

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**ORGANOTİPİK MODELLERE UYGULANAN  
FARKLI İRRİGASYON PROTOKOLLERİNİN APİKAL PAPILLAYA AİT  
KÖK HÜCRELERİN CANLILIĞINA ETKİSİ**

**Dt. Merve ÖZGÜVEN AKBULUT**

**ENDODONTİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ali ERDEMİR**

**2016 - KIRIKKALE**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

ORGANOTİPİK MODELLERE UYGULANAN  
FARKLI İRRİGASYON PROTOKOLLERİNİN APİKAL PAPILLAYA AİT  
KÖK HÜCRELERİN CANLILIĞINA ETKİSİ

Dt. Merve ÖZGÜVEN AKBULUT

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ali ERDEMİR

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014/05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

2016 - KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Endodonti Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu  
çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05 / 12 / 2016



İmza

Prof. Dr. Ali ERDEMİR

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Hatice Ebru OLGUN ERDEMİR

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği  
Fakültesi

Üye



İmza

Doç. Dr. Senem Gökçen YİĞİT ÖZER

Adnan Menderes Üniversitesi, Diş Hekimliği  
Fakültesi

Üye



İmza

Yrd. Doç. Dr. Hicran Dönmez Özkan

Adnan Menderes Üniversitesi, Diş Hekimliği  
Fakültesi

Üye



İmza

Yrd. Doç. Dr. Meltem Karşıyaka Hendek

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği  
Fakültesi

Üye

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	X
Çizelgeler	XIII
ÖZET	1
SUMMARY	4
1 GİRİŞ.....	7
1.1 Rejeneratif Endodontinin Tarihçesi.....	9
1.2 Diş Gelişimi.....	12
1.3 Rejeneratif Endodontide Klinik Öncesi Uygulamalar.....	13
1.3.1 Kök Hücreler.....	13
1.3.1.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	14
1.3.1.1.1 Farklılaşma Yetkinliğine Göre (Alison ve ark. 2002).....	14
1.3.1.1.2 Elde Edildikleri Döneme Göre (Fortier 2005).....	16
1.3.1.2 Dental Dokulardan İzole Edilen Yetişkin Kök Hücreler.....	16
1.3.1.2.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	17
1.3.1.2.2 Apikal Papilla Kök Hücreleri.....	18
1.3.1.2.3 Periodontal Ligament Kök Hücreleri.....	20
1.3.1.2.4 Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri.....	20
1.3.1.2.5 Dental Folikül Kök Hücreleri.....	21
1.3.1.2.6 Diş Germi Progenitör Hücreleri.....	21
1.3.1.3 Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	22
1.3.1.3.1 Akan Hücre Ölçer.....	22



1.3.2	Sinyal Molekülleri/Büyüme Faktörleri .....	26
1.3.3	İskeleler .....	29
1.3.3.1	Trombositten Zengin Plazma .....	31
1.3.3.2	Kitosan.....	32
1.3.3.3	Hidrojeller.....	33
1.4	Rejeneratif Endodontide Klinik Uygulamalar.....	34
1.4.1	Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonu .....	35
1.4.1.1	Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonunda Kullanılan İrrigasyon Ajanları.....	35
1.4.1.1.1	Sodyum Hipoklorit .....	36
1.4.1.1.2	Etilendiamintetraasetik Asit.....	37
1.4.1.1.3	Klorheksidin .....	38
1.4.1.2	Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonunda Kullanılan İrrigasyon Ajanlarıyla İlgili Yapılan Çalışmalar .....	39
1.5	Hücre Proliferasyon Ölçüm Yöntemleri.....	42
1.5.1	WST-1 .....	43
1.6	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sistemleri ile Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi .....	43
1.7	İkili Boyama Yöntemiyle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi .....	44
1.8	Amaç .....	44
2	GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
2.1	Etik Kurul Onayı .....	46
2.2	Hastaların Çalışmaya Dâhil Edilme Kriterleri .....	46
2.3	Hücre İzolasyonu ve Primer Hücre Kültürü.....	47
2.4	Hücrelerin Pasajlanması .....	49
2.5	Akan Hücre Ölçer ile SCAP Karakterizasyonu.....	49
2.6	Organotipik Kök Kanal Modellerinin Hazırlanması .....	53

2.7	Organotipik Kök Kanal Modellerinin İrrigasyonu .....	54
2.8	PRP'nın Hazırlanması .....	56
2.9	Hücre Sayımı .....	58
2.10	SCAP ve PRP'nın Organotipik Kök Kanal Modellerine Yerleştirilmesi....	59
2.11	WST-1 ile SCAP Canlılığının Belirlenmesi.....	61
2.12	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemiyle (xCELLigence RTCA) Zamana Bağlı SCAP Proliferasyonunun Belirlenmesi .....	62
2.13	İkili Boyama Yöntemi ile SCAP'nde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	64
2.13.1	İkili Boyama Yönteminde Kullanılacak Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması .....	64
2.13.2	Deneyin Yapılışı .....	65
2.14	SEM Analizi .....	67
2.15	İstatistiksel Analiz .....	69
3	BULGULAR.....	70
3.1	SCAP Karakterizasyonu.....	70
3.2	SCAP Canlılığı .....	72
3.3	Zamana Bağlı SCAP Proliferasyonu .....	79
3.4	SCAP'nde Apoptoz ve Nekroz Varlığı .....	85
3.5	SEM Analizi .....	90
4	TARTIŞMA VE SONUÇ .....	100
5	KAYNAKLAR .....	116
6	EKLER .....	139
7	ÖZGEÇMİŞ .....	143

## ÖNSÖZ

Yoğun emekler sonrası kazandığım uzmanlık sınavının ardından, her anımı hayatım boyunca hatırlayacağım üç yıllık asistanlık dönemim sonunda bu tez çalışmasını nihayete erdirmiş olmanın mutluluğunu yaşıyorum.

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana yol gösteren, uzmanlık dönemi ve tez çalışma süreçlerimde öncelikle engin bilgi ve tecrübelerini özveriyle paylaşan, çalışmalarımın hiçbir aşamasında desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan, benim de kendisiyle çalışmış olmak ve uzmanlık öğrencisi olmaktan gururla bahsedeceğim ve her daim saygıyla hatırlayacağım çok değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Ali ERDEMİR'e,

Çalışmalarım sırasında değerli görüş ve fikirlerine başvurduğum ve tezimin analizlerinin gerçekleştirilmesinde bana yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Tez izleme komitesindeki saygıdeğer hocalarım Sn. Prof. Dr. Hatice Ebru OLGUN ERDEMİR ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖZCAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen KÜBTAL çalışanlarına,

SEM fotoğraflarının çekimindeki destekleri için Hitit Üniversitesi öğretim üyesi Sn. Doç. Dr. Hakan GÜNGÜNEŞ'e,

Çalışmamıza verdiği mali destek için KKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım, bu zorlu tempoda desteklerini hep hissettiğim çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde beni destekleyip, daima yanımda olan her şeyden çok sevdiğim canım ailem ve dostlarıma,

Üzüntülerimi sevince, tüm zorları kolaylığa, hayatımı mutluluğa çeviren biricik eşim sevgili Bera AKBULUT'a,

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AAE</b>	: American Association of Endodontists
<b>APC</b>	: Allophycocyanin
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>BMP</b>	: Bone Morphogenetic Protein
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Hidroksit
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation
<b>CHX</b>	: Klorheksidin
<b>CI</b>	: Cell Index
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DFSCs</b>	: Dental Follicle Stem Cells
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DPSCs</b>	: Dental Pulp Stem Cells
<b>EDTA</b>	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
<b>EGF</b>	: Epidermal Growth Factor
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FACS</b>	: Fluorescence-activated Cell Sorting
<b>FGF</b>	: Fibroblast Growth Factor

<b>FITC</b>	: Fluorescein Isothiocyanate
<b>FS</b>	: Forward Scatter
<b>HA/TCP</b>	: Hidroksiapatit/Trikalsiyum Fosfat
<b>HBSS</b>	: Hank's Balanced Salt Solution
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IGF</b>	: Insulin-like Growth Factor
<b>ISCT</b>	: International Society for Cellular Therapy
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>MSC</b>	: Mesenchymal Stem Cell
<b>MTA</b>	: Mineral Trioxide Aggregate
<b>NaOCl</b>	: Sodyum Hipoklorit
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PCNA</b>	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived Growth Factor
<b>PDLSCs</b>	: Periodontal Ligament Stem Cells
<b>PE</b>	: Phycoerythrin
<b>PEG</b>	: Polietilen Glikol
<b>PerCP-Cy</b>	: Peridinin Chlorophyll-Cyanines
<b>PGA</b>	: Poliglikolik Asit
<b>PLA</b>	: Polilaktik Asit
<b>PLGA</b>	: Polilaktik-koglikolik Asit
<b>PMT</b>	: Photo Multiplier Tubes
<b>PRP</b>	: Platelet-rich Plasma

<b>RTCA</b>	: Real-time Cell Analysis
<b>RT-PCR</b>	: Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
<b>SCAP</b>	: Stem Cells of the Apical Papilla
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SHED</b>	: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences
<b>SS</b>	: Side Scatter
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming Growth Factor-Beta
<b>TGPCs</b>	: Tooth Germ Progenitor Cells
<b>VEGF</b>	: Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WST-1</b>	: Water-soluble Tetrazolium Salt
<b>MEM-<math>\alpha</math></b>	: Minimum Essential Medium-Alpha
<b><math>\mu</math>L</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	: Mikrometre
<b>%</b>	: Yüzde
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	: Santigrad derece

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1</b> FS/SS histogramında periferik kan hücrelerinin dağılımı ve kapılanması..	24
<b>Şekil 1.2</b> FL-1/FL-2 histogramı ile hücre süspansiyonu içindeki farklı hücre popülasyonlarının floresan yoğunluklarına göre gösterimi .....	24
<b>Şekil 2.1</b> Çalışmada kullanılan minimum essential medium-alpha (MEM- $\alpha$ ) .....	48
<b>Şekil 2.2</b> Flask içerisinde primer kültürü yapılmış apikal papilla dokusu.....	48
<b>Şekil 2.3</b> Çalışmada kullanılan akan hücre ölçer .....	50
<b>Şekil 2.4</b> Human MSC Analysis Kit.....	50
<b>Şekil 2.5</b> Çalışmada kullanılan BD Pharmingen™ Stain Buffer ve BD™ Accutase™ Cell Detachment Solution.....	52
<b>Şekil 2.6</b> Organotipik kök kanal modellerinin görünümü .....	54
<b>Şekil 2.7</b> Hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyonundan sonra indikatördeki renk değişimi .....	54
<b>Şekil 2.8</b> Kök kanal modellerinin irrigasyonu .....	56
<b>Şekil 2.9</b> Çalışmamızda kullanılan PRP kit içeriği.....	56
<b>Şekil 2.10</b> İlk santrifüjden sonraki görünüm.....	57
<b>Şekil 2.11 (A)</b> İkinci santrifüjden sonraki görünüm <b>(B)</b> İzole edilen PRP .....	58
<b>Şekil 2.12</b> Çalışmada kullanılan hücre sayım cihazı .....	59
<b>Şekil 2.13 (A)</b> Çalışmamızda kullanılan transwell insertler <b>(B)</b> Kök kanal modellerinin transwell içerisine dik bir şekilde yerleştirilmesi .....	60
<b>Şekil 2.14</b> Kök kanal modelleri yerleştirildikten sonra transwell ve kuyuların besiyeri ile doldurulması .....	60
<b>Şekil 2.15</b> Kök kanal modellerinin WST-1 ile inkübasyon sonrası görünümü .....	62
<b>Şekil 2.16</b> Çalışmamızda kullanılan xCELLigence RTCA sistemi.....	63
<b>Şekil 2.17</b> E-plate kuyucuklarının irrigasyon ajanları ile yıkanması.....	63
<b>Şekil 2.18</b> Çalışmada kullanılan floresan ataçmanlı inverted mikroskop.....	66
<b>Şekil 2.19</b> Çalışmada kullanılan altın-palladyum kaplama cihazı .....	68
<b>Şekil 2.20</b> Altın-palladyum tabaka ile kaplanan örneklerin SEM cihazına yerleştirilmesi .....	68
<b>Şekil 2.21</b> Çalışmada kullanılan SEM cihazı.....	69
<b>Şekil 3.1</b> Akan hücre ölçerde SCAP'nin analizi <b>(A)</b> Tüm popülasyon içerisinden canlı hücrelerin kapılanması (P1 kapısı) <b>(B)</b> Sadece canlı hücrelerin gösterilmesi (P2 kapısı) <b>(C)</b> P2 kapısı içinde negatif kokteyldeki antikorlarla boyanmayan hücrelerin kapılanması (P3 kapısı) <b>(D)</b> P3 kapısı içinde CD105 pozitif hücrelerin kapılanması (P4 kapısı) <b>(E)</b> P4 kapısı içinde CD73 ve CD90 pozitif hücrelerin kapılanması (P8 kapısı) .....	71
<b>Şekil 3.2</b> Akan hücre ölçerde analizi yapılan hücrelerin yüzde değerleri.....	72
<b>Şekil 3.3</b> WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. güne ait absorbans değeri ortalamalarının grafiksel görünümü.....	73

<b>Şekil 3.4</b> WST-1 yöntemi ile elde edilen 7. güne ait absorbands değeri ortalamalarının grafiksel görünümü.....	74
<b>Şekil 3.5</b> Tüm gruplarda WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. ve 7. güne ait absorbands değeri ortalamalarının grafiksel görünümü .....	77
<b>Şekil 3.6</b> Tüm gruplarda WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. ve 7. güne ait yüzde canlılık değerlerinin grafiksel görünümü .....	78
<b>Şekil 3.7</b> %5 (Grup 2) ve %17'lik EDTA (Grup 3)'in tek başına kullanıldığı grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyonu grafiği .....	80
<b>Şekil 3.8</b> %5'lik EDTA kullanılan tüm grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği.....	81
<b>Şekil 3.9</b> %17'lik EDTA kullanılan tüm grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği.....	82
<b>Şekil 3.10</b> Tüm gruplara ait zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği .....	84
<b>Şekil 3.11</b> İkili boyama yöntemine ait 24 saat sonunda elde edilen yüzde nekroz değerlerinin grafiksel görünümü .....	86
<b>Şekil 3.12</b> Grup 1 (kontrol), Grup 2 (%5 EDTA) ve Grup 3 (%17 EDTA)'ün DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri .....	87
<b>Şekil 3.13</b> Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA), Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA) ve Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'nın DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri.....	88
<b>Şekil 3.14</b> Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA), Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA) ve Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'un DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri.....	89
<b>Şekil 3.15</b> Grup 1 (kontrol)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü... 91	
<b>Şekil 3.16</b> Grup 1 (kontrol)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü. 91	
<b>Şekil 3.17</b> Grup 2 (%5 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	92
<b>Şekil 3.18</b> Grup 2 (%5 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	92
<b>Şekil 3.19</b> Grup 3 (%17 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	93
<b>Şekil 3.20</b> Grup 3 (%17 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	93
<b>Şekil 3.21</b> Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	94
<b>Şekil 3.22</b> Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	94
<b>Şekil 3.23</b> Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	95



<b>Şekil 3.24</b> Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü.....	95
<b>Şekil 3.25</b> Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'dan 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	96
<b>Şekil 3.26</b> Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'dan 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	96
<b>Şekil 3.27</b> Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	97
<b>Şekil 3.28</b> Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü.....	97
<b>Şekil 3.29</b> Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü.....	98
<b>Şekil 3.30</b> Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü.....	98
<b>Şekil 3.31</b> Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'dan 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü .....	99
<b>Şekil 3.32</b> Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'dan 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü.....	99

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1</b> Rejenerasyon ve tamirde önemli role sahip olduğu bilinen büyüme faktörleri .....	27
<b>Çizelge 2.1</b> Human MSC Analysis Kit İçeriği.....	51
<b>Çizelge 3.1</b> xCELLigence RTCA sistemine ait 116 saat sonunda elde edilen ortalama CI ve standart sapma değerleri .....	79
<b>Çizelge 3.2</b> İkili boyama yöntemine ait 24 saat sonunda elde edilen yüzde nekroz ve standart sapma değerleri .....	85



## ÖZET

### **Organotipik Modellere Uygulanan Farklı İrrigasyon Protokollerinin Apikal Papillaya Ait Kök Hücrelerin Canlılığına Etkisi**

Rejeneratif endodontik prosedürler pulpa nekrozlu immatür daimi dişlerin tedavisi için uygulanabilir bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Birçok rejeneratif endodontik tedavi minimal enstrümantasyonla ya da hiç enstrümantasyon yapılmaksızın gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle kök kanal dezenfeksiyonunun sağlanması rejeneratif endodontik uygulamalar içinde önemli bir yere sahiptir. Fakat rejeneratif endodontide kullanılan kimyasal ajanların bakteriyostatik/bakterisidal özellikte olması yeterli değildir; aynı zamanda hastaya ait kök hücrelerin hayatta kalma, çoğalma ve farklılaşma kapasitesini de artırabilmelidir. Bu çalışmanın amacı farklı irrigasyon protokollerinin insana ait SCAP'nin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu çalışmada insana ait immatür üçüncü molar dişlerden elde edilen SCAP akan hücre ölçer kullanılarak karakterize edildi. CD73, CD90 ve CD105 markırlarını aynı anda eksprese hücrelerin yüzdesi %90'ın üzerindeydi. Karakterize edilen SCAP tüm deneylerde kullanıldı.

Çalışmada WST-1 yöntemi için 43 adet yeni çekilmiş tek köklü insan dişi kullanıldı. Dişler çekilir çekilmez steril ve soğuk HBSS içerisine yerleştirildi. Bütün dişlerin kron kısmı, dişin uzun aksına dik olarak kesilerek uzaklaştırıldı. 5 mm uzunluğa sahip standart kök segmentleri oluşturmak için steril edilmiş yüksek hızda frezler kullanıldı. 1,3 mm çapında paralel duvarlı kanal yapısı hazırlamak için konik olmayan LSX eğeler kullanıldı ve böylelikle rejeneratif vakaların çoğunda karşılaşılan açık/immatür apeks taklit edilmiş oldu. Bütün organotipik kök kanal modelleri hava ile kurutulup, hidrojen peroksit gazıyla steril edildi ve 1 kontrol grubu (n=3) ve 8 deney grubu (n=5) olmak üzere rastgele 9 farklı gruba ayrıldı. Her grupta farklı bir irrigasyon protokolü uygulandı: (Grup 1) irrigasyon yapılmadı, (Grup 2) %5 EDTA, (Grup 3) %17 EDTA, (Grup 4) %1 NaOCl+%5 EDTA, (Grup 5) %2,5 NaOCl+%5 EDTA, (Grup 6) %5 NaOCl+%5 EDTA, (Grup 7) %1 NaOCl+%17 EDTA, (Grup 8) %2,5 NaOCl+%17 EDTA, (Grup 9) %5 NaOCl+%17 EDTA ile irrigasyon yapıldı. Tüm

deney gruplarında irrigasyon ajanı artıklarını uzaklaştırmak amacıyla steril salin kullanılarak final irrigasyon yapıldı. Tüm bu prosedürlerin ardından izole SCAP, PRP ile karıştırılarak organotipik modeller içerisine ekildi. Bu modeller dik bir şekilde 0,4 µm boyutunda porlara sahip transwell insertler (Corning, Tewksbury, MA) içerisine yerleştirildi, 3 ve 7 gün boyunca inkübe edildi. Besiyeri ise her 2 günde bir kez tazelenildi. İrrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı üzerine etkisi WST-1 yöntemi ile değerlendirildi. İki farklı değerlendirme zamanı için absorbans değerlerini belirlemek amacıyla mikropilaka spektrofotometri cihazı (BioTek, PowerWave XS2) kullanıldı. İstatistiksel analizlerde Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis H testi kullanıldı ( $\alpha=0,05$ ). Grup içi değerlendirmeler ise Wilcoxon işaret testi ile yapıldı.

SCAP'nin proliferasyonu, xCELLigence RTCA sistemi ve 96 kuyucuklu E-plate (Roche, Basel, Switzerland) kullanılarak belirlendi. Bu sistemde irrigasyon protokolleri E-plate kuyucuklarına uygulandı ve ardından PRP/SCAP süspansiyonu steril otomatik bir pipet yardımıyla yine E-plate kuyucuklarına ekildi. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. 116 saat boyunca her kuyucuğun empedans değeri xCELLigence sistemi ile takip edildi ve CI değeri olarak sunuldu. Verilerin analizi için Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis H testi kullanıldı ( $\alpha=0,05$ ).

Apoptotik/nekrotik hücreler ikili boyama yöntemi ile değerlendirildi. Bu sistemde irrigasyon protokolleri kuyucuklara uygulandı ve ardından PRP/SCAP süspansiyonu steril otomatik bir pipet yardımıyla yine kuyucuklara ekildi. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. 24 saat inkübasyonun ardından, floresan ataçmanlı inverted mikroskop (DMI6000B, Leica, Germany) yardımıyla her kuyudan bir görüntü alındı. Tüm hücre ve apoptotik hücre sayısı DAPI filtresi altında belirlenirken, nekrotik hücrelerin sayısı FITC filtresi altında belirlendi. Elde edilen değerlerle apoptoz/nekroz oranı hesaplandı. İstatistiksel analizlerde Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis H testi kullanıldı ( $\alpha=0,05$ ).

SEM analizi için 9 adet yeni çekilmiş tek köklü insan dişi kullanıldı. Bütün dişlerin kron kısımları dişin uzun aksına dik olarak kesilerek uzaklaştırıldı. Kök kanalları çalışma boyutunda hazırlandıktan sonra, bütün kökler longitudinal olarak ikiye ayrıldı. Örnekler hava ile kurutuldu, hidrojen peroksit gazı ile steril edildi ve rastgele 9 gruba ayrıldı. İrrigasyon protokolleri uygulandıktan sonra, izole edilen

SCAP, PRP ile karıştırıldıktan sonra kök kanalları içerisine ekildi. Örnekler yatay bir şekilde 12 kuyucuklu mikroplakalara yerleştirildi ve 7gün boyunca inkübe edildi. Besiyeri ise her 2 günde bir kez tazelenildi. Ardından örnekler SEM analizi için hazırlandı. 1 000× ve 10 000× büyütmede görüntüler alındı.

WST-1 yönteminde, 3. günde yapılan ölçümlerde Grup 8 en yüksek absorbans değerine sahipken, 7. günde Grup 3'ün en yüksek absorbans değerine sahip olduğu görüldü. Her iki zaman ölçümünde de en düşük SCAP canlılık oranı Grup 6'da görüldü.

xCELLigence RTCA sisteminde, 116 saat sonunda en yüksek değerler EDTA'in tek başına kullanıldığı gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) görülürken, en düşük değerler %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda (Grup 6 ve Grup 9) görüldü. En yüksek proliferasyon oranına sahip bu gruplar (Grup 2 ve Grup 3) ile Grup 5, 6 ve 9 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

İkili boyama yönteminde 24 saat sonunda elde edilen verilere göre en yüksek nekroz oranı %5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 6) ile irrigasyon yapılan grupta gözlenirken, en düşük nekroz oranı %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupta gözlemlendi. Hiçbir grupta apoptotik hücreye rastlanmadı.

SEM analizi sonuçlarına göre, sadece EDTA'in kullanıldığı (Grup 2 ve Grup 3) ve %2,5 NaOCl+%17 EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 8), SCAP'nin küçük topluluklar halinde ve diğer gruplara göre daha yoğun olarak dentin yüzeyine tutunduğu görüldü. %5'lik NaOCl ile irrigasyon yapılan gruplardan (Grup 6 ve Grup 9) 1 000× büyütmede alınan SEM görüntülerinde ise, fibrin ağ yoğunluğunun azaldığı tespit edildi.

Sonuç olarak, %5'lik NaOCl'in dâhil edildiği irrigasyon protokollerinin SCAP üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu görüldü. NaOCl ile yapılan irrigasyonun SCAP üzerindeki olumsuz etkilerini geri çevirmede ise, %17'lik EDTA'in %5'lik EDTA'e göre daha başarılı olduğu tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** Apikal Papilla Kök Hücreleri, Canlılık, Etilendiamintetraasetik Asit, İrrigasyon, Rejeneratif Endodonti

## SUMMARY

### **Effect of Different Irrigation Protocols on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in Organotype Models**

Regenerative endodontic procedures have emerged as viable “alternatives for the treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis. Most regenerative endodontic procedures include minimal to no mechanical instrumentation. Therefore, root canal disinfection is an important part in regenerative endodontic procedures. However, chemical agents used in regenerative endodontics must be selected not only based on their bactericidal/bacteriostatic characteristics but also on their ability to promote the survival, proliferation and differentiation capacity of the patient’s stem cells. The aim of this study was to evaluate the effect of different irrigation protocols on the survival of human SCAP in organotype models. SCAP were isolated from immature human third molars and characterized by flow cytometry. The percentage of cells that coexpressed CD73, CD90, and CD105 was >90%. The characterized SCAP were used in all experiments.

In the study 43 recently extracted with single canal human teeth were used for WST-1 method. Extracted teeth were immediately placed in sterile ice-cold HBSS. All teeth were decoronated perpendicular to the long axis. Sterilized high-speed burs were used to section roots to achieve standardized segment lengths of 5 mm. Nontapered LSX instruments were used to prepare a parallel-walled canal space with a constant 1,3 mm diameter. Thus, an open/immature apex was simulated often observed in regenerative cases. All organotype root canal models were air dried, gas sterilized with hydrogen peroxide, and randomly divided into 1 control group (n=3) and 8 experiment groups (n=5). Different irrigation protocols were performed on each group: (Group 1) no irrigation, (Group 2) 5% EDTA, (Group 3) 17% EDTA, (Group 4) 1% NaOCl+5% EDTA, (Group 5) 2,5% NaOCl+5% EDTA, (Group 6) 5% NaOCl+5% EDTA, (Group 7) 1% NaOCl+17% EDTA, (Group 8) 2,5% NaOCl+17% EDTA, (Group 9) 5% NaOCl+17% EDTA. The final irrigation was done with sterile

saline in all experiment groups to remove residual irrigant. Following this procedures, isolated SCAP were mixed with PRP and seeded into the organotype models. The models containing PRP and cells were placed vertically into the transwell inserts (Corning, Tewksbury, MA) with 0,4  $\mu\text{m}$  pore size and incubated for 3 and 7 days and the medium was refreshed once every 2 days. After all of these procedures, the effect of irrigation protocols on SCAP survival was evaluated with WST-1 method. To determine the absorbans value the microplate spectrophotometer was used (BioTek, PowerWave XS2) for two different evaluation time. Kruskall-Wallis H and post hoc Bonferroni test were used in statistical analysis ( $\alpha=0,05$ ). Wilcoxon signed-rank test used for intra-group comparison.

The proliferation of SCAP was determined using the xCELLigence RTCA and E-plate 96 system (Roche, Basel, Switzerland). In this system, the irrigation protocols were applied on the E-plate and then PRP/SCAP suspension was seeded onto the E-plate via a sterile automatic pipette. These experiments were done in triplicates. The impedance value of each well was monitored by the xCELLigence system for 116 hours and expressed as a CI value. Kruskall-Wallis H and post hoc Bonferroni test were used for analysing the data ( $\alpha=0,05$ ).

Apoptotic/necrotic cells was evaluated with double-staining method. In this method, the irrigation protocols were applied on the plate and then PRP/SCAP suspension was seeded onto the plate via a sterile automatic pipette. These experiments were done in triplicates. After 24 hour incubation, an image was taken from each well by the inverted fluorescence microscope (DMI6000B, Leica, Germany). While the number of all and apoptotic cells determining under the DAPI filter, the number of necrotic cells were determined under the FITC filter. After that apoptosis/necrosis rate was calculated. Kruskall-Wallis H and post hoc Bonferroni test were used in statistical analysis ( $\alpha=0,05$ ).

9 recently extracted with single canal human teeth were used in this study for SEM analysis. All teeth were decoronated perpendicular to the long axis. After the root canals were prepared at working length, all roots were split longitudinally. All samples were air dried, gas sterilized with hydrogen peroxide, and randomly divided in into 9 groups. After irrigation protocols were applied, isolated SCAP were mixed

with PRP and seeded into the root canals. The samples containing PRP and cells were placed horizontally into the 12 well plate and incubated for 7 days and the medium was refreshed once every 2 days. Then the samples were prepared for SEM analysis. The images were taken at 1 000× and 10 000× magnifications.

In WST-1 method, while the measurements which took place at 3<sup>rd</sup> day showed that Group 8 has the highest absorbance value, at 7<sup>th</sup> day it was seen that Group 3 had the highest absorbance value. The measurements which made 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days showed that in both time period group 6 had the lowest absorbance value.

In xCELLigence RTCA system, after 116 hours of incubation, the highest proliferation rates were seen in Group 2 and Group 3 where only EDTA used, in the meanwhile the proliferation rates were seen in Group 6 and Group 9 where 5% NaOCl used. There were statistically significant differences between the groups which had the highest proliferation rates (Group 2 and Group 3) and Group 5,6 and 9 ( $p < 0,01$ ).

According to the datas which obtained by double staining method after 24 hours, the highest necrosis rate observed in Group 6 which was irrigated with 5% NaOCl+5%EDTA, the lowest necrosis rate observed in Group 3 which was irrigated with 17% EDTA. There was no apoptotic cell in any group.

According to SEM analysis results it has been seen that, in Group 2 and Group 3 which only EDTA used and Group 8 which irrigated with 2,5% NaOCl+17% EDTA, SCAP in small communities attached on dentine surface more consistent than the other groups. On the other hand, in SEM images which were taken at 1 000× magnification from Group 6 ve Group 9 which irrigated with 5% NaOCl, it has been detected that fibre web consistency has decreased.

As a result, it has been seen that, the irrigation protocols which 5% NaOCl included have negative effects on SCAP. It has been detected to reverse the negative effects of NaOCl irrigation on SCAP, 17% EDTA is more successful than %5 EDTA.

**Keywords:** Ethylenediaminetetraacetic Acid, Irrigation, Regenerative Endodontics, Stem Cells of the Apical Papilla, Survival



# 1 GİRİŞ

Geleneksel diş hekimliğinde, optimal koşullar altında gerçekleştirilen bazı uygulamalarda başarı oranının %90'ın üzerinde olduğu belirtilmektedir (Schwartz-Arad ve ark. 2005). İçerikleri güçlendirilmiş yeni materyallerin gelişimi, bazı prosedürlerde teknik hassasiyeti etkileyecek durumlara özen gösterilmesi ve halk arasında ağız ve diş sağlığı konusunda oluşan farkındalık bu başarı oranına ulaşılmasında etkili olmuştur. Son yıllarda dental materyallerin biyouyumluluğu üzerine odaklanması da, tedavi sonrası diş ve periodonsiyumda olumsuz hücresel yanıtlar oluşmadan güven verici sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Ama yine de kabul etmek gerekir ki, geleneksel yaklaşımların çoğu sadece dişin yapısal bütünlük, fonksiyon ve estetiğinin geri kazandırılmasına yönelik tedavileri kapsamaktadır ve genel olarak hala dokulardaki biyolojik canlılığı teşvik etmeye yönelik tedaviler değildir. Bu durumdaki bir dişin fiziksel savunma mekanizması ve ağrı iletiminde rol alan sinirlerin olmaması nedeniyle ilerleyen dönemlerde riske maruz kalma ihtimali artmaktadır (Schmalz ve Smith 2014).

Dentisyon döneminde immatür dişler, travma ve dens evaginatus gibi gelişimsel dental anomaliler nedeniyle pulpa nekrozu riskiyle karşı karşıyadır (Andreasen ve Ravn 1972, Yip 1974, Kling ve ark. 1986, Andreasen ve ark. 1995, McCulloch ve ark. 1998, Sobhi ve ark. 2004, Soriano ve ark. 2007). Karma dentisyona sahip genç hastalarda immatür daimi bir dişin kaybı; aynı zamanda fonksiyon kaybı, maloklüzyon ve maksillofasiyal gelişimin yetersizliği gibi yıkıcı sonuçlara neden olabileceğinden, bu dişler mümkün olduğunca ağızda tutulmalıdır (Diogenes ve ark. 2014). Fakat nekrotik pulpaya sahip immatür bir dişin kök kanal tedavisi çeşitli zorlukları da beraberinde getirir (Wigler ve ark. 2013). Mekanik enstrümantasyonla kök dentininin uzaklaştırılması, zaten ince olan kök kanal duvarlarını daha da kırılgan hale getireceği için kontrendikedir. Kök kanal dolgu materyalinin periapikal bölgeye taşırılmadan kök kanalının doldurulması klinik açıdan zordur, çünkü birbirinden uzak kök kanal duvarlarının oluşturduğu büyük apikal açıklık kanal dolgu materyalinin apikalden taşmasını önleyecek gerekli mekanik dayanağı sağlayamaz (Wigler ve ark. 2013).

1966 yılında Alfred L. Frank apikal kapanmayı teşvik edici bir tekniği tanımlayan bir makale yayınlamıştır. Bu çalışmada 3 aydan 6 aya kadar, kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) kullanılarak gerçekleştirilen pansumanlar sonrası apikal lezyonun iyileşmesinin yanı sıra kök apeksinin kalsifiye doku ile kapandığı da gösterilmiştir (Frank 1966). Bunu takip eden çalışmalar (Torneck ve Smith 1970, Torneck ve ark. 1973c, Torneck ve ark. 1973b, Torneck ve ark. 1973a) ise bu durumun yeni bir hücre popülasyonunun varlığıyla beraber apikaldeki enfeksiyondan sonra canlı kalan rezidüel papilla ve kök kını hücrelerinin stimüle olmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra Cvek (1972) tarafından yapılan bir çalışmada apeksifikasyon tedavisi uygulanan 55 adet nonvital daimi kesici diştten 50'sinde tedaviden 14-21 ay sonra iyileşme ve apikal kapanmanın gerçekleştiği fakat kök oluşumunun devam etmediği tespit edilmiştir.

$\text{Ca(OH)}_2$  ile yapılan apeksifikasyonun birçok dezavantajı bulunmaktadır. Uzun bir zaman periyodu boyunca (6-24 ay) çoklu seans gerektiren bir tedavi seçeneğidir (Kleier ve Barr 1991, Mohammadi ve Dummer 2011) ve bu zaman zarfında uzun süre  $\text{Ca(OH)}_2$ 'e maruz bırakılan dentinin mekanik dayanımı da zarar görmektedir (Mohammadi ve Dummer 2011).

$\text{Ca(OH)}_2$  ile apeksifikasyon tedavisine alternatif bir prosedür Torabinejad ve Chivian (1999) tarafından öne sürülmüştür. Bu prosedürde, 1 ya da 2 seansta kök kanal temizliği ve Mineral Trioksit Agregatın (MTA) apikal tıkaç olarak kullanılmasıyla dolgu materyali taşırılma riski en aza indirilmiş ve apikal onarım teşvik edilmiştir.

Simon ve ark. (2007) ise açık apeks ve apikal lezyonlu bir dişte bu tekniği sadece bir seansta gerçekleştirerek sonuçları değerlendirmişler ve  $\text{Ca(OH)}_2$  ile apeksifikasyon tedavisine göre makul ve öngörülebilir bir tedavi alternatifi olduğu sonucuna varmışlardır. Her ne kadar bu tedavi sadece 1 seansta olumlu bir iyileşmeyle sonuçlansa da,  $\text{Ca(OH)}_2$  ile apeksifikasyon tekniğinin oluşturduğu olumsuz sonuçları ortadan kaldıramamıştır (Mente ve ark. 2009). Yani kök gelişiminin devamı sağlanamamıştır ve immatür diş hala kök fraktürüne yatkındır (Cvek 1992). Bu eksiklikler klinisyenleri tedavi sonrası apikal periodontitisin iyileşmesine ek olarak pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu ve kök gelişiminin devamını teşvik ederek pulpanın normal fizyolojik fonksiyonlarının geri kazandırılmasını amaçlayan biyolojik

temelli prosedürleri araştırmaları için harekete geçirmiştir (Neha ve ark. 2011). Bu noktadan sonra temeli onlarca yıl öncesine dayanan rejeneratif endodontik uygulamalar nekrotik pulpaya sahip immatür dişlerin tedavisi için uygulanabilir bir tedavi alternatifi olarak görülmeye başlanmıştır.

### 1.1 Rejeneratif Endodontinin Tarihçesi

Diş hekimliği tarihinde kaybedilmiş ya da hasarlı dokuların yerine konulması büyük lde protetik ya da biyouyumlu materyallerle yapılan endodontik tedavilerle sağlanmaktaydı. Bunun aksine rejeneratif tedavilerin amacı, dental doku ve onu destekleyen yapıların biyolojik olarak yerine konulmasıdır.

Dental dokularda rejeneratif uygulamaları destekleyen nc çalışmalar, bundan yaklaşık 65 yıl önce Dr. B.W. Hermann (1952) tarafından  $\text{Ca(OH)}_2$ 'in vital pulpa tedavisi için kullanılmasıyla başlamıştır. Nygaard-Qstby, 1960'ların başında rejeneratif endodontik uygulamalara öncülük ederek, nekrotik pulpa ve apikal lezyona sahip matür bir dişin apikal üçlüsünde yeni vaskülarize doku oluşumunun indüklendiği bir çalışma ortaya koymuştur (Qstby 1961). Bu alışmada "Kök kanal sisteminde kan pıhtısı varlığı iyileşmeyi teşvik eder." hipotezini test etmek amacıyla, temizlenmiş ve medikamentle dezenfekte edilmiş kök kanalı içine apikalden taşırılan bir kanal eğesi ile kanama uyarılmıştır. Ardından oluşan pıhtının koronali kloroperka ile kapatılmış ve hastalar 17 günden 3,5 yıla kadar farklı zaman aralıklarında takip edilmiştir. Daha sonra tedavi edilen bu dişler çekilmiş ve yeni oluşan doku histolojik olarak incelenmiştir. Tüm dişlerde; foraminal genişleme ve aşırı enstrmentasyona bağlı olarak 17 gün gibi erken bir sürede inflamasyon belirtilerinde azalma; nekrotik dişlerdeki patolojik belirtilerde azalma ve apikal kapanmanın radyografi ile görülmesi gibi sonuçlar elde edilmiştir. Histolojik analiz sonuçlarına göre, kanal içine doğru büyüyen bağ doku, bu yeni oluşan doku içerisine gömülü mineralize doku adaları ve kanal duvarları boyunca çeşitli seviyelerde mineralize doku gözlenmiştir. Aynı zamanda oluşan kan pıhtısının kanal içindeki yeni dokunun büyümesini destekleyebileceği de öne sürülmüştür. Pulpa fibroblasttan zengin bir bağ dokusu olduğu için elde edilen bu bulgular oldukça umut vaat edicidir. Fakat kanal içerisinde

istenmeyen hücre tiplerinin (sementoblastlar) varlığı ve istenilen hücrelerin (odontoblastlar) olmayışı bu protokolün tam anlamıyla pulpanın histolojik rejenerasyonunu sağlayamadığını göstermiştir. Bütün olumsuzluklara rağmen bu öncül çalışma, ileride rejeneratif endodonti alanında yapılacak çalışmalara temel oluşturmuştur.

1966 yılında, dezenfeksiyonun primer olarak seanslar arası uygulanan poliantibiyotik patıyla sağlandığı 5 vakadan oluşan bir çalışma yayınlanmıştır (Rule ve Winter 1966). Araştırmacılar, gerçekleştirilen vakalarda apikal kanamanın uyarılmasına istemeden neden olmuşlardır. Sonuç olarak tüm vakalarda hastalığa ait işaret ve belirtiler azalmış ve kök gelişiminin devam ettiği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada nekrotik pulpalı immatür dişlerin dezenfeksiyonu ve kök gelişiminin uyarılması için poliantibiyotik patı ilk kez kullanılmıştır.

Bu çalışmadan 5 yıl sonra yapılan başka bir çalışmada kanal dezenfeksiyonunun ardından, bu kez apikal kanama isteyerek uyarılmıştır (Nygaard-Qstby ve Hjortdal 1971). Vital ya da nekrotik pulpaya sahip 47 diş üzerinde yapılan bu çalışmada, dişlerin genelinde semptomların kaybolduğu görülmüştür. Ardından 9 günden 3 yıla kadar değişen sürelerde takip edilen bu dişler ya çekilmiş ya da çevresindeki yapılarla beraber kök ucu rezeke edilmiştir. Yapılan histolojik incelemede 28 adet dişte fibröz bağ doku oluşumu gözlenirken, 18 adet dişte hücreli sement varlığı tespit edilmiştir. Tüm bu çalışma sonuçlarına bakıldığında, kanal dezenfeksiyonu sonrası onarımın mümkün olduğu açıkça gösterilmiş ve böylece güncel rejeneratif tedavilerin temelleri atılmıştır.

30 yıl aradan sonra güncel rejeneratif endodontik uygulamaları içeren ilk vaka 2001 yılında yayınlanmıştır (Iwaya ve ark. 2001). Bu vakada nekrotik pulpaya sahip immatür bir dişe, enstrümantasyon yapılmaksızın, %5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) ve %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kimyasal dezenfeksiyon yapılmış ve kanal içi medikament olarak siprofloksasin ve metranidazol içeren ikili antibiyotik patı yerleştirilmiştir. Böylece, bu rejeneratif yaklaşım ile kayda değer kök gelişiminin elde edilebileceği ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca 30 ay sonra dişe uygulanan vitalite testlerine pozitif yanıt alınmıştır.

Birkaç yıl sonra sunulan başka bir vaka raporunda (Banchs ve Trope 2004) yeni bir protokol tanımlanmıştır. Nekroze pulpaya sahip immatür bir mandibular premolar, enstrümantasyon yapılmaksızın, %5,25'lik NaOCl ile dezenfekte edilmiştir. Ardından siprofloksasin, minosiklin ve metranidazol içeren üçlü antibiyotik patı 28 gün boyunca kanalda tutulmuştur. İkinci seansta antibiyotik karışımı salin ile irriga edilerek uzaklaştırılmış ve apikal kanama uyarılmıştır. Oluşan kan pıhtısının üzerine, MTA dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra, kavite nemli bir pamuk pelet ve geçici bir restorasyonla kapatılmıştır. 2 hafta sonra geçici restorasyon ve pamuk pelet uzaklaştırılarak daimi restorasyon yapılmış ve hastada herhangi bir semptom ve bulguya rastlanmamıştır. Sunulan bu vaka raporunda kök gelişiminin devam ettiği görülmüş ve 2 yılın sonunda vitalite testlerine pozitif yanıt alınmıştır. Daha da önemlisi bu vaka raporunda tanımlanan protokol geniş kabul görmüş ve günümüzde en çok kullanılan rejeneratif tedavi protokolü haline gelmiştir.

Rejeneratif endodontik uygulamalarda başarı kriterlerini tanımlamak zordur, fakat kök gelişiminin derecesi başarıyı belirleyen önemli bir kriterdir. Buradan yola çıkılarak gerçekleştirilen retrospektif bir çalışmada (Bose ve ark. 2009); rejeneratif prosedürlerin uygulandığı, cerrahi olmayan kök kanal tedavisinin ve MTA ile apeksifikasyonun gerçekleştirildiği tedavilere ait radyografiler toplanmış, ardından bu radyografiler dijital ortamda kök kalınlığı ve uzunluğunun ölçümüne izin veren bir yazılım programı kullanılarak standardize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, rejeneratif prosedürlerle tedavi edilen grupta kök kalınlığı ve uzunluğundaki artış diğer gruplara göre belirgin derecede fazladır. Ayrıca bu çalışma sonuçlarına göre, kök kalınlığında %30 değişiklik oluşabilmesi için yaklaşık 1 yıl süre gerekirken, aynı başarıyı kök uzunluğunda elde etmek için 3 yıl beklemek gerektiği söylenebilir.

Yapılan güncel çalışmalardan birinde (Jeeruphan ve ark. 2012), bu kez rejeneratif endodontiye ait standart bir protokol, MTA ile immedat apeksifikasyon ve Ca(OH)<sub>2</sub> ile uzun süreli apeksifikasyonla tedavi edilen dişler arasında klinik sonuçlar değerlendirilmiş ve daha önce yapılan retrospektif bir çalışmaya (Bose ve ark. 2009) benzer bulgular elde edilmiştir. Revaskularizasyon protokolünün uygulandığı dişlerde kök kalınlığında yaklaşık %28, kök uzunluğunda ise yaklaşık %15 artış gözlenirken; Ca(OH)<sub>2</sub> ile uzun süreli apeksifikasyonun gerçekleştirildiği dişlerde kök kalınlığındaki artış %1,5, MTA ile immedat apeksifikasyon uygulanan dişlerde ise kök

uzunluğundaki artış %6 olarak bulunmuştur. Ayrıca ilk kez bu çalışmada, yapılan tedaviler sonrası dişlerin ağızda kalma oranları değerlendirilmiştir. Buna göre, rejeneratif tedavi prosedürlerinin uygulandığı grupta bu oran %100 iken, MTA ile immedat apeksifikasyonun gerçekleştiği grupta %95 ve apeksifikasyon için uzun süreli Ca(OH)<sub>2</sub> kullanılan grupta ise %77 olarak tespit edilmiştir. Ca(OH)<sub>2</sub>'in kullanıldığı grupta diş kayıpları (%23) restore edilemeyecek derecede kök fraktürlerinin oluşmasından kaynaklanmıştır. Bu çalışma, rejeneratif tedavilerin dişin ağızda kalma süresini olumlu yönde etkilediğini kanıtlayan ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir.

Güncel rejeneratif endodontik uygulamalar genel olarak aşağıdaki basamakları içermektedir (Iohara ve ark. 2009, Huang ve ark. 2010, Sakai ve ark. 2010):

1. Kök kanalının irrigasyon ajanlarıyla dezenfeksiyonu
2. Antibiyotik patları ya da Ca(OH)<sub>2</sub> kullanılarak kanal içi medikasyon
3. Periapikal dokular ya da kalan pulpanın mekanik irritasyonu ile kanal içine kanamanın uyarılması
4. Oluşan kan pıhtısının üzerine MTA yerleştirilmesi

Bu uygulamalar, pulpa-dentin kompleksine ait hücrelerin yanı sıra, dentin ve kökü içeren hasarlı yapıların yerine konması üzerine tasarlanan biyolojik temelli prosedürler olarak tanımlanmaktadır (Murray ve ark. 2007). Tasarlanan klinik uygulamalar için doku mühendisliğini temel alan klinik öncesi çalışmaların etkilerini anlamak ve diş gelişimini kısaca gözden geçirmek önemlidir.

## 1.2 Diş Gelişimi

Diş gelişimi, birbirini izleyen morfolojik süreçler (*tomurcuk, takke, çan*) sonrası kron, kök ve periodonsiyumun oluşmasıyla tamamlanmaktadır. Bu süreç, ektoderm kaynaklı oral epitel hücreleriyle nöral krista kaynaklı mezenkimal hücreleri içeren bir seri karşılıklı etkileşim tarafından düzenlenir (Thesleff 2003, Volponi ve ark. 2010).

Ektodermal kök hücreler mineyi oluşturacak olan ameloblastlara farklılaşırken; nöral kristadan göç eden mezenkimal kök hücreler ise ilk olarak dişlerin geliştiği birinci yutak kavsine gelir. Buradan alt ve üst çene taslaklarına dağılır ve odontoblast, sementoblast/sementosit, osteoblast, kondroblast/kondrosit, melanosit ve kas hücrelerine farklılaşır (Hargreaves ve ark. 2011, Can 2014).

Odontoblastlar dişlerin gelişim dönemi ve yaşlanma boyunca pulpa-dentin kompleksinin en belirgin ve en özelleşmiş hücresidir. Rejeneratif endodontik uygulamalarda pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu için önemli şartlardan biri odontoblastlara farklılaşabilen mezenkimal kök hücreler elde etmektir (Hargreaves ve ark. 2011).

### **1.3 Rejeneratif Endodontide Klinik Öncesi Uygulamalar**

Doku mühendisliği bir doku ya da organın rejenerasyonu için klinik stratejilerin geliştirilmesini amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır (Langer ve Vacanti 1993). Rejeneratif endodontik uygulamaların gelişiminde doku mühendisliği ilkeleri uygulanırken; hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip kök hücreler, bu hücrelerin fonksiyonlarını destekleyen veya yönlendiren büyüme faktörleri/sinyal molekülleri ve oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskeleleri olmak üzere üç temel bileşen rol oynamaktadır (Langer ve Vacanti 1993, Nakashima ve Akamine 2005, Hargreaves ve ark. 2008).

#### **1.3.1 Kök Hücreler**

Kök hücreler bütün çok hücreli canlı organizmalarda bulunan; kendini yenileme (self renewal), çeşitli hücrelere farklılaşma (differentiation) ve klon oluşturma yeteneğine (clonality) sahip özelleşmemiş hücrelerdir (Smith 2001, Weissman ve ark. 2001).

Kendini yenileme, kök hücrelerin yaşam boyu sayılarını korumak üzere gerektiğinde çoğalmaları anlamına gelir. Bu süreç hücrenin farklılaşmadan korunduğu aşamada meydana gelmektedir. Yani bu kavram kök hücrenin farklılaşmadan çoğalmasını tanımlar (Can 2014).

Farklılaşma, işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen bir dizi biyokimyasal ve fenotipik olaylar bütünüdür. Hücrelerin yenilenmesi veya doku onarımları, kök ve öncü hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla başlar. Hücrede farklılaşmayı kontrol eden moleküler işlemlerin başında sinyal iletim sistemi gelir ve farklılaşmayı kontrol eden sinyal molekülleri büyüme faktörleridir (Can 2014).

Klon oluşturma yeteneği, kök hücrelerin vazgeçilmez özelliklerinden biri olmak durumundadır. Tek bir hücreden çok sayıda yeni kök hücrenin üretmesi olarak tanımlanan klonalite, klonun büyüklüğüne göre ve klon oluşturma hızına göre kök hücreler arasında yapılacak kıyaslamalarda kullanılan ölçütlerdendir. Klonları oluşturan hücrelerin kültürde canlılıklarını korumaları, başarıyla dondurulup çözülebilmeleri ve pasajlanabilmeleri öngörülür (Can 2014).

### **1.3.1.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması**

Kök hücreler farklılaşma yetkinliğine göre (Alison ve ark. 2002) ve elde edildikleri döneme göre (Fortier 2005) iki şekilde sınıflandırılmaktadır.

#### **1.3.1.1.1 Farklılaşma Yetkinliğine Göre (Alison ve ark. 2002)**

Farklılaşma yetkinliğine göre kök hücreler dört sınıfta incelenebilir.

**Totipotent kök hücreler:** Sperm ile yumurtanın birleşmesinden sonra oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan bu ilk embriyonel hücreye “totipotent” (her şeyi yapabilen) hücre denilmektedir (Kansu 2005, Sahin ve ark. 2005). Döllenmeyi izleyen ilk dört ile beş gün içerisinde tek



hücreden meydana gelen tüm hücreler aynı güce sahiptir ve bu hücreler rahim içerisine yerleştirildiğinde her biri tek başına bir organizma oluşturabilecek güçtedir. Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir.

**Pluripotent kök hücreler:** 5. günden, yani 2–3 hücre bölünmesinden sonra meydana gelen hücreler “blastosist” denilen küresel bir şekil almaktadırlar (Parson 2004, Sagsoz ve Ketani 2008). Embriyoda blastosistin iç hücre kitlesindeki embriyoblastlara “pluripotent” hücre denilmektedir (Karasahin 2012). Üç germ tabakasından gelişen bütün hücreleri (Sonoyama ve ark. 2008) oluşturma potansiyeline sahiptirler; ancak tek başlarına tüm organizmayı oluşturamazlar. Gerekli ortam sağlandığında bu hücreler endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan yaklaşık 250 farklı türde hücreye farklılaşabilmektedirler (Rodriguez-Lozano ve ark. 2012).

**Multipotent kök hücreler:** Anne karnındaki organizmanın daha sonraki gelişim aşamalarında hücreler biraz daha özel görevlere sahip olmakta ve yetişkin kök hücrelere dönüşmektedirler (Verfaillie ve ark. 2002). Bu yetişkin kök hücreler de belirli hücre türlerini meydana getirmektedir. Örneğin kan kök hücresi kemik iliğinde bulunmakta ve gerektiğinde beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve kanın pıhtılaşmasında görev alan trombositlere dönüşmektedir. Aynı şekilde deri kök hücreleri de değişik deri hücrelerine dönüşebilmektedir. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere “multipotent” (çok yetili) hücre denilmektedir (Verfaillie ve ark. 2002, Kansu 2005, Sagsoz ve Ketani 2008).

Totipotent hücreler, embriyonun erken evresindeki kök hücrelerdir. Pluripotent hücreler, embriyonun blastosit evresinden itibaren ve fetusta bulunabilen hücrelerdir. Multipotent hücreler ise kordon kanı ve yetişkin kök hücrelerdir (Verfaillie ve ark. 2002, Kansu 2005, Sagsoz ve Ketani 2008, Karasahin 2012).

**Unipotent kök hücreler:** Farklılaşmanın en son basamağında sadece tek bir hücre tipini oluşturabilme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Kendi kendini yenileyebilme yapısı ile kök hücre özelliğini korurlar (Alison ve ark. 2002).

### 1.3.1.1.2 Elde Edildikleri Döneme Göre (Fortier 2005)

Elde edildikleri döneme göre kök hücreler ikiye ayrılır.

**Embriyonik Kök Hücreler:** Blastosist adı verilen 5-6 günlük embriyonun iç hücre kitlesinde yer alan hücrelerdir. Pluripotent özellikte olup üç farklı germ tabakasına dönüşebilen bu kök hücreler, embriyo gövdesine ait bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alacak olan doku ve organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine sahiptir.

**Yetişkin Kök Hücreler:** Erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanır. Hasarlanan dokuların yenilenmesinde görev alan bu hücreler, yaşam boyu kök hücre havuzunu yenileyerek kök hücre sayısının azalmadan sürdürülebilmesini garanti altına alır. Yetişkin kök hücreler arasında multipotent olanların yanı sıra unipotent hücrelere de rastlamak olasıdır.

Günümüzde üzerinde en çok çalışılan yetişkin kök hücre tiplerinden biri mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler; kemik iliği, yağ dokusu, kemik, periost, sinovyal eklemler, iskelet kası, deri, periferik kan, periodontal ligament ve pulpa dahil olmak üzere farklı kaynaklardan izole edilmiştir (Mizuno ve ark. 2012).

### 1.3.1.2 Dental Dokulardan İzole Edilen Yetişkin Kök Hücreler

Pulpa, periodontal ligament ve kemik gibi mezenkimal dokular yetişkin kök hücreler açısından zengin bir potansiyele sahiptir. Bu hücreler onlarca yıl önce ilk olarak kemik iliğinde bulunmuş olup; fibroblastik görünüme sahip, kendini yenileyen ve koloni oluşturan hücreler olarak karakterize edilmiştir (Friedenstein ve ark. 1974a, Friedenstein ve ark. 1974b). Başlangıçta stromal kök hücreler olarak adlandırılmış olsalar da, daha sonra yaygın olarak kabul gören mezenkimal kök hücre terimi geçerli olmuştur (Caplan 1991).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, pulpa nekrozlu immatür daimi dişlerde apikal kanama uyarılmış ve kök kanalı içinde mezenkimal kök hücrelerin varlığı

değerlendirilmiştir (Lovelace ve ark. 2011). Rejeneratif endodontik işlemler sırasında farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerin kök kanalı içine önemli ölçüdeki girişi ilk kez bu çalışmayla gösterilmiş olup, aynı zamanda kanal içindeki bazı mezenkimal kök hücre belirteçlerinin (CD105) salınım oranının sistemik dolaşıma göre 700 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma rejeneratif endodontik uygulamaların kök hücre bazlı tedaviler olduğunu gösteren ilk klinik çalışmadır.

Dental dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücreler şöyle sıralanabilir (Egusa ve ark. 2012):

- Dental pulpa kök hücreleri (dental pulp stem cells, DPSCs)
- Apikal papilla kök hücreleri (stem cells of the apical papilla, SCAP)
- Periodontal ligament kök hücreleri (periodontal ligament stem cells, PDLSCs)
- Eksfoliyeye olmuş insan süt dişi kök hücreleri (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)
- Dental folikül kök hücreleri (dental follicle stem cells, DFSCs)
- Diş germi progenitör hücreleri (tooth germ progenitor cells, TGPCs)

### 1.3.1.2.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri

DPSCs, ilk olarak Gronthos ve ark. (2000) tarafından insana ait gömülü üçüncü büyük azı dişlerinden izole edilmiştir. Bu hücrelerin elde edilebilmesi için dişin dikkatle kırılması veya kesilmesiyle mekanik olarak dışarı çıkarılan pulpa, ya kısa süreli enzimatik sindirimden sonra tek hücre süspansiyonu haline getirilir ya da eksplant kültür tekniğinde olduğu gibi hücrelerin kendiliğinden filizlenerek tek tabaka hücre kümeleri oluşturabilmesi için 2 mm<sup>3</sup> hacminde doku parçaları elde edilerek kültüre edilir (Nakashima ve ark. 2013). Her iki teknikte de DPSCs, yüksek proliferasyon, kendini yenileme ve birçok hücre hattına farklılaşabilme özelliklerini sergiler.

DPSCs'nin *in vitro* ortamda osteoblast, kondrosit, adiposit, miyoblast, vasküler endotel hücreleri, melanosit, nöronlar ve glia hücreleri gibi çeşitli hücreleri

oluşturabildiği görülmüştür (Gronthos ve ark. 2002, Laino ve ark. 2005, Kerkis ve ark. 2006, Ballini ve ark. 2007, Yang ve ark. 2007, Arthur ve ark. 2008, Graziano ve ark. 2008b, Stevens ve ark. 2008, Zhang ve ark. 2008, Koyama ve ark. 2009).

*In vivo* olarak DPSCs, hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat (HA/TCP) birleşiminden oluşan bir iskeleyle immün sistemi baskılanmış farelerin deri altına transplante edildiğinde, bu hücrelerin odontoblastlara farklılaşarak dentin/pulpa benzeri bir yapı oluşturabildikleri gösterilmiştir (Gronthos ve ark. 2000, Gronthos ve ark. 2002, Batouli ve ark. 2003).

Huang ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada DPSCs'nin dentin üzerinde büyütüldüğünde, dentin kanallarının içine doğru uzanan sitoplazmik uzantılarıyla odontoblast benzeri hücrelere dönüştüğü ortaya konmuştur.

#### **1.3.1.2.2 Apikal Papilla Kök Hücreleri**

İnsana ait gelişen daimi bir dişin apeksinde konumlanan dental papilla dokusunun fiziksel ve histolojik karakteri ilk olarak Sonoyama ve ark. tarafından 2008 yılında tanımlanmış ve bu doku “apikal papilla” olarak isimlendirilmiştir. Gelişmekte olan kökün apeksine gevşek bir şekilde bağlı olan bu doku kolaylıkla kökten ayrılabilir.

Apikal papillada bulunan kök hücreler pulpadan daha farklı özelliklere sahiptir (Sonoyama ve ark. 2006, Sonoyama ve ark. 2008). Daha apikalde konumlandığı için apikal papillanın kollateral dolaşımdan faydalandığı ve böylelikle pulpa nekrozu boyunca hayatta kalabildiği düşünülmektedir.

Pulpitis ya da pulpa nekrozunun ileri aşamalarında pulpa kaynaklı kök hücreler kaybedilir. Periapikal bölgedeki kök hücrelerin bir araya gelmesi ya da kan akımıyla kanal içine gönderilmesi zor olsa da mümkün olabilir (Galler ve ark. 2014). Yapılan çalışmalarda güncel rejeneratif endodontik prosedürlerin bir basamağı olan apikalden kanamanın uyarılması sırasında apikal alanda bulunan kök hücre ve büyüme faktörlerinin fibrin pıhtı içine yerleşmesiyle pulpa-dentin kompleksinin

rejenerasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (Murray ve ark. 2007, Petrino ve ark. 2010, Ruparel ve ark. 2012).

Sonoyama ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, SCAP'nin DPSCs'nden farklı olup olmadığını incelemek amacıyla aynı diştten izole edilen DPSCs ve SCAP aynı koşullar altında kültüre edilmiştir. Sonuç olarak SCAP'nin, daha yüksek hızda popülasyonunu ikiye katladığı, doku rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu, daha fazla kök hücreye özgü pozitif yüzey antijeni (STRO-1) içerdiği ve daha yüksek seviyede antiapoptotik protein (survivin) eksprese ettiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada elde edilen SCAP, HA/TCP bileşiminden oluşan bir iskeleyle immün sistemi baskılanmış farelere transplante edilmiş ve HA/TCP yüzeyi üzerinde bağ dokusu ile birlikte tipik bir dentin tabakasının oluştuğu tespit edilmiştir.

SCAP'nin henüz gelişmekte olan bir diştten elde ediliyor olması, bu hücrelerin DPSCs'ne kıyasla daha erken dönem kök hücre olduğu kanaatini uyandırmaktadır. SCAP'nin kök dentininin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların, DPSCs'nin ise reperatif dentin üretmekten sorumlu olan odontoblastların kökeni olduğu düşünülmektedir. Bu da SCAP'nin doku onarımında DPSCs'ne kıyasla daha üstün olduğu anlamına gelebilir (Huang ve ark. 2009).

SCAP, rejeneratif endodontide büyük potansiyele sahip bir dental kök hücre grubudur (Huang ve ark. 2008). Bu hücrelerin kök gelişim sürecinde farklılaşmamış hücrelerin asıl kaynağı olduğuna inanılmaktadır (Sonoyama ve ark. 2008). SCAP'nin odontoblast benzeri hücrelere farklılaştığı *in vivo* bir çalışma, dentinin yeni baştan (*de novo*) sentezi ile sonuçlanmıştır (Huang ve ark. 2010).

SCAP'nin birçok dentinojenik belirtecin yanı sıra nörojenik belirteçleri de eksprese ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Sonoyama ve ark. 2008). SCAP'nin bu nörojenik potansiyelinin, tıpkı DPSCs gibi nöral krista kökenli olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Gronthos ve ark. 2002).

Yapılan çalışmalarda SCAP'nin mezenkimal kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu sağlayarak ve osteoblast, kondrosit ve adiposit gibi mezenkimal hücre dizilerine farklılaşarak mezenkimal kök hücre özelliği gösterdiği tespit edilmiştir

(Sonoyama ve ark. 2006, Huang ve ark. 2008, Sonoyama ve ark. 2008, Bakopoulou ve ark. 2011).

### **1.3.1.2.3 Periodontal Ligament Kök Hücreleri**

Periodontal ligament, sement ile alveol kemiğin iç duvarı arasında yerleşmiş, dişi çeneler içinde destekleyen ve karmaşık vasküler yapıya ve çok sayıda hücre içeriğine sahip yumuşak bağ dokusudur (McCulloch ve ark. 2000, Seo ve ark. 2004, Rimondini ve Mele 2009).

PDLSCs, farklı hücre gruplarına farklılaşma potansiyeli olan heterojen bir hücre topluluğundan oluşmaktadır (Gould ve ark. 1980, Lekic ve ark. 2001, Murakami ve ark. 2003). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda PDLSCs'nin sement, periodontal ligament ve alveolar kemik gibi periodontal dokuları rejenere etme yeteneği ortaya konmuştur (Seo ve ark. 2004, Seo ve ark. 2005). Sonoyama ve ark. (2006) ise PDLSCs'ni immün sistemi baskılanmış farelere transplante etmiş ve bu hücrelerle fonksiyonel bir periodonsiyumun başarıyla oluşturulabileceğini göstermiştir.

PDLSCs mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini göstermeleri ve multipotansiyel farklılaşma kapasiteleri sayesinde mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanıldığı için klinik açıdan büyük öneme sahiptir (Seo ve ark. 2005).

### **1.3.1.2.4 Eksfoliyel Olmuş İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri**

SHED, fizyolojik düşme zamanı gelmiş süt dişlerinin pulpasından izole edilmektedir. Odontoblast, adipositler ve nöral hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir ve SHED'nin *in vivo* koşullar altında kemik oluşumu ve dentin üretimini indüklediği gösterilmiştir (Miura ve ark. 2003). SHED'nin özellikle lamelli yapıda kemik benzeri bir matriks oluşumunu indükleyebildiği gösterilmiştir (Miura ve ark. 2003, Seo ve ark. 2008). Sahip olduğu bu farklı özelliğin süt dişinin kendi doğasından kaynaklı olduğu, yani kök rezorpsiyonu ve kökü çevreleyen yeni kemik oluşumunun

eş zamanlı gerçekleşiyor olmasıyla açıklanabileceği öne sürülmüştür (Egusa ve ark. 2012).

Kemik iliği kök hücreleri ve DPSCs ile karşılaştırıldığında, SHED'nin daha yüksek proliferasyon kapasitesine ve hücre sayısını iki katına çıkarma hızına sahip olduğu tespit edilmiştir (Miura ve ark. 2003).

#### **1.3.1.2.5 Dental Folikül Kök Hücreleri**

Dental folikül, gelişmekte olan diş germini çevreleyen ektomezenkimal bir dokudur. Sement, periodontal ligament ve alveol kemik formasyonunda rol oynayan öncü hücreleri içermektedir (Felthaus ve ark. 2010).

Gömülü üçüncü büyük azı dişlerinin foliküllerinden izole edilen DFSCs'nde farklılaşmamış hücelere özgü yüzey antijenlerinden olan Nestin ve Notch-1 ekspresyonu görülmüştür (Morsczeck ve ark. 2005). Uygun ortamda DFSCs'nin sement, kemik, sinir hücreleri ve adipositlere farklılaşabildiği gözlenmiştir (Kemoun ve ark. 2007, Felthaus ve ark. 2010).

#### **1.3.1.2.6 Diş Germi Progenitör Hücreleri**

Diş germi (pulpa ve çevresindeki dokular), embriyonik gelişim boyunca ektomezenkimal etkileşimler sonucu oluşan bir yapıdır (Graziano ve ark. 2008a). Buradaki progenitör hücreler dental organ, dental papilla ve dental foliküle farklılaşırlar (Bosshardt 2005).

TGPCs ilk kez Ikeda ve ark. (2008) tarafından çan evresinin geç dönemindeki üçüncü molar diş germinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Yüksek proliferasyon kapasitesine sahip bu hücrelerin, *in vitro* koşullarda üç germ yaprağından köken alan osteoblast, sinir hücreleri ve hepatositlere dönüşebilme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve ark. 2008).

İnsanda 6 yaş civarı, üçüncü molardan elde edilen diş germi dokuları henüz organogenezis aşamasındadır. Üçüncü molarlarda organogenezisin doğumdan sonra gerçekleşmesi, yani buradaki embriyonik dokuların bu zamana kadar farklılaşmamış olması bu dokuyu eşsiz kılmaktadır (Graziano ve ark. 2008a). Bu nedenle üçüncü molarların diş germinden elde edilen kök hücrelerin, yetişkin hastalarda gerçekleştirilen kök hücre bazlı tedavilerdeki önemini göz ardı etmemek gerekir (Yalvac ve ark. 2010).

### **1.3.1.3 Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu**

Düşük düzeyde immünojeniteleri nedeniyle hücre sel tedavilere en iyi aday olan mezenkimal kök hücreler, yaygın olarak kullanılan dört farklı yöntemle karakterize edilmekte ve izolasyonu yapılmaktadır (Murray ve ark. 2007). Bunlardan ilki hücrelerin spesifik antikörlerle boyandıktan sonra, akan hücre ölçer (flow cytometer) kullanılarak kök hücre karakterizasyonunun yapıldığı floresan aktive hücre ayırma tekniğidir (fluorescence-activated cell sorting, FACS). Diğerleri ise immüno manyetik boncuklar kullanılarak, immünohistokimyasal boyama yapılarak ve son olarak da fenotip, kemotaksi, çoğalma, farklılaşma ve mineralizasyon gibi fizyolojik ve histolojik kriterler kullanılarak kök hücrelerin karakterize edilmesi ve ayrılmasıdır (Murray ve ark. 2007).

#### **1.3.1.3.1 Akan Hücre Ölçer**

Akan hücre ölçer tek hücre süspansiyonu halindeki hücrelerin bir akış kanalı boyunca tek hücre seviyesinde lazer önünden geçerken yansıyan foton enerjisinin ölçümüne bağlı olarak; hücrelerin büyüklük (0,2-150  $\mu\text{m}$ ), granülarite ve floresans özelliklerine göre; hücre popülasyonlarını, organelleri veya benzer ölçüde partikülleri kantitatif olarak araştırma imkânı sağlayan bir cihazdır.



Akan hücre ölçer sistemi 3 ana sistemden oluşmaktadır (Shapiro 2003):

- 1. Hidrolik Sistem:** Partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev alan akış sistemidir.
- 2. Optik Sistem:** Lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan saçılımın çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde fotodedektöre aktarılmasında görev almaktadır.
- 3. Elektronik Sistem:** Elde edilen optik sinyalin fotomultipler tüp (Photo Multiplier Tubes, PMT) ile çoğaltılarak elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur.

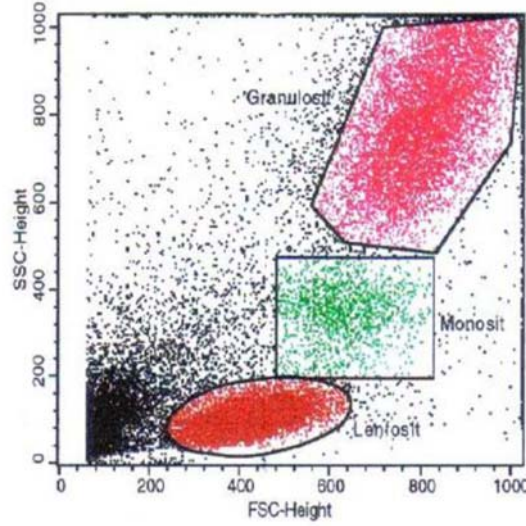
Süspansiyon haline getirilmiş hücrelerin analizi için hücrelerin floresan işaretli (FITC, PE, APC, PerCP vb.) monoklonal antikorlar ile direkt ya da indirekt yoldan işaretlenmesi gerekmektedir. Sistem floresan yoğunluk ölçümü prensibine dayalı olduğundan, işaretli hücrelerden bu floresanı açığa çıkaracak güç kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Bu kaynak argon, kripton, helyum-kadmiyum, helyum-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları olabilir.

Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam ve quartzdan yapılmış akış kabine (flow cell) gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar.

Tek hücre olarak lazer kaynağının önünden geçen floresan işaretli hücrelerin analizi için sistemde; forward scatter (FS), side scatter (SS) ve floresan (FL-1, FL-2, FL-3, FL-4 vs.) dedektörleri bulunmaktadır. FS hücre yüzey alanı veya büyüklüğü hakkında bilgi verirken, SS granülarite veya hücre iç yapısı hakkında bilgi verir. Örneğin periferik kanda lenfositler, monositler ve granülositler farklı büyüklük ve granülariteye sahiptirler. Bu özelliklerine göre hücreler FS/SS histogramında farklı bölgelerde dağılım gösterirler (Şekil 1.1).

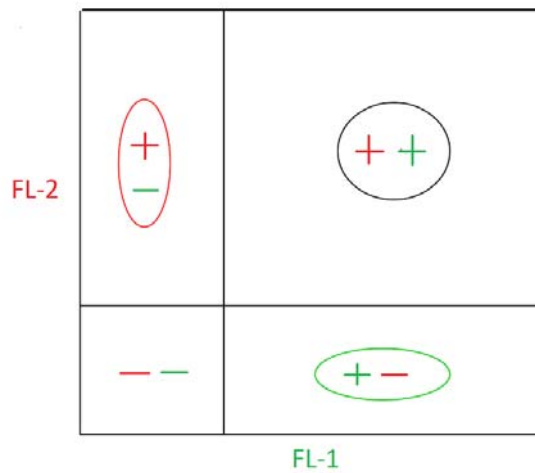
Süspansiyon hücre popülasyonları büyüklük ve granülarite özelliklerine göre ayrıldıktan sonra bu farklı hücre popülasyonları içinden bilgi edinilmek istenen hücre/hücre gruplarının grafik bir çerçeve ile belirlenmesi işlemine gating/kapılama

işlemi adı verilmektedir (Şekil 1.1). Bu işlemden sonra, sistem verilen komutlara uygun olarak sadece kapı içindeki hücreler hakkında bilgi vermektedir (Shapiro 2003).



**Şekil 1.1** FS/SS histogramında periferik kan hücrelerinin dağılımı ve kapılanması

Floresan dedektörler (FL-1, FL-2 vs.) ise kendi kanallarından okunacak antikorlarla boyanmış hücreleri analiz eder ve bu hücreler hakkında yüzde bilgi verir (Şekil 1.2) (Shapiro 2003).



**Şekil 1.2** FL-1/FL-2 histogramı ile hücre süspansiyonu içindeki farklı hücre popülasyonlarının floresan yoğunluklarına göre gösterimi

Veri analizi, kapılanan hücrelerin floresan yoğunluklarının önce optik sinyale daha sonra PMTs ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevrilip bilgisayara kaydedilmesi ve bu kayıtlı veriler üzerinde ölçümlerin yapılması işlemidir.

Akan hücre ölçer, süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi (immünofenotipleme), B ve T hücre alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tipleni, deoksiribonükleik asit (DNA) analizi, nötrofil fonksiyonları (fagositoz, solunumsal patlama ve kemotaksi), hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi (hücre proliferasyonu), hücre içi sitokin tayini ve kromozom analizi gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır.

İmmünofenotipleme hücre yüzeyinde eksprese edilen antijenlerin antikor kullanılarak tanımlanmasıdır. Bu antijenik yapılar adezyon, metabolizma ve hücre etkileşiminde rol oynayan fonksiyonel membran proteinleridir. Antikorlar bu antijenlerin yüzeylerindeki epitoplara bağlanmaktadır (Kishimoto 1998).

Hücre yüzeyindeki antijenik yapılar günümüzde CD (Cluster of Differentiation) molekülleri olarak adlandırılmakta ve farklı immünojenik fonksiyonlara sahip hücrelerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Abbas ve ark. 2000). Günümüzde CD moleküllerinin sayısı CD363'e ulaşmıştır (www.hcdm.org).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy, ISCT) mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için gerekli minimal kriterleri tanımlayan bir bildiri yayınlamıştır (Dominici ve ark. 2006). Bu kriterler aşağıdaki gibidir:

1. Mezenkimal kök hücre standart kültür ortamında plastik yüzeylere yapışmalıdır.
2. CD73, CD90 ve CD105 yüzey moleküllerini eksprese ederken, CD45, CD34, CD14 ya da CD11b ve CD79 $\alpha$  ya da CD19 ve HLA-DR eksprese etmemelidir.
3. *In vitro* ortamda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşmalıdır.

### 1.3.2 Sinyal Molekülleri/Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücrel çoğalma ve/veya farklılaşmayı indükleyen proteinlerdir. Birçok büyüme faktörü çok yönlüdür ve bu sayede çeşitli hücre tiplerinde hücrel bölünmeyi teşvik eder (Bazley ve Gullick 2005).

Büyüme faktörleri çoğunlukla hücre proliferasyon hızının artırılması, hücrelerin herhangi bir doku türüne farklılaşmasının indüklenmesi, mineral matriks sentezi ya da sekrete edilmesi için hücrelerin uyarılması gibi kök hücre aktivitelerini kontrol etmek amacıyla kullanılır (Martin ve ark. 1998a, Murphy ve ark. 2004, Stevens ve ark. 2005).

Rejeneratif endodontinin klinik pratiğinde önemli bir etki oluşturulmak isteniyorsa, öncelikle fonksiyonel bir pulpa rejenerasyonu sağlayan ve kayıp dentin yapısını ideal olarak restore edebilen etkin tedavilere odaklanması gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda, doku onarımına aracılık eden biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması diş onarım mekanizmasını taklit edebilmesini sağlayacaktır.

Dentin, doku cevabı oluşturabilen birçok protein içermektedir. Çürük, restoratif materyaller ve asit uygulanması gibi bazı prosedürleri takiben dental dokuların demineralizasyonu büyüme faktörlerinin salınımına yol açabilmektedir (Murray ve Smith 2002). Bu büyüme faktörlerinin tersiyer dentinogeneziste gerçekleşen birçok olayın sinyal iletiminde anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir (Tziafas 1995, Tziafas ve ark. 1995). Birçok araştırma dentin kaynaklı proteinlerin odontoblastik farklılaşma için yeterli olduğunu göstermiştir (Begue-Kirn ve ark. 1992, Tziafas ve ark. 1995, Casagrande ve ark. 2010).

Dentin matriksinde bulunan, rejenerasyon ve tamirde önemli role sahip olduğu düşünülen büyüme faktörleri Çizelge 1.1’de gösterilmektedir (Smith ve ark. 2016).

**Çizelge 1.1** Rejenerasyon ve tamirde önemli role sahip olduğu bilinen büyüme faktörleri

<b>Dentin matriksinde bulunan anahtar büyüme faktörleri</b>	<b>Rejeneratif Fonksiyonu</b>
<b>Transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (TGF-β1)</b>	Primer odontoblastik farklılaşmada rol oynar. Tersiyer dentinogenezisi teşvik eder.
<b>Transforme edici büyüme faktörü-beta 2 (TGF-β2)</b>	DPSCs'nin mineralize fenotipe farklılaşmasını upregüle eder.
<b>Transforme edici büyüme faktörü-beta 3 (TGF-β3)</b>	Odontoblastik farklılaşmayı teşvik eder.
<b>Kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2)</b>	<i>In vivo ve in vitro</i> modellerde odontoblastik farklılaşmayı teşvik eder. DSPP (dentin sialofosfoprotein)'i indükler ve alkalen fosfataz aktivitesini artırır.
<b>Kemik morfojenik proteini-4 (BMP-4)</b>	Odontoblastik farklılaşmayı artırır.
<b>Kemik morfojenik proteini-7 (BMP-7)</b>	DPSCs'nin mineralizasyonunu teşvik eder.
<b>İnsülin büyüme faktörü-1 (IGF-1)</b>	DPSCs ve SCAP'nin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik eder.
<b>Hepatosit büyüme faktörü</b>	Mezenkimal kök hücrelerin canlılığını, çoğalmasını ve migrasyonunu teşvik eder.

<b>Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)</b>	Şiddetli kombine immün yetmezliği (SCID) olan farelerin deri altına implante edilen diş segmentlerinde kan damarı oluşumunu teşvik ettiği gösterilen güçlü anjiogenik faktördür.
<b>Adrenomedullin</b>	P38 sinyalini teşvik ederek odontoblastik farklılaşmayı teşvik eder.
<b>Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2)</b>	Kök hücre kemotaksisi, köklülüğü ve anjiogenezisi teşvik eder.
<b>Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)</b>	Anjiogenezisi ve mezenkimal kök hücrelerin kemotaksisini teşvik eder. Odontoblastik farklılaşma sürecini düzenler. Diğer büyüme faktörlerine sinerjik olarak etki eder.
<b>Epidermal büyüme faktörü (EGF)</b>	DPSCs ve SCAP'nin nörolojik farklılaşmasını artırır.
<b>Plasenta büyüme faktörü</b>	Anjiogenezisi ve mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını teşvik eder.
<b>Beyin kaynaklı nörotrofik faktör</b>	Nöral büyüme ve aksonal odaklanmayı teşvik eder.
<b>Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör</b>	<i>In vivo</i> sinir rejenerasyonunu ve pulpa hücrelerinin canlılık/proliferasyonunu teşvik eder. Odontojenik farklılaşma boyunca ekspresyonu artar.
<b>Büyüme/Farklılaşma Faktör 15</b>	Aksonal rejenerasyonu ve hasar sonrası fonksiyonu teşvik eder. Nöronal onarımda önemli rol oynar.

Çizelge 1.1'de (Smith ve ark. 2016) yer alan büyüme faktörleri arasında özellikle TGF- $\beta$  ailesi, odontoblastların farklılaşması ve dentin matriks salınımının uyarılmasında hücrel sinyal iletimi açısından önemli bir yere sahiptir. Bu büyüme faktörleri odontoblastlar tarafından salınır ve dentin matriksine çökelir (Roberts-Clark ve Smith 2000). Burada dentin matriksinin diğer bileşenleriyle etkileşerek aktif bir formda korunmuş olurlar (Smith ve ark. 1998). Saf halde dentin protein parçalarının eklenmesi, tersiyer dentin matriksinin salgılanmasındaki artışı stimüle eder (Smith ve ark. 2001).

Diş gelişimi ve rejenerasyonda görev alan bir diğer önemli büyüme faktörü ailesi BMPs'dir (Aberg ve ark. 1997, Nakashima ve Reddi 2003). İnsana ait BMP-2 kültür ortamında yetişkin pulpa kök hücrelerinin odontoblastik morfolojiye farklılaşmasını teşvik etmektedir (Nakashima ve ark. 1994, Iohara ve ark. 2004, Saito ve ark. 2004). Aynı zamanda BMP-2, BMP-4 ve BMP-7 *in vivo* koşullarda reperatif dentin oluşumunu indüklemektedir (Nakashima 1994b, Nakashima 1994a, Six ve ark. 2002).

Yapılan bir çalışmada insana ait IGF-1, kollajen ile birlikte uygulandığında dentin köprüsü ve tübüler dentin formasyonunu indüklediği bulunmuştur (Lovschall ve ark. 2001).

FGF-2 ya da temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ise dental pulpada sahip olduğu anjiyogenik potansiyel sebebiyle pulpa rejenerasyonunda önemli bir yere sahiptir (Ishimatsu ve ark. 2009, Kitamura ve ark. 2012).

Tüm bu sonuçlar, büyüme faktörlerinin endodontik ve restoratif materyallere eklenmesiyle dentin ve pulpa rejenerasyonunun stimüle olma potansiyelini göstermektedir. Uzun vadede büyüme faktörleri büyük olasılıkla yetişkin kök hücreler ile birlikte doku mühendisliği uygulamalarında hastalıklı diş pulpasının yerine konulmasında kullanılacaktır (Murray ve ark. 2007).

### 1.3.3 İskeleler

Doku mühendisliğinde kök hücreler ve büyüme faktörlerinden sonra diğer önemli unsur doku iskeleleridir (Nakashima ve Reddi 2003, Sharma ve Elisseff

2004). İskele rejenerasyon sırasında hücrelerin doğru pozisyonda lokalize olabilmesi; farklılaşma, çoğalma ve metabolizmalarının düzenlenebilmesi; yani rejener dokunun formunun belirlenmesi için gereklidir (Salgado ve ark. 2004).

Ekstrasellüler matriksi taklit eden bu yapı, kök hücrelerin farklılaşmasını kontrol ederek (Yamamura 1985, Bi ve ark. 2007) onlar için fiziksel destek oluşturur. Yüksek porözite ve yeterli büyüklükteki porlara sahip olması, hücre beslenmesi ve besinlerin difüzyonu için çok önemlidir (Sachlos ve Czernuszka 2003). Yeni bir cerrahi operasyona gerek kalmadan çevre dokular tarafından absorbe edilebilmeli ve zaman içerisinde biyolojik bozunmaya uğramalıdır (Schopper ve ark. 2005).

İskeleler doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır. Doğal iskelelere örnek olarak kollajen, glikozaminoglikanlar, demineralize ya da doğal dentin matriksi, fibrin pıhtı, trombosit zengin plazma (Platelet Rich Plasma, PRP), aljinat gibi hidrojeller (Dobie ve ark. 2002, Fujiwara ve ark. 2006) ve kitosan gibi doğal polisakkaritler verilebilir (Murray ve ark. 2007, Hargreaves ve ark. 2011).

Polilaktik asit (PLA), poliglolik asit (PGA), polilaktik-koglikolik asit (PLGA), poliepsilon kaprolakton (Yang ve ark. 2010), polietilen glikol (PEG) gibi polimerler ve HA/TCP (Ando ve ark. 2009) gibi biyoseramikler (Yang ve ark. 2009) ve silika ise sentetik iskeleler grubunda sayılabilir. Bu iskeleler çözünebilir fibröz yapıya sahip oldukları için doku mühendisliğinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Tek sorun yüksek porözite ve düzenli gözenek boyutunu elde etmede oluşan zorluktur (Murray ve ark. 2007).

Doğal materyallerin en önemli avantajları doku uyumlarının iyi olması nedeniyle herhangi bir toksik reaksiyona veya kronik inflamasyona neden olmamalarıdır. Köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada (Thibodeau ve ark. 2007), köpeklere ait 60 immatür diş enfekte edilip apikal periodontitis varlığı doğrulanmış ve ardından üçlü antibiyotik patı (siprofloksasin, minosiklin, metranidazol) ile kök kanallarının dezenfeksiyonu sağlanmıştır. Daha sonra dişler 5 gruba ayrılarak; 2 grup pozitif ve negatif kontrol grupları olarak düşünülmüş, bir grupta kanal içine kanama uyarılmış, diğer grupta kanal içine kollajen solüsyon yerleştirilmiş, son grupta ise her ikisi birden uygulanmıştır. Kanalda kan pıhtısının oluşturulduğu dişler radyolojik



olarak incelendiğinde; apikal lezyonda iyileşme, kök boyutu ve duvar kalınlığında artış gözlenmiştir. Bu dişlere histolojik olarak bakıldığında; apikal alanda iyileşme, kök kanalı içine doğru büyüyen bir doku ve duvar kalınlığında artış fark edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, üçlü antibiyotik patıyla dezenfekte edildikten sonra kanamanın oluşturulduğu kanallarda daha fazla vital doku oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçlara göre, kan pıhtısı varlığının revaskülarizasyon için önemli olduğu vurgulanmıştır. Kan pıhtısı içindeki fibrin polimer kök hücrelerinin büyümesi için bir matriks ya da iskele gibi işlev görmekte, böylece dokunun rejenerasyon olasılığı da artmaktadır. Sonuç olarak dokunun büyümesinin teşviki için iskele önemli bir yere sahiptir.

Rejeneratif endodontik prosedürlerin uygulandığı vaka raporlarında ve yapılan çalışmalarda genellikle kullanılan iskeleler apikalden kanamanın uyarılmasıyla oluşan doğal fibrin pıhtı, PRP, kitosan ve hidrojellerdir.

### **1.3.3.1 Trombositten Zengin Plazma**

PRP, venöz kanın hücresel elemanlarına ayrılması ile elde edilen otojen trombosit konsantrasyonudur (Marx 2004). Bu uygulamalar doğal pıhtıdaki eritrosit/trombosit oranını tersine çevirerek, trombositlerin konsantre halde ilgili alana uygulanmasını sağlamaktadır.

Trombositler, oluşturdukları pıhtı formasyonu ve alfa granülleri içerisindeki büyüme faktörleri ile yara iyileşmesi ve rejenerasyonda etkin rolleri olan hücrelerdir (Carlson ve Roach 2002). Agregasyon sırasında aktive olarak alfa granüller içerisindeki büyüme faktörlerini ortama salarlar. En önemli ve anahtar içerikler  $\alpha$  granüllerinde bulunur.

Trombositlerin yara bölgesine uygulanmasıyla; içerdikleri PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, EGF ve IGF gibi büyüme faktörleri de konsantre bir şekilde bu bölgeye uygulanmış olur (Eppley ve ark. 2004, Foster ve ark. 2009). Böylelikle yara bölgesindeki kök hücrelerin çoğalması sağlanarak daha ideal bir iyileşme süreci elde edilmiş olur (Nikolidakis ve Jansen 2008, Alsousou ve ark. 2013).

PRP yüksek miktarda büyüme faktörü içermesinin yanında, sahip olduğu yoğun fibrinojen içeriğiyle fibrin pıhtı oluşturmaktadır. Oluşan bu üç boyutlu fibrin pıhtı bölgedeki hücrelerin tutunması için iskele görevi görmektedir (Sonnleitner ve ark. 2000).

Rejeneratif endodontik prosedürlerde immatür daimi dişlerin apikal bölgesinden kanamanın uyarılmasıyla kanal içinde pıhtı formasyonu oluşmakta ve oluşan pıhtının kanaldaki kök hücrelerin migrasyonunda matriks olarak görev aldığı öne sürülmektedir (Banchs ve Trope 2004). Kanama ve pıhtı oluşumu yara iyileşmesinin ilk basamağı ve önemli bir bileşenidir. Rejeneratif endodontik prosedürlerde de kanal içine kanamanın uyarılmasının amacı doku iyileşmesi olaylarını canlandırmaktır.

Son zamanlarda PRP rejeneratif endodontik uygulamalarda kan pıhtısının yerine matriks olarak kullanılmaya başlanmış ve bu vakalarda başarılı bir iskele oluşumu gözlenmiştir (Torabinejad ve Turman 2011, Bezgin ve ark. 2014). Torabinejad ve Faras (2012) nekrotik pulpaya sahip immatür bir insan dişinin rejeneratif endodontik tedavisinde PRP kullanarak kanal içinde pulpa benzeri bir dokunun varlığını tespit etmiştir. Oluşan doku uygulamadan 14 ay sonra kanaldan uzaklaştırılarak histolojik olarak incelendiğinde odontoblast ve tipik bir pulpa dokusu görülmemesine rağmen, vital pulpa benzeri bağ doku varlığı açıkça gösterilmiştir.

Bezgin ve ark. (2015) PRP'nın rejeneratif endodontik tedavilerde iskele olarak kullanımını değerlendirdikleri bir klinik çalışmada, 18 ay sonunda yaptıkları klinik ve radyografik incelemelerde PRP'nın kanal içinde uygun bir iskele oluşturduğu sonucuna varmışlardır.

### **1.3.3.2 Kitosan**

Kitosan, kitinin yüksek alkali ortamda kısmi deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir polimerdir (Kurita 1998). Doğada selülozdan sonra en çok bulunan protein

olan kitin, deniz kabuklularının ve mantarların hücre duvarında yer alır (Vincent ve Wegst 2004).

Kitine göre birçok avantaja sahip olan kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur. Kitosan hücre proliferasyonunu ve yapısal doku organizasyonunu uyarıcı özelliğe sahip bir materyaldir. Bunun yanında antibakteriyel ve antifungal özellikleri de yara iyileşmesine olumlu katkıda bulunmaktadır. Ayrıca yara iyileşmesinde etkin olan diğer biyolojik faktörleri ve makrofaj aktivitesini de etkileyerek hızlı yara iyileşmesinde rol oynar (Hirano 1999, Yi ve ark. 2005, Kurita 2006).

Asetik asitte çözülmüş kitosan solüsyonlarının gram (+) ve gram (-) bakterilerin üremesini inhibe ettikleri bilinmektedir. Kitosanın bakteri üremesini baskılayıcı etkisinin, sahip olduğu amino grubu ile bakteri üzerinde bulunan anyonik gruplar arasındaki reaksiyona bağlı olduğu düşünülmektedir (Shigemasa ve Minami 1995).

Kitosan iskeleler biyolojik olarak kendini yenileyebilen ve çözünebilen, biyoyumlu, antijenik ve toksik olmayan yapılardır (Shigemasa ve ark. 1994). Ekstrasellüler matriks bileşeni olan hyalüronik aside benzer yapısal özelliklere sahip olan kitosan, gözenekli yapıdadır ve hücrelerin büyümesi ve osteokondüksiyon için uygun bir forma sahiptir (Peniche ve ark. 2007, Venkatesan ve Kim 2010). Kitosanın bu fiziksel, biyolojik ve mekanik özellikleri incelenmiş ve doku mühendisliği uygulamaları için olumlu sonuçlar oluşturduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lim ve ark. 2010, Ujang ve ark. 2014).

### **1.3.3.3 Hidrojeller**

Hidrojeller suda kendi ağırlıklarının binlerce kat fazlasını absorbe edebilen hidrofilik polimer bağlarıdır. Oluşturuldukları materyale göre kimyasal olarak kararlı ya da çok kararsız olabilirler.

Pulpa dokusu, sert dokular gibi fiziksel bir dayanağa ihtiyaç duymadığı için rijit iskeleler yerine rejeneratif pulpa tedavilerinde polimer hidrojel gibi üç boyutlu

yumuşak bir iskele kullanımı gündeme gelmiştir (Dhariwala ve ark. 2004, Trojani ve ark. 2005). Ayrıca kök kanalının dar bir boşluk olması ve özellikle apikal bölgedeki kompleks anatomi, doku mühendisliğinde enjekte edilebilir iskelelerin daha ideal bir yapı oluşturabileceğini düşündürmektedir (Piva ve ark. 2014).

Hidrojel, non-invaziv özelliktedir ve şırınga yardımıyla kök kanalına kolaylıkla yerleştirilebilir (Alhadlaq ve Mao 2005). Dokuya implante edildikten sonra ışıkla polimerize olabilen rijit bir yapı elde edilmesi üzerine odaklanılarak hidrojel, daha kullanışlı hale getirilmesi düşünülmektedir (Luo ve Shoichet 2004).

#### **1.4 Rejeneratif Endodontide Klinik Uygulamalar**

Rejeneratif endodontik prosedürler, nekrotik pulpaya sahip immatür daimi dişlerin tedavisinde çeşitli apeksifikasyon prosedürlerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Apikal periodontitisin iyileşmesine ek olarak; yayımlanmış vaka raporlarında da görüldüğü üzere kök gelişiminin devam etmesi, pulpada immün defansın ve ağrı iletiminin yeniden oluşması gibi pulpanın normal fizyolojik fonksiyonlarının geri kazandırılmasını amaçlar (Diogenes ve ark. 2013). Yani rejeneratif endodontik prosedürlerin esas hedefi, pulpa-dentin kompleksinin bileşenlerini rejenere etmektir.

2001 yılından bu yana önemli sayıda vaka raporu ve vaka serisi yayınlanmış olup, bunlara bakıldığında (Diogenes ve ark. 2013);

- Kök gelişiminin devam etmesi gibi genel olarak görülen klinik sonuçlar ve bazen vitalite testlerine normal nosiseptif cevap
- Genel olarak karşılaşılan teknik zorluklar ve istenmeyen yan etkiler
- Tedavi protokollerinin büyük değişkenlik göstermesi

gibi durumlar gözlenmiştir.

Tedavi yaklaşımları değişiklik göstermesine rağmen gerçekleştirilen vakaların neredeyse tümünde apikal patolojinin gerilediği, kök uzunluğu ve kalınlığının arttığı görülmüştür (Law 2013).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar ve vaka raporları göz önüne alındığında, rejeneratif endodontik prosedürlerin 3 önemli prensibi şöyle sıralanabilir (Iwaya ve ark. 2001, Banchs ve Trope 2004):

1. Kök kanal sistemindeki bakterileri elimine etmek
2. Büyüyen yeni doku için bir iskele oluşturmak
3. Bakteri geçirmeyen bir kapatma oluşturarak yeni bir enfeksiyon oluşumunu engellemek

#### **1.4.1 Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonu**

Enfekte nekrotik pulpaya sahip immatür dişlerin tedavisinde rejenerasyon öncesi tam bir dezenfeksiyon sağlanması önemlidir. Birçok rejeneratif endodontik prosedür minimal enstrümantasyonla ya da hiç enstrümantasyon yapılmaksızın gerçekleştirilir. Mekanik enstrümantasyon ince kök duvarlarını daha da zayıf hale getireceği için (Cvek 1992) ve kök kanalının apikalinde bulunan vital doku artıklarını uzaklaştırabileceği için (Iwaya ve ark. 2001) kontrendikedir. Bu nedenle kök kanal sisteminde enfeksiyonun giderilmesi ve tam bir dezenfeksiyon sağlanması, ciddi bir kimyasal debridman ve kanal içi medikamentlerin kullanımına bağlıdır. Fakat rejeneratif uygulamalarda, klasik endodontik tedavilerden farklı olarak, kullanılan kimyasal ajanların sadece bakteriyostatik/bakterisidal özellikte olması yeterli değildir; aynı zamanda hastaya ait kök hücrelerin hayatta kalma, çoğalma ve farklılaşma kapasitesini de artırabilmelidir (Diogenes ve ark. 2013).

##### **1.4.1.1 Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonunda Kullanılan İrrigasyon Ajanları**

Günümüze kadar yayınlanan rejeneratif endodontik prosedürlerin uygulandığı vaka raporlarında genellikle kullanılan irrigasyon ajanları NaOCl, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve klorheksidindir (CHX).

#### 1.4.1.1.1 Sodyum Hipoklorit

Kök kanal debridmanının ilk basamağı, bol miktarda irrigasyon ile kök kanalındaki enfekte nekrotik organik dokuyu elimine etmektir. Bu amaçla bugüne kadar gerçekleştirilen tüm rejeneratif endodontik uygulamalarda NaOCl kullanılmıştır. Bu vakaların yaklaşık %63'ünde %3'lük NaOCl kullanılırken, %36'sında %5-6'lık NaOCl ve sadece %1'inde yaklaşık %1'lik NaOCl tercih edilmiştir (Diogenes ve ark. 2013).

NaOCl, mükemmel bakterisidal etkinlik (Harrison ve ark. 1990, Vianna ve ark. 2006) ve yüksek doku çözme kapasitesine sahip (Hand ve ark. 1978, Harrison ve Hand 1981), endodontik aletler için etkin lubrikasyon sağlayan güçlü bir antibakteriyel ajandır. NaOCl'in doku çözme potansiyeli, bulunduğu konsantrasyona ve sıvının kanaldaki değişim frekansına bağlıdır (Hasselgren ve ark. 1988, Parirokh ve ark. 2012).

NaOCl'in yüksek konsantrasyonları periapikal dokular üzerinde toksik etki oluşturmaktadır (Stojicic ve ark. 2010). NaOCl ile kanal irrije edilirken solüsyonun periapikal bölgeye taşmasını önlemek için, enjektör iğnesi apikal foramenden 2 mm kısa olacak şekilde ayarlanmalı (Neha ve ark. 2011) ve solüsyon kanal içine yavaş bir şekilde gönderilmelidir (Hulsmann ve Hahn 2000).

Kök kanallarında bakteri irritasyonunu engellemek için maksimum antimikrobiyal etkinliğe ihtiyaç duyulsa da, bu antimikrobiyallerin yeni oluşacak dokuyu çevreleyen yumuşak ve sert dokuların üzerinde minimal toksisite göstermesi önemli bir konudur. NaOCl'in yüksek konsantrasyonlarının SCAP üzerinde toksik etki oluşturabileceği, kök hücrelerin dentine bağlanmasını önleyebileceği ve dentin kaynaklı büyüme faktörlerini denatüre edebileceği *in vitro* ve hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2000, Ring ve ark. 2008, Casagrande ve ark. 2010, Trevino ve ark. 2011).

#### 1.4.1.1.2 Etilendiamintetraasetik Asit

EDTA, endodontide ilk olarak Nygaard-Qstby tarafından 1957 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Bir şelasyon ajanı olarak EDTA, dentindeki  $Ca^{++}$  iyonları ile birleşerek şelat tuzları oluşturur (Hulsmann ve ark. 2003). Böylelikle smear tabakanın inorganik kısmı uzaklaştırılarak kök kanalında kullanılan dezenfektanların etkinliği artırılabilir (Niu ve ark. 2002).

EDTA'nın dentinin kristal yapısından  $Ca^{++}$  iyonlarını uzaklaştırmasıyla, yüzeyel dentin tabakası demineralize olur. Bu durum TGF- $\beta$  (Zhao ve ark. 2000), BMP-2 (Begue-Kirn ve ark. 1992), PDGF, VEGF ve FGF-2 (Roberts-Clark ve Smith 2000) gibi dentine gömülü büyüme faktörlerinin salınımını sağlar ve bu büyüme faktörleri kök hücrelerin odontoblastlara farklılaşması ve tersiyer dentin oluşumunu stimüle eder (Smith ve ark. 2001).

Yapılan bir çalışmada insana ait dentin segmentleri %10'luk EDTA ile 10 dakika muamele edildikten sonra dentindeki TGF- $\beta$ 1 varlığı taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) gösterilmiştir. Devamında EDTA'nın dentin yüzeyine 5, 10 ve 20 dakikalık uygulamaları sonrası TGF- $\beta$ 1 miktarı ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile ölçülmüş ve zamanla TGF- $\beta$ 1 miktarında artma olduğu açıkça ortaya konmuştur (Galler ve ark. 2015). Bu bulgular rejeneratif prosedürler sırasında dentin yüzeyine uygulanan EDTA'nın, hücresel davranışı etkilemede önemli ölçüde katkı sağlayabileceğini vurgulamaktadır.

Yapılan çalışmalarda EDTA'nın hücre bağlanmasını (Ring ve ark. 2008) ve kök hücre farklılaşmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir (Casagrande ve ark. 2010, Galler ve ark. 2011). EDTA'nın kök hücre üzerindeki etkisini inceleyen bir *in vitro* çalışmada, EDTA uygulanmış dentin yüzeyinin, kök hücrelerin bağlanmasını artırdığı ve bağlanan hücrelerin odontoblastik/osteoblastik farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Pang ve ark. 2014).

Hücre adezyonunun, yüzeyin kimyasal ve topografik özelliklerinden etkilendiği bilinmektedir (Roach ve ark. 2005). Yüzey ıslanabilirliği de bu özelliklerden biridir. Yakın zamanda yüzey ıslanabilirliğinin artmasıyla hücre

bağlanmasının teşvik edildiği gösterilmiştir (Wei ve ark. 2009, Huang ve ark. 2012). Bu bağlamda EDTA uygulanmış dentin yüzeyinde büyük yoğunlukta hücre bulunması, EDTA'nın yüzey ıslanabilirliğini artırmasıyla açıklanabilir (Huang ve ark. 2012). Ya da hücre bağlanmasının artması, hidrofilik yüzeye bağlanmayı seven anahtar adezyon proteini olan fibronektinin, EDTA uygulanmış hidrofilik yüzeye bağlanma miktarındaki artışla ilişkili olabilir (Wei ve ark. 2009).

EDTA uygulanmış dentin yüzeyinde oluşan dentin dekalsifikasyonu organik matriks içerisindeki kollajen fibriller açığa çıkar ve bu durum integrin reseptörleri üzerinden hücre bağlanmasına olanak tanıyan başka bir model oluşturur (Verdelis ve ark. 1999, Heino ve Kapyla 2009).

Yapılan tüm bu çalışmalar, daha fazla translasyonel araştırmayla bir yaklaşımın klinik olarak nasıl uygulanabilir hale geldiğinin açık bir örneğidir. Bütün bu çalışmalar sonucunda, EDTA rejeneratif endodontik prosedürlerde sıkça kullanılan ve kullanılması Amerikan Endodontistler Birliği (American Association of Endodontists, AAE) tarafından tavsiye edilen bir irrigasyon ajanı olmuştur (AAE 2016).

#### **1.4.1.1.3 Klorheksidin**

CHX; gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakteriler ve mayalar üzerinde etkili, geniş spektrumlu antimikrobiyal bir ajandır. Katyonik yapısından dolayı negatif yüklü bakteri yüzeyine elektrostatik olarak bağlanır ve bakteri hücre duvarının dış tabakasına zarar vererek geçirgen hale getirir. Konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriyostatik ya da bakterisidal etki gösterebilir.

CHX'in likit ve jel formu endodontide irrigasyon ajanı olarak önerilmektedir. Birçok araştırma CHX'in farklı konsantrasyonlardaki antibakteriyel etkinliği üzerine yoğunlaşmıştır (Gomes ve ark. 2001, Basrani ve ark. 2002). %2'lik CHX'in %0,12'lik konsantrasyona göre daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu yapılan *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş ve antibakteriyel etkinliğin konsantrasyona bağlı olduğu açıkça ortaya konmuştur (Basrani ve ark. 2003).



CHX, yüksek antimikrobiyal etkinliğe ve dentin ile etkileşerek bu etkiyi uzatma yeteneğine sahip olması nedeniyle endodontide kullanımı önerilen bir ajandır. Fakat doku çözme yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle irrigasyon ajanı olarak tek başına kullanımı önerilmemektedir (Okino ve ark. 2004, Haapasalo ve ark. 2010).

%0,12 ile %2 arasındaki konsantrasyonlarda CHX'in lokal ya da sistemik olarak düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Löe 1973). Yine %2'lik CHX ile subgingival irrigasyon yapıldığında gingival dokularda herhangi bir toksisite belirtisi gözlenmemiş (Southard ve ark. 1989), hatta CHX ile yapılan gargaranın periodontal hastalıkların iyileşmesini teşvik ettiği görülmüştür (Asboe-Jorgensen ve ark. 1974). Fakat yapılan bir çalışmada, CHX'in insan derisinden izole edilen fibroblastlar üzerinde sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Hidalgo ve Dominguez 2001). Ayrıca Faria ve ark. (2007) farenin arka pençesine CHX enjekte ettiklerinde ciddi toksik reaksiyon oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

%0,12'lik ve %2'lik CHX'in rejeneratif endodontik uygulamalarda kök kanal dezenfeksiyonu amacıyla kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edildiğinden bahsedilmektedir (Banchs ve Trope 2004, Shin ve ark. 2009). Fakat farklı irrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı üzerine etkisinin incelendiği *in vitro* bir çalışmada, kök kanalı %17'lik EDTA'ten sonra %2'lik CHX ile irrig edilmiş ve bunun sonucunda hiçbir canlı hücreye rastlanmamıştır (Trevino ve ark. 2011). Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise farklı irrigasyon solüsyonlarının DPSCs'nin dentine bağlanması üzerindeki etkisi incelenmiş, CHX'in kök hücrelerin dentine bağlanmasını önlediği ve kök hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Ring ve ark. 2008).

#### **1.4.1.2 Kanal Debridman ve Dezenfeksiyonunda Kullanılan Irrigasyon Ajanlarıyla İlgili Yapılan Çalışmalar**

Herhangi bir rejeneratif tedavinin başarısı için en önemli faktör enfeksiyonun kontrol altına alınabilmesidir. Organotipik kök kanal modelleriyle yapılan bir çalışmada (Trevino ve ark. 2011) kök kanalları çeşitli irrigasyon ajanlarıyla dezenfekte edilmiş, kurulanmış ve ardından SCAP ve PRP karışımı kanal içerisine

yerleştirilmiştir. Fakat güçlü bir antibakteriyel ajan olan %6'lık NaOCl'in SCAP'ın hayatta kalma kapasitesini belirgin derecede azalttığı görülmüştür. Buna karşın %17'lik EDTA kullanıldığında aynı kök hücrelerinin hayatta kalma oranı artmıştır. Daha da önemlisi %6'lık NaOCl kullanımından sonra EDTA uygulanmasının, NaOCl'in istenmeyen etkilerini azalttığı tespit edilmiştir.

Yapılan *in vivo* bir çalışmada (Galler ve ark. 2011), hazırlanan dentin diskleri birinci grupta sadece %5,25'lik NaOCl, ikinci grupta ise %5,25'lik NaOCl'i takiben %17'lik EDTA ile işleme tabi tutulmuştur. Ardından DPSCs, büyüme faktörü içeren hidrojel iskeleyle beraber dentin disklerine ekilmiş ve immün sistemi baskılanmış farelerin deri altına yerleştirilmiştir. İşlemden 6 hafta sonra diskler yerlerinden çıkarılmış ve immünohistokimyasal işlemlere tabi tutulmuştur. Sadece %5,25'lik NaOCl kullanılan grupta rezorbsiyon alanları kolayca izlenirken, diğer grupta tam aksine dentin tübüllerine uzanan odontoblast benzeri hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal analizler sonucu, sadece %5,25'lik NaOCl kullanılan grupta DPSCs'nin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmadığı tespit edilmiştir.

Tedavi sırasında kök hücrelerin hayatta kalma olasılıklarını etkileyen mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Daha önce bahsedilen çalışmalarda kök hücreler irrigasyon ajanlarıyla doğrudan temas ettirilmemiştir (Trevino ve ark. 2011, Martin ve ark. 2014). Ek olarak bu irrigasyon ajanları kullanıldıktan sonra, kök hücreler üzerinde oluşabilecek toksisiteyi minimize etmek için dentin bol miktarda fosfat tamponlu salin (Phosphate Buffered Saline, PBS) ya da serum fizyolojik ile durulanmıştır. Hatta yüksek konsantrasyonda (%6) NaOCl'in derin etkilerini nötralize etmek için sodyum tiyosülfat kullanılmasına rağmen toksik etki ortadan kaldırılamamıştır. Bundan dolayı kök hücreler üzerindeki toksik etkinin, irrigasyon sonrasında oluşan kimyasal artıkların direkt etkisiyle ilişkili olmadığı, kimyasal ajanların dentin üzerinde kök hücrelerin yaşamına olanak vermeyen bir mikroçevre oluşturmasıyla dolaylı olarak meydana geldiği düşünülmektedir (Martin ve ark. 2014).

Esner ve ark. (2011) NaOCl'in insan pulpa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında hücreleri, besiyeri kullanarak seyreltikleri %0,33, %0,16, %0,08 ve %0,04'lük NaOCl'e; 5, 10 ve 15 dakika maruz bırakmışlar

ve NaOCl'in konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Fakat 10 ve 15 dakika %0,33'lük NaOCl'e maruz bırakılan pulpa hücreleri ışık mikroskopu altında incelendiğinde ölü halde oldukları gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, %6'lık NaOCl'in dentine gömülü büyüme faktörlerini (TGF- $\beta$  vb.) denatüre ettiği gösterilmiştir (Okita ve ark. 2007). TGF- $\beta$  gibi dentin matrisine gömülü büyüme faktörleri diğerlerinin yanı sıra, kök hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının güçlü uyarıcı olarak bilinmektedir (Smith ve Leaver 1981, Lesot ve ark. 1986, Smith ve ark. 1990, Liu ve ark. 2007). Dolayısıyla, kullanılan irrigasyon ajanlarının olumsuz etkisi, bu solüsyonların dentine ait büyüme faktörleri üzerinde oluşturduğu zararlı etki nedeniyle indirekt olarak gerçekleşiyor olabilir. Buna karşın, EDTA dentinden büyüme faktörlerinin salınımını sağlayarak biyoyararlanımı artırır (Lin ve ark. 2012, Caplan 2013). Ayrıca oluşturduğu demineralizasyon sonucu mezenkimal kök hücrelerin dentin yüzeyine tutunmasını sağlayarak tedavide olumlu etki yaratıyor olabilir.

NaOCl'in klinik olarak kullanılan konsantrasyonlarının SCAP'nin canlılığı ve farklılaşması üzerinde etkili olup olmadığını değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Martin ve ark. 2014), çekilmiş dişlerden 5 mm uzunluğa ve 1,3 mm kanal çapına sahip standart kök segmentleri hazırlanmıştır. Bu örnekler %1,5, %3 ve %6'lık konsantrasyonlarda 20 mL NaOCl ile irrigate edilmiştir. Ardından bu örnekler 10 mL %17'lik EDTA ya da serum fizyolojik ile irrigate edilerek ikinci irrigasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kanalda herhangi bir kimyasal artık kalmaması için tüm örnekler bol miktarda serum fizyolojik ile irrigate edilmiş ve kurulanmıştır. SCAP bir hyalüronik asit-hidrojel iskele içerisinde bütün kanallara ekilmiş ve 7 gün kültüre edilmiştir. 7 gün sonunda canlı hücrelerin miktarı luminesans testi ile değerlendirilirken, odontoblastik farklılaşmaya özgü protein geni ise kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR ile test edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında NaOCl'in konsantrasyona bağlı olarak SCAP'nin canlılığı ve farklılaşmasını azalttığı, son irrigasyon ajanı olarak EDTA'nın kullanılmasıyla NaOCl'in zararlı etkilerinin tersine çevrildiği görülmüştür. Ayrıca %1,5'lik NaOCl'in SCAP'nin çoğalma ve farklılaşması üzerinde minimal olumsuz etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

## 1.5 Hücre Proliferasyon Ölçüm Yöntemleri

Hücre proliferasyon testleri DNA sentezi, metabolik aktivite, proliferasyon işaretçileri ve adenozin trifosfat (ATP) içeriğinin ölçümüne dayalı testler olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılabilir (Terzioglu ve ark. 2013).

DNA sentezinin belirlenmesine dayalı hücre proliferasyon testlerinde, başlıca radyoaktif ( $^3\text{H}$  timidin) veya floresan özellikli (BrdU, EdU) olmak üzere, timidin analogları kullanılmaktadır. Hücre proliferasyonu, timidin analoglarının yeni sentezlenen DNA'ya katılımı üzerinden izlenebilmektedir (Maghni ve ark. 1999, Chehrehasa ve ark. 2009).

Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksisiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler (Jenkins 1999).

Proliferasyon işaretçisi temelli testlerde başlıca proliferasyon hücre çekirdek antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) ve fosfohiston H3 için antikolar kullanılmaktadır (Muskhelishvili ve ark. 2003).

ATP temelli testler ise hücre proliferasyonunu belirlemek için bir diğer alternatif olup, bu testlerde hücre popülasyonundaki artan ATP miktarına göre proliferasyon oranı belirlenir (Crouch ve ark. 1993).

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak,

- 2-(4,5-dimetil-2-tiazol)-3,5-difenil-2H-tetrazolyum bromit (MTT)
- 2,3-bis(2-metiloksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit (XTT)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS),
- 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1)

gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır (Maghni ve ark. 1999, Tsukatani ve ark. 2008).

### 1.5.1 WST-1

Water-soluble tetrazolium salt (WST-1) yapısında tetrazolyum tuzları bulunmaktadır ve bu tuz canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle formazan kristallerine dönüşmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış ile birlikte mitokondriyal enzim aktivitesinde de artış olmakta ve bunun sonucunda formazan kristallerinin miktarı artmaktadır. Formazan kristalleri artışı koyu renk oluşumuna sebep olmaktadır, bu da hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Mosmann 1983). Çalışma prensibi temel olarak, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanması sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak mikropilaya okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır (Mosmann 1983).

### 1.6 Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sistemleri ile Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analizi (Real Time Cell Analysis, RTCA) sistemleri, etiketleme gerektirmeyen zamana bağlı hücre sayım cihazlarıdır. Sistem elektriksel empedansı ölçerek çalışmaktadır. Empedans ölçümüyle yaşayan hücre sayısı, adezyonu ve morfolojisi hakkında niceliksel bilgiler elde edilmektedir.

Elektrotların üzerindeki hücreler, elektrot-çözelti ara yüzeyindeki iyonik ortamı etkiler ve bunun sonucunda elektrot empedansı artar. Ne kadar çok hücre elektroda tutunursa empedanstaki artış da o kadar çok olur. Elektrot empedansı sistem programında cell index (CI) olarak ifade edilir. Eğer ortamda hücre yoksa veya hücreler elektroda iyi tutunmadıysa CI değeri sıfır olur. Elektroda ne kadar çok hücre tutunur ve yayılırsa CI değeri de o kadar büyük olur. Analiz sonucunda zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren bir grafik elde edilmiş olur.

## 1.7 İkili Boyama Yöntemiyle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Hücre ölümleri morfolojik ve biyolojik olarak değerlendirildiğinde, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken; nekroz, hasar yolu ile ölüm anlamını taşımaktadır (Martin ve ark. 1998b).

Nekroz, hücrede toksik madde varlığı ve oksijen yetersizliği gibi sebeplerden kaynaklanabilir ve hücrede şişme görülür. Apoptoz ise fizyolojik ve patolojik sebeplerden olmaktadır. Apoptoz olan hücrelerin komşu hücrelerle bağlantısı kalmaz ve hücrede küçülme görülür (Martin ve ark. 1998b).

İkili boyama, floresan maddelerin (Hoechst boyası, DAPI “4’,6-diamidino-2-phenylindole”, propidium iodide, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate” vb.) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla nukleusu görünür hale gelir. Canlı ve nekrotik hücre ayırımı yapabilmek için; canlı, apoptotik veya nekrotik tüm hücreleri boyayabilen bir boya (Hoechst boyası vb.) ile sadece nekrotik hücreleri boyayabilen bir başka boya (Propidium iodide vb.) beraber kullanılır.

Değerlendirmede normal hücrelerin çekirdekleri sönük, çekirdekte DNA dağılmamış ve hücrede veziküller oluşmamış olarak görülecektir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş ve DNA parçalanmış şekilde görülecektir. Hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre çekirdeği kırmızıya boyanır. Floresan ışık altında bakıldığında çekirdekleri kırmızı renkte görünen hücrelerin yüzdesi hesaplanarak nekrotik indeks belirlenir.

## 1.8 Amaç

NaOCl ve EDTA endodontide en yaygın kullanılan irrigasyon ajanlarıdır ve her ikisi de rejeneratif endodontik tedavilerde önemli bir yere sahiptir.

Çalışmamızda,

- Organotipik kök kanal modelleri üzerinde, farklı konsantrasyonlarda NaOCl ve EDTA'in kullanıldığı irrigasyon protokollerinin, immatür üçüncü molar dişlerden elde edilen SCAP'nin canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi,
- Yine farklı konsantrasyonlarda NaOCl ve EDTA'in kullanıldığı irrigasyon protokolleri ile yıkanmış mikropilakaya kuyucuklarına ekimi yapılan SCAP'nin zamana bağlı proliferasyonunun değerlendirilmesi ve SCAP'ndeki apoptoz ve nekrozun belirlenmesi

amaçlanmıştır.

## 2 GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Etik Kurul Onayı

Araştırma için gerekli olan etik kurul onayı Kırıkkale Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (04.06.2014 tarih ve 16/05 numaralı karar) (Ek-1). Araştırmada kullanılacak olan SCAP için dişi çekilecek olan tüm bireylere ve 18 yaş altındaki bireylerin ebeveynlerine araştırmanın amacı ve yöntemine ilişkin ayrıntılı bilgi verildikten sonra katılımları için Etik Kurul tarafından kabul edilmiş olan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatıldı.

### 2.2 Hastaların Çalışmaya Dâhil Edilme Kriterleri

Araştırmada kullanılan SCAP için dişi çekilen tüm bireyler Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi kliniklerine başvuran hastalar arasından seçildi.

1. İmmatür üçüncü molar dişine çekim endikasyonu konulmuş olan
2. 16-25 yaş arasındaki kadın ya da erkek
3. Çekilecek immatür üçüncü molar dişin kök ucu açıklığı radyografik olarak 1,5 mm'den fazla olan
4. Araştırmaya gönüllü olarak katılan
5. Çalışma hakkında bilgilendirilebilecek ve onam alınabilecek yeterlilikte olan (18 yaşından küçük hastalarda onam hastanın ebeveyninden alınmıştır.)

hastalar çalışmaya dâhil edildi.

Çürük, pulpal inflamasyon ya da nekroz gibi nedenlerden dolayı immatür üçüncü molar dişine çekim endikasyonu konulan hastalar çalışma dışında tutuldu.

Organotipik kök kanal modeli olarak kullanılan dişler ise herhangi bir nedenle çekim endikasyonuna sahip tek köklü ve tek kanallı dişler olmak üzere, Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi kliniklerine başvuran hastalardan sözlü ve yazılı onam alınarak elde edildi.



### 2.3 Hücre İzolasyonu ve Primer Hücre Kültürü

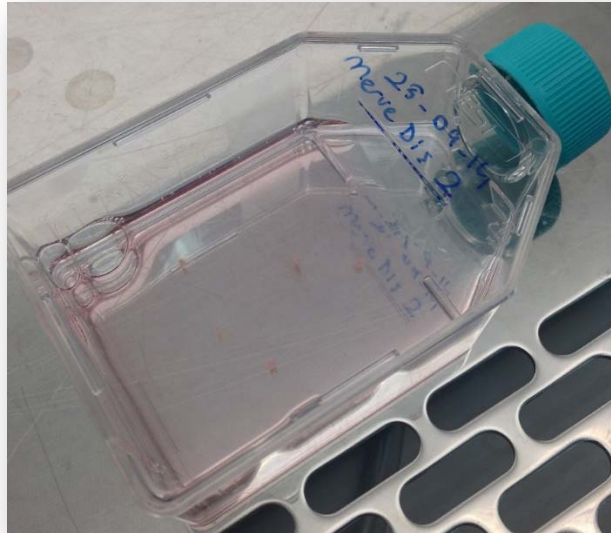
Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda muayene edilen ve çekim endikasyonu konulan 8 adet immatür daimi üçüncü molar diş, hastaya ya da hasta ebeveynine bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra çekildi. Çekimden hemen sonra dişler soğuk ve steril Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS; Biological Industries, Israel) içerisinde durulandı ve HBSS içeren şişelere alınarak ilk 1 saat içinde, buz kasetleri ile polistiren kutularda laboratuvara taşındı.

Laboratuvara ulaştırılan dişler laminar akışlı kabin içinde (Airstream Class II, ESCO, USA) soğuk HBSS dolu bir petri kabına yerleştirildi ve apikal papilla HBSS içerisindeyken 10 numaralı steril bistüri yardımıyla kesilerek dişten uzaklaştırıldı. Yaklaşık 2×2×1 mm boyutunda parçalara ayrıldıktan sonra 3 mg/mL kollajenaz enzimi (SERVA, Germany) ile 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübatörden (BINDER, Tuttlingen, Germany) çıkarılan örnekler mikrosantrifüj tüpüne alınarak 2500 rpm hızla 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve dipte kalan doku parçaları alınarak 25 cm<sup>2</sup> boyutundaki flaslara yerleştirildi. Minimum essential medium-alpha (%89) (MEM-α; Biological Industries, Israel) (Şekil 2.1) içine fetal bovine serum (%10) ve penisilin-streptomisin karışımı (%1) (Biological Industries, Israel) eklenerek besiyeri hazırlandı ve çalışmanın tümünde bu besiyeri kullanıldı. Daha sonra hazırlanan besiyeri pastör pipeti ile nazikçe doku parçalarının üzerine damlatıldı ve bu şekilde 10 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Daha sonra flask içine 3 mL besiyeri ilave edildi (Şekil 2.2) ve tekrar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin çoğalmasına paralel olarak her 2 günde bir kez besiyeri tazelenildi. Hücreler %70-%80 yoğunluğa ulaştıktan sonra flask yüzeyinden kaldırılıp pasajlandı.



**Şekil 2.1** Çalışmada kullanılan minimum essential medium-alpha (MEM- $\alpha$ )

Çalışmanın tümünde hücre kültürleri 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli ortamda genel hijyen kurallarına uyularak inkübe edildi.



**Şekil 2.2** Flask içerisinde primer kültürü yapılmış apikal papilla dokusu

## 2.4 Hücrelerin Pasajlanması

İzole edilen hücreler, çalışma kapsamındaki deneyler için yeterli miktarda çoğaltılmaları amacıyla pasajlandı. Bu işlemler için kültür ortamındaki hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırılarak flask 0,5 mL PBS (BioShop, Canada) ile yıkandı. Daha sonra içerisine 0,5 mL %0,25'lik tripsin-EDTA (Biological Industries, Israel) solüsyonu ilave edilerek, hücrelerin flask zemininden ayrılmaları için 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından, hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlendikten sonra, zeminden ayrılan hücreler kültür vasatı ile yeniden süspansiyon edilerek yaklaşık 1:2 oranında sulandırıldı ve büyümeleri istenen yeni kültür ortamına aktarılarak inkübasyona bırakıldı. İlk pasajdan sonra tüm örnekler ait hücreler dondurularak sıvı azot tankında muhafaza edildi. SCAP karakterizasyonunda 5. ve 6. pasajlar arasındaki kültürlerde bulunan hücreler kullanıldı.

## 2.5 Akan Hücre Ölçer ile SCAP Karakterizasyonu

Akan hücre ölçer (FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA) (Şekil 2.3) ve ISCT'nin bildirisinde (Dominici ve ark. 2006) belirtilmiş olan mezenkimal kök hücre yüzeyindeki antijenlere spesifik antikorları içeren Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Analysis Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) (Şekil 2.4) kullanılarak SCAP karakterizasyonu gerçekleştirildi. Human MSC Analysis Kit içeriği Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Çalışmada kullanılan akan hücre ölçer



Şekil 2.4 Human MSC Analysis Kit

**Çizelge 2.1** Human MSC Analysis Kit İçeriği

	<b>VİAL</b>	<b>İÇERİK</b>
<b>I</b>	<b>hMSC Positive Cocktail</b>	CD90 FITC CD105 PerCP-Cy5.5 CD73 APC
<b>II</b>	<b>hMSC Positive Isotype Control Cocktail</b>	mIgG1, κ FITC mIgG1, κ PerCP-Cy5.5 mIgG1, κ APC
<b>III</b>	<b>PE hMSC Negative Cocktail</b>	CD34 PE CD11b PE CD19 PE CD45 PE HLA-DR PE
<b>IV</b>	<b>PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail</b>	mIgG1, κ PE mIgG2a, κ PE
<b>V</b>	<b>FITC Mouse Anti-Human CD90</b>	CD90 FITC
<b>VI</b>	<b>PE Mouse Anti-Human CD44</b>	CD44 PE
<b>VII</b>	<b>PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse Anti-Human CD105</b>	CD105 PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5
<b>VIII</b>	<b>APC Mouse Anti-Human CD73</b>	CD73 APC
<b>IX</b>	<b>PE Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	mIgG2b, κ

Örnek analizi öncesinde kalibrasyon kontrolü yapıldı, sistem performansı kontrol edildi ve ardından kompanzasyon aşamasına geçildi. Kompanzasyon için kit içinde kullanılan tüm boyalar (FITC, PerCP-Cy5.5, APC ve PE) için birer tüp hazırlandı. Bu tüplere öncelikle 100 µL BD Pharmingen<sup>TM</sup> Stain Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) konuldu. Daha sonra her birinin üzerine kompanzasyon boncukları ilave edildi ve Çizelge 2.1’de gösterilen V, VI, VII ve VIII numaralı kompanzasyon için hazırlanmış boyalı antikordardan sırasıyla 5 µL damlatıldı. Bunlara ek olarak boya içermeyen bir tüp daha hazırlandı. Tüm bu işlemlerden sonra tüpler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bütün tüpler akan hücre ölçerde okutuldu. Böylelikle kullanılan boyaların emisyon sırasında

spektrumlarının birbirine geçmesi önleni ve daha doğru sonuçlara ulaşılması sağlandı.

Örnek analizi için kültür ortamındaki hücreler BD™ Accutase™ Cell Detachment Solution (BD Biosciences, San Jose, CA) (Şekil 2.5) kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldı ve BD Pharmingen™ Stain Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) (Şekil 2.5) içinde  $1 \times 10^7$  hücre/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde yeniden süspanse edildi.



**Şekil 2.5** Çalışmada kullanılan BD Pharmingen™ Stain Buffer ve BD™ Accutase™ Cell Detachment Solution

Analiz için 3 tüp hazırlandı:

**1.tüp:** Boş bırakıldı.

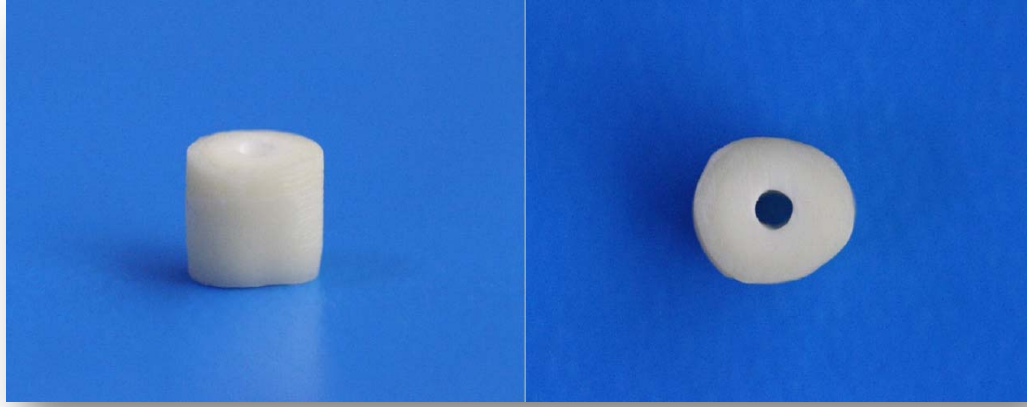
**2.tüp:** hMSC Positive Isotype Control Cocktail (20 µl) ve PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail (20 µl) konuldu.

**3.tüp:** hMSC Positive Cocktail (20 µl) ve PE hMSC Negative Cocktail (20 µl) konuldu.

Tüplerin her birine, hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µL eklendi. Ardından karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler BD Pharmingen™ Stain Buffer ile iki kez yıkandı ve 300-500 µL BD Pharmingen™ Stain Buffer içinde yeniden süspansiyon edildi. Ardından hücreler, akan hücre ölçerinde analiz edildi. 8 farklı örnekten izole edilen tüm hücreler için aynı prosedür tekrarlandı. Analizi yapılan SCAP, testlerde kullanılmadan önce büyümeleri ve morfolojilerini geri kazanmaları amacıyla kültür ortamına aktarılarak 1 hafta boyunca inkübasyona bırakıldı.

## **2.6 Organotipik Kök Kanal Modellerinin Hazırlanması**

Onam formu alınan hastalara ait 43 adet tek köklü ve tek kanallı diş çekildikten hemen sonra soğuk HBSS içerisine yerleştirildi. Steril bir kretuar yardımıyla gingival ve periodontal dokular uzaklaştırıldıktan sonra kontaminasyonu önlemek amacıyla diş yüzeyi %70'lik etanol ile temizlendi ve soğuk PBS ile 5 kez yıkandı. Ardından dişlerin kron kısımları ince bir elmas separe (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL) kullanılarak uzaklaştırıldı. Geriye kalan kökün apikal ve koronal üçlüsü de elmas separe ile uzaklaştırıldıktan sonra kökün orta üçlüsünden, steril edilmiş yüksek hızda frezler kullanılarak 5 mm uzunluğunda standardize kök kanal modelleri elde edildi. Bu modeller steril serum fizyolojik ile devamlı irrigasyon altında Lightspeed LSX nikel titanyum eğeler (Discus Dental, San Antonio, TX) kullanılarak genişletildi ve #130 numaralı eğe ile 1,3 mm çapında paralel duvarlı kök kanalı oluşturuldu (Şekil 2.6). Tüm bu işlemlerin ardından organotipik kök kanal modelleri hava ile kurutulup, hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyonu ile steril edildikten sonra kullanılabileceği kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi (Şekil 2.7).



Şekil 2.6 Organotipik kök kanal modellerinin görünümü



Şekil 2.7 Hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyonundan sonra indikatördeki renk değişimi

## 2.7 Organotipik Kök Kanal Modellerinin İrrigasyonu

Hazırlanan organotipik kök kanal modelleri irrigasyon yapılmadan önce dentinin rehidrate olması için en az 10 dakika boyunca HBSS içerisinde bekletildi. Ardından tüm modeller 1 kontrol grubu (n=3) ve 8 deney grubu (n=5) olmak üzere rastgele 9 farklı gruba ayrıldı ve her bir deney grubunda farklı irrigasyon protokolü uygulandı.



Grup 1: Kontrol grubu olarak belirlendi ve hiçbir irrigasyon ajanı kullanılmadı.

Grup 2: 10 mL %5'lik EDTA (Werax, Spot Diş Deposu Malz. San. Tic. Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) ile irrigasyon yapıldı.

Grup 3: 10 mL %17'lik EDTA (Werax, Spot Diş Deposu Malz. San. Tic. Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) ile irrigasyon yapıldı.

Grup 4: 20 mL %1'lik NaOCl'i (Werax, Spot Diş Deposu Malz. San. Tic. Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) takiben 10 mL %5'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Grup 5: 20 mL %2,5'lik NaOCl'i takiben 10 mL %5'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Grup 6: 20 mL %5'lik NaOCl'i takiben 10 mL %5'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Grup 7: 20 mL %1'lik NaOCl'i takiben 10 mL %17'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Grup 8: 20 mL %2,5'lik NaOCl'i takiben 10 mL %17'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Grup 9: 20 mL %5'lik NaOCl'i takiben 10 mL %17'lik EDTA ile irrigasyon yapıldı.

Tüm bu işlemlerin ardından deney gruplarındaki örneklerde, kalan herhangi bir kimyasal ajanı uzaklaştırmak amacıyla, 20 mL serum fizyolojik ile irrigasyon yapıldı.



**Şekil 2.8** Kök kanal modellerinin irrigasyonu

İrrigasyon sırasında 18 gauge boyutundaki enjektör ucu (Ayset Tıbbi Ürünler, Adana, Türkiye) kanalın koronal açıklığına yerleştirildi (Şekil 2.8) ve irrigasyon solüsyonları 5 mL/dakika hızla kök kanalına gönderildi. İrrigasyon işlemlerinin ardından modeller steril kağıt konularla (Sure-endo, Sure Dent, Korea) kurulandı ve kullanılana kadar laminar akışlı kabinde mikropalakalar içerisinde bekletildi.

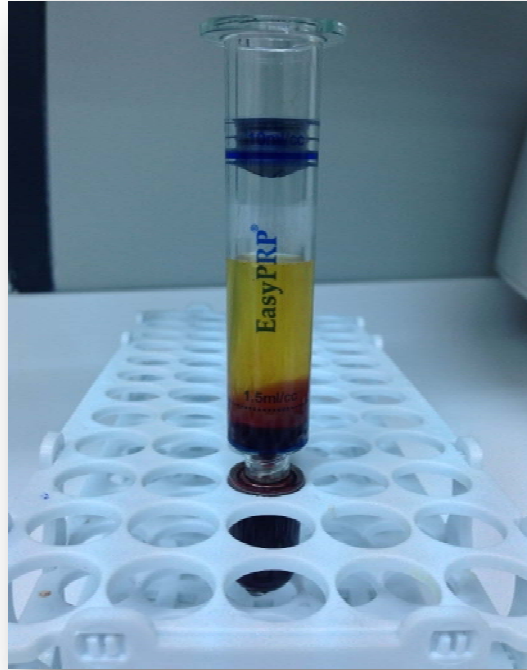
## **2.8 PRP'nın Hazırlanması**

PRP izolasyonu için özel olarak üretilmiş EasyPRP® Kit 10 (Neotec Biotechnology, İstanbul, Türkiye) kullanıldı (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9** Çalışmamızda kullanılan PRP kit içeriği

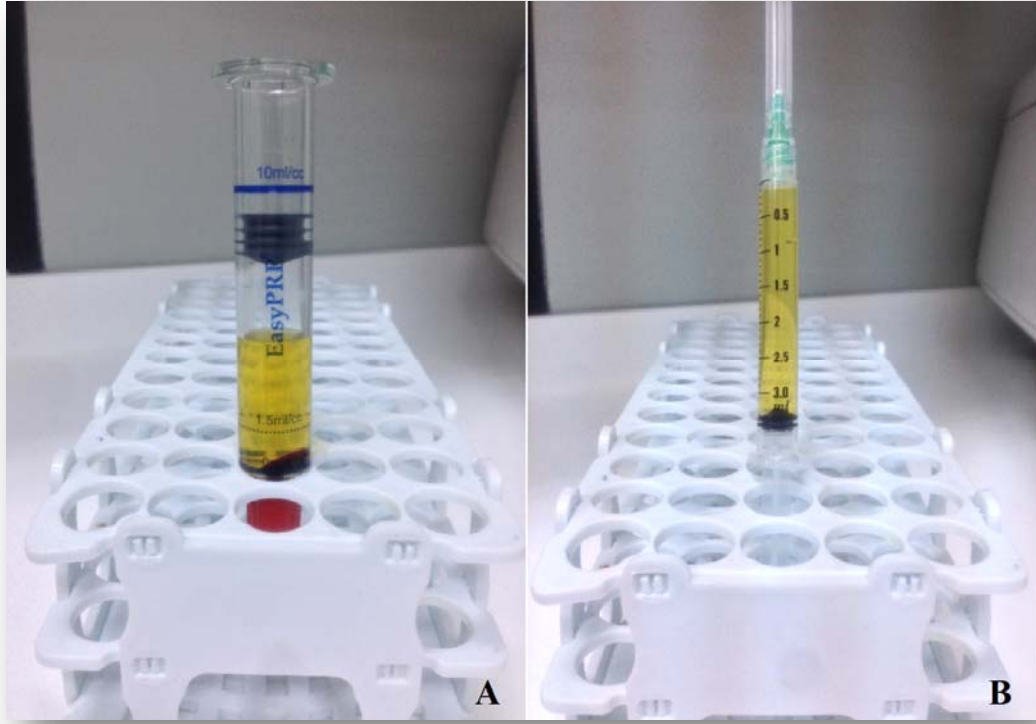
Çalışmamızdaki tüm testlerde kullanılan PRP, onam formu imzalatılmış aynı gönüllü bireyden elde edildi. Öncelikle EasyPRP enjektörüne 1,5 mL antikoagülan (Asit Sitrat Dekstroz Solüsyon A, ACD-A) çekildi. Ardından aynı enjektöre kelebek kan alma seti bağlanarak gönüllü bireyden 8,5 mL venöz kan alındı. Enjektöre ait alt hazne, uç kısma takıldıktan sonra enjektörün rotu çevrilerek çıkartıldı. Kan ve antikoagülanın tam olarak karışabilmesi için enjektör 2-3 kez hafifçe çalkalandı ve santrifüj cihazına (ROTINA 380R, Hettich, Germany) yerleştirildi. 1200 g'de 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.10). İlk santrifüj (soft spin) bittikten sonra enjektörün rotu tekrar takıldı ve enjektörün kırmızı kan hücreleriyle dolu alt haznesi çıkartıldı. Enjektörün içinde kalan kırmızı kan hücreleri de boşaltıldıktan sonra, bu kez alt hazne yerine plastik bir tıpa takılarak enjektör rotu çıkartıldı ve enjektör içinde kalan serum ikinci santrifüj için cihaza yerleştirildi.



**Şekil 2.10** İlk santrifüjden sonraki görünüm

İkinci santrifüj (hard spin) 4500 g'de 12 dakika boyunca serumun trombositçe zengin kısmı ile trombositçe fakir kısmını ayırmak amacıyla gerçekleştirildi (Şekil

2.11A). Santrifüj sonrası alt kısımdaki plastik tıpa çıkartıldı. Enjektör dik bir şekilde tutularak içerisindeki PRP başka bir enjektöre alındı ve kullanılana kadar bekletildi (Şekil 2.11B).



Şekil 2.11 (A) İkinci santrifüjden sonraki görünüm (B) İzole edilen PRP

## 2.9 Hücre Sayımı

Hücre sayımı hemositometri ile yapıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alındı ve laminar akışlı kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Ardından 0,5 mL PBS ile yıkandı ve 0,5 mL tripsin-EDTA ilave edilerek 3-5 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra flaskta besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı ve 2500 rpm hızla 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri eklendi.

Pipet yardımıyla pellet ve besiyeri süspansiyon edildikten sonra karışımdan 10 µL alınıp mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 10 µL tripan blue (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, Missouri, USA) eklenip homojenize edildi. Hücre, besiyeri ve tripan blue karışımından 10 µL alınıp hemositometri lamına konuldu. Lam Invitrogen™ Countess™ hücre sayım cihazına (Thermo Fisher Scientific, California, USA) yerleştirildikten sonra sayım yapıldı (Şekil 2.12).

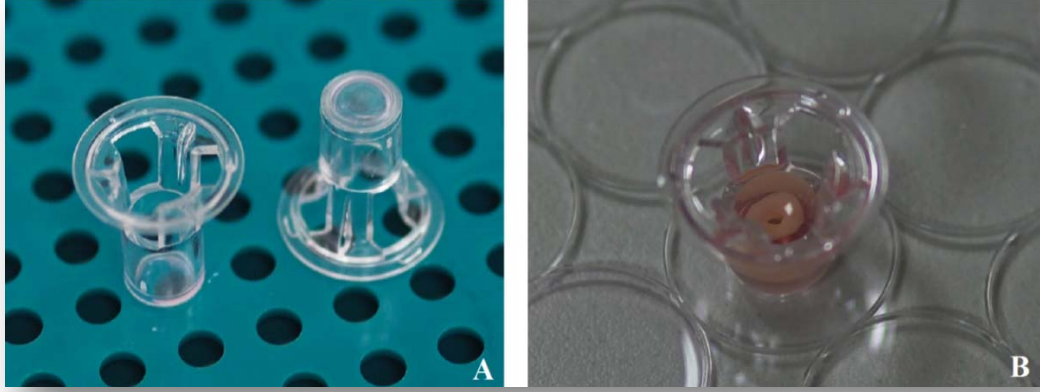


Şekil 2.12 Çalışmada kullanılan hücre sayım cihazı

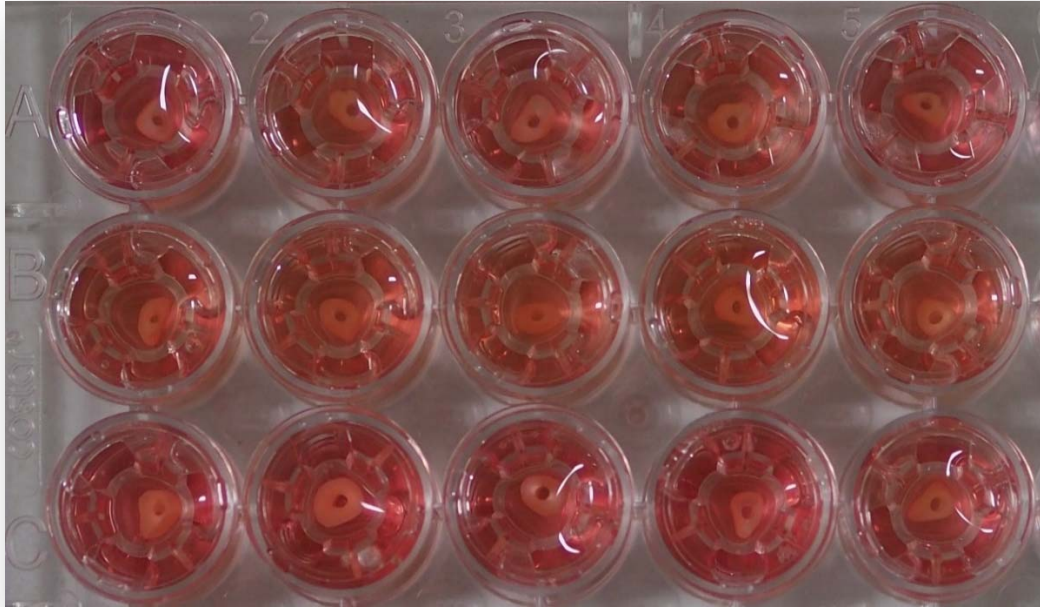
## 2.10 SCAP ve PRP'nın Organotipik Kök Kanal Modellerine Yerleştirilmesi

Gerekli sayıya ulaşan hücreler, irrigasyon protokolü uygulanmış her bir organotipik kök kanal modeli içerisinde  $2,5 \times 10^6$  hücre/mL olacak şekilde PRP ile karıştırılarak hazırlandı. Bu işlemden önce PRP içerisine %10 oranında kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) eklenerek antikoagülan etkinin ortadan kalkması ve fibrin polimerizasyonunun gerçekleşmesi sağlandı. Ardından kök kanal modelleri; 0,4 µm boyutunda porlara sahip polyester membranlı transwell insert (Corning, Tewksbury, MA) içerisine dik bir şekilde yerleştirildi (Şekil 2.13). Hazırlanan PRP/SCAP süspansiyonu, her bir kök kanalı içerisinde 10 µL olacak şekilde, steril bir pipet

yardımıyla kanal içerisine yavaşça enjekte edildi. Ardından tüm örneklerle, transwell ve kuyuyu dolduracak şekilde besiyeri eklendi (Şekil 2.14). 37<sup>0</sup>C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemli ortamda genel hijyen kurallarına uyularak, 3. ve 7. günlerde hücre canlılığı test edilmek üzere inkübe edildi ve her 2 günde bir kez besiyeri tazelandı.



**Şekil 2.13 (A)** Çalışmamızda kullanılan transwell insertler **(B)** Kök kanal modellerinin transwell içerisine dik bir şekilde yerleştirilmesi



**Şekil 2.14** Kök kanal modelleri yerleştirildikten sonra transwell ve kuyuların besiyeri ile doldurulması

## 2.11 WST-1 ile SCAP Canlılığının Belirlenmesi

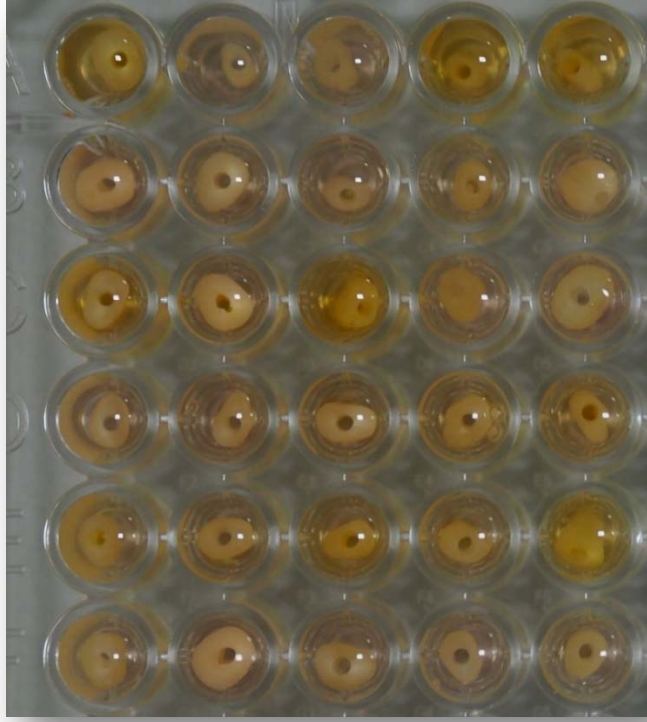
WST-1; hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksitesinin radyoaktif olmayan ölçümünü yapan kullanıma hazır kolorimetrik bir reaktiftir. Canlı hücreler besiyerini sarı renge dönüştürür ve renk değişimine bağlı olarak mikropilaka okuyucuda absorbans ölçümü yapılarak veri elde edilir.

3. ve 7. günündeki deney grubuna ait kök kanal modelleri transwell içerisinde alınarak 96 kuyucuklu mikropilakalara yerleştirildi. Karanlık ortam sağlanarak kök kanal modellerinin bulunduğu tüm kuyucuklara 200 µL fenol red içermeyen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biological Industries, Israel) konuldu ve üzerine 10 µl Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Basel, Switzerland) çözeltisi ilave edildi (Şekil 2.15). 37°C ve karanlık ortamda 4 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu mikropilakanın absorbans değerleri mikropilaka spektrofotometri cihazında (BioTek PowerWave XS2, Winooski, VT, USA) 420 nm'de okundu.

Hücre canlılığı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{deney grubuna ait ortalama absorbans değeri}}{\text{kontrol grubuna ait ortalama absorbans değeri}} \times \%100$$





**Şekil 2.15** Kök kanal modellerinin WST-1 ile inkübasyon sonrası görünümü

### **2.12 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemiyle (xCELLigence RTCA) Zamana Bağlı SCAP Proliferasyonunun Belirlenmesi**

xCELLigence RTCA sistemi (Roche, Basel, Switzerland) hücre kültürü E-plate'lerinin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçer. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dâhil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir.

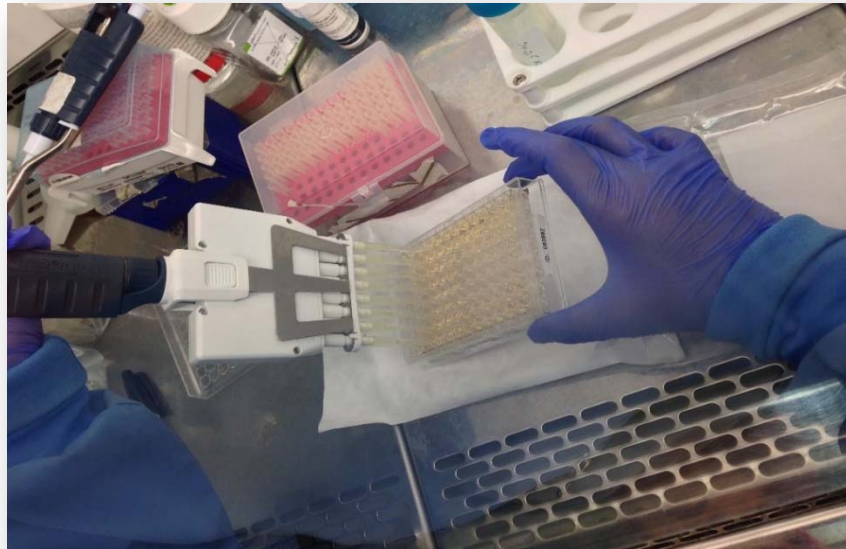
xCELLigence RTCA sistemi ile (Şekil 2.16) hücre proliferasyonu değerlendirilirken 96 kuyucuklu E-plate (Roche, Basel, Switzerland) kullanıldı.





**Şekil 2.16** Çalışmamızda kullanılan xCELLigence RTCA sistemi

Bu deney, WST-1 ile hücre canlılığı değerlendirilirken belirlenen gruplardaki irrigasyon ajanlarının organotipik kök kanal modelleri yerine mikroplaka kuyucuklarına uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubuna ait kuyucuklar herhangi bir irrigasyon ajanı ile yıkanmadı. Her grup 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Her kuyucuk için her irrigasyon ajanından 200  $\mu$ L kullanıldı (Şekil 2.17). İrrigasyonu tamamlanan kuyucuklar laminar akışlı kabin içerisinde kurumaya bırakıldı.



**Şekil 2.17** E-plate kuyucuklarının irrigasyon ajanları ile yıkanması

Flasktaki hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı mikroskopik incelemeyle belirlendikten sonra laminar akışlı kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Ardından 0,5 mL PBS ile yıkandı ve 0,5 mL tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra flaska besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı ve 2500 rpm hızla 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri eklenerek süspansiyon edildi ve hücre sayımı yapıldı.

Hücreler kuyucuklara ekilmeden önce E-plate'in her kuyusuna 100 µL besiyeri konuldu. E-plate etüvde bulunan xCELLigence RTCA sistemine yerleştirildikten sonra E-plate ile cihazın aynı sıcaklığa ulaşması için 5 dakika beklendi ve 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra E-plate çıkarıldı. Tüm kuyucuklara konsantrasyonu  $3 \times 10^4$  hücre/mL olacak şekilde 100 µL PRP/SCAP süspansiyonu ekildi. Bu işlemden önce PRP içerisine %10 oranında CaCl<sub>2</sub> eklenerek antikoagülan etkinin ortadan kalkması ve fibrin polimerizasyonunun gerçekleşmesi sağlandı. E-plate tekrar etüve yerleştirilip 10 dakika beklendi. 10 dakika sonunda okuma başlatıldı. 116 saat boyunca her kuyunun empedans değeri izlenerek proliferasyon takip edildi. Sonuçlar RTCA Software 1.2 (Roche, Basel, Switzerland) ile değerlendirildi ve CI değeri olarak sunuldu.

## **2.13 İkili Boyama Yöntemi ile SCAP'nde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi**

### **2.13.1 İkili Boyama Yönteminde Kullanılacak Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması**

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptoz ve nekrozu göstermektedir. Kullanılan boyalardan Ribonükleaz A -20 °C'de saklanır. Sitoplazmik RNA'yı yok eder ve böylece sitoplazmanın boyanmasını engeller. Hoechst (33342) boyası +4 °C'de saklanır. Canlı hücreleri sönük mavi renkte, apoptotik hücreleri ise parlak beyaz renkte boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium

iodide ise +4 °C’de saklanır ve canlı hücre zarından geçemez. Fakat ölü hücre zarından geçerek DNA ve RNA’yı kırmızıya boyar ve sekonder nekrozu gösterir.

Ribonükleaz A (SERVA, Germany); 1 mL PBS’de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı.

Hoechst (33342) (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, Missouri, USA); 1 mL PBS’de 200 µg olacak şekilde hazırlandı.

Propidium Iodide (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, Missouri, USA); 1 mL PBS’de 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

Boyalar kullanılana kadar -20 °C’de saklandı.

Çalışmamızda kullanılan solüsyon ise (ikili boyama yöntemi çalışma solüsyonu); 10 mL PBS içine Ribonükleaz-A’dan 100 µL, Hoechst (33342) boyasından 500 µL, propidium iodide boyasından 100 µL ilave edilerek hazırlandı.

### **2.13.2 Deneyin Yapılışı**

İkili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz varlığı değerlendirilirken 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanıldı. Bu deney, WST-1 ile hücre canlılığı değerlendirilirken belirlenen gruplardaki irrigasyon ajanlarının organotipik kök kanal modelleri yerine mikropalaka kuyucuklarına uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubuna ait kuyucuklar herhangi bir irrigasyon ajanı ile yıkanmadı. Her grup 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve her kuyucuk için her irrigasyon ajanından 200 µL kullanıldı. İrrigasyonu tamamlanan kuyucuklar laminar akışlı kabin içerisinde kurumaya bırakıldı.

Flasktaki hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı mikroskopik incelemeyle belirlendikten sonra laminar akışlı kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Ardından 0,5 mL PBS ile yıkandı ve 0,5 mL tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra flaska besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı ve 2500 rpm hızla 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında

süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri eklenerek süspansiyon edildi ve hücre sayımı yapıldı.

İrrigasyonu tamamlanan kuyucuklara konsantrasyonu  $5 \times 10^4$  hücre/mL olacak şekilde 100  $\mu$ L PRP/SCAP süspansiyonu ekildi. Bu işlemden önce PRP içerisine %10 oranında  $\text{CaCl}_2$  eklenerek antikoagülan etkinin ortadan kalkması ve fibrin polimerizasyonunun gerçekleşmesi sağlandı. Ardından  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  ve %95 hava içeren nemli ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler inverted mikroskop (DMIL LED, Leica, Germany) altında incelendi ve vasatları atılan hücrelerin üzerine 100  $\mu$ L ikili boyama çalışma solüsyonu damlatıldı. Hiç ışık görmeyecek şekilde, oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan ataçmanlı inverted mikroskop (DMI6000B, Leica, Germany) (Şekil 2.18) ile DAPI filtresi altında her kuyucuktan bir görüntü alınarak tüm hücreler içerisinde apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) altında yine her kuyucuktan bir görüntü alınarak nekroza uğramış hücreler tespit edildi. Her grup için üç kuyudaki tüm hücre, nekrotik hücre ve apoptotik hücre sayıları toplandı. Tüm hücreler içinde apoptoz ve nekroza uğramış hücrelerin yüzdesi ve standart sapması hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi.



**Şekil 2.18** Çalışmada kullanılan floresan ataçmanlı inverted mikroskop

## 2.14 SEM Analizi

SEM analizi için her grupta 1 adet tek köklü diş kullanılmak üzere toplam 9 adet tek köklü dişin kron kısımları elmas separe yardımıyla uzaklaştırıldı. Kök kanalları Protaper® (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) döner alet sistemi ile genişletildi. Genişletmeye SX eğesi ile başlandı ve en son F4 (40/0.6) eğesi kullanılarak genişletme tamamlandı. Kök kanallarının genişletilmesi esnasında, her alet değişiminden sonra ve preparasyon sonunda, kök kanalları serum fizyolojik ile irrigate edildi ve kağıt konularla kurulandı.

Genişletmenin ardından kök kanallarının iç yüzeyine dokunulmadan köklerin bukkal ve lingual yüzeylerine paralel oluklar açıldı. Daha sonra bu oluklara yerleştirilen siman spatülü yardımıyla dişler iki parçaya ayrıldı ve hidrojen peroksit gazı ile steril edildi.

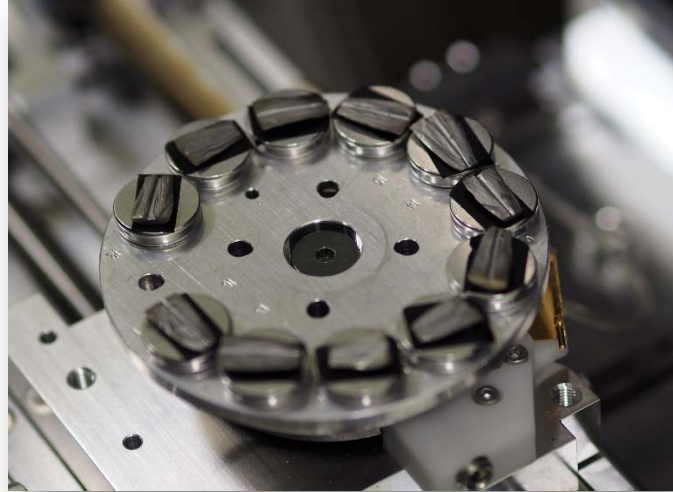
Steril haldeki 18 adet örnek, her grupta 2 adet örnek olacak şekilde 9 gruba ayrıldı. Örnekler, WST-1 yönteminde organotipik kök kanal modellerine uygulanan irrigasyon protokolleri kullanılarak laminar akışlı kabin içerisinde irrigate edildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklerde kök kanalı içerisine, konsantrasyonu  $2,5 \times 10^6$  hücre/mL olacak şekilde 10 µL PRP/SCAP süspansiyonu ekildi. Bu işlemde önce PRP içerisine %10 oranında CaCl<sub>2</sub> eklenerek antikoagülan etkinin ortadan kalkması ve fibrin polimerizasyonunun gerçekleşmesi sağlandı. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler 7 gün boyunca besiyeri içerisinde inkübe edildi.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra örneklere ekilen hücreler, %2'lik gluteraldehit ile 30 dakika muamele edilerek fikse edildi. Ardından tüm örnekler sırasıyla etanol serisinin (%30, %50, %70, %80, %90 ve saf alkol) her birinde 5 dakika bekletilerek dehidrate edildi ve kurumaya bırakıldı.

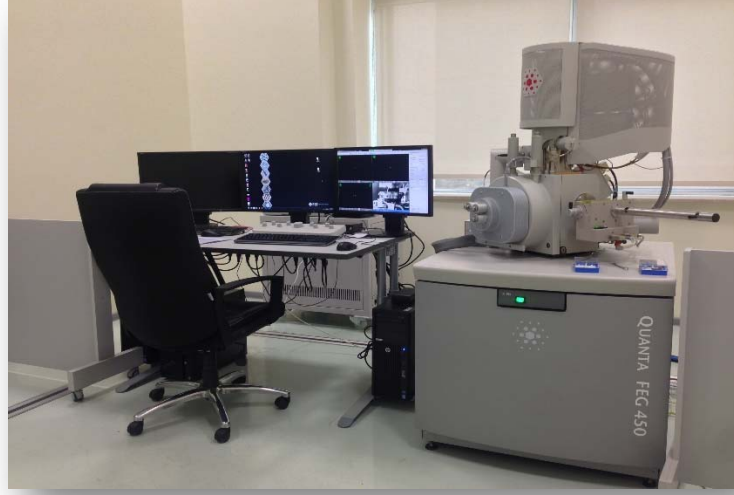


**Şekil 2.19** Çalışmada kullanılan altın-palladyum kaplama cihazı

Kurutma işlemini takiben SEM incelemesinin yapılabilmesi için her örnek kaplama cihazı (Q150R ES, Quorum, East Sussex, England) kullanılarak altın-palladyum tabaka ile kaplandı (Şekil 2.19). Hazırlanan örnekler (Şekil 2.20) SEM (Quanta FEG 450, FEI, Eindhoven, Netherlands) altında incelendi (Şekil 2.21).



**Şekil 2.20** Altın-palladyum tabaka ile kaplanan örneklerin SEM cihazına yerleştirilmesi



**Şekil 2.21** Çalışmada kullanılan SEM cihazı

## **2.15 İstatistiksel Analiz**

Bu çalışmada elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corporation, New York, USA) programı aracılığı ile analiz edildi. Tüm testlerde gruplar arasındaki karşılaştırmalara Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis H testi ile, grup içi karşılaştırmalara ise Wilcoxon işaret testi ile bakıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanıldı ve  $p < 0,05$  olması durumunda anlamlı farklılığın olduğu kabul edildi.

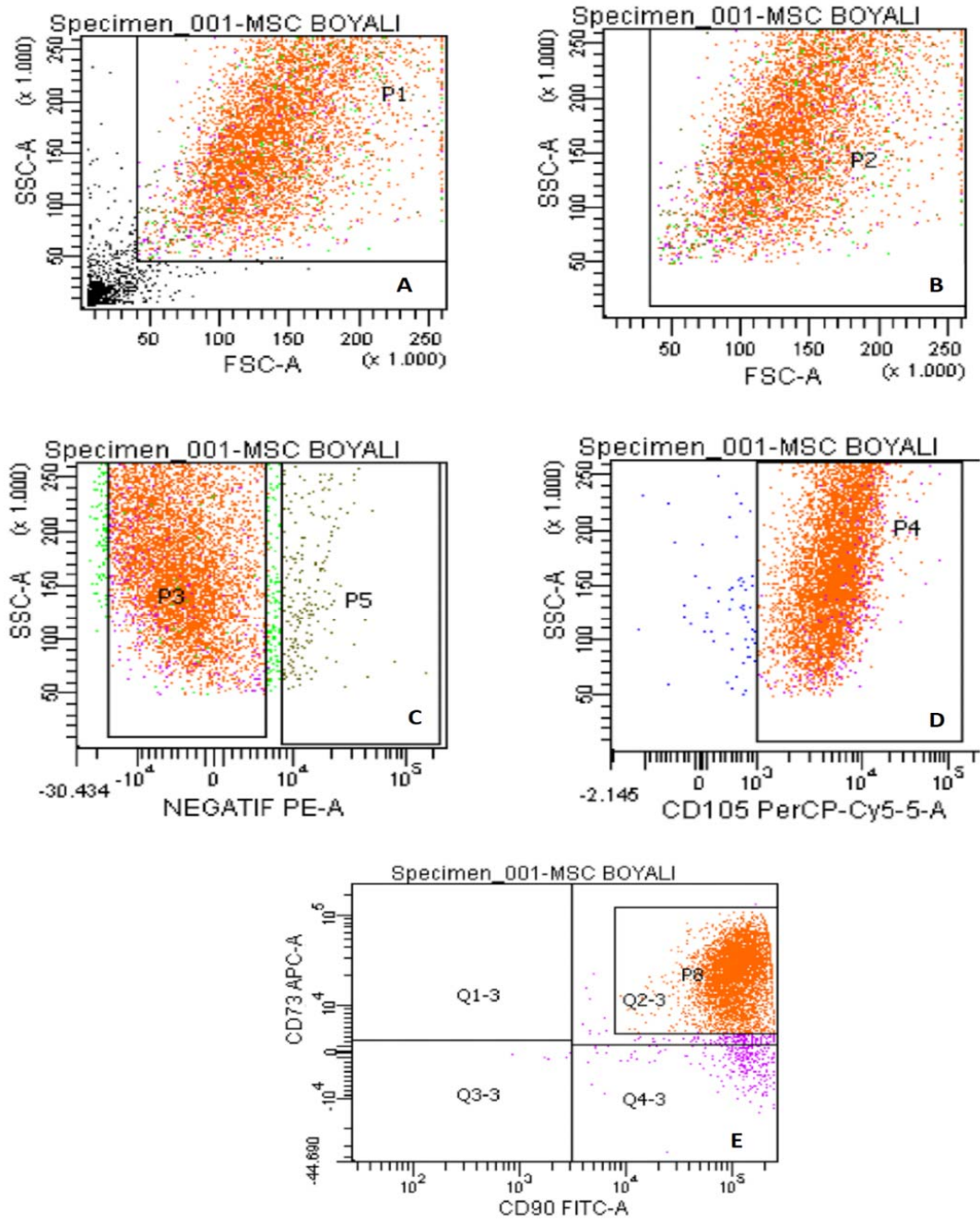
## 3 BULGULAR

### 3.1 SCAP Karakterizasyonu

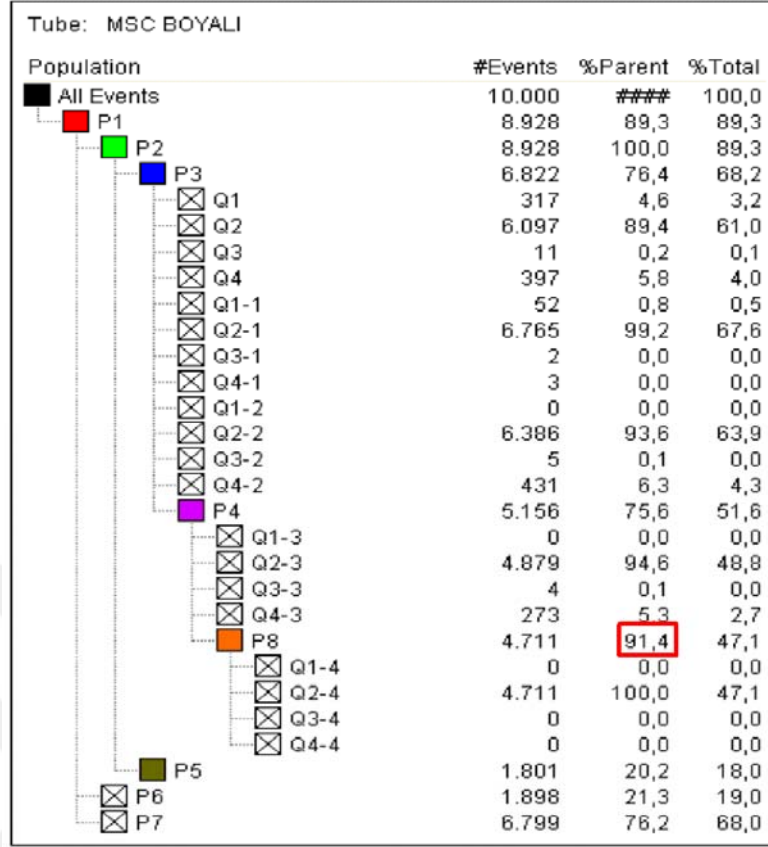
8 adet apikal papilla dokusundan izole edilen ve çoğaltılan hücrelerin akan hücre ölçer ile karakterizasyonu Şekil 3.1’de gösterilen basamaklar izlenerek yapıldı. Analiz sonucunda bütün örnekler için CD73, CD90 ve CD105 yüzey markırlarını birlikte eksprese eden hücrelerin genel yüzdesi %90’ın üzerindeydi (Şekil 3.2).







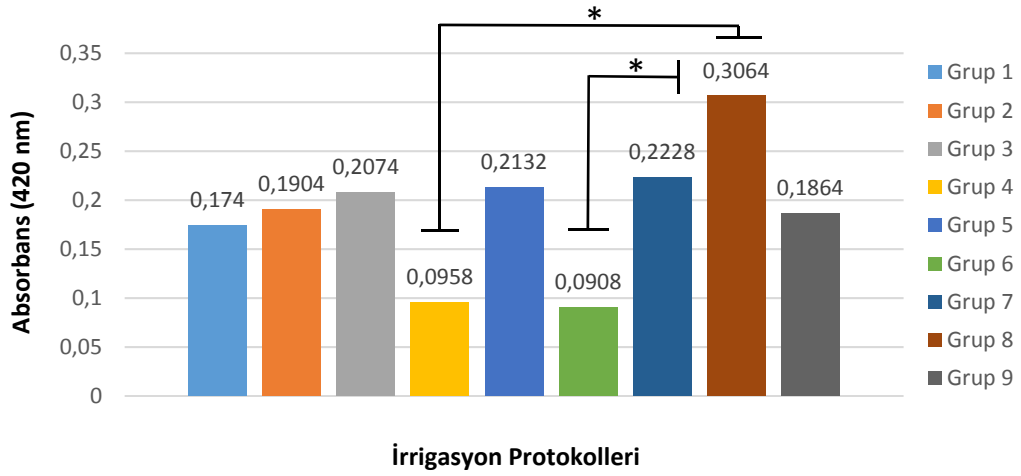
**Şekil 3.1** Akan hücre ölçerde SCAP'nin analizi **(A)** Tüm popülasyon içerisinde canlı hücrelerin kapılanması (P1 kapısı) **(B)** Sadece canlı hücrelerin gösterilmesi (P2 kapısı) **(C)** P2 kapısı içinde negatif kokteyldeki antikorlarla boyanmayan hücrelerin kapılanması (P3 kapısı) **(D)** P3 kapısı içinde CD105 pozitif hücrelerin kapılanması (P4 kapısı) **(E)** P4 kapısı içinde CD73 ve CD90 pozitif hücrelerin kapılanması (P8 kapısı)



Şekil 3.2 Akan hücre ölçerde analizi yapılan hücrelerin yüzde değerleri

### 3.2 SCAP Canlılığı

Çalışmada organotipik kök kanal modellerine uygulanan irrigasyon protokollerinin, SCAP'nin canlılığı üzerine etkisinin değerlendirildiği WST-1 yönteminde 3. ve 7. güne ait absorbans değerlerinin ortalamaları Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te grafiksel olarak gösterilmektedir.



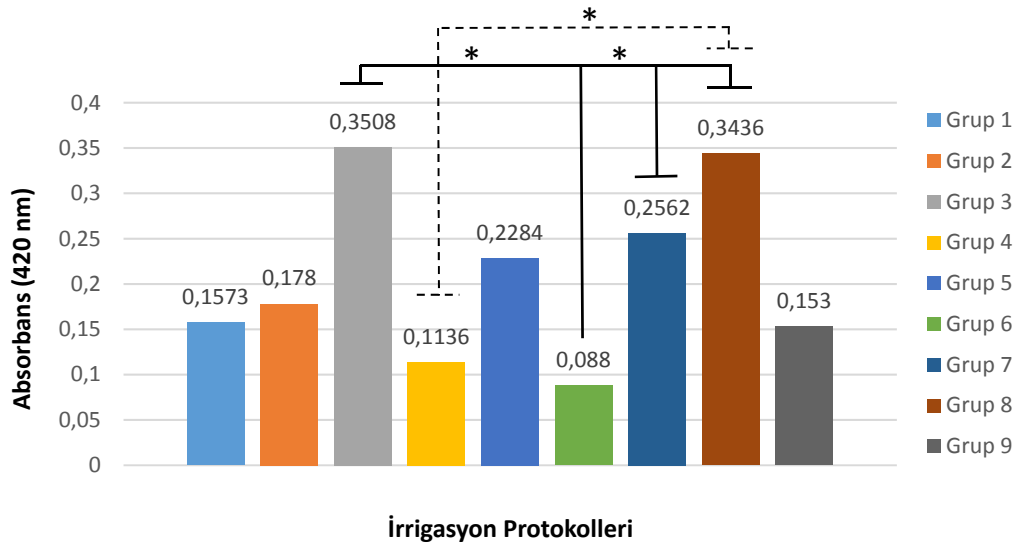
**Şekil 3.3** WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. güne ait absorbans değeri ortalamalarının grafiksel görünümü. \*İşaretili gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,01$ ).

WST-1 yöntemi ile 3. günde elde edilen veriler incelendiğinde; en yüksek absorbans değeri %2,5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 8) ile irrigasyon yapılan grupta gözlemlendi ve en düşük absorbans değerlerine sahip %1 NaOCl+%5 EDTA (Grup 4) ve %5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 6) ile irrigasyon yapılan gruplardaki absorbans değerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,01$ ) (Şekil 3.3).

Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA) ve Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA) dışındaki tüm gruplar kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek absorbans değerine sahip olsa da, kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p > 0,01$ ) (Şekil 3.3).

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ( $p > 0,01$ ), %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupta absorbans değerinin %5'lik EDTA (Grup 2) ile irrigasyon yapılan gruba göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3). Ayrıca belli bir konsantrasyondaki (%1, %2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA ile irrigasyon yapılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grubun, %5'lik EDTA ile irrigasyon yapılan gruba göre daha yüksek absorbans değerine sahip

olduğu görüldü (Şekil 3.3). Farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in ardından %5'lik EDTA kullanılan gruplar (Grup 4, 5 ve 6) kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek absorbans değeri %2,5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 5) ile irrigasyon yapılan grupta gözlenirken, %17'lik EDTA kullanılan gruplar (Grup 7, 8 ve 9) kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek absorbans değeri %2,5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 8) ile irrigasyon yapılan grupta gözlendi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.4** WST-1 yöntemi ile elde edilen 7. güne ait absorbans değeri ortalamalarının grafiksel görünümü. \*İşaretili gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,01$ ).

WST-1 yöntemi ile 7. günde elde edilen veriler incelendiğinde; en yüksek absorbans değerleri sırasıyla %17'lik EDTA (Grup 3), %2,5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 8) ve %1 NaOCl+%17 EDTA (Grup 7) ile irrigasyon yapılan gruplarda gözlendi ve bu değerler en düşük absorbans değerine sahip %5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 6) ile irrigasyon yapılan gruptaki absorbans değerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,01$ ) (Şekil 3.4).

Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA), Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA) ve Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA) dışındaki tüm gruplar kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek absorbans değerine sahip olsa da, kontrol grubu ile aralarında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,01$ ). Fakat Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA)'ün sahip olduğu absorbans değeri Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA)'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,01$ ) (Şekil 3.4).

%17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupta absorbans değeri %5'lik EDTA (Grup 2) ile irrigasyon yapılan gruba göre; 3. günden daha büyük bir farkla yüksek olmasına rağmen, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,01$ ) (Şekil 3.4). Ayrıca belli bir konsantrasyondaki (%1,%2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA ile irrigasyon yapılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grubun, %5'lik EDTA ile irrigasyon yapılan gruba göre daha yüksek absorbans değerine sahip olduğu görüldü. Farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in ardından %5'lik EDTA kullanılan gruplar (Grup 4, 5 ve 6) kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek absorbans değeri %2,5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 5) ile irrigasyon yapılan grupta gözlenirken, %17'lik EDTA kullanılan gruplar (Grup 7, 8 ve 9) kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek absorbans değeri %2,5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 8) ile irrigasyon yapılan grupta gözlendi (Şekil 3.4).

3. ve 7. günde yapılan ölçümlerde, SCAP'nin sahip olduğu absorbans değerlerinin ortalamaları Şekil 3.5'te, yüzde canlılık değerleri ise Şekil 3.6'da grafiksel olarak gösterilmektedir. Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 7 ve Grup 8'deki absorbans değeri zamanla artarken; Grup 1, Grup 2, Grup 6 ve Grup 9'daki absorbans değeri zamanla azalmış ve Grup 2 ve Grup 9'daki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

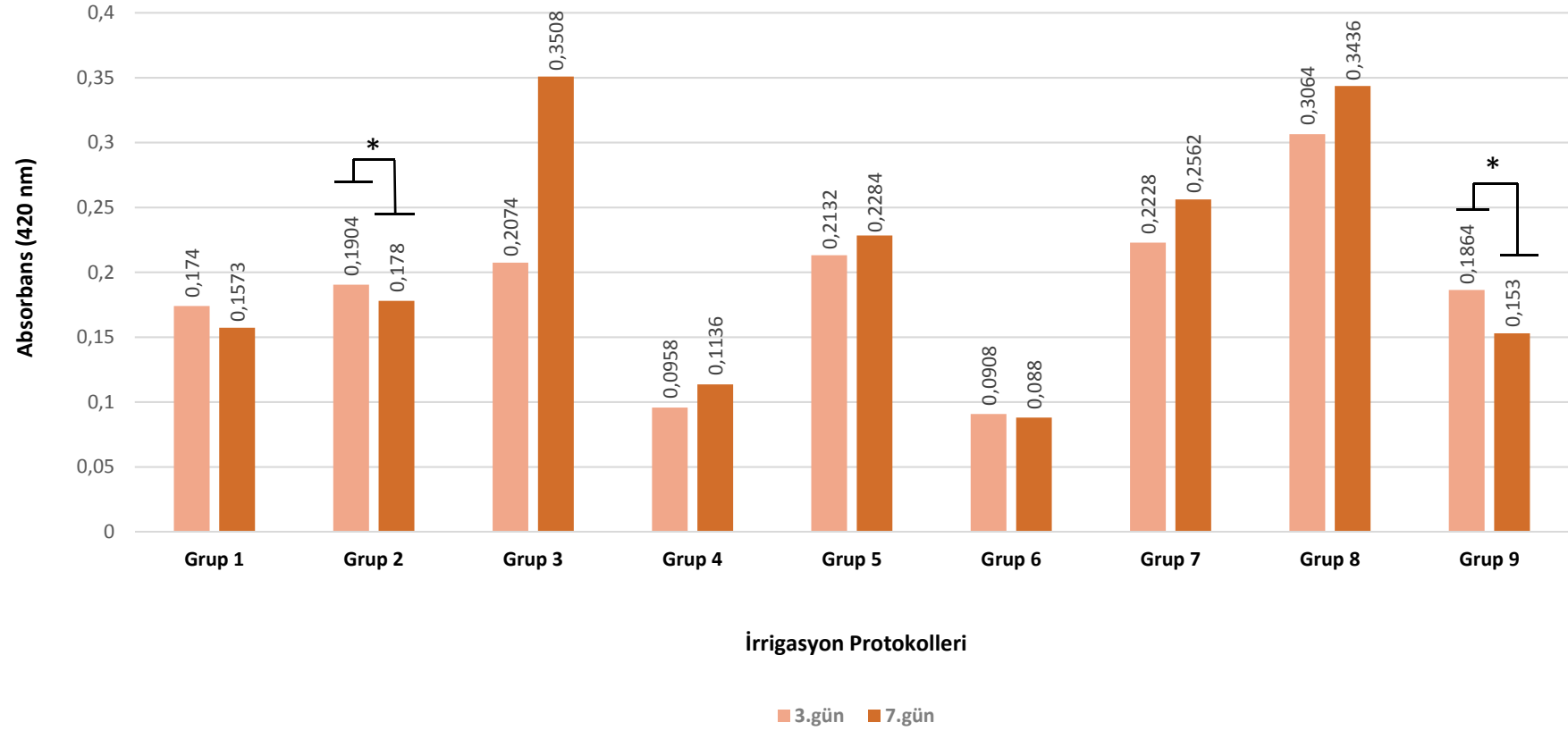
3. günde yapılan ölçümlerde Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA) en yüksek absorbans değerine sahipken, 7. günde Grup 3 (%17 EDTA)'ün en yüksek absorbans değerine sahip olduğu görüldü. Her iki zaman ölçümünde de en düşük SCAP canlılık oranı ise Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'da görüldü.

3. günde %5'lik EDTA (Grup 2) ve %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan gruplarda kültüre edilen hücreler yakın absorbans değerlerine sahipken, 7. günde %17'lik EDTA hücreler üzerinde olumlu etkisini devam ettirerek en yüksek absorbans ve yüzde canlılık değerine ulaştı. %17'lik EDTA'in 7. günde sahip olduğu bu değerler tüm zaman ve tüm gruplar arasında görülen en yüksek absorbans ve yüzde

canlılık değeri oldu. %5'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grupta kültüre edilen hücrelerde ise absorbens değerinin 3. günden 7. güne azaldığı görüldü.

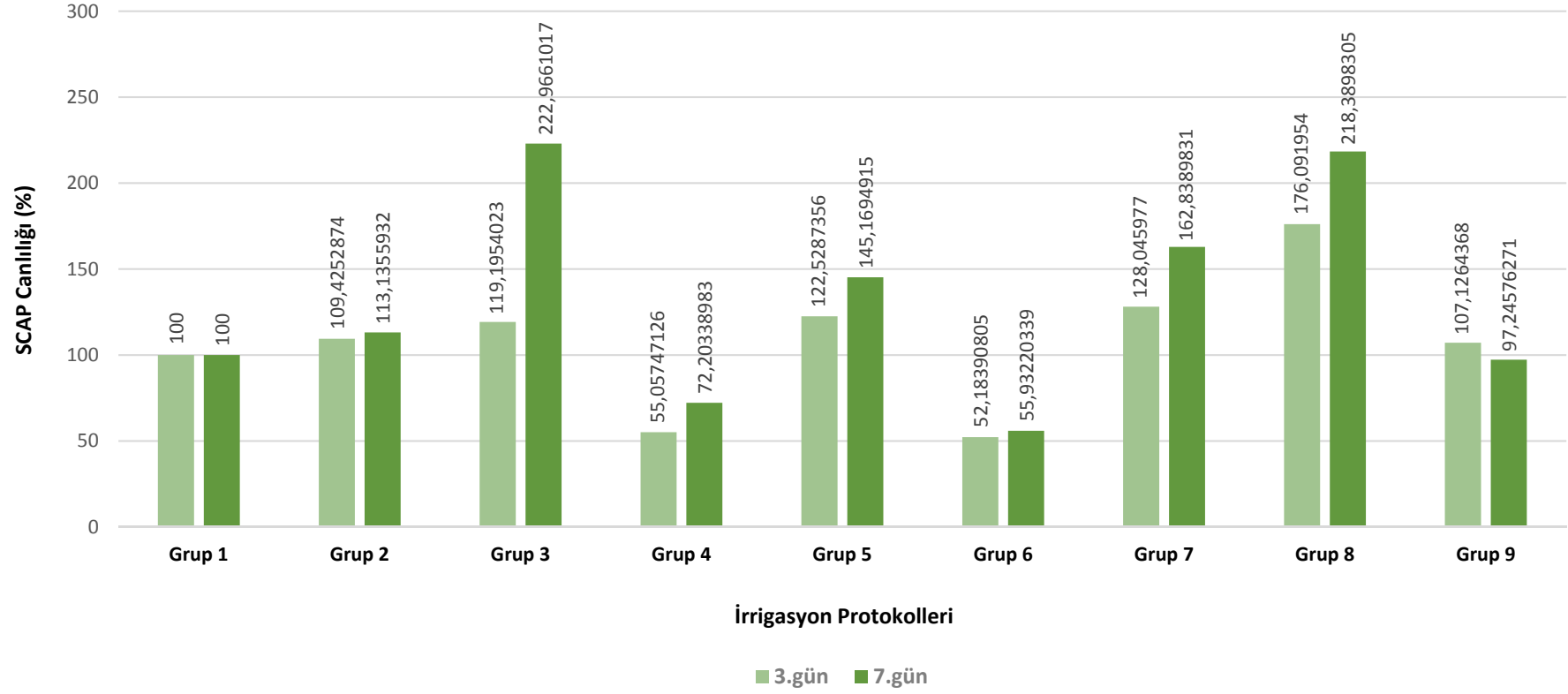
EDTA tüm konsantrasyonlarında, %1'lik ve %2,5'lik NaOCl'in olumsuz etkilerini zamanla tersine çevirse de; %5'lik NaOCl'in olumsuz etkilerini tersine çevirmede başarılı olamadı ve Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA) ve Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'da absorbens değerlerinin zamanla azaldığı gözlemlendi.





Şekil 3.5 Tüm gruplarda WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. ve 7. güne ait absorbans değeri ortalamalarının grafiksel görünümü

\*İşaretili gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.6** Tüm gruplarda WST-1 yöntemi ile elde edilen 3. ve 7. güne ait yüzde canlılık değerlerinin grafiksel görünümü



### 3.3 Zamana Bağlı SCAP Proliferasyonu

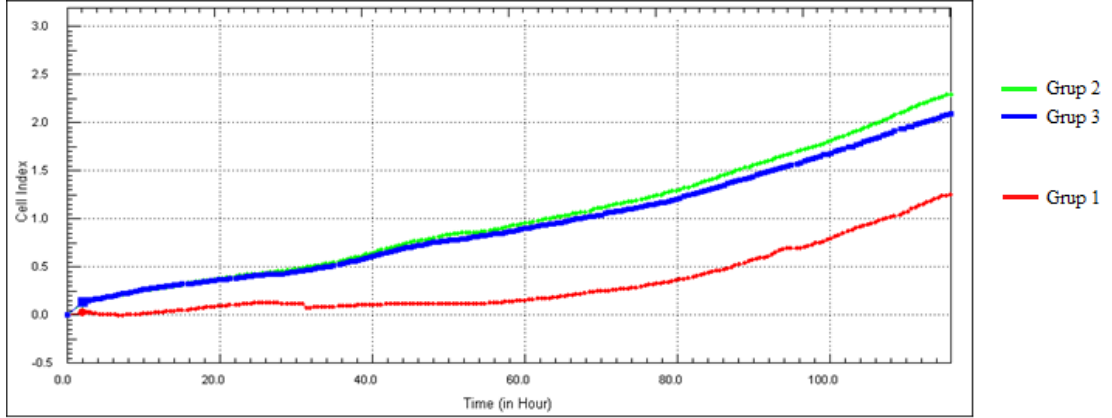
Çalışmada kuyucuklara uygulanan irrigasyon protokollerinin, zamana bağlı SCAP proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği gerçek zamanlı hücre analiz sistemine (xCELLigence RTCA) ait 116 saat sonunda elde edilen ortalama CI değerleri ve standart sapmalar Çizelge 3.1’de; grafikler ise Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da gösterilmektedir.

**Çizelge 3.1** xCELLigence RTCA sistemine ait 116 saat sonunda elde edilen ortalama CI ve standart sapma değerleri

İrrigasyon Protokolleri	ORT ± SS
<b>Grup 1</b> (Kontrol)	1,22 ± 0,97 <sup>a,c</sup>
<b>Grup 2</b> (%5 EDTA)	2,26 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>Grup 3</b> (%17 EDTA)	2,05 ± 0,16 <sup>a,b</sup>
<b>Grup 4</b> (%1 NaOCl + %5 EDTA)	1,58 ± 0,09 <sup>a,b,c</sup>
<b>Grup 5</b> (%2,5 NaOCl + %5 EDTA)	1,11 ± 0,53 <sup>c</sup>
<b>Grup 6</b> (%5 NaOCl + %5 EDTA)	0,77 ± 0,47 <sup>c</sup>
<b>Grup 7</b> (%1 NaOCl + %17 EDTA)	1,73 ± 0,19 <sup>a,b,c</sup>
<b>Grup 8</b> (%2,5 NaOCl + %17 EDTA)	1,73 ± 0,18 <sup>a,b,c</sup>
<b>Grup 9</b> (%5 NaOCl + %17 EDTA)	0,97 ± 0,37 <sup>c</sup>

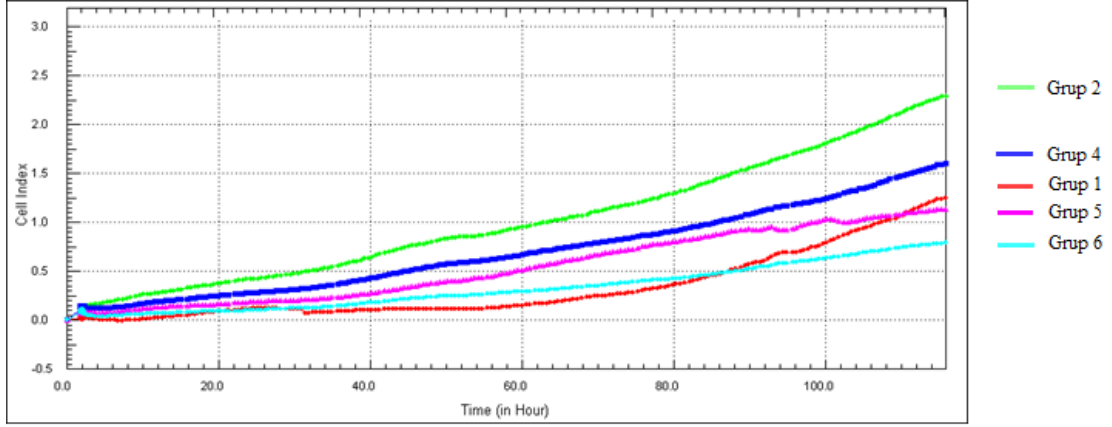
\*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,01$ ).

\*Aynı sütunda aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,01$ ).



**Şekil 3.7** %5 (Grup 2) ve %17'lik EDTA (Grup 3)'in tek başına kullanıldığı grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyonu grafiği

116 saat sonunda yapılan ölçümlere göre, irrigasyon ajanı olarak %5 ve %17'lik EDTA'in tek başına kullanıldığı gruplarda (sırasıyla Grup 2 ve Grup 3) kültüre edilen SCAP'nin kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek proliferasyon oranına sahip olduğu görüldü ve Grup 1 ve Grup 2 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,01$ ) (Şekil 3.7). Grup 2 ve Grup 3 kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, SCAP'nin 116 saat boyunca yakın değerlerde proliferasyon oranına sahip olduğu görüldü ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0,01$ ) (Şekil 3.7).

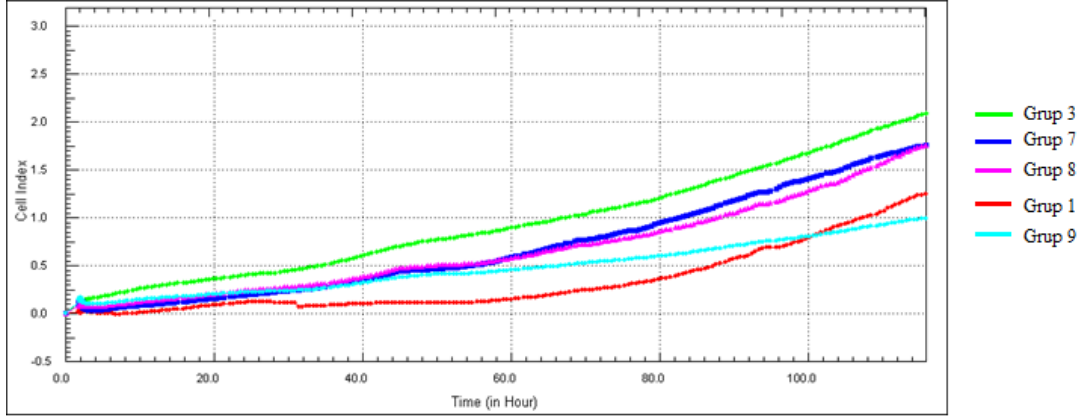


**Şekil 3.8** %5'lik EDTA kullanılan tüm grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği

%5'lik EDTA kullanılan tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında en yüksek SCAP proliferasyonu sadece %5'lik EDTA kullanılan grupta (Grup 2) görülürken, en düşük SCAP proliferasyonu %5 NaOCl+%5 EDTA'in birlikte kullanıldığı grupta (Grup 6) tespit edildi (Şekil 3.8) ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

%5'lik EDTA (Grup 2) ve %1 NaOCl+%5 EDTA (Grup 4) ile irrigasyon yapılan gruplarda SCAP proliferasyonu kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek değere sahipken, %2,5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 5) ve %5 NaOCl+%5 EDTA (Grup 6) ile irrigasyon yapılan gruplarda SCAP proliferasyonunun kontrol grubundan daha düşük değere sahip olduğu görüldü (Şekil 3.8) ve Grup 2 ile Grup 1, Grup 5 ve Grup 6 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

Farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in ardından %5'lik EDTA ile irrigasyon yapılan gruplar (Grup 4, Grup 5 ve Grup 6) kendi aralarında karşılaştırıldığında; NaOCl'in konsantrasyonu arttıkça SCAP proliferasyonunda azalma meydana geldiği görüldü (Şekil 3.8).



**Şekil 3.9** %17'lik EDTA kullanılan tüm grupların kendi aralarında ve kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığı zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği

%17'lik EDTA kullanılan tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en yüksek SCAP proliferasyonu sadece %17'lik EDTA kullanılan grupta (Grup 3) görülürken, en düşük SCAP proliferasyonu %5 NaOCl+%17 EDTA'in birlikte kullanıldığı grupta (Grup 9) tespit edildi (Şekil 3.9) ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

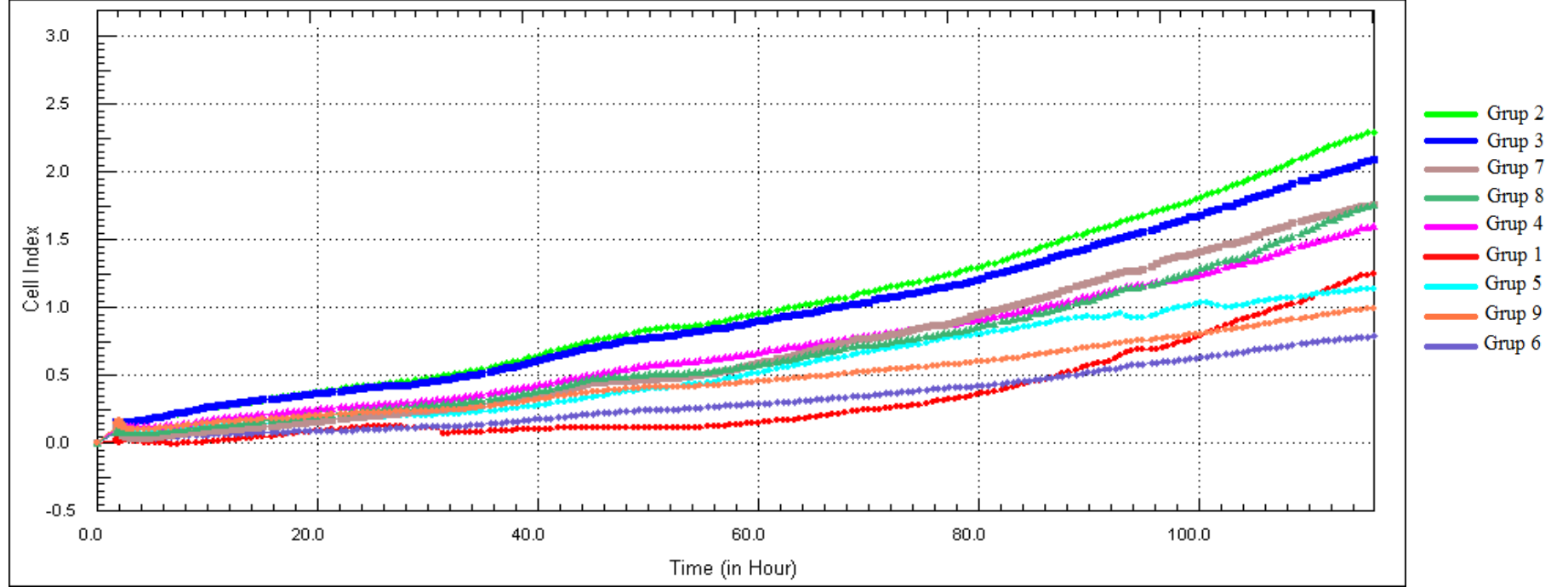
%17'lik EDTA (Grup 3), %1 NaOCl+%17 EDTA (Grup 7) ve %2,5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 8) ile irrigasyon yapılan gruplarda SCAP proliferasyonu kontrol grubuna (Grup 1) göre daha yüksek değere sahipken, %5 NaOCl+%17 EDTA (Grup 9) ile irrigasyon yapılan grupta SCAP proliferasyonunun kontrol grubundan daha düşük değere sahip olduğu görüldü (Şekil 3.9) ve Grup 3 ile Grup 9 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

Farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in ardından %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan gruplar (Grup 7, 8 ve 9) kendi aralarında karşılaştırıldığında; NaOCl'in konsantrasyonu arttıkça SCAP proliferasyonunda azalma meydana geldiği görüldü (Şekil 3.9). Fakat 116 saat sonunda % 2,5'lik NaOCl kullanılan grupta (Grup 8) CI değerinin (1,73063), %1'lik NaOCl kullanılan gruptaki (Grup 7) CI değerini (1,727) geçmekte olduğu tespit edildi.

Sonuçların tamamı incelendiğinde, 116 saat boyunca tüm gruplarda SCAP'nin yüzeye tutunup, proliferere olabildiği gözlemlendi (Şekil 3.10).

116 saat sonunda en yüksek değerler EDTA'in tek başına kullanıldığı gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) görülürken, en düşük değerler %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda (Grup 6 ve Grup 9) görüldü (şekil 3.10). En yüksek proliferasyon oranına sahip bu gruplar ile Grup 5, 6 ve 9 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,01$ ).

Elde edilen sonuçlara göre belli bir konsantrasyondaki (%1, %2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA kullanılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA'in kullanıldığı gruplar, %5'lik EDTA'in kullanıldığı gruplara göre daha yüksek CI değeri göstermiştir (şekil 3.10). Bu nedenle; %5'lik EDTA tek başına kullanıldığında %17'lik EDTA'ten daha yüksek proliferasyon oranına sahip olsa da, %17'lik EDTA'in, NaOCl'in olumsuz etkilerini tersine çevirmede daha başarılı olduğu görülmektedir.



Şekil 3.10 Tüm gruplara ait zamana bağlı SCAP proliferasyon grafiği

### 3.4 SCAP’nde Apoptoz ve Nekroz Varlığı

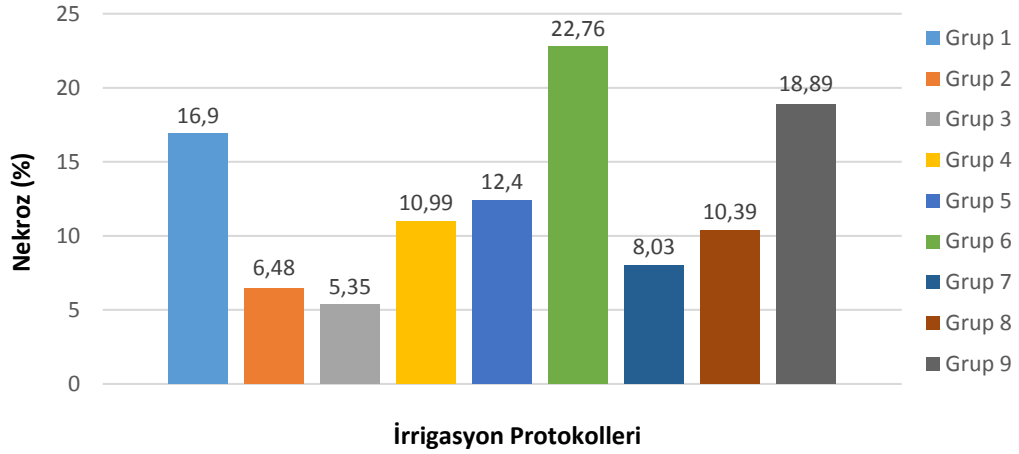
Çalışmada kuyucuklara uygulanan irrigasyon protokollerinin ardından SCAP’nde apoptoz ve nekroz varlığının değerlendirildiği ikili boyama yöntemine ait 24 saat sonunda elde edilen veriler Çizelge 3.2’de, verilerin grafiksel görünümü Şekil 3.11’de, mikroskop görüntüleri ise Şekil 3.12, 3.13, 3.14’te sunulmaktadır. Mikroskop altında yapılan incelemelerde hiçbir grupta apoptotik hücreye rastlanmamıştır.

**Çizelge 3.2** İkili boyama yöntemine ait 24 saat sonunda elde edilen yüzde nekroz ve standart sapma değerleri

İrrigasyon Protokolleri	Nekroz (%) ± SS
<b>Grup 1</b> (Kontrol)	16,90 ± 3,46 <sup>a</sup>
<b>Grup 2</b> (%5 EDTA)	6,48 ± 4,04 <sup>a</sup>
<b>Grup 3</b> (%17 EDTA)	5,35 ± 3,05 <sup>a</sup>
<b>Grup 4</b> (%1 NaOCl + %5 EDTA)	10,99 ± 0,58 <sup>a</sup>
<b>Grup 5</b> (%2,5 NaOCl + %5 EDTA)	12,40 ± 9,16 <sup>a</sup>
<b>Grup 6</b> (%5 NaOCl + %5 EDTA)	22,76 ± 4,62 <sup>a</sup>
<b>Grup 7</b> (%1 NaOCl + %17 EDTA)	8,03 ± 6,66 <sup>a</sup>
<b>Grup 8</b> (%2,5 NaOCl + %17 EDTA)	10,39 ± 0,58 <sup>a</sup>
<b>Grup 9</b> (%5 NaOCl + %17 EDTA)	18,89 ± 4,00 <sup>a</sup>

\*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,01$ ).

\*Aynı sütunda aynı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,01$ ).



**Şekil 3.11** İkili boyama yöntemine ait 24 saat sonunda elde edilen yüzde nekroz değerlerinin grafiksel görünümü

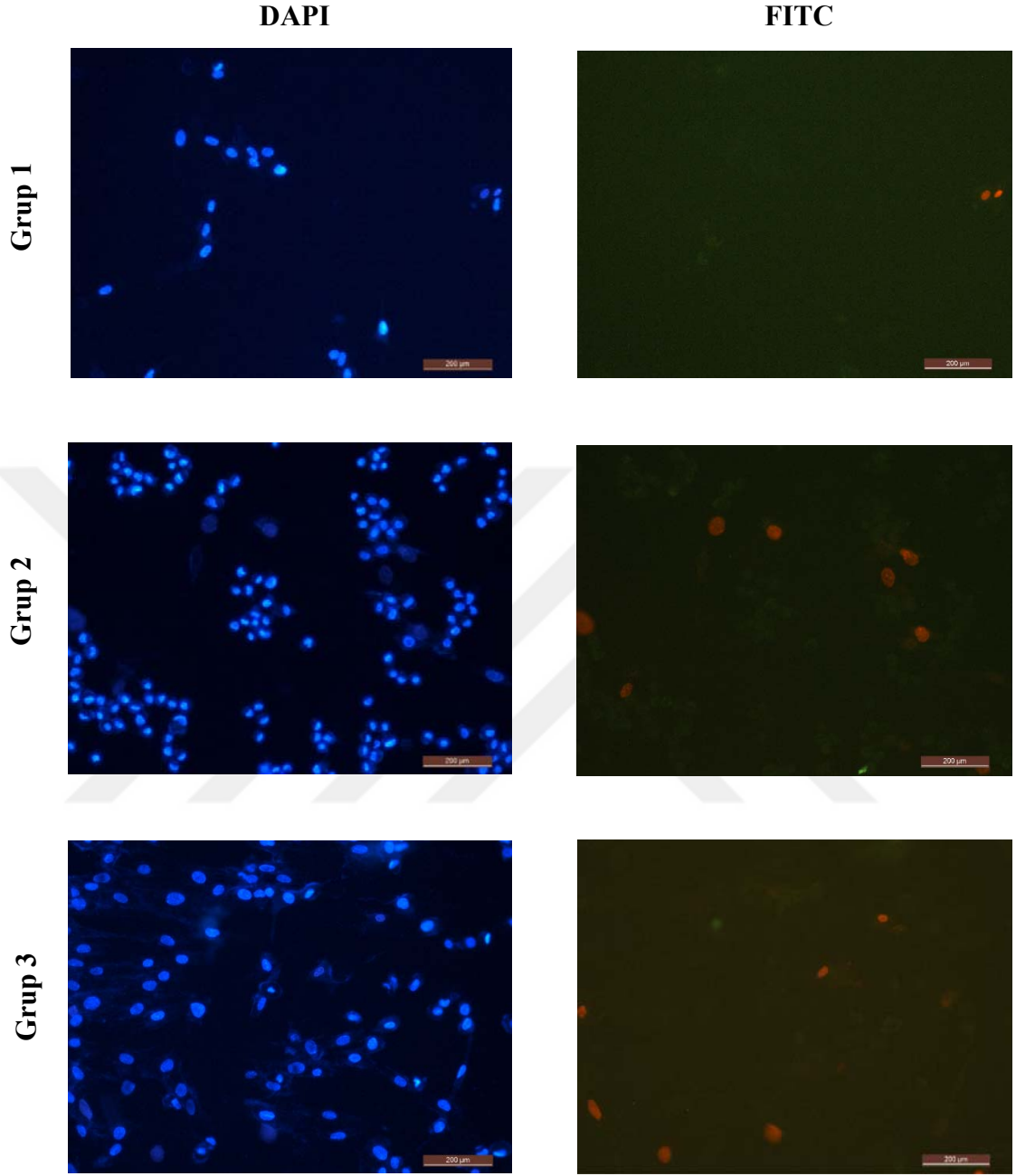
İkili boyama yönteminde 24 saat sonunda elde edilen verilere göre en yüksek nekroz oranları %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda (Grup 6 ve Grup 9) gözlenirken, en düşük nekroz oranı %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupta gözlemlendi (Şekil 3.11).

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ( $p>0,01$ ), %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupta nekroz oranının %5'lik EDTA (Grup 2) ile irrigasyon yapılan gruba göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 3.11).

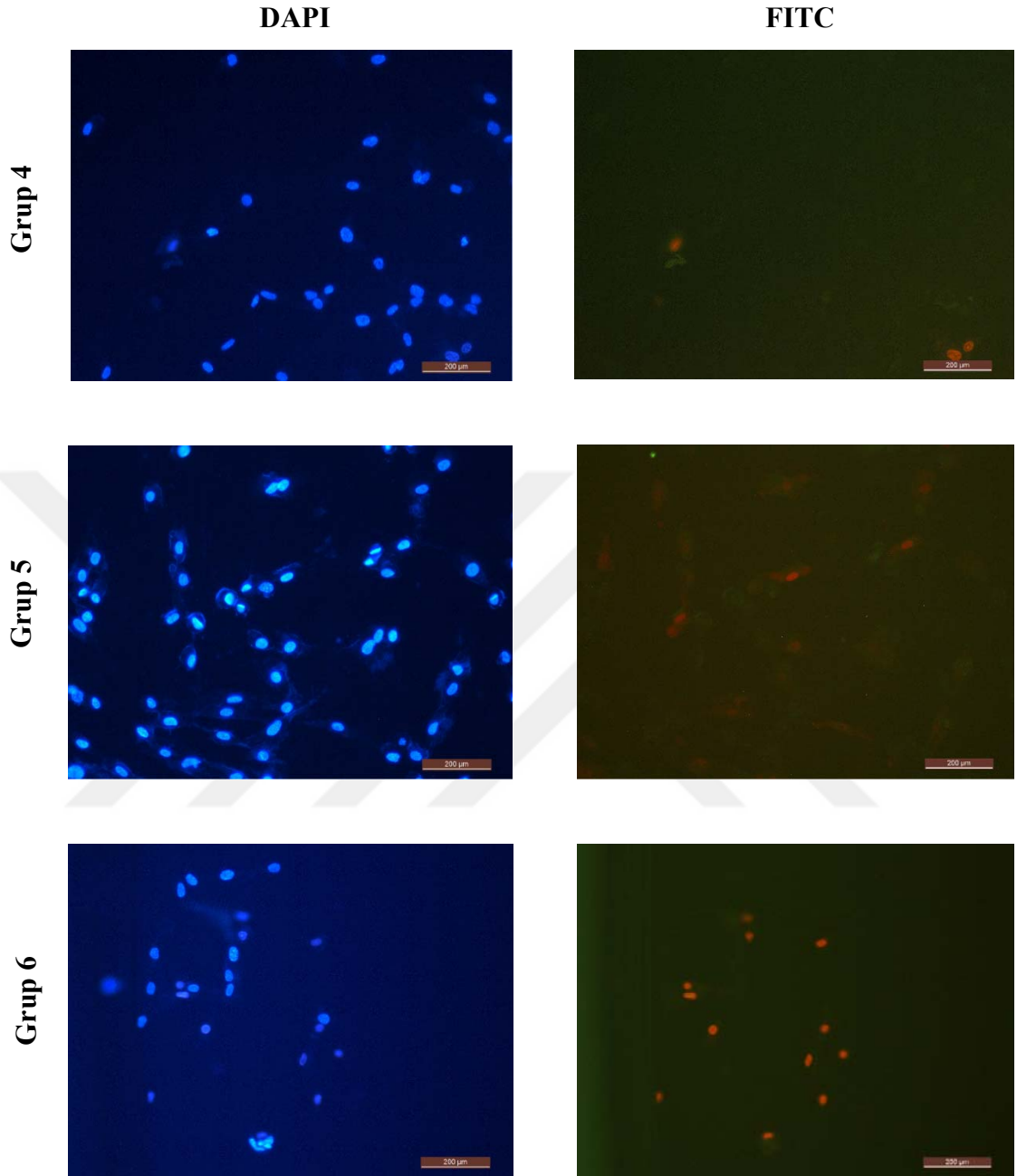
Belli bir konsantrasyondaki (%1, %2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA kullanılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA'nın kullanıldığı grubun, %5'lik EDTA'nın kullanıldığı gruba göre daha düşük nekroz oranına sahip olduğu görüldü (Şekil 3.11). Bu nedenle; %17'lik EDTA'nın NaOCl'in olumsuz etkilerini tersine çevirmede %5'lik EDTA'ten daha başarılı olduğu görülmektedir.

Farklı konsantrasyonlardaki NaOCl ve EDTA ile irrigasyon yapılan grupların tümüne bakıldığında ise (Grup 4, 5, 6, 7, 8 ve 9); NaOCl'in konsantrasyonu arttıkça nekroz oranında da artış meydana geldiği görülmektedir.

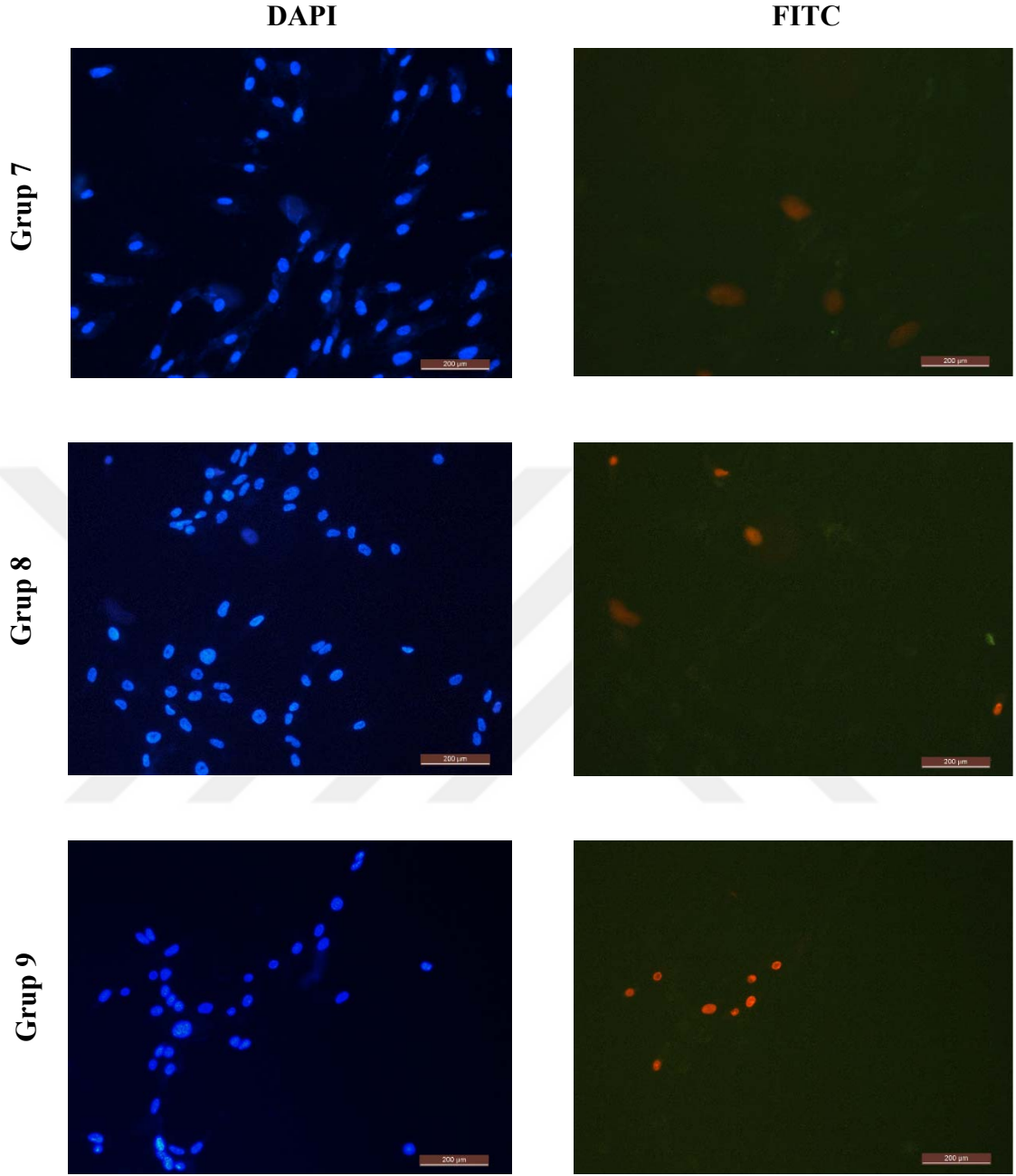




**Şekil 3.12** Grup 1 (kontrol), Grup 2 (%5 EDTA) ve Grup 3 (%17 EDTA)'ün DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri



**Şekil 3.13** Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA), Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA) ve Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'nın DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri



**Şekil 3.14** Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA), Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA) ve Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'un DAPI ve FITC filtreleri altındaki floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri

### 3.5 SEM Analizi

SEM incelemesi sonucunda tüm gruplarda elde edilen farklı büyütmelelerdeki görüntüler Şekil 3.15 ile Şekil 3.32 arasında sunulmaktadır.

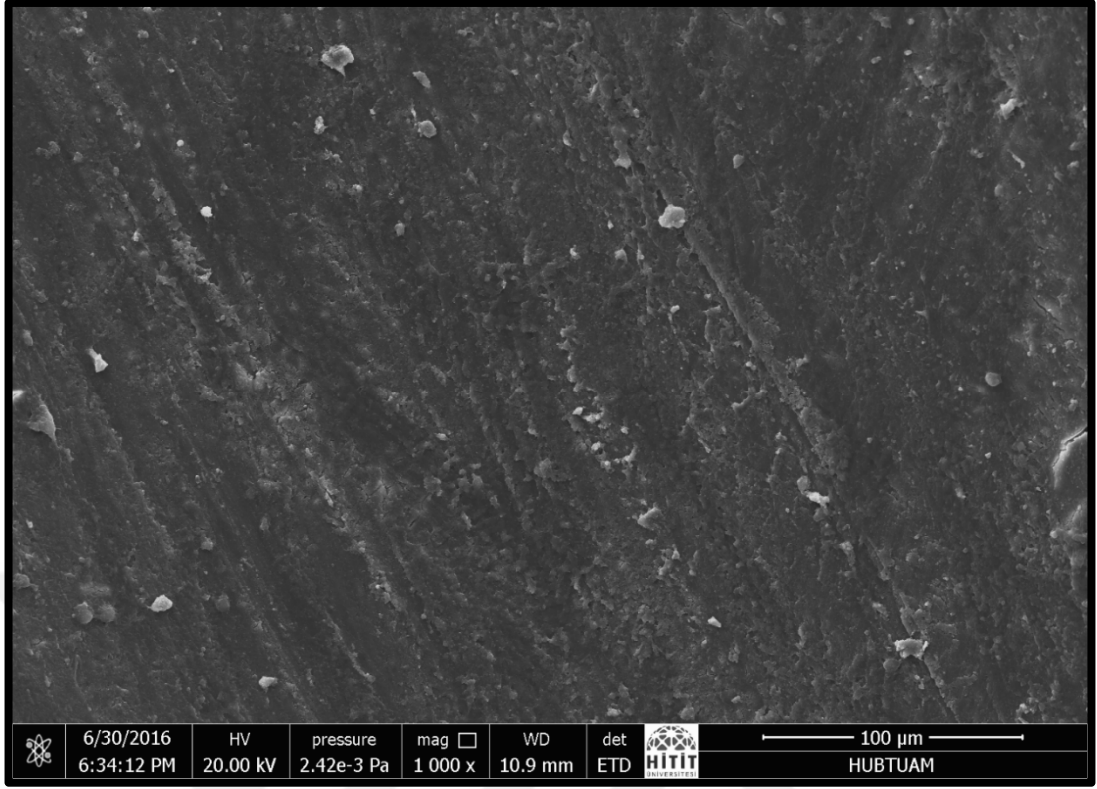
Kontrol grubundaki (Grup 1) görüntülere bakıldığında dentin yüzeyinin tamamen smear tabakayla kaplı olduğu görüldü (Şekil 3.15). 10 000× büyütmede ise smear üzerinde yoğun olmayan fibrin ağ yapısı gözlemlendi (Şekil 3.16).

Tüm gruplardan alınan SEM görüntüleri incelendiğinde, SCAP'nin fibrin ağ örtüsü içinde yuvarlak şekil aldığı ve hücre uzantılarıyla dentin yüzeyine bağlandığı görüldü. PRP'nin sahip olduğu bu fibrin ağ örtüsünün, mikro gözenekli yapısıyla; hücrelerin madde alışverişine engel olmayan, hücreleri hapseden ve onlara tutunma yüzeyi sağlayan, hücre-hücre etkileşimine izin veren bir ortam oluşturduğu tespit edildi (Şekil 3.24).

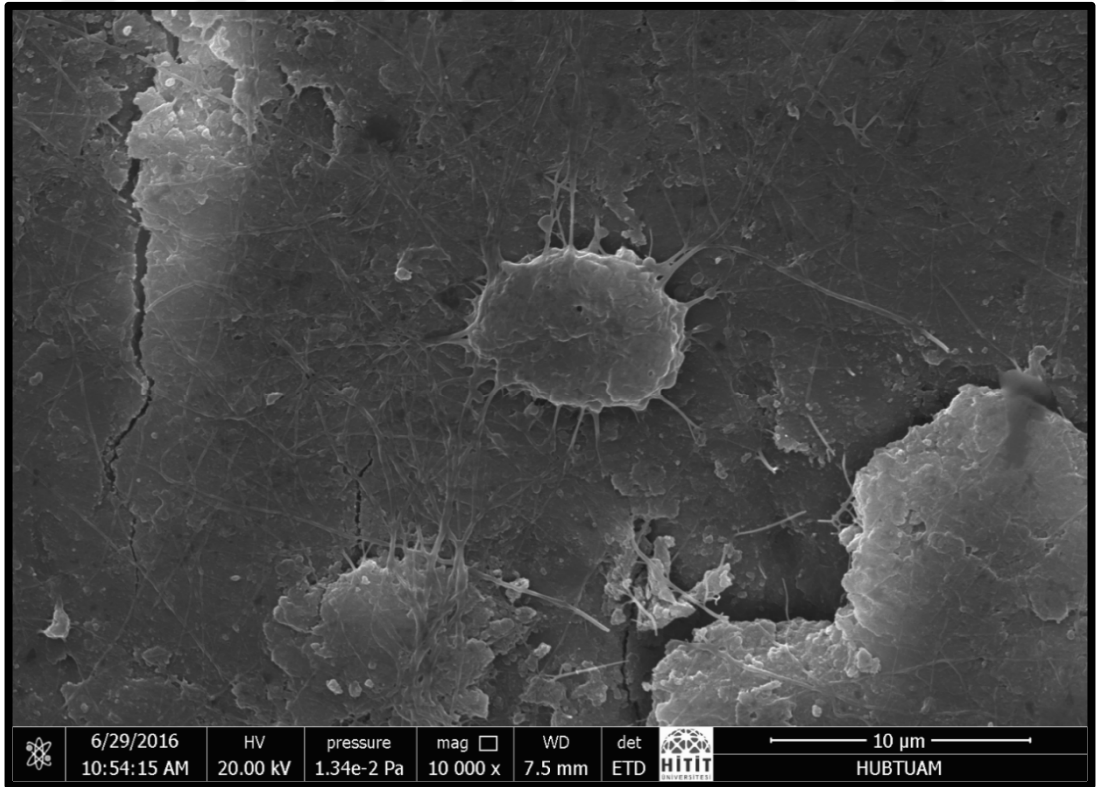
Sadece EDTA'in kullanıldığı (Grup 2 ve Grup 3) ve %2,5'lik NaOCl'in ardından EDTA'in iki farklı konsantrasyonu ile irrigasyon yapılan gruplardan (Grup 5 ve Grup 8) 1 000× ve 10 000× büyütmede alınan SEM görüntülerinde, fibrin ağ yapısının daha yoğun olduğu ve hücre-hücre arası etkileşimlerin varlığı gözlemlendi (Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.29, Şekil 3.30).

Sadece EDTA'in kullanıldığı (Grup 2 ve Grup 3) ve %2,5'lik NaOCl'in ardından %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 8), SCAP'nin küçük topluluklar halinde ve diğer gruplara göre daha yoğun olarak dentin yüzeyine tutunduğu görüldü (Şekil 3.17, Şekil 3.19, Şekil 3.29).

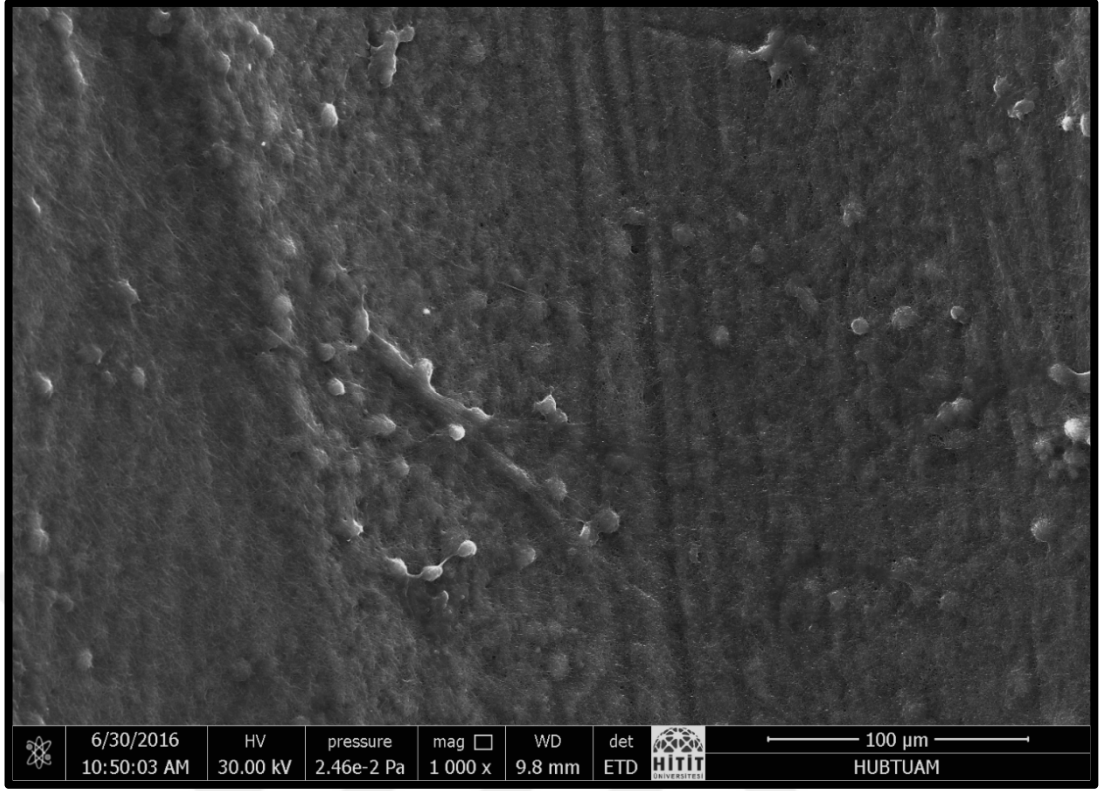
%5'lik NaOCl ile irrigasyon yapılan gruplardan (Grup 6 ve Grup 9) 1 000× büyütmede alınan SEM görüntülerinde ise, fibrin ağ yoğunluğunun azalması nedeniyle açık dentin tübüllerinin daha görünür hale geldiği tespit edildi (Şekil 3.25, Şekil 3.31).



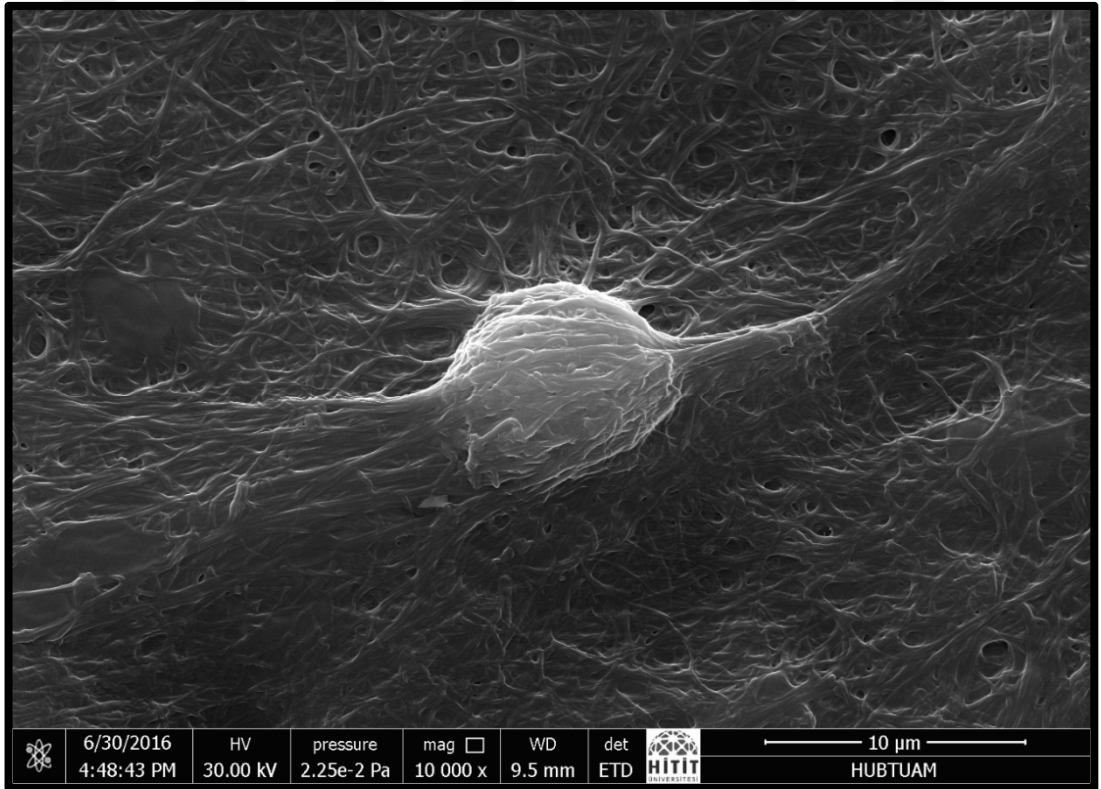
Şekil 3.15 Grup 1 (kontrol)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



Şekil 3.16 Grup 1 (kontrol)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

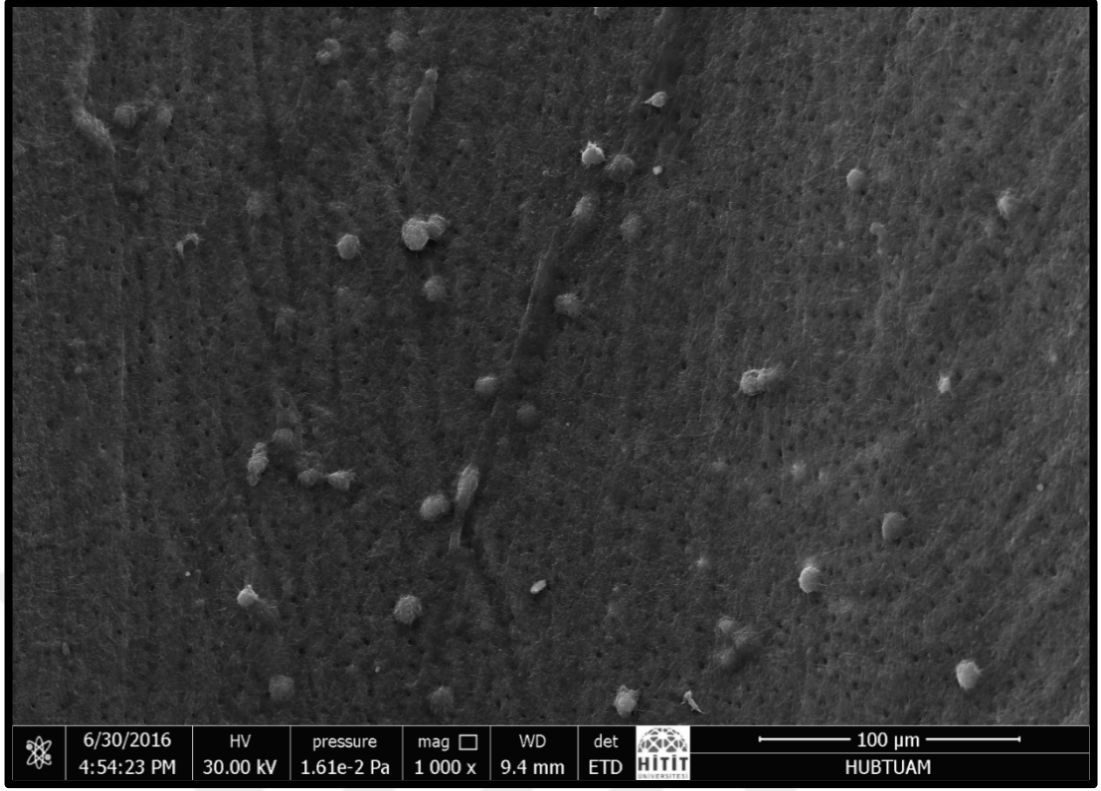


Şekil 3.17 Grup 2 (%5 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

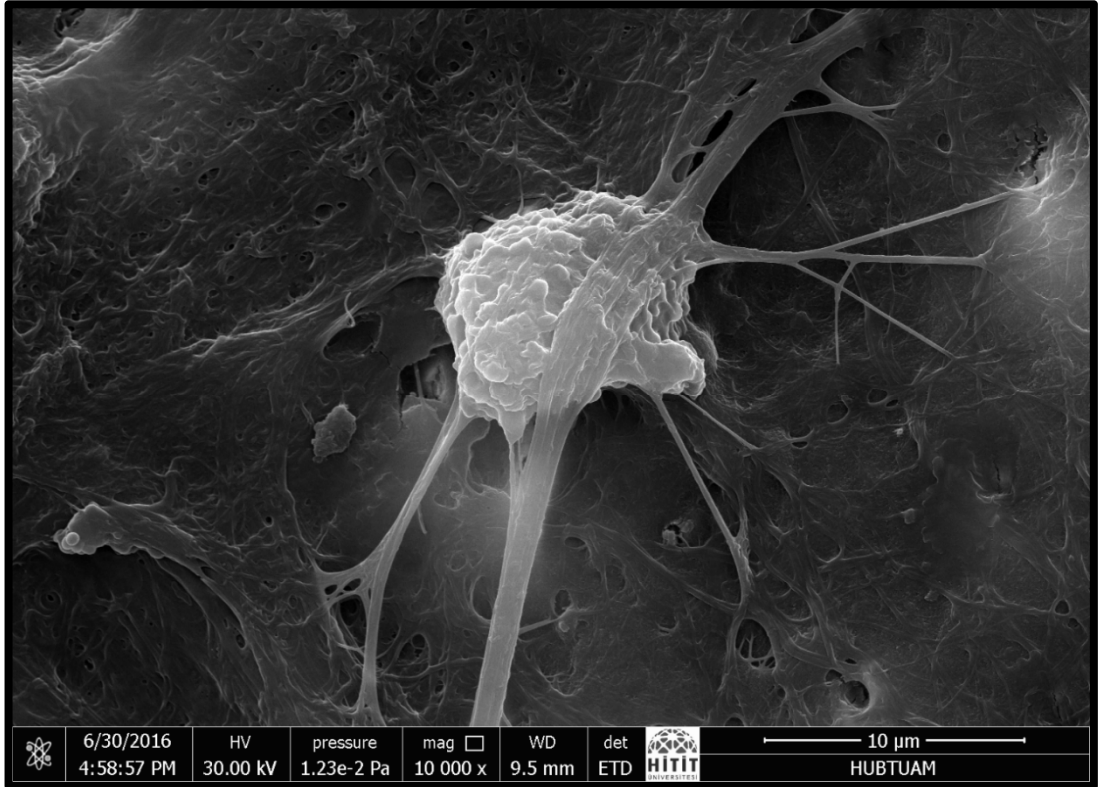


Şekil 3.18 Grup 2 (%5 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

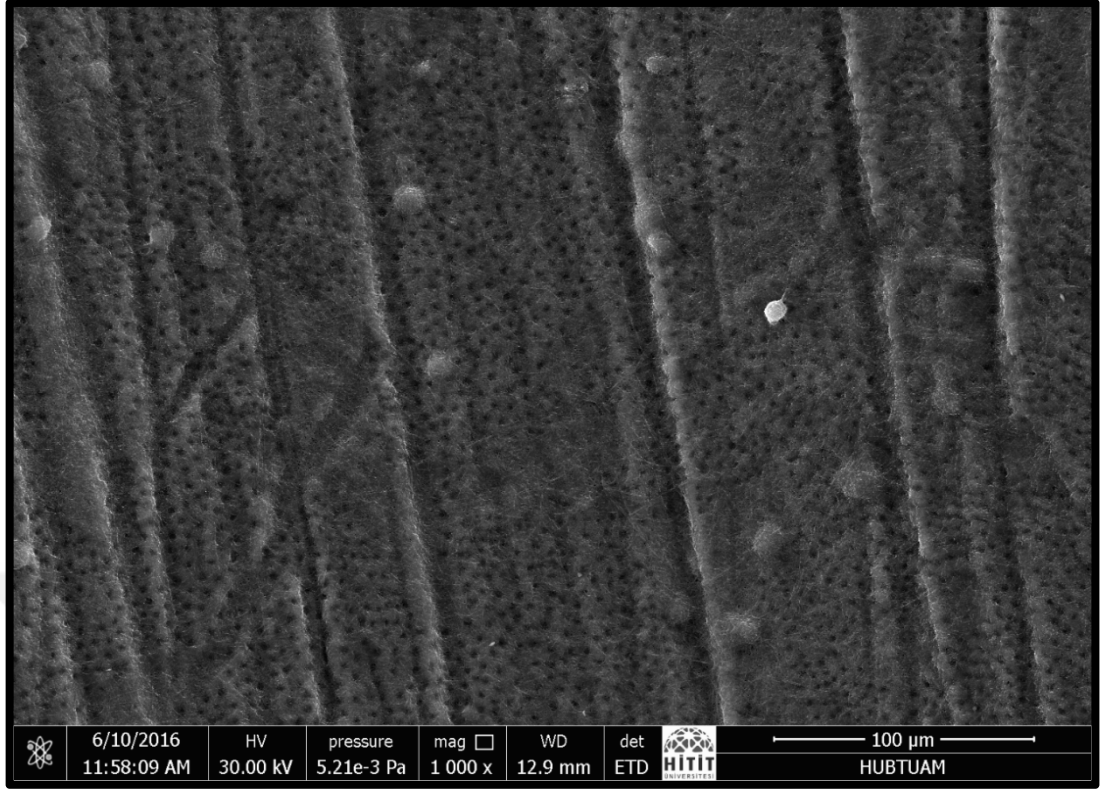




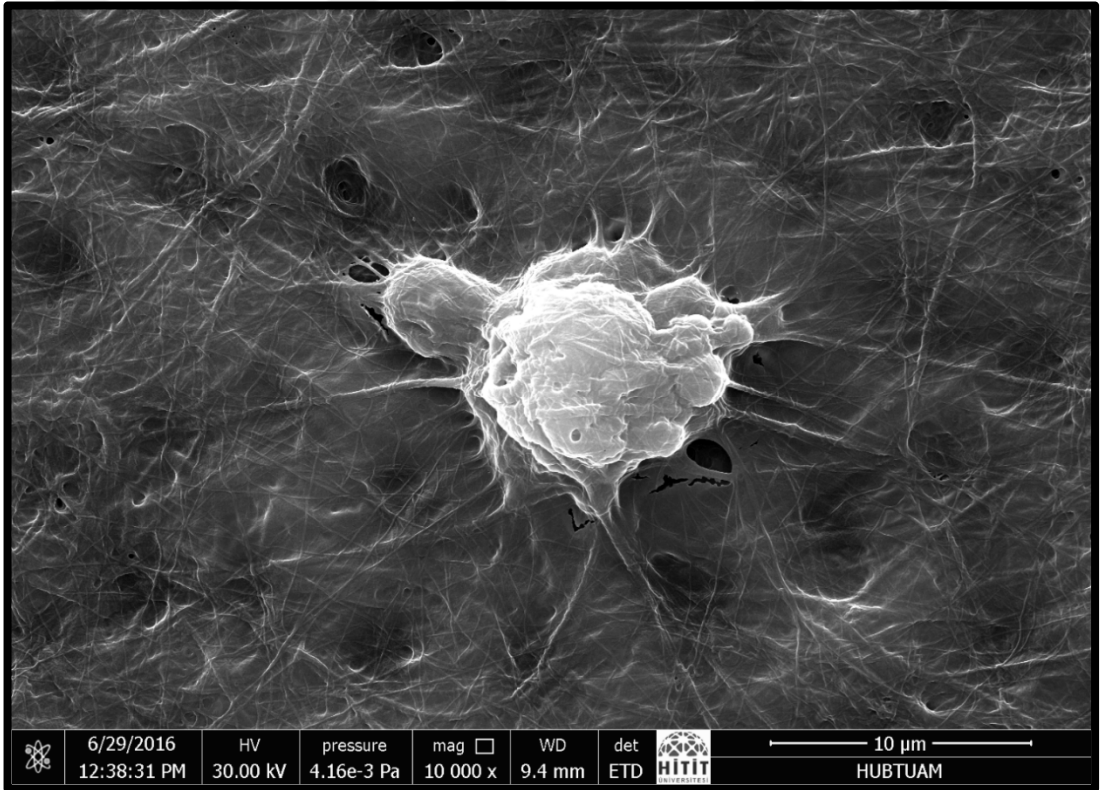
Şekil 3.19 Grup 3 (%17 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



Şekil 3.20 Grup 3 (%17 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

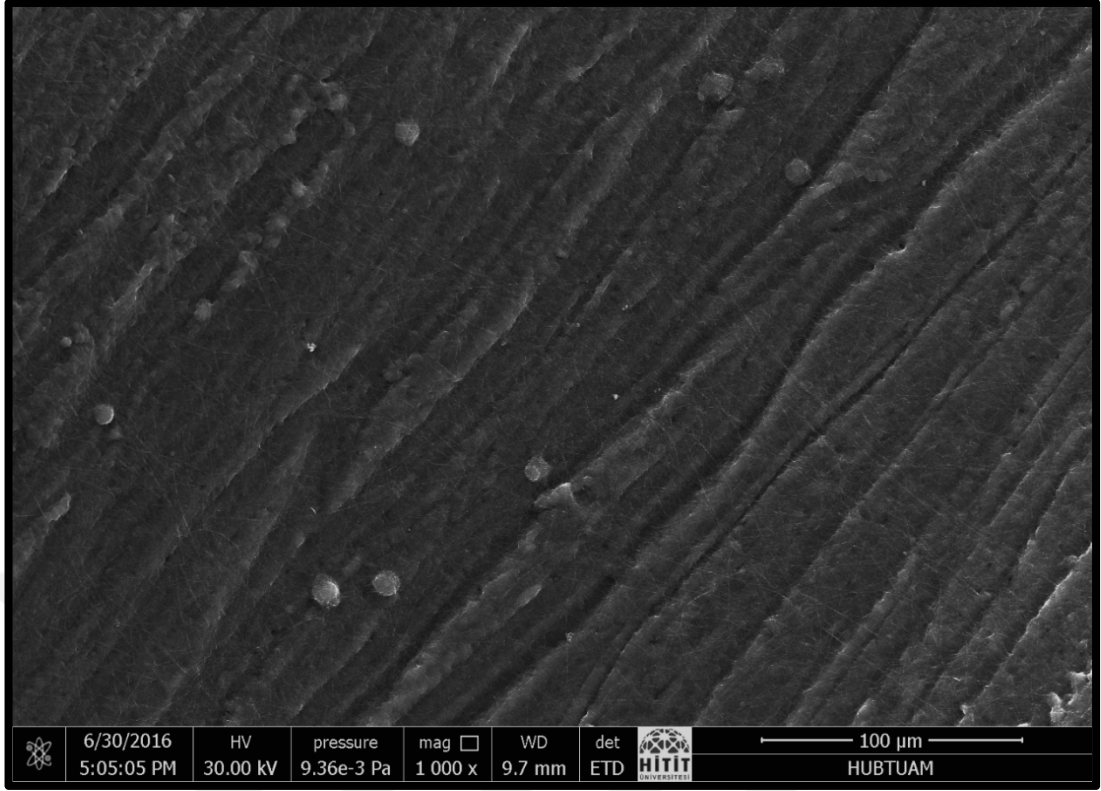


Şekil 3.21 Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

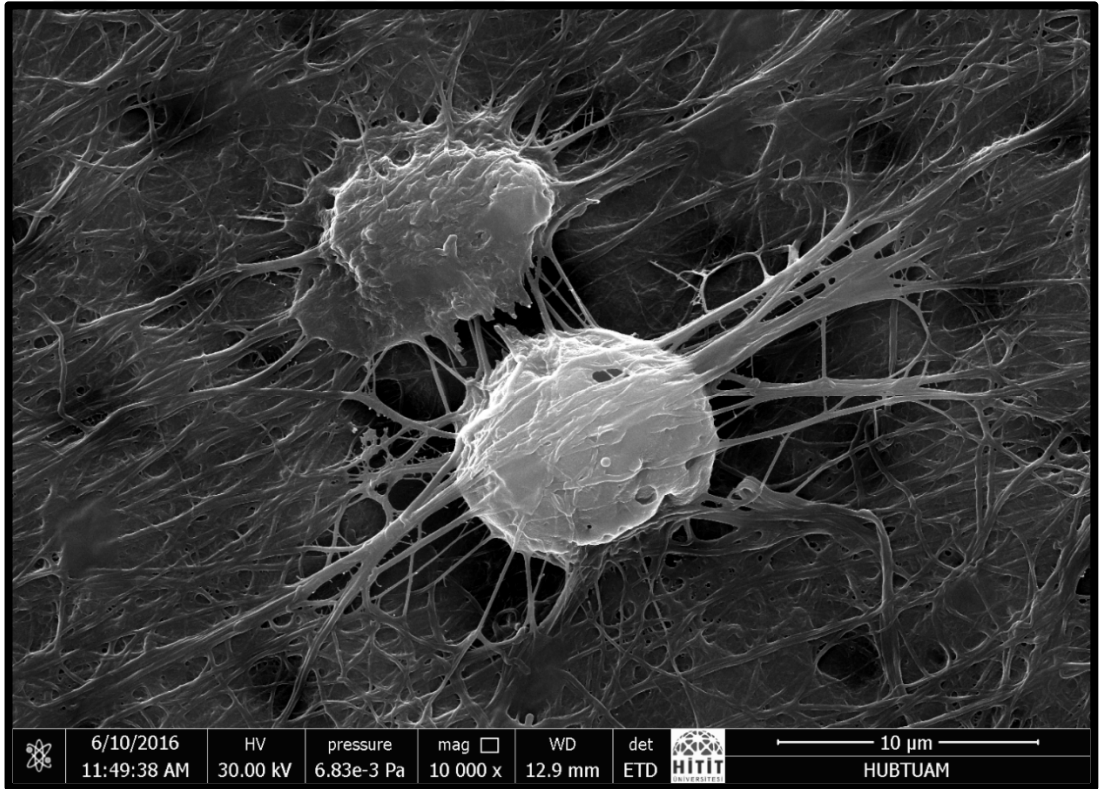


Şekil 3.22 Grup 4 (%1 NaOCl+%5 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

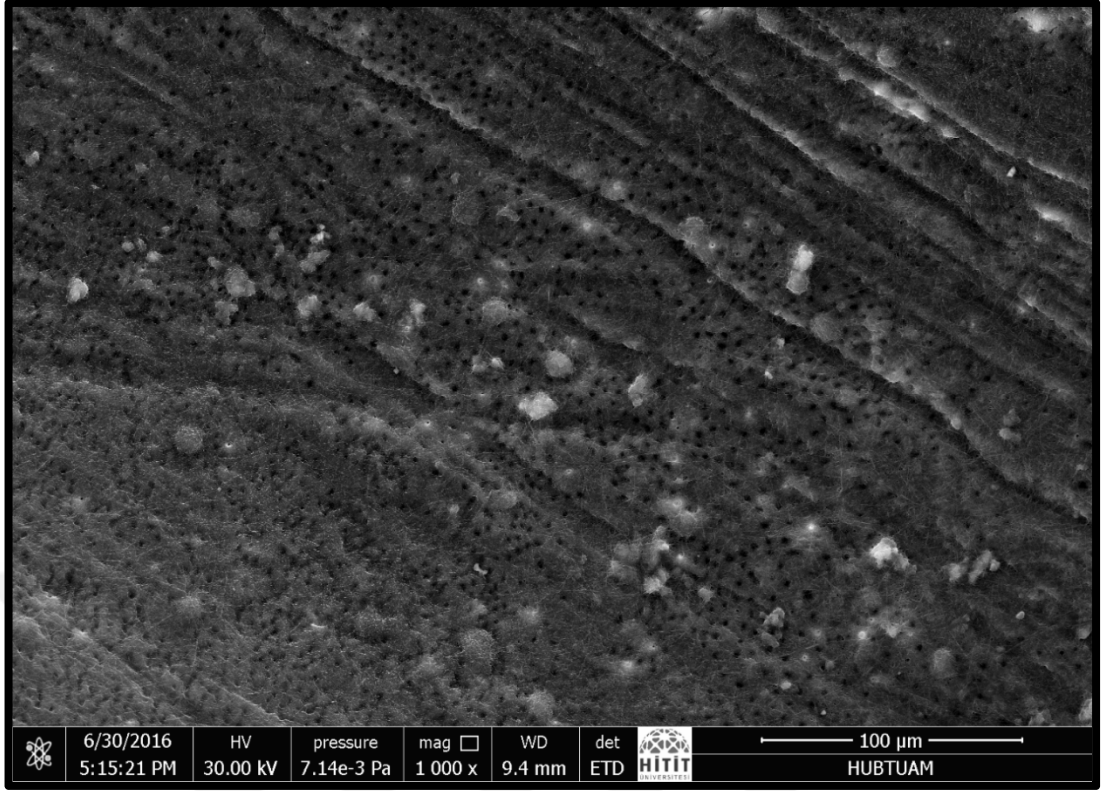




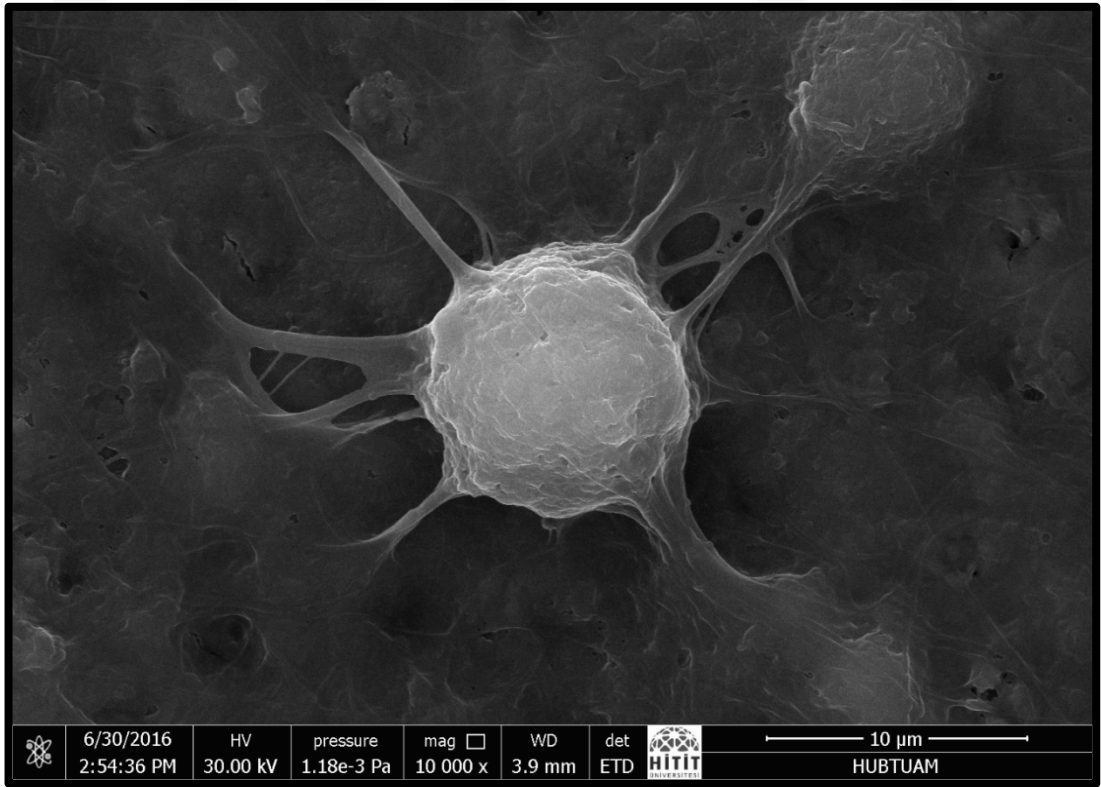
Şekil 3.23 Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA)'ten 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



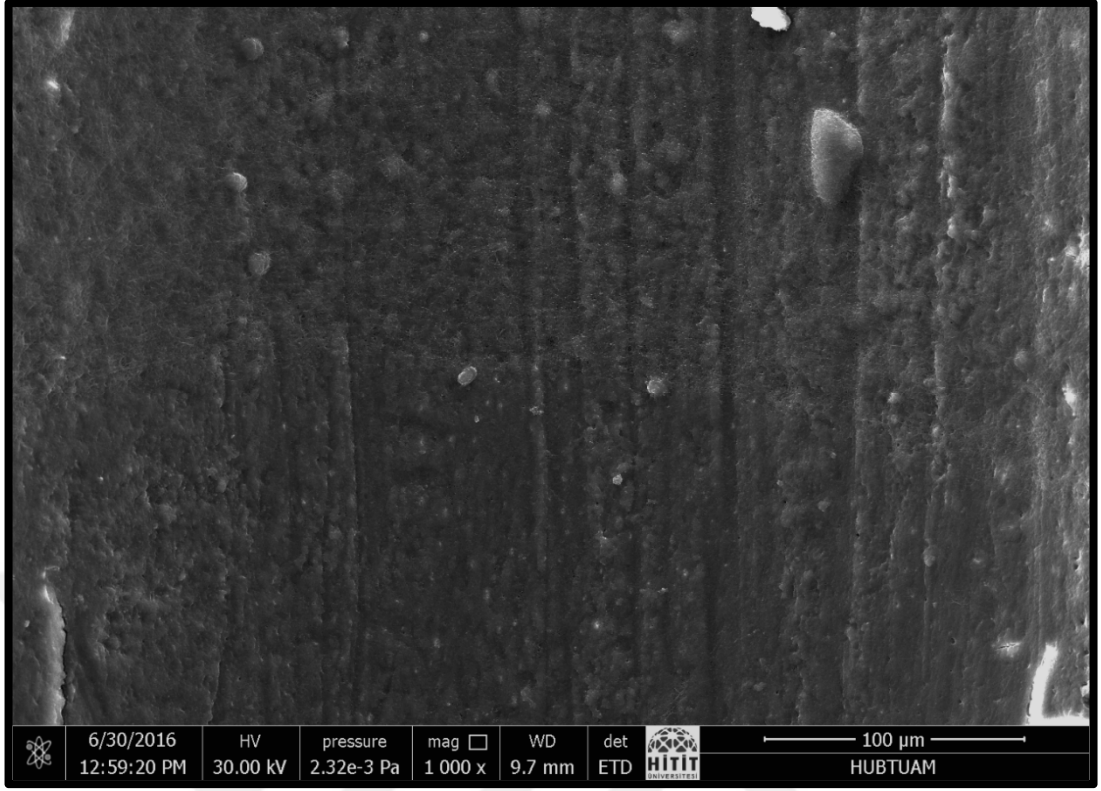
Şekil 3.24 Grup 5 (%2,5 NaOCl+%5 EDTA)'ten 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



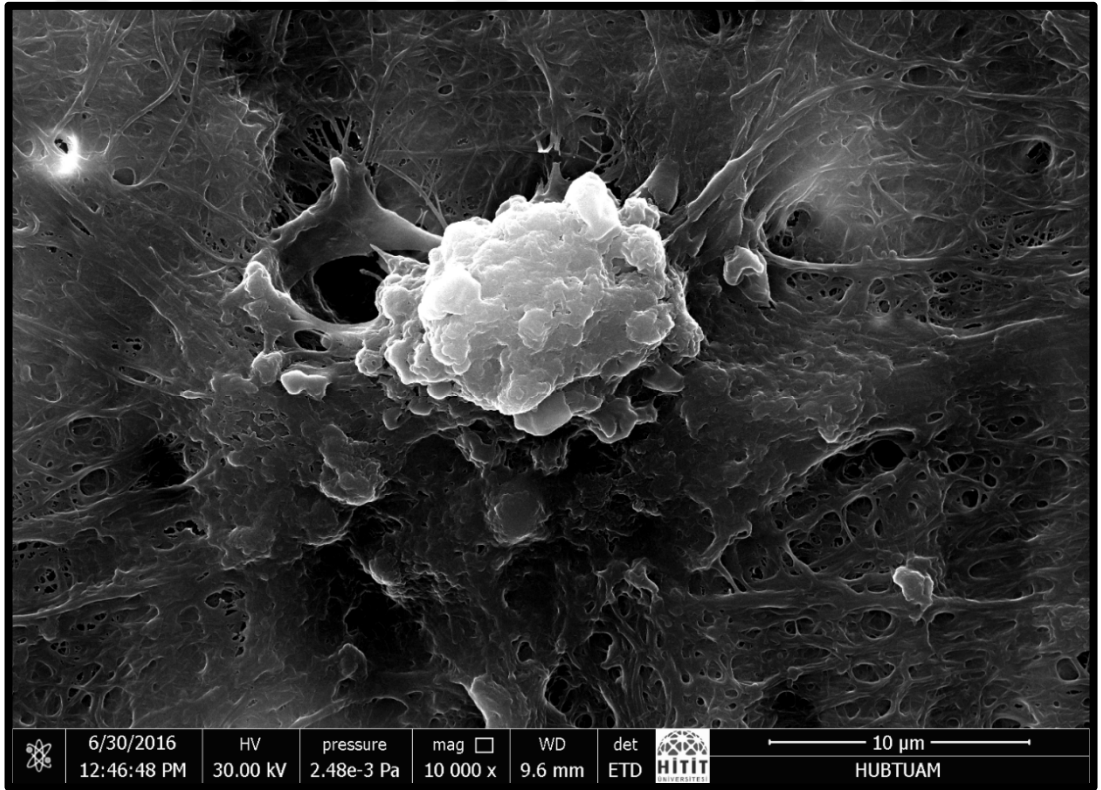
Şekil 3.25 Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'dan 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



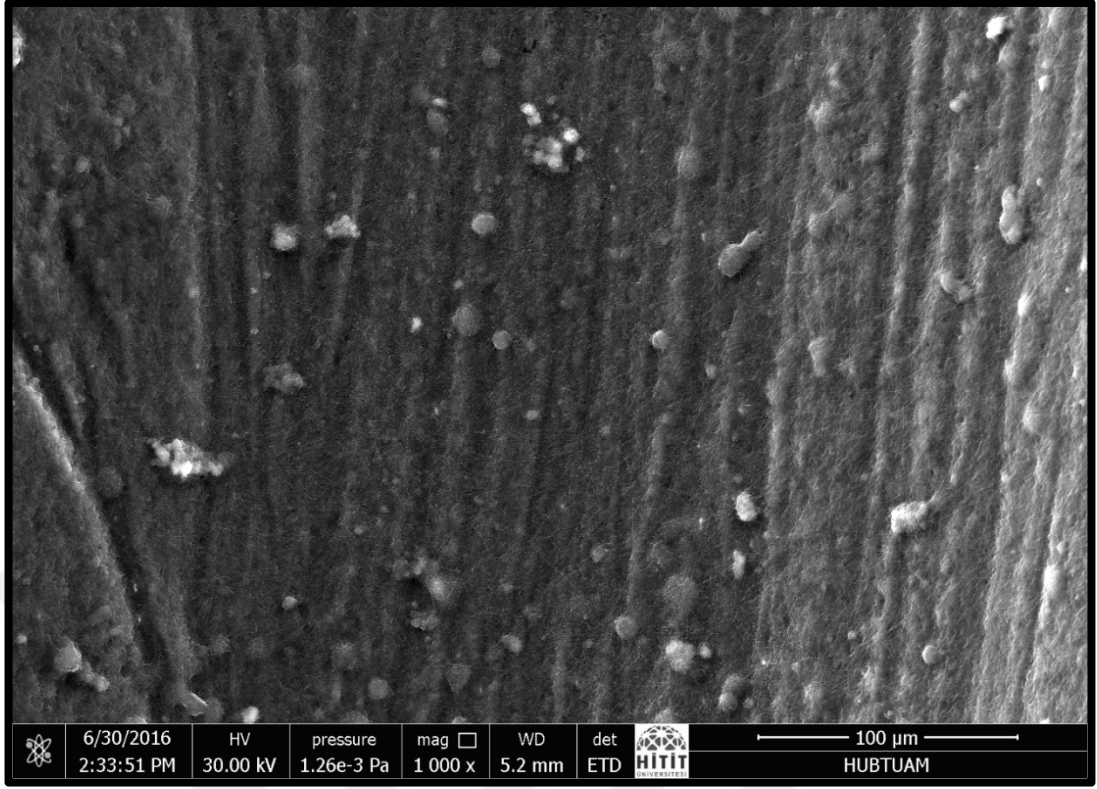
Şekil 3.26 Grup 6 (%5 NaOCl+%5 EDTA)'dan 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



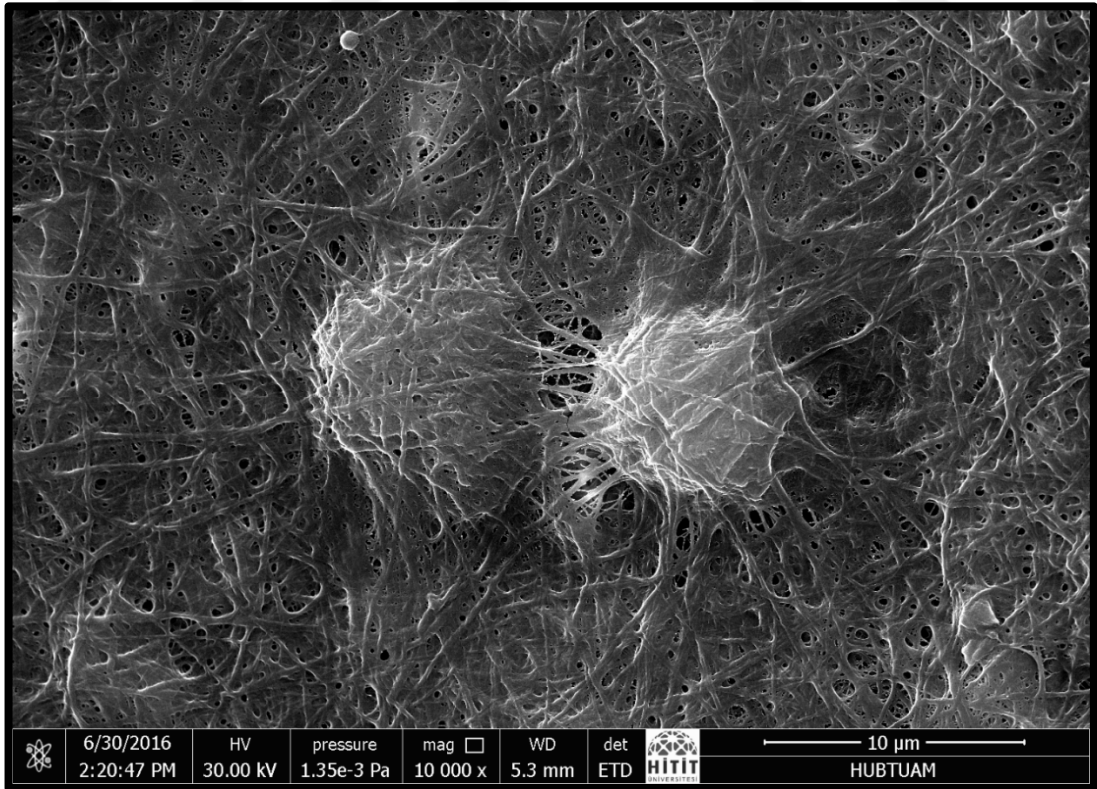
Şekil 3.27 Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



Şekil 3.28 Grup 7 (%1 NaOCl+%17 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

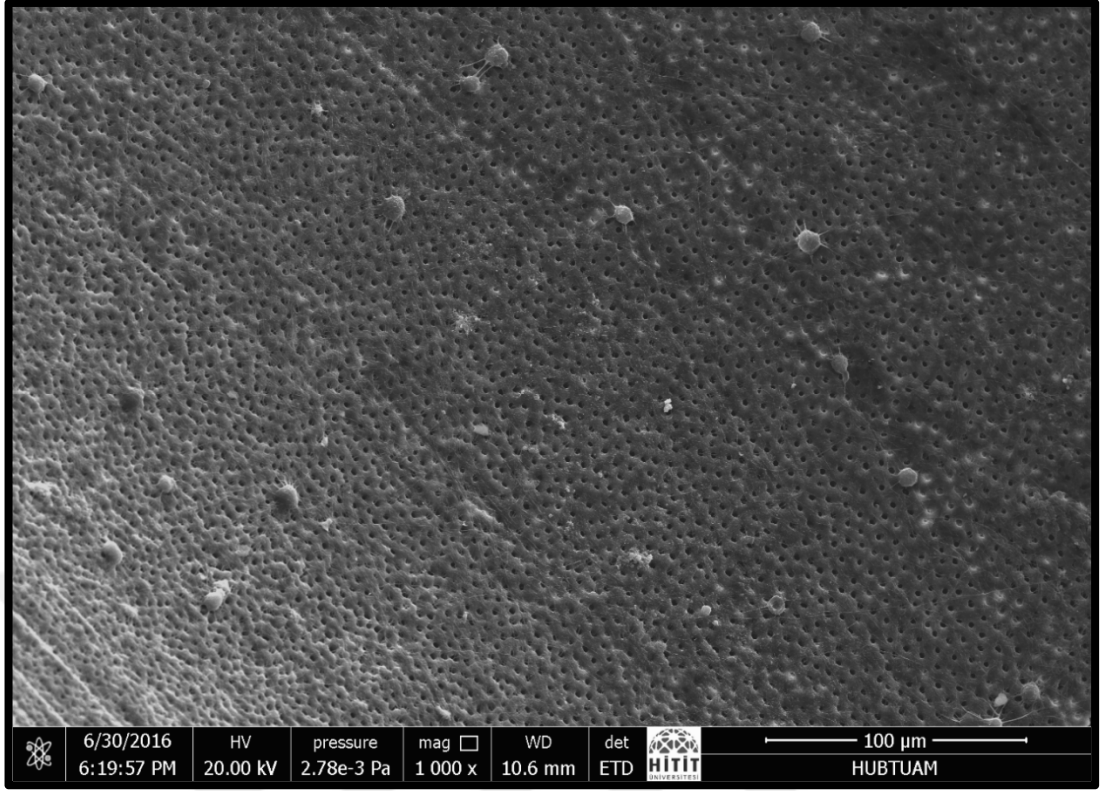


Şekil 3.29 Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA)'den 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

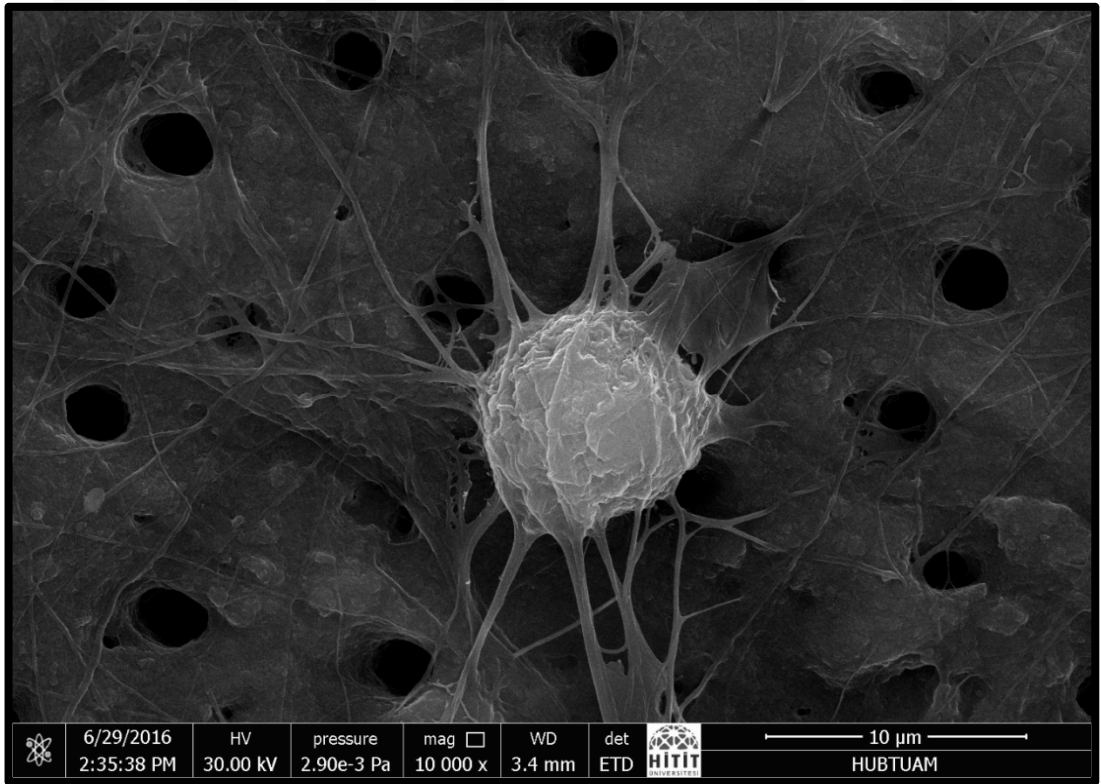


Şekil 3.30 Grup 8 (%2,5 NaOCl+%17 EDTA)'den 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü





Şekil 3.31 Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'dan 1 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü



Şekil 3.32 Grup 9 (%5 NaOCl+%17 EDTA)'dan 10 000× büyütmede alınan örnek SEM görüntüsü

#### 4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyolojik açıdan bakıldığında, endodontinin amacı apikal periodontitisi önlemek ya da tedavi etmektir. Bu amaca yönelik en uygun yöntem, pulpal inflamasyon oluştuğunda pulpa sağlığını korumak iken, pulpa nekrozu varlığında pulpal doku rejenerasyonunu sağlamaktır.

Rejeneratif endodontik prosedürler, dentin ve kök yapılarının yanı sıra pulpa-dentin kompleksinin hücrelerini de içeren; hasarlı, hastalıklı ve kayıp dokuları yerine koymak ve pulpa-dentin kompleksinin normal fizyolojik fonksiyonlarını aynı kökenli canlı dokularla restore etmek üzere tasarlanan biyolojik temelli prosedürler olarak tanımlanmaktadır (Murray ve ark. 2007).

Rejeneratif endodontik tedavilerin temeli, 1960'ların başında Nygaard-Qstby tarafından nekrotik pulpa ve apikal lezyona sahip matür bir dişin apikal üçlüsünde yeni vaskülarize doku oluşumunun indüklendiği bir çalışma ile atılmıştır. Bu çalışma ileride rejeneratif endodonti alanında yapılacak çalışmalara öncülük etmiş ve benzer protokoller nekrotik pulpalı immatür daimi dişlerin tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Hatta yayınlanan son vaka raporlarında nekrotik pulpalı immatür daimi dişlerin özellikle biyolojik temelli endodontik tedavilere cevap verebileceği gösterilmektedir (Hargreaves ve ark. 2008). Ancak günümüze kadar uygulanan rejeneratif prosedürler kapsamında çok sayıda teknik, irrigasyon ajanı ve kanal içi medikament kullanılmış ve tedavi protokolünde standardizasyon tam olarak oluşturulamamıştır (Cotti ve ark. 2008, Hargreaves ve ark. 2008, Jung ve ark. 2008, Bose ve ark. 2009, Hargreaves ve ark. 2013). Bu durum rejeneratif endodontik tedaviler hakkında daha çok translasyonel çalışmaya ihtiyaç olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Herhangi bir rejenerasyon prosedürünün başarılı olabilmesi için irrigasyon ajanları; hem bakterisit/bakteriyostatik özellikleri, hem de hastaya ait kök hücrelerin proliferasyon kapasitesini ve canlılığını teşvik etme yeteneği göz önünde bulundurularak seçilmelidir. Bu kriterler irrigasyon ajanlarının endodontik tedavideki klasik kullanım kriterlerinden çok farklıdır. Bu nedenle irrigasyon ajanlarının hastaya

ait hücreler üzerinde kimyasal etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (Trevino ve ark. 2011, Martin ve ark. 2014). Rejeneratif endodontik tedavilerin daha öngörülebilir tedaviler olabilmesi için kullanılan irrigasyon ajanlarının tüm yönleriyle değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda NaOCl ve EDTA'in kullanıldığı irrigasyon protokollerinin SCAP'nin canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesinde, üç boyutlu formu ve fonksiyonuyla *in vivo* organa benzeyen organotipik modeller kullanıldı. Böylelikle farklı irrigasyon ajanlarıyla muamele edilmiş dentin gibi ev sahibi dokular ile apikal dental dokulardan izole edilen hücreler ve doku iskeleleri arasındaki etkileşimin değerlendirilmesi yapıldı. Çünkü dentinin mezenkimal kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyen fizyolojik konsantrasyonlarda büyüme faktörüne sahip olduğu bilinmektedir (Smith ve ark. 1995, Cassidy ve ark. 1997). Dentin geleneksel kültür ortamlarında mevcut olmayan ekstrasellüler matriks proteinleri ve yüzey moleküllerinin benzersiz bir bileşimidir (Bronckers ve ark. 1989). Demarco ve ark. (2010) dentinin DPSCs'nin farklılaşması üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında; dentine ait morfojenlerin, DPSCs'nin odontoblastlara farklılaşmasında ve pulpa benzeri bir doku elde edilmesinde önemli bir role sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Trevino ve ark. (2011) insan diş köklerinin organotipik model olarak kullandıkları bir çalışmada; bu modelin rejeneratif prosedürlerin taklit edilmesine olanak sağlamakla beraber, araştırmacıların çeşitli irrigasyon ajanları, medikamentler, hücreler, büyüme faktörleri ve doku iskelelerinin pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu üzerine etkisini *in vitro* olarak değerlendirmesine de izin vereceğini ifade etmişlerdir. Böylelikle hayvan modelleri ve insan deneylerinden önce organotipik modellerin araştırma yöntemi olarak kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır. Tüm bu nedenler ve daha önce yapılmış benzer çalışmalarla (Trevino ve ark. 2011, Martin ve ark. 2014) kıyaslanabilirlik açısından, çalışmamızda anatomileri aynı tipte olan insan diş köklerinden elde edilen standardize kök kanal boyutlarına sahip organotipik modeller kullanıldı.

Irrigasyon ajanlarının kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda günümüze kadar farklı dental dokulardan izole edilen birçok yetişkin kök

hücre kullanılmıştır (Casagrande ve ark. 2010, Pang ve ark. 2014). Gelişimini tamamlamamış dişlerin kök ucunda yer alan apikal papilla, rejeneratif prosedürlere katılması muhtemel kök hücrelerden zengin bir kaynaktır (Lovelace ve ark. 2011). Bu dokudan izole edilen SCAP de konumundan dolayı rejeneratif endodonti alanında büyük ilgi uyandırmaktadır.

Sonoyama ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, SCAP'nin DPSCs'ne göre daha yüksek hızda popülasyonunu ikiye katladığını, doku rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olduğunu, daha fazla kök hücreye özgü pozitif yüzey antijeni içerdiğini ve daha yüksek seviyede antiapoptotik protein eksprese ettiğini tespit etmişlerdir.

Yine Sonoyama ve ark. (2008) SCAP ve DPSCs'ni karşılaştırdıkları başka bir çalışmada aynı süre içerisinde SCAP'nin DPSCs'ne göre 2-3 kat daha fazla çoğaldığını, histolojik olarak apikal papillanın pulpadan farklı bir doku olduğunu ve apikal papillanın güçlü bir mezenkimal kök hücre kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca apikal papilla ve burada bulunan kök hücrelerin daha apikalde konumlanmasından dolayı kollateral dolaşımdan faydalandığı ve böylelikle pulpa nekrozu boyunca hayatta kalabildiğini düşünmektedirler.

Huang ve ark. (2008) apikal papillanın kök oluşumundaki rolünün klinik vakalarla gösterilebileceğini belirtmişlerdir. Komplike kron kırığına sahip immatür bir dişin tedavisinde pulpa tamamen ekstirpe edilmiş fakat apikal papillaya müdahale edilmemiştir ve sonuç olarak kök ucu oluşumu gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde mini domuzları model olarak kullandıkları bir pilot çalışmada (Huang ve ark. 2008), kök gelişiminin erken döneminde dişin bir kökünde apikal papilla cerrahi olarak uzaklaştırılmış ve pulpa dokusu sağlam olmasına rağmen kök gelişiminin durduğu gözlenmiştir. Apikal papillanın uzaklaştırılmadığı aynı dişin diğer köklerinde ise normal büyüme ve gelişimin devam ettiği tespit edilmiştir.

Huang ve ark. (2009) SCAP'nin henüz gelişmekte olan bir diştten elde ediliyor olmasından dolayı, bu hücrelerin DPSCs'ne kıyasla daha erken dönem kök hücre olduğunu düşünmektedirler. Ayrıca SCAP'nin kök dentininin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların, DPSCs'nin ise reperatif dentin üretmekten sorumlu olan odontoblastların kökeni olabileceğini belirtmişlerdir.



Abuarqoub ve ark. (2015) farklı konsantrasyonlarda oluşturulmuş platelet lizatlarının DPSCs ve SCAP üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, bu hücrelerin izolasyon sonrası kültürdeki davranışlarını da incelemişler ve SCAP kültüründe kolonilerin hem daha çok sayıda hem de daha erken sürede oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca SCAP bir hafta sonra yeterli yoğunluğa ulaştığı için pasajlanırken, DPSCs'nin aynı yoğunluğa ancak iki hafta sonunda ulaşabildiğini tespit etmişlerdir. Yukarıda belirtilen nedenlerle bu çalışmada rejeneratif endodontik prosedürler için zengin bir kaynak olduğu belirtilen apikal papilla dokusundan izole edilen SCAP kullanıldı.

Apikal papilla, kök hücrelerin yanı sıra farklı hücre türlerini de içerdiğinden (fibroblastlar vb.) hücrel olarak heterojen bir yapıya sahiptir (Sonoyama ve ark. 2006, Sonoyama ve ark. 2008). Ek olarak kök hücre popülasyonu da kendi içinde farklı yüzey markırlarını eksprese eden hücrelerden oluşmaktadır. SCAP'nin ilk karakterizasyonu bir yüzey markırı olan STRO-1 ekspresyonuna dayalı yapılmıştır (Sonoyama ve ark. 2008). Fakat STRO-1 pozitif hücrelerin SCAP popülasyonunun küçük bir kısmını oluşturduğu açık bir şekilde gösterilmektedir (Huang ve ark. 2009, Bakopoulou ve ark. 2011, Wu ve ark. 2012).

Ruparel ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada gerçek mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için minimal kriterleri göz önünde bulundurarak (Dominici ve ark. 2006) CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonuna odaklanmışlar ve bu markırların ekspresyon profillerini lazer taramalı konfokal mikroskop, mezenkimal kök hücreye spesifik gerçek zamanlı RT-PCR ve akan hücre ölçer ile değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak apikal papillanın CD73, CD90 ve CD105 pozitif hücrelerden oluşan yoğun bir popülasyona sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Lazer taramalı konfokal mikroskopla yapılan değerlendirme sonrası ise apikal papilla ve hücrelerinin mezenkimal kök hücreler için gerekli markırları (CD73, CD90 ve CD105) eksprese ettiğini ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda bu incelemede apikal papilla ve dental pulpa arasındaki fark da vurgulanmaktadır. Çünkü dental pulpa hücrelerinin sadece küçük bir kısmının mezenkimal kök hücrelerden oluştuğu tespit edilmiştir (Gronthos ve ark. 2000, Ruparel ve ark. 2013). Ayrıca bu çalışmayla SCAP'nin sahip olduğu yüksek proliferasyon oranı ve farklılaşma potansiyeli gibi diğer farklılıkların, bu hücrelerin

klirik 6ncesi 7alışmalarda kullanımını ve klinik prosed6rlerdeki rol6n6 desteklediği ifade edilmiştir. Bu nedenle bu 7alışmada da SCAP'nin karakterizasyonu; CD73, CD90 ve CD105 y6zey antijenlerinin ekspresyonuna dayalı olarak ger7ekleştirilmiştir.

Dentin y6zeyine k6k h6cre adezyonu daha 6nce değerlendirilmiş 6nemli bir konudur ve h6creler k6k kanalına yerleştirilirken iskele yardımıyla 63 boyutlu bir b6y6me ortamı sağlanması gerekir (Elseed ve ark. 2009). Rejeneratif endodontik tedavilerde iskele oluşturulması i7in 6nerilen protokol, periapeksten kasıtlı olarak kanamanın uyarılması ve k6k kanalı i7inde fibrin pıhtı oluşumunun sağlanmasıdır (AAE 2016). Fibrin pıhtı iskelelerin başarı oranının y6ksek olduğunu g6steren bir7ok vaka raporu yayınlanmıştır (Iwaya ve ark. 2001, Banchs ve Trope 2004, Bose ve ark. 2009, Ding ve ark. 2009, Lenzi ve Trope 2012, Sonmez ve ark. 2013), fakat her zaman kanal i7ine kanamanın uyarılması m6mk6n değildir (Cehreli ve ark. 2011, Nosrat ve ark. 2012, Bezgin ve ark. 2015). Bu nedenle araştırmacılar kanama varlığında ya da yokluğunda kullanılabilir değer 63 boyutlu iskeleleri incelemeye başlamışlardır (Geisler 2012). Ven6z kanın h6cresel elemanlarına ayrılması ile elde edilen otojen trombosit konsantrasyonu PRP da bu iskelelerden biridir ve hastalardan kolaylıkla elde edilebilir (Sachdeva ve ark. 2015).

PRP; baş-boyun cerrahisi, kardiyovask6ler cerrahi ve ağız ve 7ene cerrahisi d6hil olmak 6zere 7eşitli cerrahi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir7ok araştırmacı rejeneratif endodontik tedavilerde, PRP'yı fibrin pıhtı iskelesi ile beraber kullanırken (Jadhav ve ark. 2012, Jadhav ve ark. 2013, Martin ve ark. 2013); bazı araştırmacılar PRP'yı tek başına kullanmışlar ve başarılı bir iskele oluşumunun g6zlendiğini bildirmişlerdir (Torabinejad ve Turman 2011, Bezgin ve ark. 2014). Fakat PRP'nın bu başarısını doğrulamak i7in prospektif 7alışmalara ihtiya7 olduğunun da altını 7izmişlerdir.

Bezgin ve ark. (Bezgin ve ark. 2015) fibrin pıhtı ve PRP'nın rejeneratif endodontik tedavilerde iskele olarak kullanımını karşılaştırdıkları klinik 7alışmalarında; iki grup arasındaki başarı oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını tespit etmişlerdir. Buna rağmen PRP grubunda tam iyileşme ve apikal kapanmanın tamamlanması i7in gereken s6renin daha kısa olduğu g6zlemlenmiştir. Ayrıca PRP'nın kullanıldığı grupta vitalite testlerine alınan pozitif cevap oranının,

fibrin pıhtı grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buradan yola çıkarak araştırmacılar, PRP'nın rejeneratif endodontik tedaviler için kullanılabilir bir iskele olduğu sonucuna varmışlardır.

PRP hakkında diğer bir önemli konu ise; PRP'dan salınan büyüme faktörlerinin iyileşmenin uyarılması için mitogenez, kemotaksi, farklılaşma ve metabolizma gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olmasıdır. Birçok büyüme faktörü içermekte olan PRP'nın kök hücrelerin proliferasyonunu, canlılığını ve farklılaşmasını teşvik ettiği yapılan *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Marx 2004, Doucet ve ark. 2005, Kasten ve ark. 2006, Vogel ve ark. 2006).

Trevino ve ark. (2011) çeşitli irrigasyon ajanlarının SCAP canlılığı üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, hücreleri PRP ile beraber kök kanal modelleri içerisine yerleştirdiklerinde hücre canlılığının teşvik edildiğini tespit etmişlerdir. PRP kullanılmayan negatif kontrol grubunda ise canlı hücreye rastlanmamıştır. Bu nedenle biz de çalışmamızda SCAP'ni organotipik kök kanal modelleri içerisine yerleştirirken PRP'yı iskele olarak kullanmayı tercih ettik.

NaOCl, endodontide en sık kullanılan dezenfeksiyon ajanıdır. Mükemmel bakterisidal etkinliğe (Harrison ve ark. 1990, Vianna ve ark. 2006, Martinho ve Gomes 2008) ve doku çözme kapasitesine (Hand ve ark. 1978, Harrison ve Hand 1981, Yang ve ark. 1995) sahiptir. Bu iki özellik rejeneratif endodontik uygulamalarda minimal enstrümantasyon yapılan ya da hiç mekanik enstrümantasyon yapılmayan immatür dişlerin dezenfeksiyonu için çok önemlidir (Hargreaves ve ark. 2013). Bu nedenle bugüne kadar gerçekleştirilen tüm rejeneratif endodontik uygulamalarda farklı konsantrasyonlarda NaOCl kullanılmıştır (Diogenes ve ark. 2013). Yapılan translasyonel çalışmalarda NaOCl tek başına kullanıldığında, bütün konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı (Martin ve ark. 2014) ve yüksek konsantrasyonlarda dentindeki büyüme faktörlerini denatüre ettiği (Zhao ve ark. 2000) tespit edilmiştir. Bu nedenle AAE, NaOCl kullanımının ardından EDTA ile irrigasyon yapılmasını önermektedir (AAE 2016). Bizim çalışmamızda da rejeneratif endodontik uygulamalarda kullanılacak en ideal irrigasyon protokolünü tespit etmek amacıyla, sadece NaOCl kullanmak yerine; %1, %2,5 ve %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda final irrigasyon ajanı olarak %5'lik veya %17'lik EDTA kullanıldı.

EDTA ise endodontide kök kanal tedavisi sırasında sıkça kullanılan bir şelasyon ajanıdır. Bakteriyel enfeksiyon varlığında NaOCl ile beraber kullanıldığında, smear tabakasını uzaklaştırıp dentin tübüllerini açarak; irrigasyon ajanları, kanal içi medikamentler ve kök kanal dolgu patlarının dentin tübüllerine girişine izin verir ve böylece bu ajanların bakterisidal/bakteriostatik etkilerinin maksimuma ulaşmasını sağlar (Aktener ve Bilkay 1993, Oksan ve ark. 1993, Srivastava ve Chandra 1999). Bu özelliklerine ek olarak şelasyon etkisiyle, dentine gömülü büyüme faktörlerinin salınımını teşvik ettiği için rejeneratif endodontik prosedürlerde kullanılması yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Begue-Kirn ve ark. 1992, Tomson ve ark. 2007). Bu büyüme faktörlerinin dental dokulardaki kök hücrelerin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Finkelman ve ark. 1990, Roberts-Clark ve Smith 2000, Almushayt ve ark. 2006). Rejeneratif endodontik tedavilerde NaOCl'in olumsuz etkilerini tersine çevirerek hücre canlılığı üzerinde oluşturduğu olumlu etkisinden dolayı, çalışmamızda da EDTA hem tek başına hem de NaOCl'in ardından final irrigasyon ajanı olarak, %5'lik ve %17'lik konsantrasyonlarda kullanıldı.

Literatürde hücre canlılığının tespiti için birçok yöntem ve hazır ticari kit bulunmaktadır (Terzioglu ve ark. 2013). Martin ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in SCAP'nin canlılığı üzerine etkisini, canlı hücrelerin luminesansını ölçerek sonuç veren CellTiter-Glo reaktifini kullanarak değerlendirmişlerdir. Trevino ve ark. (2011) çalışmalarında %6'lık NaOCl, %17'lik EDTA ve %2'lik CHX'in farklı kombinasyonlarının kullanıldığı irrigasyon protokollerinin SCAP'nin canlılığı üzerine etkisini immünohistokimyasal teknikler kullanarak lazer taramalı konfokal mikroskop altında değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ise organotipik kök kanal modelleri üzerinde, farklı konsantrasyonlarda NaOCl ve EDTA'in kullanıldığı irrigasyon protokollerinin, SCAP'nin canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesinde WST-1 kiti kullanılmıştır. Bölünme döngüsüne giren canlı hücrelerde metabolik aktivitede artış görülmektedir, bu nedenle metabolik aktivitenin ölçülmesi de sık kullanılan hücre canlılığı tespit yöntemlerinden biridir (Rode 2008). Bu yöntemde yaygın olarak tetrazolyum tuzlarını içeren kitler kullanılmaktadır. WST-1 kiti de bunlardan biridir ve canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçer (Rode 2008). Tetrazolyum türleri karşılaştırıldığında en iyi

alternatif WST-1 gibi görünmektedir. Çünkü diğer tuzlara göre daha verimli tüketilmekte ve daha çabuk renk değişimi göstermektedir (Smith 2012). Ayrıca düşük hücre sayılarını belirlemede, MTT ve XTT'ye göre daha yüksek hassasiyete sahip olduğu tespit edilmiştir (Rode 2008).

Rejeneratif endodontik prosedürlerden sonra önemli sayıda farklılaşmamış mezenkimal kök hücrenin kök kanal sistemi içerisine gönderildiği 2011 yılında yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuş (Lovelace ve ark.) ve bu bulgu rejeneratif endodontik tedaviler için dönüm noktası olmuştur. Daha önce gerçekleştirilen rejeneratif endodontik tedavilerde kullanılan protokoller ile nekrotik pulpaya sahip immatür dişte sadece maksimum dezenfeksiyon sağlanması amaçlanmış, irrigasyon ajanlarının kök hücreler üzerindeki etkisi dikkate alınmamıştır. Bu nedenle literatürde irrigasyon ajanlarının kök hücreler üzerindeki etkisini değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Martin ve ark. (2014) farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in SCAP'nin canlılığı ve farklılaşması üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, NaOCl'in konsantrasyona bağlı olarak SCAP canlılığını azalttığını tespit etmişlerdir. %0,5, %1,5 ve %3'lük NaOCl kullanılan gruplarda SCAP'nin canlılığında benzer oranlarda azalma görülürken, %6'lık NaOCl'in anlamlı ölçüde SCAP'nin canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın %17'lik EDTA'nın final irrigasyon ajanı olarak kullanıldığı gruplarda, NaOCl'in SCAP canlılığı üzerindeki negatif etkilerinin tersine çevrildiği ve herhangi bir işlem yapılmamış olan kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir. En yüksek hücre canlılığı ise sadece %17 EDTA'nın kullanıldığı grupta görülmüştür.

Trevino ve ark. (2011) %6'lık NaOCl, %17'lik EDTA ve %2'lik CHX'in farklı kombinasyonlarının kullanıldığı irrigasyon protokollerinin SCAP'nin canlılığı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; sadece %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grupta, %6'lık NaOCl ve %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan gruba göre hücre canlılığının daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Ring ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada 10 farklı irrigasyon ajanının DPSCs üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaya göre en yüksek sitotoksosite

değerleri %6'lık NaOCl'in kullanıldığı gruplarda görülürken, en düşük sitotoksositeye sahip grubun %17'lik EDTA'in kullanıldığı pozitif kontrol grubu olduğu tespit edilmiştir.

Farklı irrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı üzerine etkisini incelediğimiz bu çalışmayla daha önce yapılmış benzer çalışmalar arasındaki en önemli fark; önceki çalışmalarda EDTA'in sadece %17'lik konsantrasyonunun kök hücreler üzerindeki etkisi incelenirken (Ring ve ark. 2008, Trevino ve ark. 2011, Martin ve ark. 2014), bu çalışmada EDTA'in hem %5'lik hem de %17'lik konsantrasyonlarının kök hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda daha düşük konsantrasyona sahip EDTA solüsyonunun kök hücreler üzerinde oluşturacağı negatif ya da pozitif etkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

Organotipik modellere uygulanan farklı irrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı üzerine etkisini WST-1 yöntemi ile incelediğimiz bu çalışmada, 7.gün sonunda en yüksek değer %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 3) gözlenirken; %17'lik EDTA kullanılan gruplar içinde en düşük değer ise %5 NaOCl+%17 EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 9) gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada her ne kadar farklı bir yöntem kullanılmış olsa da, elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Ring ve ark. 2008, Trevino ve ark. 2011, Martin ve ark. 2014).

EDTA'in dentinin kristal yapısından Ca<sup>++</sup> iyonlarını uzaklaştırmasıyla, yüzeysel dentin tabakası demineralize olur. Bu durum TGF- $\beta$  (Zhao ve ark. 2000), BMP-2 (Begue-Kirn ve ark. 1992), PDGF, VEGF ve FGF-2 (Roberts-Clark ve Smith 2000) gibi dentine gömülü büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Bu büyüme faktörlerinin dental dokulardaki kök hücrelerin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Finkelman ve ark. 1990, Roberts-Clark ve Smith 2000, Almushayt ve ark. 2006). EDTA'in kök hücre üzerindeki etkisini inceleyen bir *in vitro* çalışmada, EDTA uygulanmış dentin yüzeyinin, kök hücrelerin bağlanmasını artırdığı ve bağlanan hücrelerin odontoblastik/osteoblastik farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Pang ve ark. 2014). Ayrıca EDTA uygulanmış dentin yüzeyinde oluşan dentin dekalsifikasyonu ile organik matriks içerisindeki kollajen fibriller açığa çıkar ve bu durumun integrin reseptörleri üzerinden

hücre bağlanmasına olanak tanıyan başka bir model oluşturabileceği düşünülmektedir (Verdelis ve ark. 1999, Heino ve Kapyla 2009).

Hücre adezyonunun yüzeyin kimyasal ve topografik özelliklerinden etkilendiği bilinmektedir (Roach ve ark. 2005). Yüzey ıslanabilirliği de bu özelliklerden biridir. Yakın zamanda yüzey ıslanabilirliğinin artmasıyla hücre bağlanmasının teşvik edildiği gösterilmiştir (Wei ve ark. 2009, Huang ve ark. 2012). Bu bağlamda EDTA uygulanmış dentin yüzeyinde büyük yoğunlukta hücre bulunması, EDTA'nın yüzey ıslanabilirliğini artırmasıyla açıklanabilir (Huang ve ark. 2012). Ayrıca hücre bağlanmasındaki artışın, hidrofilik yüzeye bağlanmayı seven anahtar adezyon proteini fibronektinin, EDTA uygulanmış hidrofilik yüzeye bağlanma miktarındaki artışla ilişkili olabileceği olası mekanizmalar arasındadır (Wei ve ark. 2009).

%5'lik ve %17'lik EDTA'nın SCAP canlılığı üzerine etkisini karşılaştırdığımız bu yöntemde, %5'lik EDTA'nın hem tek başına (Grup 2) hem de tüm NaOCl konsantrasyonlarının ardından kullanıldığı gruplara bakıldığında (Grup 4, 5, 6) kök hücreler üzerinde %17'lik EDTA kadar olumlu etkiler (Grup 3, 7, 8 ve 9) oluşturamadığı gözlenmektedir.

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda %5'lik EDTA'nın SCAP'nin canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu gruba ait verilerin başka araştırmalarla karşılaştırılması mümkün değildir. Fakat EDTA'nın farklı konsantrasyonlarının smear uzaklaştırma etkinliği ve dentinde oluşturduğu demineralizasyon derecesinin araştırıldığı çalışmalarda; farklı konsantrasyonlardaki EDTA'nın (%1, %5, %10 ve %15) smear uzaklaştırma etkinliğinde bir fark olmadığı (Şen ve ark. 2009), fakat yüksek konsantrasyona sahip EDTA solüsyonunun dentinde daha fazla demineralizasyona neden olduğu bildirilmiştir (Serper ve Çalt 2002). Bunun sonucunda %17'lik EDTA, dentinde daha fazla demineralizasyon oluşturarak, dentine gömülü büyüme faktörlerinin salınımında %5'lik EDTA'ya göre daha olumlu etki oluşturuyor olabilir.

Organotipik modellere uygulanan farklı irrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı üzerine etkisini incelediğimiz bu çalışmada en yüksek değer sadece %17'lik

EDTA'in kullanıldığı grupta (Grup 3) izlenirken, ikinci en yüksek değer ise %2,5 NaOCl+%17 EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 8) gözlenmiştir. Her ne kadar %5'lik EDTA, SCAP'nin canlılığını teşvik etmede ya da NaOCl'in olumsuz etkilerini tersine çevirmede %17'lik EDTA kadar başarılı olamasa da; %5'lik EDTA'in final irrigasyon ajanı olarak kullanıldığı gruplar arasında da (Grup 4, 5, 6) en yüksek değer %2,5 NaOCl+%5 EDTA kullanılan grupta (Grup 5) gözlenmiştir. Bu durumun smear tabakasının etkin bir şekilde uzaklaştırılması ve bu şekilde SCAP'nin açık dentin tübüllerine daha iyi bağlanmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde günümüze kadar yapılan çalışmalarda kök kanallarında smear tabakasının organik ve inorganik içeriğinin ikisini birden uzaklaştırabilen bir solüsyon bulunmadığından kök kanallarının irrigasyonunda organik ve inorganik çözücülerin birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir (Baumgartner ve ark. 1984, Tatsuta ve ark. 1999). Yamashita ve ark. (2003) %2'lik CHX, %2,5'lik NaOCl ve %2,5'lik NaOCl ve %17'lik EDTA'in birlikte kullanımının kök kanallarındaki smear tabakası üzerinde etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında en etkili sonuçların %2,5'lik NaOCl ve %17'lik EDTA'in birlikte kullanılmasıyla elde edildiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde yapılan başka çalışmalarda da %2,5'lik NaOCl ve %17'lik EDTA solüsyonlarının birlikte kullanımının kök kanallarındaki smear tabakayı uzaklaştırmada etkin konsantrasyonlar olduğu bildirilmiştir (Menezes ve ark. 2003, de Vasconcelos ve ark. 2007, Goel ve Tewari 2009).

Daha önce yapılmış benzer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada, çeşitli irrigasyon protokollerinin SCAP canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi ikinci bir yöntemle incelenmiştir. Böylelikle literatürde ilk kez irrigasyon solüsyonları dentin yerine mikropilaya kuyucuklarına uygulanarak, bu solüsyonların dentin yokluğunda kök hücreler üzerindeki etkilerinin değişip değişmediği araştırılmıştır.

Zamana bağlı SCAP proliferasyonunun değerlendirildiği gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence RTCA) verilerinin tamamı incelendiğinde, 116 saat boyunca tüm gruplarda SCAP'nin kuyucuk yüzeyine tutunup, proliferate olabildiği gözlenmiştir. Bu durum kullanılan hiçbir irrigasyon protokolünün SCAP üzerinde toksik etki oluşturmadığını göstermektedir. Ancak proliferate olma hızlarındaki



farklılık, kullanılan irrigasyon ajanlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemine ait bulgular değerlendirildiğinde sadece %5'lik (Grup 2) ve %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupların 116 saat boyunca birbirine yakın CI değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Ek olarak belli bir konsantrasyondaki (%1, %2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA kullanılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA'in NaOCl'in etkilerini tersine çevirmede daha başarılı olduğu gözlemlense de, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat deney grupları kendi aralarında kıyaslandıklarında en iyi sonuçların EDTA'in tek başına kullanıldığı gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) elde edildiği görülmektedir. Bu gruplara ait kuyucuklara bakıldığında (Grup 2 ve Grup 3) ise SCAP proliferasyonunun 116 saat boyunca kontrol grubundan daha yüksek seviyede seyrettiği tespit edilmiştir. Bu da EDTA'nın SCAP üzerinde toksik etki oluşturmadığının ve tam tersine olumlu etkiler yaptığının bir göstergesidir.

Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde, NaOCl ve EDTA'in birlikte kullanıldığı gruplara bakıldığında, NaOCl'in konsantrasyonu arttıkça hücrelerin proliferasyon oranının azaldığı görülmektedir. En düşük CI değerleri %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda (Grup 6 ve Grup 9) tespit edilmiştir. Kuyucuklar irrigasyon sonrası her ne kadar bol miktarda serum fizyolojik ile durulanmış olsa da, konsantrasyona bağlı etkinin devam etmesi kimyasal artıkların ortamdan uzaklaştırılmadığını düşündürmektedir. Fakat bazı araştırmacılar sodyum tiyosülfat gibi nötralize edici bir ajan kullanılmasına rağmen yüksek konsantrasyonda (%6) NaOCl'in kök hücreler üzerindeki toksik etkisinin ortadan kaldırılamadığını tespit etmişlerdir (Martin ve ark. 2014). Bu nedenle toksik etkinin, kimyasal ajanların dentin üzerinde kök hücrelerin yaşamına olanak vermeyen bir mikroçevre oluşturmasıyla dolaylı olarak meydana geldiğini düşünmektedirler. Fakat bizim çalışmamızdaki bu yöntemde NaOCl, dentin yerine kuyucuklara uygulandığı için böyle bir mekanizmanın varlığından söz etmek mümkün değildir. Bu nedenle toksik etkinin devam etmesine sebep olacak başka mekanizmalar üzerinde durulmalı ve bu konuyla ilgili yeni çalışmalar tasarlanmalıdır.

Yaptığımız çalışmada kuyucuklara uygulanan irrigasyon protokollerinin ardından SCAP'nde apoptoz ve nekroz varlığının değerlendirildiği ikili boyama yöntemine ait mikroskopik incelemede, 24 saat sonunda hiçbir grupta apoptotik hücreye rastlanmamıştır. Bu sonuç, hücreleri intihara sürükleyecek herhangi bir durumun var olmadığını göstermektedir. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en düşük nekroz oranlarının EDTA'in tek başına kullanıldığı gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) elde edildiği görülmektedir. Fakat %5'lik (Grup 2) ve %17'lik EDTA (Grup 3) ile irrigasyon yapılan grupların birbirine yakın nekroz oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Ek olarak belli bir konsantrasyondaki (%1, %2,5 ya da %5) NaOCl'in ardından, farklı iki konsantrasyonda EDTA kullanılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında (Grup 4 ile 7, Grup 5 ile 8, Grup 6 ile 9); %17'lik EDTA kullanılan gruplarda daha düşük nekroz oranları gözlenirse de, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. NaOCl ve EDTA'in birlikte kullanıldığı gruplara bakıldığında ise, NaOCl'in konsantrasyonu arttıkça hücrelerdeki nekroz oranının arttığı görülmektedir. En yüksek yüzde nekroz değerleri %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda (Grup 6 ve Grup 9) tespit edilmiştir.

İkili boyama yöntemiyle elde edilen bulgular gerçek zamanlı hücre analizi bulgularını doğrular niteliktedir. Literatürde bu yöntemlerle irrigasyon solüsyonlarının SCAP üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu yöntemlere ait verilerin başka araştırmalarla karşılaştırılması mümkün değildir.

Yaptığımız bu çalışmada, WST-1 yöntemi ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; %17'lik EDTA'in %5'lik EDTA'e göre SCAP üzerinde daha olumlu sonuçlar oluşturduğu gözlenirken, gerçek zamanlı hücre analizi ve ikili boyama yönteminde %5'lik ve %17'lik EDTA'in birbirine yakın sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu durum EDTA'in kök hücreler üzerinde oluşturduğu birçok olumlu etkinin, sahip olduğu konsantrasyona bağlı olarak dentin üzerinde meydana getirmiş olduğu değişikliklerden kaynaklandığını göstermektedir. Yine WST-1 yöntemi ile elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; NaOCl ve EDTA'in birlikte kullanıldığı gruplardan %5'lik ve %17'lik EDTA kullanılan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında, en iyi sonuçlar %2,5'lik NaOCl ile irrigasyon yapılan gruplarda

gözlenmiştir. Aynı gruplar arasında gerçek zamanlı hücre analizi ve ikili boyama yöntemleri kullanılarak yapılan karşılaştırmalarda ise; NaOCl'in konsantrasyonuna bağlı olarak SCAP'ndeki proliferasyon oranının azaldığı ve nekroz oranının arttığı tespit edilmiştir. Bu farklılığın; WST-1 yönteminde %2,5'lik NaOCl ve %17'lik EDTA kullanımının smear tabakasını etkin bir şekilde uzaklaştırarak SCAP'nin açık dentin tübüllerine daha iyi bağlanmasını sağladığından, buna karşın gerçek zamanlı hücre analizi ve ikili boyama yönteminde, kuyucuklardaki kimyasal artıklar ortamdan uzaklaştırılmadığı için konsantrasyona bağlı etkinin devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

SEM analizine ait görüntüler incelendiğinde, tüm gruplarda SCAP'nin fibrin ağ örtüsü içinde yuvarlak şekil aldığı ve hücre uzantılarıyla dentin yüzeyine bağlandığı tespit edilmiştir. Sadece EDTA'in kullanıldığı (Grup 2 ve Grup 3) ve %2,5'lik NaOCl'in ardından EDTA'in iki farklı konsantrasyonu ile irrigasyon yapılan gruplardan (Grup 5 ve Grup 8) 1 000× ve 10 000× büyütmede alınan SEM görüntülerinde, fibrin ağ yapısının daha yoğun olduğu ve hücre-hücre arası etkileşimlerin varlığı gözlenmiştir. Sadece EDTA'in kullanıldığı (Grup 2 ve Grup 3) ve %2,5'lik NaOCl'in ardından %17'lik EDTA ile irrigasyon yapılan grupta (Grup 8), SCAP'nin küçük topluluklar halinde ve diğer gruplara göre daha yoğun olarak dentin yüzeyine tutunduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçların EDTA'in dentin yüzeyinde meydana getirdiği olumlu değişikliklerle ve her iki solüsyonun birlikte kullanıldığı gruplarda smear tabakasının etkin bir şekilde uzaklaştırılarak SCAP'nin açık dentin tübüllerine daha iyi bağlanmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

%5'lik NaOCl ile irrigasyon yapılan gruplardan (Grup 6 ve Grup 9) alınan SEM görüntülerinde ise, fibrin ağ yoğunluğunun azalması nedeniyle açık dentin tübüllerinin daha görünür hale geldiği tespit edilmiştir. Bu durumun %5'lik NaOCl'in dentinde meydana getirdiği olumsuz etkinin, %5'lik ve %17'lik EDTA kullanılmasına rağmen tersine çevrilememesi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir.

Literatürde PRP iskele içerisinde kök kanalına gönderilen SCAP'ni SEM analizi ile değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu yöntemlere ait verilerin başka araştırmalarla karşılaştırılması mümkün değildir. Ancak PRP; biyouyumlu, üç boyutlu, mikro gözenekli, hücre tutunmasını sağlayabilecek ve

kök hücreleri fiziksel olarak hapsedebilecek bir matriks (üç boyutlu iskele) sağlamaktadır. Bu durum, PRP'nın *in vivo* olarak dişe ait dokuların onarımı ve rejenerasyonunu hızlandırabileceği kanaatini uyandırmıştır.

Rejeneratif endodontik tedavilerde kullanılan irrigasyon ajanlarının kök hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri tedavilerin başarıyla sonuçlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu *in vitro* çalışmaya ait bulgular değerlendirildiğinde;

1. WST-1, gerçek zamanlı hücre analizi ve ikili boyama yöntemlerinin; rejeneratif endodontik tedavilerde uygulanan irrigasyon protokollerinin SCAP üzerine etkisinin değerlendirilmesi için uygun yöntemler olduğuna
2. SEM analizinin, SCAP'nin dentine bağlanması ve oluşan fibrin ağ yapının incelenmesi için uygun bir yöntem olduğuna
3. PRP'nin sahip olduğu üç boyutlu ve mikro gözenekli yapıyla, SCAP için uygun ve kullanılabilir bir iskele olduğuna
4. %5'lik ve %17'lik EDTA'in, SCAP üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğuna
5. %5'lik NaOCl'in kullanıldığı gruplarda, SCAP'nde canlılık ve proliferasyon oranının azaldığına ve nekroz oranının arttığına
6. NaOCl ile yapılan irrigasyonun SCAP üzerindeki olumsuz etkilerini geri çevirmede, %17'lik EDTA'in %5'lik EDTA'e göre daha başarılı olduğuna
7. SCAP için en olumlu sonuçlara, %2,5'lik NaOCl ve ardından %17'lik EDTA ile yapılan irrigasyon protokolüyle ulaşıldığına

dair sonuçlar elde edilmiştir.

Rejeneratif endodontik uygulamaların alanı hızla gelişmektedir. Doku mühendisliği ilkeleri üzerine kurulu rejeneratif endodontide, tüm hızla gelişen alanlara benzer olarak, klinik öncesi araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Günümüze kadar rejeneratif endodontik uygulamaları içeren onlarca farklı vaka yayınlanmıştır. Fakat bunların çoğunda uygulanan standart bir irrigasyon protokolü yoktur. Bizim çalışmamızda SCAP'nin canlılığı ve proliferasyonunu olumlu yönde etkileyecek en uygun irrigasyon protokolünü tespit etmek ve rejeneratif endodontide uygulanan irrigasyon protokollerinin standardizasyonuna katkı sağlamak amacıyla, EDTA'in

daha önce rejeneratif endodontik uygulamalarda kullanılmamış olan %5'lik konsantrasyonu ile oluşturulan irrigasyon protokolleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların literatüre gerçek anlamda katkı sağladığını düşünmekteyiz. Ancak bu konudaki çalışmalar henüz sınırlı sayıda olduğu için *in vivo* ve *in vitro* daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



## 5 KAYNAKLAR

- AAE. (2016) Clinical considerations for a regenerative procedure, Erişim: [http://www.aae.org/uploadedfiles/publications\_and\_research/research/currentregenerativeendodontic\_onsiderations.pdf], Erişim tarihi: 08.06.2016.
- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. (2000) Cellular and molecular immunology. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- ABERG T, WOZNEY J, THESLEFF I. (1997) Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn*,210,383-396.
- ABUARQOUB D, AWIDI A, ABUHARFEIL N. (2015) Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. *Arch Oral Biol*,60,1545-1553.
- AKTENER BO, BILKAY U. (1993) Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *J Endod*,19,228-231.
- ALHADLAQ A, MAO JJ. (2005) Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Joint Surg Am*,87,936-944.
- ALISON MR, POULSOM R, FORBES S, WRIGHT NA. (2002) An introduction to stem cells. *J Pathol*,197,419-423.
- ALMUSHAYT A, NARAYANAN K, ZAKI AE, GEORGE A. (2006) Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*,13,611-620.
- ALSOUSOU J, ALI A, WILLETT K, HARRISON P. (2013) The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*,24,173-182.
- ANDO Y, HONDA MJ, OHSHIMA H, TONOMURA A, OHARA T, ITAYA T, KAGAMI H, UEDA M. (2009) The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCP in porcine teeth. *Nagoya J Med Sci*,71,51-62.

- ANDREASEN JO, RAVN JJ. (1972) Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a Danish population sample. *Int J Oral Surg*,1,235-239.
- ANDREASEN JO, BORUM MK, JACOBSEN HL, ANDREASEN FM. (1995) Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol*,11,59-68.
- ARTHUR A, RYCHKOV G, SHI S, KOBLAR SA, GRONTHOS S. (2008) Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*,26,1787-1795.
- ASBOE-JORGENSEN V, ATTSTROM R, LANG NP, LOE H. (1974) Effect of a chlorhexidine dressing on the healing after periodontal surgery. *J Periodontol*,45,13-17.
- BAKOPOULOU A, LEYHAUSEN G, VOLK J, TSIFTSOGLU A, GAREFIS P, KOIDIS P, GEURTSSEN W. (2011) Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*,56,709-721.
- BALLINI A, DE FRENZA G, CANTORE S, PAPA F, GRANO M, MASTRANGELO F, TETE S, GRASSI FR. (2007) In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *Int J Immunopathol Pharmacol*,20,9-16.
- BANCHS F, TROPE M. (2004) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*,30,196-200.
- BASRANI B, TJADERHANE L, SANTOS JM, PASCON E, GRAD H, LAWRENCE HP, FRIEDMAN S. (2003) Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,96,618-624.
- BASRANI B, SANTOS JM, TJADERHANE L, GRAD H, GORDUYSUS O, HUANG J, LAWRENCE HP, FRIEDMAN S. (2002) Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,94,240-245.
- BATOULI S, MIURA M, BRAHIM J, TSUTSUI TW, FISHER LW, GRONTHOS S, ROBEY PG, SHI S. (2003) Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*,82,976-981.
- BAUMGARTNER JC, BROWN CM, MADER CL, PETERS DD, SHULMAN JD. (1984) A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod*,10,525-531.

- BAZLEY LA, GULLICK WJ. (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer*,12 Suppl 1,S17-27.
- BEGUE-KIRN C, SMITH AJ, RUCH JV, WOZNEY JM, PURCHIO A, HARTMANN D, LESOT H. (1992) Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol*,36,491-503.
- BEZGIN T, YILMAZ AD, CELIK BN, SONMEZ H. (2014) Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *Int Endod J*,47,41-49.
- BEZGIN T, YILMAZ AD, CELIK BN, KOLSUZ ME, SONMEZ H. (2015) Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod*,41,36-44.
- BI Y, EHIRCHIOU D, KILTS TM, INKSON CA, EMBREE MC, SONOYAMA W, LI L, LEET AI, SEO BM, ZHANG L, SHI S, YOUNG MF. (2007) Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*,13,1219-1227.
- BOSE R, NUMMIKOSKI P, HARGREAVES K. (2009) A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*,35,1343-1349.
- BOSSHARDT DD. (2005) Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res*,84,390-406.
- BRONCKERS AL, LYARUU DM, WOLTGENS JH. (1989) Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. *Connect Tissue Res*,22,65-70.
- CAN A. (2014) Kök Hücre - Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara. s: 39-47.
- CAPLAN AI. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*,9,641-650.
- CAPLAN AI. (2013) Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*,110,2695-2696.
- CARLSON NE, ROACH RB, JR. (2002) Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*,133,1383-1386.



- CASAGRANDE L, DEMARCO FF, ZHANG Z, ARAUJO FB, SHI S, NOR JE. (2010) Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*,89,603-608.
- CASSIDY N, FAHEY M, PRIME SS, SMITH AJ. (1997) Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*,42,219-223.
- CEHRELI ZC, ISBITIREN B, SARA S, ERBAS G. (2011) Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*,37,1327-1330.
- CHEHREHASA F, MEEDENIYA AC, DWYER P, ABRAHAMSEN G, MACKAY-SIM A. (2009) EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods*,177,122-130.
- COTTI E, MEREU M, LUSSO D. (2008) Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*,34,611-616.
- CROUCH SP, KOZLOWSKI R, SLATER KJ, FLETCHER J. (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*,160,81-88.
- CVEK M. (1972) Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontol Revy*,23,27-44.
- CVEK M. (1992) Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*,8,45-55.
- DE VASCONCELOS BC, LUNA-CRUZ SM, DE-DEUS G, DE MORAES IG, MANIGLIA-FERREIRA C, GURGEL-FILHO ED. (2007) Cleaning ability of chlorhexidine gel and sodium hypochlorite associated or not with EDTA as root canal irrigants: a scanning electron microscopy study. *J Appl Oral Sci*,15,387-391.
- DEMARCO FF, CASAGRANDE L, ZHANG Z, DONG Z, TARQUINIO SB, ZEITLIN BD, SHI S, SMITH AJ, NOR JE. (2010) Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*,36,1805-1811.
- DHARIWALA B, HUNT E, BOLAND T. (2004) Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Eng*,10,1316-1322.

- DING RY, CHEUNG GS, CHEN J, YIN XZ, WANG QQ, ZHANG CF. (2009) Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*,35,745-749.
- DIOGENES A, HENRY MA, TEIXEIRA FB, HARGREAVES KM. (2013) An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics*,28,2-23.
- DIOGENES AR, RUPAREL NB, TEIXEIRA FB, HARGREAVES KM. (2014) Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod*,40,S52-57.
- DOBIE K, SMITH G, SLOAN AJ, SMITH AJ. (2002) Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res*,43,387-390.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*,8,315-317.
- DOUCET C, ERNOU I, ZHANG Y, LLENSE JR, BEGOT L, HOLY X, LATAILLADE JJ. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*,205,228-236.
- EGUSA H, SONOYAMA W, NISHIMURA M, ATSUTA I, AKIYAMA K. (2012) Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*,56,151-165.
- ELSEED MA, MURRAY PE, GARCIA-GODOY F, NAMEROW KN. (2009) Assessment of bioactive and bio-adhesive therapies to enhance stem cell attachment to root surface dentine. *Int Endod J*,42,576-583.
- EPPLEY BL, WOODSELL JE, HIGGINS J. (2004) Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*,114,1502-1508.
- ESSNER MD, JAVED A, ELEAZER PD. (2011) Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,112,662-666.
- FARIA G, CELES MR, DE ROSSI A, SILVA LA, SILVA JS, ROSSI MA. (2007) Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod*,33,715-722.

- FELTHAUS O, ERNST W, DRIEMEL O, REICHERT TE, SCHMALZ G, MORSCZECK C. (2010) TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs). *Neurosci Lett*,471,179-184.
- FINKELMAN RD, MOHAN S, JENNINGS JC, TAYLOR AK, JEPSEN S, BAYLINK DJ. (1990) Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*,5,717-723.
- FORTIER LA. (2005) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*,34,415-423.
- FOSTER TE, PUSKAS BL, MANDELBAUM BR, GERHARDT MB, RODEO SA. (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*,37,2259-2272.
- FRANK AL. (1966) Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc*,72,87-93.
- FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHYAN RK, LATSINIK NV, PANASYUK AF, KEILISS-BOROK IV. (1974a) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*,17,331-340.
- FRIEDENSTEIN AJ, DERIGLASOVA UF, KULAGINA NN, PANASUK AF, RUDAKOWA SF, LURIA EA, RUADKOW IA. (1974b) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*,2,83-92.
- FUJIWARA S, KUMABE S, IWAI Y. (2006) Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn*,83,15-24.
- GALLER KM, EIDT A, SCHMALZ G. (2014) Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod*,40,S41-45.
- GALLER KM, D'SOUZA RN, FEDERLIN M, CAVENDER AC, HARTGERINK JD, HECKER S, SCHMALZ G. (2011) Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod*,37,1536-1541.
- GALLER KM, BUCHALLA W, HILLER KA, FEDERLIN M, EIDT A, SCHIEFERSTEINER M, SCHMALZ G. (2015) Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod*,41,363-368.
- GEISLER TM. (2012) Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. *Dent Clin North Am*,56,603-626.

- GOEL S, TEWARI S. (2009) Smear layer removal with passive ultrasonic irrigation and the NaviTip FX: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,108,465-470.
- GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. (2001) In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*,34,424-428.
- GOULD TR, MELCHER AH, BRUNETTE DM. (1980) Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontal Res*,15,20-42.
- GRAZIANO A, D'AQUINO R, LAINO G, PAPACCIO G. (2008a) Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*,4,21-26.
- GRAZIANO A, D'AQUINO R, LAINO G, PROTO A, GIULIANO MT, PIROZZI G, DE ROSA A, DI NAPOLI D, PAPACCIO G. (2008b) Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell Prolif*,41,1-11.
- GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*,97,13625-13630.
- GRONTHOS S, BRAHIM J, LI W, FISHER LW, CHERMAN N, BOYDE A, DENBESTEN P, ROBEY PG, SHI S. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*,81,531-535.
- HAAPASALO M, SHEN Y, QIAN W, GAO Y. (2010) Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*,54,291-312.
- HAND RE, SMITH ML, HARRISON JW. (1978) Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod*,4,60-64.
- HARGREAVES KM, COHEN S, BERMAN LH. (2011) *Cohen's pathways of the pulp*. 10th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, Mo.
- HARGREAVES KM, DIOGENES A, TEIXEIRA FB. (2013) Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*,39,S30-43.
- HARGREAVES KM, GIESLER T, HENRY M, WANG Y. (2008) Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*,34,S51-56.

- HARRISON JW, HAND RE. (1981) The effect of dilution and organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*,7,128-132.
- HARRISON JW, WAGNER GW, HENRY CA. (1990) Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. *J Endod*,16,328-330.
- HASSELGREN G, OLSSON B, CVEK M. (1988) Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod*,14,125-127.
- HEINO J, KAPYLA J. (2009) Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des*,15,1309-1317.
- HERMANN BW. (1952) [On the reaction of the dental pulp to vital amputation and calxyl capping]. *Dtsch Zahnarztl Z*,7,1446-1447.
- HIDALGO E, DOMINGUEZ C. (2001) Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*,15,271-276.
- HIRANO S. (1999) Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym Int*,48,732-734.
- HUANG GT, SHAGRAMANOVA K, CHAN SW. (2006) Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*,32,1066-1073.
- HUANG GT, GRONTHOS S, SHI S. (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*,88,792-806.
- HUANG GT, SONOYAMA W, LIU Y, LIU H, WANG S, SHI S. (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*,34,645-651.
- HUANG GT, YAMAZA T, SHEA LD, DJOUAD F, KUHN NZ, TUAN RS, SHI S. (2010) Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*,16,605-615.
- HUANG X, ZHANG J, HUANG C, WANG Y, PEI D. (2012) Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. *Int Endod J*,45,346-353.
- HULSMANN M, HAHN W. (2000) Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J*,33,186-193.

- HULSMANN M, HECKENDORFF M, LENNON A. (2003) Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*,36,810-830.
- IKEDA E, YAGI K, KOJIMA M, YAGYUU T, OHSHIMA A, SOBAJIMA S, TADOKORO M, KATSUBE Y, ISODA K, KONDOH M, KAWASE M, GO MJ, ADACHI H, YOKOTA Y, KIRITA T, OHGUSHI H. (2008) Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*,76,495-505.
- IOHARA K, NAKASHIMA M, ITO M, ISHIKAWA M, NAKASIMA A, AKAMINE A. (2004) Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*,83,590-595.
- IOHARA K, ZHENG L, ITO M, ISHIZAKA R, NAKAMURA H, INTO T, MATSUSHITA K, NAKASHIMA M. (2009) Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med*,4,377-385.
- ISHIMATSU H, KITAMURA C, MOROTOMI T, TABATA Y, NISHIHARA T, CHEN KK, TERASHITA M. (2009) Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. *J Endod*,35,858-865.
- IWAYA SI, IKAWA M, KUBOTA M. (2001) Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*,17,185-187.
- JADHAV G, SHAH N, LOGANI A. (2012) Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. *J Endod*,38,1581-1587.
- JADHAV GR, SHAH N, LOGANI A. (2013) Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. *J Conserv Dent*,16,568-572.
- JEERUPHAN T, JANTARAT J, YANPISET K, SUWANNAPAN L, KHEWSAWAI P, HARGREAVES KM. (2012) Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod*,38,1330-1336.
- JENKINS N. (1999) *Animal cell biotechnology : methods and protocols*. Humana Press, Totowa, N.J. s: 239-252.

- JUNG IY, LEE SJ, HARGREAVES KM. (2008) Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*,34,876-887.
- KANSU E. (2005) Current concepts in stem cell biology and plasticity. *Hacettepe Med J*,36,191-197.
- KARASAHIN T. (2012) Embryonic stem cells. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*,9,65-71.
- KASTEN P, VOGEL J, LUGINBUHL R, NIEMEYER P, WEISS S, SCHNEIDER S, KRAMER M, LEO A, RICHTER W. (2006) Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs*,183,68-79.
- KEMOUN P, LAURENCIN-DALICIEUX S, RUE J, FARGES JC, GENNERO I, CONTE-AURIOL F, BRIAND-MESANGE F, GADELORGE M, ARZATE H, NARAYANAN AS, BRUNEL G, SALLES JP. (2007) Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*,329,283-294.
- KERKIS I, KERKIS A, DOZORTSEV D, STUKART-PARSONS GC, GOMES MASSIRONI SM, PEREIRA LV, CAPLAN AI, CERRUTI HF. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*,184,105-116.
- KISHIMOTO T. (1998) Leucocyte typing VI : white cell differentiation antigens : proceedings of the sixth international workshop and conference held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996 Garland Pub., New York.
- KITAMURA C, NISHIHARA T, TERASHITA M, TABATA Y, WASHIO A. (2012) Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of fgf-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. *Int J Dent*,2012,190561.
- KLEIER DJ, BARR ES. (1991) A study of endodontically apexified teeth. *Endod Dent Traumatol*,7,112-117.
- KLING M, CVEK M, MEJARE I. (1986) Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol*,2,83-89.
- KOYAMA N, OKUBO Y, NAKAO K, BESSHO K. (2009) Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*,67,501-506.

- KURITA K. (1998) Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 59,117-120.
- KURITA K. (2006) Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)*,8,203-226.
- LAINO G, D'AQUINO R, GRAZIANO A, LANZA V, CARINCI F, NARO F, PIROZZI G, PAPACCIO G. (2005) A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*,20,1394-1402.
- LANGER R, VACANTI JP. (1993) Tissue engineering. *Science*,260,920-926.
- LAW AS. (2013) Considerations for regeneration procedures. *J Endod*,39,S44-56.
- LEKIC P, ROJAS J, BIREK C, TENENBAUM H, MCCULLOCH CA. (2001) Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res*,36,71-79.
- LENZI R, TROPE M. (2012) Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod*,38,411-414.
- LESOT H, SMITH AJ, MEYER JM, STAUBLI A, RUCH JV. (1986) Cell-matrix interactions: influence of noncollagenous proteins from dentin on cultured dental cells. *J Embryol Exp Morphol*,96,195-209.
- LIM CK, YAACOB NS, ISMAIL Z, HALIM AS. (2010) In vitro biocompatibility of chitosan porous skin regenerating templates (PSRTs) using primary human skin keratinocytes. *Toxicol In Vitro*,24,721-727.
- LIN P, LIN Y, LENNON DP, CORREA D, SCHLUCHTER M, CAPLAN AI. (2012) Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem Cells Transl Med*,1,886-897.
- LIU J, JIN T, CHANG S, RITCHIE HH, SMITH AJ, CLARKSON BH. (2007) Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*,43,120-128.
- LOVELACE TW, HENRY MA, HARGREAVES KM, DIOGENES A. (2011) Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*,37,133-138.



- LOVSCHELL H, FEJERSKOV O, FLYVBJERG A. (2001) Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res*,15,108-112.
- LÖE H. (1973) Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J Periodontal Res*,12(Suppl),93-99.
- LUO Y, SHOICHET MS. (2004) A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat Mater*,3,249-253.
- MAGHNI K, NICOLESCU OM, MARTIN JG. (1999) Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods*,223,185-194.
- MARTIN DE, DE ALMEIDA JF, HENRY MA, KHAING ZZ, SCHMIDT CE, TEIXEIRA FB, DIOGENES A. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*,40,51-55.
- MARTIN G, RICUCCI D, GIBBS JL, LIN LM. (2013) Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*,39,138-144.
- MARTIN I, PADERA RF, VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED LE. (1998a) In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res*,16,181-189.
- MARTIN LJ, AL-ABDULLA NA, BRAMBRINK AM, KIRSCH JR, SIEBER FE, PORTERA-CAILLIAU C. (1998b) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*,46,281-309.
- MARTINHO FC, GOMES BP. (2008) Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod*,34,268-272.
- MARX RE. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*,62,489-496.
- MCCULLOCH CA, LEKIC P, MCKEE MD. (2000) Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol* 2000,24,56-72.
- MCCULLOCH KJ, MILLS CM, GREENFELD RS, COIL JM. (1998) Dens evaginatus: review of the literature and report of several clinical cases. *J Can Dent Assoc*,64,104-106, 110-103.

- MENEZES AC, ZANET CG, VALERA MC. (2003) Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. *Pesqui Odontol Bras*,17,349-355.
- MENTE J, HAGEN, PFEFFERLE T, KOCH MJ, DREYHAUPT J, STAEHLE HJ, FRIEDMAN S. (2009) Mineral trioxide aggregate apical plugs in teeth with open apical foramina: a retrospective analysis of treatment outcome. *J Endod*,35,1354-1358.
- MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI S. (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*,100,5807-5812.
- MIZUNO H, TOBITA M, UYSAL AC. (2012) Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*,30,804-810.
- MOHAMMADI Z, DUMMER PM. (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*,44,697-730.
- MORSCZECK C, GOTZ W, SCHIERHOLZ J, ZEILHOFER F, KUHN U, MOHL C, SIPPEL C, HOFFMANN KH. (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*,24,155-165.
- MOSMANN T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*,65,55-63.
- MURAKAMI Y, KOJIMA T, NAGASAWA T, KOBAYASHI H, ISHIKAWA I. (2003) Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*,74,780-786.
- MURPHY WL, SIMMONS CA, KAIGLER D, MOONEY DJ. (2004) Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res*,83,204-210.
- MURRAY PE, SMITH AJ. (2002) Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care*,9,21-26.
- MURRAY PE, GARCIA-GODOY F, HARGREAVES KM. (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*,33,377-390.
- MUSKHELISHVILI L, LATENDRESSE JR, KODELL RL, HENDERSON EB. (2003) Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem*,51,1681-1688.

- NAKASHIMA M. (1994a) Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol*,39,1085-1089.
- NAKASHIMA M. (1994b) Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res*,73,1515-1522.
- NAKASHIMA M, REDDI AH. (2003) The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*,21,1025-1032.
- NAKASHIMA M, AKAMINE A. (2005) The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*,31,711-718.
- NAKASHIMA M, IOHARA K, MURAKAMI M. (2013) Dental pulp stem cells and regeneration. *Endod Topics*,28,38-50.
- NAKASHIMA M, NAGASAWA H, YAMADA Y, REDDI AH. (1994) Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol*,162,18-28.
- NEHA K, KANSAL R, GARG P, JOSHI R, GARG D, GROVER HS. (2011) Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*,16,e997-1004.
- NIKOLIDAKIS D, JANSEN JA. (2008) The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev*,14,249-258.
- NIU W, YOSHIOKA T, KOBAYASHI C, SUDA H. (2002) A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J*,35,934-939.
- NOSRAT A, HOMAYOUNFAR N, OLOOMI K. (2012) Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J Endod*,38,1428-1434.
- NYGAARD-QSTBY B, HJORTDAL O. (1971) Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res*,79,333-349.

- OKINO LA, SIQUEIRA EL, SANTOS M, BOMBANA AC, FIGUEIREDO JA. (2004) Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*,37,38-41.
- OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*,448,313-317.
- OKSAN T, AKTENER BO, SEN BH, TEZEL H. (1993) The penetration of root canal sealers into dentinal tubules. A scanning electron microscopic study. *Int Endod J*,26,301-305.
- PANG NS, LEE SJ, KIM E, SHIN DM, CHO SW, PARK W, ZHANG X, JUNG IY. (2014) Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*,40,811-817.
- PARIROKH M, JALALI S, HAGHDOOST AA, ABBOTT PV. (2012) Comparison of the effect of various irrigants on apically extruded debris after root canal preparation. *J Endod*,38,196-199.
- PARSON AB. (2004) *The proteus effect: stem cells and their promise for medicine*. Joseph Henry Press, Washington, D.C.
- PENICHE C, FERNANDEZ M, RODRIGUEZ G, PARRA J, JIMENEZ J, BRAVO AL, GOMEZ D, SAN ROMAN J. (2007) Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behaviour. *J Mater Sci Mater Med*,18,1719-1726.
- PETRINO JA, BODA KK, SHAMBARGER S, BOWLES WR, MCCLANAHAN SB. (2010) Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod*,36,536-541.
- PIVA E, SILVA AF, NOR JE. (2014) Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod*,40,S33-40.
- QSTBY BN. (1961) The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*,19,324-353.
- RIMONDINI L, MELE S. (2009) Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol*,58,483-500.
- RING KC, MURRAY PE, NAMEROW KN, KUTTLER S, GARCIA-GODOY F. (2008) The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod*,34,1474-1479.

- ROACH P, FARRAR D, PERRY CC. (2005) Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc*,127,8168-8173.
- ROBERTS-CLARK DJ, SMITH AJ. (2000) Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*,45,1013-1016.
- RODE HJ. (2008) Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4th ed. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.
- RODRIGUEZ-LOZANO FJ, INSAUSTI CL, INIESTA F, BLANQUER M, RAMIREZ MD, MESEGUER L, MESEGUER-HENAREJOS AB, MARIN N, MARTINEZ S, MORALEDA JM. (2012) Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*,17,1062-1067.
- RULE DC, WINTER GB. (1966) Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. *Br Dent J*,120,586-590.
- RUPAREL NB, TEIXEIRA FB, FERRAZ CC, DIOGENES A. (2012) Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*,38,1372-1375.
- RUPAREL NB, DE ALMEIDA JF, HENRY MA, DIOGENES A. (2013) Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod*,39,357-363.
- SACHDEVA GS, SACHDEVA LT, GOEL M, BALA S. (2015) Regenerative endodontic treatment of an immature tooth with a necrotic pulp and apical periodontitis using platelet-rich plasma (PRP) and mineral trioxide aggregate (MTA): a case report. *Int Endod J*,48,902-910.
- SACHLOS E, CZERNUSZKA JT. (2003) Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*,5,29-39; discussion 39-40.
- SAGSOZ H, KETANI MA. (2008) Stem cells. *J Fac Vet Med Univ Dicle* 1,129-133.
- SAHIN F, SAYDAM G, OMA Y SB. (2005) Stem cell plasticity and stem cell treatment in clinical practice. *Turk J Hematol Oncol*,15,48-56.
- SAITO T, OGAWA M, HATA Y, BESSHO K. (2004) Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*,30,205-208.

- SAKAI VT, ZHANG Z, DONG Z, NEIVA KG, MACHADO MA, SHI S, SANTOS CF, NOR JE. (2010) SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*,89,791-796.
- SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL. (2004) Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*,4,743-765.
- SCHMALZ G, SMITH AJ. (2014) Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod*,40,S2-5.
- SCHOPPER C, ZIYA-GHAZVINI F, GORIWODA W, MOSER D, WANSCHITZ F, SPASSOVA E, LAGOIANNIS G, AUTERITH A, EWERS R. (2005) HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation--a long-term histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,74,458-467.
- SCHWARTZ-ARAD D, HERZBERG R, LEVIN L. (2005) Evaluation of long-term implant success. *J Periodontol*,76,1623-1628.
- SEO BM, MIURA M, SONOYAMA W, COPPE C, STANYON R, SHI S. (2005) Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*,84,907-912.
- SEO BM, SONOYAMA W, YAMAZA T, COPPE C, KIKUIRI T, AKIYAMA K, LEE JS, SHI S. (2008) SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*,14,428-434.
- SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J, YOUNG M, ROBEY PG, WANG CY, SHI S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*,364,149-155.
- SERPER A, ÇALT S. (2002) The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod*,28,501-502.
- SHAPIRO HM. (2003) *Practical flow cytometry*. 4th ed. Wiley-Liss, New York.
- SHARMA B, ELISSEEFF JH. (2004) Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng*,32,148-159.
- SHGEMASA Y, MINAMI S. (1995) Application of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotech and Reviews*,13,383-420.

- SHIGEMASA Y, SAITO K, SASHIWA H, SAIMOTO H. (1994) Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int J Biol Macromol*,16,43-49.
- SHIN SY, ALBERT JS, MORTMAN RE. (2009) One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*,42,1118-1126.
- SIMON S, RILLIARD F, BERDAL A, MACHTOU P. (2007) The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J*,40,186-197.
- SIX N, DECUP F, LASFARGUES JJ, SALIH E, GOLDBERG M. (2002) Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med*,13,225-232.
- SMITH AG. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*,17,435-462.
- SMITH AJ, LEAVER AG. (1981) Distribution of the EDTA-soluble non-collagenous organic matrix components of rabbit incisor dentine. *Arch Oral Biol*,26,643-649.
- SMITH AJ, MATTHEWS JB, HALL RC. (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci*,106 Suppl 1,179-184.
- SMITH AJ, MURRAY PE, SLOAN AJ, MATTHEWS JB, ZHAO S. (2001) Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res*,15,51-54.
- SMITH AJ, DUNCAN HF, DIOGENES A, SIMON S, COOPER PR. (2016) Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod*,42,47-56.
- SMITH AJ, TOBIAS RS, PLANT CG, BROWNE RM, LESOT H, RUCH JV. (1990) In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale*,18,123-129.
- SMITH AJ, TOBIAS RS, CASSIDY N, BEGUE-KIRN C, RUCH JV, LESOT H. (1995) Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. *Connect Tissue Res*,32,291-296.
- SMITH C. (2012) Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells, Erişim: [<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays>], Erişim tarihi: 25.09.2012.

- SOBHI MB, RANA MJ, IBRAHIM M, CHAUDARY A, MANZOOR MA, TASLEEM UL H. (2004) Frequency of dens evaginatus of permanent anterior teeth. *J Coll Physicians Surg Pak*,14,88-90.
- SONMEZ IS, AKBAY OBA A, ERKMEN ALMAZ M. (2013) Revascularization/Regeneration performed in immature molars: case reports. *J Clin Pediatr Dent*,37,231-234.
- SONNLEITNER D, HUEMER P, SULLIVAN DY. (2000) A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*,15,879-882.
- SONOYAMA W, LIU Y, YAMAZA T, TUAN RS, WANG S, SHI S, HUANG GT. (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*,34,166-171.
- SONOYAMA W, LIU Y, FANG D, YAMAZA T, SEO BM, ZHANG C, LIU H, GRONTHOS S, WANG CY, WANG S, SHI S. (2006) Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*,1,e79.
- SORIANO EP, CALDAS ADE F, JR., DINIZ DE CARVALHO MV, AMORIM FILHO HDE A. (2007) Prevalence and risk factors related to traumatic dental injuries in Brazilian schoolchildren. *Dent Traumatol*,23,232-240.
- SOUTHARD SR, DRISKO CL, KILLOY WJ, COBB CM, TIRA DE. (1989) The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroides gingivalis* in periodontal pockets. *J Periodontol*,60,302-309.
- SRIVASTAVA N, CHANDRA S. (1999) Effect of endodontic smear layer and various solvents on the calcium ion diffusion through radicular dentin--an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*,17,101-106.
- STEVENS A, ZULIANI T, OLEJNIK C, LEROY H, OBRIOT H, KERR-CONTE J, FORMSTECHEP P, BAILLIEZ Y, POLAKOWSKA RR. (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev*,17,1175-1184.
- STEVENS MM, MARINI RP, SCHAEFER D, ARONSON J, LANGER R, SHASTRI VP. (2005) In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci U S A*,102,11450-11455.



- STOJICIC S, ZIVKOVIC S, QIAN W, ZHANG H, HAAPASALO M. (2010) Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod*,36,1558-1562.
- ŞEN BH, ERTURK O, PISKIN B. (2009) The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,108,622-627.
- TATSUTA CT, MORGAN LA, BAUMGARTNER JC, ADEY JD. (1999) Effect of calcium hydroxide and four irrigation regimens on instrumented and uninstrumented canal wall topography. *J Endod*,25,93-98.
- TERZIOGLU G, KESKIN AU, YANIKKAYA DEMIREL G. (2013) Measurement methods of cell proliferation and a comparison of various commercial proliferation kits. *Turk J Immunol*,1,74-89.
- THESLEFF I. (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*,116,1647-1648.
- THIBODEAU B, TEIXEIRA F, YAMAUCHI M, CAPLAN DJ, TROPE M. (2007) Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*,33,680-689.
- TOMSON PL, GROVER LM, LUMLEY PJ, SLOAN AJ, SMITH AJ, COOPER PR. (2007) Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*,35,636-642.
- TORABINEJAD M, CHIVIAN N. (1999) Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*,25,197-205.
- TORABINEJAD M, TURMAN M. (2011) Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*,37,265-268.
- TORABINEJAD M, FARAS H. (2012) A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod*,38,864-868.
- TORNECK CD, SMITH J. (1970) Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I. Effect of partial and total pulp removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,30,258-266.
- TORNECK CD, SMITH JS, GRINDALL P. (1973a) Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. IV. Effect of debridement procedures and calcium hydroxide-camphorated parachlorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,35,541-554.

- TORNECK CD, SMITH JS, GRINDALL P. (1973b) Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. III. Effect of debridement and disinfection procedures in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,35,532-540.
- TORNECK CD, SMITH JS, GRINDALL P. (1973c) Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. II. Effect of pulp injury and oral contamination. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,35,378-388.
- TREVINO EG, PATWARDHAN AN, HENRY MA, PERRY G, DYBDAL-HARGREAVES N, HARGREAVES KM, DIOGENES A. (2011) Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod*,37,1109-1115.
- TROJANI C, WEISS P, MICHIELS JF, VINATIER C, GUICHEUX J, DACULSI G, GAUDRAY P, CARLE GF, ROCHET N. (2005) Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*,26,5509-5517.
- TSUKATANI T, SUENAGA H, HIGUCHI T, AKAO T, ISHIYAMA M, EZOE K, MATSUMOTO K. (2008) Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *J Microbiol Methods*,75,109-116.
- TZIAFAS D. (1995) Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol*,39,281-290.
- TZIAFAS D, ALVANOU A, PANAGIOTAKOPOULOS N, SMITH AJ, LESOT H, KOMNENOU A, RUCH JV. (1995) Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol*,40,883-893.
- UJANG Z, ABDUL RASHID AH, SUBOH SK, HALIM AS, LIM CK. (2014) Physical properties and biocompatibility of oligochitosan membrane film as wound dressing. *J Appl Biomater Funct Mater*,12,155-162.
- VENKATESAN J, KIM SK. (2010) Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Mar Drugs*,8,2252-2266.
- VERDELIS K, ELIADES G, OVIIR T, MARGELOS J. (1999) Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical root dentin locations. *Endod Dent Traumatol*,15,164-170.

- VERFAILLIE CM, PERA MF, LANSDORP PM. (2002) Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*,369-391.
- VIANNA ME, HORZ HP, GOMES BP, CONRADS G. (2006) In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*,39,484-492.
- VINCENT JF, WEGST UG. (2004) Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct Dev*,33,187-199.
- VOGEL JP, SZALAY K, GEIGER F, KRAMER M, RICHTER W, KASTEN P. (2006) Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*,17,462-469.
- VOLPONI AA, PANG Y, SHARPE PT. (2010) Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*,20,715-722.
- WEI J, IGARASHI T, OKUMORI N, IGARASHI T, MAETANI T, LIU B, YOSHINARI M. (2009) Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*,4,045002.
- WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*,17,387-403.
- WIGLER R, KAUFMAN AY, LIN S, STEINBOCK N, HAZAN-MOLINA H, TORNECK CD. (2013) Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod*,39,319-326.
- WU J, HUANG GT, HE W, WANG P, TONG Z, JIA Q, DONG L, NIU Z, NI L. (2012) Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. *J Endod*,38,614-622.
- YALVAC ME, RAMAZANOGLU M, RIZVANOV AA, SAHIN F, BAYRAK OF, SALLI U, PALOTAS A, KOSE GT. (2010) Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J*,10,105-113.
- YAMAMURA T. (1985) Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res*,64 Spec No,530-540.

- YAMASHITA JC, TANOMARU FILHO M, LEONARDO MR, ROSSI MA, SILVA LA. (2003) Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J*,36,391-394.
- YANG SF, RIVERA EM, BAUMGARDNER KR, WALTON RE, STANFORD C. (1995) Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *J Endod*,21,613-616.
- YANG X, VAN DER KRAAN PM, BIAN Z, FAN M, WALBOOMERS XF, JANSEN JA. (2009) Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J Dent Res*,88,1020-1025.
- YANG X, YANG F, WALBOOMERS XF, BIAN Z, FAN M, JANSEN JA. (2010) The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*,93,247-257.
- YANG X, VAN DER KRAAN PM, VAN DEN DOLDER J, WALBOOMERS XF, BIAN Z, FAN M, JANSEN JA. (2007) STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng*,13,2803-2812.
- YI H, WU LQ, BENTLEY WE, GHODSSI R, RUBLOFF GW, CULVER JN, PAYNE GF. (2005) Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*,6,2881-2894.
- YIP WK. (1974) The prevalence of dens evaginatus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,38,80-87.
- ZHANG W, WALBOOMERS XF, VAN KUPPEVELT TH, DAAMEN WF, VAN DAMME PA, BIAN Z, JANSEN JA. (2008) In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med*,2,117-125.
- ZHAO S, SLOAN AJ, MURRAY PE, LUMLEY PJ, SMITH AJ. (2000) Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J*,32,489-494.

## 6 EKLER

1. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (3 Sayfa)



**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

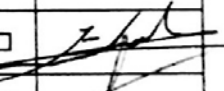

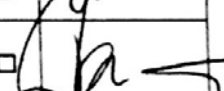
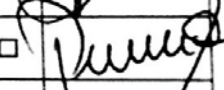
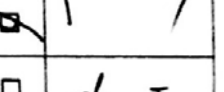
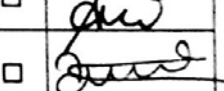
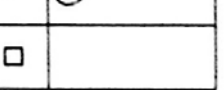

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	<b>ETİK KURULUN ADI</b>	<b>KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>
	<b>AÇIK ADRESİ:</b>	Yenişehir Mahallesi Tahsin Duru Caddesi No:14 YAHŞIHAN / KIRIKKALE
	<b>TELEFON</b>	0 318 333 50 00/5733
	<b>FAKS</b>	0 318 224 07 86
	<b>E-POSTA</b>	ketik@kku.edu.tr

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI</b>	Organotipik Modellere Uygulanan Farklı İrrigasyon Protokollerinin Apikal Papillaya Ait Kök Hücrelerin Canlılığına Etkisi			
	<b>ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU</b>				
	<b>KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI</b>	Prof. Dr. Ali Erdemir			
	<b>KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI</b>	Endodonti			
	<b>KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ</b>	Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi			
	<b>DESTEKLEYİCİ</b>	-			
	<b>DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ</b>	-			
	<b>ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ</b>	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
<b>Diğer ise belirtiniz</b>					
<b>ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER</b>	<b>TEK MERKEZ</b> X	<b>ÇOK MERKEZLİ</b> <input type="checkbox"/>	<b>ULUSAL</b> <input type="checkbox"/>	<b>ULUSLARARASI</b> <input type="checkbox"/>	

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

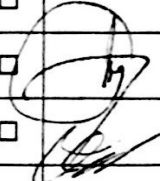
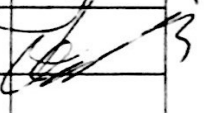
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mayıs 2014		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mayıs 2014		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	Mayıs 2014		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
DİĞER:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BİLGİLERİ	<b>Karar No:</b> 16/05	<b>Tarih:</b> 04.06.2014					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve <b>Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması nın ardından</b> yürütülmesi uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof. Dr. Zühal AKTUNA

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Zühal AKTUNA	Tıbbi Farmakoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Orhan Murat KOÇAK	Psikiatri	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Üçler KISA	Biyokimya	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Didem ALİFENDİOĞLU	Pediyatri	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Pınar ATASOY	Patoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meral SAYGUN	Halk Sağlığı	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Aylin AKBAY OBA	Diş Hekimi	Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇİFTÇİ	Dahiliye	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\*: Toplantıda Bulunma

**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞİMŞEK	Kardiyoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Ali Doğan DURSUN	Fizyoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Serap BİBEROĞLU	Acil Tıp	Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Burhan BİRİNCİ	Serbest Eczacı	Kırıkkale -Merkez	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Gökay GÜL	Hukuk	Kırıkkale	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yakup DOĞAN	Fakülte Sekreteri	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
			E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	



## 7 ÖZGEÇMİŞ

Merve ÖZGÜVEN AKBULUT 18.08.1989 tarihinde Bolu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bolu'da, lise öğrenimini ise Ankara'da tamamladı. 2011 yılında Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden mezun oldu.

Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'nda 2012 yılının Aralık ayında araştırma görevlisi olarak uzmanlık öğrenimine başladı.

