



T.C.

**YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI**

**MTA, DYCAL ve EMDOGAIN' in JERM HALİNDEKİ 20
YAŞ DIŞLERİNDEN ALINMIŞ KÖK HÜCRELER
ÜZERİNDEKİ ÇOĞALTMA ve FARKLILAŞTIRMA
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dt. ESRA PAMUKÇU GÜVEN
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNDÜZ BAYIRLI**

İSTANBUL-2010



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

MTA, DYCAL ve EMDOGAIN' in JERM HALİNDEKİ 20
YAŞ DIŞLERİNDEN ALINMIŞ KÖK HÜCRELER
ÜZERİNDEKİ ÇOĞALTMA ve FARKLILAŞTIRMA
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. ESRA PAMUKÇU GÜVEN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜNDÜZ BAYIRLI

İSTANBUL-2010

I) TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesini sağlayan ve doktora eğitimimin vesilesi olan, tüm eğitimim boyunca bilgisini, tecrübelerini içtenlikle paylaşan ve klinik deneyimlerinin yanı sıra hayata dair tecrübelerinden de her zaman yararlandığım değerli hocam, sayın **Prof. Dr. Gündüz Bayırlı' ya,**

Sonsuz sevgi ve fedakarlığı ile bana destek olan, engin bilgisi, tecrübesi ve fikirleriyle daima yolumu açan, annem **Prof. Dr. Zafer Pamukçu' ya,**

Gerek doktora eğitimim sırasında gerekse tezimin tüm aşamalarında yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim sayın **Doç. Dr. Figen Kaptan' a,**

Eğitimim sırasında desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden sürekli yararlandığım sayın **Doç. Dr. Baybora Kayahan' a,**

Tüm doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteği ile bana güven veren sayın **Doç. Dr. Jale Tanalp, Yrd. Doç. Dr. Hakkı Sunay, Yrd. Doç. Dr. Meriç Karapınar Kazandağ' a,**

Bana her zaman her konuda yardımcı olan sevgili **Toygan Bora ve Tolga Sandıkçı' ya,**

Birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım Endodonti kliniğindeki **tüm çalışma arkadaşlarıma,**

Tezimin gerçekleşmesinde benden yardımlarını esirgemeyen **Mehmet Emir Yalvaç, Burçin Keskin ve kardeşlerim Güray/Arcan Güven ve Emre/Banu Pamukçu' ya,**

Destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili eşim **Koray Güven' e** ve **aileme** verdikleri huzur ve güven duygusu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

II) İÇİNDEKİLER

I) TEŞEKKÜR.....	I
II) İÇİNDEKİLER	II
III) KISALTMALAR ve SİMGELER.....	V
IV) RESİM LİSTESİ	VIII
V) ŞEKİL LİSTESİ	X
VI) TABLO LİSTESİ	XIII
VII) ÖZET	XIV
VIII) İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	XV
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KÖK HÜCRELER.....	2
2.1.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRESİ:	2
2.1.2. YETİŞKİN KÖK HÜCRESİ:	6
2.1.2.1. Yetişkin Kök Hücrelerinin Diş Hekimliği Açısından Değerlendirilmesi 8	
2.1.2.2. Yetişkin Kök Hücrelerinin Pulpa - Dentin Kompleksi Üzerine Etkileri 14	
2.2. REJENERATİF TEDAVİLER ve MİNE MATRİKS PROTEİN TÜREVLERİ 19	
2.2.1 MİNE MATRİKS TÜREVLERİNİN PULPA - DENTİN KOMPLEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ	23
2.3. REJENERATİF TEDAVİLERDE MİNERAL TRİOXİDE AGGREGATE (MTA) ve KALSİYUM HİDROKSİTİN KULLANILMASI	27
2.3.1. MİNERAL TRİOXİDE AGGREGATE (MTA) ve KALSİYUM HİDROKSİTİN PULPA-DENTİN KOMPLEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. JERM HALİNDEKİ İNSAN 20 YAŞ DIŞLERİNDEN ALINAN KÖK HÜCRELERİN KULLANILMASI:.....	38
3.2. ÇOĞALMA DENEYİ;	39
3.2.1. MATERYELLERİN HAZIRLANMASI:	39
3.2.2. HÜCRE EKİMİ:	40
3.2.3. MTS TESTİ:	41
3.3. FARKLILAŞMA DENEYİ;.....	42

3.3.1. ODONTOJENİK BESİYERİNİN HAZIRLANMASI:	42
3.3.2. TEST MATERYELLERİNİN HAZIRLANMASI:.....	42
3.3.3 HÜCRE EKİMİ:	43
3.3.4. GRADİENT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Gradient PCR):	43
3.3.4.1. RNA izolasyon protokolü:	44
3.3.4.2. cDNA sentezinin yapılması	45
3.3.4.3. Ana karışımın hazırlanması:	46
3.3.4.4. Primerlerin hazırlanması:.....	46
3.3.4.5. Jelin hazırlanması:	48
3.3.4.6. Elde edilen cDNA bantlarının görüntülenmesi:.....	48
3.3.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Real Time-PCR):	48
3.3.5.1. Örnek cDNA' lerin sulandırılması:.....	49
3.3.5.2. Reaksiyon karışımının hazırlanması:.....	49
3.3.5.2.1. DSPP için reaksiyon karışımının hazırlanması:.....	49
3.3.5.2.2. GAPDH ve ON için reaksiyon karışımının hazırlanması:	49
3.3.5.3. Hazırlanan karışımın RealTime-PCR cihazında okutulması:	49
3.3.6. MİKROSKOBİK İNCELEME	50
3.3.7. VON KOSSA BOYAMASI:	50
3.3.8. ALKALEN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ:.....	51
3.4. SCANNING ELECTRON MİKROSKOP (SEM) ANALİZİ:	52
3.4.1. MATERYALLERİN HAZIRLANMASI:	52
3.4.1.1. Çoğalma Deneyi;	52
3.4.1.2. Farklılaşma Deneyi;.....	53
3.4.2. ÇOĞALMA VE FARKLILAŞMA DENEYLERİ İÇİN HÜCRE EKİMİ:..	54
3.4.3. SEM – SCANNİNG ELECTRON MİKROSKOBİK İNCELEME:	54
3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. MTS TESTİ SONUCUNDA HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI:.....	57
4.2 GRADİENT PCR SONUÇLARI.....	59
4.3. RealTime-PCR SONUÇLARI	61
4.4. MİKROSKOBİK İNCELEME	64

4.5. VON KOSSA BOYAMASI:	66
4.6. ALP AKTİVİTESİ:.....	68
4.7. SCANNİNG ELEKTRON MİKROSKOP (SEM) GÖRÜNTÜLERİ:.....	69
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇLAR.....	85
7. KAYNAKLAR	87
8. ÖZGEÇMİŞ	119

III) KISALTMALAR ve SİMGELER

MTA:	Mineral Trioxide Aggregate
Ca(OH)₂:	Kalsiyum Hidroksit
EMD:	Mine Matriks Protein Türevleri
MTS:	Metiltetrazoliumbromid
cDNA:	RNA üzerinden sentezlenen kalıp DNA
PCR:	Bir kalıp DNA (cDNA) üzerinden istenilen uzunlukta bir bögenin çoğaltılması işlemi
Gradient PCR:	Primer optimizasyonu için yapılan PCR işlemi
Real Time-PCR:	İlgilenilen gen bölgesi çoğalırken eş zamanlı miktarının izlenebildiği PCR tekniğidir.
DSP:	Dentinsialoprotein
DPP:	Dentinfosfoprotein
DSPP:	Dentinsialofosfoprotein
DMP:	Dentin matriks protein
GAPDH:	Gliseraldehit-3- Fosfat Dehidrogenaz
ON:	Osteonektin
ALP aktivitesi:	Alkalen fosfataz aktivitesi
SEM:	Scanning Elektron Mikroskop
GFAP:	Glial Fibrillary Acid Protein
HTGSCs:	İnsan diş jermi kök hücreleri
PDLSc:	Periodontal ligament kök hücresi
DPSCs:	Diş Pulpası kök hücresi
SHED:	Süt Dişi kök hücresi
SCAP:	Apikal papilla kök hücresi
DFCs:	Diş folikül hücresi
MSCs:	Mezankimal kök hücreler
BMSSCs:	Kemik iliği bağ dokusu kök hücreleri
PDLFs:	Periodontal ligament fibroblastları
AOs:	Kemik hücreleri
GFs:	Dişeti fibroblastları

TGF-β:	Transforming growth faktor beta
BMP:	Bone morphogenetic protein
LAB:	Otojen kemik dokusu
PGA:	Propilen Glikol Aljinat
HERS:	Hertwig epitel kök kını
BSP:	Bone sialoprotein
OC:	Osteokalsin
OP:	Osteopontin
CaCO₃:	Kalsiyum karbonat
PGE:	Prostoglandin
FBS:	Fetal bovine serum
PSF:	Penisilin-Streptomisin-Fungizon
DMEM:	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
EDTA:	Etilen Daimin Tetrasetik Asit
PBS:	Fosfat Tampon Solüsyonu
HKP:	Hücre kültür plağı
DNase:	DNA' yı parçalamaya yarayan enzim
RNase:	RNA' yı parçalamaya yarayan enzim
dNTP:	Deoksiribonükleotid trifosfat
Oligo dT:	RNA yapısında bulunan çoklu Adenin nüleotidine bağlanan Timin nükleotidi
DSPP forward:	Dentinsialofoprotein, cDNA üzerinde bağlanacağı özgül bölgenin başlangıcını gösteren nükleotid dizilimi.
DSPP reverse:	Dentinsialofoprotein cDNA üzerinde bağlanacağı özgül bölgenin bitişini gösteren nükleotid dizilimi.
GoTaq DNA Polimeraz:	Polimeraz zincir reaksiyonunu gerçekleştiren enzim
TAE:	Tris Asetik Asit
TBE:	Tris Borik Asit
mm:	Milimetre
mm²:	Milimetrekare
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre

ml:	Mililitre
ng:	Nanogram
bp:	Baspair
kV:	Kilovolt
rpm:	Round per minute
mM:	Milimolar

IV) RESİM LİSTESİ:

Resim 1: Embriyonik kök hücrelerinin blastosist içindeki şematik görünümü.

Resim 2: Blastosist içinde, içteki hücre kitlesinde bulunan embriyonik kök hücreler.

Resim 3: Diş pulpası kök hücrelerinin çeşitli hücre gruplarına farklılaşması.

Resim 4: Erken kök gelişim evresinde bulunan 20 yaş dışındaki apikal papilla dokusunun görüntüsü.

Resim 5: Kök gelişimi ileri aşamada olan 20 yaş dışından alınmış apikal papillanın görüntüsü.

Resim 6: Kuron gelişimi tamamlanmış, sürmemiş 20 yaş dışının görüntüsü (11-17 yaş).

Resim 7A: Diş pulpası kök hücrelerinin (DPSC), 5. gündeki morfolojik görüntüsü.

Resim 7B: Kemik iliği bağ dokusundan alınan kök hücrelerin (BMSSC), 3. gündeki morfolojik görüntüsü.

Resim 8: Materyallerin kök hücreler üzerindeki proliferatif etkisinin MTT yöntemiyle saptanması amacıyla MTA ve DYCAL' ın hazırlanması görülmektedir.

Resim 9: Emdogain eklendikten sonraki görüntüsü.

Resim 10: Hücre ekimi yapıldıktan sonraki görüntüsü.

Resim 11: MTT-metiltetrazolium boyası eklendikten 2 saat sonraki hücrelerin görüntüsü.

Resim 12: MTA' nın, üretici firma tavsiyesi doğrultusunda hazırlanarak 10 mm yüksekliğinde yerleştirilmesinin görüntüsü.

Resim 13: MTA' nın donmasını takiben, Emdogain' in hazırlanışı.

Resim 14: Hücre ekimi yapıldıktan sonraki görüntüsü.

Resim 15: 14 gün boyunca materyallerle temasta olan ve indüklenen hücrelerin 96 bölmeli plağa alınan parçalanmış proteinlerinin görüntüsü.

Resim 16: Proteinler üzerine ALP belirleme solüsyonu eklendikten 50 dakika sonraki görüntüsü.

Resim 17A: SEM görüntülerinin alınması için MTA ve Dycal' ın hazırlanması.

Resim 17B: Emdogainin hazırlanması

Resim 18: Odontogenesis etkisinin SEM' de görüntülenmesi için materyallerin hazırlanmasının görüntüsü.

Resim 19: Çoğalma deneyinde, SEM görüntüsü almadan önce, materyellerin 10nm kalınlığında altın- palladyum ile kaplanmış haldeki görüntüsü.

Resim 20: Farklılaşma deneyinde, SEM görüntüsü almadan önce, materyellerin 10nm kalınlığındaki altın-palladyum ile kaplandıktan sonraki görüntüsü.

V) ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 1: Embriyonik jerm tabakalarından farklılaşan dokular.

Şekil 2: İnsan kök hücrelerinin alındıkları evreye göre sınıflandırılması.

Şekil 3: Diş jermi kök hücrelerinin test materyelleri ile 48 saat boyunca temasında ortaya çıkan MTS testi (canlılık) sonuçlarının grafiksel gösterimi.

Şekil 4: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde, DSPP' ye ait olan özgül bölgenin 280 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.

Şekil 5: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerindeki GAPDH' e ait olan özgül bölgenin 123 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.

Şekil 6: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde ON' e ait olan özgül bölgenin 576 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.

Şekil 7: Hücrelerden test materyelleri etkisiyle DSPP varlığında sentez edilen DNA miktarının grafiksel gösterimi sunulmaktadır.

Şekil 8: Hücrelerden test materyelleri etkisiyle ON varlığında sentez edilen DNA miktarının grafiksel gösterimi sunulmaktadır.

Şekil 9A: Odontojenik besiyeri içermeyen (-) kontrol grubu hücrelerin, 8. gündeki ipliksi yapısının 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 9B: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, 8. gündeki yuvarlak şekillerinin 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 10A: Odontojenik besiyeri içermeyen (-) kontrol grubu hücrelerin, 8.gündeki ipliksi yapısının 10x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 10B: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, 8. gündeki yuvarlak şekillerinin 10x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 11A: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, 14. günün sonunda 4X büyütmesiyle gözlenen kalsiyum birikimi izlenmektedir.

Şekil 11B: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin 14. günün sonunda 10X büyütmesiyle izlenen poligonal şekilleri (siyah ok) ve kristal oluşumu (beyaz ok).

Şekil 12A: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 12B: Odontojenik besiyeri ve Emdogain içeren hücrelerin 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 13A: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubunda poligonal şekilli hücreler ve kristal oluşumu 20x büyütmeyle izlenmektedir.

Şekil 13B: Odontojenik besiyeri ve Emdogain içeren hücrelerin 20x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 14: Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, 14. günde nodül oluşumunu görmek amacıyla yapılan Von kossa boyama görüntüsü. (4x büyütme)

Şekil 15: Odontojenik besiyeri ve Emdogain içeren hücrelerin Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü. (4x büyütme)

Şekil 16: Odontojenik besiyeri ve Emdogain içeren hücrelerin Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü. (20x büyütme)

Şekil 17: Diş jermi kök hücrelerinin test materyelleri karşısında gösterdikleri ALP aktivite değerlerinin grafiksel gösterimi.

Şekil 18A: Dycal yüzeyinde tutunan diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 18B: Dycal yüzeyinde tutunan diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 19A: Emdogain ile kaplanmış Dycal yüzeyinde diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 19B: Emdogain ile kaplanmış Dycal yüzeyinde diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 20A: Emdogain üzerine tutunan diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 20B: Emdogain üzerine tutunan diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 21A: Diş jermi kök hücrelerinin hücre kültür plağı yüzeyinde 200 büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 21B: Diş jermi kök hücrelerinin hücre kültür plağı yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 22A: Diş jermi kök hücrelerinin MTA yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 22B: Diş jermi kök hücrelerinin MTA yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 23A: Emdogain ile kaplanmış MTA yüzeyindeki diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 23B: Emdogain ile kaplanmış MTA yüzeyindeki diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 24A: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan diş jermi kök hücrelerinin EMD yüzeyinde 500x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 24B: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan diş jermi kök hücrelerinin EMD yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 25A: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin hücre kültür plağı yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 25B: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin hücre kültür plağı yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 26A: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin MTA yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 26B: Odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin MTA yüzeyinde 500x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

Şekil 26C: Odontoblastik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin MTA yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

VI) TABLO LİSTESİ:

Tablo 1: Diş jermi kök hücreleri üzerinde çoğalma etkisi incelenen materyellerin 48 saat sonunda elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri ile HKP (Hücre kültür plağı) değeri baz alınarak hesaplanan bütün grupların normalizasyon değerleri görülmektedir.

Tablo 2: İncelendiğinde diş jermi kök hücreleri üzerinde çoğalma etkisi incelenen materyellerin, birbiriyle anlamlılık değerlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 3: İncelendiğinde 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile uyarılarak farklılaşan diş jermi kök hücrelerinden, materyellerin etkisiyle DSPP varlığında sentezlenen DNA miktarının ortalama, standart sapma ve GAPDH ortalama değeri baz alınarak hesaplanan normalizasyon değerleri görülmektedir.

Tablo 4: İncelendiğinde kullanılan materyellerin, DSPP varlığında hücre DNA'larının çoğalmasına olan etkilerinin, anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırması görülmektedir.

Tablo 5: 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile indüklenen diş jermi kök hücrelerinin materyeller etkisiyle ON varlığında gösterdikleri DNA sentezinin ortalama, standart sapma ve GAPDH baz alınarak hesaplanan normalizasyon değerleri görülmektedir.

Tablo 6: İncelendiğinde kullanılan materyellerin, ON varlığında hücre DNA'larının çoğalmasına olan etkilerinin, anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırması görülmektedir.

Tablo 7: İncelendiğinde diş jermi kök hücrelerinin 14. günün sonunda materyeller etkisiyle gösterdikleri ALP aktivite ortalama ve standart sapma değerleri görülmektedir.

Tablo 8: İncelendiğinde diş jermi kök hücrelerinin 14. günün sonunda test materyelleri etkisiyle gösterdikleri ALP aktivite değerlerinin anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırılması görülmektedir.

VII) ÖZET

Açığa çıkmış pulpa dokusunun örtülmesi için kullanılan materyellerin, pulpa dokusu ile uyumlu olması, hücrelerin çoğalma ve odontoblastik değişimlerini desteklemesi, tedavi başarı sonucuna direkt etki eden faktörlerdir. Pulpa kuafajı için Mineral Trioxide Aggregate (MTA) ve Kalsiyum hidroksit içerikli siman (DYCAL) yıllardır kullanılmaktadır. Ancak bu materyellerin, pulpa hücrelerinin farklılaşmasını olumsuz etkilemesi ve nekrozuna sebep olması gibi kusurları bulunmaktadır. Öte yandan domuz embriyosundan elde edilen mine matriks proteinlerinin asidik ekstresi olan EMD'nin pulpa ve periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırdığı bilinmektedir. Yakın zaman çalışmalarında MTA' nın EMD ile birlikte kullanımı, diş pulpası hücrelerinin odontoblastik farklılaşmasını, tek başına kullanımına göre daha etkili biçimde uyardığını göstermiştir (158). Klinik kullanım sırasında kuafaj materyellerinin pulpa hücreleriyle direkt temasta bulunması, in vitro çalışmalarda hücre-materyel etkileşiminin göz önünde tutulmasını zorunlu kılmaktadır. O yüzden, bu çalışmada EMD, MTA ve DYCAL' ın insan diş jermi kök hücreleri (HTGSCs) üzerindeki odontoblastik farklılaşması materyel-hücre direk teması dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda MTA ve DYCAL yüzeylerinin EMD ile kaplanması halinde hücreler üzerinde çoğalma ve farklılaşma açısından ortaya çıkabilecek etkisi incelenmek istenmiştir. EMD kaplama protokolünün MTA' nın fiziksel özelliklerini değiştirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle, EMD ile kaplanmış MTA'nın hücre çoğalması ve farklılaşmasına olan etkisi değerlendirilememiştir. Sonuçlar EMD' nin hücrelerin farklılaşma ve çoğalmasını en iyi sağlayan materyel olduğunu bunun yanı sıra DYCAL' ın EMD ile kaplanmasının tek başına kullanımında sebep olduğu hücre nekrozunu ortadan kaldırayabileceğini göstermiştir. DYCAL' ın EMD ile kaplanarak pulpa kuafajında kullanılması pulpanın DYCAL ile tek başına örtülmesi sırasında ortaya çıkan sorunları ekarte ederek alternatif bir yöntem oluşturabilir.

VIII İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)

Effect of DYCAL, MTA and EMD on Proliferation and Differentiation of Human Tooth Germ Stem Cells

Biocompatibility of pulp capping materials is of very significance in order to accomplish a successful treatment meaning they have to be nontoxic, permissive to proliferation and inductive for odontogenic differentiation of pulp cells. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide-containing cement (DYCAL) are being used as pulp capping materials for many years but there are still some imperfections in use of these materials as they cause necrosis or inhibition of differentiation of pulp cells. On the other hand, an acid extract of porcine enamel matrix protein (EMD) has been shown to increase proliferation and differentiation of various dental cells including dental pulp and periodontal ligament cells. Recent studies demonstrated that the use MTA combined with EMD might be much more effective in inducing odontogenic differentiation of dental pulps cells compared to the use of MTA only. In clinical use, pulp capping materials are in direct contact with dental pulp cells is a phenomenon that must be considered when the cell and material interaction is investigated. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of EMD, MTA and DYCAL on odontogenic differentiation of human tooth germ stem cells (HTGSCs) directly cultured on the materials. It also tried to show if EMD coated MTA and DYCAL surfaces give rise to better proliferation and differentiation of cells. As our EMD coating protocol changed physical properties of MTA we were not able to assess efficiency of the EMD coated MTA on cell proliferation and differentiation. The results showed that EMD is the best among the tested materials in terms of inducing differentiation and proliferation on the other hand DYCAL coated with EMD might be an alternative method to prevent cell necrosis in use of DYCAL alone.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bugüne dek yapılan araştırmalarda EMD' nin, tek başına odontoblast hücre farklılaşması, proliferasyonu ve kök yüzeyinde periodontal doku rejenerasyonu sağladığı gösterilmiştir. Diş pulpası ve periodontal ligament kök hücrelerinin EMD ile biyouyumlu olduğu anlaşılmıştır. Ancak jel formunda bulunması, klinik kullanımda açığa çıkmış pulpa dokusu üzerine uygulanmasını ve uygulama sonrasındaki izolasyonu zorlaştırmaktadır. Bu durumu ortadan kaldırabilmek ve ileride pulpa dokusunun önce biyolojik materyel olan EMD ardından da DYCAL ve MTA gibi sertleşerek bariyer oluşturabilen materyellerle kaplanması halinde oluşabilecek sonuçları görmek için bu çalışma *in vitro* olarak planlandı. Yapılan çalışmalarda, diş jermi kök hücrelerinin rejeneratif etkisinin anlaşılması nedeniyle insan 20 yaş diş jermilerinden alınan kök hücreler kullanıldı. Literatürde oldukça az sayıda bulunan diş jermi kök hücre çalışmalarının EMD, MTA ve DYCAL ile desteklenmesi amaçlandı. EMD' nin DYCAL ve MTA ile kaplanması durumunda hücre ve materyel yüzeyinde gelişebilecek durumların tespit edilmesi amacıyla SEM incelemesi yapıldı. Hücre proliferasyonu ve canlılığının anlaşılması için MTS boyama testi kullanıldı. Pulpa kuafajı sırasında ortamda bulunan hücrelerin odontoblast hücrelerine farklılaşarak rejenerasyon sağladığı esasına dayanarak insan diş jermi kök hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler, bütün çok hücreli organizmalarda bulunan ve doku rejenerasyonunun sağlanmasında önemli rolü olan özel yapılardır. En temel özellikleri; kendilerini yenileyebilme ve özelleşmiş hücrelere farklılaşırken bile kök hücre yapısını sürdürebilmeleridir (1,2). Kök hücreler, buldukları evrelere göre, farklı potansiyel özellikleri gösterirler:

- ***Totipotent kök hücreler***, yumurta ve sperm hücresinin kaynaşmasıyla ortaya çıkar. Döllenen yumurta hücresinin ilk birkaç bölünmesiyle oluşan hücreler de bu gruba dâhildir. Embriyonik hücre tiplerine dönüşebilirler. Yeni bir organizma meydana getirme gücüne sahiptirler.
- ***Pluripotent kök hücreler***, totipotent hücrelerin devamı şeklindedir. Bölünme sayısının artmasıyla oluşurlar. Mezodermal, ektodermal ve endodermal jerm tabakalarından türeyen bütün hücre tiplerine farklılaşabilirler.
- ***Multipotent kök hücreler***, sadece alındıkları doku tipiyle ilişkili olan belli sayıda hücrelere dönüşebilirler.
- ***Oligopotent kök hücreler***, lenfoid ve myeloid kök hücreler gibi az sayıda hücre grubuna dönüşebilirler.
- ***Unipotent kök hücreler***, sadece tek hücre tipini - kendilerini oluşturabilirler. Ancak kendi kendini yenileyebilme yapısı ile kök hücre özelliğini korurlar.

Kök hücreler, iki temel gruba ayrılır (3,4,5,6):

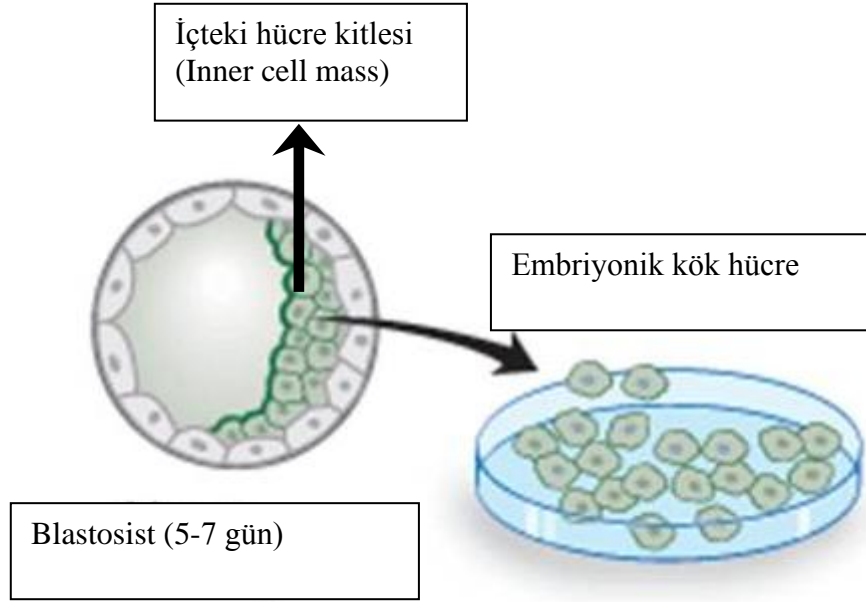
2.1.1. Embriyonik kök hücresi

2.1.2. Yetişkin kök hücresi

2.1.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRESİ:

Embriyonik kök hücrelerle ilgili çalışmalar, sadece laboratuvar ortamında hazırlanan döllenmiş yumurta hücresi (zigot) üzerinde yapılır; anne rahminde yapılan bir işlem değildir. Elde edilen zigotun büyümesiyle oluşan yapıya, embriyo adı verilir.

Embriyolar, iki hücreli aşamadan, embriyonun 5-7 günlük hali olan çok hücreli blastosist evresine kadar çoğalırlar. Embriyonik kök hücreler, bu oluşumun blastosist aşamasında, içteki hücre kitlesinde (inner cell mass) yer alırlar (Resim 1,2) (7, 8).



Resim 1: Embriyonik kök hücrelerinin blastosist içindeki şematik görünümü.



Resim 2: Blastosist içinde, içteki hücre kitlesinde yer alan embriyonik kök hücreler.

Pluripotent özellikte olan embriyonik kök hücreler, mezodermal, ektodermal ve endodermal olmak üzere üç farklı jerm tabakaya dönüşebilirler (Şekil 1) (8).

Embriyonik kök hücrelerin kullanıldığı hayvan çalışması, ilk defa 1981 yılında yapılmasına rağmen, insan embriyonik kök hücrelerinin tespiti, 1998 yılına rastlamaktadır (7). Bu gecikmenin, türlere ait farklılıktan ve insan hücre besiyerlerinin laboratuvar ortamında sağlanmasındaki güçlükten kaynaklandığı düşünülmektedir.

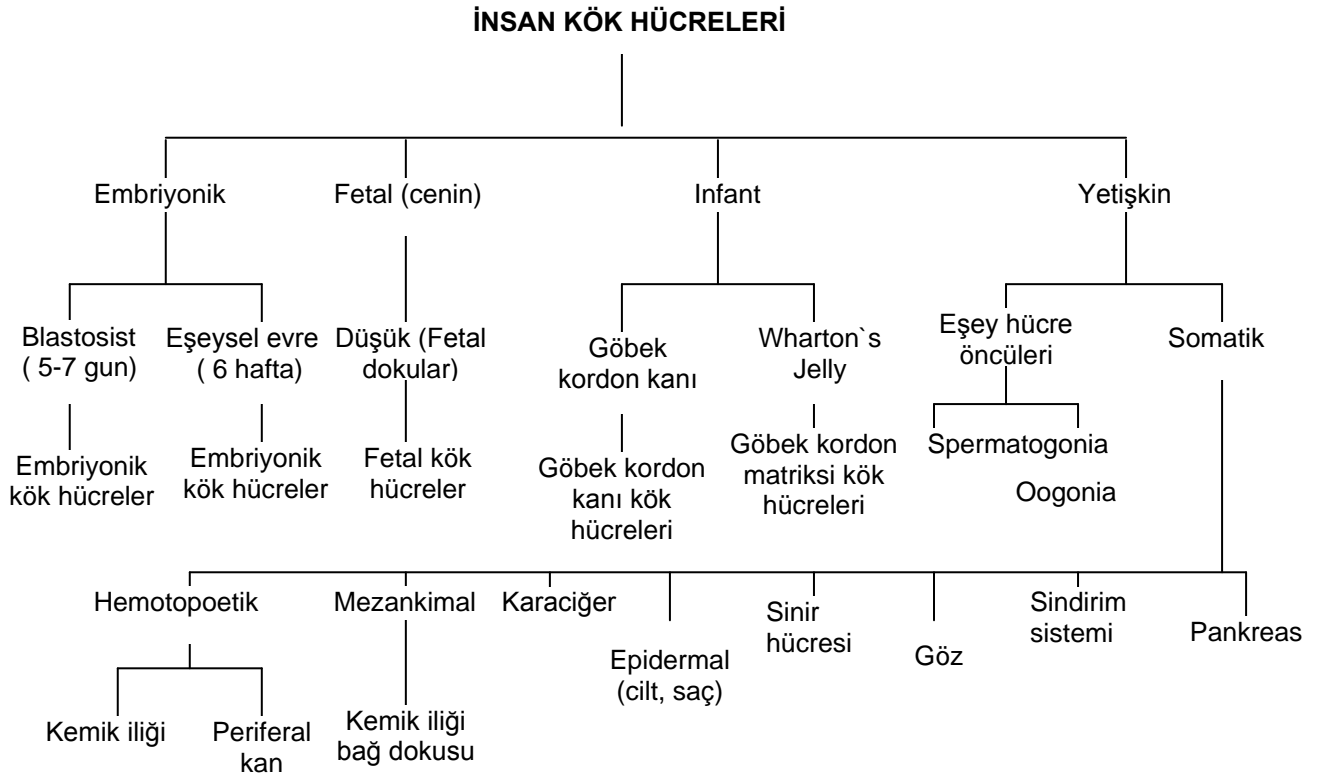
Embriyonik jerm tabakası	Farklılaştığı dokular
Endoderm	Tiroid, paratiroid bezleri Larinks, Soluk borusu, akciğerler İdrar torbası, idrar yolu, vajina Gastrointestinal organlar, pankreas, karaciğer Barsak ve solunum sistemi epitelyumu
Mezoderm	Kemik iliği (kan) Adrenal korteks Bağ dokusu (kemik, kırıldak) Lenfatik dokular İskelet, kalp ve düz kaslar Üreme sistemi (yumurta ve sperm hücresi) Kalp ve kan damarları Diş pulpası Dentin
Ektoderm	Cilt epiteli Sinir dokusu Adrenal medulla, hipofiz bezi Göz (retina), Kulak dokusu Diş minesini

Şekil 1: Embriyonik jerm tabakalarından farklılaşan dokular.

Mezoderm tabakasından, temel olarak hemanjioblast, kalp öncü hücreleri ve mezankimal kök hücreler oluşmaktadır. Mezankimal kök hücrelerin tespiti, özel yüzey antijenleri (CD73, CD90, CD105, CD166, Stro-1) sayesinde yapılır. Kemik iliği, kas,

kıkırdak, yağ hücresi ve diş pulpası kök hücreleri, mezankimal yüzey antijenini taşımaktadır (1,6,9).

Hemanjioblastik kök hücreler, kalbi ve kan damarlarını saran zarı oluşturan - epiblastik hücreler ile vücutta bulunan kanın, bütün şekilli elemanlarının yapımını sağlayan - hematopoetik kök hücrelerden oluşur. Kordon kanı, kemik iliği, ve periferel kandan alınan hücreler; hemotopoetik kök hücre grubunu oluşturur (Şekil 2) (10). Göbek kordon kanından alınan kök hücreler, özellikle, kanser nedeniyle kemoterapi gören hastalarda veya kan hastalığı nedeniyle kemik iliği tahrip olmuş kişilerde kullanılır (11).



Şekil 2: İnsan kök hücrelerinin alındıkları evreye göre sınıflandırılması.

Yapılmakta olan çalışmalarda, kök hücrelerle doku rejenerasyonunun yeniden sağlanabilir olması, günümüzde, kök hücre biyolojisini çok önemli kılmaktadır. Ancak embriyonik kök hücrelerle ilgili araştırmalarda, blastosistlerin kullanılmasından

kaynaklanan bazı etik problemler vardır (12). Bu durum, klinik ve laboratuvar çalışmaları için yetişkin kök hücrelerini daha uygun hale getirmektedir (4).

2.1.2.YETİŞKİN KÖK HÜCRESİ:

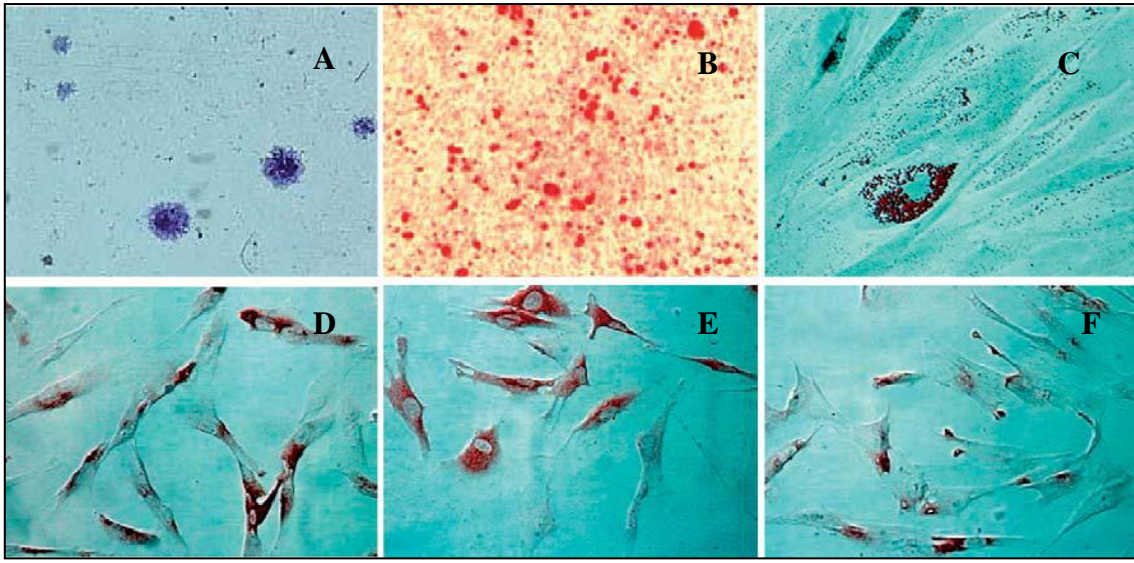
Doğum sonrası dönemde izole edilen yetişkin kök hücreleri, embriyonik hücrelerin vücuttaki bütün hücre tiplerine dönüşebilme yeteneklerinden farklıdır. Bunlar, multipotent özellikte olup, sadece buldukları doku ve/veya organın tamirini ve devamlılığını sağlarlar. Bir organ veya dokuda farklılaşmış hücrelerin arasında farklılaşmamış olarak bulunurlar. Doğum sonrası dönemde izole edilen yetişkin kök hücreleri, günümüze kadar, aşağıdaki dokulardan alınmıştır:

- ❖ Kemik iliği (1, 3, 13, 14, 15, 16, 17),
- ❖ Kordon kanı ve periferel kandan – Hemotopoetik kök hücre (18, 19)
- ❖ Sinir dokusu (20, 21, 22, 23, 24, 25),
- ❖ Retina (26, 27, 28, 29)
- ❖ Yenidoğan diş epitel (30, 31)
- ❖ Periodontal ligament (6, 32) ve
- ❖ Diş pulpası (1, 14)

İlk defa insan diş pulpasından alınan hücrelerle çalışmak için uygun kültür şartlarının oluşturulması 1980' li yıllara rastlamaktadır. O dönemde yapılan çalışmalarda, pulpa hücreleri, fibroblast benzeri hücre olarak nitelendiriliyordu (33). Gronthos ve ark.' larının (1), diş pulpasından aldıkları hücreleri, " *Diş Pulpası Kök Hücresi* " olarak adlandırmasıyla, ilk kez kök hücre ifadesi kullanılmaya başlanmıştır. Gronthos (1), bu hücreleri, fibroblast benzeri yapıda, eşeysiz çoğalabilen ve farklılaşarak doku rejenerasyonu sağlayan hücreler olarak tanımlamaktadır. Bu nitelikteki hücreler, damardan zengin bölgelerde bulunmaktadır (9). 1960' larda, gelişmekte olan pulpa dokusunda glikojen depozitlerinin izlenmesi, daha o yıllarda farklılaşmamış mezankim hücrelerinin keşfini sağlamıştır. Araştırmacıya göre, fibroblastlar ve odontoblastlar gibi tamamen farklılaşmış pulpa hücreleri, glikojen depolarını dönüşüm sırasında tükettikleri için, bunun izine olgun dönemde rastlanmamaktadır (34). Daha sonraki dönemde yapılan çalışmalarla, eskiden diferansiye olmamış mezankim

hücreleri olarak adlandırılan diş pulpası kök hücrelerinin, odontoblast ve osteoblast benzeri hücreye dönüştüğü gösterilmiştir (35).

Bunu takiben, Zhang ve ark, (36), olgun diş pulpasından aldıkları hücrelerin, dondurulmuş olsalar dahi nöron, odontoblast, yağ, kas ve kıkırdak hücresi gibi beş farklı hücre tipine dönüşebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın devamında, diş pulpası kök hücrelerinin in vivo olarak, odontojenik, miyojenik (kas hücresi) ve adipojenik (yağ hücresi) farklılaşmaları da bildirilmiştir (37) (Resim 3).



Resim 3: Diş pulpası kök hücrelerinin çeşitli hücre gruplarına farklılaşması (38).

A: Diş pulpasından izole edilen kök hücrelerinin, normal besiyerinde 10 gün bekletildikten sonra oluşan *tek-koloni kümeciklerinin* görüntüsü.

B: L - ascorbate 2 - phosphate, deksametazon ve inorganik fosfat ile 4 hafta kültüre edilen hücrelerin, alizarin red boyamasıyla *mineralize nodül oluşumunu* göstermesi.

C: 5 hafta boyunca uygun besiyeri (0.5mMisobutylmethylxanthine, 0.5_Mhydrocortisone, ve 60_Mindomethacin) ile indüklenen hücrelerin *yağ kümecikleri* oluşturması.

D: *Nestin* (sinir öncü hücrelerinin erken dönemde tanınmasını sağlayan protein) sentezi

E: *GFAP* (glial fibrillary acid protein) – sinir hücresi olduğunun anlaşılmasını sağlayan protein sentezi.

F: Olgun *nöron uzantıları*.

2.1.2.1. Yetişkin Kök Hücrelerinin Diş Hekimliği Açısından Değerlendirilmesi

Günümüze kadar, insan dişlerinden; buldukları yere ve gelişim evresine göre çeşitli mezankimal kök hücre izolasyonları sağlanmıştır. Bunları lokalizasyonuna göre, iki sınıfa ayırabiliriz:

1. Periodontal ligamentten alınan kök hücreler – *Periodontal ligament stem cells (PDLSC)*: (6, 32, 39, 40, 41, 42, 43, 44)

2. Diş pulpasından elde edilen kök hücreler :

Diş pulpası kök hücreleri alındığı dişin, içinde bulunduğu gelişim evresine göre 3 ayrı grupta incelenmiştir:

2.1. Süt dişlerinden alınan kök hücreler – *Stem cells from deciduous teeth (SHED)* (5)

2.2. Gelişimini tamamlamış daimi dişlerden alınan *Yetişkin kök hücreleri(DPSCs)* (1, 3, 14, 45, 46)

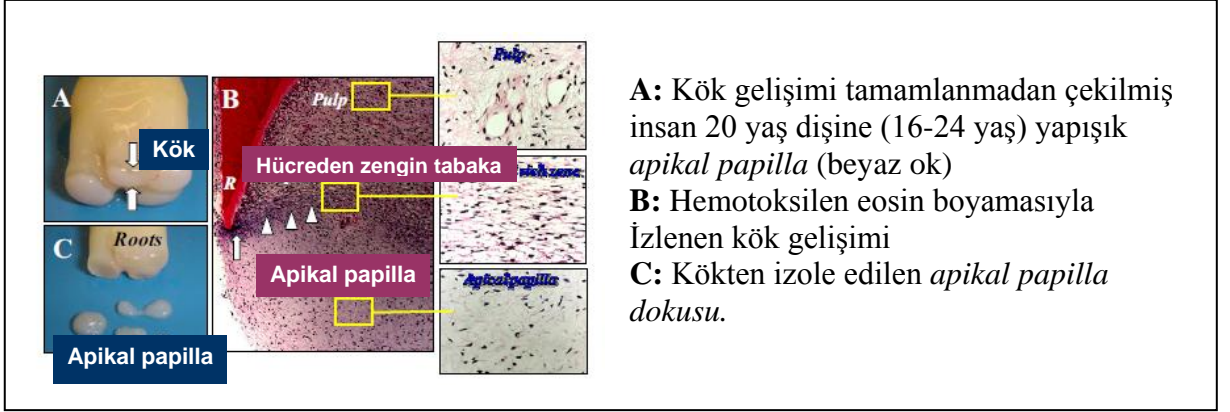
2.3. Gelişimi devam etmekte olan daimi dişlerden alınan kök hücreler;

2.3.1. Apikal papilladan elde edilen kök hücreler – *Stem cells from apical papilla (SCAP)* (Resim 4,5) (47)

2.3.2. Diş folikülünden alınan kök hücreler – *Dental follicle cells (DFCs)* (Resim 6) (48, 49, 50, 51, 52)

2.3.3. Diş jerminden alınan kök hücreler – *Tooth germ stem cells (TGSCs)*, (53, 54).

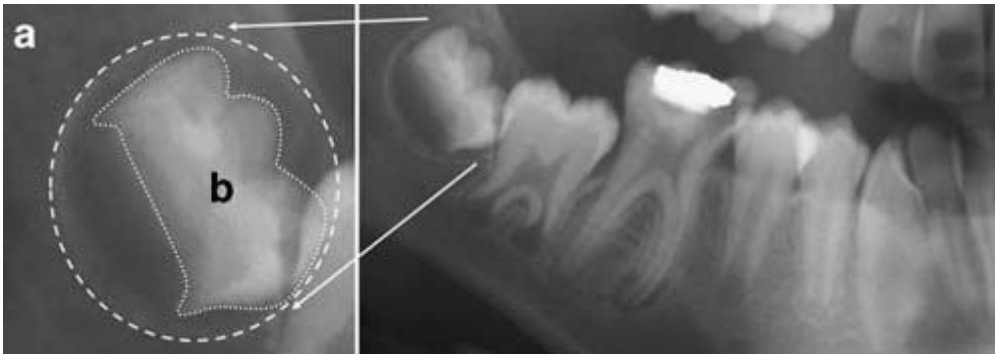
olarak sınıflandırılabiliriz.



Resim 4: Erken kök gelişim evresinde bulunan 20 yaş dişindeki apikal papilla dokusunun görüntüsü (47).



Resim 5: Kök gelişimi ileri aşamada olan 20 yaş dişinden alınmış apikal papillanın görüntüsü (2).

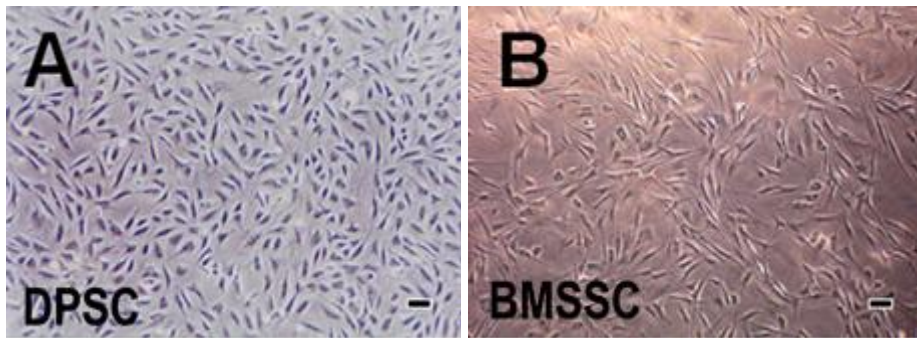


Resim 6: Kuron gelişimi tamamlanmış, sürmemiş 20 yaş dişinin görüntüsü (11-17 yaş).
(a) Bütün diş jermi (Kesik çizgi içerisinde kalan saha).
(b) Dental mezankim içeren, etrafı diş folikülü ile çevrili kuron kısmı (nokta nokta ile belirtilen alan) (54).

Kemik iliği, mezankimal kök hücre – “ *Mesanchymal stem cells* ” (MSCs) sınıfının ana kaynağını oluşturmaktadır. Ancak kemik iliği ile ilişkili hastalıklar ve bu dokunun izolasyonu sırasında ve sonrasında yaşanan güçlükler, araştırmacıları yeni bir kaynak arayışına sevk etmiştir. Bu nedenle, izolasyonu ve bulunması daha kolay olduğu düşünülen diş kökenli hücreler, sürekli olarak kemik iliğinden alınan hücrelerle kıyaslanmaktadır (1, 3, 14, 15, 16, 17, 55, 56)

Aynı embriyonel jerm tabakasından oluşmasına rağmen, hücreler, alındıkları dokuya göre farklı özellikler göstermektedir (Resim 7A, B). Yapılan çalışmalarda, insan diş pulpasından alınan yetişkin kök hücreler (DPSCs), kemik iliği bağ dokusundan – “ *Bone marrow stromal stem cells* ” (BMSSCs) alınanlara göre çoğalmaya daha meyilli bulunmuştur (1).

Mezankimal kökenli bu iki hücre grubunun (DPSCs- BMSSCs) kullanıldığı başka çalışmalar da vardır (1, 3, 14, 15, 16, 17). Bu araştırmalarda, yetişkin kök hücreleri, odontoblastlara farklılaşarak, dentin kanalları ile karakterize mineralize matriks ve damarlardan oluşan fibröz bir doku meydana getirmiştir. Oluşan dokunun birbirinden çok farklı olmadığı düşünülmektedir. Ancak, Yu ve ark, (2007), farklı bir yöntemle uyardıkları hücreleri, oluşturdukları dentin- pulpa kompleksi açısından değerlendirerek, diş pulpası kök hücrelerinin odontogenesis için, kemik iliği bağ dokusundan alınan hücrelere göre daha uygun olduğunu ortaya koymuşlardır (57).



Resim 7: A. Diş pulpası kök hücrelerinin (DPSC), 5. gündeki morfolojik görüntüsü. **B.** Kemik iliği bağ dokusundan alınan kök hücrelerin (BMSSC), 3. gündeki morfolojik görüntüsü (57).

Morsczeck ve ark. (56), diş folikülü öncü hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada, meydana gelen kalsifiye dokunun, kemik iliği bağ dokusu hücrelerinin oluşturduğu yapıyla benzerlik gösterdiğini ancak, diş folikül hücrelerinin kemik hücresine farklılaşmasının yetersiz olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhou ve ark. (32), kemik iliği bağ dokusu kök hücrelerinin (BMSCs) sahip olduğu bazı proteinlerin, periodonsiyumdan alınan periodontal ligament fibroblastları, kemik hücreleri ve dişeti fibroblastlarında da, bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Gelişimini tamamlamış ve sürmüş dişlerden alınan kök hücrelerin, yüksek oranda çoğalma, farklılaşma ve yapılandırma potansiyeli göstermesi, gelişim evresinin başlangıcında olan dişlerin kök hücre özelliklerini akla getirmektedir. Araştırmalar incelendiğinde, dental mezankimal kök hücrelerin, insan süt dişleri (5) gibi sürmüş ancak gelişimini tamamlamamış daimi dişlerden (47) de elde edildiğini görmekteyiz. Oluşum evresi açısından değerlendirildiğinde, gelişimini tamamlamamış, kök ucu açık, pulpası enfekte dişlerin apexogenesisle iyileşmesi, apikal kısımda mezankimal kök hücrelerin varlığını belirtmektedir (47, 58). Hatta rejeneratif tedaviler kapsamında üçlü antibiyotik (Metranidazole, minosiklin, siprofloksasin) desteğiyle, bu hücrelerin, canlılığını yitirmiş kök ucu açık daimi dişlerin kök kanal boşluğunda, yeni canlı bir doku oluşumunu sağladığı belirtilmektedir (59). Kuruunu tamamlanmış ancak henüz sürmemiş, jerm halindeki dişlerden alınan kök hücreler, gelişimi daha ileri evrede olan dişlerden elde edilen hücrelere göre, çoğalmaya daha meyilli bulunmuştur (53). Kök gelişimi tamamlanmamış dişlerden alınan hücrelerin, kollateral dolaşıma sahip olması, (2, 58) ve kök hücrelerin dolaşımdan zengin bölgelerde daha fazla bulunması (9) apeksi açık diş kök hücrelerinin rejenerasyona yatkınlığını açıklamaktadır.

Diş jerminin merkezinde yer alan diş pulpası ve etrafını saran folikülün hücre karakterlerinin karşılaştırmalı yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak postnatal sekiz günlük fareden alınmış diş folikülleri (60) ile insan 20 yaş diş foliküllerinden (48, 49) elde edilmiş hücrelerin izolasyonu ve farklılaşmasına dair çalışmalar vardır. Erken evredeki diş pulpası kök hücrelerinin (hDPSCs) detaylı karakterleri ise Takeda ve ark. (53), tarafından tanımlanarak, " *Kron gelişimi tamamlanmış diş jerminden alınan diş pulpası kök hücreleri (hDPSCs)* " olarak ifade edilmiştir. Ancak daha önceden de

değınildiği gibi, bu çalışmada kullanılan hücrelerin diş jermının neresinden alındığı tam olarak belirtilmemektedir.Yalvac ve ark. (54), ise aynı hücre grubunu, " *Diş jermi kök hücreleri- (TGSCs)* " olarak isimlendirmektedirler.

Morsczeck ve ark (2009) (56), steroid hormonunun glikokortikoid sınıfının bir yesi olan deksametazonun, diş folikülü kök hücrelerinin kemik hücresine farklılaşmasını başlattığını hatta, insülinin de deksametazon kadar olmasa bile bu değişimi sağladığını ortaya koymuşlardır.

Yalvac ve ark. (2009) (54), insan diş jermi kök hücrelerinin (hTGSCs), matrijel üzerinde, tp-benzeri doku oluşturmasını, damarlanmaya örnek olabileceğini düşünerek kemik iliği kök hücreleri ile (61), kıyaslanabilir bulmuşlardır.

Diş Hekimliği açısından bakıldığında, diş kök hücreleriyle ilgili yapılan çalışmalardaki esasın, dişlerin rejenerasyonu olduğunu görmekteyiz. Kemirgenlerde hücre temelli çalışmaların gelecek vaadetmesi insanlar için umut kaynağı olmuştur. (62, 63, 64, 65). Gronthos, (1, 3) ve Seo (6), farelere enjekte ettikleri hücrelerden, diş yapısıyla karakterize fibröz doku oluşumunu göstermişlerdir. Üstelik insan dişinden alınan pulpa ve periodontal ligament gibi iki farklı dokuda bu durumun sağlanması, kök hücre kaynaklarının oluşturulması açısından çok daha avantajlıdır.

Periodonsiyum, sement, periodontal ligament, alveol kemiği ve dişetini kapsamaktadır. Periodontal ligament fibroblastları (PDLFs), kemik hücreleri (AOs) ve dişeti fibroblastları (GFs) aynı mezankimal kök hücre (MSCs) yüzey antijenlerini içermektedir. Taşıdıkları yüzey antijenleri açısından kemik iliği kök hücreleriyle de, benzerlik göstermektedir (32). Periodontal doku rejenerasyonunda, diş folikülü, sement ve periodontal ligament hücrelerinin rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (66, 67, 68). Lin ve ark. (39), periodontal rejenerasyonda mezakimal yüzey antijenine sahip kök hücrelerin varlığını göstermişlerdir. Sodek J. ve ark. (40), periodonsiyum hücrelerinin, ektomezankimal yapıda hücre öncülerinden tredikten sonra, farklı gidiş yoluyla değiştiklerini ve kökenlerinden ayrı hareket ettiklerini düşünmüşlerdir. Bu düşüncenin aksine, Zhou ve ark. (32), periyodonsiyumdan aldıkları hücrelerin, mezankimal yapıdan tredikten sonra, periodonsiyumun ilgili bölgesine g ettiklerini belirtmektedirler.

Dişten alınan kök hücrelerin, uygun bir şekilde izole edilip kullanılabilmesi için oluşum süreci iyi bilinmelidir.

Diş gelişimi, omurganın gelişimi sırasında, sinir dokusunun kıvrımlarından köken alan geçici bir embriyonik doku olan nöral crest' ten gelen ağız epiteli ve ektomezankim hücrelerin birbirlerini indüklemesiyle oluşur (69, 70). Dişin gelişimi sırasında, ektomezankimal yapının dental lamina tarafından uyarılmasıyla dental papilla oluşmaktadır. Ağız epitelinden kaynaklanan ameloblastlar mine tabakasını oluştururken, diş papillasından gelen odontoblastlar da dentini meydana getirmektedir. Apikal foramenlerden gelen damar ve sinir ağı ile beslenen fibröz pulpa dokusu, dental papilladan kaynaklanır. Diş yapısı, ektomezankim kökenli dental folikülden türemiş olan, periodontal ligament tabakasıyla kemiğe tutunmaktadır (42).

Diş folikülü, sürmemiş diş jermi çevreleyen ektomezankim yapıda, zayıf bağlantı dokusudur. Dişin sürmesi için gereklidir (71, 72), dişin ağız içine yükselmesini takiben, yerini periodontal ligamente bırakır. Yapılan araştırmalar, diş folikülünün sementoblast, osteoblast ve periodontal ligament öncü hücrelerini içerdiğini göstermektedir (50, 56). Dişler, iki ayrı embriyonal tabakadan meydana gelmektedir. Pulpa dokusu mezankim, periodontal ligament ise ektomezankim kökenlidir. Farges ve ark. (73), ilk defa ultrastrüktürel hücre yapısını ortaya koyarak epitelyal-mezankimal hücrelerin farkını belirlemişlerdir. Bu karakterizasyonun oluşturulması, yapılan çalışmaların kliniğe uyarlanmasını sağlamaktadır.

Ancak günümüzde yapılan çalışmalar, diş pulpası kök hücreleri (DPSCs), süt dişleri kök hücreleri (SHED), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs) (42), kemik hücreleri ve dişeti fibroblastlarının (32) aynı embriyonik jerm yaprağından geliştiğini göstermektedir. Buna rağmen farklı yapılar oluşturmaktadırlar. Araştırmacılar, bu durumun, mezankimal kök hücrelerin, kemik kaynaklı proteinleri değiştirip kullanarak farklılaştıklarını, böylece periodontal doku oluşturabildiğini (74), bunun yanısıra doğrudan hücre özgülüğü ile de ilgili olabileceğini düşünmektedirler (75). Ayrıca, süt dişi pulpasında bulunan epitel kök hücrelerin varlığını, dişin tamir ve rejenerasyonunda gerekli olan epitelyal komponent olarak belirtmektedirler (76).

Değişik hücre gruplarının kıyaslandığı bir çalışmada, odontoblast farklılaşması, sadece mezankim kökenli olan hücreler tarafından gerçekleştirilmiştir (75). Apikal papilla dokusu da, mezankimal yapıda kök hücreleri (MSCs) içermektedir. Ve yazara göre, bunlar primer odontoblastların kaynağını oluşturarak kök dentininin yapımında görev almaktadırlar (47). Meydana gelen dokuların farklı olmasını araştırmacılar, dentin, sement ve kemik oluşumu için gereken moleküler düzenleyicilerin aynı olmasına rağmen hücre gruplarına özel proteinlerin (genlerin) ve büyüme faktörlerini harekete geçiren transkriptör faktörlerinin (moleküler sinyallerin) farklı olmasına bağlamaktadırlar (42, 56).

2.1.2.2. Yetişkin Kök Hücrelerinin Pulpa - Dentin Kompleksi Üzerine Etkileri

Rejeneratif endodonti, hasara uğramış dentin-kök yapısının ve pulpa-dentin kompleksinin, tamirinin biyolojik temelli çalışmalarla sağlanmasıdır. Bu yenilenmenin laboratuvar ortamında sağlanabilmesi için, diş yapısı ve gelişim süreçlerinin anlaşılır olması önemlidir.

Odontogenesis, ameloblast ve odontoblast hücrelerinin farklılaşmasıyla sonuçlanan, epitelyal-mezankimal doku etkileşimidir. Ameloblast, mine matriksi, odontoblast ise dentin matriksinin yapımından sorumludur (73). Odontoblast uzantıları ve mineralize alanlarla karakterize epitelyal - mezankimal nodüllerin oluşumu, dentin yapısını ortaya çıkarır. Bu hücreler, dentin matriksinin organik bileşenlerinin (protein, yağ ve karbonhidrat molekülleri) sentezi ve salgılanmasıyla in vitro ortamda odontojenik dokunun yeniden organize olmasını sağlar. Kollagen yapıdaki dentin matriksinin oluşmasından sonra, Dentinsialoprotein - (DSP) ve Dentinfosfoprotein - (DPP) sentezlenmesiyle gelişen olaylar zincirine dentinogenesis denir (77). Protein yapısının büyük çoğunluğunu, kollagen yapı oluştururken kollagen olmayan kısmı; proteoglikan, glikoprotein, glikozaminoglikan, osteonektin, osteopontin, dentin matriks protein (DMP1), dentin sialoprotein (DSP) ve dentin fosfoprotein (DPP) oluşturmaktadır (78). İn vitro çalışmalarda, bir hücrenin odontoblast hücresi olduğunun anlaşılması için, hem morfolojik, hem de fonksiyonel özellikleri aynı anda gösteriyor olması gerekir. Morfolojik özellik olarak hücre polarizasyonu, odontoblastik uzantısı ve

poligonal hücre yapısını, fonksiyonel olarak ise dentine özel protein olan dentin sialofosfoprotein – (DSPP) sentezini gerçekleştiriyor olması şarttır (79).

Günümüze kadar, mezankimal pulpa dokusundan odontoblast benzeri hücre oluşumunu sağlamak amacıyla çeşitli hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır (33, 81, 82). Hücre farklılaşması için, hücrelerin alındığı dişin bulunduğu gelişim evresi kadar, kullanılan maddelerin miktarı da önemli olmaktadır. Mineralizasyon, beta-gliserolfosfat varlığında sağlanabilirken, serum miktarı, farklılaşan hücre sayısını belirlemektedir (83). Ayrıca Sonoyama ve Liu (47), apikal papilla dokusu ile diş pulpası arasında yer alan hücreden zengin tabakanın odontoblast farklılaşmasında rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yukarıda dentin için belirtilen proteinlerin büyük çoğunluğu, kemik için de geçerlidir. Ancak yapılan çalışmalar, dentin sialoprotein (DSP) ve dentin fosfoprotein (DPP)' nin sadece odontoblastlar için özel proteinler olduğunu göstermektedir (79, 84). Bu iki protein, tek bir gende kodlanarak (DSPP)- Dentin sialofosfoproteini oluşturmaktadır (85). Fakat 2001 yılına kadar, elde edilen odontoblastların sahip oldukları genler, tam olarak bilinmemekteydi. Bleicher ve Couble (86), bu düşünceden yola çıkarak uyguladıkları yeni bir teknikle, odontoblastlar tarafından sentez edilen yeni genlerin, tanımlanmasını sağlayarak, DSPP' nin odontoblastlara özgü tek protein olduğunu ortaya koymuşlardır. İndüklenecek farklılaşması sağlanan hücrelerin, odontoblast hücresi olabilmesi için DSPP sentezi göstermesi gerekmektedir (87). Bu özellik, hücrelerin fonksiyonel yapısını bize gösterirken, hücrenin poligonal şekil alması ve odontoblastik uzantıya sahip olması da morfolojik yapısını kanıtlamaktadır. Ancak bu iki olay birbirinden ayrı değerlendirilemez. Hücreler, 2- 3 hafta içinde, dentin matriksi etrafında polarize olurken (83), matriks mineralizasyonu, hücresel nodüllerin oluşumundan sonra, yoğun kollagen ağı ile sarılmasıyla gerçekleşir (33, 83). Dentin sialoprotein (DSP) ve Dentin matriks protein (DMP), salgılama evresinin göstergeleridir(87). DSPP sentezi, ekstraselüler matriksin mineralizasyonundan sonra (4-6 hafta içinde) ciddi bir artış gösterir (83).

Dentin diskleri üzerinde, dişten alınan kök hücrelerle yapılan bir çalışmada, bu hücrelerin sayıca artmadığı ancak 16. günün sonunda morfolojik olarak odontoblast

hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (88). Ruch ve ark.' ları (79), 1995 yılında fare embriyonunda, in vivo olarak yaptıkları farklılaşma çalışmasında, bu hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini göstermişlerdir. Ancak, Couble ve Farges (83), oluşturdukları in vitro sistemle odontoblastların bu iki özelliğini eş zamanlı olarak bildiren ilk araştırmacılarıdır.

Laboratuvar ortamında istenilen hücrelerin elde edilmesi, kök hücrelerle kliniğe dayalı çalışmalar yapmanın yollarını açmaktadır. Örneğin; kullanılan farklı büyüme faktörleri ile bu hücrelerin, pulpa kuafajı sırasındaki farklılaşma mekanizması çözülmeye çalışılmaktadır.

Yıllardır araştırmacılar, kaybolan veya zarar gören diş dokularının tamirini anlamak için çalışma yapmaktadır. 1952 yılında, Dr. B. W. Hermann tarafından, kalsiyum hidroksitin pulpa amputasyonu tedavisinde kullanılması, rejeneratif endodontiye ait ilk girişim olarak kabul edilmektedir (89). Pulpanın yaralanması sonrasında, fibröz dokunun uyarılarak, dentin oluşumunun sağlanması, kalsiyum hidroksit esaslı patların etkisiyle odontoblast hücreleri (90) tarafından yapılmaktaydı (89). Mezankimal pulpa hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaşmasının, kalsiyum hidroksitin meydana getirdiği nekrotik tabaka sayesinde olduğu düşünülmekteydi. Fakat yakın zamanda, Mizuno ve Banzai (91), kalsiyum iyonlarının pulpadaki fibronektin sentezini sağladığını ortaya çıkarmışlardır.

Fibronektin, sanılanın aksine odontoblastlar tarafından değil, fibroblast hücreleri tarafından sentezlenmektedir (33, 80). Fibronektin, fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından salgılanarak, pulpanın farklılaşmamış mezankim hücrelerini, sert doku oluşumu sağlayan hücrelere dönüştürmektedir. Fibronektin, odontoblast tabakasında, pulpadan predentin içine, odontoblast uzantılarıyla taşınmaktadır (92) Pulpanın sert doku oluşturma kapasitesi, dişetine göre daha yüksektir. Çünkü, pulpadan alınan fibroblastlar, dişetindekilere göre alkalen fosfataz aktivitesini daha fazla göstermektedir (33). Alkalen fosfataz enzimi, kalsifiye doku oluşumunda önemli bir role sahiptir. Bu enzimin aktivitesi, osteoblast ve odontoblast hücreleri için belirleyicidir (93). Başka bir histokimyasal çalışmada, yüzeysel nekrotik tabaka ile canlı pulpa dokusu arasında fibronektin varlığı tespit edilmiştir. Yoshida' ya göre (94), fibronektinden zengin bu

tabaka, tamir dentininin oluşumu sırasında büyüme faktörleri için kaynak oluşturmaktadır. Büyüme faktörleri, hücrelerin göçü ve tutunmasından sorumlu olarak tamir olayına katılmaktadır. Aynı zamanda kollagen sentezi ile sert doku oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir (95, 96).

Kemik oluşumu için gerekli olan Transforming Growth Factor beta (TGF- β), Bone Morphogenic Protein (BMP) 2, 4 ve 7 gibi düzenleyiciler, odontoblast gelişimini de desteklemektedir (97, 98). Odontoblast öncülerinin çoğalma ve farklılaşmaları, yine kemik hücrelerinde olduğu gibi fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, platelet-derived büyüme faktörü, insülin- benzeri büyüme faktörü ve tümör nekroze edici büyüme faktörü - alfa tarafından sağlanmaktadır (98). Bu sebeple, osteoblastlar ve odontoblastların uyarılması arasında belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Dentin ve kemik matriksinde bulunan mineralizasyon sistemi de, ortak protein yapılarından dolayı birbirine oldukça benzemektedir. Araştırmacılar sahip olunan proteinlerin ve sert doku oluşturma mekanizmalarının birbirine benzemesine rağmen farklı yapıların ortaya çıkmasını, proteinlerin uyarılmasını sağlayan transkriptör faktörlerinin değişik olmasına bağlamaktadırlar (55). Kemik ve dentin dokusundaki ayırıcı faktör, dentinde bulunan ve sadece odontoblastlara özgü olan Dentinsialofosfoprotein (DSPP) sentezinin belirlenmesidir (86).

Günümüze dek, çeşitli dokulardan elde edilen kök hücrelerin, büyüme faktörleri ile uyarılarak odontoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşmasına ilişkin çalışmalar yapılmıştır (15, 48, 49). Açığa çıkmış pulpa dokusunun dentinogenesis amaçlı uyarılmasında yine büyüme faktörlerinden faydalanılmaktadır (35, 95, 96).

Diş folikül öncü hücrelerinin osteojenik farklılaşması, BMP-2 / 7 gibi büyüme faktörleriyle sağlanmaktadır (48, 49). Köpek dişleri üzerinde yapılan bir çalışmada, MTA ile pulpa dokusu üzerinde oluşturulan sert doku, BMP-7 ile oluşturulana oldukça benzemektedir. Ancak büyüme faktörü ile meydana gelen yapı, kemik benzeri morfolojiye sahip ve odontoblastlara özgü DSP sentezi göstermemektedir (35). Buna rağmen kültür çalışmasında, farklılaşma ve mineralizasyon için, BMP-2 kullanıldığı zaman, hücrelerin DSPP sentez ederek odontoblastlara dönüştüğü izlenmiştir (15). Bu durumu, mezankimal kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasında etkisi olduğu

bilinen transkriptör faktörünün (56), BMP-2' nin yönlendirilmesinde yetersiz kalmasıyla (99) açıklayabiliriz. Yine köpek dişleri üzerinde, kollagen matriks yardımıyla taşınarak amputasyon tedavisinde kullanılan BMP-2 ve BMP-4' ün açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde osteodentin yapımını uyardığı tespit edilmiştir. Bu sonucun aksine TGF- β 1 pulpa rejenerasyonunu engellemiştir (97). Narayanan ve ark. (75), ise dentin matriks proteininin (DMP-1), odontogenez olayında uyarıcı molekül gibi davrandığını, bu şekilde hücrelerin odontoblastlara farklılaştığını belirlemiştir.

Kemik iliği mezankimal kök hücrelerin, periodontal defekte etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hücrelerin farklılaşarak beklenen periodontal rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir (100). R d' Aquino' nun 2007' de yaptığı bir çalışmada (101), dişten alınan kök hücreler, kemik rejenerasyonu açısından incelenerek, olumlu sonuçlar elde edilmiş. Kemik ve endotel hücrelerine sinerjik dönüşümün araştırıldığı bu *in vitro* ve *in vivo* kombine çalışmada, damarlarla karakterize kemik oluşumu izlenmiştir. Araştırmacıya göre; damar ve kemik yapısının eş zamanlı oluşması, klinik uygulamada, yetişkin kemik dokusu oluşturma potansiyelini arttırmaktadır. Bu hücrelerin damarlanma potansiyeli, kalp krizi tedavisinde gelecek vaatetmektedir (102). Buna benzer başka bir çalışmada, otojen kemik dokusu (LAB) oluşturulması için kullanılan yetişkin diş pulpası kök hücreleri, 30. günde ekstraselüler matriks oluşturan çökeltiler meydana getirmiş, 50. günün sonunda ise istenen özellikleri taşıyan mineralize doku oluşturmuştur. Farelere nakli sağlanan bu oluşum, kaybedilen alveol kemik dokusunun yerini tutabilecek yapıda, trabeküllerle çevrili lameller kemik oluşumunu sağlamıştır (103).

Araştırmacılar bu kadarla da kalmayıp, embriyonik ve doğum sonrası dönemdeki diş tomurcuklarının kullanıldığı bir hayvan çalışması yaparak, diş oluşumuna dair bulgular elde etmişlerdir. Embriyonik hücrelerin meydana getirdiği dişin kuru, diğer gruba göre daha düzgün bulunmuştur. Doğum sonrası dönemde alınan diş tomurcuk hücrelerinin, embriyonik hücrelerin aksine, dişin kuru şekillenmesi için gereken temel faktörlere sahip olmadığı düşünülmektedir (104).

Eksik olan bir yapının dışarıdan tamamlanabilmesi, kök hücrelerin başarısını gösteren, diş hekimliği açısından ileri bir adımdır. İnsan süt dişlerinden alınan kök

hücrelerle kemik rejenerasyonu, ototransplantasyon ve doku temelli klinik uygulamalar yapılmaktadır (105). Diş Hekimliği açısından bakıldığında, kök hücre çalışmaları pulpa, periyodonsiyum ve hatta diş rejenerasyonunun sağlanması ile sınırlı kalmaktayken, embriyonik kök hücrelerin, hasar görmüş doku ve organa transplantasyonu, hastanın yaşam kalitesini arttırarak ömrünü uzatmaktadır (106). Bu amaçla bulunması, elde edilmesi ve izolasyonu daha kolay olduğu düşünülen multipotent özellikteki diş kök hücreleri, yeniden programlanarak pluripotent aşamaya döndürülmeye çalışılmaktadır. Son dönemde yapılan bir araştırmada, özel besiyeri içinde kültürü yapılan süt dişi kök hücrelerinin, epitelyal yapıda hücre taşıdığı gösterilmiştir (76). Bu durum yıllardır bilinen, “ *Diş pulpasında epitel hücresi yoktur* ” kavramına oldukça şaşırtıcı bir yaklaşımdır. Bu konuda yapılacak daha ayrıntılı araştırmalar, diş ve çevre dokularından alınan hücrelerin, aynı moleküler yolu izlemesine rağmen nasıl farklı dokular meydana getirerek diş oluşumunu sağladıklarını ortaya çıkaracaktır. Belki yukarıda yapılan çalışmada olduğu gibi bilinenin aksine, diş yapısında farklı hücrelerin ve değişik mekanizmaların rol oynadığı tespit edilerek, yeni diş oluşumu sağlanacaktır.

2.2. REJENERATİF TEDAVİLER ve MİNE MATRİKS PROTEİN TÜREVLERİ

Mine matriks protein türevi (EMD), embriyo halindeki domuzların gelişmekte olan dişlerindeki Hertwig epitel kök kınından salgılanan mine matriks proteinlerinin (EMPs), saflaştırılmış asidik ekstresidir. (107, 108). Çoğunluğunu amelogeninin oluşturduğu mine matriks proteini, hidrofobik yapıdadır (109). Mine matriks proteinlerinin, dişin embriyonik gelişimi sırasında ektodermal-mezankimal etkileşimine katılarak diş oluşumunu kontrol ettiği düşünülmektedir (107). Hertwig epitel kök kını (HERS) hücreleri tarafından sentez edilen mine matriks proteinleri, diş folikül hücrelerinin sementoblasta farklılaşmasını sağlayarak, sement oluşumunda önemli rol oynamaktadır (107). Bu proteinin, hücresiz sement oluşumunu desteklemesi yoluyla (107) periodontal doku rejenerasyonuna etkisi de bilinmektedir (110).

Kültür ortamına, EMD’ nin dahil edildiği çalışmalar, periodontal fibroblastların sayıca arttığını, protein ve kollagen üretiminin de fazlaştığını göstermektedir (111). Periodontal ligament fibroblastlarının, proteoglikan ve hiyaluronan sentezini uyarmak

suretiyle etkilenmesi (41), mine matriks protein türevlerinin tamir ve rejenerasyonda rol oynadığını düşündürmektedir. Hyaluronan sentezi, hücrelerin ayrılması ve göç etmesi için gereklidir (112). Bilindiği gibi yara iyileşmesi, ilgili hücrelerin yara bölgesine ilerlemesiyle başlar. Chen' e göre EMD, periodontal ligament ve dişeti fibroblastlarında hyaluronan ve proteoglikan sentezini başlatarak periodontal doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesini sağlamaktadır (112). İyileşme sırasında EMD, damar endotel hücreleri ile periodontal ligament hücrelerinin etkileşimini sağlayarak, damar oluşumuna da imkan tanımaktadır (113).

Kök dentininin oluşumu, sementogenesis ile yakından ilişkilidir. Hertwig epitel kök kını, dental papillanın mezankimal hücrelerini uyararak “ *Mantle predentin* ” (henüz mineralize olmamış, yeni oluşan periferel dentin) yapımını başlatır. Böylece yeni oluşan dentinle temas eden diş folikül mezankimal hücreleri, sement oluşumunda rol alırlar (107). Sement oluşumundan önce, kök yüzeyinde mine matriksine benzer bir yapının, epitel kök kınının iç kısmında bulunan bir bölgeden salgılandığının saptanması (107, 114), araştırmacıları mine matriks türevlerine yönlendirmiştir. Ayrıca, hücresiz sementte bulunan bazı proteinler, mine matriksinde olanlarla benzerlik göstermektedir (115). Mine matriksini meydana getiren proteinlerin başında amelogenin yer alır ve içeriğinin yüzde doksanını oluşturur, kalan %10' luk kısım ise, tuftelin, tuft protein, serum, tükürük proteini (116), ameloblastin (117) ve amelinden (118) oluşmaktadır. İçerisinde mine matriks protein türevi, su ve propilen glikol aljinat (PGA) isimli taşıyıcı bulunan formu piyasada bulunmaktadır. Amelogenin sahip olduğu özel protein yapısıyla, hücre ataşmanına olanak tanır (119, 120). Johnson (121), EMD içerisinde bulunan amelogenin dışındaki diğer proteinlerin, damar oluşumu için etken olabileceğini savunmaktadır.

İnsanlar üzerinde kullanılan materyellerin, klinik açıdan güvenli olması şarttır. İlk kez 1997 yılında (110), insan dişleri için klinikte uygulanmaya başlanan EMD' e dair günümüze ulaşan, olumsuz bir sonuç bulunmamaktadır (122). EMD uygulanan hastalarda, herhangi bir allerjik yanıtın gelişmemesi, içinde bulunan proteinlerin, "*self-protein*" olmasına bağlanmaktayken, toleransın iyi olması da, biomateryelin güvenliğini ortaya koymaktadır (123). EMD uygulanan dişlerde ortaya çıkan enflamatuar yanıtın az

olması, EMD' nin hücrelerden enflamatuar mediatör salınımını baskılamasına ve antienflamatuar mediatör olan TGF- β ' yı içermesine bağlanmaktadır (124).

Kullanılan materyelin ortamda bulunan hücreler üzerindeki etkisi, bize klinik kullanımı sırasında karşılaşacağımız durumlar hakkında bilgi verir. Suzuki ve ark. (120), EMD' nin hücre ataşmanına etkisini araştırdığı çalışmasında, EMD ile kaplanmış doku kültür plaklarının, periodontal ligament fibroblastlarının tutunmasına olumlu etki yaptığını göstermiştir. Ortaya çıkan bu sonucu, hücre yüzey reseptörü (hücre ve ekstrasellüler matriks arasındaki adezyonu sağlar) ile EMD içerisinde bulunan bone sialoprotein (BSP) benzeri molekülün (kemik matriksinde salgılanan glikoprotein) etkileşimi, şeklinde açıklamaktadır (120). Ancak ataşman ve proliferasyon açısından başka hücrelerle karşılaştırılan periodontal ligament fibroblastları, kemik hücrelerine hatta dişeti fibroblastları ve epitel hücrelerine oranla zayıf bir bağlanma göstermektedir (31, 125).

Mine matriks protein türevlerinin, hücreler üzerindeki etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Elde edilen ilk bulgulara göre; EMD preparatlarında spesifik büyüme faktörü bulunmamakta (111), ancak hücrelerle karşılaşan materyalin, hücre içindeki sinyalleri uyararak büyüme faktörlerinin ortaya çıkmasını sağladığı düşünülmektedir (119). Amelogenin içerikli biyomateryalin, periodontal ligament fibroblastlarındaki büyüme faktörü - TGF- β 1 sentezini artırarak hücre büyümesine katkı sağladığını gösteren araştırmalar da vardır (126, 127). Ancak daha sonra yapılan araştırmalarda, mine matriks protein türevlerinin endojen olarak, TGF- β 1 içerdiği bildirilmiştir (43, 44, 128). TGF- β 1, enflamatuar sitokinleri baskılayarak (129) ekstrasellüler matriks oluşumunda ve periyodonsiyum gelişiminde önemli rol oynamaktadır (130). Kemik hücrelerinden bağlantı dokusu büyüme faktörünün [Connective tissue growth factor (CTGF)] sentezi, EMD varlığında TGF- β 1 etkisiyle olmaktadır. CTGF, osteoblastların farklılaşmasını tetikleyerek mineralizasyonda rol oynamaktadır (131).

Itoh ve ark. (132), EMD' nin, büyüme faktörü bulundurmadığını, osteoklast ve osteoblast hücrelerine etkisinin, sahip olduğu bioaktif moleküller sayesinde olduğunu belirtmektedir. Ancak EMD' nin, kemik oluşumunda etkisi olduğu bilinen BMP 2; 4; 7

gibi molekülleri kapsadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (133). Mine matriks protein türevlerinin sahip olduğu Bone Sialoprotein (BSP) ve Osteopontin (OP) gibi osteojenik proteinler, periodontal ligament fibroblastlarında farklılaşmayı sağlamaktadır (120). Ayrıca EMD' nin, hücrelerle direkt temas etmeden doku rejenerasyonunu sağlıyor olması, bunu içerdiği biyoaktif moleküllerle yaptığını düşündürmektedir (134).

Periodontal defektlerde uygulanan EMD, çıplak kök dentin yüzeyi tarafından emilerek periodontal doku rejenerasyonu sağlar (107, 111, 135, 136, 137). Periodontal rejenerasyon için kırıkta, kemik, damar ve yumuşak doku oluşumu birlikte değerlendirilmelidir. Hama ve ark. (128), yaptıkları çalışmada EMD' nin, osteoblast farklılaşmasına olan etkisini, erken ve geç olmak üzere iki farklı evrede değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda; EMD' nin, periodontal doku rejenerasyonunda izlenen hücre sıralamasına göre, seçici fonksiyon gösterdiği vurgulanmıştır. Kırıkta oluşumundan kemik ve damar yapısı gelişimine kadar olan evrede, kondrositlerin de rolü olduğu düşünülmektedir (138). Kırıkta yapıdan kemik oluşumu sırasında gerekli olan mineralizasyon ve kondrosit hipertrofisi, yine EMD içinde bulunan BMP- 6 ve insülin benzeri büyüme faktörü ile sağlanmaktadır (139). Mine matriks protein türevinin, periodontal ligament hücrelerinden, indirekt olarak damar endotel büyüme faktörünün salınımını sağlayarak (Vascular endothelial growth factor- VEGF), damarlanma olayına katıldığı bildirilmiştir (113). Büyüme faktör (Transforming growth faktör beta - TGF β) etkisinin ortadan kaldırıldığı başka bir çalışmada, EMD' nin bazı medyatörler aracılığıyla, hücrel enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak gingival fibroblast proliferasyonunda rol aldığı belirtilmiştir (109).

EMD ile ilgili yapılan araştırmalarda, kullanılan hücre grubuna bağlı olarak, farklı sonuçlar elde edildiğini görmekteyiz. EMD' nin, periodontal ligament fibroblastlarının çoğalmasını ve kemik hücresine farklılaşmasını desteklediği araştırmalar olduğu gibi (111, 126, 140, 141, 142); gingival fibroblastların çoğalmasını olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar da vardır (43, 44). Aynı şekilde, ortamda emdogain olduğu zaman, bazı hücre gruplarının kemik hücresine farklılaşması sağlanırken, bazı hücre hatları etkilenmemektedir (128, 143). Gingival fibroblast hücreleri, EMD' e periodontal ligament fibroblastlarından daha duyarlıdır (41).

Yapılan çalışmalardan, mine matris protein türevlerinin farklı hücre gruplarını etkileyebildiğini ancak sonuçların her zaman birbiriyle uyumlu olmadığını görmekteyiz. Bosshardt (144) bu durumu şu maddelerle açıklamaktadır:

1. Kullanılan mine matris proteinlerinin farklı olması
2. Kullanılan mine matris protein konsantrasyonlarının farklı olması
3. Çalışmalarda dikkate alınan değişik gözlemlene periyotları
4. Farklı hücre tiplerinin kullanılması
5. Farklılaşan hücrelerin, değişik aşamalarının kullanılması
6. İn vitro koşulların farklı olması
7. İn vivo lokal çevre koşullarının değişik olması

Yukarıda bahsedildiği gibi; EMD' nin biyolojik etkisi, uygulandığı konsantrasyonla doğrudan ilişkilidir (119, 142). Doz artışı, bu durumu olumsuz etkiler (121). EMD' nin büyük kısmını oluşturan amelogeninin, osteojenik proteinlerin [Bone sialoprotein - (BSP) ve Osteokalsin (OC)] üretiminden sorumlu olduğu, yüksek dozda uygulanan biyomateryalin bu sayede, mineralize nodül oluşumunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (145). Doz artışı ile ortaya çıkan bu olumsuz sonucun, amelogeninle bağlantılı (121) olduğu bilinmemekte ancak hangi mekanizmayla ortaya çıktığının araştırılması gerekmektedir.

2.2.1 MİNE MATRİKS PROTEİN TÜREVLERİNİN PULPA - DENTİN KOMPLEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bir dişin canlılığını sürdürmesi, fonksiyon görebilmesi açısından oldukça önemlidir. Pulpanın yaralanması, istenmeyen doku kayıplarına sebep olmaktadır. Araştırmacılar yıllardır pulpanın korunması için zarar gören dentin dokusunun tamirini sağlamaya uğraşmaktadır. Bugüne kadar, kalsiyum hidroksit (89, 146), çinko oksit öjenol, cam iyonmer simanı, rezin adezivler (147), hidroksiapatit kristalleri (148, 149), trikalsiyum fosfat ve mineral trioxide agregat (MTA) (150) gibi materyallerle dentin dokusu onarılmaya çalışılmıştır. Ancak dentin benzeri sert doku oluşum mekanizması hala bilinmemektedir. Son zamanlarda bu mekanizmanın anlaşılması amacıyla, osteojenik ve odontojenik proteinler gibi biyolojik aktif moleküller (BMPs; DMPs) incelenmektedir (15, 75, 96, 151, 152). Böylece diş pulpasındaki hücresel yanıtla

beraber, diş oluşum evresinin başlangıcındaki dentin yapımı, laboratuvar ortamında gözlemlenerek çözülmeye uğraşılmaktadır. Artık dentin oluşumu sırasında ortamda bulunan indükleyici faktörler ve maddeler de önem kazanmıştır. Örneğin; Hammarström (107), folikül hücrelerinin mine matriksiyle teması sırasında, hücresiz sement benzeri doku oluşurken, ortamda amelogenin bulunduğunu bildirmiştir. Amelogenin ve amelın odontoblastların farklılaştığı son aşamada ortama katılarak dentin oluşumunda görev almaktadır (153, 154, 155). İçeriğinde amelogenin ve amelın bulunan bir mine matriks protein türevi, dentin benzeri sert doku oluşturma kapasitesi açasından denemeye değer bulunmaktadır. Ancak EMD' nin, jel formunda olması ve bir taşıyıcı içinde bulunması, klinik uygulamayı zorlaştırmaktadır. EMD, Propilen glikol aljinat (PGA) isimli bir madde içinde taşınmaktadır. Doku sıvısındaki ısının artmasıyla beraber, asidik çözeltili nötrale olarak EMD içerisindeki proteinler aktif hale geçmektedir (156).

Olsson ve ark.(157), kalsiyum hidroksit ve EMD' i pulpa kuafajında kullanarak, materyellerin pulpa üzerindeki etkisini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda; kalsiyum hidroksite kıyasla mine matriks protein türevi ile daha fazla miktarda sert doku oluştuğunu ve hastaların daha az postoperatif sıklıntı yaşadıklarını belirlemelerine rağmen, klinik uygulamasının çok da avantajlı olmadığını vurgulamaktadırlar. Uyguladıkları teknikte, pulpa proliferasyonu için emdogainin jel formunun daha iyi olacağını, sert doku oluşumu için ise, daha katı bir taşıyıcı materyel tercih edilebileceğini belirtiyorlar. Bu çalışma sonucunun aksine, Garrocho-Rangel ve ark. (122), pulpa kuafajında kullanılan Dycal ve EMD' nin klinik belirtiler açasından çok farklılık göstermediğini açıklamışlardır.

EMD' nin MTA ile karıştırılarak kullanılması, taşınma ve uygulanmasındaki zorlukları ekarte ederek, sert doku oluşumunu sağlamaktadır (158). İnsan diş pulpası kök hücreleri üzerinde MTA ile EMD' nin karıştırılarak kullanıldığı bir çalışmada, MTA ve EMD kombinasyonunun MTA' nın tek başına kullanıldığı gruplara göre, insan diş pulpası kök hücrelerinin odontoblastik farklılaşmasını ve mineralizasyonunu daha iyi sağladığı ortaya konmuştur. Araştırıcıya göre, bu karışım pulpa kuafajı için alternatif bir materyel oluşurmaktadır. (158).

Ishizaki (159), EMD ile oluşan kalsifiye alanın, kalsiyum hidroksitin sebep olduğu nekrotik tabakadan (160) farklı olarak, materyelin kendi özelliğinden kaynaklandığını belirtmektedir. Ayrıca, EMD uygulanan grupta oluşan ve kök kanalının içine kadar uzanan sert dokuyu, doğrudan kullanılan materyel hacmi ile ilişkili bulmuştur. Mine matriks protein türevinin açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde nekrotik tabaka oluşturduğunu ancak reparatif dentin oluşumundaki esas etkisinin, ortamda bulunan hücreleri indükleyerek sağladığını gösteren çalışma da vardır (124). Nakamura (161), EMD ve kalsiyum hidroksit esaslı dolgu materyelinin pulpanın yara iyileşmesine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, EMD' nin daha fazla miktarda dentin benzeri doku oluşturduğunu göstermişlerdir. Alkalen fosfataz enzim (ALP) aktivitesi, hücrelerin laboratuvar ortamında, sert doku oluşturabilme kapasitesini ortaya koyan yöntemlerden biridir. EMD' nin, insan dişeti fibroblastlarında ve periodontal ligament hücrelerinde alkalen fosfataz aktivitesini dikkate değer ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir (111, 126). Bu da mine matriks protein türevinin mineralizasyona olan katkısını açıklamaktadır.

Igarashi ve ark. (162), biyolojik materyallerin, pulpa hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması üzerinde olumlu etkisi olduğunu, ancak dentin köprüsü oluşturmada yetersiz kaldığına değinerek, EMD' nin pulpa amputasyonunda kullanıldığı bir hayvan çalışması yapmışlardır. Negatif kontrol grubunu, içinde EMD bulunmayan propilen glikol aljinat oluşturmasına rağmen tamir dentini ve dentin köprüsü oluşumu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu duruma, PGA tarafından uyarılan büyüme faktörlerinin sebep olduğunu düşünmektedirler.

Yukarıda da değinildiği gibi dentin köprüsü oluşturma açısından artık biyolojik materyeller denenmektedir (35, 96). Kaida (124), biyolojik materyellerin sert doku oluşturma mekanizmasına dair yaptığı çalışmasında, EMD bulunan grupta oldukça dar bir nekrotik tabaka oluştuğunu ancak mineralize alanın, EMD tarafından indüklenen makrofajların sentezlediği BMP etkisiyle olduğunu ortaya koymuştur. Kalsiyum hidroksit ve cam ionomerin oluşturduğu dentin, EMD ile meydana gelen reparatif dentine kıyasla, daha pöröz yapıdadır. Kaida' ya göre; EMD' nin içerisinde bulunan bone morfogenetik proteinler, hücrelerden salınanlarla birleşerek tamir olayına katılmaktadır (124).

Ağız içerisinde, gerek periodontal defekt gerekse pulpa hasarlarında, mikroorganizmaların etkisi göz ardı edilemez. Dış ortama açık olan, hastalığa meyilli bir dokunun başlangıçta steril olsa dahi sonradan enfekte olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda emdogainin antibakteriyel etkisinin de incelendiğini görmekteyiz.

Sculean A. ve ark. (163), kronik periodontitisli hastalardan plak örneği alarak, çeşitli maddelerin antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Etkilerini inceledikleri maddelerden (EMD, EMD / PGA, PGA ve pozitif kontrol grubu olarak klorheksidin) en iyi antibakteriyel etkinin propilen glikol aljinatın tek başına kullanıldığı grupta olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular, periodontal açıdan sağlıklı bireylerde yapılan başka bir antibakteriyel araştırma sonucuyla da örtüşmektedir (164). Bu çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar, EMD' nin antibakteriyel etkisinin, içinde bulundurduğu taşıyıcıdan (PGA) kaynaklandığını söylemektedirler. Ancak propilen glikol aljinatın bu etkiyi nasıl sağladığına dair çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalarda, EMD' nin periodontal fibroblastları etkileyerek rejenerasyon sağladığı belirtilmiş (41, 110), hatta rejenerasyonun oluşum sırasına göre, ortamda bulunan hücrelerin değişik zamanlarda farklılaştığı gözlenmiştir (128). Ayrıca, EMD' nin osteoblast (121, 165) ve hücresiz sement (107) oluşumuna katkısı da bilinmektedir. Oluşan kemik hücreleri, sert doku yapımını sağlarken, EMD sayesinde osteoklast oluşumuyla kemik şekillenmesi mümkün olmaktadır (166). Böylece, periodontal doku ve kemikiçi defektlerinin tamiri için gereken yapılar, EMD etkisiyle oluşmaktadır. Bu biyomateryelin uygulandığı periodontal defektli vakalarda, kemik kazanım oranlarının başarılı bulunması bu durumu desteklemektedir (110, 123). EMD' nin, yara iyileşmesinin temel göstergesi olan yeni damar oluşumuna, direkt ve indirekt yollarla (167) katkı sağladığını gösteren çalışmalar da vardır (113). Ayrıca osteoblast hücreleri kadar odontoblast hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak (168), dentin benzeri sert doku oluşumuna da katılmaktadır (161,157). Görüldüğü gibi EMD, ister karşılaştığı hücre için bir matriks görevi görsün (111, 134) ister sahip olduğu biyoaktif moleküllerle (43, 44, 128) etkili olsun; bulunduğu ortamda hücre ataşmanı, yayılımı, proliferasyonu ve büyüme faktörlerinin sentezi gibi olumlu etkiler yaratabilmektedir. Ayrıca

periodontal ligament hücrelerinde rejeneratif cevabı tetikleme özelliğine sahip olması onu değerli kılmaktadır (111).

2.3. REJENERATİF TEDAVİLERDE MİNERAL TRİOXİDE AGGREGATE (MTA) ve KALSİYUM HİDROKSİTİN KULLANILMASI

1920 yılında ilk kez Hermann tarafından, Calxyl (Otto & Co., Frankfurt, Germany) adı altında diş hekimliğine tanıtılan kalsiyum hidroksit patı, günümüzde hala antibakteriyel etkisi ve sert doku oluşturma özelliği nedeniyle, pulpa dokusunun uyarılması ve periapikal doku tamirinde kullanılmaktadır (169). Kalsiyum hidroksitin kimyasal yapısı, doğada bulunan CaCO_3 ' in yüksek derecelerde ısınması ile açığa çıkan kalsiyum oksit ve karbondioksitle sağlanmaktadır. Suyla temas eden kalsiyum oksit, beyaz renkli kokusuz bir toz olan kalsiyum hidroksiti meydana getirmektedir. Cvek' e göre, kalsiyum hidroksitin, pulpa dokusu üzerindeki olumlu etkisinin anlaşılması, 1930'lu yıllara rastlamakta ve hala sert doku depozisyonunu sağlayan en iyi materyel olarak güncelliğini korumaktadır (169). Toz, pat ve siman olarak farklı formları bulunur (169, 170). Kalsiyum hidroksitin esas etkisi, Ca^+ ve OH^- iyonlarından kaynaklanmaktadır (171). İyon salınım süresini etkileyen uygun bir taşıyıcı ile kullanıldığı zaman, uygulandığı amaca göre değişik etkiler göstermektedir (172). Pat formları kök kanal içerisine daha kolay uygulanırken, baz ve katalizör gibi iki ayrı patın karıştırılmasıyla elde edilen Dycal gibi simanlar, içeriklerindeki bazı maddeler sayesinde sertleşerek vital tedaviler için daha uygun olmaktadır (173).

Kalsiyum hidroksit preparatlarından biri, Dycal' dır. Dycal, L. D. Caulk Co. (Milford, DE) tarafından geliştirilen, ana içeriğini kalsiyum hidroksitin oluşturduğu bir preparattır. İlk olarak 1962 yılında piyasaya sürülmüştür (173). Baz kısmında plastikleştirici (ethyltoluene sulfonamide) katkı maddesi bulunduran bu kalsiyum tuzu, aynı zamanda ideal bir kök kanal dolgu maddesi özelliği taşımakta (174), ancak hızlı sertleşme zamanı, kök kanalına uygulanmasını zorlaştırmaktadır (175). Caulk firmasının, dycal patı üzerinde bu sebeple yaptığı değişiklikler, sertleşme zamanını uzatarak, uygun bir kök kanal patı yanında (175), istenilen formda kuafaj materyeli ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Dycal' ın piyasaya çıktığı ilk günden itibaren

içeriğinde bu şekilde değişiklik yapılması, çok farklı formlara sahip preparatların piyasada bulunmasını sağlamıştır. Örneğin; içinde bulunan plastikleştirici madde miktarının arttırılması, Dycal' in daha kırılğan hale gelmesine sebep olmuştur (175). Ayrıca sertleşen tip kalsiyum hidroksit preparatların bileşiminde bulunan farklı madde ve oranlar, bu preparatların suya afinitesini değiştirerek pulpada farklı yanıtların ortaya çıkmasını sağlamaktadır (173). Özellikle Life ve Dycal gibi sertleşen kalsiyum hidroksit simanları, restorasyon amacıyla kullanılan asitleme işleminden etkilenmektedir (176). Simanların olumsuz özelliklerini gidermek amacıyla yapılan değişikliklere günümüzde en iyi örnek, Dycal' in zaman içerisinde çözünmesini önlemek (177) ve dayanıklılığını arttırmak amacıyla, yapısına polimer (urethane dimethacrylate) (178) ilave edilmiş formlarının piyasaya sürülmesi olarak sayılabilir (173). Kalsiyum hidroksitin bu yeni formlarının asit karşısında direncinin arttığı ve dentine bağlanma gösterdiği bildirilmiştir (179).

Dycal' in alkalen özelliği, saf kalsiyum hidroksitten daha azdır (180). Buna rağmen, Isermann (181), dycal'ın sahip olduğu bakteriyostatik etki nedeniyle pulpa dokusunda iyileşme gösterdiğini ve bu sayede açığa çıkmış pulpanın canlılığını sürdürmesini sağladığını bildirmiştir.

Kalsiyum hidroksitin, olumlu etkileri yanında klinik kullanımda ciddi enflamatuvar reaksiyona sebep olması ve rejeneratif özelliğinin bulunmaması araştırmacıları alternatif materyel arayışına sokmuştur. MTA' nın hücreler üzerindeki olumlu etkisi (182) yanında pulpa dokusuyla karşılaştığı anda biyolojik aktif maddelerin salınımını tetikleyerek (183) bariyer oluşturması, kalsiyum hidroksit yerine kullanılmasını sağlamaktadır.

MTA içinde, bizmut oksit (184), silikon dioksit ve kalsiyum oksit bulunduran portland sementin modifiye bir formudur (185, 186). İlk kez 1995 yılında Torabinejad tarafından tanıtılmıştır. Beyaz ve gri olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. Beyaz MTA, gri formunun içinde yer alan ve esas rengini veren, aluminoferrit isimli maddeden yoksundur (185). Yapılan çalışmalar, pulpa hücrelerinin canlılığı üzerinde beyaz ve gri formlarının aynı etkiyi yaptığını göstermektedir (187). MTA esas olarak, kök kanal sistemi ile kök çevresi dokular arasında sızdırmazlığı sağlamak amacıyla

hazırlanmıştır (188). Ancak, açığa çıkmış pulpa dokusunun MTA ile örtülmesi sonucunda, daha az bir enflamatuvar yanıtla sert doku oluşumunun gözlenmesi, MTA' nın pulpa kuafajı için kalsiyum hidroksite alternatif olabileceğini düşündürmüştür (189, 190, 191, 192). MTA, pulpa kufajı, kök perforasyon tamiri (193, 194, 195) ve kök ucu dolgusu (196, 197, 198) olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda rejeneratif endodontik tedavide, sürmüş ancak gelişimini tamamlamamış nekrotik pulpalı daimi dişlerin tek seanslık apeksifikasyonunda da tercih edilmektedir (199).

MTA ile benzer fiziksel özelliklere ve hareket mekanizmasına sahip portland sementin (200, 201), periapikal lezyon bulunduran açık apeksli dişlerde apikal tıkaç olarak kullanıldığı bir vakada, lezyonun iyileşerek, kök uzunluğunun normale eriştiği bildirilmiştir (202). MTA' nın, retrograd yoldan kullanılması ile, pulpa proliferasyonundan çok, pulpa dokusu içindeki hücreleri ve osteoblastik aktiviteyi uyararak bariyer oluşturduğu gözlenmektedir (182, 183, 199, 203). Hatta *in vitro* bir çalışmada, periodontal fibroblastları uyardığı, böylece bazı büyüme faktörlerinin (BMP-2 ve TGFβ1) salınımını sağlayarak periapikal doku tamiri üzerindeki biyolojik etki mekanizmasının açıklanabileceği ifade edilmektedir (204).

Basma dayanımının yetersizliği ve uzun sertleşme zamanı, MTA' nın restoratif dolgu maddesi olarak tercih edilmesini önlemektedir (184). Endodontik sealer olarak, primer monobloklara örnek gösterilen MTA' nın yapılan çalışmalarda, dentin kanallarına bağlanma yapmadığı, ortamda bulunan dentin lenfi sayesinde meydana getirdiği kristallerin çökmesiyle, dentin dokusunu örtülediği vurgulanmaktadır (205). Ayrıca MTA ve kalsiyum hidroksitin kök dentinin yapısına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki materyelin de diş kökünde zayıflamaya yol açtığı belirtilmektedir. Araştırmacı, bu durumu, materyellerin sahip olduğu alkalin özelliğin, dentinin protein yapısında çökmeye neden olmasıyla açıklamaktadır (206). Bu sebeplerle kök kanal dolgusu olarak tercih edilmeyen materyelin, kök dentinine uyumunu geliştirmek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. İçerisine çeşitli oranlarda polimer eklenerek, kök kanal dolgusu olarak kullanılmasının amaçlandığı bir çalışmada, MTA' nın suyla teması sırasında ortaya çıkan kimyasal bileşenlerin değişmediği ve radyoopasite, akıcılık ve yeterli film kalınlığının sağlanması ile uygun bir kök kanal dolgusu haline geldiği belirtilmektedir (207).

Kullanılan materyellerin hücreler üzerindeki olumsuz etkisi ne kadar az olursa, hasta güvenliği o kadar fazla olmaktadır. MTA' nın hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunmaması klinik kullanımda kalsiyum hidroksite avantaj oluşturmaktadır (182). Öyle ki MTA' nın analjezik özelliğinin araştırıldığı bir hayvan çalışmasında sinir dokusuna dahi herhangi bir iritan etkisinin olmadığı belirtilmiştir (208). Torabinejad (184), tarafından yapılan bir çalışmada, kök ucu dolgusu olarak, köpek dişlerinde kullanılan MTA' nın, enflamatuvar yanıt oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç histolojik görüntülerin incelendiği başka bir hayvan çalışmasının bulgularıyla da örtüşmektedir. Elde edilen bulgulara göre, retrograd dolgu olarak kullanılan MTA' nın enflamatuvar reaksiyona sebep olmadığı, hatta onun etkisiyle kök ucu çevresinde oluşan yeni sementin, eskisiyle bağlantı yaptığı gözlenmiştir (197). MTA ve Dycal' ın, hücrelerin canlılığı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, Dycal' ın oldukça toksik olduğu ve uygulamadan 72 saat sonra neredeyse tüm hücrelerin öldüğü bildirilmiştir. Buna karşın, MTA' nın hücrelerin canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmemiştir (182). Kalsiyum hidroksitin sahip olduğu yüksek pH değeri, hücreler üzerindeki olumsuz etkisini açıklamaktadır (168) MTA da, ilk 24 saat içerisinde pH değerinin yüksek olması nedeniyle hücre besiyerinde protein denatürasyonuna sebep olarak hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. Ancak kalsiyum hidroksit etkisinin aksine sertleşmesini takip eden sürelerde biyoyumluluğunun ve hücre canlılığının arttığı belirtilmektedir (204). Kuratate (183), kalsiyum hidroksitin işlemler sırasında ciddi bir enflamatuvar reaksiyon başlattığını, MTA' nın kostik etkisinin ise kalsiyum hidroksite oranla çok daha az olduğunu bildirmiştir. Öyle ki ağrıya sebep olmak yerine ağrı kesici özelliğini gösteren bir çalışma da bulunmaktadır. Orofasyal ağrının yaratıldığı bu hayvan çalışma modelinde, MTA' nın öjenole göre daha etkili bir analjezik olduğu vurgulanmakta, yazar bu sonucu endodontik tedavi sonrasında karşılaşılan postoperatif ağrının baskılanması açısından anlamlı bulmaktadır (208).

Gelişimini tamamlamamış devital bir daimi dişte, kalsiyum hidroksit kullanılarak apikal bariyer oluşumuyla iyileşmenin sağlanması, ilk olarak 1960' lı yılların sonuna rastlamaktadır (209). O yıllarda yapılan tedavilerde, kullanılan materyellerden beklenen iyileşme kriterleri ile günümüzdekiler, birbirinden oldukça farklıdır. Örneğin; kalsiyum hidroksitin dişler üzerinde uzun süreli uygulanmasından

kaynaklanan olumsuz etkiler yerine, MTA' nın tek seansla periapikal doku tamirini sağlanması, kalsiyum hidroksite alternatif oluşturmaktadır (199).

Huang' ın ilgili makalesinde (59), gelişimini tamamlamamış, kök ucu açık devital bir daimi dişte, apeksifikasyon sağlanması amacıyla, kalsiyum hidroksit yerine neden MTA' nın tercih edildiği şu maddelerle ifade edilmektedir:

1. Kalsiyum hidroksitin, apeksifikasyon tedavisinde kullanılarak apikal bariyer oluşümünün sağlanması, hastanın yaşı ve dişin durumu ile orantılı olarak uzun zaman (20 ay) almaktadır
2. Uzun süreli muayenehane ziyareti hasta için hoş olmayan anı, klinik içinse istenmeyen masraf demektir
3. Kalsiyum hidroksitle uzun süreli apeksifikasyon tedavisinin yapılması, dişin kırılma ihtimalini arttırmaktadır

Kalsiyum hidroksitin sert doku oluşturma özelliği hem vital pulpa tedavileri hem de gelişimini tamamlamamış devital dişlerin iyileşmesini sağlanması açısından önemlidir. Ancak 2000' li yılların başından itibaren diş pulpası ile ilişkili kök hücrelerin tespiti (1), uygulanan rejeneratif tedavilerde, kök kanal boşluğunda apikal bariyer oluşümünden çok, yeni ve canlı bir dokunun varlığını gerektirmektedir. Kalsiyum hidroksitin, kök kanal boşluğundaki dokuyla direkt teması, bu boşluğu doldurabilecek sert doku oluşümünü sağladığı (210) ve diferansiye olmamış mezankim hücrelerinin indüklenerek odontoblastlara farklılaşmasını sağlayan Hertwig epitel kök kınının (HERS) parçalanmasına neden olduğu (211) için rejeneratif endodontik tedavide önerilmemektedir (59). Başlangıçta MTA uygulamasının tedavi süresini kısaltacağı (199) ve hasta üzerinde daha az komplikasyona sebep olacağı düşüncesi varken şu anda MTA' nın koronal tıkaç olarak üçlü antibiyotik bileşimiyle (Metranidazol/Minosiklin/Siprofloksasin) kullanımının rejeneratif tedavi için daha uygun olacağı düşüncesi yaygındır (59). Bu yöntemde, uygulanan tedavi süresinin kısa olması yanında kök kalınlık ve uzunluğunun normal seviyesine ulaşması da (212), kalsiyum hidroksiti ikinci plana atmaktadır. Hatta MTA' nın kök - ucu dolgusu olarak kullanıldığı vakalarda, kemiği indükleme özelliği ile periodontal doku ve kök kanal boşluğu arasında semental bariyer oluşümüne sebep olması (213), rejeneratif tedavi

yaklaşımına ters düşmektedir. Ancak herhangi bir kanal aleti kullanmadan, dezenfeksiyona öncelik verilerek MTA' nın ortograd olarak yerleştirildiği yeni tedavi yaklaşımında, üçlü antibiyotik kullanımına gerek olmadan pulpa rejenerasyonunun kök gelişimiyle birlikte tamamlandığını gösteren çalışmalar da vardır (214)

“*Revitalizasyon*” ve “*Revaskülarizasyon*” terimleri, rejeneratif endodontik işlemler sonucunda, gelişimini tamamlamamış, devital dişler üzerinde oluşan durumu anlatmak için yakın zamanda ortaya atılan kavramlardır. Huang (59), temizlenmiş kök kanal boşluğunda yeni ve canlı bir doku oluşumunu, revitalizasyon olarak nitelendirmektedir. Kanal boşluğunu bağlantı dokusunun doldurduğu ve periapikal reorganizasyonun gözlemlendiği, pulpası olmayan kök ucu açık dişlerdeki iyileşmeler için “*Revitalizasyon*” ifadesinin kullanıldığını gösteren bir araştırma da vardır (215). Canlı pulpa dokusunun oluşumu ve kök gelişimi, apikal papilla ve Hertwig epitel kök kını varlığında olmaktadır. Bu dokuların kaybedildiği, gelişimini tamamlamamış enfekte bir dişte, kök kanal boşluğu sement, periodontal ligament ve kemikle dolar (59, 212, 216). Wang (212), bu durumu, doku rejenerasyonundan çok, yara iyileşme prosedürü olarak tanımlamaktadır. Revaskülarizasyon ise periradiküler enfekte dişlerde dahi var olduğu düşünülen apikal papilla kök hücrelerinin, pulpa nekrozunu iyileştirerek pulpa dokusunun rejenere olmasını sağlamasıdır (59). Periradiküler abseye rağmen canlı kalan pulpa dokusunun varlığı, apikal kısmı oldukça geniş olan dişteki kan desteği ile sağlanır (216). Bu tedavi şeklinde apikal papilla kök hücrelerinin canlı olarak korunması çok önemlidir. Bu hücrelerin canlılığı ancak kök ucundan kaynaklanacak kan akımı ile sağlanabilir (210). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, herhangi bir kanal aleti kullanılmadığı, enfeksiyon kontrolünün ise üçlü antibiyotik kombinasyonu ile sağlandığını görmekteyiz (216, 217, 218). Canlı olarak korunduğuna inanılan diş pulpası ve apikal papilla hücrelerinin dış ortamdan çok iyi izole edilmesi, bu tedavi yaklaşımının ikinci ve önemli bir basamağıdır. Bu amaçla kalan pulpa dokusuna adaptasyonu ve biyoyumluluğu iyi olduğu düşünülen MTA, böyle bir dişin pulpa sınırına yerleştirilmektedir (214). Ayrıca MTA' nın pulpa hücrelerinde proliferasyona sebep olması da tercih edilmesini sağlamaktadır (219). Ancak tedavinin başlangıç aşamasında hastaları huzursuz eden klinik bulguların (perküsyon-palpasyon) giderilmesi amacıyla yine kalsiyum hidroksitten yararlanıldığını görmekteyiz (216, 217).

Rejeneratif tedavide, mikroorganizmaların ortamdan uzaklaştırılması da önemlidir. Cvek (220), pulpa revaskülarizasyonunun başarısını/başarısızlığını, pulpa boşluğunda bulunan bakterilerle ilişkilendirmektedir. Bilindiği gibi steril pulpa varlığında kök gelişimi normal sınırında olmaktadır. Bakterilerin elimine edildiği gelişimini tamamlamamış enfekte devital bir dişte, dişin içinde bulunduğu hastalık evresine göre sahip olduğu (pulpa dokusu, apikal papilla hücreleri, HERS, periodontal ligament, sement, kemik) yapılar, kök kanal boşluğunun dolmasına ve kök gelişimine imkan tanımaktadır (59). Avülse olmuş dişlerin, topikal antibiyotik kullanımı ile replantasyonu sonucundaki, canlılık oranlarının araştırıldığı bir hayvan çalışmasında, minosiklinin oldukça başarılı bulunması da bu sonucu desteklemektedir (221). Kalsiyum hidroksit, sahip olduğu yüksek pH değeri ve OH⁻ iyon salınımıyla, ortamda bulunan mikroorganizmalar üzerinde etkili olarak (222, 223), apikal bariyer oluşumunu sağlamakta ancak kök kanal boşluğunu tı kayabileceği düşüncesiyle tercih edilmemektedir. Ancak tüm bu olumsuzluklarına rağmen, rejeneratif tedavilerin başlangıç aşamasında var olan klinik bulguların giderilmesi amacıyla, yine kalsiyum hidroksitin kullanıldığını görmekteyiz (216). Ara seans dezenfeksiyonunun kalsiyum hidroksitle sağlanmasının ardından, MTA kök kanalının koronal kısmında tıkaç olarak kullanılmaktadır (214, 224). Taşıdığı propilen glikol aljinat sayesinde antibakteriyel etkisi kanıtlanmış olan EMD' nin (163, 164) revaskülarizasyon / revitalizasyon tedavisinde kullanılarak rejeneratif etkinliğinin araştırılması da yerinde olur.

2.3.1. MİNERAL TRİOXİDE AGGREGATE (MTA) ve KALSİYUM HİDROKSİTİN PULPA-DENTİN KOMPLEKSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Açığa çıkmış pulpa dokusunun örtülmesi için kalsiyum hidroksite alternatif oluşturabilecek başka materyellerin karşılaştırmalı çalışmaları hala devam etmektedir. Kalsiyum hidroksitin, her ne kadar çözünürlüğünü azaltmak ve dayanıklılığını arttırmak için geliştirilen formülleri piyasaya sürülse de, uzun dönemde kuafaj materyeli olarak yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Bu amaçla resin bazlı kompozit sistemleri, çinko oksit öjenol, cam iyonmer simanı, rezin adezivler (147), hidroksiapatit kristalleri (148, 149), trikalsiyum fosfat ve mineral trioxide agregat – MTA (150) gibi materyeller denenmektedir. Hatta resin bazlı kompozit sistemlerin (ACSs) özellikle mikrosızıntı

açısından daha avantajlı olduğu, ancak uzun dönem çalışmalarla desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir (225). Self – etching adeziv sistemle dycal’ in karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise, adeziv sistemin pulpa dokusuna uyumunun ve adaptasyonunun daha başarılı olduğu ancak reparatif dentin meydana getirme kapasitesinin Dycal’ a göre zayıf kaldığı ifade edilmektedir (226).

Kalsiyum hidroksitin hem saf, hem de sertleşebilen formları, pulpa dokusu üzerinde sızıntıyı önleyemese bile, sahip olduğu OH⁻ iyonlarının yardımıyla enfeksiyonu baskılamaktadır (225). Mikroorganizmaların bulunduğu bir ortamda, kullanılan materyelin enfeksiyonu kontrol altına alabilmesi, değerini arttıran bir özelliktir. Ancak aynı maddenin bakteriler üzerinde istenen etkisi, canlı dokuya zararının sınırlanmasını gerektirmektedir. Bu da araştırmacıları, benzer etkileri gösteren başka materyel arayışına itmiştir. Daha önceden de belirtildiği gibi pulpa dokusunun MTA ile örtülmesi sonucunda, daha az bir enflamatuar yanıtla sert doku oluşumunun gözlenmesi, MTA’ nın pulpa kuafajı için kalsiyum hidroksite alternatif olabileceğini düşündürmüştür (189, 190, 191, 192). Pulpa kuafajında MTA kullanılarak, dentin köprüsünün oluştuğunu gösteren çeşitli hayvan çalışmaları vardır. (192). Klinik ve laboratuvar çalışmasının birleştirildiği bir fare çalışmasında, MTA ile oluşan dentin köprüsünün, kalsiyum hidroksitle oluşan aksine, açığa çıkmış pulpa dokusunun tamamen izolasyonunu sağlayacak şekilde, dentin duvarlarına adapte olduğu ifade edilmektedir (227). Nair (192), insan dişleri üzerinde dycal ve MTA’ yı kullanarak yaptığı çalışmasında, MTA ile oluşan dentin köprüsünün daha kompakt yapıda olduğunu vurgulamıştır. Nair ayrıca kalsiyum hidroksitin, pulpa dokusunda akut ve kronik enflamasyona sebep olduğunu ve oluşturduğu sert doku bariyerinin tünel defektleri içerdiğini, yaptığı histolojik incelemeye dayanarak ortaya koymuştur. MTA’ nın enflamasyonda kilit rol oynayan prostoglandini (PGE2) etkileyerek, dentin köprüsü oluşumuna katıldığı belirtilmektedir (228). Bu durum belki vital pulpa tedavilerinde MTA’ nın, antienflamatuar etkisini açıklamaktadır. Silva (229), MTA ile temasta olan pulpa dokusundaki antienflamatuar reaksiyonu, sitokin salınımıyla ilişkilendirmektedir. Prostoglandinin sadece enflamatuar reaksiyonda rol almadığı aynı zamanda hücre proliferasyonu, rejenerasyonu ve büyümesiyle de ilgili olduğu belirtilmektedir (230). Ayrıca MTA ve kalsiyum hidroksitin hazırlanmasını takiben ortaya çıkan pH değerlerinin, açığa çıkmış pulpa dokusundaki enflamatuar reaksiyona etkisi göz ardı

edilmemelidir. Hatta materyellerin sahip olduğu pH değeri, meydana gelen sert doku bariyerinin morfolojisi ve lokalizasyonunu belirlemektedir (231). Kalsiyum hidroksitin nekrotik tabaka oluşturarak hücreleri indüklemesinin aksine, MTA' nın hücrelerle direkt temasında olumlu etkisinin bulunması, dokuyla uyumluluğu açısından bir avantajdır. Ancak tamir dentini oluşumunda, hücrelere etki mekanizmasının anlaşılması için çalışmalar hala devam etmektedir. Kuratate ve ark. (183), MTA ile örtülen pulpa dokusundaki reparatif dentin oluşum mekanizmasının, kalsiyum hidroksitin hücreler üzerindeki etki mekanizmasıyla benzerlik gösterdiğini belirtmektedir. Bilindiği gibi kalsiyum hidroksit, oluşturduğu nekroz tabakası sayesinde hücrelerin uyarılarak göç etmesi, çoğalması ve farklılaşmasını sağlamaktadır (160). Odontoblast hücresine farklılaşan pulpanın öncü hücreleri, matriks sentezi ve mineralizasyonu ile dentin benzeri sert dokuyu oluşturmaktadır (183). MTA ise, açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde önce kristalin bir yapı oluşturmakta, bunun pulpa tarafına bakan kısmında ise fibronektinden zengin bir tabaka meydana getirmektedir. Bu tabaka sayesinde kök dentininden büyüme faktörlerinin salınımı ile sert doku oluşumu sağlanmaktadır (232). Aslında kalsiyum hidroksit ve MTA' nın ortamda yarattığı alkale özelliikle, büyüme faktörlerinin salınımını sağladığı da belirtilmektedir (232).

Gelişimini tamamlamadan alınmış jerm halindeki 20 yaş dişlerinin bütünüyle kullanıldığı in vitro bir çalışmada, kalsiyum hidroksit ve MTA' nın reparatif dentinogenesisteki etkinliği incelenmiş. Her iki materyelin de açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde osteodentin yapıda mineralize bir saha meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ancak MTA' nın oluşturduğu yapı, uygulamadan çok kısa bir süre sonra, pulpa dokusuna oldukça yakın bir yerde, kalsiyum hidroksitin etkisiyle oluşana kıyasla daha ince, homojen ve lokalize olarak meydana gelmiştir. Araştırmacılar MTA' nın daha erken aşamada ortaya çıkan bu etkinliğini, biyoyumluluğuna ve kalsiyum salgılama özelliğine bağlamaktadır (233).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda, dentin köprüsünün oluşumu, açığa çıkmış pulpa dokusunun korunması için yeterliydi (234). Ancak rejeneratif endodontik işlemler adı altında yapılan son dönem çalışmalarda, kısmen veya tamamen canlılığını yitirmiş pulpa dokusunun proliferasyonu, hatta yeniden oluşumu sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu durumun sağlanabilmesi, tercih edilen materyeller kadar pulpa içinde bulunan ve

rejenerasyona yatkın olan kök hücrelerin uyarılmasıyla da ilişkilidir. Gelişimini tamamlamamış, enfekte non-vital dişlerde pulpa revaskülarizasyonu ve kök gelişiminin tamamlanması için apikal papilla ve diş pulpası kök hücrelerinin etkinliğinden söz edilmektedir (58, 210). Bu rejeneratif yöntemden yola çıkarak, kanal aleti kullanmaksızın, dezenfeksiyonun önemsendiği, kök kanalının mine – sement sınırına kadar olan 4mm' lik kısmının MTA ile doldurulduğu, tedavilerde (214, 224), kök gelişiminin normal sınırında olması bu sonucu desteklemektedir. Bu sebeple günümüzde, vital pulpa tedavilerinde de, öncü hücrelerin uyarılması için araştırmacılar sement yapısında materyeller yanında bazı biyoaktif moleküller denemektedir. Örneğin TGF- β , antienflamatuar sitokin salınımını baskılayarak (129) hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkin rol oynamaktadır (204). Bu molekülün bir alt familyasında bulunan ve kemik, kırıkta, sement ve periodontal ligament oluşumu yanında dentin köprüsü oluşumunda da rolü olduğu bilinen bazı proteinlere [Bone morphogenetic proteins-(BMPs)] dair araştırmalar da bulunmaktadır (97, 204, 235). Bu amaçla yapılan bir çalışmada, MTA ile BMP-7' nin pulpa dokusu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuçta MTA ile oluşturulan sert dokunun, BMP-7 ile oluşturulana oldukça benzediği tespit edilmiştir. Ancak büyüme faktörü etkisiyle meydana gelen doku, kemik benzeri morfoloji göstermektedir. (35). Başka bir biyolojik materyel olan BMP-2' nin pulpa dokusunda bulunan hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasında daha etkili olduğu düşünülmektedir (15, 236). BMP- 2 ve BMP – 4' ün köpek dişleri üzerinde amputasyon tedavisi için kullanıldığı bir çalışmada, her ikisinin de kollagen matriks içinde taşınarak, açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde osteodentin yapımını başarılı şekilde uyardığı gözlenmiştir (97). Bu çalışma sonucu, yine kollagen matriks üzerinde taşınarak amputasyon tedavisi için maymun dişlerinde kullanılan BMP – 7 (OP1)' nin ortaya çıkardığı yapı ile benzerlik göstermektedir (235). Kuratate (183), tamir dentini oluşumunda, osteopontin molekülünün açığa çıkmış pulpa dokusu ile yüzeysel nekroz tabakası arasında depolanmış olmasını, reparatif dentinogenezi başlatmasına bağlamaktadır. MTA' nın mineralizasyona olan etkisinin değerlendirildiği fareler üzerinde yapılan bir başka in vitro çalışmada, MTA' nın etkisiyle BMP-2 salınımının arttığı gözlenerek, tamir dentin oluşumundaki etkinliği vurgulanmıştır (182). Kullanılan biyolojik materyeller kadar, kök hücrelerin hareket mekanizmasının çözülmesi de tamir olayının daha anlaşılır olmasını sağlayacaktır. Simon (227), genetik yapısı değiştirilmiş fare modelinin pulpa kuafajında

kullanılmasıyla, reparatif mekanizmanın hücresel ve moleküler düzeydeki aktivitesinin anlaşılmasına ışık tutacağına inanmaktadır.

Pulpa dokusunun cevabında, yine bir biyolojik aktif molekül olan EMD ile MTA ve kalsiyum hidroksitin karşılaştırmalı kullanıldığı çalışmalar vardır (122, 157, 158, 159, 161, 237). Nakamura (237), Dycal ve EMD' i pulpotomi amacıyla kullandığı bir hayvan çalışmasında, EMD ile oluşan reparatif dentinin, temas ettiği pulpa dokusu ve kök dentininde herhangi bir değişiklik meydana getirmeden daha fazla miktarda oluştuğunu belirtmektedir. Bu çalışmada ayrıca kalsiyum hidroksitin kök kanal boşluğunun daralmasına sebep olduğundan bahsedilmektedir.

Kalsiyum hidroksit oluşturduğu nekrotik tabaka (160) ile etki sağlarken; MTA hücreleri indükleyerek özel proteinlerin açığa çıkmasına sebep olmaktadır (182, 232). Emdogain ise hem sahip olduğu moleküller (43, 44, 128) hem de hücreleri uyararak (111, 134) salınımını sağladığı maddelerle pulpa cevabı oluşturmaktadır. Etki mekanizması ne şekilde olursa olsun, bu üç materyel vital pulpa tedavilerinde başarı ile kullanılmaktadır. Hatta EMDOGAİN ve MTA' nın karıştırılarak kullanıldığı bir çalışma sonucunda elde edilen bulgular, jel formunda olan bu materyelin taşınma sorununu da ortadan kaldırmaktadır (158).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. JERM HALİNDEKİ İNSAN 20 YAŞ DIŞLARINDAN ALINAN KÖK HÜCRELERİN KULLANILMASI:

Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü tarafından gelişimini henüz tamamlamamış 20 yaş dış jermelerinden izole edilip, karakterizasyonu yapılarak dondurulan hücreler, bölümün izni ile çalışmaya dahil edildi (yaş aralığı 11-17) (54).

Kök hücrelerin içinde dondurulmuş halde bulunan tüpler, 37°C' deki suyun içinde hafif bir çalkalama hareketiyle çözdürüldü. Hücreler, donmasını sağlayan ortam sıvısının uzaklaştırılması için büyüme besiyeriyle yıkandı. Supernatant uzaklaştırıldı, tekrar büyüme besiyerine kondu ve 500 gram' da 5 dakikalığına santrifüj edildi. Dondurulmuş ve tekrar çözdürülmüş bu hücrelerin canlılığı, standart trypan boyası¹ ile tespit edildi.

Canlılığı yeterli bulunan hücreler, içerisinde %10 fetal bovine serum (FBS)², %1 penisilin – streptomisin - fungizon (PSF) karışımı³ (5,000 units/ml penisilin ve 50µg/ml streptomisin - 20ml), 2mM L-glutamin⁴ bulunan besiyerine (DMEM - Dulbecco' s modified eagle medium, low glucose 500ml - 1X)⁵, konularak 37 °C' de %5 CO₂, % 95 atmosfer basıncına sahip, nemli inkübatörde bekletildi (1, 120). Kök hücrelerin, çoğalmaları ışık mikroskobu altında hergün takip edildi. Hücrelerin, yapışıp çoğalarak flask yüzeyini % 70-80 oranında kaplamasıyla pasajlama işlemine geçildi. Bu işlemin amacı, kullanılmış olan besiyerlerinden hücreleri ayırmak ve daha büyük ölçeklerdeki taze besiyerine aktarmaktır. Hücreler, tripsin-EDTA solüsyonu⁶ (1x) kullanılarak kaldırıldı ve pasajlanarak yeni flaslara aktarıldı. Bu olay istenilen pasaj düzeyine gelene kadar sürdürüldü (48).

¹ Standart trypan boyası, T8154 Sigma Trypan Blue solution

² Fetal bovine serum, Sigma Aldrich F0926 – 100ml

³ PSF, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

⁴ L-glutamine, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

⁵ DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

⁶ Tripsin-EDTA solüsyonu, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.2. ÇOĞALMA DENEYİ;

3.2.1. MATERYELLERİN HAZIRLANMASI:

Çoğalma deneyi için materyallerden öncelikle Mineral Trioxide Aggregate (ProRoot MTA)⁷ ve kalsiyum hidroksit bazlı siman (Dycal)⁸ hazırlandı. Toplam 7 grup oluşturuldu ve 96 bölmeli plak⁹ kullanıldı. Negatif kontrol grubu olarak hücre kültür plağı- HKP(-), pozitif kontrol grubu olarak ise %20' lik DMSO¹⁰ kullanıldı.

1. Grup: MTA
2. Grup: MTA+ EMDOGAİN¹¹
3. Grup: DYCAL
4. Grup: DYCAL+EMDOGAİN
5. Grup: EMDOGAİN
6. Grup: %20 DMSO [(+) Kontrol grubu]
7. Grup: HKP(-) [(-) Kontrol grubu]

Malzemeler, 96 bölmeli plağın tabanına, yaklaşık 2.5 mm yüksekliğinde olacak şekilde (Resim 8), üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda karıştırılarak yerleştirildi. Böylece hücrelerle temas eden test materyali yüzey alanı 50 mm² olarak hazırlandı. 37°C, %5 CO₂ ve nemli inkübatörde 4 gün sertleşmesi için beklendi (238, 239).

Materyellerin sertleşmesini takiben MTA ve Dycal, asetik asit içerisinde çözdürülen 200 µg/ ml Emdogain gel (30mg/ml ve 0.7 ml) ile kaplanarak (Resim 9) bir gece +4 °C' de bekletildi (120). Kuyucukların tabanına hazırlanan materyellerin donmasını takiben, üzerlerine direkt olarak hücreler kondu. Böylelikle, hücrelerin çoğalması ve SEM görüntülerinin tespiti, materyel üzerinde sağlanacaktı. Burada istenen, diş jermi kök hücrelerinin üzerine Emdogain, MTA ve Dycal veya bunların kombinasyonları koyulduğu zaman, hücrelerin materyellere cevabının in vitro olarak belirlenmesidir.

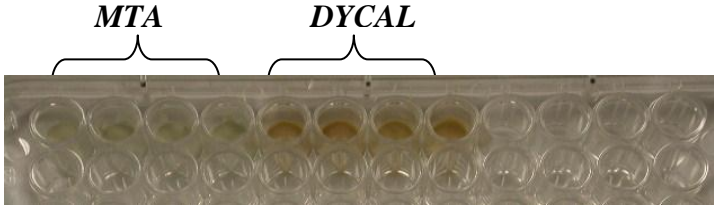
⁷ MTA, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA

⁸ Dycal, Dentsply Caulk, Milford, DE

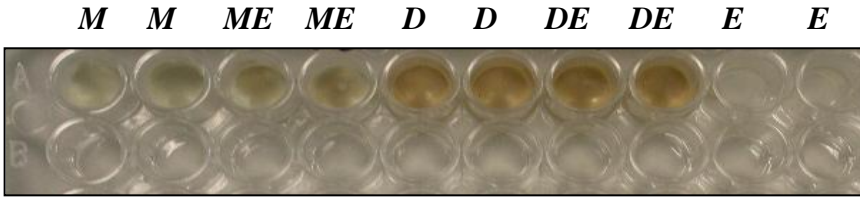
⁹ 96 bölmeli plak, Nunc, USA

¹⁰ DMSO, D4540 Sigma Dimethyl sulfoxide

¹¹ EMD, Biora AB, Malmö, Sweden



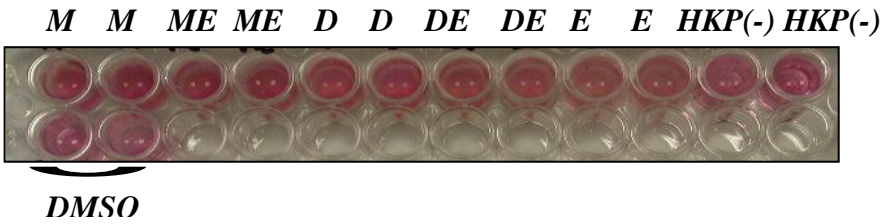
Resim 8: Materyallerin kök hücreler üzerindeki proliferatif etkisinin *MTS yöntemiyle* saptanması amacıyla MTA ve DYCAL'ın hazırlanması görülmektedir.



Resim 9: EMDOGAİN eklendikten sonraki görüntüsü. (**M:** MTA; **ME:** MTA/EMD; **D:** Dycal; **DE:** Dycal/EMD; **E:** EMD)

3.2.2. HÜCRE EKİMİ:

Bir gece + 4°C' de bekletilen kuyucuklardan Emdogain'in sıvı kısmı uzaklaştırıldı. Laminar flow içinde, kapakları açık bir şekilde bir gün bekletildikten sonra UV altında 30 dakika tutuldu. Steril PBS (fosfat tampon solüsyonu)¹² ile iki kere yıkandı. Başka bir plakta beş kez pasajlanmış olan hücrelerin 10 µl' si, hemositometre üzerine konarak ışık mikroskobu altında sayıldı. 96 bölmeli plak için 3000 hücre/kuyucuk (120) olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı (Resim 10). 2 gün süreyle inkübatörde bekletildi.



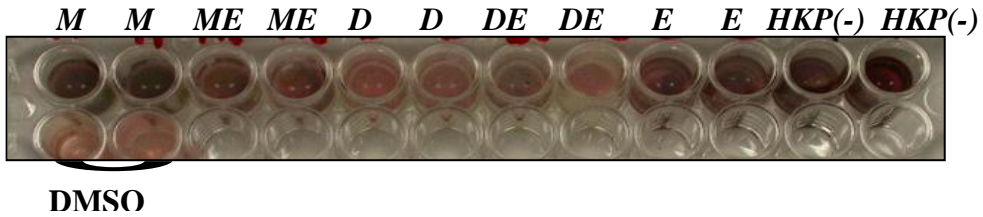
Resim 10: Hücre ekimi yapıldıktan sonraki görüntüsü. **M:** MTA; **ME:** MTA/EMD; **D:** Dycal; **DE:** Dycal/EMD; **E:** EMD; **HKP:** Hücre kültür plağı [(-) Kontrol]; **DMSO:** (+)Kontrol

¹² **PBS**, GIBCO™ Phosphate-Buffered Saline (PBS) 7.2 (1X); liquid from Invitrogen

3.2.3. MTS TESTİ:

Bu yöntem, hücre büyümesi için gerekli olan metabolik bileşenlerin fonksiyonlarını tespit ederek canlılığı ortaya koyar. Hücrede meydana gelen bir hasar, hücrenin hayati fonksiyonu ve büyümesi için lazım olan enerjinin sağlanması ve sürdürülmesine engel olur. **MTS**¹³ (3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium), mitokondride bulunan enzim aktivitesini tespit eden bir tetrazolium-tuz bazlı kolorimetrik yöntemdir. Canlı hücrelerde bulunan enzimlerin MTS' i formazana indirgemesi ile sarı renkte olan solüsyon mor renge dönüşür.

- ❖ Materyellerle aynı besiyerinde 2 gün kalan hücrelerden, 100 µl alınarak ayrı bir 96 bölmeli plağa kondu.
- ❖ Üzerlerine 10 µl MTS - Metiltetrazolium boyasından eklenerek 2 saat inkübatörde bekletildi (Resim 11).
- ❖ Bu sürenin sonunda, formazan oluşumuyla ortaya çıkan abzorban değeri, 96-well plate reader cihazında¹⁴ okutuldu.



Resim 11: *MTS-Metiltetrazolium* boyası eklendikten 2 saat sonraki hücrelerin görüntüsü.

¹³ **MTS**, CellTiter96 Aqueous One Solution, Promega, UK

¹⁴ **96-well plate reader**, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA

3.3. FARKLILAŞMA DENEYİ;

3.3.1. ODONTOJENİK BESİYERİNİN HAZIRLANMASI:

Hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını sağlamak amacıyla, 50µg/ml Askorbik asit¹⁵ ve 2mM 2- β-Gliserolfosfat¹⁶ kullanıldı. Tek bir falkon tüp içinde 20 ml besiyeri kullanılarak hassas terazide ölçülen 10 mg Askorbik asit ve 86.4 mg β-Gliserolfosfat çözdürüldü. 24' lük kuyucukların herbirine 50 µl Askorbik asit / β-Gliserolfosfat kondu, kalan kısım da 450 µl besiyeriyle tamamlandı. Bu işlem 14 gün boyunca gūnaşırı tekrarlandı (83).

3.3.2. TEST MATERYELLERİNİN HAZIRLANMASI:

Çoğalma deneyinden farklı olarak, bu çalışmada 4 grup oluşturuldu. İlk olarak MTA üretici firmanın belirttiği doğrultuda hazırlandı. 24 bölmeli plağa 10 mm yüksekliğinde yerleştirildi (Resim 12). Böylelikle hücrelerle temas eden yüzey alanı 200 mm² olarak belirlenmiş oldu. Sertleşmesi için 4 gün inkübatörde bekletildi (238, 239). MTA' nın donmasını takiben Emdogain hazırlandı (Resim 13) (120). Materyel kullanmadan sadece odontojenik besiyeri ile indüklenen grup, (+) Kontrol grubu- HKP(+) olarak belirlendi. MTS testinde Dycal' ın toksik etkisi tespit edildiği için farklılaşma deneyinde yer verilmedi.

Grup A: MTA

Grup B: EMDOGAİN

Grup C: HKP(+) [(+) Kontrol grubu]

Grup D: (-) Kontrol grubu

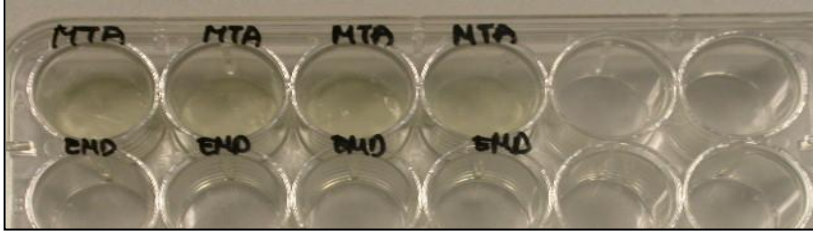
MTA MTA MTA MTA



Resim 12: MTA, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlanarak 10 mm yüksekliğinde yerleştirildi.

¹⁵ Askorbik asit, Sigma, Saint-Louis, MO, USA

¹⁶ Beta gliserolfosfat, Sigma, Saint-Louis, MO, USA



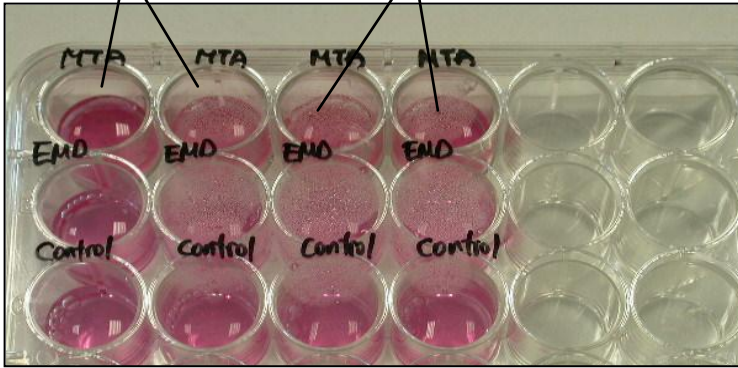
Resim 13: MTA'nın donmasını takiben, EMDOGAİN hazırlandı.

3.3.3 HÜCRE EKİMİ:

Her kuyucuğa 25.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılarak, üzeri 450 µl besiyeri ile dolduruldu (Resim 14) (120). Odontojenik besiyeri içeren grup, (+) Kontrol grubu- HKP(+) olarak belirlendi.

PCR için RNA
izolasyonu yapılacak

ALP aktivitesi incelenecek



Resim 14: Hücre ekimi yapıldıktan sonraki görüntü. Çalışmanın sonunda her gruptan 2 kuyucuk PCR, 2 kuyucuk ise ALP aktivitesine bakmak üzere kullanıldı.

3.3.4. GRADİENT POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Gradient PCR):

Bu deneyde, test materyellerinin, hücrelerin farklılaşmasına olan etkisini değerlendirmek amacıyla PCR yapıldı.

PCR – Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları:

- 3.3.4.1. RNA izolasyonu
- 3.3.4.2. cDNA sentezi
- 3.3.4.3. Ana karışımın hazırlanması
- 3.3.4.4. Primerlerin hazırlanması
- 3.3.4.5. cDNA'ın çoğaltılması
- 3.3.4.6. Jelde yürütme işlemi

3.3.4.1. RNA izolasyon protokolü:

Hücreler tripsinle kaldırılmadan, aynı kuyucuk içerisinde liziz tampunu ile parçalandıktan sonra RNA izolasyon işlemine başlandı. Bunun için High Pure RNA İzolasyon Kit¹⁷ kullanıldı.

- ❖ 100 µl PBS (fosfat tampon solüsyonu) hücrelerin üzerine koyulduktan sonra, 200µl lysis binding buffer eklendi.
- ❖ Örnekler 15 saniye vortexlendi.
- ❖ Sonra örnekler, RNA izolasyon kitinde bulunan filtre tübüne alındı.
- ❖ 14000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, toplama tüpündeki atık dökülerek filtre tüpü tekrardan toplama tüpü (izolasyon kitinde var) içine yerleştirildi.
- ❖ Bir eppendorf tüp içine 225µl DNA inkübasyon buffer, üzerine de 25µl DNAaz I kondu.
- ❖ Sonra bu tüp içinden 50 µl alınarak her bir tüpe konarak, 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Üzerlerine 500 µl wash buffer I kondu. Ve 14000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi.
- ❖ Toplama tüpündeki atıklar yeniden uzaklaştırıldı.
- ❖ Filtre tübü üzerine 500 µl wash buffer II kondu, 14000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi.

¹⁷ **High Pure RNA İzolasyon Kit**, Roche Applied Science Indianapolis, IN, USA

- ❖ Santrifüjden sonra, toplama tüpüne 200 µl wash buffer II kondu, 14000 rpm’ de 2 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Yine toplama tüpleri atılarak bu sefer filtre tüpleri 2ml’ lik eppendorf tüp içine kondu.
- ❖ Filtre tüplere 50 µl elution buffer kondu ve hücreler 14000 rpm’ de 2 dakika santrifüj edildi.
- ❖ Eppendorfta kalan RNA’ lar nanofotometrede değerlendirildi.

Elde edilen RNA konsantrasyonları:

Nanofotometre TM - İMPLEN cihazı kullanılarak ölçüm yapıldı. Öncelikle aletin kalibrasyonu sağlandı. Bunu takiben, yoğunluğu ölçülmek istenen örnekten 3 µl alınarak yoğunluk ölçümü yapıldı. Bunu yapmaktaki amaç, cDNA sentezi için yeterli yoğunlukta RNA izolasyonu sağlanıp sağlanamadığının görülmesidir. Buna göre bulunan değerler:

❖ EMDOGAİN	30 ng/µl
❖ MTA	10.8 ng/µl
❖ HKP(+) [(+) Kontrol grubu]	18.8 ng/µl
❖ (-) Kontrol grubu	74.0 ng/ µl

3.3.4.2. cDNA sentezinin yapılması

cDNA sentez kiti¹⁸ kullanılmıştır. Bütün örneklerden cDNA sentezi için yaklaşık olarak aynı miktarda RNA alınmıştır.

❖ EMDOGAİN	8 µl
❖ MTA	20 µl
❖ HKP(+) [(+) Kontrol grubu]	12 µl
❖ (-) Kontrol grubu	3 µl

Örnek RNA+Distile su ve Oligo dT’ ler 15 µl’ lik hacim içerisinde 10 dakika 65°C’ de bekletildi.

¹⁸ **cDNA Sentez Kiti**, Roche Applied Science Indianapolis, IN, USA

3.3.4.3. Ana karışımın hazırlanması:

Bu karışım, 4 RNA örneği ve bir ekstra örnek için aşağıda belirtilen miktarlarda hazırlandı.

❖ Reverse Transkriptaz buffer:	4 µl x 5
❖ Reverse Transkriptaz enzim:	0.3 µl x 5
❖ RNase inhibitör:	0.2 µl x 5
❖ dNTP:	0.5 µl x 5

Her bir RNA oligodT karışımı üzerine (15µl) 5µl ana karışımdan ilave edildikten sonra, elde edilen karışım (20µl), PCR tüpleri içerisinde, PCR cihazında 50 °C' de 30 dakika, 85 °C' de 5 dakika bekletilerek cDNA lerin sentezi yapıldı.

3.3.4.4. Primerlerin hazırlanması:

Primerler toz halinde olduğu için DNase ve RNase içermeyen ultra saf distile su ile sulandırıldı. 90 µl distile su + 10µl primer kullanılarak % 10' luk (10µM) primer elde edilmiş oldu. DSPP ON, GAPDH primerlerinin optimizasyonu için, 50 °C -60 °C arasındaki sıcaklığın denendiği bir gradient PCR yapıldı. 20 µl PCR karışımının içeriği ve primerlerin sekans bilgileri aşağıdaki gibidir.

PCR analizinde kullanılan primerler ve referansları:

DSPP	Forward: 5'-GAGGATAAAGGACAACATGG-3' (<i>AlliotLicht, 2005</i>) ²⁴⁰ Reverse: 5'- AAGAAGCATCTCCTCGGC - 3'
ON	Forward: 5'-ATGAGGGCCTGGATCTTCTT-3' (<i>Alliot-Licht, 2005</i>) ²⁴⁰ Reverse: 5'-CTGCTTCTCAGTCAGAAGGT-3'
GAPDH	Forward: 5'-TATCGTGGAAGGACTCA-3' (<i>Lisignolia, 2005</i>) ²⁴¹ Reverse: 5'GCAGGGATGATGTTCTGGA-3'

DSPP - PCR karışımının hazırlanması:

❖ PCR buffer:	4 µl x
❖ dNTP:	0.5 µl x
❖ DSPP forward:	0.3 µl x
❖ DSPP reverse:	0.3 µl x
❖ cDNA örneği:	2 µl x
❖ Distile su:	11.7 µl x
❖ GoTaq DNA Polimerase:	0.2 µl x
❖ MgCL ₂ :	1 µl x

GAPDH ve ON – PCR karışımının hazırlanması:

❖ PCR buffer:	4 µl x
❖ dNTP:	0.5 µl x
❖ GAPDH/ON forward:	0.4 µl x
❖ GAPDH/ON reverse:	0.7 µl x
❖ cDNA örneği:	1 µl x
❖ Distile su:	15.8 µl x
❖ GoTaq DNA Polimerase:	0.2 µl x
❖ MgCL ₂ :	1.5 µl x

Tüm genler için 20 µl hacminde 8 ayrı tüp PCR cihazında 50 °C ile 60 °C arasındaki farklı sıcaklıklara ayarlanmış kuyucuklara yerleştirildikten sonra, PCR şartları cihaza aşağıdaki gibi girildi.

95°C' de 3 dakika 1 kez

95°C' de 30 saniye + 50-60°C'de 45saniye + 72°C'de 45 saniye 35 kez.

72°C de 5 dak 1 kez

4°C'de bekleme (Sonsuz: Örnekler Jel'e yüklenene kadar cihazda +4°C' de tutuldu)

3.3.4.5. Jelin hazırlanması:

1 gram toz halindeki Agaroz + 100 ml TAE ve TBE* tamponu ile bir erlen şişe içerisinde karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında 600°C' de 3 dakika bekletildi. Üç dakikalık beklemenin ardından şişe 5 dakika soğumaya bırakıldı. Soğumayı (şişenin el yakmayacak sıcaklığa düşmesi) takiben, şişe içine 2.5µl Etidyum bromid[#] koyulup karıştırıldı. Bu karışım tarakların bulunduğu jel tankı içine döküldü. Tank içindeki karışım donduktan sonra, taraklar çıkarıldı. Jel 900 ml distile su ve 100 ml % 5 lik TAE karışımı içeren jel tankına tamamen gömüldükten sonra, jel üstünde kalan kuyucuklara önce 5 µl marker¹⁹, sırasıyla da her bir kuyucuğa PCR cihazından alınan tüplerden, 8 µl DNA örnekleri kondu.

Jel tankı, güç kaynağının artı ve eksi kutuplarına bağlandıktan sonra, örneklerin 100 Watta 45 dakika boyunca, jelde yürümesi sağlandı.

3.3.4.6. Elde edilen cDNA bantlarının görüntülenmesi:

Jel elektroforez işleminden elde edilen DNA bantları, jel görüntüleme cihazında görüntülenerek, istenen cDNA sentezi için gerekli olan en uygun sıcaklık ve primerlerin spesifik bağlanıp bağlanmadığı tespit edildi

3.3.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Real Time-PCR):

- ❖ Klasik PCR ve jel elektroforez işlemleri, kullanılan primerin cDNA üzerindeki ilgili bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını gösterirken, RealTime-PCR, primerin etkisiyle çoğalan cDNA' nın miktarı ile ilgili bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır. Bu çalışmada EMDOGAİN, MTA, HKP(+)[(+)] Kontrol grubu] ve

***TAE ve TBE:** İletkenliği sağlayan kimyasallardır. DNA (-) yüklü, jel (+) yüklü olduğu için, elde edilen DNA molekülü jelin üzerinde yürüyerek istenilen görüntüyü verir.

[#]**Etidyum bromid:** DNA' nın çift sarmalı arasına yerleşerek DNA' yı özel ultraviyole ışık altında görünür hale getiren boya.

¹⁹**Marker,** Wide range DNA marker, Sigma D7058

Moleküler ağırlığı belli olan DNA parçasıdır. Reaksiyon başlayınca, mol ağırlığına göre aşağıya doğru dağılır. En yukarıda mol ağırlığı en yüksek olan bulunur.

(-) Kontrol grubu örneklerinin ekspres ettikleri DSPP ve ON miktarları Real Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. GAPDH geninin ifadesi, örneklerden alınan RNA' ların normalizasyonu için standart olarak kullanılmıştır. Çalışmada Takara firmasının ürettiği SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] kiti üretici firmanın tavsiyeleri dikkate alınarak yapılmıştır.

3.3.5.1. Örnek cDNA' lerin sulandırılması:

20 µl cDNA + 180 µl distile su kullanılarak yapıldı. Toplamda, 200 µl omalıdır.

3.3.5.2. Reaksiyon karışımının hazırlanması:

Üretici firmanın belirlediği miktarlara göre DSPP, ON ve GAPDH için hazırlanan 20 µl' lik reaksiyon karışımının içeriği aşağıda belirtilmektedir.

3.3.5.2.1. DSPP için reaksiyon karışımının hazırlanması:

- ❖ SYBRgreen buffer²⁰: 10 µl
- ❖ DSPP forward: 0.4 µl
- ❖ DSPP reverse: 0.4
- ❖ cDNA örneği: 2 µl
- ❖ Distile su: 7.2 µl

3.3.5.2.2. GAPDH ve ON için reaksiyon karışımının hazırlanması:

- ❖ SYBRgreen buffer: 10 µl
- ❖ GAPDH/ON forward: 0.2 µl
- ❖ GAPDH/ON reverse: 0.2 µl
- ❖ cDNA örneği: 2 µl
- ❖ Distile su: 7.6 µl

3.3.5.3. Hazırlanan karışımın RealTime-PCR cihazında okutulması:

SYBRgreen boyası, yeni oluşan DNA moleküllerine bağlanarak floresan ışımaya yapar. Bu ışımaya, RealTime-PCR cihazı tarafından (Normal PCR' dan farklı olarak) algılanarak ışımaya şiddetine rakamsal değer verilir, böylece sentez edilen DNA' nın miktarı ölçülür. Bu ölçüm için iCycler RealTime-PCR detection system²¹ kullanıldı.

²⁰ **Syber Green Buffer**, Takara Syber Green Polymerase kit, Japan

²¹ **iCycler RT-PCR detection system**, Bio-Rad, Hercules, CA, USA

3.3.6. MİKROSKOBİK İNCELEME

Işık mikroskobu²² altında Emdogain, (+) ve (-) kontrol gruplarının 4x, 10x, 20x büyütmeyle plak üzerinden fotoğrafları alındı.

MTA grubu, kuyucuğun tabanını kapladığı için ışık mikroskobunda çekimi yapılamadı.

3.3.7. VON KOSSA BOYAMASI:

Von Kossa methodu²³, hücrelerin meydana getirdiği kalsiyum iyonlarıyla gümüş katyonlarının yer değiştirmesi esasına dayanır. Kalsiyum tuzları, dışarıdan eklediğimiz gümüş nitrat solüsyonu sayesinde metalik gümüşe indirgenerek gümüş tuzları haline gelir ve siyah bir görüntü verir.

Boyama protokolü:

- ❖ Kuyucukların içindeki besiyerleri aspire edilerek, % 2 paraformaldehitten 500 µl konarak, +4°C de 30 dakika bekletildi.
- ❖ Distile su ile yıkama yapıldı.
- ❖ Set içerisinde bulunan maddelerden ilki olan A maddesinden 10 damla herbir kuyucuğa konup 10 dakika beklendi.
- ❖ Distile su ile yıkandı.
- ❖ B maddesinden 10 damla konarak, karanlıkta 1 saat beklemeye bırakıldı.
- ❖ Distile su ile yıkandı.
- ❖ 5 damla distile su ile 10 damla C maddesi eklenerek, 5 dakika gümüş tuzlarının siyah renk alması için beklendi.
- ❖ Distile su ile yıkandı.
- ❖ D ve E maddelerinden ayrı ayrı 10' ar damla eklenerek, 5' er dakika beklendi.
- ❖ Distile su ile son kez yıkanarak 10 damla alkol kondu. Alkol aspire edilerek ışık mikroskobu altında oluşan kalsiyum depozitleri incelendi.

²² Işık mikroskobu, Nikon TS100, Minnesota, MN, USA

²³ Von Kossa method, Bio-optica, Milano, Italy

Boyama protokolünde kullanılan maddeler:

A- Lityum karbonatın çökelmiş solüsyonu	30ml
B- Gümüş nitrat solüsyonu	30ml
C- İndirgeme solüsyonu	30ml
D- Sodyum sülfid solüsyonu	30ml
E- Mayer' s Carmalum	30ml

3.3.8. ALKALEN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ:

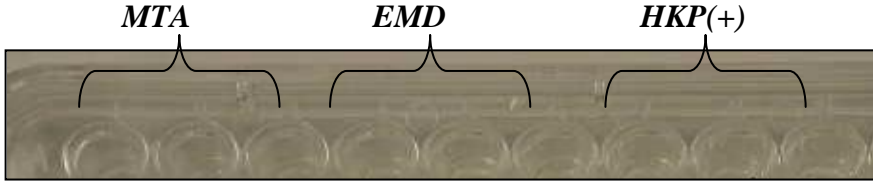
Normal yetişkinde kanda bulunan alkalen fosfataz enzimi, sert kemiksi dokuların mineralizasyonunda etkilidir. Fosfat naklini düzenleyerek, kalsifiye doku oluşumunu sağlar. Alkalen fosfataz aktivitesi, hücre kültür sistemlerinde, sert doku yapımını indükleyicidir ve osteoblast ve odontoblastlar için erken tanı işaretidir (93). Bu nedenle, osteoblastik aktivitenin varlığı, özel boyama sistemiyle laboratuvarında tespit edilir.

Alkalen fosfataz aktivitesi uygulama protokolü:

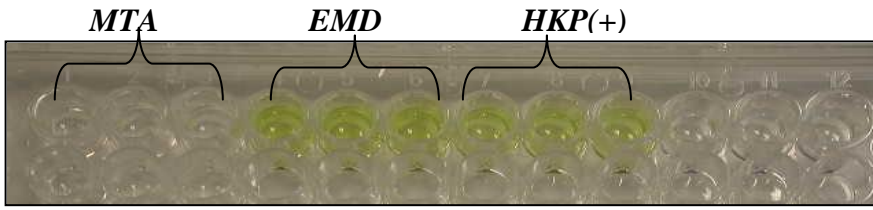
- ❖ Hücreler tripsinle kaldırılmadan, 24 bölmeli plak üzerinde, kuyucukların herbirine 500µl 0.2% Triton-X 100 koyuldu. Bu maddenin kullanım amacı, hücreleri parçalayarak içerisindeki proteini açığa çıkarmaktır.
- ❖ Karışım, 300rpm' de çalışan shaker üzerinde 30dak. sallanarak, inkübe edildi.
- ❖ Pipetle çok iyi karıştırılarak 96 bölmeli plak içerisine herbir örnekten 25µl alındı (Resim 15).
- ❖ Üzerlerine ALP protokolüne göre 75µl Randox ALP belirleme ajanı²⁴ (Resim 16) eklendi.
- ❖ 15 dakika aralıklarla 1saat boyunca 96 well plate reader²⁵ ile abzorban değeri ölçümü yapıldı.

²⁴ **Randox ALP belirleme ajanı**, Randox Laboratories, Crumlin, UK

²⁵ **96- well plate reader**, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, US



Resim 15: 96 bölmeli plağa, 14 gün boyunca materyallerle temasta olan ve indüklenen hücrelerin parçalanmış proteinleri alındı.



Resim 16: Proteinler üzerine ALP belirleme solüsyonu eklendikten 50 dakika sonraki görüntüsü.

3.4. SCANNING ELECTRON MİKROSKOP (SEM) ANALİZİ:

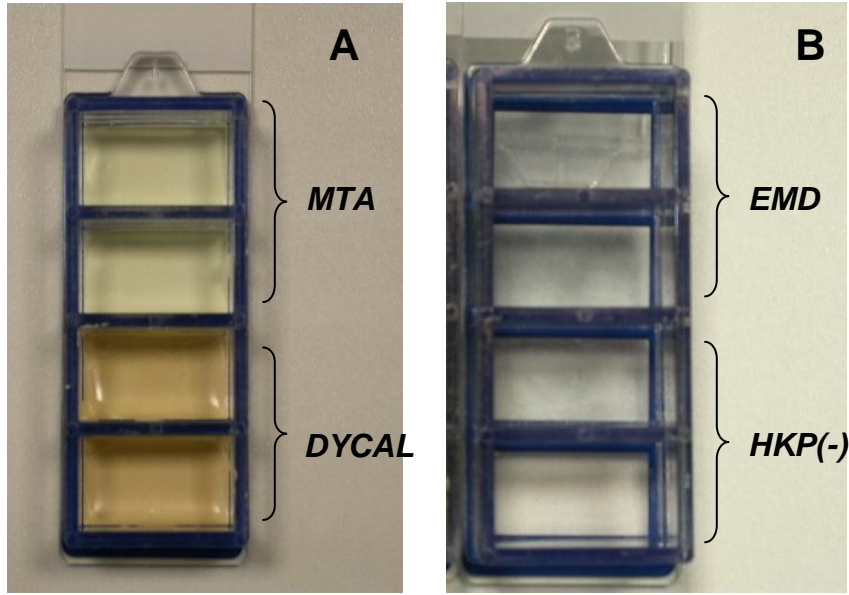
3.4.1. MATERYALLERİN HAZIRLANMASI:

3.4.1.1. Çoğalma Deneyi;

Toplamda 6 grup olacak şekilde materyeller hazırlandı. MTS deneyinde, 7. grup olan (+) Kontrol grubunun (%20 DMSO) olumsuz sonuç vermesinden dolayı SEM görüntüsüne yer verilmedi.

1. **Grup:** MTA
2. **Grup:** MTA+ EMDOGAİN
3. **Grup:** DYCAL
4. **Grup:** DYCAL+EMDOGAİN
5. **Grup:** EMDOGAİN
6. **Grup:** HKP(-) [(-) Kontrol grubu]

Öncelikle MTA ve DYCAL örnekleri üretici firmanın belirlediği şekilde karıştırılarak hazırlandı. 4 odacıklı lam²⁶ (81) içerisine, yüksekliği 10 mm olacak şekilde yerleştirildi (Resim 17A). Böylece kullanılan materyelin hücrelerle temas eden yüzey alanı, 96 bölmeli plağın taban alanının 4 katı olacak şekilde (238, 239) 200 mm² olarak tespit edildi. İnkübatörde 4 gün sertleşmesi için bekletildi. Dördüncü günün sonunda, EMDOGAİN ile kaplanarak +4°C’ de 24 saat bırakıldı (Resim 17B).



Resim 17: A. SEM görüntülerinin alınması için MTA ve Dycal' ın hazırlanması B. EMD' nin hazırlanması.

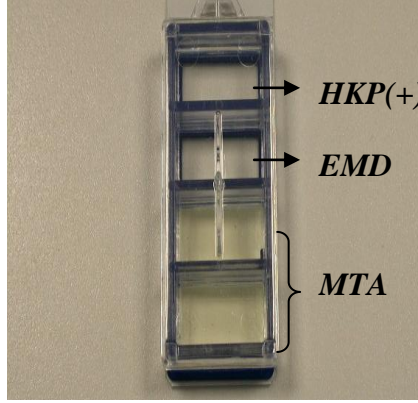
3.4.1.2. Farklılaşma Deneyi;

MTS deneyinde Dycal' ın toksik etkisi tespit edildiği için farklılaşma deneyinde Dycal'a yer verilmedi.

1. **Grup:** MTA
2. **Grup:** EMDOGAİN
3. **Grup:** HKP(+)

²⁶ 4 odacıklı lam, Nunc, USA

Materyellerden öncelikle MTA hazırlandı. 4 odacıklı lam (81) içerisine yüksekliği 10 mm olacak şekilde yerleştirilip, dört gün sertleşmesi için inkübatörde bekletildi. MTA' nın donmasını takiben EMDOGAİN, uygulama protokolüne göre, kuyucuğa eklenerek bir gece +4°C' de saklandı (Resim 18).



Resim 18: Odontogenesis etkisinin SEM' de görüntülenmesi için materyallerin hazırlanması.

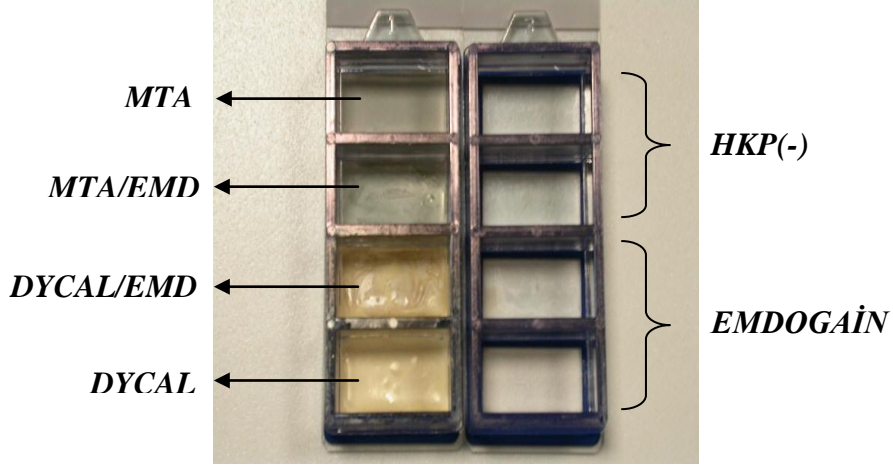
3.4.2. ÇOĞALMA VE FARKLILAŞMA DENEYLERİ İÇİN HÜCRE EKİMİ:

Bir gece + 4°C' de bekletilen kuyucuklardan Emdogain uzaklaştırıldı. Laminar flow içinde, kapakları açık bir şekilde bir gün bekletildikten sonra UV altında 30 dakika tutuldu. Steril PBS (fosfat tampon solüsyonu) ile iki kere yıkandı. Başka bir plakta beş kez pasajlanmış olan hücrelerin 10 µl' si, hemositometre üzerine konarak ışık mikroskobu altında sayıldı. 25.000 hücre/kuyucuk (120) olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı. Üstüne her bir kuyucuğa 450 µl besiyeri konarak inkübatöre yerleştirildi.

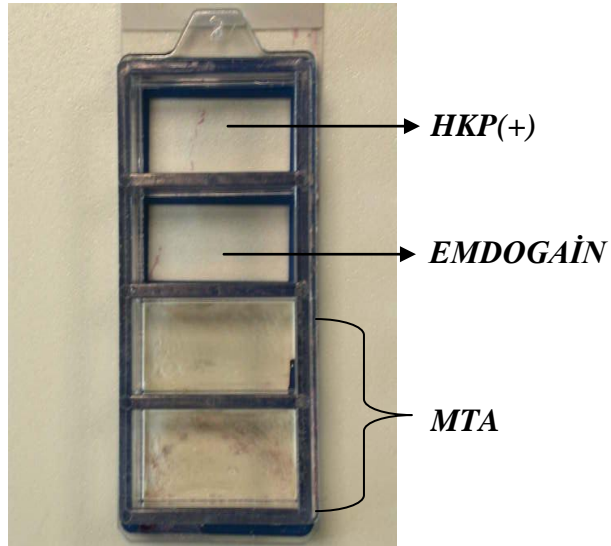
3.4.3. SEM – SCANNİNG ELECTRON MİKROSKOBİK İNCELEME:

- ❖ Çoğalma deneyi için iki gün, farklılaşma deneyi için 14 gün materyallerle kültüre edilip indüklenen hücreler, %2' lik paraformaldehitle fikse edildi. 1 saat oda sıcaklığında kurutması sağlandı.
- ❖ Etanol serisiyle dehidratasyon yapıldı.

- ❖ Sputter coater²⁷ ile püskürtme yöntemi kullanılarak, 10nm kalınlığında Au-Pd ile kaplandı (Resim 19, 20).
- ❖ Hücreler, 5 kV voltaj altında Karl Zeiss EVO 40 model SEM cihazındaki²⁸ değişen büyütmelerde (200x –5000x) görüntülendi



Resim 19: Çoğalma deneyinde, SEM görüntüsü almadan önce, materyellerin 10nm kalınlığında altın- palladyum ile kaplanmış haldeki görüntüsü.



Resim 20: Farklılaşma deneyinde, SEM görüntüsü almadan önce, materyellerin 10nm kalınlığındaki altın-palladyum ile kaplandıktan sonraki görüntüsü.

²⁷ **Sputter coater**, Model BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater, Balzers, Liechtenstein

²⁸ **Karl Zeiss EVO 40 model SEM cihazı**, Dresden, Germany

3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

İstatistiksel analizler, *Sigma Stat Software Jandel Scientific, San Rafael, CA* kullanılarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel methodların (ortalama, standart sapma) yanı sıra ikili grupların karşılaştırılmasında bağımsız *Mann-Whitney U-test* kullanıldı. Sonuçlar anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. MTS TESTİ SONUCUNDA HÜCRE CANLILIĞININ SAPTANMASI:

Kullanılan materyeller ile 48 saat temasta bulunan diş jermi kök hücreleri, canlılık testi sonucunda, aşağıda tabloda belirtilen değerleri göstermektedir (Tablo 1,2). Negatif kontrol grubu, Hücre Kültür Plağı HKP(-) grubudur. DMSO eklenen grup ise (+) kontrol grubunu oluşturmaktadır.

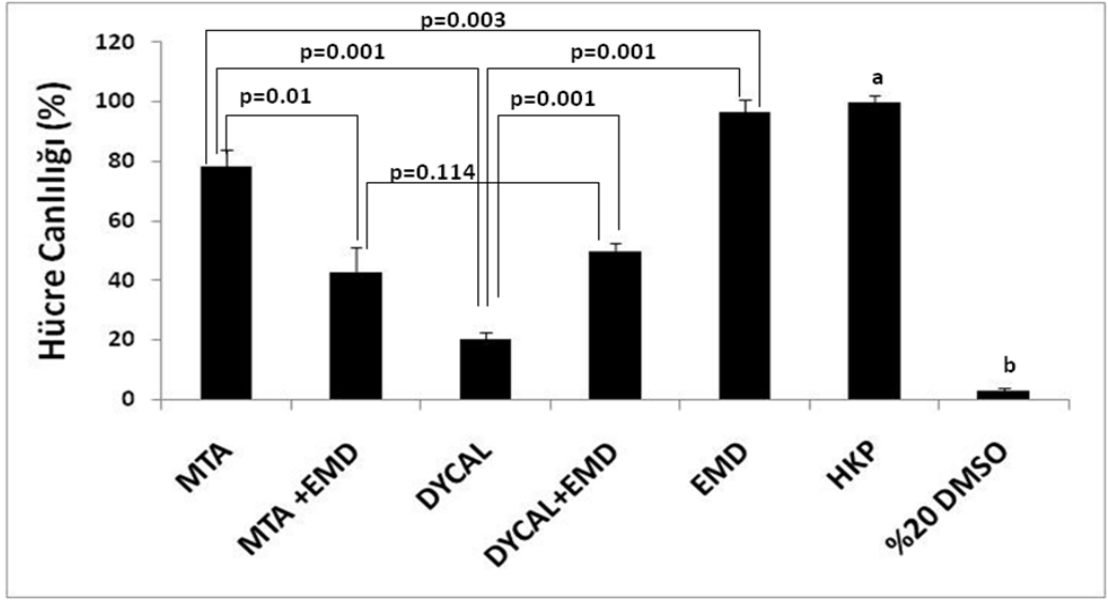
Tablo 1: Diş jermi kök hücreleri üzerinde çoğalma etkisi incelenen materyellerin 48 saat sonunda elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri ile HKP (Hücre kültür plağı) değeri baz alınarak hesaplanan normalizasyon değerleri görülmektedir

MATERYELLER	ORTALAMA	STANDART SAPMA	NORMALİZASYON* değerleri	STANDART SAPMA NORMALİZASYON
MTA	0,4075	0,030643	78,17746	5,878774
MTA + EMD	0,22225	0,044018	42,63789	8,444698
DYCAL	0,10575	0,011983	20,28777	2,298825
DYCAL+ EMD	0,26	0,014989	49,8801	2,875565
EMD	0,50275	0,023514	96,45084	4,511114
HKP(-)	0,52125	0,012038	100	2,309474
%20 DMSO	0,01675	0,003304	3,213429	0,633868

*Normalizasyon değeri: Test materyelleri ortalaması/HKP ortalama

Tablo 2: İncelendiğinde diş jermi kök hücreleri üzerinde çoğalma etkisi incelenen materyellerin, birbiriyle anlamlılık değerlerinin karşılaştırılması görülmektedir. Tabloya göre sadece EMDOGAİN ile kaplanmış MTA ve DYCAL ile EMDOGAİN-HKP grupları p değerleri açısından anlamlılık göstermemektedir ($p>0.05$).

MATERYELLER	P DEĞERLERİ	ANLAMLILIK
MTA-EMD	0,003	Anlamlı
MTA-MTA+EMD	0,01	Anlamlı
DYCAL-DYCAL+EMD	0,001	Anlamlı
MTA+EMD-DYCAL+EMD	0,114	Anlamlı Değil
MTA-DYCAL	0,001	Anlamlı
DYCAL-EMD	0,001	Anlamlı
MTA-HKP(-)	0,001	Anlamlı
MTA+EMD-HKP(-)	0,029	Anlamlı
DYCAL-HKP(-)	0,001	Anlamlı
DYCAL+EMD-HKP(-)	0,001	Anlamlı
EMD-HKP(-)	0,211	Anlamlı Değil
MTA-DMSO	0,029	Anlamlı
MTA+EMD-DMSO	0,029	Anlamlı
DYCAL-DMSO	0,001	Anlamlı
DYCAL+EMD-DMSO	0,029	Anlamlı
EMD-DMSO	0,029	Anlamlı
HKP(-)-DMSO	0,001	Anlamlı



Şekil 3: Diş jermi kök hücrelerinin test materyelleri ile 48 saat boyunca temasında ortaya çıkan *MTS testi* sonuçlarının grafiksel gösterimi.

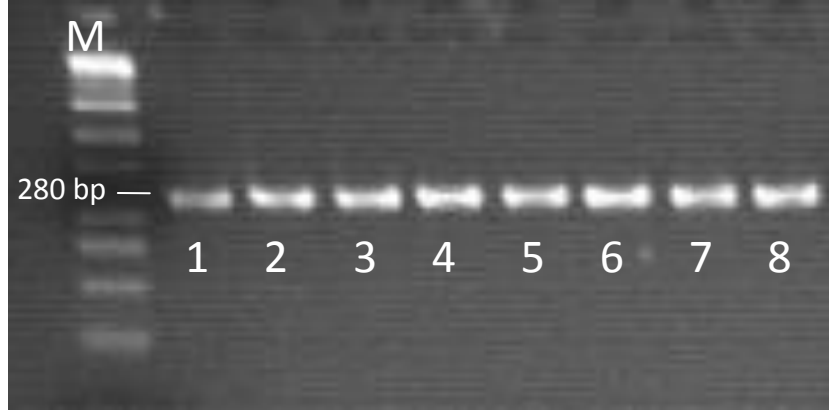
- EMD hariç diğer test materyelleri için tespit edilen değerler HKP(-) ile anlamlı derecede farklı bulunmuştur.
- Tüm gruplar %20 DMSO grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

4.2 GRADİENT PCR SONUÇLARI

Diş jermi kök hücrelerinin 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile uyarılması sonucunda elde edilen odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde DSPP, ON ve GAPDH' e ait olan özgül bölgenin çoğaltılan bant görüntüleri Şekil 4,5 ve 6' da görülmektedir.

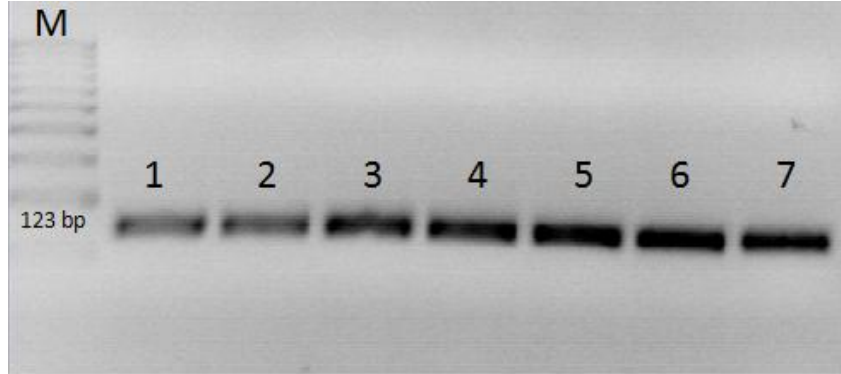
Odontoblast hücre farklılaşmasına dair yapılmış olan bu gen analizi çalışmasında, RealTime-PCR' da kullanmak üzere DSPP için; 280 bp ve 58 °C sıcaklık (Şekil 4), GAPDH için 123 bp ve 58 °C (Şekil 5), ON için; 576 bp ve 58 °C sıcaklığın (Şekil 6) protein sentezinin gerçekleşebilmesi açısından en uygun değerler olduğu tespit edildi.

DSPP Gradient PCR



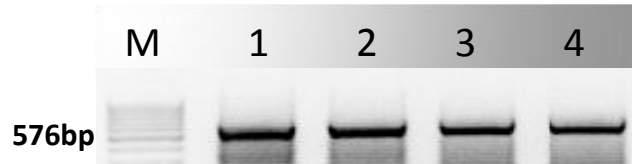
Şekil 4: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde, DSPP' ye ait olan özgül bölgenin 280 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.
1. 50 C° **2.** 50.7 C° **3.** 51.9 C° **4.** 53.7 C° **5.** 56.1 C° **6.** 58 C° **7.** 59.2 C° **8.** 60 C° ,
M: Marker (Biobasic,GM345)

GAPDH Gradient PCR



Şekil 5: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerindeki GAPDH' e ait olan özgül bölgenin 123 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.
1. 50 C° **2.** 50.7 C° **3.** 51.9 C° **4.** 53.7 C° **5.** 56.1 C° **6.** 58 C° **7.** 59.2 C°
M: Marker (Sigma,D3687)

ON Gradient PCR



Şekil 6: Odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde ON' e ait olan özgül bölgenin 576 bp molekül ağırlığında ve çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.
1. 52 C° **2.** 54 C° **3.** 56 C° **4.** 58 C° . **M:** Marker (Biobasic,GM345)

4.3. RealTime-PCR SONUÇLARI

Gradient PCR analizinde molekül ağırlığı ve sıcaklık değerleri, bant görüntüleri ile tespit edildi. RealTime-PCR analizinde, bu değerler kullanılarak odontoblast hücrelerinin DSPP ve ON varlığında sentezledikleri DNA miktarı rakamsal olarak saptandı (Tablo 3,4).

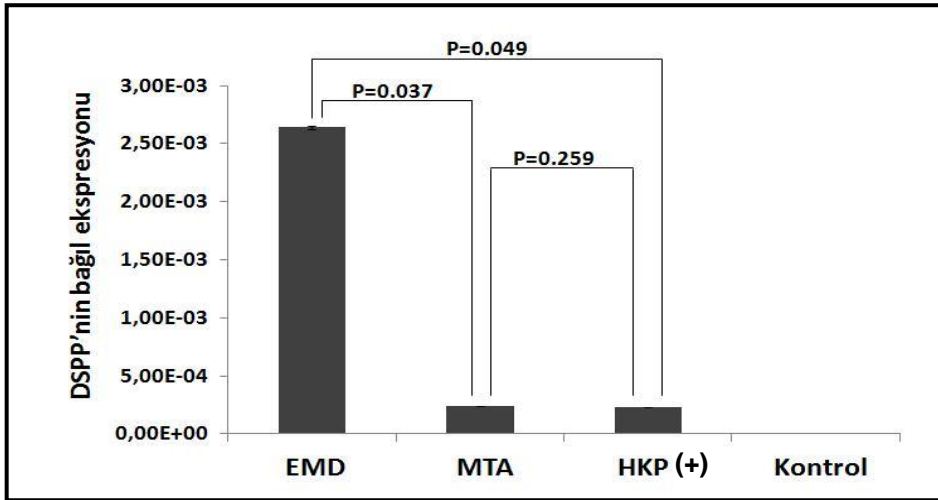
Tablo 3: İncelendiğinde 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile uyarılarak farklılaşan diş jermi kök hücrelerinden, materyellerin etkisiyle *DSPP* varlığında sentezlenen DNA miktarının ortalama, standart sapma ve GAPDH ortalama değeri baz alınarak hesaplanan normalizasyon değerleri görülmektedir.

EMD	MTA	HKP(+)	KONTROL	MATERYELLER
5,52E-01	2,79E-02	7,05E-02	5,71E-04	DSPP ORTALAMA değerleri
2,09E+04	1,18E+04	3,08E+04	7,59E+04	GAPDH ORTALAMA değerleri
2,64E-03	2,38E-04	2,29E-04	7,53E-07	NORMALİZASYON* değerleri
0,294111	0,023106	0,051065	0,000133	STANDART SAPMA değerleri
1,41E-05	1,97E-06	1,66E-06	1,75E-09	STANDART SAPMA NORMALİZASYONU

*Normalizasyon değeri: Test materyelleri ortalaması/GAPDH ortalama

Tablo 4: İncelendiğinde kullanılan materyellerin, *DSPP* varlığında hücre DNA' larının çoğalmasına olan etkilerinin, anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırması görülmektedir.

MATERYELLER	P DEĞERLERİ	ANLAMLILIK
MTA-EMD	0,037	Anlamlı
EMD-HKP(+)	0,049	Anlamlı
MTA-HKP(+)	0,259	Anlamlı değil



Şekil 7: Hücrelerden test materyelleri etkisiyle *DSPP* varlığında sentez edilen DNA miktarının grafiksel gösterimi sunulmaktadır. Kontrol grubunda *DSPP*' ne bağlı DNA sentezi tespit edilememiştir.

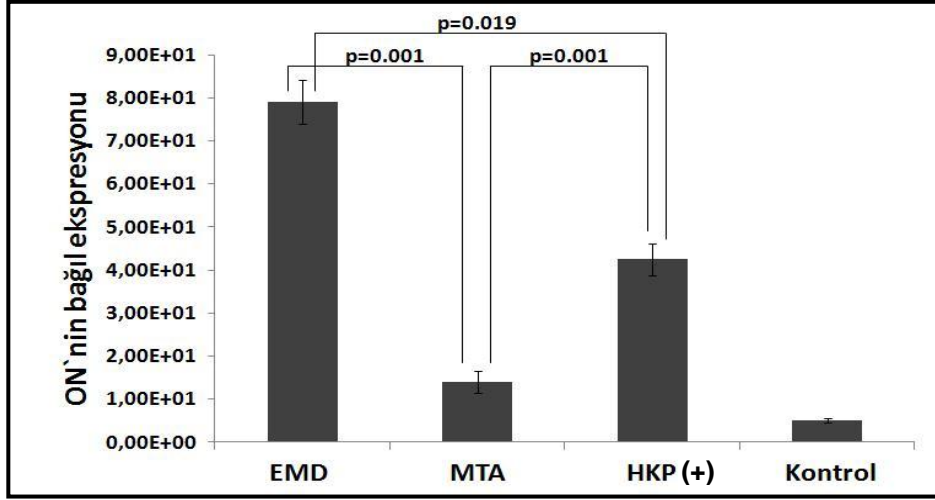
Tablo 5: 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile indüklenen diş jermi kök hücrelerinin materyeller etkisiyle *ON* varlığında gösterdikleri DNA sentezinin ortalama, standart sapma ve GAPDH baz alınarak hesaplanan normalizasyon değerleri görülmektedir.

EMD	MTA	HKP(+)	(-) KONTROL	MATERYELLER
16525,33	1643	13066,67	3904,667	ON ORTALAMA değerleri
20900	11755	30750	75850	GAPDH ORTALAMA değerleri
79,06858	1,40E+01	4,25E+01	5,15E+00	NORMALİZASYON* değerleri
1087,532	2,99E+02	1,12E+03	3,60E+02	STANDART SAPMA değerleri
5,203501	2,54E+00	3,66E+00	4,75E-01	STANDART SAPMA NORMALİZASYONU

***Normalizasyon değeri:** Test materyelleri ortalaması/GAPDH ortalama

Tablo 6: İncelendiğinde kullanılan materyellerin, *ON* varlığında hücre DNA'larının çoğalmasına olan etkilerinin, anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırması görülmektedir.

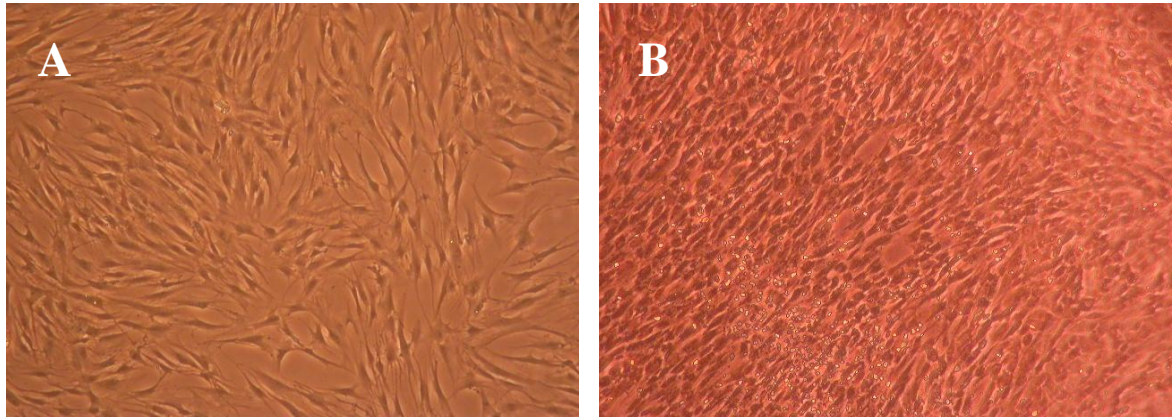
MATERYELLER	p değerleri	ANLAMLILIK
MTA-EMD	0,001	Anlamlı
EMD-HKP(+)	0,019	Anlamlı
MTA-HKP(+)	0,001	Anlamlı



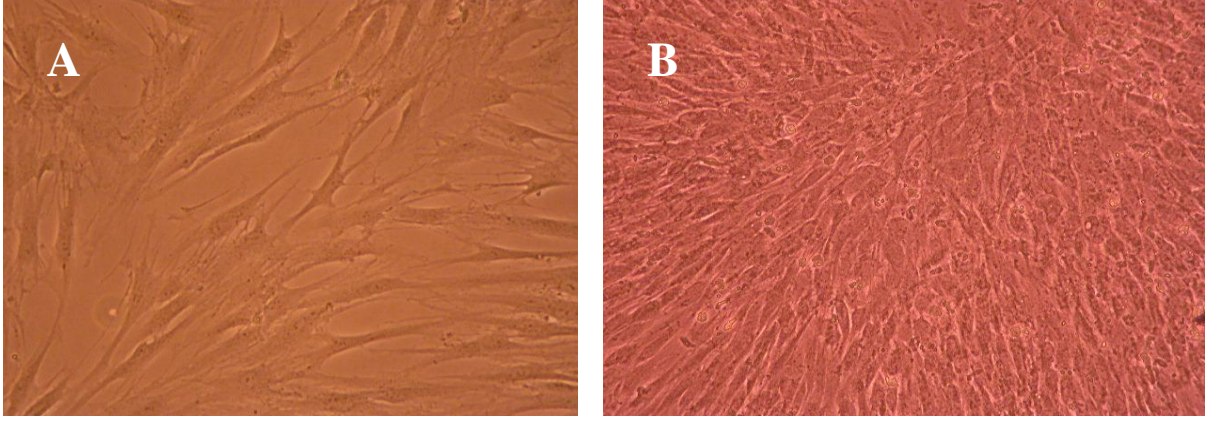
Şekil 8: Hücrelerden test materyelleri etkisiyle *ON* varlığında sentezlenen DNA miktarının grafiksel gösterimi sunulmaktadır. Diğer grupların tümü kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

4.4. MİKROSKOBİK İNCELEME

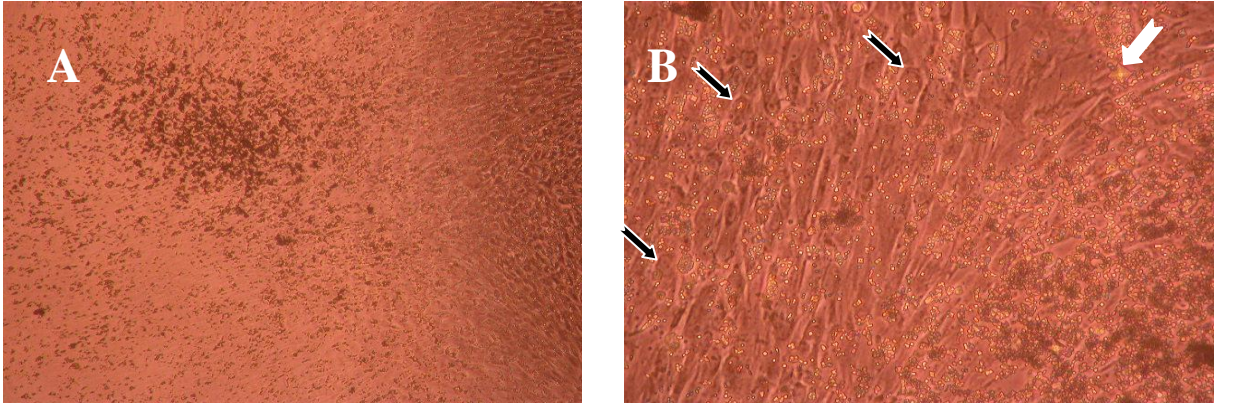
Odontojenik besiyeri içermeyen (-) ve odontoblastik uyarıcı besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücrelerin, ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.



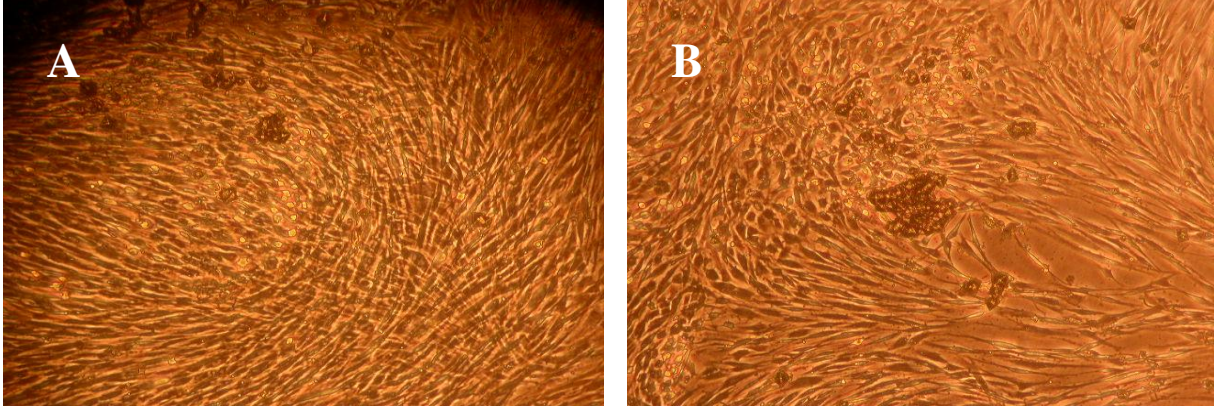
Şekil 9: **A.** Odontojenik besiyeri içermeyen (-) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 8. gündeki iplikli yapısının 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 8. gündeki yuvarlak şekillerinin 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



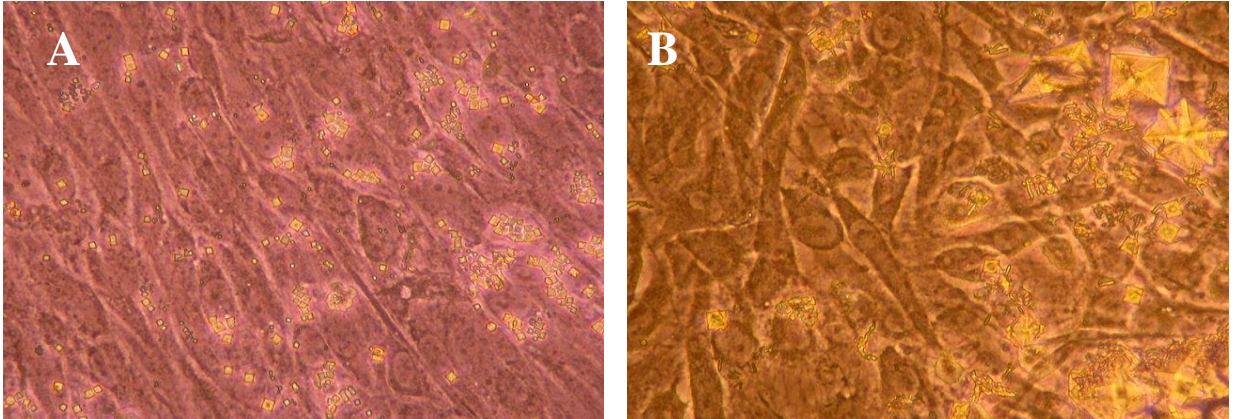
Şekil 10: **A.** Odontojenik besiyeri içermeyen (-) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 8.gündeki ipliksi yapısının 10x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 8. gündeki yuvarlak şekillerinin 10x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



Şekil 11: **A.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 14. günün sonunda 4X büyütmesiyle gözlenen kalsiyum birikimi izlenmektedir. **B.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin 14. günün sonunda 10X büyütmesiyle izlenen poligonal şekilleri (siyah ok) ve kristal oluşumu (beyaz ok).



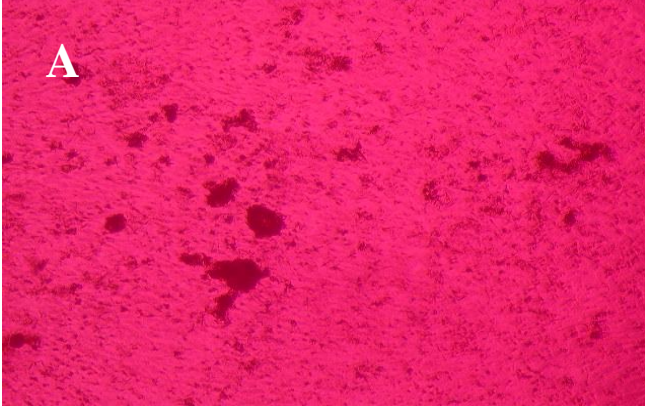
Şekil 12: **A.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Odontojenik besiyeri ve **EMDOGAİN** içeren hücrelerin 4x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



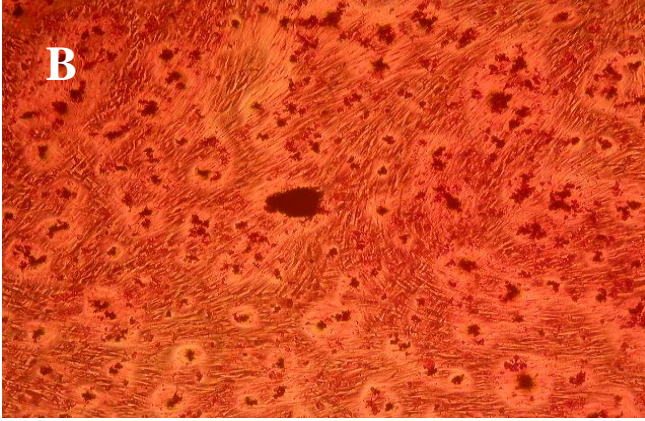
Şekil 13: **A.** Odontojenik besiyeri içeren (+) **KONTROL GRUBUNDA** poligonal şekilli hücreler ve kristal oluşumu 20x büyütmeyle izlenmektedir. **B.** Odontojenik besiyeri ve **EMDOGAİN** içeren hücrelerin 20x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

4.5. VON KOSSA BOYAMASI:

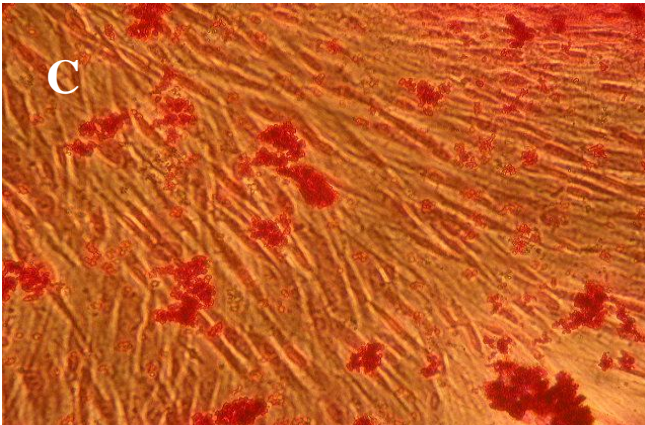
Von Kossa boyama protokolü, gereç ve yöntem kısmında anlatıldığı gibi uygulandı. Alkol aspire edildikten sonra, 4x ve 20x büyütmeyle fotoğrafları alındı.



Şekil 14: *Odontojenik besiyeri* içeren (+) **KONTROL GRUBU** hücrelerin, 14. günde nodül oluşumunu görmek amacıyla yapılan Von kossa boyama görüntüsü. (4x büyütme).



Şekil 15: *Odontojenik besiyeri* ve *EMDOGAIN* içeren hücrelerin Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü (4x büyütme)



Şekil 16: *Odontojenik besiyeri* ve *EMDOGAIN* içeren hücrelerin Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü (20x büyütme)

4.6. ALP AKTİVİTESİ:

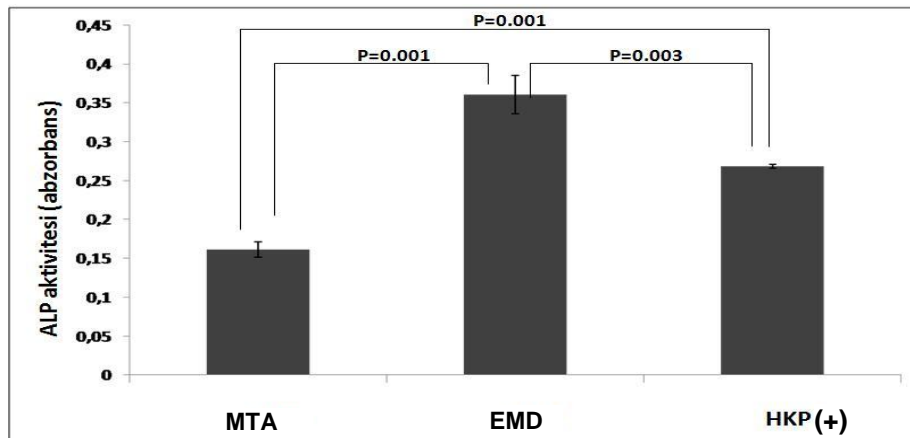
Diş jermi kök hücrelerinin odontojenik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılmasını takiben sert doku oluşturabilme özelliklerinin incelenmesi için ALP aktivite testi uygulandı.

Tablo 7: İncelendiğinde diş jermi kök hücrelerinin 14. günün sonunda materyeller etkisiyle gösterdikleri *ALP aktivite* ortalama ve standart sapma değerleri görülmektedir.

	MTA	EMD	HKP(+)
ORTALAMA	0,161333	0,360333	0,268667
STANDART SAPMA	0,010017	0,024664	0,002517

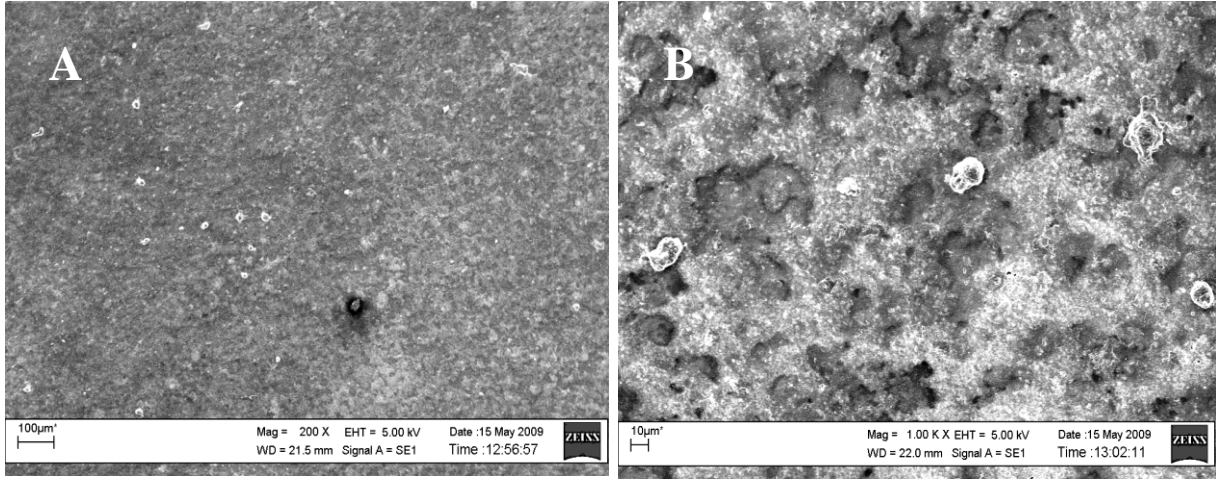
Tablo 8: İncelendiğinde diş jermi kök hücrelerinin 14. günün sonunda test materyelleri etkisiyle gösterdikleri *ALP aktivite* değerlerinin anlamlılık açısından birbirleriyle karşılaştırılması görülmektedir.

MATERYELLER	p değerleri	ANLAMLILIK
MTA-EMD	0,001	Anlamlı
MTA-HKP(+)	0,001	Anlamlı
EMD-HKP(+)	0,003	Anlamlı

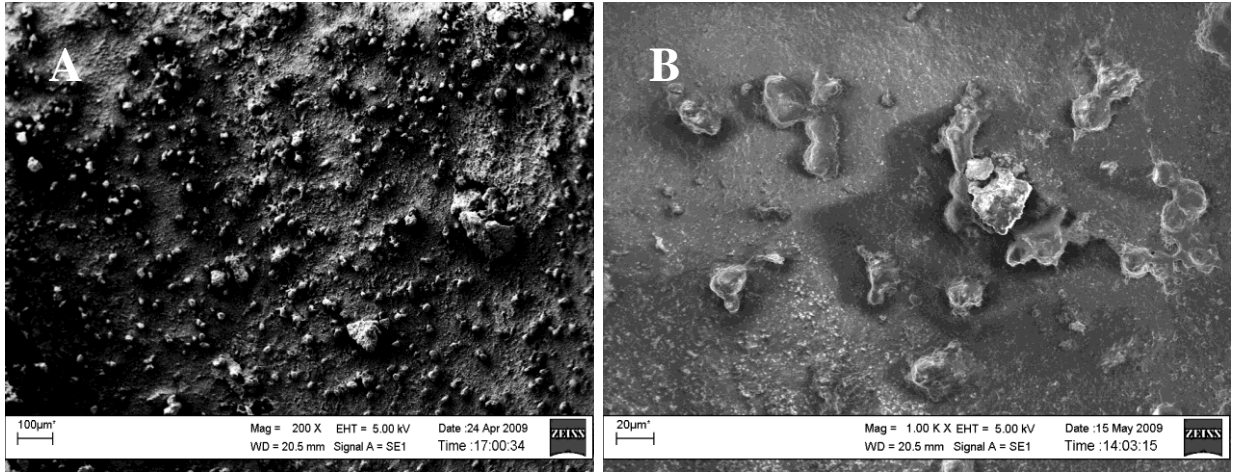


Şekil 17: Diş jermi kök hücrelerinin test materyelleri karşısında gösterdikleri *ALP aktivite* değerlerinin grafiksel gösterimi.

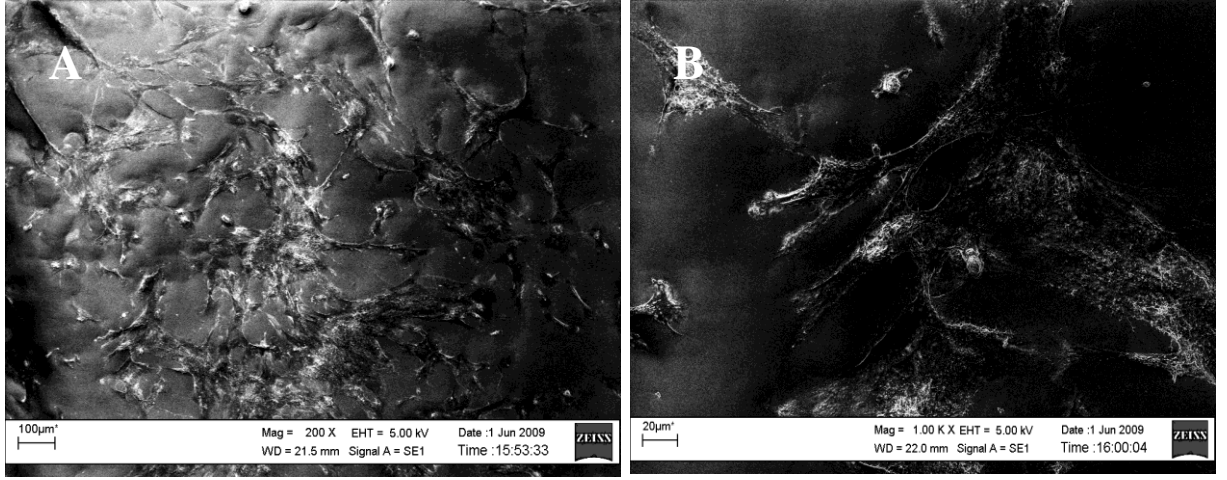
4.7. SCANNİNG ELEKTRON MİKROSKOP (SEM) GÖRÜNTÜLERİ:



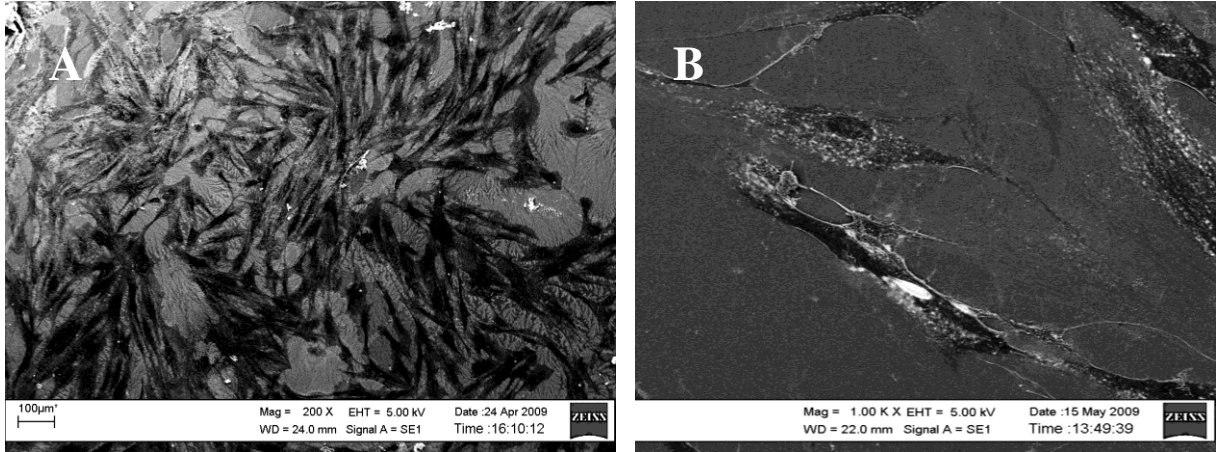
Şekil 18: A. *DYCAL* yüzeyinde tutunan diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. *DYCAL* yüzeyinde tutunan diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



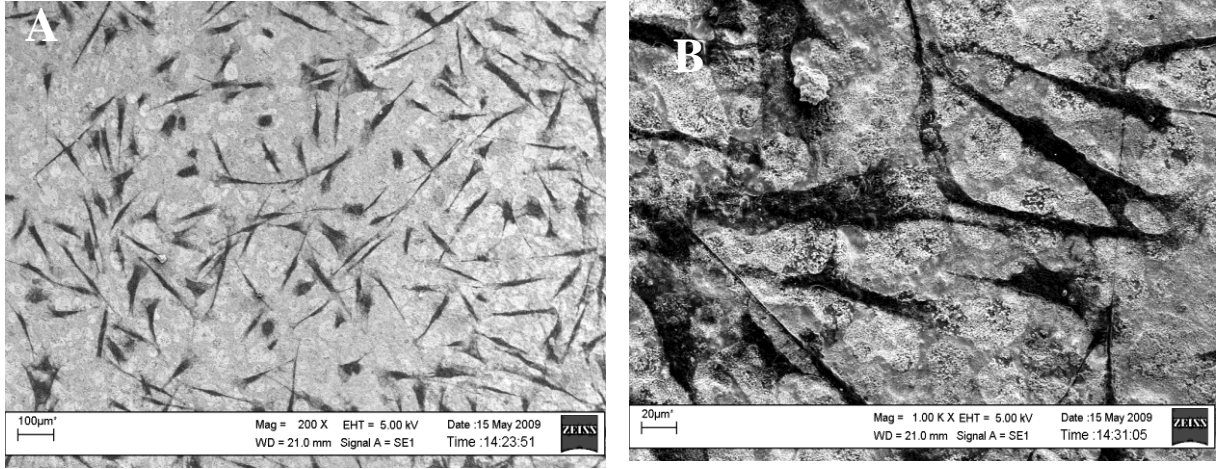
Şekil 19: A. *EMDOGAİN İLE KAPLANMIŞ DYCAL* yüzeyinde diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. *EMDOGAİN İLE KAPLANMIŞ DYCAL* yüzeyinde diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



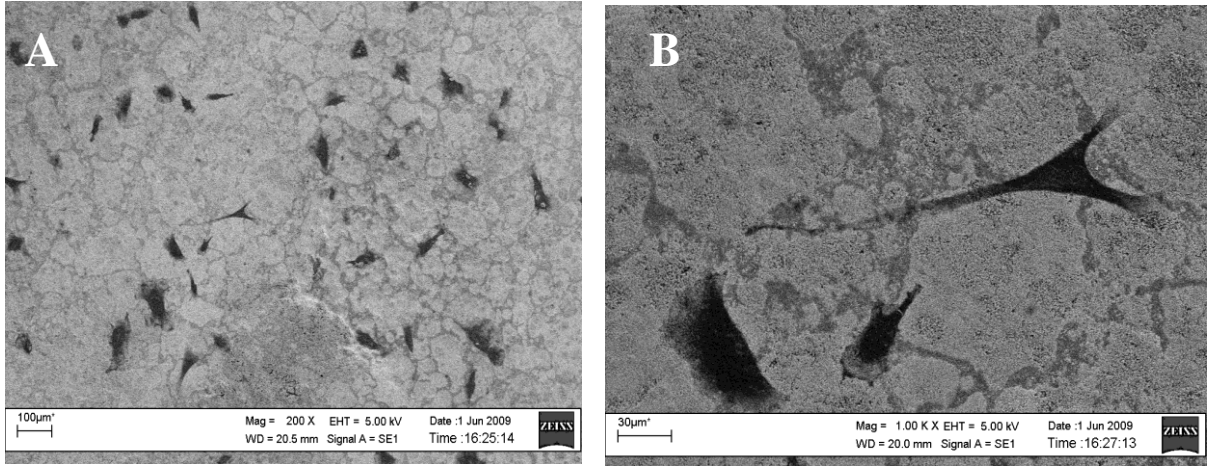
Şekil 20: A. EMDOGAIN üzerine tutunan diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B. EMDOGAIN** üzerine tutunan diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



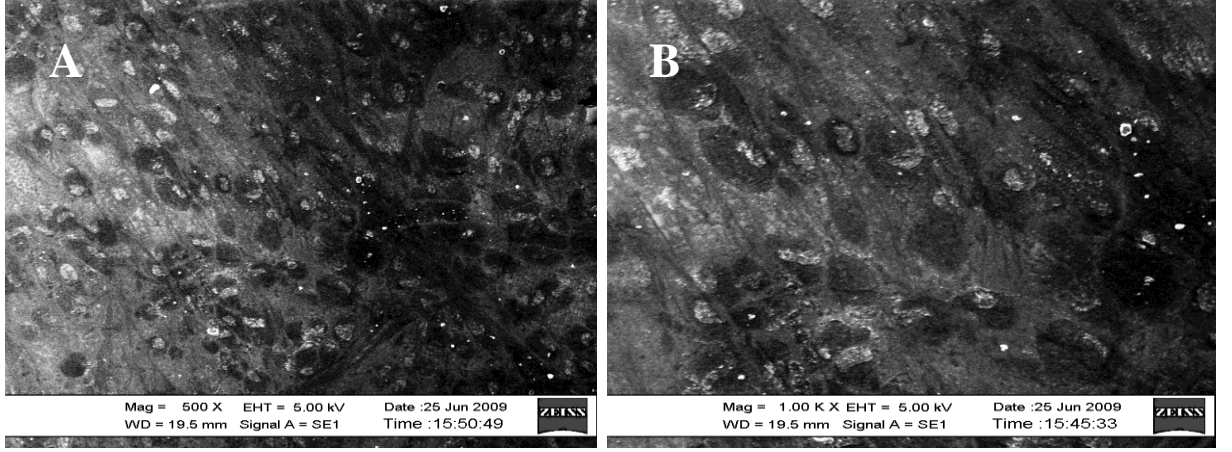
Şekil 21: A. Diş jermi kök hücrelerinin **HÜCRE KÜLTÜR PLAĞI** yüzeyinde 200 büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Diş jermi kök hücrelerinin **HÜCRE KÜLTÜR PLAĞI** yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



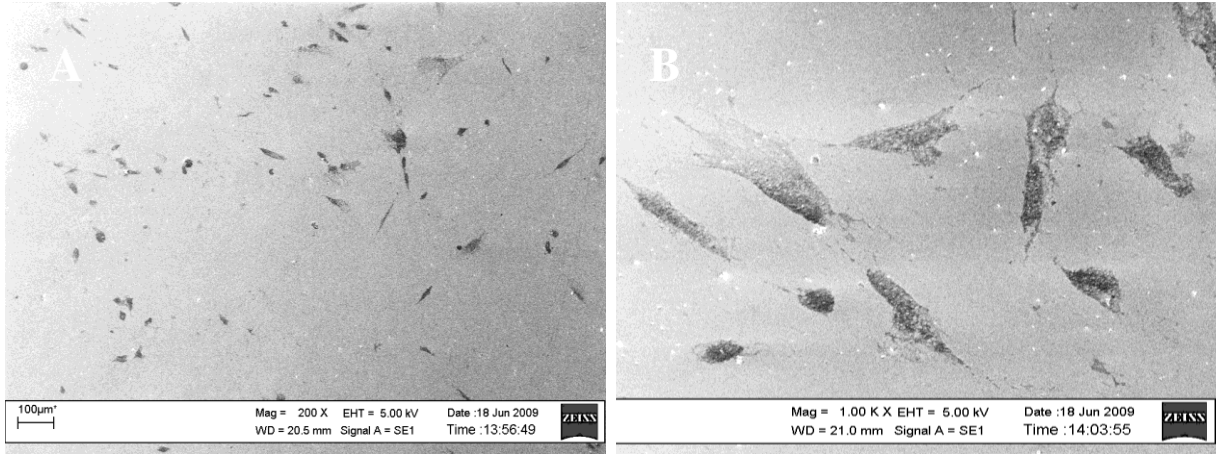
Şekil 22: **A.** Diş jermi kök hücrelerinin *MTA* yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Diş jermi kök hücrelerinin *MTA* yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



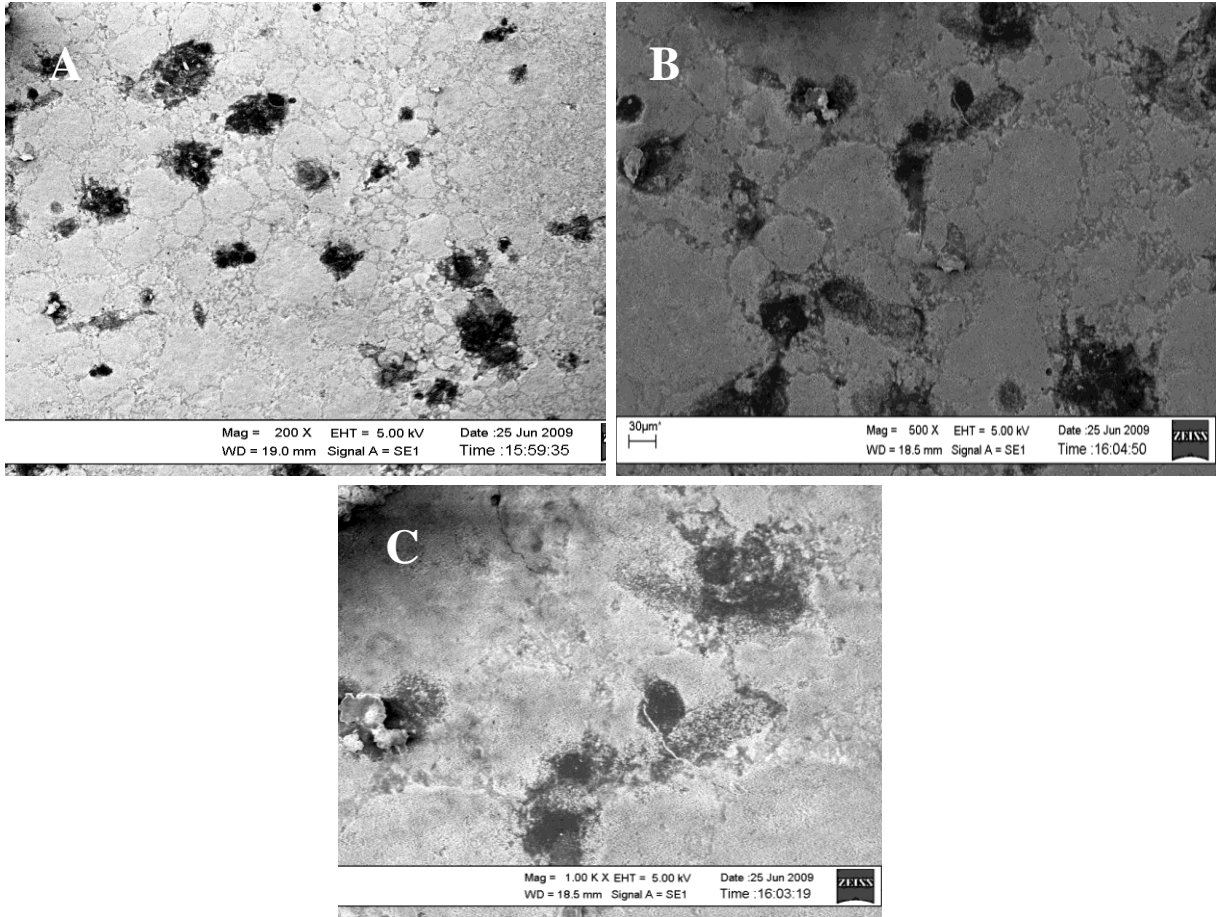
Şekil 23: **A.** *EMDOGAIN İLE KAPLANMIŞ MTA* yüzeyindeki diş jermi kök hücrelerinin 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** *EMDOGAIN İLE KAPLANMIŞ MTA* yüzeyindeki diş jermi kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



Şekil 24: A. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan diş jermi kök hücrelerinin *EMDOGAIN* yüzeyinde 500x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan diş jermi kök hücrelerinin *EMDOGAIN* yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



Şekil 25: A. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin *HÜCRE KÜLTÜR PLAĞI* yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin *HÜCRE KÜLTÜR PLAĞI* yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.



Şekil 26: A. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin *MTA* yüzeyinde 200x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. *Odontojenik besiyeri* ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin *MTA* yüzeyinde 500x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. C. Odontoblastik besiyeri ile 14 gün boyunca uyarılan hücrelerin *MTA* yüzeyinde 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir.

5. TARTIŞMA

Günümüzdeki rejeneratif tedavilerde apikal papilla ve diş pulpası kök hücrelerinin etkinliğinden söz edilmekte, (2, 58) hatta diş pulpası kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşarak dentin-pulpa kompleksini oluşturduğunu gösteren çalışmalara yer verilmektedir (1, 3, 14, 15, 16, 17, 57). Yetişkin diş pulpası kök hücrelerinin (DPSCs), diş-jerm-hücre besiyerinde kültüre edildikten sonra, düzgün şekilli dentin-pulpa kompleksini oluşturması, işlem görmüş yetişkin diş kök hücresi yerine, erken gelişim evresinde olan jerm hücrelerini kullanmayı daha makul kılmaktadır (17). Ayrıca kyonu tamamlanmış ancak henüz sürmemiş, jerm halindeki dişlerden alınan kök hücrelerin, gelişimi daha ileri evrede olan dişlerden elde edilen hücrelere göre, çoğalmaya daha meyilli bulunması, (53) son zamanda yapılan çalışmalarda tercih edilme nedenidir. Bu çalışmada kullanılan diş jermi kök hücre grubunun rejeneratif özelliğinin MTA ve EMD ile desteklenmesi, reparatif işlemlerdeki moleküler ve hücrel aktivitenin anlaşılmasına yardımcı olmuştur.

MTA' nın pH' ı düşürülerek daha asidik olmasının sağlandığı in vitro bir çalışmada, mikrosertliğinin azaldığı ve SEM görüntülerine dayanarak yüzeydeki pöröz yapının arttığı belirtilmektedir (243). Bizim çalışmamızda mine matriks protein türevi, asetik asit yardımıyla uygulanmıştır; böylece çözünürlüğü artırılarak, hücre kültür plağına adaptasyonunun sağlanması amaçlanmıştır. Yukarıda ifade edildiği gibi asidik ortamın MTA' nın mikrosertliğini (23, 242, 243) ve sertleşmesini olumsuz etkilediği (184) daha önce açıklanmıştır. Bunlardan farklı olarak, bu çalışmada uygulanan yöntemde pH değişikliğine uğramış MTA' nın hücreler ile etkileşimi, ilk defa hücre proliferasyonu, farklılaşması ve de SEM görüntüleri açısından incelenmektedir. Enflamasyona uğramış düşük pH' lı ortamın, MTA' nın fiziksel ve kimyasal yapısını değiştirebileceği (242), hatta hazırlanması sırasında alkalin ortamda bulunmasının bile yapısında aynı olumsuz etkiyi yaratacağı (244) belirtilmiştir. Bu düşünceyle uyumlu olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar da, asidik ortamın MTA' nın yapısını bozarak hücreler için olumsuz bir yüzey yarattığını göstermektedir. Takita (245), MTA' nın hücre proliferasyonu üzerindeki olumlu etkisini MTA' dan sürekli olarak salınan kalsiyum iyonlarıyla ilişkilendirmektedir. Bu araştırmada, MTA' nın tek başına hücre

çoğalmasını anlamlı derecede arttırması, bu düşünceyle uyumlu olarak Takita' nın kendi araştırma sonucuyla da örtüşmektedir.

MTA yüzeyinin pH değişikliğine dair yapılmış tüm bu araştırmalara rağmen, sertleşebilen kalsiyum hidroksit simanının, asidik ortamla temasında yüzeyinde ortaya çıkan tepkiye ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak kalsiyum hidroksit tozunun asidik pH içeren solüsyonlarla karıştırılması halinde, alkalen özelliğini koruması ve bu özelliği uzun süre devam ettirmesi oldukça şaşırtıcı bulunmaktadır (169). Periapikal lezyonla ilişkili, köpeklerde in vivo yapılan bir araştırmada, yüksek konsantrasyondaki kalsiyum hidroksit patının asidik değeri yüksek olan bakteriyel endotoksini detoksifiye ettiği belirtilmektedir (246). Bakteriyel enfeksiyon varlığında Dycal ile tedavi edilen açığa çıkmış pulpa dokusunun büyük çoğunluğunun canlı kalması, dycal kullanılmayan diğer gruplarda periapikal lezyonun gelişmesi (181) yine kalsiyum hidroksitin asidik ortamı nötralize etme özelliğini göstermektedir. Asidik pH' ın kalsiyum hidroksitin iyon salınımını arttırdığı da göz ardı edilmemelidir (169). Böylece kalsiyum hidroksit, artan OH⁻ iyon miktarı ile sahip olduğu alkalen pH sayesinde osteoklastların salgıladığı laktik asidi nötralize ederek, dişin mineral yapısının çözünmesini engellemektedir (247). Burada kalsiyum hidroksitin bulunduğu yüzeyle temas süresi oldukça önemlidir. Andreasen 2002 yılında gelişimini tamamlamamış koyun dişleri üzerinde yaptığı çalışmada, kalsiyum hidroksitin uzun süreli dentin temasında dentinin kırılma dayanımını azalttığını ortaya koymuştur. Bu durumu, dentinde bulunan asit proteinlerin ve proteoglikanların, kalsiyum hidroksitin etkisiyle nötralize olması, çözünmesi ve denatürasyonu ile açıklamaktadır. Fakat bu çalışmaların tümü, kalsiyum hidroksitin yüksek pH değerine ilişkin araştırmalardır. Bu çalışmada kullanılan sertleşebilen kalsiyum hidroksit simanının yüzeyine dair araştırmalar değildir. Ancak bu çoğalma testinde, Dycal' ın sahip olduğu yüksek pH değerinin hücrelerle direkt temasında ortaya çıkan toksik etkisi, yukarıdaki ifadelerle uyumludur.

Kök - ucu dolgusu olarak tercih edilen bazı materyellerin EMD ile kaplanması halinde sıçan periodontal ligament fibroblastlarının fenotipinde oluşabilecek değişikliğe dair yapılmış bir çalışma bulunmaktadır (248). Ancak bu çalışma, kullanılan hücre tipinin farklı olması yanında, kalsiyum hidroksit tozunun steril serum ile

karıştırılarak elde edilmesi ve yüzeyinin karbonat tampon içerisinde çözündürülmüş EMD ile kaplanması açısından bu çalışma yönteminden ayrılmaktadır. Çalışmamız sonucunda hücreler için olumsuz özelliklere sahip olduğu bilinen Dycal, asit içerisinde çözündürülmüş EMD ile birleşince şaşırtıcı derecede iyi bir yüzey oluşturmuştur. Bu durum, kalsiyum hidroksitin asidik ortamı nötralize edebilmesi ve bu ortamda iyon salınımının artması ile meydana gelen yüksek pH değeri ile açıklanabilir. Ayrıca kalsiyum hidroksitin sert doku oluşumunda önemli yere sahip olan alkalen fosfataz aktivitesini indüklenme özelliği (247) biyolojik medyatör olan EMD ile asidik ortamda birleşince beklenen klinik sonuçları verecektir.

Kullanılan materyellerin pulpa dokusunda bulunan hücreleri nasıl aktive ettiğine dair çalışmalar devam etmektedir. Reparatif dentin oluşumunda, Dycal' in ortamda var olan odontoblastları stimule ettiği, EMD' nin ise kaynağı bilinmeyen ve pulpa dokusunda bulunan yeni odontoblastlar sayesinde etki gösterdiği belirtilmektedir (237). Yani EMD erken dentinogenesis aşamasındaki biyolojik medyatör gibi davranarak, dentin köprüsü oluşumuna katılmaktadır (237). Bu sonuçla uyumlu olarak, dycal ve EMD birleşimi, Dycal' in hücreler üzerindeki olumsuz etkisini azaltarak, hücreler için uygun bir yüzey oluşumu sağlamaktadır. Yaptığımız MTS testi ve SEM görüntüleri bu durumu desteklemektedir.

1970' li yıllardan günümüze kadar olan sitotoksisite çalışmalarını incelediğimizde, kullanılan test materyellerinin hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılmasında, model kavite methodu, agar overlay methodu, milipore filter ve radiochromium (249) gibi methodların kullanıldığını görmekteyiz. Ancak kullanılan bu yöntemlerin bazı dezavantajlara sahip olması araştırma sonucunda ortaya çıkan bulguları da olumsuz etkilemektedir. Örneğin Torabinejad' ın 1995 yılında yaptığı sitotoksisite çalışmasında agar overlay methodu kullanması, kullanılan materyelin toksik komponentinin zamanla hücre kültür ortamına difuze olmasına yol açtığından, amalgam ilk hazırlandığı anda MTA' ya göre daha az toksik bulunmuştur (238). 1998 yılında yapılan in vitro bir çalışmada, kullanılan materyelin sitotoksik etkisi, ilk defa hücrelerle temasında ortaya çıkan sitokin salınımıyla değerlendirilmiştir (249). 2000' li yılların başında ise test materyellerinden elde edilen içeriklerin hücreler üzerinde

kullanıldığını görmekteyiz (238, 239). Bu çalışmalarını takip eden yıllarda, test materyelinin yüzeyi ile hücre kültür besiyer hacmi arasındaki oranın Uluslararası standardizasyon organizasyonu (ISO) standartlarına göre baz alınarak hesaplanmasıyla hazırlanan teflon diskler kullanılmıştır (250). Bizim kullandığımız yöntem, Thomson' un 2003 yılında yaptığı çalışmasında (261), hücreler ile materyelin direkt temasını sağlayan methoda benzemektedir. Bugüne kadar materyel yüzeylerinin EMD ile kaplanarak hücre kültür ortamına temasının sağlandığı tek bir çalışma bulunmaktadır (248). Inoue' nin çalışmasında olduğu gibi çalışmamızda da hücre kültüründen önce EMD, materyellerin üzerine eklenmiş, bir gece +4°C' de bekletildikten sonra üzerine hücreler ekilmiştir. Ancak yukarıda bahsedildiği gibi bu çalışmada kullanılan hücre tipi, materyel farklılığı, EMD' nin uygulanma şekli ve incelenen testler, çalışma düzenimizden oldukça değişiktir. Sadece test materyelleriyle hücrelerin direkt temas etmesi ve yüzeylerinin EMD ile kaplanması açısından benzerlik göstermektedir.

Hücre canlılığının ve çoğalmasının saptanması için metiltetrazoliumbromid (MTS) testi kullanıldı. MTS testi, canlı hücrelerin içinde bulunan mitokondrilerin ürettiği suksinat dehidrogenaz enzim aktivitesini tespit ederek işleyişi değerlendirir. Böylece kullanılan materyellerin, sadece canlı hücreler üzerindeki etkileri ortaya çıkar. Bu yöntem mekanizması, yaşayan hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enziminin, sarı renkli, suda çözünen MTS' i [3 - (4,5- dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 - difenil tetrazolium bromide] suda çözünmeyen, koyu mavi renkte formazana dönüştürmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan formazan miktarı, canlı kalan hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Yapılan proliferasyon testinde EMD' nin, hücre canlılığını koruduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç periodontal fibroblastlar üzerindeki olumlu etkisiyle aynı doğrultudadır (111, 126, 140, 141, 142). Üç ayrı hayvan dokusundan alınmış fibroblast hücre hattı üzerinde MTA ile yapılan in vitro bir çalışmada da, materyelin sitotoksik etkisinin bulunmaması, MTA' nın biyouyumluluğunu açıklamaktadır (251). Jafari 2005 yılında, dentin rejenerasyonu ve pulpa iyileşmesinde önemli yere sahip olan fare diş pulpası odontoblastları ve diferansiye olmamış mezankim hücreleri üzerinde bir çalışma yapmıştır. Ortaya çıkan bulgular, MTA' nın bu hücreler üzerinde apoptotik etkisinin bulunmadığını hatta hücrelerdeki DNA sentezini artırarak dentin – pulpa kompleksinin rejenerasyonuna katılabileceğini göstermektedir (252). MTA ve kalsiyum hidroksit

bazlı simanın insan diş pulpası hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir araştırmada, MTA' nın hücre çoğalmasını iyi ölçüde arttırdığı gözlenmiştir (245, 253). Aynı zamanda insan periodontal ligament ve gingival fibroblast hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışma sonucuna dayanarak, kök ucu dolgusu olarak rahatlıkla kullanılabilmesi belirtilmektedir (230, 238, 250). Hatta MTA' nın ilk hazırlandığı anda ve sertleşmesini takip eden 24 saat boyunca insan periodontal ligament hücreleri üzerinde ortaya çıkan sititoksik etkisinin, başka kök ucu dolgu maddelerine kıyasla daha düşük bulunması (238) klinik kullanımdaki başarısını pekiştirmektedir. Bu çalışma sonucunun bulgularımızla uyumlu olduğunu görmekteyiz. Kuafaj tedavisinde kullanılan kalsiyum hidroksit bazlı materyellerin enfeksiyonu kontrol altına alması ve yara iyileşme prosedürünü stimule etmesi dışında, pulpa hücreleri üzerinde dentinojenik bir etkisi bulunmamaktadır (232). Bu da odontoblast farklılaşmasında neden Dycal' ı tercih etmediğimizi açıklamaktadır. Dycal' ın sahip olduğu yüksek pH değeri ile yara yüzeyinde meydana getirdiği nekrotik tabaka sayesinde uyaran oluşturması; Min' in (253) çalışmasındaki gibi, bu çalışmada da toksik etkili olduğunu göstermektedir.

Odontoblast ve osteoblast hücreleri, sert doku oluşturma özelliği ile dentin ve kemik yapımında rol oynarlar. Dentin oluşumu için, ilk olarak kalsiyum iyonları ile karakterize nodül oluşumu gözlenir (33, 83). Çalışmada kullanılan hücrelerin, odontoblastlara farklılaşması için, içerisinde β gliserolfosfat ve askorbik asit bulunan bir odontojenik besiyeri kullanılmıştır (83). Hazırlanan bu solüsyonun 14 gün süreyle uygulanması, hücrelerin farklılaşmasını sağlayarak nodül oluşumunu başlatır. Oluşan bu sert doku Von Kosa boyaması ile değerlendirilir. Von Kosa boyama testi, hücrelerin meydana getirdiği kalsiyum iyonlarıyla gümüş katyonlarının yer değiştirmesi esasına dayanır. Kalsiyum tuzları, dışarıdan eklenen gümüş nitrat solüsyonu sayesinde metalik gümüşe indirgenerek gümüş tuzları haline gelir ve siyah bir görüntü verir. Mineralize olmayan saha ise koyu sarıya boyanır (254). Bu çalışmada farklı bir yöntem kullanarak kuyucukların tabanı test materyelleri ile kaplandığı için, oluşan nodüller sadece EMD kullanılan grupta tespit edilebildi. EMD kuyucuk tabanının şeffaflığını bozmadan gümüş tuzlarının gözlenmesini sağlamıştır. Ancak MTA ile oluşan gümüş tuzları Von Kosa boyaması sırasında yüzeyden uzaklaşarak bu grupta nodül oluşumunun tespit edilmesini önlemiştir. Sonuçta Von Kosa boyaması ile EMD kullanılan grupta tespit

edilen hücresel nodül oluşumu, materyelin matriks mineralizasyonuna olan olumlu etkisini ifade etmektedir. Bu çalışma sonucu, insan kemik iliği bağ dokusu hücrelerinin kullanıldığı başka bir Von Kossa boyama bulgusu ile ters düşmektedir (255). Aynı çalışmada, sonucumuzdan farklı olarak EMD' nin kemik hücresine farklılaşmayı olumsuz etkilemesi, kullanılan EMD miktarı ile hücre grubunun değişik olması şeklinde açıklanabilir. Sıçan kemik iliği kök hücreleri ile dişeti fibroblastlarının kullanıldığı başka bir in vitro çalışma sonucu ise, EMD' nin kemik iliği hücrelerinin nodül oluşumuna pozitif etki yaptığını göstermektedir. Dişeti fibroblastları üzerindeki Von Kossa etkisi ise olumsuzdur (256). Bu çalışmada Von Kossa boyaması ile tespit edilen nodül oluşumu, ışık mikroskop görüntüsüyle de desteklenmektedir. Bu sonuç aynı zamanda EMD' nin ALP enzim aktivitesi ve DSPP sentezinin incelendiği PCR sonucuyla birbirini tutmaktadır. Bilindiği gibi DSPP miktarı, nodül oluşumunu takiben olan dentin matriks mineralizasyonu sonucunda ciddi bir artış göstermektedir (83).

ALP enzimi, kalsifiye doku oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Bu enzimin aktivitesi, osteoblast ve odontoblast hücreleri için belirleyicidir (93). Aslında bu enzim aktivitesinin tespiti, Von Kossa boyamasından farklı olarak ortamda bulunan hücrelerin odontoblast/osteoblast hücresine farklılaşmasını değerlendirir. Pulpadan alınan fibroblastlar, dişetindekilere göre alkalen fosfataz aktivitesini daha fazla göstermektedir (33). Diş folikülü öncü hücrelerinin kalsifiye doku meydana getirdiğini gösteren çalışma da vardır (56). Çalışmamızdaki ALP aktivite sonuçları, EMD' nin jerm halindeki dişlerden alınmış kök hücreleri başarılı şekilde uyardığını göstermektedir. Bu sonuç Keila' nın 2004 yılında sıçan kemik iliği kök hücrelerininin ALP aktivitesinin EMD varlığında arttığını belirttiği çalışma bulgusuyla da uyumludur. Ancak aynı çalışmada dişeti fibroblastları EMD varlığında beklenen ALP aktivite sonucunu vermemiştir (254). Hatta kalsiyum hidroksitin EMD ile kaplanması halinde oluşan yüzey, sıçan periodontal ligament fibroblastlarının ALP aktivitesini az da olsa olumsuz etkilemiştir (248). Kullanılan materyeller hücreler üzerinde mineralize nodül oluşumunu ve ALP aktivitesini arttırarak osteojenik veya dentinojenik farklılaşmaya katılmaktadır. Yukarıdaki çalışmada, EMD' nin sıçan dişeti fibroblastları üzerinde mineralize nodül oluşumu ve ALP aktivitesi açısından olumsuz etkisine rağmen, matriks oluşumunu arttırması ile ilişkili olarak osteojenik farklılaşmasından bahsedilmektedir (254). Diş

folikül öncü hücrelerinin osteojenik farklılaşmasının BMP-2, 7 gibi faktörlerle sağlandığı belirtilmektedir (48, 49). Aynı zamanda gelişimini tamamlamamış dentinde, odontoblast farklılaşmasının BMP-2 ve BMP-4 ile oluştuğu ifade edilmektedir (97). EMD' nin aynı büyüme faktörlerine (BMP 2,4,7) sahip olması (124, 133) bizim çalışmamızda, DSPP ve ON sentezi ile ALP aktivitesi üzerinde ortaya çıkan olumlu sonucu açıklamakta hatta MTA' nın da aynı büyüme faktörünü (BMP-2) uyararak sert doku oluşumunda yer alması (182) düşüncesiyle de uyumlu olmaktadır. Elde edilen bu sonuç, Min ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışma sonucuna uymaktadır. O çalışmaya göre EMD, insan diş pulpası kök hücreleri üzerinde MTA' nın odontoblastik farklılaşmasına sinerjik etki yapmakta, tek başına MTA, hem DSPP sentezinde hem de ALP aktivitesinde yetersiz kalmaktadır. Ancak daha önceden de belirtildiği gibi, bu çalışma dizaynında da materyel ile hücreler direkt temas etmemektedir (158). Min' in (158) çalışmasına göre, MTA tek başına osteonektin (ON) sentezinde, daha iyi sonuç vermekte, DSPP sentezinde ise EMD ile birlikte kullanımı başarılı olarak gösterilmektedir. MTA' nın kemik hücresine farklılaşmayı odontoblast hücre farklılaşmasına göre daha başarılı bir şekilde sağladığı düşünülebilir. MTA' nın insan osteosarkom hücrelerinde, enflamatuar sitokin (Interleukin - IL1 α , IL1 β ve IL6) salınımını sağlayarak kemik oluşumuna katıldığı belirtilmesine (249) rağmen osteoblast hücrelerinde ALP aktivitesini etkilemediği, bunun yanı sıra osteokalsin sentezini arttırdığını gösteren in vitro çalışma da bulunmaktadır (256). Jerm halindeki 20 yaş dişlerinin bütünüyle kullanıldığı başka bir laboratuvar çalışmasında da, MTA ve kalsiyum hidroksitin her ikisinin de açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde osteodentin yapıda, mineralize bir saha meydana getirdiği tespit edilmiştir (233). Nakamura (237), pulpotomi tedavisinde Dycal' ı kullandığı bir hayvan çalışmasında, kök kanalının daralmasına neden olacak şekilde dentin köprüsü oluşumu gözlediğini vurgulamaktadır. Bunun aksine EMD pulpa fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadan reparatif dentin oluşumu göstermiştir (237). Köpek dişleri üzerinde MTA ile yapılan bir kuafaj çalışmasında, MTA' nın temasta bulunduğu yüzeysel pulpa dokusu hücrelerinde enflamatuar reaksiyona sebep olmaksızın histolojik değişiklik yarattığı belirtilmektedir. Üçüncü haftanın sonunda da osteodentin bariyer oluşumu SEM ve TEM analiziyle gösterilmektedir (232). Reparatif dentinogenesiste, açığa çıkmış pulpa dokusunun korunması için kullanılan materyellerden, pulpa dokusuyla uyumlu bir sert doku

bariyeri meydana getirmesi istenmektedir. Kalsiyum hidroksit ve MTA ile meydana gelen bu mineralize sahanın, osteodentin yapıda olduğunun belirlenmesi (232, 233), pulpa hücrelerinin bu materyeller karşısında hem osteoblastik hemde odontoblastik farklılaşmasını ifade etmektedir. Bununla beraber, yapılan çalışmalar osteokalsin, osteonektin ve dentin matriks proteininin (DMP1) hem dentin hem kemik için ortak proteinler olduğunu, ancak (DSPP) - dentin sialofosfoproteininin sadece odontoblast hücreleri için özel olduğunu göstermektedir (83). Bu sebeple, uyararak farklılaşması sağlanan hücre DNA' larının, PCR analizi ile, dentine özel protein karşısında çoğaldığının gösterilmesi gerekmektedir. Kültürü yapılan insan pulpası hücrelerinin odontoblast farklılaşmasında ON protein sentezine rastlanması ve bu proteinin odontoblast farklılaşmasıyla ilişkilendirilmesi (253) nedeniyle, bu çalışmadaki PCR analizinde DSPP yanında ON sentezine de yer verildi. Bu sonuçlara göre, EMD ve MTA başarılı şekilde hem DSPP hem ON sentezini sağlamaktadır. Ancak EMD, MTA' ya göre daha başarılı sonuç vermektedir.

Yapılan çalışmalarda, MTA ve kalsiyum hidroksitin ortamda yarattığı alkalen pH' ın kök dentininden büyüme faktörlerinin salınımını sağladığı ifade edilmektedir. Hatta MTA sayesinde açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde kristalin bir yapı oluştuğu, bunun yüzeyinde meydana gelen fibronektin tabakasının da büyüme faktörleri için aynı etkiyi yarattığı belirtilmektedir (232). Bununla uyumlu olarak reparatif dentinogenesiste MTA ile oluşan mineralizasyonda, BMP- 2' nin aktif rol oynadığı (182) aynı zamanda BMP-2' nin insan diş pulpası hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını hızlandığı (236) ve fare dişlerinin gelişimi sırasında DSPP sentezinden sorumlu olduğu (257) belirtilmektedir. Yani MTA, diş pulpası hücrelerinde BMP-2' nin açığa çıkmasında etkin rol oynayarak odontoblast hücre farklılaşması ve mineralizasyonu sağlamaktadır. Bu durum, MTA' nın diş jermi kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını ve ALP aktivitesini olumlu etkilediğini gösteren çalışma bulgularımızla da aynı doğrultudadır. Ancak insan dişeti fibroblastları üzerinde yapılan bir başka çalışmada da, MTA ile ilişkili TGF - β ve BMP - 2 salınımı ortaya konmakta ve insan dişeti fibroblastlarının MTA ile karşılaştığı anda periodontal ligament fibroblastları gibi davranarak kemik tamiri ve sementogenesis ile ilişkili genleri aktive ettiği vurgulanmaktadır (204). TGF- β 1' in köpek dişlerinin amputasyon tedavisinde pulpa dokusunun rejenerasyonunu

engellediğini gösteren bulgulara (97) rağmen insan diş pulpası kök hücrelerinde odontoblast farklılaşmasını sağladığını belirten çalışma da bulunmaktadır (258). Kullanılan hücre grubuna göre farklı sonuçların ortaya çıktığını görmekteyiz. Daha önceden de, bu çalışmada kullanılan diş jermi kök hücrelerinin çeşitliliğine dair araştırmaların olmadığına yukarıda değinmiştik. Ancak diş jerminin etrafında bulunan doku (diş folikülü) dişin ağız içerisine yükselmesini takiben, yerini periodontal ligamente bırakır. Bu nedenle diş jermi kök hücrelerinin diş folikülü yanında diş pulpasına dair hücreler içerdiğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak diş folikülünün sementoblast, osteoblast ve periodontal ligament öncü hücrelerini kapsamı (50, 56), bu çalışmada kullanılan hücreler karşısında MTA' nın odontoblast farklılaşması yanında ON sentezi ve ALP aktivitesine yaptığı olumlu etkiyi açıklamaktadır.

Yapılan çalışmaların çoğunda hücrelerin materyellerle direkt temas etmediği görülmektedir (158, 182, 204, 245, 251, 252). Çünkü gerekli hücre proliferasyonu ve sayısı ancak hücrenin yüzeye optimal atışmanı ile sağlanmakta böylece hücreler büyümeleri için gereken, hücre – yüzey ve hücre – hücre temasını kazanmaktadır. (251). Bu sebeple, yapılan çalışmaların çoğunda hücrelerin işlem görmemiş kültür plaklarına direkt temas ettiği belirtilmektedir. Ancak bu uygulama şekli, kullanılan materyel ile hücrelerin temasını önleyerek, klinik kullanımı yansıtmamaktadır (245). Hatta test materyellerinin tabana yerleştirilip sertleşmesi sağlandıktan sonra, üstlerine belli oranlarda konularak değişik yoğunlukta elde edilen besiyerlerinin, ayrı bir kuyucuğa ekilen hücreler üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır (238, 239). Hücrelerin MTA ile temasından olumsuz etkilendiğini gösteren çalışmaların (259, 260) aksine bizim çalışmamız gerek MTT boyaması ile yapılan proliferasyon testinde gerekse SEM görüntülerinde oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Bu çalışma sonuçları Thomson' nın (261), fare sementoblast hücreleriyle temas halinde bulunan MTA' nın, hücrelerin atışmanını ve büyümesini başarılı şekilde sağladığını gösteren araştırma bulgularıyla da uyumludur (261). Hücrelerle materyelin direkt temas ettiği bir başka çalışma sonucunda yine MTA' nın insan osteosarkom hücreleri için sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir (249). Fare odontoblast ve farklılaşmamış mezankim hücreleri üzerinde MTA ile yapılan in vitro çalışma, materyelin bu hücrelerin proliferasyonunu

arttırdığını, bu durumun dentin rejenerasyonu açısından, klinik kullanımda olumlu sonuçlara neden olacağı belirtilmektedir (252).

Hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve mineralize matris oluşturabilmesi için ortamdaki materyele adezyonu birinci koşuldur. Hücrelerin üzerinde bulunduğu materyele adaptasyonu, bu materyelin toksik etkisiyle doğrudan ilişkilidir. SEM analizi, kullanılan madde ile hücrenin temasını görüntüler. Koh 1998 yılında yaptığı in vitro çalışmasında, hücre morfolojisinin değerlendirilmesi için ilk defa SEM analizini kullanmıştır (249). Min ve ark.'larının 2007' de yaptığı çalışmasında portland cement ve dycal üzerindeki insan pulpa hücrelerinin SEM görüntülerini MTT proliferasyon testiyle desteklemektedir (253). Elde edilen sonuçlar, SEM ve MTT bulgularımızla paralellik göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak, portland cement üzerinde yayılan hücrelerin proliferasyonu da başarılı bulunmuş, ancak Dycal' ın toksik etkisi, hücrelerin kendini bırakmadan, daha yuvarlak görüntü vermesine sebep olmuştur. Yalnız bu çalışma düzeninde, SEM görüntüleri için hücreler 24 saatliğine materyellerin üzerinde inkübe edilmiş, proliferasyon testi ise materyeller ile hücrelerin teması olmadan gerçekleştirilmiştir. Uyguladığımız teknikte, klinik uygulamayı yansıtması açısından MTT ve SEM analizi, materyel - hücre temasıyla sağlanmıştır. Thomson 2003 yılında, fare sementoblastik hücreleriyle MTA ve başka endodontik materyellerin direkt temasını sağlayarak SEM analizi ve osteokalsin sentezini incelemiştir. Bizim çalışma dizaynı ve sonucumuzla uyumlu olarak, hücreler 48 saat MTA üzerinde inkübe edildikten sonra SEM incelemesinde iyi bir adezyon göstermiştir (261). Ancak sementoblastik hücrelerin mineralizasyonuna dair yapılan bu çalışmadan farklı olarak, araştırmamızda diş folikülü yanında diş pulpası kök hücrelerini de içerdiği düşünülen diş jermi kök hücrelerinin mineralizasyonuna da değinildi. İleride pulpa kuafajı amacıyla kullanmak istenilen MTA ve diş jermi kök hücrelerinin odontoblastik aktiviteyi yeterli ölçüde sağladığı tespit edildi. EMD için elde edilen veriler de olumlu bulundu. Ancak MTA' nın EMD ile kaplanması, MTA yüzeyine olumsuz etki yapmıştır. Bu sebeple MTA/EMD bileşiminin odontoblastik ve osteoblastik farklılaşmaya etkisi değerlendirilemedi. Bunun yanısıra diş jermi kök hücrelerinin EMD ile kaplanmış Dycal karşısında biyouyumluluğunun artmış olması, kuafaj amaçlı in vivo kullanımına alternatif oluşturabilir. Literatüre baktığımızda kalsiyum hidroksitin asidik

ortamda artan iyon salınımı (169) ile ortaya çıkan OH⁻ miktarı, antimikrobiyal etki yanında istenilen mineralizasyon ve kalsifikasyonu sağlamaktadır (247). Kalsiyum hidroksitin EMD ile kaplanarak sıçan periodontal ligament fibroblastları üzerinde kullanıldığı bir çalışmada, sementle ilişkili proteinlerin arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu yüzeyin in vivo koşullarda sement oluşumuna olumlu etki yapacağını düşünmektedir (248). Fakat Dycal/EMD birleşimine dair PCR ve ALP aktivitesi analizlerinin yapılması yerinde olacaktır. Hatta diş jerminin sahip olduğu hücrelerin detaylı karakterlerinin incelenmesi de gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

1. DYCAL, MTA ve EMDOGAİN' in insan diş jermi kök hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinin incelendiği deneyde, hücreler 96 gözlü plağa ekildi. Materyeller, EMDOGAİN ile kaplanarak uygulandı. Hücre canlılık analizinin 48 saat sonucuna göre, en iyi ataşman EMDOGAİN ve Hücre Kültür Plağı (HKP) grubunda saptandı (Şekil 3).
2. DYCAL, hem yüzeye tutunan hücre sayısının azlığı (Şekil 18A, B) hem de bununla doğru orantılı olarak MTS testinde ortaya çıkan sitotoksik etkisi (Şekil 3) nedeniyle hücrelerle biyouyumluluğu en az bulunan grup oldu.
3. EMDOGAİN ile kaplanan DYCAL, hücreler için daha az toksik bir yüzey oluşturdu (Şekil 3).
4. Ancak yinede DYCAL' ın ortamda bulunduğu her iki SEM analizi sonucuna göre, hücreler EMDOGAİN ve HKP yüzeyinde büyüyenlerden morfolojik olarak farklı gözlemlendi (Şekil 18A,B, Şekil 19A,B).
5. MTA, SEM analizi sonucuna göre hücrelerin morfolojik yapısını değiştirmede (Şekil 22A,B). Hücre canlılık testi sonucunda ise DYCAL' dan daha az toksik bulundu (Şekil 3).
6. MTA' nın EMDOGAİN ile kaplanması, DYCAL yüzeyinde olduğu gibi istenilen sertlik ve pürüzsüzlüğü sağlayamadı (Şekil 23A,B). Bu yüzeye hücrelerin ekimi sırasında, MTA parçalarının besiyeri içinde dağılması, yüzeye tutunan hücre sayısını da olumsuz etkiledi.
7. Hücreler odontoblastik farklılaşmalarının sağlanması amacıyla, 14 gün boyunca odontojenik besiyeri ile indüklendi. EMDOGAİN ile kaplanmış yüzeyin, diğer yüzeylere kıyasla ALP aktivite sonucu en üst seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 17).

- 8.** RealTime-PCR analizi sonuçları, EMDOGAİN' in diş jermi kök hücrelerinin odontoblastik farklılaşması sırasında ON ve DSPP sentezini uyardığını göstermektedir (Şekil 7, 8).
- 9.** MTA' nın RealTime-PCR analizi sonucu ise, EMDOGAİN grubundan oldukça düşük seviyede olmak üzere ON ve DSPP sentezini uyardığını ortaya koymaktadır (Şekil 7, 8).
- 10.** Odontojenik besiyeri içeren (+) kontrol grubu hücreleri, 14. günün sonunda ışık mikroskobu altında incelendiğinde, poligonal şekilleri, kalsiyum birikimi ve kristal oluşumu gözlemlendi (Şekil 11A,B).
- 11.** Odontojenik besiyeri ve EMDOGAİN ile kaplı yüzeyde bulunan hücreler, 14. günün sonunda ışık mikroskobu altında incelendiğinde, poligonal şekilleri ile kristal oluşumu gözlemlendi (Şekil 13A,B).
- 12.** Odontojenik besiyeri ve EMDOGAİN içeren hücelere Von Kossa boyaması yapıldıktan sonra, ışık mikroskobu altında bakıldığında nodül oluşumu izlendi (şekil 15, 16).
- 13.** EMDOGAİN ve odontojenik besiyeri içeren grupta bulunan diş jermi kök hücrelerinin, morfolojik olarak poligonal şekil aldığı ve sayıca oldukça fazla olduğu yapılan SEM analizinde görülmektedir (Şekil 24A, B).

7. KAYNAKLAR

1. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehon Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 97: 13625-13630, 2000.
2. Huang J, Sonoyama W. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*, 34: 645–651, 2008a.
3. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res*, 81: 531–535, 2002.
4. Krebsbach PH, Robey PG. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *J Dent Educ*, 66: 766–773, 2002.
5. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 13: 5807–5812, 2003.
6. Seo BM, Miura M, Gronthos S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364: 149–155, 2004.
7. Thomson JA, Joseph Itskovitz-Eldor, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel J, Marshall S, Jones JM. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147, 1998.
8. Klimanskaya I, Rosenthal N and Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nature Reviews*, 7: 131-142, 2008.

9. Shi S and Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res*, 18: 696–704, 2003.
10. Hawley RG, Ali Ramezani A and Hawley TS. Hematopoietic Stem Cells In: Abelson JN, Simon MI. *Methods in enzymology*. Academic press, New York USA, pp 149-179, 1995.
11. Charbord P. Hemopoietic Stem Cells: Analysis of Some Parameters Critical for Engraftment. *Stem cells*, 12: 545–562, 1994.
12. Conrad C, Huss R. Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery. *J Surg Res*, 124: 201–208, 2005.
13. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem cells*, 19: 180–192, 2001.
14. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG and Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, 82: 976–981, 2003.
15. Iohara K. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*, 83: 590-595, 2004.
16. Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, Wang S.L and Lesot H. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res*, 85: 416–421, 2006.
17. Yu JH, Deng ZH, Shi JN, Zhai HH, Nie X, Zhuang H, Li YC and JinY. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin–pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng*, 12: 3097–3105, 2006a.

18. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol*, 197: 430–440, 2002.
19. McCulloch EA and Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat. Med*, 11: 1026–1028, 2005.
20. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100: 143–155, 2000.
21. Muroyama Y, Fujihara M, Ikeya M, Kondoh H and Takada S. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev*, 16: 548–553, 2002.
22. Muroyama Y, Kondoh H and Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 313: 915–921, 2004.
23. Lee HY, Kleber M, Hari L, Brault V, Suter U, Taketo MM, Kemler R and Sommer L. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science*, 303: 1020–1023, 2004.
24. Sommer L. Multiple roles of canonical Wnt signaling in cell cycle progression and cell lineage specification in neural development. *Cell Cycle*, 3: 701–703, 2004.
25. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas J L, Poellinger L, Lendahl U and Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 9: 617 – 628, 2005.
26. Jasoni CL and Reh TA. Temporal and spatial pattern of MASH- I expression in the developing rat retina demonstrates progenitor cell heterogeneity. *J Comp Neurol*, 369: 319 – 327, 1996.

27. James J, Das AV, Bhattacharya S, Chacko DM, Zhao X and Ahmad I. In vitro generation of early born neurons from late retinal progenitors. *J Neurosci*, 23: 8193–8203, 2003.
28. Akagi T, Inoue T, Miyoshi G, Bessho Y, Takahashi M, Lee JE, Guillemot F and Kageyama R. Requirement of multiple basic helix–loop–helix genes for retinal neuronal subtype specification. *J. Biol. Chem*, 279: 28492 – 28498, 2004.
29. Fischer AJ, Omar G, Walton NA, Verrill TA and Unson CG. Glucagon expressing neurons within the retina regulate the proliferation of neural progenitors in the circumferential marginal zone of the avian eye. *J Neurosci*, 25: 10157 – 10166, 2005.
30. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*, 147: 105–120, 1999.
31. Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Enhanced proliferation, attachment and osteopontin expression by porcine periodontal cells exposed to Emdogain®. *Archs Oral Biol*, 50: 1047-1054, 2005.
32. Zhou Y, Hutmacher DW, Sae-Lim V, Zhou Z, Woodruff M and Lim TM. Osteogenic and Adipogenic Induction Potential of Human Periodontal Cells. *J Periodontol*, 79: 525– 534, 2008.
33. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y and M. Mori'. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp - derived fibroblasts. *Archs Oral Biol*, 12: 1045–1055, 1992.
34. Garant PR. Glycogen Storage Within Undifferentiated Cells of the Dental Papilla: Electron Microscope Findings. *J Dent Res*, 47: 699, 1968.

35. Andelin WE, Shabahang S. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod* 29: 646–650, 2003.
36. Zhang W. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. *Tissue Eng*, 12: 2813–2824, 2006.
37. Zhang WJ. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *Tissue Eng Regen Med*, 2: 117–125, 2008.
38. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells In: Abelson JN, Simon MI. *Methods in enzymology*. Academic press, New York USA, pp 99-113, 1995.
39. Lin NH, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodont Res*, 43: 514 – 523, 2008.
40. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000, 24: 99-126, 2000.
41. Haase HR, Bartold PM. Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal cells. *J Periodontol*, 72: 341 - 348, 2001.
42. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofacial Res*, 8: 191 – 199, 2005.
43. Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodont Res*, 36: 367 – 376, 2001.
44. Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Anti-TGF- β antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21 WAF1/cip1 and prevents its

- inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodont Res*, 37: 255 – 262, 2002.
45. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*, 33: 703-708, 2007.
 46. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y and Polakowska RR. Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming abilities. *Stem Cells and Development*, 17: 1175–1184, 2008.
 47. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 34: 166–71, 2008.
 48. Morscezk C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24: 155-165, 2005a.
 49. Morszeck C, Moehl C, Gotz W, Heredia A, Schaffer TE, Eckstein N, Sippel C, Hoffmann KH. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*, 29: 567 – 575, 2005b.
 50. Kémoun P, Laurencin-Dalicious S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. 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, 2007.
 51. Yao S, Pan F, Prpic V and Wise GE. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *J Dent Res*, 87: 767-771, 2008.

52. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, Sahin F, Palotas A, Rizvanov AA. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. *Neurochem Res*, 34: 1272–1277, 2009a.
53. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Lida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*, 87: 676–681, 2008.
54. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, Palota's A and Kose GT. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The Pharmacogenomics J*, 1 – 9, 2009b.
55. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatric Dent*, 19: 61–70, 2009.
56. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Saugspier M, Viale-Bouroncle S, Driemel O. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Invest*, 13: 383-391, 2009.
57. Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J and Jin Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol. Cell*, 99: 465 – 474, 2007.
58. Sonoyama W, Liu Y, Fang D. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS ONE*, 1: 1-8, 2006.
59. Huang GTJ. Apexification: the beginning of its end. *Int Endod J*, 42: 855–866, 2009.

60. Luan X, Ito Y, Dangaria S and Diekwisch TGH. Dental Follicle Progenitor Cell Heterogeneity in the Developing Mouse Periodontium. *Stem Cells and Development*, 15: 595–608, 2006.
61. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 109: 337–346, 2002.
62. Chai Y and Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: A perspective. *Microsc. Res. Tech*, 60: 469–479, 2003.
63. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP and Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J. Dent. Res*, 83: 523–528, 2004.
64. Ohazama A, Modino SA, Miletich I and Sharpe PT. Stem cell based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res*, 83: 518–522, 2004.
65. Yen AH, and Sharpe PT. Regeneration of teeth using stem cell based tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther*, 6: 9–16, 2006.
66. Chang J, Sonayama W, Wang Z. Non-canonical WNT-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem*, 282: 30938–30948, 2007.
67. Zhao M, Jin O, Berry JE, Nociti FH, Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *J Periodontol*, 75: 154–161, 2004.
68. Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Giannobile WV. Cementum engineering using three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 67: 54–60, 2003.

69. Thesleff I, Sharpe P. Signaling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 67: 111–123, 1997.
70. Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*, 103: 155 – 169, 1988.
71. Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*, 9: 189–200, 1980.
72. Marks SC Jr, Cahill DR. Experimental study in the dog of the nonactive role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol*, 29: 311–322, 1984.
73. Farges JC, Couble ML, Magloire H, Hartma DJ And Bleicher F. Ultrastructural Characterization of Mesenchymal and Epithelial Cells Co-Cultured from Human Dental Root Apical Explants. *Connect Tissue Res*, 33: 37-46, 1995.
74. Kramer PR, Nares S, Kramer SF. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res*, 83: 27–34, 2004.
75. Narayanan K, Sirinivas R. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast - like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Cell biology*, 98: 4516–4521, 2001.
76. Nam H, Lee G. Identification of novel epithelial stem cell-like cells in human deciduous dental pulp. *Biochem Biophys Res Commun*, 386: 135-139, 2009.
77. Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA & MacDougall M. Genomic Organization, Chromosomal Mapping, and Promoter Analysis of the Mouse Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) Gene,

- Which Codes for Both Dentin Sialoprotein and Dentin Phosphoprotein. *J Biol Chem*, 273: 9457–9464, 1998.
- 78.** Linde A. Dentin Matrix Proteins: Composition and Possible Functions in Calcification. *Anat Rec*, 224: 154-166, 1989.
- 79.** Ruch JV, Lesot H and Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int. J Dev. Biol*, 39: 51-68, 1995.
- 80.** Martinez EF, Machado de Souza SO, Correa L and Cavalcanti de Araujo V. Immunohistochemical Localization of Tenascin, Fibronectin, and Type III Collagen in Human Dental Pulp. *J Endod*, 26: 708-711, 2000.
- 81.** Macdougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature Sensitive Simian Virus 40 Large T Antigen Immortalization of Murine Odontoblast Cell Cultures: Establishment of Clonal Odontoblast Cell Line. *Connect Tissue Res* 33: 97–103, 1995.
- 82.** Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 Cell Line from CD-1 Mouse Fetal Molar Dental Papillae. *Connect Tissue Res*, 37: 233- 249, 1998.
- 83.** Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat MB, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66: 129– 138, 2000.
- 84.** Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J DevBiol*, 39: 169 – 179, 1995.
- 85.** MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J & Gu TT. Dentin Phosphoprotein and Dentin Sialoprotein Are Cleavage Products Expressed from a

Single Transcript Coded by a Gene on Human Chromosome 4 *J. Biol. Chem.* 272: 835 – 842, 1997.

86. Bleicher F, Couble ML, Buchaille R, Farges JC, Magloire H. New genes involved in odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 15: 30-33, 2001.
87. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*, 28: 77-92, 2000.
88. Huang G, Shagramanova K. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*, 32: 1066–1073, 2006.
89. Murray PE, Garcia-Godoy F et al. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, 33: 377-390, 2007.
90. Kitamura CK. Kimura. Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. *J Dent Res*, 78: 673-680, 1999.
91. Mizuno M & Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J*, 41: 933–938, 2008.
92. Yoshida N, Yoshida K. Immunoelectron-microscopic study of the localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Archs Oral Biol*, 40: 83-89, 1995.
93. Beck GR, Zerler JrB & Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8352 – 8357, 2000.

94. Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M and Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res*, 75: 1590 – 1597, 1996.
95. Six N, Lasfargues J, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Archs Oral Biol*, 47: 177–187, 2002.
96. Kikuchi N, Kitamura C, Morotomi T, Inuyama Y, Ishimatsu H, Tabata Y, Nishihara T, DDS, Terashita M. Formation of Dentin-like Particles in Dentin Defects above Exposed pulp by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor 2 from Gelatin Hydrogels. *J Endod*, 33: 1198-1202, 2007.
97. Nakashima M. Induction Of Dentine In Amputated Pulp Of Dogs By Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins-2 And -4 with Collagen Matrix. *Archs Oral Biol*, 39: 1085-1089, 1994.
98. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H. Differential Effects of Various Growth Factors and Cytokines on the Syntheses of DNA, Type I Collagen, Laminin, Fibronectin, Osteonectin/Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), and Alkaline Phosphatase by Human Pulp Cells in Culture. *J Cell Physiol*, 174: 194–205, 1998.
99. Ikeda R, Yoshida K, Tsukahara S, Sakamoto Y, Tanaka H, Furukawa K, Inoue I. The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem*, 280: 8523–8530, 2005.

- 100.** Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y and Kurihara H. Behavior of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Defects. *J Periodontol*, 77: 1003 -1007, 2006.
- 101.** R d'Aquino, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, Rosa AD and Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1162 – 1171, 2007.
- 102.** Gandia CA, Arminan. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*, 26: 638 – 645, 2008.
- 103.** Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F. A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB). *J Bone and Min Res*, 20: 1394 – 1402, 2005.
- 104.** Honda MJ, Fong H, Sumita SIY, Sarikaya M. Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. *Med Mol Morphol*, 41:183–192, 2008.
- 105.** Laino G, Graziano A, D'aquino R, Pirozzi G, Lanza V. An Approachable Human Adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Phys*, 206: 693 – 701, 2006.
- 106.** Patel P. A natural stem cell therapy? How novel findings and biotechnology clarify the ethics of stem cell research. *J Med Ethics*, 32: 235–239, 2006.
- 107.** Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24: 658 – 668, 1997.

108. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol*, 31: 184 – 192, 2004.
109. Zeldich E, Koren R, Dard M, Nemcovsky C and Weinreb M. EGFR in Enamel Matrix Derivative-induced Gingival Fibroblast Mitogenesis. *J Dent Res*, 87: 850 – 855, 2008.
110. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, 24: 693 – 696, 1997.
111. Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarstrom L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 24: 685 – 692, 1997.
112. Chen WY, Abatangelo G. Functions of hylauronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 7: 79 – 89, 1999.
113. Schlueter SR, Carnes DL, Cochran DL. In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. *J Periodontol*, 78: 141 – 151, 2007.
114. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K and Inoue T. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Micros Res and Tech*, 60:491–502, 2003.
115. Slavkin HC, Bringas P, Bessem C. Hertwig s epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodont Res*, 23: 28 – 40, 1998.

116. Brookes S, Robinson C, Kirkham J & Bonass WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Archs Oral Biol*, 40: 1–14, 1995.
117. Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM. & Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. *J Biol Chem*, 271: 4431–4435, 1996.
118. Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L & Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone and Min Res*, 11: 883 – 891, 1996.
119. Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 28: 181–188, 2001.
120. Suzuki N, Ohyama M, Maeno M. Attachment of Human Periodontal Ligament Cells to Enamel Matrix derived protein is mediated via Interaction between BSP-like Molecules and Integrin $\alpha\beta 3$. *J Periodontol* 72: 1520–1526, 2001.
121. Johnson DL, Carnes D, Steffensen B and Cochran DL. Cellular Effects of Enamel Matrix Derivative Are Associated With Different Molecular Weight Fractions Following Separation by Size-Exclusion Chromatography. *J Periodontol*, 80: 648–656, 2009.
122. Garrocho-Rangel A, Flores H, Silva-Herzog D, Hernandez-Sierra F, Mandeville P and Pozos-Guillen AJ, Potosí SL. Efficacy of EMD versus calcium hydroxide in direct pulp capping of primary molars: a randomized controlled clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107: 733-738, 2009.
123. Zetterstrom O, Andersson C, Eriksson L, Fredriksson A, Friskopp J, Heden G. Jansson B, Lundgren T, Nilveits R, Olsson A, Renvert S, Salonen L, Sjostrom L,

- Winetl A, Ostgren A, Gestrelus S. Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol* 24: 697-704, 1997.
- 124.** Kaida H, Hamachi T, Anan H and Maeda K. Wound Healing Process of Injured Pulp Tissues with Emdogain Gel. *J Endod*, 34: 26 – 30, 2008.
- 125.** Rincon JC, Haase HR, Bartold PM. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *J Periodont Res*, 38: 290–295, 2003.
- 126.** Van Der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beersten W. Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor b1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 71: 31–43, 2000.
- 127.** Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T. Participation of endogenous IGF-I and TGF-b1 with enamel matrix derivative- stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 38: 1 – 9, 2003.
- 128.** Hama H, Azuma H, Seto H, Kido JI, Nagata T. Inhibitory effect of enamel matrix derivative on osteoblastic differentiation of rat calvaria cells in culture. *J Periodont Res*, 43: 179 – 185, 2008.
- 129.** Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL, Varesio L. Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood*, 76: 2466 – 2469, 1990.
- 130.** Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res*, 77: 1708-1716, 1998.

131. Heng NHM, N'Guessan PD, Kleber BM, Bernimoulin JP and Pischon N. Enamel Matrix Derivative Induces Connective Tissue Growth Factor Expression in Human Osteoblastic Cells. *J Periodontol*, 78: 2369- 2379, 2007.
132. Itoh N, Kasai H, Ariyoshi W, Harada E, Yokota M, Nishihara T. Mechanisms involved in the enhancement of osteoclast formation by enamel matrix derivative. *J Periodont Res*, 41: 273 – 279, 2006.
133. Takayama T, Suzuki N, Narukawa M, Tokunaga T, Otsuka K, Ito K. Enamel matrix derivative stimulates core binding factor alpha1/Runt-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells. *J Periodontol*, 76: 244 – 249, 2005.
134. He J, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LSW and Zhu Q. Direct contact between enamel matrix derivative (EMD) and osteoblasts is not required for EMD-induced cell proliferation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98: 370 – 375, 2004.
135. Safavi KE, Kazemi R, Watkins D. Adhesion of enamel matrix derivatives on root-end filling materials. *J Endod*, 25: 710-712, 1999.
136. Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Fabi B, Lundgren E, Lyngstadaas PS. Presence of an enamel matrix protein derivative on human teeth following periodontal surgery. *Clin Oral Invest*, 6: 183-187, 2002.
137. Cochran DL, King GN, Schoolfield J, Velasquez-Plata, Mellonig JT, Jones A. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol*, 74: 1043–1055, 2003.
138. Cheng UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci*, 9: 410 – 414, 2004.

139. Narukawa M, Suzuki N, Takayama T, Shoji T, Otsuka K, Ito K. Enamel matrix derivative stimulates chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Periodont Res*, 42: 131–137, 2007.
140. Cattaneo V, Rota C, Silverstri M. Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblasts: proliferation, morphology and root surface colonization: An in vitro study. *J Periodont Res*, 38: 568 – 574, 2003.
141. Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 71: 1270–1277, 2000.
142. Kawase T, Okuda K, Yoshie H & Burns DM. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAINs) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodontal Research*, 35: 291–300, 2000.
143. Schwartz Z, Carnes DL, Pulliam R. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, 71: 1287–1296, 2000.
144. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*, 35 (Suppl. 8): 87– 105, 2008.
145. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB. Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 74: 1423 – 1431, 2003.
146. Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod*, 4: 232 – 237, 1978.

147. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent*, 20: 223 – 229, 1995.
148. Jaber LC, Mascres. Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med*, 20: 502 – 508, 1991.
149. Jaber LC, Mascres. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 73: 92 - 98, 1992.
150. Barrieshi-Nusair KM, Qudeimat MA. A prospective clinical study of mineral trioxide aggregate for partial pulpotomy in cariously exposed permanent teeth. *J Endod*, 32: 731–735, 2006.
151. Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, Tucker M, Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod*, 23: 378 – 82, 1997.
152. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 31: 711 –718, 2005.
153. Inai T, Kukita T, Ohsaki Y, Nagata K, Kukita A, Kurisu K. Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast development in rat molar tooth germs. *Anat Rec*, 229: 259 – 270, 1991.
154. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, et al. Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clin Oral Invest*, 6: 51 –57, 2002.
155. Papagerakis P, MacDougall M, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Oboeuf M, Bernal A. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone*, 32: 228 –240, 2003.

156. Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*, 24: 678–684, 1997b.
157. Olsson H, Davies JR, Holst KE, Schröder U and Petersson K. Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps. *Int Endod J*, 38: 186–194, 2005.
158. Min KS, Yang SH and Kim EC. The Combined Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Enamel Matrix Derivative on Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *J Endod*, 35: 847–851, 2009.
159. Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X and Yamashita A. Histopathological Study of Dental Pulp Tissue Capped with Enamel Matrix Derivative. *J Endod*, 29: 176-179, 2003.
160. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res*, 64: 541 –548, 1985.
161. Nakamura Y, Hammarström L, Lundberg E, Ekdahl H, Matsumoto K, Gestrelus S and Lyngstadaas SP. Enamel Matrix Derivative Promotes Reparative Processes in the Dental Pulp. *Adv Dent Res*, 15: 105–107, 2001.
162. Igarashi R, Sahara T, Shimizu-Ishiura M and Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Elect Micros*, 52: 227 – 236, 2003.
163. Sculean A, Auschill TM, Donos N, Brex M & Arweiler NB. Effect of an enamel matrix protein derivative (Emdogains) on ex vivo dental plaque vitality. *J Clin Periodontol*, 28: 1074 – 1078, 2001.

- 164.** Arweiler NB, Auschill TM, Donos N & Sculean A. Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental plaque biofilm vitality. *Clin Oral Invest*, 6: 205 – 209, 2002.
- 165.** Ohyama M, Suzuki N, Yamaguchi Y, Maeno M, Otsuka K, Ito K. Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C2C12 cells. *J Periodontol*, 73: 543 – 550, 2002.
- 166.** Otsuka T, Kasai H, Yamaguchi K, Nishihara T. Enamel matrix derivative promotes osteoclast cell formation by RANKL production in mouse marrow cultures. *J Dent*, 33: 744–755, 2005.
- 167.** Parkar MH, Tonetti M. Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: Analysis using cDNA arrays. *J Periodontol*, 75: 1539 – 1546, 2004.
- 168.** Jiang J, Goodarzi G, He J, Li H, Safavi KE, Spångberg LSW and Zhu Q, Farmington CT and Dallas TX. Emdogain-gel stimulates proliferation of odontoblasts and Osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102: 698 – 702, 2006.
- 169.** Fava LRG & Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*, 32: 257–282, 1999.
- 170.** Pereira JC. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp-capping procedures. Histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 50: 176 – 186, 1980.
- 171.** Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog. Part I. *Braz Dent J*, 7: 41 – 46, 1996.

- 172.** Ballal NV, Shavi GV, Kumar R, Kundabala M and Bhat KS. In Vitro Sustained Release of Calcium Ions and pH Maintenance from Different Vehicles Containing Calcium Hydroxide. *J Endod*, 36: 862–866, 2010.
- 173.** Çalışkan K. Endodontide tanı ve tedaviler. (1. Baskı) Nobel Matbaacılık, İstanbul, ss: 31-82, 2006.
- 174.** Goldberg F, Gurfinkel J. Analysis of the use of Dycal with gutta percha points as an endodontic filling technique. *Oral Surg*, 47: 78–82, 1979.
- 175.** Shiveley J, Reader AI, Beck FM, Melfi R and Meyers W. An In Vitro Autoradiographic Study Comparing the Apical Seal of Uncatalyzed Dycal to Grossman's Sealer. *J Endod*, 11: 62-66, 1985.
- 176.** Ölmez A, Öztas N, Basak F, Sabuncuoğlu B. A histopathologic study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 86: 98– 103, 1998.
- 177.** Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ. Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1–2 year observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol*, 14: 156–168, 1985.
- 178.** Stanley HR, Pameijer CH. Pulp capping with a new visiblelight- curing calcium hydroxide composition (Prisma VLC Dycal). *Oper Dent*, 10: 156 – 163, 1985.
- 179.** Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the “Total etch” technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent*, 11: 45–54, 1998.
- 180.** Tronstad L. Reaction of the exposed pulp to Dycal treatment. *Oral Surg, Oral Med and Oral Pathol*, 38: 945–953, 1974.

- 181.** Isermann GT and Kaminski EJ. Pulpal response to minimal exposure in presence of bacteria and Dycal. *J Endod*, 5: 322–327, 1979.
- 182.** Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T and Saito T. The Effect of Mineral Trioxide Aggregate on the Mineralization Ability of Rat Dental Pulp Cells: An In Vitro Study. *J Endod*, 34: 1057–1060, 2008.
- 183.** Kuratate M, Yoshihara K, Shigetani Y, Yoshihara N, Ohshima H and Okiji T, Immunohistochemical Analysis of Nestin, Osteopontin and Proliferating Cells in the Reparative Process of Exposed Dental Pulp Capped with Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 34: 970–974, 2008.
- 184.** Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 21: 349 – 353, 1995a.
- 185.** Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*, 39: 747–754, 2006.
- 186.** Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent Mater*, 24: 149–164, 2008.
- 187.** Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*, 42, 227 – 237, 2009.
- 188.** Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 25: 197 – 205, 1999.

- 189.** Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J*, 36: 225–231, 2003.
- 190.** Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent*, 30: 203–209, 2006.
- 191.** Accorinte MLR, Holland R, Reis A. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*, 34: 1 – 6, 2008.
- 192.** Nair PNR, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J*, 41: 128 – 150, 2008.
- 193.** Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod*, 30: 80 –83, 2004.
- 194.** Daoudi MF, Saunders WP. In vitro evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope. *J Endod*, 28: 512 –515, 2002.
- 195.** Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*, 19: 541 – 544, 1993.
- 196.** Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*, 21: 603 – 608, 1995b.

197. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*, 23: 225 – 228, 1997.
198. Apaydin ES, Shabahang S, Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. *J Endod*, 30: 21–24, 2004.
199. Steinig TH, Regan JD and Gutmann JL. The Use And Predictable Placement of Mineral Trioxide Aggregate In One-Visit Apexification Cases. *Aust Endod J*, 29: 34-42, 2003.
200. Holland R, Souza V, Murata SS. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J*, 12: 109–113, 2001.
201. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol and Endod*, 95: 483–489, 2003.
202. De-Deus G, Coutinho-Filho T. The use of white Portland cement as an apical plug in a tooth with a necrotic pulp and wide-open apex: a case report. *Int Endod J*, 40: 653–660, 2007.
203. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J*, 38: 137-143, 2005.
204. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, MD, Serdar MA and Basak F. Effect of Mineral Trioxide Aggregate Cements on Transforming Growth Factor beta1 and Bone Morphogenetic Protein Production by Human Fibroblasts In Vitro. *J Endod*, 33: 447 – 450, 2007.

- 205.** Tay FR and Pashley DH. Monoblocks in Root Canals: A Hypothetical or a Tangible Goal. *J Endod*, 33: 391–398, 2007.
- 206.** White JD, Lacefield WR, Chavers LS and Eleazer PD. The Effect of Three Commonly Used Endodontic Materials on the Strength and Hardness of Root Dentin. *J Endod*, 28: 828–830, 2002.
- 207.** Camileri J. Evaluation of Selected Properties of Mineral Trioxide Aggregate Sealer Cement. *J Endod*, 35: 1412–1417, 2009.
- 208.** Abbasipour F, Rastqar A, Bakhtiar H, Khalilkhani H, Aeinehchi M, Janahmadi M. The nociceptive and anti-nociceptive effects of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 42: 794–801, 2009.
- 209.** Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long – term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, 18: 134–137, 2002.
- 210.** Huang GTJ. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 36: 379–386, 2008b.
- 211.** Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, 30: 196 – 200, 2004.
- 212.** Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM and Huang GTJ. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the Revitalization/Revascularization procedure of immature dog teeth with Apical Periodontitis. *J Endod*, 36: 56–63, 2010.
- 213.** Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod*, 25: 1 – 5, 1999.

- 214.** Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*, 42: 1118 – 1126, 2009.
- 215.** Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG and Laporta R, Meadow E. Revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod*, 2: 159–165, 1976.
- 216.** Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*, 32: 1205–1213, 2006.
- 217.** Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*, 17: 185 – 187, 2001.
- 218.** Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*, 34: 876 – 887, 2008.
- 219.** Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root end filling materials. *J Endod*, 21: 537–539, 1995.
- 220.** Cvek M, Cleaton - Jones P, Austin J, Kling M, Lownie J, Fatti P. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endod Dent Traumatol*, 6: 170–176, 1990.
- 221.** Ritter ALS, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser doppler flowmetry, radiography and histology. *Dent traumatol*, 20: 75 – 84, 2004.
- 222.** Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*, 19: 76 – 78, 1993.

- 223.** Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod*, 20: 127 – 129, 1994.
- 224.** Trope M. Regenerative Potential of Dental Pulp. *J Endod*, 34: 13–17, 2008.
- 225.** Schuurs AHB, Gruythuysen RJM, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol*, 16: 240–250, 2000.
- 226.** Lu Y, Liu T, Li H, Pi G. Histological evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide on human pulp tissue. *Int Endod J*, 41: 643 – 650, 2008
- 227.** Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Naulin Ifi C, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J*, 41: 781 – 790, 2008.
- 228.** Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K and Yawaka Y. Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Rat Clonal Dental Pulp Cells: Expression of Cyclooxygenase-2 mRNA and Inflammation-related Protein via Nuclear Factor Kappa B Signaling System. *J Endod*, 35: 843-846, 2009.
- 229.** Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod*, 105: 70 – 76, 2008.
- 230.** Pistorius A, Willershausen B, Briseno Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. *Int Endod J*, 36: 610 – 615, 2003.

- 231.** Reston EG, Souza Costa CA. Scanning electron microscopy evaluation of the hard tissue barrier after pulp capping with calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate (MTA) or ProRoot MTA. *Aust Endod J*, 35: 78–84, 2009.
- 232.** Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J*, 35: 245 – 254, 2002.
- 233.** Tecles O, Laurent P, Aubut V, About I. Human Tooth Culture: A Study Model for Reparative Dentinogenesis and Direct Pulp Capping Materials Biocompatibility. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 85B: 180-187, 2008.
- 234.** Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*, 21: 4–11, 1996.
- 235.** Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D and Charette M. Induction of Reparative Dentine Formation In Monkeys By Recombinant Human Osteogenic Protein-L. *Archs Oral Biol*, 38: 571 – 576, 1993.
- 236.** Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*, 30: 205 – 208, 2004.
- 237.** Nakamura L, Hammarström K, Matsumoto & Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J*, 35: 407 – 417, 2002.
- 238.** Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*, 26: 288-291, 2000.
- 239.** Huang TH, Ding S, Hsu Ting-Cheng, Kao Chia-Tze. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials* 24: 3909 – 3913, 2003.

- 240.** Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*, 321: 391, 2005.
- 241.** Lisignolia G, Cristinoa S, Piacentinia A, Toneguzzia S, Grassia F, Cavalloa C, Zinib N, Solimandoc L, Maraldibc NM, Facchiniad A. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials*, 26: 5677-5686, 2005.
- 242.** Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST, Mohammadi MM, Dummer PMH. The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 41: 108 – 116, 2008.
- 243.** Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandag M, Canpolat C, MalkonduO, Kaptan F, Dummer PMH. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 42: 1004–1014, 2009.
- 244.** Saghiri MA, Lotfi M, Saghiri AM, Vosoughhosseini S, Aeinehchi M and Ranjkesh B. Scanning Electron Micrograph and Surface Hardness of Mineral Trioxide Aggregate in the Presence of Alkaline pH. *J Endod*, 35: 706 – 710, 2009.
- 245.** Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*, 39: 415 – 422, 2006.
- 246.** Silva LAB, Filho PN, Leonardo MR, Rossi MA and Pansani CA. Effect of Calcium Hydroxide on Bacterial Endotoxin In Vivo. *J Endod*, 28: 94 - 98, 2002.
- 247.** Desai S and Chandler N. Calcium Hydroxide–Based Root Canal Sealers: A Review. *J Endod*, 35: 475–480, 2009.

- 248.** Inoue M, LeGeros RZ, Hoffman C, Diamond K, Rosenberg PA, Craig RG. Effect of enamel matrix proteins on the phenotype expression of periodontal ligament cells cultured on dental materials. *J Biomed Mater Res*, 69A: 172 – 179, 2004.
- 249.** Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR and Torabinejad M. Cellular Response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 24: 543 – 547, 1998.
- 250.** Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F and Ural AU. Cytotoxic Effects of Four Different Endodontic Materials in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Endod*, 33: 1450 – 1454, 2007.
- 251.** Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glassionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod*, 31: 44 – 46, 2005.
- 252.** Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ and Nör JE. Effect of ProRoot MTA on Pulp Cell Apoptosis and Proliferation In Vitro. *J Endod*, 31: 387 – 391, 2005.
- 253.** Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU and Kim EC. Human Pulp Cells Response to Portland Cement In Vitro. *J Endod*, 33: 163 – 166, 2007.
- 254.** Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z and Weinreb M. In Vitro Effects Of Enamel Matrix Proteins On Rat Bone Marrow Cells And Gingival Fibroblasts. *J Dent Res*, 83; 134–138, 2004.
- 255.** Guida L, Annunziata M, Carinci F, Feo AD, Passaro I and Oliva A. In Vitro Biologic Response of Human Bone Marrow Stromal Cells to Enamel Matrix Derivative. *J Periodontol*, 78: 2190 – 2196, 2007.

- 256.** Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 37: 432 – 439, 1997.
- 257.** Chen S, Gluhak-Heinrich J, Martinez M, Li T, Wu Y, Chuang HH, Chen L, Dong J, Gay I and MacDougall M. Bone Morphogenetic Protein 2 Mediates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Odontoblast Differentiation via NF- κ B Signaling. *The J Biol Chem*, 283: 19359 – 19370, 2008.
- 258.** He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*, 32: 827 – 834, 2008.
- 259.** Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot and White MTA. *Int Endod J*, 36: 564 – 570, 2003.
- 260.** Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J*, 38: 834 – 842, 2005.
- 261.** Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts Maintain Expression of Osteocalcin in the Presence of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 29: 407 - 412, 2003.

8. ÖZGEÇMİŞ

1975 Yılında Ankara' da doğdu. İlköğrenimini Antalya Kolejinde, Ortaöğrenimini Edirne Anadolu Lisesinde tamamladı. 1999 yılında Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden mezun oldu. 2006 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Halen Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalında doktora öğrencisidir. Evli ve iki kız çocuğu sahibidir.