



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**FARELERİN DORSUMUNA YERLEŞTİRİLEN İNSAN DİŞİ
KÖK DENTİNLERİNİN DEĞİŞİK ASİTLERLE
DAĞLANMASI SONRASI İNSAN DENTAL PULPA KÖK
HÜCRE EKİMİ YOLUYLA YAPILAN REJENERATİF
ENDODONTİK TEDAVİLERDE OLUŞAN YENİ
DOKULARIN HİSTOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Alp Abidin ATEŞÇİ

Pedodonti Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.

Ege Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**FARELERİN DORSUMUNA YERLEŞTİRİLEN İNSAN DİŞİ KÖK
DENTİNLERİNİN DEĞİŞİK ASİTLERLE DAĞLANMASI
SONRASI İNSAN DENTAL PULPA KÖK HÜCRE EKİMİ
YOLUYLA YAPILAN REJENERATİF ENDODONTİK
TEDAVİLERDE OLUŞAN YENİ DOKULARIN HİSTOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

Pedodonti Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Dt. Alp Abidin ATEŞÇİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. A. Cemal ERONAT

İZMİR

2019

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı :E.Ü. DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

Anabilim Dalı : Pedodonti Ana Bilim Dalı

Program : Doktora

Tez Konusu :

Farelerin dorsumuna yerleştirilen insan dişi kök dentinlerinin değişik asitlerle dağlanması sonrası insan Dental Pulpa Kök Hücresi ekimi yoluyla yapılan rejeneratif endodontik tedavilerde oluşan yeni dokuların histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmesi

Danışman : Prof.Dr. Ahmet Cemal ERONAT

Tezi Hazırlayan : Alp Abidin ATEŞÇİ

Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Başkan(Danışman) : Prof. Dr. Ahmet Cemal ERONAT

Üye / İmza : Prof.Dr. Nesrin ERONAT

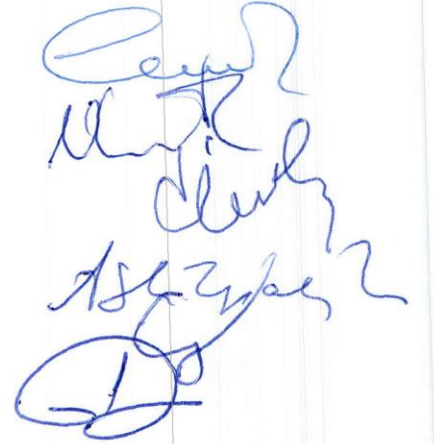
Üye / İmza : Prof.Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Üye / İmza : Prof.Dr. Aşlı TOPALOĞLU AK

Üye / İmza : Doç.Dr. Çığır Biray AVCI

Üye / İmza : Prof. Dr. Fahinur ERTUĞRUL

Tezin Kabul Edildiği Tarih : 11.11.2019



Önsöz

Tıp ve diş hekimliğinin bir çok alanında doku mühendisliği ile ilgili yapılmakta olan araştırmalar, tedavi seçeneklerinde uygulayıcıların önüne yeni yeni ufuklar açmaktadır. Günümüzde en güncel olanların başında rejeneratif endodontik tedavilerle ilgili çalışmalar gelmektedir. Rejeneratif endodontik tedavilerin birincil amacı pulpa-dentin kompleksinin duraksamış olan canlılığının ve fonksiyonunun tekrar devamlılığını sağlamaktır. Bu tedavilerde, oluşan yeni dokunun biyolojik özellikleri üzerinde etkisi olan ve dentinin içerisinde gömülü olarak yer alan büyüme faktörlerinin salınımı tedavinin başarısında önemli rol oynamaktadır. Dentin matriksi, bu biyoaktif moleküllerin dentinogenezis sırasında salınımını sağlayan bir rezervuar görevi görmektedir. Bu büyüme faktörleri arasında, Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ve Fibroblast Growth Factor (FGF) gibi yara iyileşmesi ve doku tamirinde önemli rol oynayan moleküller yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda dentinin çeşitli asitlerle ve pürüzlendirme ajanları ile (etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), sitrik asit, fosforik asit) uyarılması sonucunda dentin matriksinden büyüme faktörlerinin salındığı ve bu büyüme faktörlerinin, differansiye olmamış mezenkimal kök hücreleri (MKH) uyararak pulpa-dentin rejenerasyonunu başlattığı gösterilmiştir.

Çalışmamızın *in vitro* bölümünde, diş hekimliğinde dentin pürüzlendirilmesi amacıyla kullanılan asitlerin dentinde gömülü olarak bulunan TGF- β 1, VEGF, FGF-2 ve BMP-2 salınımına olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızın *in vivo* bölümünde ise aynı asitlerin pulpal rejenerasyona olan etkileri araştırılmıştır.

Doktora eğitimim sırasında bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesi, çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinden tez yazımına kadar doktora sürecimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benden hiç esirgemeyen danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Cemal ERONAT'a,

Tez izleme komitemde yer alarak tez konumun belirlenmesi, kurgulanması, uygulanması aşamalarında her türlü desteği veren, bilgileriyle çalışmamı yönlendiren Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Nesrin

ERONAT'a, C.B.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Çığır Biray AVCI'ya,

Doktoramın ilk iki senesinde öğrencisi olduğum, doktora eğitimime başladığım günden bu yana bana her konuda yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aslı Topaloğlu AK'a,

Doktora eğitimim süresince gerek pratik gerek teorik olarak gelişmemde katkıda bulunan, bilgi ve deneyimlerini fedakarca paylaşan Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Çok değerli ailem ve arkadaşlarıma bu yoğun çalışma sürecinde bana her zaman destek olup ve fedakarlıklarını esirgemedikleri için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, Kasım 2019

Dt. Alp Abidin ATEŞÇİ

Özet

Farelerin Dorsumuna Yerleştirilen İnsan Dişi Kök Dentinlerinin Değişik Asitlerle Dağlanması Sonrası İnsan Dental Pulpa Kök Hücre Ekimi Yoluyla Yapılan Rejeneratif Endodontik Tedavilerde Oluşan Yeni Dokuların Histolojik Ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Rejeneratif endodontik tedavilerin amacı, travmatik yaralanmalar veya bakteriyel kontaminasyon sonrası gelişen enflamasyon sonucu canlılığını kaybetmiş ve bundan dolayı kök gelişimi duraksamış dişlerin pulpa-dentin kompleksinin gelişiminin ve fonksiyonunun tekrar kazandırılmasıdır. Klinik rejeneratif endodontik tedavilerde son irrigasyon ajanı olarak EDTA kullanımı altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı rejeneratif endodontik tedavilerde kullanılan EDTA'ya alternatif olabilecek dentin pürüzlendirme ajanlarının dentinden büyüme faktörlerinin (TGF- β 1, FGF, VEGF ve BMP-2) salınımına ve kullanımları sonrasında oluşan yeni dokulara olan etkilerinin histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelenmesidir.

Çalışmamızın *in vitro* bölümünde çekilmiş gömülü yirmi yaş dişlerinin koronal bölümleri kullanılmıştır. Çekilen dişlerin önce kök kısımları, daha sonra da mineleri su soğutması altında aeratör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kök kısımlarından ayrılmış kronlar önce kron-kök istikametinde ortadan ikiye bölünmüş ve her parçadan enlemesine izomet cihazı yardımıyla steril salin irrigasyonu altında 1mm kalınlığında dentin diskleri elde edilmiştir. Dentin disklerinin ilk yarısındaki örnekler kontrol (distile su) ve test edilecek asit gruplarına (EDTA, sitrik asit, fitik asit, fosforik asit) belirlenen sürelerde batırılmış ve öğütülerek toz haline getirilmiştir. Dentin disklerinin ikinci yarısındaki örnekler kontrol ve test edilecek asit gruplarına batırıldıktan sonra 3 gün süre ile mezenkimal kök hücre ortamında inkübasyona bırakılmıştır. 3 günlük inkübasyon periyodundan sonra örnekler toplanmış ve öğütülerek dentin tozu haline getirilmiştir. Elde edilen dentin tozları TGF- β 1, FGF-2, VEGF ve BMP-2 salınımları açısından ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kitleri yardımıyla incelenmiştir. Kök hücre ekimi yapılmayan gruplar içerisinde en yüksek TGF- β 1 salınımı sitrik asit grubunda, en yüksek VEGF salınımı fosforik asit grubunda, en yüksek BMP-2 ve FGF-2 salınımı fitik asit grubunda gözlenmiştir. Kök hücre ekimi yapılan gruplar içerisinde en yüksek TGF- β 1, VEGF ve

BMP-2 salınımı fosforik asit grubunda gözlenirken en yüksek FGF-2 salınımı EDTA grubunda gözlenmiştir. MKH uygulaması sonucunda tüm büyüme faktörlerinde dramatik bir artış olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızın *in vivo* bölümünde çekilmiş tek köklü insan keser dişlerinin kök bölümleri kullanılmıştır. Çekilen dişlerin kron kısımları su soğutması altında aeratör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kök kanalları kanal eğeleri yardımıyla genişletildikten sonra 3-4 mm uzunluğunda kök fragmanı örnekleri elde edilmiştir. Kök fragmanları, kontrol (Distile su) ve asit grupları (EDTA, sitrik asit, fitik asit, fosforik asit) ile irriga edilmiştir. İrrigasyon tamamlandıktan sonra kök kanallarının dar çapa sahip uç kısımları 1-2 mm kalınlığında mineral trioksit agregat (MTA) ile örtülmüştür. Örneklerin ilk yarısındaki kök fragmanlarının içine sadece polilaktid-koglikolik asit (PLG) doku iskelesi implantasyonu yapılmıştır. Grupların ikinci yarısındaki kök fragmanlarının içine, hücre kültüründe üzerine insan MKH ekimi yapılan sentetik PLG doku iskeleleri yerleştirilmiştir. Kök fragmanları immüsupresif deney farelerinin dorsumlarına (fare başına 2 adet kök fragmanı) subkutan olarak yerleştirilmiştir. 2 ay sonra fareler sakrifiye edilerek dişler histolojik ve immünohistokimyasal boyalar yardımıyla incelenmiştir. MKH ve asit uygulaması yapılan örneklerde çok daha organize ve pulpa benzeri bir doku oluşumu gözlenmiştir. Odontoblastlar tarafından eksprese edilen belirteçlerin en yoğun olarak fosforik asit + MKH grubunda boyandığı saptanmıştır. Fosforik asitin rejeneratif endodontik tedavilerde altın standart olarak kabul edilen EDTA yerine kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: rejeneratif endodonti, doku mühendisliği, kök hücre

Abstract

Comparative histological and immunohistochemical analysis of new tissues after conditioning root canal dentin with different acids in regenerative endodontic treatment using DPSC seeding implanted in mice dorsum

The primary goal of the regenerative endodontic treatment is to regain vitality and function of pulp-dentin complex which lost due to trauma or microbial contamination. By this way, root development will continue and teeth will function as an organ in its lifespan. EDTA has been considered the gold standard in regenerative endodontic treatments. The aim of this study was to evaluate the effects of different dentin conditioning agents alternative to EDTA on released growth factors (TGF- β 1, FGF, VEGF ve BMP-2) and investigate their effects on the newly formed tissues *in vivo* by histochemical and immunohistochemical methods.

In the *in vitro* part of the study coronal sections of extracted human impacted third molar teeth were used. Crowns were separated from roots and splitted from its half by cutting corono-apical direction and cut into a disc shape (approximately 1-mm thick) horizontally with isomet saw under sterile saline irrigation. First half of the dentin discs prepared from half of the crowns were immersed in the acids and grinded into dentin powder. Other half of the dentin discs prepared from other half of the crowns were conditioned with the same acids and medium containing human mesenchymal stem cells (MSCs) were seeded onto dentin discs for three days. After three days of incubation period, dentin discs were removed and grinded into dentin powder. Dentin powders were tested by ELISA kits for TGF- β 1, FGF-2, VEGF and BMP-2 quantification. In the first half of the groups, highest TGF- β 1 release was seen in citric acid group, highest VEGF release was seen in phoshoric acid group, highest BMP-2 and FGF-2 release was seen in the phytic acid group. In the second half of the groups highest TGF- β 1, FGF-2 and BMP-2 release was seen in the phoshoric acid group while highest FGF-2 release was seen in the EDTA group. Three days of MSC seeding after dentin conditioning has made a dramatic increase in all of the growth factors.

In the *in vivo* part of our study, root sections of extracted human incisor teeth were used. Crowns sections of extracted teeth were removed from roots under water cooling. Root canals were enlarged by endodontic files and approximately 3-4 mm length of root fragments were cut under water cooling. Root fragments were irrigated with the groups including control and acid solutions (distilled water, EDTA, citric acid, phytic acid, phosphoric acid). After irrigation narrow end of the canals were sealed with 1-2 mm thickness of MTA. In the first half of the groups only PLG scaffolds were inserted into the root fragments. In the second half of the groups, MSCs were seeded onto PLG scaffolds and then inserted into root fragments. Root fragments were implanted into the subcutaneous space of immunodeficient mice dorsum (2 teeth for each mice). Two months after implantation, mice were sacrificed and root fragments were evaluated by histochemical and immunohistochemical stainings. Pulp-like tissues were observed in the groups which include acid application and MSC seeding. The highest density stainings with odontoblast markers were observed in the phosphoric acid + MSC application group. We conclude that phosphoric acid could be an alternative conditioning agent to EDTA, which is considered as golden standard, in regenerative endodontic treatments.

Keywords: regenerative endodontics, tissue engineering, stem cell

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	II
Özet.....	IV
Abstract.....	VI
İçindekiler.....	VIII
Tablolar Dizini.....	XIII
Grafikler Dizini.....	XV
Şekiller Dizini.....	XVII
Kısaltmalar.....	XXVIII
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	7
2.1. Rejeneratif Endodonti ve Doku Mühendisliği.....	7
2.1.1 Doku Mühendisliğinin Elemanları.....	9
2.1.1.1 Kök Hücreler.....	9
2.1.1.1.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	10
2.1.1.1.1.1 Farklanma (Plastisite).....	10
2.1.1.1.1.2 Kendini Yenileyebilme (Self-Renewal).....	11
2.1.1.1.1.3 Pluripotensi (Köklülük).....	11
2.1.1.1.2 Kök Hücre Çeşitleri.....	12
2.1.1.1.2.1 Embriyonik Kök Hücreler.....	12
2.1.1.1.2.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler.....	13
2.1.1.1.2.2.1 Fetüs Kök Hücreleri.....	13
2.1.1.1.2.2.2 Kadavra Kök Hücreleri.....	13
2.1.1.1.2.2.3 Erişkin Kök Hücreler.....	13
2.1.1.1.2.2.3.1 Hematopoetik Kök Hücreler (HKH).....	14
2.1.1.1.2.2.3.2 Non-Hematopoetik Kök Hücreler (non-HKH).....	14
2.1.1.1.2.2.3.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	14
2.1.1.1.2.2.3.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Multipotent Farklılaşma Kapasitesi.....	18
2.1.1.1.2.2.3.2.1.2 Kök Hücre Nişi.....	18

2.1.1.1.2.2.3.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Avantaj ve Dezavantajları.....	20
2.1.1.1.2.2.3.2.1.3.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Avantajları.....	20
2.1.1.1.2.2.3.2.1.3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Dezavantajları.....	20
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4 Diş ve Çevre Dokulardaki MKH Kaynakları.....	21
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPKH).....	21
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.2 Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH).....	22
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.3 Periodontal Ligament Kök Hücreleri.....	22
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.4 Dental Folikül Kök Hücreleri (DFKH).....	23
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.5 Eksfoliyel Süt Dişi Pulpasından Elde Edilen Kök Hücreler (SDKH)	23
2.1.1.1.2.2.3.2.1.5 Dental Kaynaklı Olmayan Mezenkimal Kök Hücreler.....	25
2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.1 Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....	25
2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.2 Alveol Kemiği Kaynaklı Kök Hücreler.....	25
2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.3 Periost Kaynaklı Kök Hücreler.....	26
2.1.1.1.2.2.3.2.1.6 Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve <i>in vitro</i> Ortamda Çoğaltılması.....	26
2.1.1.1.2.2.3.2.1.6.1 <i>in vitro</i> Kültür Öncesi Hazırlık.....	27
2.1.1.1.2.2.3.2.1.6.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültür İşlemi.....	28
2.1.1.2 Büyüme Faktörleri.....	29
2.1.1.2.1 Transforming Growth Factor Beta (TGF- β).....	30
2.1.1.2.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	30
2.1.1.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	31
2.1.1.2.4 Fibroblast Growth Factor (FGF).....	32
2.1.1.2.5 Platelet Derived Growth Factor (PDGF).....	33
2.1.1.3 Doku İskelesi (Skaffold).....	33
2.1.1.4 Dentin Pürüzlendirme Ajanları.....	36
2.1.1.4.1 EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit).....	36
2.1.1.4.2 Fosforik Asit.....	37

2.1.1.4.3 Fitik Asit (İnositol Hekzofosfat, IP-6).....	37
2.1.1.4.4 Sitrik Asit	38
3. Gereç ve Yöntem.....	40
3.1 Etik Kurul.....	40
3.2 Deneyin <i>in vitro</i> Bölümünde Kullanılacak Dişlerin Seçim Kriterleri ve Çalışma Gruplarının Dağılımı.....	40
3.3 Deneyin <i>in vitro</i> Bölümündeki Çalışma Tekniği.....	42
3.3.1 MKH Ekimi Yapılmayan Gruplardaki Uygulamalar.....	42
3.3.2 MKH Ekimi Yapılacak Gruplardaki Uygulamalar.....	43
3.3.2.1 MKH'lerin İzolasyonu ve Kültür İşlemleri.....	43
3.3.2.2 Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	44
3.3.2.3 MKH'lerin Kesitlere Ekimi ve İnkübasyonu.....	45
3.3.3 Dentin Tozlarındaki Büyüme Faktörlerinin ELISA Yöntemi İle Ölçümü.....	46
3.3.3.1 Yıkama Tamponunun Hazırlanması.....	46
3.3.3.2 Standart Solüsyonlarının Hazırlanması.....	47
3.3.3.3 Biotin-Belirleme Antikoru Hazırlanması.....	48
3.3.3.4 HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması.....	48
3.3.3.5 Çalışma Protokolü.....	48
3.3.4 Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	49
3.4 Deneyin <i>in vivo</i> Bölümündeki Çalışma Tekniği.....	49
3.4.1 Deneyin <i>in vivo</i> Bölümünde Kullanılacak Dişlerin Seçim Kriterleri, Hazırlanması ve Çalışma Gruplarına Dağılımı.....	49
3.4.2 PLG Doku İskelesinin Hazırlanması.....	51
3.4.3 Hazırlanan Kök Dentinlerinin Farelerin Dorsumlarına Yerleştirilmesi.....	51
3.4.4 Deney Farelerinin Sakrifikasyonu, Kök Dentinlerinin Geri Toplanması, Fiksasyonu ve Dekalsifikasyonu.....	54
3.4.5 Histokimyasal Boyama.....	56
3.4.5.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyaması.....	56
3.4.5.2 Masson Trikrom (MT) Boyama.....	58
3.4.5.3 Alizerin Kırmızısı Boyaması.....	60

3.4.6 İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama.....	61
3.4.6.1 İndirekt İmmünohistokimyasal Boyamalarda Kullanılan Belirteçler.....	61
3.4.6.2 İmmünohistokimyasal Boyama Protokolleri.....	63
3.4.6.3 Terminal Deoksinükleotidil-Transferaz Aracılı Deoksiüridin Trifosfoat Nick- End İşaretleme (TUNEL) Boyaması.....	65
3.4.7 Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi.....	67
4. Bulgular.....	68
4.1 Araştırmanın <i>in vitro</i> Bölümündeki Bulgular.....	68
4.1.1 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki TGF-β1 Bulguları.....	68
4.1.2 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki VEGF Bulguları.....	70
4.1.3 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki BMP-2 Bulguları.....	71
4.1.4 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki FGF-2 Bulguları.....	73
4.2 Araştırmanın <i>in vivo</i> Bölümündeki Bulgular.....	74
4.2.1 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular.....	74
4.2.1.1 MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu Bulguları.....	74
4.2.1.2 MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu Bulguları	80
4.2.1.3 MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu Bulguları.....	86
4.2.1.4 MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu Bulguları.....	93
4.2.1.5 MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu Bulguları.....	100
4.2.1.6 MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu Bulguları.....	107
4.2.1.7 MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu Bulguları.....	114
4.2.1.8 MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu Bulguları.....	120
4.2.1.9 MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu Bulguları.....	127
4.2.1.10 MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu Bulguları.....	133
4.2.2 Grupların Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	140
4.2.2.1 Gruplar Arası Morfolojik Yapının Karşılaştırılması.....	140
4.2.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	147
4.2.2.2.1 Anti-Enamelisin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	147
4.2.2.2.2 Anti-DSP Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	150

4.2.2.2.3 Anti-Osteokalsin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	153
4.2.2.2.4 Anti-Osteonektin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	156
4.2.2.2.5 Anti-BMP-2 Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	159
4.2.2.2.6 Anti-Ki67 Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	162
4.2.2.2.7 Anti-VEGF Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	165
4.2.2.2.8 Anti-eNOS ve Anti-iNOS Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması.....	168
4.2.2.2.9 TUNEL Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması	173
5.Tartışma.....	176
6.Sonuç ve Öneriler.....	190
7. Kaynaklar.....	191
8.Ekler.....	204
Teşekkür.....	207
Özgeçmiş.....	208

Tablolar Dizini

Tablo 1. Dekalsifikasyon ve Parafin takip protokolü.....	54
Tablo 2. Hematoksilen Eozin boyaması parafin takip protokolü	57
Tablo 3. Masson-Trikrom boyaması parafin takip protokolü.....	59
Tablo 4. Alizarin Kırmızısı boyaması parafin takip protokolü.....	61
Tablo 5. İmmunohistokimya boyamaları için parafin takip protokolü.....	64
Tablo 6. TUNEL boyama protokolü.....	66
Tablo 7. Grupların TGF- β 1 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri.....	69
Tablo 8. Grupların VEGF salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri.....	71
Tablo 9. Grupların BMP-2 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri.....	72
Tablo 10. Grupların FGF-2 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri.....	74
Tablo 11. Grupların anti-Enamelisin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri	149
Tablo 12. Grupların anti-DSP boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri.....	152
Tablo 13. Grupların anti-Osteokalsin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri	155
Tablo 14. Grupların anti-Osteonektin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri	158
Tablo 15. Grupların anti-Osteonektin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri	161
Tablo 16. Grupların anti-Ki67 boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri.....	164
Tablo 17. Grupların anti-VEGF boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri....	167

Tablo 18. Grupların anti-eNOS boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri.....170

Tablo 19. Grupların anti-iNOS boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri.....172

Tablo 20. Grupların TUNEL boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri.....175



Grafikler Dizini

Grafik 1. Kök hücrenin karakterizasyonunu gösteren kontrol (PBS), STRO-1, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretlemesi için immünohistokimya bulgularının H-skor analizi.....	45
Grafik 2. Grupların TGF- β 1 salınımı açısından karşılaştırılması.....	69
Grafik 3. Grupların VEGF salınımı açısından karşılaştırılması.....	70
Grafik 4. Grupların BMP-2 salınımı açısından karşılaştırılması.....	72
Grafik 5. Grupların FGF-2 salınımı açısından karşılaştırılması.....	73
Grafik 6. Morfolojik yapının değerlendirilmesi için kullanılan H&E boyama sonuçları.....	142
Grafik 7. Yeni oluşan bağ dokusu içindeki kollagen yapımının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan MT boyama sonuçları.....	144
Grafik 8. Kök dentinleri içindeki kalsifiye doku yapımının değerlendirilmesi için kullanılan Alizarin kırmızısı boyama sonuçları.....	146
Grafik 9. Odontoblastlara özgü olarak kabul edilen farklılaşma belirteci olan Anti-Enamelisin boyama sonuçları.....	149
Grafik 10. Odontoblastlara özgü olarak kabul edilen farklılaşma belirteci olan Anti-DSP boyama sonuçları.....	152
Grafik 11. Rejenere olan hücrelerin geç dönem reaksiyon belirteci olan Anti-Osteokalsin boyama sonuçları.....	155
Grafik 12. Kalsifik rejenerasyon yapma gücü olan hücrelerin erken dönem reaksiyonlarının gösterilmesi için kullanılan Anti-Osteonektin boyama sonuçları.....	152
Grafik 13. Osteoblastik özelliği ve kalsifik rejenerasyon yeteneği yüksek olan hücrelerin boyanmasında kullanılan Anti-BMP-2 boyaması sonuçları.....	161

Grafik 14. Hücrelerin geçmişe dönük proliferasyonunu göstermek amacıyla kullanılan anti-Ki67 boyaması sonuçları.....	164
Grafik 15. Yeni damar yapılanmasının gösterilmesi amacıyla kullanılan Anti-VEGF boyamasının sonuçları.....	167
Grafik 16. Pulpa rejenerasyonunda ortamdaki oksidatif stresi belirlemek için yapılan Anti-eNOS boyamasının sonuçları.....	170
Grafik 17. Pulpa rejenerasyonunda oksidatif stresin bir diğer belirteci olan Anti-iNOS sonuçları.....	172
Grafik 18. Hücrelerin apoptozis belirteci olan TUNEL boyaması sonuçları.....	175

Şekiller Dizini

Şekil 1. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri	17
Şekil 2. Baksh ve arkadaşları tarafından önerilen differensiasyon şeması.....	19
Şekil 3. Dental kaynaklı kök hücrelerin şematik gösterimi.....	21
Şekil 4. Dental kaynaklı kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin şematik gösterimi	24
Şekil 5. MKH'lerin üretim ve laboratuvar aşamaları	29
Şekil 6. İsoet hassas kesim cihazı	40
Şekil 7. Dentin kesitlerinin görünümü	40
Şekil 8. Dentin kesitlerinin gruplara dağılımı	42
Şekil 9. Örneklerin toz haline getirilmesi	43
Şekil 10. MKH karakterizasyonu için yapılan spesifik immünohistokimyasal boyamalar.....	44
Şekil 11. Örneklerin üzerine MKH ekimi	46
Şekil 12. Anti-TGF-β1 ve Anti-VEGF standart solüsyonlarının hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi	47
Şekil 13. Anti-BMP-2 standart solüsyonunun hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi	48
Şekil 14. Anti-FGF-2 standart solüsyonunun hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi	48
Şekil 15. Farelerin dorsumuna yerleştirilen kök dentinlerinin şematik gösterimi	52
Şekil 16. Farelerin dorsumlarına yapılan insizyonlar	53
Şekil 17. Farelerin dorsumuna kök dentinlerinin yerleştirilmesi	53
Şekil 18. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü	75
Şekil 19. Kontrol grubundaki MT boyamalarındaki kollagen dokusunun görüntüsü.....	75
Şekil 20. Kontrol grubundaki Alizarin kırmızı boyamalarındaki kollagen dokusunun görüntüsü.....	75
Şekil 21. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	76

Şekil 22. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	76
Şekil 23. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü	77
Şekil 24. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	77
Şekil 25. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	77
Şekil 26. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	78
Şekil 27. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	78
Şekil 28. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	79
Şekil 39. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	79
Şekil 30. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	79
Şekil 31. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	80
Şekil 32. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü.....	81
Şekil 33. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	81
Şekil 34. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	82
Şekil 35. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	82
Şekil 36. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	82
Şekil 37. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	83
Şekil 38. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	83

Şekil 39. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	83
Şekil 40. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	84
Şekil 41. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	84
Şekil 42. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	85
Şekil 43. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	85
Şekil 44. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	86
Şekil 45. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	86
Şekil 46. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	87
Şekil 47. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	87
Şekil 48. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü.....	87
Şekil 49. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	88
Şekil 50. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	88
Şekil 51. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	89
Şekil 52. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	89
Şekil 53. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	89
Şekil 54. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	90
Şekil 55. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	90

Şekil 56. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	91
Şekil 57. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	91
Şekil 58. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	92
Şekil 59. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	92
Şekil 60. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü	92
Şekil 61. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	93
Şekil 62. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	94
Şekil 63. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	94
Şekil 64. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü.....	94
Şekil 65. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	95
Şekil 66. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	95
Şekil 67. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; dentin duvarının önünde odontoblastik rejenerasyona uğrayan kök hücrelerin Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	96
Şekil 68. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	96
Şekil 69. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	96
Şekil 70. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	97
Şekil 71. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	97
Şekil 72. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	97

Şekil 73. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	98
Şekil 74. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	98
Şekil 75. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	99
Şekil 76. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	99
Şekil 77. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	100
Şekil 78. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	100
Şekil 79. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	101
Şekil 80. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	101
Şekil 81. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü.....	102
Şekil 82. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	102
Şekil 83. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	103
Şekil 84. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	103
Şekil 85. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	103
Şekil 86. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	104
Şekil 87. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	104
Şekil 88. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	104
Şekil 89. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	105

Şekil 90. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	105
Şekil 91. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	106
Şekil 92. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	106
Şekil 93. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	107
Şekil 94. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	107
Şekil 95. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	108
Şekil 96. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	108
Şekil 97. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki MT boyamalarındayeni oluşan bağ dokusu içinde yoğun olarak organize olmuş kollagen yapının görüntüsü.....	108
Şekil 98. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	109
Şekil 99. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	109
Şekil 100. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	110
Şekil 101. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	110
Şekil 102. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	110
Şekil 103. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	111
Şekil 104. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	111
Şekil 105. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	111
Şekil 106. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	112

Şekil 107. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	112
Şekil 108. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	113
Şekil 109. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	113
Şekil 110. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	113
Şekil 111. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	114
Şekil 112. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü.....	115
Şekil 113. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	115
Şekil 114. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Dentin duvarında düzensiz olarak Anti-Enamelisin ile boyanmış hücrelerin görünümü.....	116
Şekil 115. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	116
Şekil 116. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	116
Şekil 117. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	117
Şekil 118. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü	117
Şekil 119. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü	117
Şekil 120. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü	118
Şekil 121. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü	118
Şekil 122. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü	119
Şekil 123. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü	119

Şekil 124. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	119
Şekil 125. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü	120
Şekil 126. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü; dentin duvarlarında çok katlı ve düzenli odontoblast benzeri hücre yapılanması.....	121
Şekil 127. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü; yeni oluşan doku içinde yoğun kollagen yapımının görülmesi.....	121
Şekil 128. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	122
Şekil 129. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	122
Şekil 130. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	123
Şekil 131. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü; dentin duvarı üzerinde sıralanmış yeni rejenere olmuş hücrelerin görünümü.....	123
Şekil 132. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	123
Şekil 133. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	124
Şekil 134. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Ostenektin boyaması ile görünümü.....	124
Şekil 135. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	124
Şekil 136. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	125
Şekil 137. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	125
Şekil 138. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	126
Şekil 139. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	126

Şekil 140. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	126
Şekil 141. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki bağ dokusu oluşumunun H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	127
Şekil 142. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki hücreden ve damarlanmadan zengin yeni dokunun H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	128
Şekil 143. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan bağ dokusu içindeki kollagen yapılanmasının MT boyamalarındaki görüntüsü.....	128
Şekil 144. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan kalsifiye dokunun Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü	128
Şekil 145. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	129
Şekil 146. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	129
Şekil 147. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	130
Şekil 148. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	130
Şekil 149. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	130
Şekil 150. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	131
Şekil 151. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	131
Şekil 152. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	132
Şekil 153. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	132
Şekil 154. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	133
Şekil 155. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	133
Şekil 156. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	134

Şekil 157. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinin üzerinde farklılaşmaya çalışan ve odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmış hücrelerin H&E boyamalarındaki görüntüsü	134
Şekil 158. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan bağ dokusunun H&E boyamalarındaki görüntüsü.....	135
Şekil 159. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinine komşu alandaki yoğun kollagen yapımının MT boyamalarındaki görüntüsü.....	135
Şekil 160. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki dentin duvarına komşu alandaki yoğun kalsifik doku yapımının Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü.....	135
Şekil 161. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü.....	136
Şekil 162. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü.....	136
Şekil 163. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü.....	137
Şekil 164. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü.....	137
Şekil 165. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü.....	137
Şekil 166. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü.....	138
Şekil 167. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü.....	138
Şekil 168. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü.....	139
Şekil 169. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü.....	139
Şekil 170. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü.....	139
Şekil 171. Deney gruplarının H&E boyaması görüntüleri.....	141
Şekil 172. Deney gruplarının MT boyaması görüntüleri.....	143
Şekil 173. Deney gruplarının Alizarin kırmızısı boyaması görüntüleri.....	145
Şekil 174. Deney gruplarının Anti-Enamelisin boyaması görüntüleri.....	148

Şekil 175. Deney gruplarının Anti-DSP boyaması görüntüleri.....	151
Şekil 176. Deney gruplarının Anti-Osteokalsin boyaması görüntüleri.....	154
Şekil 177. Deney gruplarının Anti-Osteonektin boyaması görüntüleri.....	157
Şekil 178. Deney gruplarının Anti-BMP-2 boyaması görüntüleri.....	160
Şekil 179. Deney gruplarının Anti-Ki67 boyaması görüntüleri.....	163
Şekil 180. Deney gruplarının Anti-VEGF boyaması görüntüleri.....	166
Şekil 181. Deney gruplarının Anti-eNOS boyaması görüntüleri.....	169
Şekil 182. Deney gruplarının Anti-iNOS boyaması görüntüleri.....	171
Şekil 183. Deney gruplarının TUNEL boyaması görüntüleri.....	174

Kısaltmalar

DPKH: Dental Pulpa Kök Hücre

APKH: Apikal Papilla Kök Hücre

YDKH: Yağ Dokusu Kök Hücre

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

DSP: Dentin Sialoprotein

BSP: Bone Sialoprotein

TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta

BMP: Bone Morphogenetic Protein

IGF: Insuline-like Growth Factor

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

FGF: Fibroblast Growth Factor

MTA: Mineral Trioksit Agregat

TNF: Tumor Necrosis Factor

IL: İnterlökin

EGF: Epidermal Growth Factor

PGA: Poglikolik Asit

PLLA: Poli-L-Laktit Asit

PLG: Polilaktid-koglikolik asit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

Oct: Octamer-binding transcription factor

MAP-ERK: Mitogen Activated Protein Kinase

CD: Cluster of Differentiation

SSEA: Stage-Specific Embryonic Antigen

HLA: Human Leukocyte Antigen

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

Non-HKH: Non-Hematopoetik Kök Hücre

ISCT: International Society of Cellular Therapy

M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

ICAM-1: Intercellular Cell Adhesion Molecule-1

SCF: Stem Cell Factor

IBMX: İzobütilmetilksantin

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

PLKH: Periodontal Ligament Kök Hücresi

DFKH: Dental Folikül Kök Hücresi

SDPKH: Süt Dişi Pulpası Kök Hücresi

ALP: Alkalen Fosfataz

DMEM-LG: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose

α -MEM: Alfa-Minimum Essential Medium

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

FCS: Fetal Calf Serum

CO₂: Karbondioksit

CFU-F: Colony Forming Unit Fibroblast

P0: Sıfırncı Pasaj

Ho: Sayılan hücre sayısı

DMP-1: Dentin Matrix Protein-1

DSPP: Dentin Sialophosho Protein

TZP: Trombositten Zengin Plazma

TZF: Trombositten Zengin Fibrin

HA: Hidroksilapatit

TCP: Trikalsiyum Fosfat

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

CHX: Klorheksidin

MMP: Matriksmetalloproteinaz

IP-6: İnositol Hekzofosfat-6

UI/ml: Units Per Millilitre

PBS: Phosphate Buffered Saline

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HRP: Horseradish Peroxidase

SABC: Streptavidin-Biotin Complex

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

MT: Masson Trikrom

i-NOS: İndüklenebilir Nitröz Oksit Sentaz

e-NOS: Endotelyal Nitröz Oksit Sentaz

H&E: Hematoksilen & Eozin

°C: Santigrat

TUNEL: Terminal Deoksinükleotidil-Transferaz Aracılı Deoksiüridin Trifosfat Nick-End İşaretleme

DAB: Diamino Benzidine

TdT: Terminal deoksinükleotidil Transferaz

FDA: Food and Drug Administration

1. Giriş

Rejeneratif endodontik tedavilerin birincil amacı ister travmatik yaralanmalar sonrası isterse de bakteriyel kontaminasyonun yol açtığı enflamasyonun gelişmesi sonrası canlılığı sonlanmış ve dolayısıyla kök gelişimi duraksamış dişlerin pulpa-dentin kompleksinin canlılığının tekrar kazandırılması ve fonksiyonunun devamlılığının sağlanmasıdır. Böylece kök gelişimi devam ederek tamamlanabilecek, dolayısıyla canlılığı korunmuş ve dayanıklılığı sağlanmış bir organ halinde hayat boyu fonksiyonlarını yerine getirebilecektir. Pulpanın bakterilere açık hale gelmesiyle enfekte olması ve geriye dönüşümsüz bir enflamasyon sonucu nekroz ile sonuçlandığı bilinmektedir. Geçmişten günümüze kadar, bakteriyel invazyona veya travmaya uğramış pulpaların tümüyle uzaklaştırılması ve o şekliyle içinin tıkanarak dişin korunması gerektiği fikri benimsenmişti (S. Kim, Shin, Song, & Kim, 2015).

Hastalıklı, eksik veya travmatize olmuş dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonu kök hücre ve doku mühendisliği konusundaki gelişmeler sayesinde gündeme gelmiştir (Dissanayaka, Zhu, Hargreaves, Jin, & Zhang, 2014). Açık apeksli genç daimi dişlerde pulpal nekrozların tedavisi, geleneksel apeksifikasyon tedavisi veya apikal bariyerler kullanılarak gerçekleştirilir. Geleneksel apeksifikasyon tedavisinde, kalsiyum hidroksitin kanal içinde uzun dönem kullanımı sonucu apikal bariyer oluşumu sağlanır, ancak bu yöntem zaman alıcı olmakla birlikte, uzun süre kullanılan kalsiyum hidroksit sebebiyle, diş köklerinde zayıflama ve servikal bölgede kırık oluşma ihtimali artar (Petrino, Boda, Shambarger, Bowles, & McClanahan, 2010; Thibodeau & Trope, 2007).

Apikal bariyer olarak mineral trioksit agregat (MTA) kullanımı tedavinin kısa sürede bitirilmesini sağlamakla birlikte, her iki yöntemde de kök kanalı duvarlarında kalınlaşma ve kök boyunda uzama gerçekleşemez ve dolayısıyla dişlerin dayanıklılığı azalır ve kırılma oranı çok yükselir. Bu nedenle son yıllarda pulpa nekrozu olan genç daimi dişlerin tedavilerinde, rejeneratif endodontik tedavilerin uygulanması gündeme gelmiştir (X. Chen ve ark., 2013; Galler, D'Souza, Federlin, ve ark., 2011; Petrino ve ark., 2010).

Rejeneratif endodontik tedaviler sonucunda ise nekrotik durumdaki genç daimi dişlerin durmuş olan kök gelişiminin devam etmesi ve dentin duvarlarının da kalınlaşması meydana gelebilmektedir (Pang ve ark., 2014). Günümüzde klinik koşullarda pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu, rejeneratif endodontik tedaviler sonrası pulpa odasında meydana gelen revaskülarizasyon olayıdır. Birçok vaka raporu revaskülarizasyon tedavileri sonucunda semptomların ortadan kalktığı ve periapikal lezyonların iyileşmesi gibi kriterler açısından başarılı sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. Ama yapılan histolojik incelemeler sonucunda kök kanalının içinde oluşan yeni dokunun pulpa-dentin benzeri dokudan ziyade daha sıklıkla periodontal doku kökenli hücrelerin oluşturduğu, sement, periodontal ligament ve kemik benzeri dokuların olduğu görülmüştür. Revaskülarizasyon işleminin klinik açıdan kök gelişimini tamamlamamış daimi dişlerin tedavisinde kendine özgü avantajları olsa da tam anlamıyla bir pulpa-dentin rejenerasyonu gerçekleştiği söylenememektedir. Bu durumda doku mühendisliği kavramı çok önem kazanmaktadır.

Doku mühendisliği yaklaşımları kök hücre, doku iskelesi ve sinyal molekülleri (örn. büyüme faktörleri) olmak üzere 3 temel komponentin kullanımını içermektedir (J. Yang, Yuan, & Chen, 2016). Kök hücreler, sınırsız bölünme, kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuları onarabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Son yıllarda, tıp alanındaki doku mühendisliği çalışmalarında kök hücre nakli sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan kök hücreler, kaynaklarına göre otolog, allogenic ve ksenogenic olmak üzere üçe ayrılırlar. En sıklıkla kullanılan tip hücreler ise otolog kök hücrelerdir. Kök hücreler köken aldıkları dokulara göre sınıflandırılmakta olup, embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Embriyonik olmayan kök hücreler fetüs, kadavra ve erişkin (somatik, postnatal, yetişkin, dokuya özgü) kök hücreleridir (Can A 2009; Fortier, 2005; İnan S 2009).

Embriyonik olmayan kök hücrelerin bir alt grubu olan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan, multipotent, uzantılı fibroblast benzeri hücrelerdir (İnan S 2009; Tap O 2013). MKH'lerin ana kaynağı kemik

iliğidir ve bu hücreler kordon kanı, yağ dokusu, maksillofasiyal dokular, karaciğer, diş pulpası, kemik trabeküler dokusu, tendonlar, sinoviyal membran, plasenta, lipoaspirasyon materyalleri, amniyon sıvısı, periost, kas ve Wharton jeli gibi birçok farklı dokudan elde edilirler (Baksh, Song, & Tuan, 2004; Gültekin KE, 2013; Koga ve ark., 2008; Matur İ, 2011; Sakaguchi, Sekiya, Yagishita, & Muneta, 2005; Yoshimura ve ark., 2007). Baş ve boyun bölgesinde vücudun diğer bölgelerinden elde edilen MKH kaynaklarına alternatif kaynaklar bulunmakta olduğu görülmüş olup, dental pulpa, apikal papilla, dental folikül, eksfoliye olmuş süt dişi pulpası ve periodontal ligament kök hücreleri en sık olarak izole edilenlerdir.

Doku mühendisliğinin yapıtaşlarından biri olan büyüme faktörleri hücrelerin migrasyon, apoptozis, çoğalma ve farklılaşmasını düzenleyen moleküllerdir. Dentinin içinde de gömülü olarak bulunan büyüme faktörleri polipeptid veya protein yapıda olup hedef hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak bütün pulpa içindeki farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerinin migrasyon, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozisinde rol oynar (S. G. Kim ve ark., 2012). Dentin ekstrasellüler matriksi dentinogenezis esnasında ortama salınan büyüme faktörleri için bir rezervuar görevi görmektedir. Bu salınabilen büyüme faktörleri dişe gelen bir travma veya enfeksiyon sonucunda meydana gelen yaralanmaların tamirinde hücre sel sinyalleşmenin esas kaynağıdır. Tamir sürecinde salınan büyüme faktörleri, önceden var olan odontoblastların sekretuar aktivitesini arttırarak veya dental pulpa kök hücrelerinin bölgeye toplanmasını, proliferasyonunu ve 'osteodentin' üreten hücrelere farklılaşmasını sağlar (Sloan & Smith, 2007).

TGF- β ailesi, hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, fonksiyonlarını ve ekstrasellüler matriks üretimini etkiler, migrasyon ve invazyonlarını düzenleyici rol oynar, yara iyileşmesinde görev alır. Bu büyüme faktörü hem dişin gelişimi sırasında, hem de dental dokuların tamiri sırasında (reaksiyonel dentinogenezis) aktif rol oynayan en önemli büyüme faktörlerinden biridir. İnsan dişlerinde, TGF- β 'nın 3 izoformu (TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3) bulunur. TGF- β 1'in çürük dentinde sağlıklı dentine oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Çürük nedeniyle demineralizasyona uğrayan dentin matriksi

içerisindeki gömülü olan TGF- β 1 serbest hale gelmesi seviyelerinin artmasına sebep olur. Demineralizasyon sebebiyle meydana gelen bu artış, TGF- β 1'in iyileşme, hasarlı dokuların onarımı ve reperatif dentin deposizyonunda önemli bir yeri olduğunun göstergesidir. TGF- β 'nın hem reperatif hem de reaksiyoner dentinogeneziste önemli rolü vardır. TGF- β 1 ve TGF- β 3 odontoblastların sekretuar aktivitelerini düzenledikleri aynı zamanda kültür ortamında odontoblastlara direkt uygulanmasının ardından bu hücrelerin dentin sekresyon aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir. Dentin ekstrasellüler matriksinde bulunan TGF- β 3, pulpada bulunan farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını uyarır (Sloan, Matthews, & Smith, 1999; Sloan & Smith, 1999; Smith, 2003; Smith & Lesot, 2001; Smith, Matthews, & Hall, 1998).

Dental pulpa kök hücrelerinin (DPKH) odontoblastlara farklılaşması üzerine etkili olan başlıca faktörler, TGF- β 1, Kemik Morfogenetik Proteini-2 ve 4'tür (BMP-2 ve BMP-4). Odontoblast prekürsörlerinin differansiasyon ve proliferasyonunu etkileyen diğer faktörler ise FGF, PDGF, Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF), VEGF, İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (Insulinlike Growth Factor-1, IGF-1), Tümör Nekroz Faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor, TNF- α), İnterlökin-b1'dir (IL- β 1) (Alaee ve ark., 2014; Bluteau, Luder, De Bari, & Mitsiadis, 2008; Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000; Pakyari, Farrokhi, Maharlooei, & Ghahary, 2013; Rai, Kaur, & Kaur, 2013; Ulmer, Winkel, Kohorst, & Stiesch, 2010; R. Zhang, Cooper, Smith, Nor, & Smith, 2011).

Doku mühendisliği yaklaşımının bir diğer basamağı ise doku iskeleleridir. Hücrelere destek sağlayan, hücrelerin bu yapılara tutunması ile fonksiyon göstermeleri için gerekli olan üç boyutlu ortamı sunan materyallerdir. Doku ile biyouyumlu olması, herhangi bir immün reaksiyona sebep olmaması, hücrelerin etkili bir şekilde yapışabilmeleri için uygun por yapısına sahip olması ve belirli bir zaman içinde biyobozunur olması ideal bir doku iskelesinde olması gereken özelliklerin başında gelmektedir (Canoğlu E, 2008; Yuan ve ark., 2011). Doku iskeleleri kaynağı, fiziksel ve kimyasal içeriği ve uygulama yöntemlerine göre sınıflandırılabilir. Kaynağına göre iki şekilde sınıflandırılmakta olup bunlar doğal ve sentetik doku iskeleleridir. Fibrin, kollagen, kitosan, glikozaminoglikan

vb. doğal doku iskelelerinden en sık kullanılanlar iken, poliglaktik asit (PGA), poli-L-laktit asit (PLLA) ve PLG en sık olarak kullanılan sentetik doku iskeleleridir (Orti ve ark., 2018). PLLA, PGA ve PLG doku iskeleleri biyouyumlu olmalarının yanı sıra toksik etkileri yoktur ve hidroliz ile kolayca degrade olabilme özelliğine sahip doku iskeleleridir. Pörözlü mikroyapıya sahip olmalarından ötürü en sık kullanılan doku iskelelerinden biridir (El-Backly, Massoud, El-Badry, Sherif, & Marei, 2008; Galler, D'Souza, Hartgerink, & Schmalz, 2011; Powers JM, 2007).

Kalsiyum hidroksit ve MTA gibi bazik özellikli pulpa kaplama materyalleri ile, dentinin pürüzlendirilmesinde kullanılan EDTA ve diğer asitlerin de dentinin ekstrasellüler matriksinde değişiklikler yaratarak dentinin içinde gömülü olarak bulunan TGF- β 1, BMP-2, FGF, PDGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını uyararak kök hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını indükleyerek dentinogenetik cevabı başlattıkları birçok çalışmayla ortaya konulmuştur (Ferracane, Cooper, & Smith, 2013; Galler ve ark., 2015; Graham ve ark., 2006; Tomson ve ark., 2007). Dentinin EDTA gibi asitlerle uyarılmasının dental kök hücrelerin kaderini, hayatta kalımını, dentin duvarlarına tutunmasını, büyüme ve farklılaşmasını uyardığı bilinmektedir (Galler, D'Souza, Federlin, ve ark., 2011; Pang ve ark., 2014; Trevino ve ark., 2011).

Farklı asitlerin MKH'lerin davranışları üzerine olan etkilerinin araştırıldığı *in vitro* çalışmalarda dentinin farklı asitler ile uyarılması sonucunda büyüme faktörlerinin açığa çıkmasıyla DPKH'lerinin mineralize doku depozisyonu arasında bir ilişki olduğu ve bu asitlerin rejeneratif endodontik tedavinin başarısında önemli rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Aynı zamanda dentinin kimyası, topografisi ve ıslanabilirliği gibi yüzey özelliklerinin kök hücre adezyonunu etkilediği bilinmektedir. Yüzey ıslanabilirliğinin artmasının hücrelerin dentine olan tutunmasını olumlu yönde etkilediği söylenmiştir (Galler, D'Souza, Federlin, ve ark., 2011; Pang ve ark., 2014; Sadaghiani ve ark., 2016).

Bu çalışmanın amacı farklı asitler kullanılarak yapılan rejeneratif endodontik tedavi işlemleri sonrasında, pulpa odasında ortaya çıkan biyolojik durumun histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılmasıdır. Burada bahsedilen asitlerden rejeneratif endodontik tedavi protokollerinde son irrigasyon ajanı olarak kullanılan

EDTA ve henüz bu protokollerde henüz yer almayan fosforik asit, sitrik asit ve fitik asidin rejeneratif endodontik tedaviye olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* olarak iki aşama halinde tasarladığımız bu çalışmada bu asitlerin hem dentininin içinde gömülü olarak bulunan büyüme faktörlerine olan etkilerini hem de rejeneratif endodontik tedavi sonrasında oluşan dokulara olan etkilerini araştırılmıştır. Bunu gerçekleştirirken de çalışmanın *in vitro* bölümünde koronal dentin disklerinin bu 4 farklı asit uygulaması sonrası açığa çıkan ve rejenerasyonda önemli olan büyüme faktörlerinden TGF- β 1, VEGF, BMP-2 ve FGF-2'nin seviyelerini tespit etmek için ELISA yöntemi kullanıldı. Örneklerin yarısı asit uygulaması sonrası insan mezenkimal kök hücresi içeren besiyeri ortamında 3 gün inkübasyona bırakılarak kök hücrelerin bu büyüme faktörlerinin seviyelerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflendi. Çalışmanın *in vivo* bölümünde ise tek köklü insan dişlerinden hazırlanmış ve yine aynı asitler ile irrig edilmiş olan kök dentinlerinin içine insan mezenkimal kök hücresi içeren PLGA doku iskelesi yerleştirildi. Hazırlanan kök dentinleri immünsüpresif balb/c cins farelerin dorsumlarına implante edildi ve 2 ay sonra dişler farelerin dorsumlarından alınarak histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile biyolojik açıdan aralarındaki farklar araştırılmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Rejeneratif Endodonti ve Doku Mühendisliği

Rejeneratif endodonti dentin ve kök yapılarıyla beraber pulpa-dentin kompleksi ve hücrelerini de içeren hasarlı diş dokularının yenilenmesi amacıyla tasarlanmış biyolojik temelli işlemler olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlamaya göre rejeneratif endodontik tedaviler enfeksiyon, travma veya gelişimsel anomali sebebiyle hasara uğramış nekrotik pulpalı genç daimi dişlerin pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonunu amaçlamaktadır.

Nekrotik pulpalı veya apikal periodontitisli genç daimi dişler, apikal bölgede sert doku oluşumunun indüklenmesi amacıyla geleneksel olarak kalsiyum hidroksit kullanılarak tedavi edilmekteydi. Daha sonraki zamanlarda MTA kullanımının artmasıyla apikal bölgede bir tıkaç oluşturularak yapılan tedaviler sıklıkla uygulanmaya başlamıştır. Kalsiyum hidroksit ile yapılan apeksifikasyon çok sayıda randevudan oluşan uzun süreli bir tedavidir. Açık apeksli genç daimi dişler uzun süreli kalsiyum hidroksite maruz kalmasının ardından kök kırığı oluşma ihtimalinin arttığı rapor edilmiştir (Andreasen, Farik, & Munksgaard, 2002). MTA kullanılarak yapılan apeksifikasyon bu uzun süreyi kısaltmış olmakla beraber kökün boy uzunluğu veya kalınlığında bir artış meydana getirmemektedir. Ayrıca bu yöntemlerle yapılan apeksifikasyon tedavileri kanal içindeki hasarlı dokunun canlılığını tekrar kazandıracak bir potansiyele sahip değildir. 2001 yılında "revaskülarizasyon" adı altında yeni bir tedavi seçeneği sunulmuştur. Revaskülarizasyon terimi ilk kez Iwaya tarafından kullanılmıştır (Iwaya, Ikawa, & Kubota, 2001). "Rejeneratif endodonti" tabiri Amerikan Endodonti Derneği tarafından 2007 yılında kullanılmış olup doku mühendisliği üzerine kurulmuş bir konsepttir (Murray, Garcia-Godoy, & Hargreaves, 2007).

Rejeneratif endodontik tedavilerin amacı doku mühendisliğinin üç temel unsuru olan kök hücreler, biyometik bir doku iskelesi ve biyoaktif moleküller (büyüme faktörleri, sitokinler vb.) ile kanal içinde enfeksiyon veya travma sonucu hasara uğramış pulpa dokusunun yeniden oluşturulmasıdır. Rejeneratif endodontik tedavilerin ilk örnekleri 1961 yılında Nygaard-Ostby ve 1971 yılında Nygaard-Ostby & Hjortdal tarafından

yapılan kök kanalının kemomekanik debridmanı sağlandıktan sonra periapikal dokuların indüklenerek bir kısmı kök dolgusu olan kanalın kan ile dolması sağlanmıştır. En erken 9 gün en geç 3 yıl sonra çekilen dişlerde yapılan histolojik incelemede dişlerin vital pulpa içerdiği ve kanalın apikal bölgesinde fibröz konnektif doku ve hücreli semt tespit edilmiştir (Nygaard-Ostby & Hjortdal, 1971; Ostby, 1961). Fakat nekrotik pulpalı dişlerin apikal bölgelerinde herhangi bir tamir dokusuna rastlanılmamıştır. Klinik olarak Iwaya ve arkadaşları apikal periodontitisli ve fistül yoluna sahip genç daimi dişlerin tedavisinde revaskülarizasyon konseptini ilk uygulayan grup olmuştur. Konseptleri Skoglund & Tronstad'ın 1978 ve 1981 yıllarında köpeklerin dişlerinde yaptığı revaskülarizasyon çalışmaları ve 1996'da Hoshino ve Sato'nun yaptığı, kök kanalının dezenfeksiyonunda kullanılan antibiyotik karışımları, siprofloksasin ve metranidazolun kullanıldığı çalışmalar temel alınarak oluşturulmuştur (Sato, Ando-Kurihara, Kota, Iwaku, & Hoshino, 1996; Skoglund & Tronstad, 1981; Skoglund, Tronstad, & Wallenius, 1978). Tedavilerinin sonucunda klinik semptomları ve apikal periodontitisin ortadan kalkmasına ve kanal duvarlarının kalınlaşması ile kök ucunun kapandığı görülmüştür. Banchs & Trope tarafından 2004'te önerilen revaskülarizasyon protokolünde siproflaksasin ve metranidazol karışımına minosiklin eklenerek üçlü antibiyotik patı kullanılmış ve bu patın tanınması sağlanmıştır (Banchs & Trope, 2004). Aynı zamanda bu çalışmada kanal içi bariyer olarak cam iyonomer siman yerine MTA kullanılmıştır. Bu tedavi yöntemi apikal periodontitisli genç daimi dişlerin semptomlarının ortadan kalkmasının yanında kanal duvarlarının kalınlaşmasına ve kök ucunun kapanmasına da olanak sağladığı söylenmiştir. Bundan dolayı rejeneratif endodontik tedaviler apikal nekrotik pulpalı genç daimi dişlerin tedavisinde geleneksel olarak uygulanan apeksifikasyon tedavisine alternatif bir tedavi olarak önerilmiştir (Hargreaves, Giesler, Henry, & Wang, 2008; S. G. Kim, Malek, Sigurdsson, Lin, & Kahler, 2018).

Doku mühendisliği kavramı, biyoloji ve mühendislik alanlarındaki prensiplerin kullanılmasıyla hasarlı ve fonksiyonunu kaybetmiş dokuların fonksiyonlarının yerine konması, tamiri ve/veya iyileştirilmesi konularıyla ilgilenen ve sürekli ilerleme gösteren bir uygulama alanıdır.

Rejeneratif tıp ise hastalık, travma, kanser ve diğer sebeplerle yapı ve fonksiyonu bozulan doku ve organların, yeniden onarılmasıyla ilgilenen bir tıp alanıdır. Bu doğrultuda, bu tedavileri destekleyici hücre ve hücre kombinasyonları, mühendislik ürünü biyomateryaller kullanılır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında kullanılan bu prensiplerin rejeneratif endodontik tedavilerde de kullanılması gündeme gelmiştir (Hargreaves ve ark., 2008).

2.1.1 Doku Mühendisliğinin Elemanları

2.1.1.1 Kök Hücreler

Kök hücreler; sınırsız çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuları onarabilme yeteneğine sahip olması özellikleri ile tanımlanan hücrelerdir. Çok sayıda bulunmasının ve eldesinin kolay olması, birden çok hücre tipine farklılaşım çoğalabilme özelliklerinin olması, otolog veya allojenik alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri sebebiyle rejeneratif tıp alanında son yıllarda sıklıkla tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak adlandırılır (Tekeli Senem ve ark., 2016).

Totipotent: Totipotent kök hücreler bütün hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan ve teorik olarak bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. Zigot, organizmayı oluşturacak tüm hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olan ilk totipotent hücredir. Totipotent hücreler, ilave embriyonik yapı olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton jeli ve plasentayı oluşturarak pluripotent, multipotent ve unipotent özellik gösterebilirler (Tekeli Senem ve ark., 2016).

Pluripotent: Pluripotent hücreler ise tüm germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilirler fakat bir organizmayı oluşturacak yeteneğe sahip değildirler (Tekeli Senem ve ark., 2016).

Multipotent: Sınırlı sayıda hücreye dönüşebilme potansiyeli olan kök hücrelerdir. Örneğin kordon kanından elde edilmiş kök hücreler uygun uyarılarla kas hücrelerine, nöronlara ve diğer hücrelere dönüşebilirler. Pluripotent hücrelere göre çok daha sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilen hücreler olup, daha özel fonksiyonlara sahiptirler. Pluripotent kök hücreler organizmada erken gelişim döneminde bulunurken, multipotent kök hücreler çocuk ve yetişkinlerde bulunurlar.(Ateş, 2016; Tekeli Senem ve ark., 2016)

2.1.1.1.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri:

2.1.1.1.1.1 Farklanma (Plastisite):

Bir hücrenin çeşitli dokulardaki hücrelere dönüşebilme yeteneğine “Plastisite” ya da “Differansiyasyon” adı verilir. Kök hücre plastisitesi; bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşabilme yeteneğini tanımlamaktadır. Aynı hücrenin değişik hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline ise “Farklılaşma Kapasitesi” denilmektedir. Farklanma, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklanma sitokinlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve hücrelerarası sinyalleşmenin kombine etkisiyle başarılan karmaşık olaylar bütünüdür. En önemli mekanizma epigenetik kontroldür. Gametler haricindeki her hücre aynı genoma sahip olduğu için bunları birbirinden ayıran etken gen ifadesidir. Kök hücre, öncül hücre ya da özelleşmiş hücre mi olacağı buna bağlıdır. Burada DNA ve histon metilasyonunun rolü önemlidir. Farklılaşmış hücrelerde heterokromotin, farklılaşmamış hücrelerde ökromotin alanlar vardır. Farklılaşmayla birlikte pluripotensiyi sağlayan genlerin ifadesi azalan bu olay DNA metilasyonu ile gerçekleşir. Oct-4 ve Sox-2 gibi bir grup gen, DNA metiltransferazlar tarafından metillenir, promotor bölgeleri bağlanır ve ifade silinir (Ateş, 2016; İrem, 2011; Tekeli Senem ve ark., 2016).

Telomeraz enziminin kök hücrelerin rejenerasyon özelliğinin devam ettirilmesinde önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda telomeraz

enziminin aktivitesindeki azalmanın hücrenin rejenerasyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. Fakat telomeraz aktivitesinin artmasıyla rejenerasyon yeteneğinin artmadığı da görülmüştür. Bundan dolayı rejenerasyon özelliğinin idamesi için diğer başka faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. TGF β , Sox2, Nanog, Oct4, Wnt, MAPK-ERK, PI3K, p53 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri, yolaklar ve epigenetik faktörler bunlara örnek gösterilebilir.(H., 2009; N. Liu, Lu, Tian, & Han, 2007; Trounson, 2006)

2.1.1.1.1.2 Kendini Yenileyebilme (Self-Renewal):

Kök hücreler, bölünme sırasında bir yandan progenitör hücreye farklılaşacak olan hücreyi üretirken diğer yandan da kendi yedeğini üretmektedirler. Hücrenin kaderi iç ve dış faktörlerle şekillenir. Bunlar; asimetrik hücre bölünmesi, mikro çevre (niş), hücre-hücre temasları, adezyon molekülleri, hücreler arası bağlantı kompleksleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve sinyal yolakları aracılığıyla belirlenip sürdürülür. En önemli belirleyici asimetrik hücre bölünmesidir. Hücrenin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki denge için bu şarttır. Asimetrik hücre bölünmesi iç ve dış faktörlerin sıkı dengesiyle gerçekleşir. Farklı mikro çevrelerde bulunan hücrelerin dönüşümleri de farklı olmaktadır. Nişi oluşturan hücre dışı matriks bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri kök hücrelerin sayısını kontrol eder. Doku onarımı, doku hacmi genişlemesi ve embriyonun gelişim sürecinde gerekli olan yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için simetrik bölünme de gereklidir. Bu durumda kök hücreler öncü hücrelere dönüşerek devreye girerler ve çok sayıda bölünme kapasitesine sahiptirler (Tekeli Senem ve ark., 2016).

2.1.1.1.1.3 Pluripotensi (Köklülük):

Kök hücrelerin üç farklı germ yaprağına ve onların farklı türlerine farklılaşabilme yeteneğidir. Bu kavram, kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel özellikleri belirtmek için kullanılmaktadır. Kök hücrelerin yüzeylerinde yer alan, hücresel sinyalleşme yolları veya iki hücre arası adezyonda rol oynayan belirteçler kullanılarak kök hücrelerin tipi belirlenebilir. Bu belirteçlerin bir kısmı farklılaşma kümeleri

(Clusters of differentiation, CD) olarak tanımlanmaktadır (G. Huang, Ye, Zhou, Liu, & Ying, 2015; Weissman, 2000).

2.1.1.1.2 Kök Hücre Çeşitleri

Günümüze kadar birçok farklı sınıflama önerilmiş olmakla beraber en çok rağbet göreni köken aldığı kaynağa göre yapılan sınıflamadır (Ateş, 2016).

A) Embriyonik kök hücreleri^{[1][2]}

B) Embriyonik olmayan kök hücreler

^{[1][2]}I- Hematopoetik kök hücreleri^{[1][2]}

- Kemik iliği kök hücreleri^{[1][2]}

- Periferik kan kök hücreleri^{[1][2]}

- Göbek kordon kanı kök hücreleri^{[1][2]}

II- Stromal (mezenkimal) kök hücreleri^{[1][2]}

III- Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri

2.1.1.1.2.1 Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonel gelişimin blastosit aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilirler ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Vücutta bulunan ve farklılaşmış olan her hücreyi oluşturabilme potansiyeline sahiptirler. Embriyonik kök hücrelerden elde edilen hücre kümelerine embrioid cisimcikler denilmektedir ve ektoderm, mezoderm ve endodermden köken alan her türlü hücreye (plasenta hariç) farklılaşabilirler. İnsanların EKH'leri farklılaşmamış pluripotent hücrelerin belirteçleri CD9, Oct-4 (Oktomer bağlayıcı protein), Nanog, alkalen fosfataz (ALP), Thy-1, SSEA-3 ve SSEA-4'ü eksprese ettikleri bilinmektedir (Ateş, 2016).

2.1.1.1.2.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Bir doku veya organdaki differansiye olmuş hücrelerin arasında bulunan farklılaşmamış hücelere denir. Bu hücreler kendini yenileyebilme ve içinde bulunduğu dokunun özelleşmiş hücrelerine differansiye olabilme yeteneğine sahiptir. Bu dokulara özgü olan hücrelerin asıl görevleri tamir ve içinde bulunduğu dokunun bütünlüğünü sağlamaktır (Ateş, 2016).

2.1.1.1.2.2.1 Fetüs Kök Hücreleri

Fetüs kök hücreleri doğum esnasında düşük yapan gebelerden veya hastalık sebebiyle sonlandırılmak durumunda kalan gebe hastalardan elde edilir. Sınırsız sayıda bölünme yeteneğiyle beraber kendini yenileme potansiyaline sahip pluripotent hücrelerdir. İstenen tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bunlara ek olarak sperm ve yumurta hücrelerine de dönüşebilme kapasitelerine sahiptirler (Gültekin KE, 2013; Shablott ve ark., 1998).

2.1.1.1.2.2.2 Kadavra Kök Hücreleri

Eldeleri kadavralardan yapılan hücreler olup proliferasyon hızları ölen bireyin yaşıyla ters orantılıdır (Sağsöz & Ketani, 2008).

2.1.1.1.2.2.3 Erişkin Kök Hücreler

Bu hücreler canlının yaşamı süresince kısmen daha sınırlı olmakla beraber, kendilerini yenileme özelliklerini kaybetmeyen, sıklıkla içinde buldukları dokuya özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Uygun koşullar sağlandığında enflamasyon veya doku hasarı gibi durumlara cevap olarak ait oldukları dokuların dışındaki hücelere de farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir (İnan S 2009; Maria, Khosravi, Mezey, & Tran, 2007; Trounson, 2006). Bu hücreler vücutta en sık olarak kemik iliğinde bulunur (Gültekin KE, 2013).

2.1.1.1.2.3.1 Hematopoetik Kök Hücreler (HKH):

Bu hücreler asimetric bölünme ile yeni bir kök hücre oluşturma potansiyeline sahip olmakla beraber çeşitli hücre tiplerine de farklılaşabilirler. Plastisite, mobilizasyon ve homing gibi özelliklere sahiptirler. Kemik iliği, kordon kanı ve periferik kan en önemli kaynaklarıdır. Yapılan çalışmalar bunların içinde kemik iliği kökenli hematopoetik hücreler diğerlerine oranla bir adım daha önde olduğu görülmüştür (Ateş, 2016; Tekeli Senem ve ark., 2016).

Kendilerini yenileme özellikleri sayesinde, yaşam boyu gerekli olan kan hücresi ihtiyacını karşılarlar. Bu hücreler HKH'leri tanımlamakta kullanılan CD38, CD43, CD45RA, CD45RO, CD90, CD59, CD109, CD117, CD166, CD45, CD14, CD133, HLA-DR ve CD34'ü eksprese ederler (H., 2009; İnan S 2009; Maria ve ark., 2007).

2.1.1.1.2.3.2 Non-Hematopoetik Kök Hücreler (non-HKH):

MKH'ler ve organlarda bulunan kök hücreler olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir. Nöral kök hücre, kardiyomyosit kök hücreleri, adipoz kökenli kök hücreler, epidermal kök hücreler, sindirim epiteli kök hücresi gibi hücreler organlarda bulunan kök hücrelerdir (Laugwitz ve ark., 2005). Rejeneratif diş hekimliğinde en sık olarak kullanılan kök hücre çeşitleri ise non-HKH grubunda bulunan MKH'lerdir.

2.1.1.1.2.3.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

İlk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmış olup birçok dokudan elde edilebilen, *in vitro* ortamda proliferasyona uygun dayanıklı ve dirençli hücrelerdir (Fridenstein, Gorskaja, & Kulagina, 1976).

Bugünkü anlamda ilk mezenkimal kök hücrelerin tanımı 1999 yılında Pittenger ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada belirtildiği üzere "Kemik iliğinden köken alan" ve uygun uyarımlarla üç temel seri; osteojenik, kondrojenik ve adipojenik serilere farklılaşabilen, CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ - integrin) gibi belirteçleri eksprese eden uzantılı fibroblast-benzeri multipotent hücrelerdir (Ateş,

2016).

Mezoderm tabakasından köken alan bu hücreler vücudun bazı yerlerinde nöral krista kaynaklı mezenkimal dokudan da gelişebilirler. Beyin, kordon kanı, göbek kordonu, karaciğer, diş pulpası ve fetal dokularda bulunan çoğalma kapasitesi yüksek ve kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Bu hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etkileri vardır (Tekeli Senem ve ark., 2016).

2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (ISCT) fikir birliğiyle MKH olarak sınıflandırmak için;

- a. Hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri, ^[1]_[2]
- b. Yüzeylerinde CD105, CD73 ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR (insan lökosit antijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri, ^[1]_[2]
- c. *in vitro* ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir (Dominici ve ark., 2006).

En sık olarak kullanılan MKH kaynakları; kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanıdır. Bu üç MKH kaynağının koloni oluşturma kapasitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en yüksek koloni oluşturma kapasitesine adipoz doku kaynaklı MKH'ler ve onu takiben kemik iliği kaynaklı ve en düşük olarak da kordon kanı kaynaklı MKH'ler olduğu rapor edilmiştir (Kern, Eichler, Stoeve, Kluter, & Bieback, 2006).

MKH'ler, hücreler arası ve hücre dışı matris ile yakın ilişkide bulunan ve çok çeşitli biyoaktif makromoleküllerle birlikte sitokin, kemokin ve büyüme faktörü gibi çeşitli çözünebilir faktörleri de sentez edebilmektedirler. Bu sayede hem immünomodülatör etkilere sahip olurken, hem de rejeneratif mekanizmaların yürütülmesinde görev alırlar.

MKH'lerin salgıladıkları bu moleküller dokularda yer alan progenitör hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını uyarırken, enflamatuvar ve immün reaksiyonları, apoptozu azaltırlar, anjiogenezisi indükleyerek doku tamirine yardımcı olurlar. Kök hücreler ait oldukları nişlerinden çıkıp yara bölgesine migre olabilir ve hasarlı hücre ile füzyon yapabilirler (Phinney & Prockop, 2007).

MKH'ler dokulardan az sayıda izole edilebildiğinden kullanımları öncesinde *in vitro* kültür ortamında çoğaltılmaları gerekmektedir. Kültürde çoğaltma sırasında hücrelerdeki yaşlanma, bazı özelliklerini kaybetme, kontaminasyon ve sitogenetik bozukluk riski mezenkimal kök hücrelerin özellikle klinik kullanımı için dezavantaj oluşturmaktadır (Çetinkaya, 2007).

Kemik iliğinden izole edilmiş ve kültür ortamına ekimi sağlanmış MKH'ler hızlı plastik adezyon yeteneği ile yüksek proliferasyon ve differensiasyon kapasitelerine sahiptirler. MKH'ler kültür ortamında proliferasyon olduktan sonra yapılan ışık mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu incelemelerinde, hücrelerin iğ şeklinde bir morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir. Fibroblastlara çok benzemekle beraber, nükleuslarının yerleşim şekilleri fibroblastların aksine simetriktir. Bu hücreler kas, epitel ve endotel hücrelerinin fenotipleriyle de benzerlik gösterebilirler (Can A 2009; Dominici ve ark., 2006). İmmunofenotipik olarak CD34, CD45, HLA DR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri eksprese etmezler, buna karşın CD105, CD73 gibi non-hematopoietik belirteçleri eksprese ettikleri rapor edilmiştir (Şekil 1) (Yılmaz, 2008).

Kültür ortamında çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine spesifik bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir (Karaöz E. & E., 2004). Fibroblastların yüzey belirteci olan STRO-1'i eksprese edebilmelerinin yanısıra CD71 (transferin) ve CD90 (thy-1) belirteçlerini de taşımaktadırlar (Yılmaz, 2008).

MKH'ler kemokin, sitokin ve ekstrasellüler matris proteinlerini sentezleyebilme özelliğine sahiptir. Interleukin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Flt-3 ligand ve stem cell faktör (SCF),

granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) MKH'lerin sekresyonunu yaptığı faktörlerdir (Yılmaz, 2008).

Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) (CD-106), Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) (CD54) ve L-Selektin (CD2L) MKH'lerin hücrelere ve ekstraselüler matriks elemanlarına adhezyonunu sağlayan moleküller olarak rapor edilmiştir (Gronthos ve ark., 2003; Tap O 2013; Yılmaz, 2008).

<i>Antijen</i>	<i>CD numarası</i>	<i>Ekspresyon</i>
Hematopoietik kök hücre belirteci	CD34	Negatif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif
LPS reseptör	CD14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif
HLA-DR		Negatif
Lewis X	CD15	Negatif
T6	CD1a	Negatif
Endoglin (SH2)	CD105	Pozitif
5' terminal nükleotidaz (SH3)	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
Thy-1	CD90	Pozitif
Büyüme faktörü ve sitokin reseptörleri		
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif
Platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör	CD140a	Pozitif
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif

Şekil 1. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik özellikleri (Yılmaz, 2008)

2.1.1.1.2.2.3.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Multipotent Farklılaşma Kapasitesi

Mezenkimal kök hücreler çeşitli uyarıların etkisiyle *in vitro* olarak adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik, kardiyojenik, myojenik, hepatik ve pankreatik hücrelere farklılaşma yeteneği gösterir. Örnek olarak; fibroblast-benzeri morfolojiye sahip mezenkimal kök hücreler; IBMX, deksametazon, PPAR γ ligandları ve insülin varlığında oval morfolojiye sahip, nötral-lipit damlaları içeren yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir (Diascro ve ark., 1998; Gronthos ve ark., 2000; Jo ve ark., 2007). Kemik morfogenetik proteini gibi büyüme faktörleri kalsiyum birikimlerinin meydana gelişini ve osteojenik farklılaşmayı sağlamaktadır (Zuk ve ark., 2001).

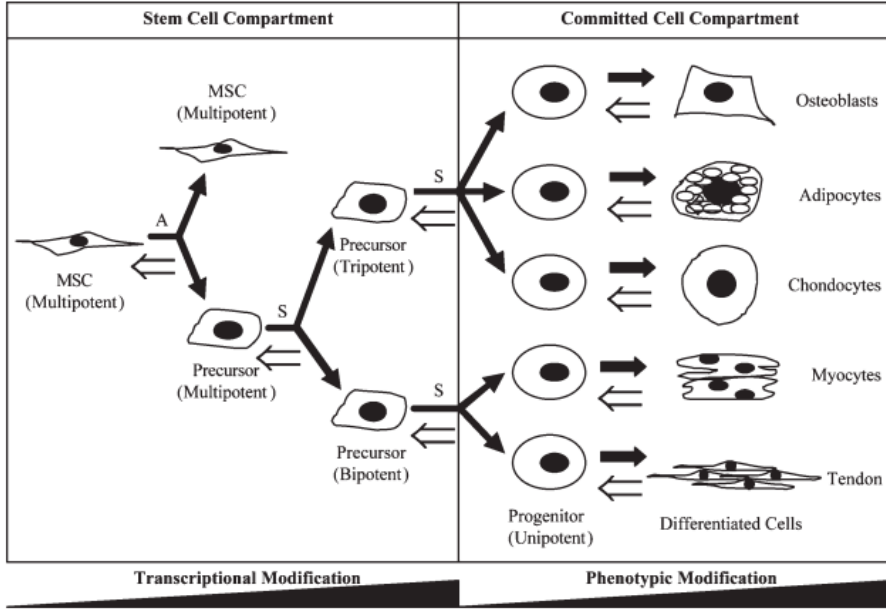
Mezenkimal kök hücreler; askorbat, deksametazon ve TGF- β varlığında, kondrojenik bir fenotip göstermekte, ayrıca ekstrasellüler matriksde, mekanik uyarım ve çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle kondrojenik farklılaşma gerçekleşmektedir (Zuk ve ark., 2001). MKH'lerin plastisite özelliğini, hücre içi ve hücre dışı sinyallerin kombinasyonu belirlemektedir. Hücre içi sinyalleri hücrenin DNA'sı üzerinde bulunan ve hücrenin fonksiyonları için gerekli olan bilgiyi taşıyan genler oluştururken hücre dışı sinyalleri ise, kök hücre nişinde bulunan moleküller, diğer hücrelerden salgılanan biyokimyasallar ve komşu hücrelerle olan fiziksel temas oluşturmaktadır (Gültekin KE, 2013).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.2 Kök Hücre Nişi

Kök hücre nişi somatik kök hücrelerin çoğaldığı, özelliklerini taşımaya devam ettikleri ve farklılaşmaya başladıkları mikroçevre olarak tanımlanmaktadır (Huysseune & Thesleff, 2004). Hücrelerin fonksiyonlarının ve regülasyonlarının düzenlenmesi için gerekli hücreSEL ve moleküler faktörleri içeren bir mikroçevre olarak da tanımlandırılabilir (J. Zhang & Li, 2008).

MKH'ler differensiasyon için gerekli sinyalleri aldıktan sonra nişlerinden ayrılırlar ve farklı davranış modelleri sergileyerek differensiasyon geçirirler. MKH'lere çeşitli uyarıların etkisiyle birlikte buldukları nişlerinde transkripsiyonel değişimler başlar. Bu aşamadan sonra asimetrik bölünme gerçekleşerek bir adet multipotent öncül (prekürsör) hücre, bir adet de kendisinin birebir aynısı olan bir kök hücre oluşur. Öncül

(prekürsör) hücreler simetrik sitokinez geçirerek bipotent (iki farklı hücre tipine dönüşebilen) veya tripotent (üç farklı hücre tipine dönüşebilen) öncül hücrelere dönüşümlerini tamamlarlar. Tripotent ve bipotent özelliği taşıyan bu öncül hücreler, simetrik bölünme geçirerek unipotent (sadece bir hücre tipine dönüşebilen) öncül hücreleri oluştururlar. Bu olayların sonunda olgun hücreler meydana gelir. Bu süreç geriye doğru da gidebilir ve buna da dedifferensiyasyon adı verilmektedir (Şekil 2) (Baksh ve ark., 2004) .



Şekil 2. Baksh ve arkadaşları tarafından önerilen differensiyasyon şeması (Baksh ve ark., 2004)

Günümüzde hematopoetik veya mezenkimal kök hücreler için 4 temel kaynak kullanılmakta olup bunlar;

1- Kemik iliği

2- Kordon kanı

3- Periferik kan

4- Yağ dokusudur.

2.1.1.1.2.2.3.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Avantaj ve Dezavantajları

2.1.1.1.2.2.3.2.1.3.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Avantajları

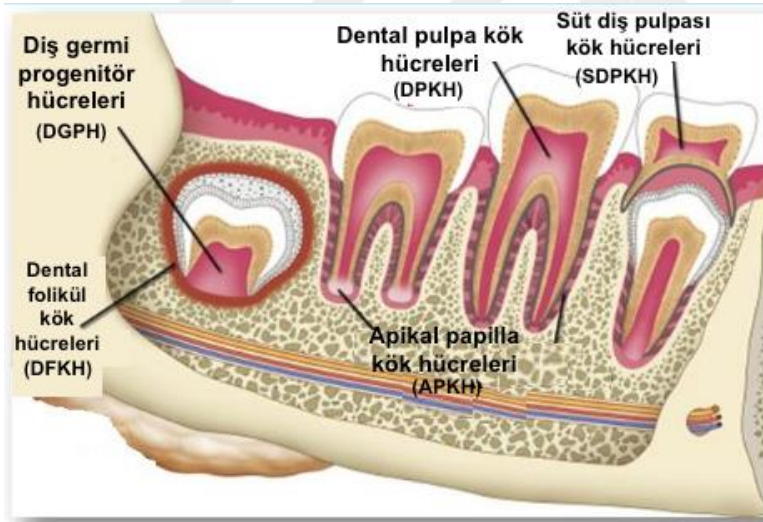
- Bağ dokudan köken almalarından dolayı stromal destek sağlayarak hücrelerin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlarlar
- Farklılaşma yetenekleri yüksektir
- Büyüme faktörleri, sitokin ve kemokin benzeri çözünebilen faktörler salgılayarak hasarlı hücre ve dokuların tamirine olanak tanırırlar
- Migrasyon yetenekleri sayesinde yaralı veya hasarlı dokulara ulaşabilirler
- Hasarlı hücreler ile füzyon yeteneğine sahiptirler
- İmmünesüpresif veya non-immünojenik özellikte olmaları nedeniyle klinik kullanımda insan doku antijeni doku uyumunun şart olmamasına hatta insan doku antijeni uyumsuz bireylerden bile MKH hazırlanabileceği rapor edilmiştir
- Dayanıklı olmaları ve gen transferinin kolay yapılabilmesinden ötürü gen tedavilerinde kullanılabilmeleri
- Çeşitli enzimler salgılayarak kalıtsal hastalıklardaki enzim hasarlarının /defektlerinin yerine koyulabilme potansiyeline sahip olmalarıdır (Akgün, 2016).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları Açısından Dezavantajları

- Sayılarının çok az olması sebebiyle *in vitro* kültür ortamında haftalarca sürebilen kültürlerde proliferasyona ihtiyaç duyma gereksinimidir.
- Proliferasyonları için ciddi bir teknoloji ve altyapı ihtiyacı duymaları ve bunun da yüksek bir maliyete sahip olmasıdır (Akgün, 2016) .

2.1.1.1.2.2.3.2.1.4 Diş ve Çevre Dokulardaki MKH Kaynakları

Kök hücrelerin keşfi ve teknolojideki gelişmeler sonrasında farklı dokuların rejenere edilmesinde yeni stratejiler geliştirilmiştir. Uygun ve istenen hücrelerin tanınması, doku veya organ gibi yapılar oluşturulurken hücrelerin uyarılması için gerekli sinyallerin geliştirilmesi gibi temel prensiplere dayanır. Baş ve boyun bölgesinde vücudun diğer bölgelerinden elde edilen mezenkimal kök hücre kaynaklarına alternatif kaynaklar bulunmakta olduğu görülmüştür (Şekil 3). Erişkin dental pulpası, apikal papilla, dental folikül, ekfoliyeye olmuş süt dişi ve periodontal ligament baş boyun bölgesindeki mezenkimal kök hücre kaynakları olarak kullanılmaktadır. Dental dokular kemik dokusunun aksine sürekli bir remodeling özelliğine sahip olmamasına rağmen bu dokulardan elde edilen kök hücrelerin differensiasyon yetenekleri vardır (Büyükakyüz, 2012; Egusa, Sonoyama, Nishimura, Atsuta, & Akiyama, 2012).



Şekil 3. Dental kaynaklı kök hücrelerin şematik gösterimi (Egusa ve ark., 2012)

2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.1 Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPKH)

Dental pulpa kök hücreleri ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Gronthos ve ark., 2000). Aynı zamanda bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine de farklılaştığı gösterilmiştir. DPKH'leri odontoblastik differensiasyon yeteneğine sahip olup fonksiyonel olarak

dentin rejenere edebilir ve dentinin beslenme ve innervasyonunu sağlarlar. Bu sayede oluşan dentin dokusu da dental pulpayı dış etkilere karşı korur ve dişin fonksiyonunun devamlılığını sağlar. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırıldığında, hücre döngüleri ile ilişkili genleri eksprese etme özellikleri ve yüksek proliferasyon hızları, dental pulpa kök hücrelerini tercih edilebilirlik yönüyle üstün kılmaktadır. Bu hücreler pulpa içinde damarların çevresinde lokalize olurlar ve kök hücre belirteci olan STRO-1'i eksprese ederler (Şekil 4). Ayrıca DPKH'lerinin odontoblastlara farklılaşma süreci, kemik iliğinden köken alan MKH'lerin osteoblastlara farklılaşma süreciyle oldukça benzerlik göstermektedir (Büyükakyüz, 2012; Morszeck, Reichert, Vollner, Gerlach, & Driemel, 2007).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.2 Apikal Papilla Kök Hücreleri (APKH)

İlk olarak 2006 yılında Sonoyama ve ark. tarafından izole edilmişlerdir (Sonoyama ve ark., 2006). Kök maturasyonunu tamamlamamış dişlerin apikal bölgelerinden izole edilmiş olan bu hücrelerin bulunduğu doku, pulpayı oluşturan dental papilin apikal kısmında bulunur ve buraya gevşek bir şekilde bağlanır. Bu hücreler odontoblast ve adipozitlere farklılaşma yeteneği gösterebilen aynı zamanda diş rejenerasyonunda periodontal ligament hücrelerine oranla daha yüksek bir proliferasyon oranına sahip hücrelerdir. Dental pulpa kök hücreleriyle kıyaslandığında daha yüksek bir proliferasyon oranına ve dentin oluşturabilme özelliklerine sahip olmaları bu hücrelerin rejeneratif tedavilerde kullanımını daha önemli hale getirmiştir. İnsan 20 yaş dişlerinden kolayca elde edilebilmeleri avantajlarından biri olarak gösterilmektedir. Apikal papilla kök hücreleri kök dentinin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların oluşumu için önemli bir kaynaktır (Büyükakyüz, 2012; Egusa ve ark., 2012; Y. T. Liu, Lin, Huang, & Huang, 2008; Sonoyama ve ark., 2006; Sonoyama ve ark., 2008).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.3 Periodontal Ligament Kök Hücreleri

Periodontal ligament kök hücreleri ilk olarak Seo ve ark. tarafından insan periodontal ligament dokusundan 2004 yılında izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu hücreler yüksek hızda proliferere olma yeteneğine sahip olan ve periodontal ligamentin oluşmasında

görevli fibroblast benzeri öncül hücrelerdir. Sharpey liflerine benzeyen kollajen fibrillerinin oluşumunda ve sementin rejenerasyonunda görev almaları periodontal açıdan hasarlı dokuların tamiri ve rejenerasyonunda önemli bir kaynak olarak öne çıkmıştır. Seo ve ark. yaptıkları bu çalışmada periodontal ligament hücrelerinin proliferasyon kapasitelerinin kemik iliği kökenli hücrelere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Seo ve ark., 2004). Oluşturduğu dokular açısından kıyaslandığında ise dental pulpa kök hücrelerinin aksine daha az mineralize bir dokunun rejenerasyonunda ve daha düşük osteojenik farklılaşma kapasitelerine sahip oldukları görülmüştür (Büyükakyüz, 2012; Seo ve ark., 2004).

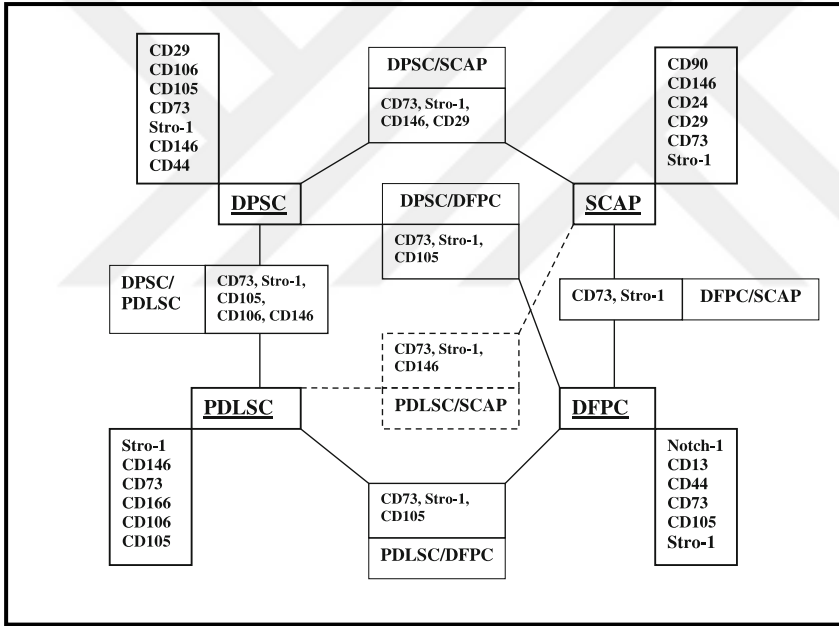
2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.4 Dental Folikül Kök Hücreleri (DFKH)

Gelişim aşamasında olan diş germini çevreleyen doku dental folikül olarak tanımlanmıştır. Bu süreçte periodontal ligament, sement ve alveolar kemik dental foliküle ait hücreler tarafından oluşturulur. Gelişimini sürdürmekte olan 3. büyük azı dişlerinin çekilmesiyle kolayca izole edilebilir olmaları bu hücrelerin ulaşılabilirliğini ve kullanımını arttırmıştır. İlk olarak Handa ve ark. tarafından 2002 yılında sıgırlardan izole edilmiştir (Handa ve ark., 2002). Bu hücreler koloni oluşturma özelliğine sahip olup CD73, STR0-1, Nestin ve Notch 1'i eksprese ettikleri bildirilmiştir. Morsczeck ve ark. 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada bu hücrelerin insan gömülü 3. büyük azı dişlerinin folikül dokusundaki öncül hücreler olduğunu göstermişlerdir (Morsczeck ve ark., 2005). Bu hücrelerin differensiasyon kabiliyetlerinin incelendiği bir çalışmada bu hücrelerin osteoblastların aksine sement benzeri bir doku oluşturduğu bildirilmiştir (Büyükakyüz, 2012).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.4.5 Eksfoliye Süt Dişi Pulpasından Elde Edilen Kök Hücreler (SDKH)

İlk olarak Miura ve ark. tarafından 2003 yılında izole edilmiş olan bu hücreler süt dişlerinde bulunmakta olup farklı hücre tiplerine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir (Miura ve ark., 2003). Yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olmalarının yanı sıra süt dişi pulpasındaki kan damarlarından zengin bölgelerin çevresinde bulunurlar. CD146 ve

STRO-1'i eksprese ederler. Bunun yanı sıra stromal ve vasküler hücreler için ayırıcı belirteçlerden olan ALP, basit fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor, bFGF), kemik sialoprotein (bone sialoprotein, BSP) ve nestin'i eksprese ederler. Sağlıklı pulpaya sahip olan ve özellikle kesici veya kanin süt dişlerinden elde edilirler. Bu hücrelerin *in vivo* olarak yapılan nakil işlemlerinden sonra tübüler dentin formasyonunu başlattıkları bilinse de dentin-pulpa kompleksini oluşturamadıkları çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Osteojenik farklılaşma yetenekleri ile osteoindüktif potansiyelleri kemik rejenerasyonunda önemlidir (Büyükakyüz, 2012; Miura ve ark., 2003).



Şekil 4. Dental kaynaklı kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin şematik gösterimi (Morszeck ve ark., 2008)

2.1.1.1.2.2.3.2.1.5 Dental Kaynaklı Olmayan Mezenkimal Kök Hücreler

2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.1 Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler erişkin kök hücreler arasında önemli bir yere sahip olup adipöz kökenli kök hücre olarak da adlandırılırlar. İlk kez 2001 yılında Zuk ve ark. tarafından izole edilen bu hücreler yağ dokusunun damardan zengin olan stromasından yağ hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra elde edilir ve günümüzde kemik iliğinden alınan kök hücrelerden sonra ikinci sırayı alır (Zuk ve ark., 2001). Yağ dokusunu vücut dışına çıkarabilmek için lipoemilim, lipoplasti veya lipotomi kullanılır. Bu hücreler MKH belirteçlerinden STRO-1, CD13, CD10, CD49, CD29, CD44, CD71, CD166, CD73, CD105 ve SH3'ü eksprese ederken, HKH belirteçlerini eksprese etmezler. Diğer MKH'lerin aksine YDKH'lerinde CD49 pozitif iken, CD106 negatiftir. YDKH'ler kültür ortamında çoğalabilme yetisi yağ dokusunun alındığı kişinin yaşıyla ters orantılıdır. Kişi ne kadar genç ise çoğalma oranı o kadar yüksektir. Yapılan çalışmalar YDKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasiteleri sayesinde yeni kemik formasyonunu başlatabildiklerini göstermiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin kemik ve periodontal dokuların rejenerasyonunda da başarı ile kullanılabileceği belirtilmiştir (Helder, Knippenberg, Klein-Nulend, & Wuisman, 2007; Zuk ve ark., 2001).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.2 Alveol Kemiği Kaynaklı Kök Hücreler

MKH'ler hem maksilla hem de mandibulada bulunan kemik iliğinden izole edilebilirler. Burada bulunan hücreler yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olmalarının yanı sıra kondrositlere, osteoblastlara, adipöz hücrelere ve nöronlara farklılaşma yeteneğine sahiptirler. MKH'lerin alveol kemiğinden elde edilmesi diğer bir kaynak olarak bilinen iliak kemikten elde edilmesine göre çok daha ağrısız ve konforlu bir izolasyon yöntemine ile gerçekleştirilir. Yüksek osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olan bu hücreler *in vivo* olarak uygun bir doku iskelesi ile kullanımı sonrası daha fazla kemik elde edilgi rapor edilmiştir (Akintoye ve ark., 2006; Ulmer ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2006).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.5.3 Periost Kaynaklı Kök Hücreler

Periost kaynaklı kök hücreler ilk olarak 2001 yılında Vacanti ve ark. tarafından izole edilmiş olup bu hücreler CD90, CD29, CD73, CD105 ve STRO-1'i eksprese ettikleri bilinmektedir (Vacanti, Bonassar, Vacanti, & Shufflebarger, 2001). Kemiğin periost kısmının kambiyum tabakası, kemik formasyonu ve tamirinde rol oynayan öncül hücreler bakımından zengin bir bölgedir. Kültür ve *in vivo* koşullarda osteoblastlara, kondrositlere ve adipoz hücrelere farklılaşabilirler. Bu bölgeden eldesi yapılan hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamda TGF- β 1 ve TGF- β 3 ile kondrojenik farklılaşması gerçekleştirilerek hyalin kırıkta oluşumu sağlanır. BMP-2 ve VEGF'de bu hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyardığı bilinmektedir (Ferretti ve ark., 2012; Ferretti & Mattioli-Belmonte, 2014; Vacanti ve ark., 2001).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.6 Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve *in vitro* Ortamda Çoğaltılması

Hücreler kaynağından alındıktan sonra izole edilebilmeleri için ise 4 temel yöntem kullanılmaktadır (Ovalı, 2008).

Bunlar;

- 1- Dansite gradient yöntemi ile izolasyon
- 2- Basit santrifügasyon ile izolasyon [11] [5EP]
- 3- Pozitif seleksiyon
- 4- Negatif seleksiyon [11] [5EP]

En çok tercih edilen yöntem basit santrifügasyon yöntemidir. Dansite gradient yöntemi ile izolasyonda kullanılan maddelerin toksik olma riski nedeniyle kullanımı tartışmalara yol açmıştır. Diğer bir yöntem olan hücrelerin pozitif veya negatif seleksiyonla izolasyonunda da antikor kullanımı tartışmalı bir konu haline gelmiştir (Ovalı, 2008) .

2.1.1.1.2.2.3.2.1.6.1 *in vitro* Kültür Öncesi Hazırlık

MKH'lerin periferik kandan veya umbilikal kord kanındaki sayısı kemik iliği ile kıyaslandığında oldukça az sayıda olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı bu hücrelerin üretimini engelleyen monositlerin bu işlemlerden önce ortadan kaldırılması gereklidir. Bunun gerçekleştirilebilmesi için MKH'lerin adhezyon yüzeyi olarak kullanılacak plastik flask'ın insan albumin veya otolog serum ile kaplanması önerilmektedir. Bu işlemde flaskın tamamını kapatacak kadar insan albumin veya otolog serum flask içine konulduktan sonra oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilir. İnkübasyondan sonra flask içindeki albumin/serumun fazlası dışarı alınır ve kullanımına kadar +4°C'de yarı kapalı bir ortamda saklamaya alınır ve kurutulur. Bu aşamayı takiben monosit ve myelosit içeriği azaltılmak istenen mononükleer hücre süspansiyonu 12-18 saat süre ile +37°C'de bekletilir. Bekletme işleminden sonra süspansiyondaki supernatan toplanır ve atılır. MKH kültür işlemlerine yeni bir kültür vasatı desteğinde devam edilir. Bu sayede MKH kültürü yapılacak mononükleer hücre süspansiyonunda da var olan monositlerin %50'sinden arınmak mümkün hale gelir (Ovalı, 2008).

Günümüzde MKH üretimi için genellikle 4 farklı besi yeri kullanılmakta olup bunlar;

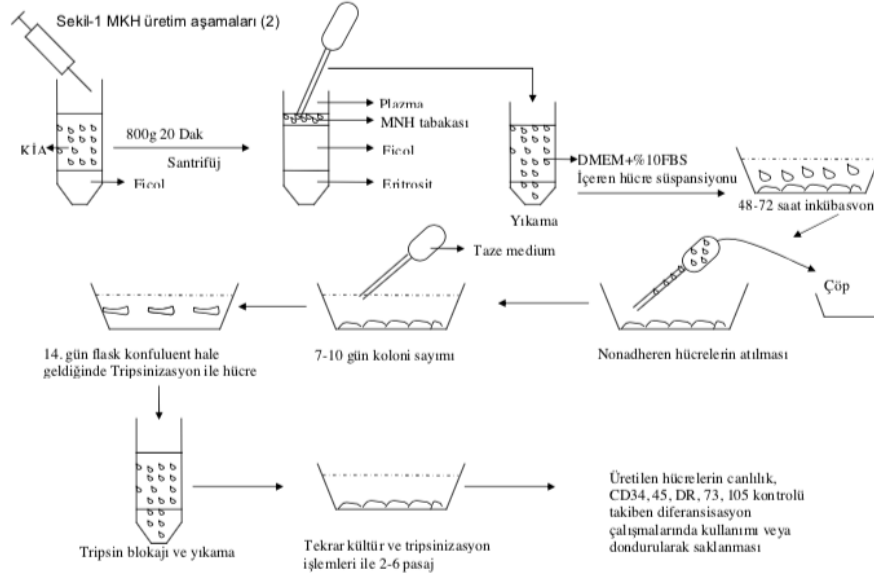
- 1- α -MEM (α -minimum essential eagle's media)^{[1][2]}
- 2- Düşük glukozlu DMEM-LG (Dubelco's modifiye eagle media- low glucose)^{[1][2]}
- 3- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640^{[1][2]}
- 4- IMDM'dir (Iscove's Modified Dulbecco's Medium).

Bu besi yerlerinden günümüzde en sık kullanılanları DMEM ve α -MEM'dir. DMEM ve α -MEM besi yerleri %10-40 oranında değişen miktarlarda fetal sığır serumu (Fetal calf serum, FCS) ile desteklenmektedir. Bu ortam içindeki serum, hücrelere besin ve büyüme faktörü sağlar. Bunlara ek olarak serumun antioksidan özelliği vardır, ancak hayvansal kaynaklı proteinler içerdiğinden dolayı enfeksiyöz ajan geçişine neden olabilir (Meuleman ve ark., 2006; Ovalı, 2008).

MKH'ler plastik adherens özellikleri sayesinde, kültür ortamında, plastik kültür doku kaplarının tabanına saatler içinde yapışmaya başlarlar. 24-48 saat içinde yapışmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılır ve çoğalan hücreler %0,2 tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile muamele edilerek yapıştıkları yerden kaldırılırlar. Kaldırılan bu hücreler daha sonra düşük konsantrasyonlarda olmak üzere yeni kültür kaplarına ekimleri yapılır. İstenen hücre sayısını elde edebilmek için hücreler 10 günde bir pasajlanırlar ve bu esnada her gün ortama taze besiyeri eklenir. Elde edilen hücrelerin daha sonra kullanılmaları gerekiyorsa, bu hücreler dondurularak da saklanabilirler (Matur İ, 2011; Tap O 2013).

2.1.1.1.2.2.3.2.1.6.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültür İşlemi

Kültür işlemleri öncesi önerilen hücre yoğunluğu $1 \times 10^4 - 0.5 \times 10^6 / \text{cm}^2$ 'dir. İlk kültür döneminde yani P0 aşamasında hücreler 37°C 'de %5 CO_2 basınç altında kültür ortamına alınır ve bu aşamada kemik iliği kaynaklı hücre kültür ortamında 3 günde bir, kordon kanı kaynaklı hücre kültürlerinde ise 7 günde bir media değişimi önerilmektedir. Bu aşamadan sonra sıklıkla 7-10. günlerde CFU-F meydana gelir. Kemik iliğinden köken alan hücre kültürlerinde 14. günde iğ benzeri hücreler kültür kabının %80'ini kaplarken, kordon kanından köken alan hücre kültürlerinde ise bu süreç 20 güne kadar uzayabilmektedir. Bu aşamayı takiben hücrelerin yerinden kaldırılması ve P1 pasajı için yeniden ekimi gereklidir. Hücrelerinden yerinden kaldırılma işlemi tripsinizasyon ile gerçekleştirilir. P0 pasajından sonraki pasajlarda hücre yoğunluğu ve MKH'lerin gelişimi ve differensiasyon kapasitelerinin korunabilmesi için bu işlem çok önemlidir. P0 pasajı tamamlandıktan sonra hücre proliferasyonu belirgin bir seviyede artar ve 3-4 günde bir yeni bir pasajlama gerekecektir. P3 pasajından sonrası insan çalışmaları açısından en uygun hücreler elde edileceği düşünülmektedir (Şekil 5) (Ovalı, 2008).



Şekil 5. MKH'lerin üretim ve laboratuvar aşamaları (Ovalı, 2008)

2.1.1.2 Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücrelerin migrasyon, apoptozis, proliferasyon ve farklılaşmasını düzenleyen aynı zamanda yeni doku oluşumunun sağlanmasında görevli olan polipeptid veya protein yapıdaki moleküllerdir. Hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Hücre içi sinyalleşmeyi başlatabilir ve hücrelerin farklılaşmasında önemli bir rolü vardır (S. G. Kim ve ark., 2012).

Dentin matrisi dentinogenezis esnasında biyoaktif moleküller için bir rezervuar görevi görmektedir. Travma veya yaralanma sonrası dentinden serbestlenebilen bu moleküller tamir mekanizmalarının başlatılmasında bir sinyal kaynağı olarak görev alır. Bu işlem önceden var olan odontoblastların yara alanına toplanmasına veya differansiye olmamış mezenkimal kök hücrelerin osteodentin sentezleyen odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlar. Bu büyüme faktörleri arasında TGF- β 1, BMP-2, VEGF, PDGF ve FGF-2 gibi yara iyileşmesi ve doku tamirinde önemli rol oynayan moleküller yer almaktadır (Sadaghiani ve ark., 2016).

2.1.1.2.1 Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)

TGF- β , hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, fonksiyonlarını ve ekstrasellüler matriks üretimini etkiler, migrasyon ve invazyonlarını düzenleyici rol oynar, yara iyileşmesinde görev alır. Bu büyüme faktörü hem dişin gelişimi sırasında, hem de dental dokuların tamiri sırasında (reaksiyoner dentinogenezis) aktif rol oynamaktadır. İnsan dişlerinde, TGF- β 'nın 3 izoformu (TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3) bulunur. Bunlar hem sağlıklı, hem de çürük dişlerde, odontoblast ve diğer pulpal hücrelerde, pulpa ve dentin dokularının ekstrasellüler matrikslerinde yer alırlar. TGF- β 1 sağlıklı dentinde, çürük dentine göre daha az bulunur. Çürük sonrası gözlenen artış, bu büyüme faktörünün doku tamiri, reparatif dentin oluşumu ve iyileşme mekanizmalarında yer aldığı bir göstergesidir. TGF- β izoformları reparatif ve reaksiyoner dentinogeneziste görev alırlar. TGF- β 1 ve TGF- β 3 odontoblastların sekretuar aktivitelerini düzenlerler. Kültür ortamında TGF- β 1 ve TGF- β 3'ün odontoblast tabakası üzerine uygulanmasının, odontoblastların dentinogenetik aktivitelerini arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca TGF- β 'in etkisinin FGF-2 ile up regülasyonu sonrasında sinerjistik olarak arttığı, artmış ALP aktivitesi, mineralize doku formasyonu, dentin sialoprotein (DSP) ve dentin matriks protein-1 (DMP-1) ekspresyonu ile rapor edilmiştir. Köpek dişlerinde yapılan bir çalışmada köpek dental pulpa hücrelerinin dışarıdan verilen TGF- β 1 ile dentinogenetik aktivitelerinin arttığı görülmüştür. TGF- β 1 *in vitro* ortamda dental pulpa hücreleri için kemotaktik etki de göstermektedir. Dentin ekstrasellüler matriksinde bulunan TGF- β 3, pulpada bulunan farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin odontoblastlara differansiasyonunu başlatır. TGF- β 3 dışında BMP-7 de odontoblast stimülasyonunu sağlayan bir diğer büyüme faktörüdür. TGF- β 2 ise daha çok sağlıklı pulpadan elde edilir ve hayat boyu devam eden fizyolojik sekonder dentin yapımında görev alır (Goldberg & Smith, 2004; S. G. Kim ve ark., 2012; Sloan ve ark., 1999; Sloan, Perry, Matthews, & Smith, 2000; Zhao, Sloan, Murray, Lumley, & Smith, 2000).

2.1.1.2.2 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

BMP'ler TGF- β süper ailesinin bir alt grubudur ve hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozisi gibi birçok aktiviteden sorumludur. Güçlü osteoindüktif ve kondrojenik

etkileri vardır. BMP-2 ilk kez Urist ve ark. tarafından keşfedilmiş olup demineralize kemiğe transplante edildikten sonra ektopik kemik formasyonu meydana geldiği rapor edilmiştir. BMP sinyal yollarında iki TGF- β (Tip 1 ve Tip 2) reseptörünün dahil olduğu bilinmektedir. BMP aktivitesi yine BMP antagonisti olan noggin ve kordin tarafından düzenlenmektedir. BMP antagonistleri tarafından yapılan bu düzenlemenin diş gelişiminde kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir. BMP-2, BMP-4, BMP-7 ve BMP-11 mineralizasyondaki rollerinden ötürü klinik açıdan en önemli BMP tiplerindedir. İnsan rekombinant BMP-2 (Hr-BMP-2), dentin siaolofosfoproteinlerinin (DSPP) mRNA ekspresyonunu indükleyerek dental pulpa hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını sağlar. Aynı zamanda ALP aktivitesini arttırırken hücre proliferasyonuna bir etkisi bulunmaz. DSPP ekspresyonu ve odontoblastik farklılaşma BMP-2'nin nükleer transkripsiyon faktörü-Y sinyalleşmesini indüklemesiyle meydana gelmektedir. Ayrıca differansiye olmamış mezenkimal hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* ortamda odontoblastlara farklılaşmasını uyarırlar. Amputasyon yapılmış köpek dişi pulpasına örtüleme materyali olarak uygulanan insan rekombinant BMP-2 ve BMP-4'ün dentin formasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise BMP-2 ve BMP-4'ün sığır pulpa hücrelerine uygulanması sonrası bu hücrelerin preodontoblastlara farklılaştığı görülmüştür. DMP-1, ALP, DSPP, enamelin ve fosfat regüle eden genlerin BMP-11 uygulanan hücrelerde yüksek oranda arttığı ve eksprese edildiği rapor edilmiştir (S. G. Kim ve ark., 2012) .

2.1.1.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF endotelyal hücrelere özel bir affinitesi olan, anjiyogenezisde kilit bir role sahip heparin bağlayıcı bir proteindir. Endotelyal hücrelerin proliferasyonu, yaşamının devam ettirilmesi ve yara bölgesindeki yeni damarlanmanın uyarılması VEGF'nin fonksiyonları arasında gösterilmektedir. VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasenta büyüme faktörünü içermektedir. Bu izoformlar içerisinde en çok işlev yapabileni VEGF-A'dır. Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinen VEGF-A, hücre migrasyonunun uyarılması, hücre proliferasyonu, vazodilatasyondan sorumludur. Ayrıca damarsal geçirgenliği VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanarak düzenlemektedir.

VEGF'nin yaralanmış dental pulpa içeren diş kesitlerine uygulanıp, bu kesitlerin immünsupresif farelere subkutanöz olarak implante edildiği bir çalışmada mikrodamar yoğunluğunu arttırdığı görülmüştür. VEGF'nin insan dental pulpa hücrelerinin endotelial hücrelere dönüşümünü uyardığı söylenmiştir. Dental pulpa hücreleri VEGF uygulaması sonrası incelendiğinde CD29, CD44, CD73, CD105 ve CD166 'ya karşı pozitif, CD14, CD34, CD45'e ise negatif olduğu görülmüştür. VEGF'nin 3 boyutlu fibrin bir doku iskelesine ekilen dental pulpa hücrelerinde VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin ekspresyonunu ve mikrodamar oluşumunu arttırdığı görülmüştür. Fakat VEGF'nin CD29, CD90, CD105, CD166, CD146 ve STRO-1 açısından pozitif olan dental pulpa hücrelerinde CD31, CD34, and CD144 pozitifliğini sağlamadığı söylenmiştir. İlginç bir şekilde VEGF osteojenik koşullarda dental pulpa hücrelerinin proliferasyonu ve osteojenik differansiasyonunu arttırdığı ve bu yüzden de osteogenezisde uyarıcı bir rolü olduğu düşünülmektedir (S. G. Kim ve ark., 2012).

2.1.1.2.4 Fibroblast Growth Factor (FGF)

FGF, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve differensiasyonunda kilit bir rol oynar. Günümüzde insanlarda 22 üyesi tanımlanmıştır ve bunlardan FGF-2'nin pulpa-dentin rejenerasyonunda en önemlisi olduğu söylenmiştir. Sinyal iletimi FGF'lerin hücre yüzeyindeki heparan sülfat ve heparan sülfat proteoglikanları bağlayabilme özelliği sayesinde gerçekleşmektedir. FGF-2 temel bir FGF iken FGF-1 asidiktir. FGF-2 hücre proliferasyonunu ve differensiasyonunu kontrol ederek diş morfogenezisini düzenler. FGF-2 potent bir anjiyogenik bir faktör olup, PDGF ve VEGF ile dental pulpada yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar. Hücre proliferasyonu ve differensiasyonundaki rolü düşünülecek olursa, FGF-2 yara iyileşmesi sırasındaki granülasyon dokusunun oluşumunda erken uyarıcı bir faktör olarak görev alır (S. G. Kim ve ark., 2012).

FGF-2 dental pulpa hücrelerinin migrasyonunu indüklemekle beraber dental pulpa hücrelerinin differansiye olmadan proliferasyonunu sağlar. Ayrıca FGF-2 ve TGF- β 1 ile kombine uygulanması sonrasında sinerjistik bir etki göstererek dental pulpa hücrelerinin odontoblastlara differansiye olmasını sağlar. Sıçan dental pulpasına FGF-2 uygulaması

sonrasında erken yara iyileşme evresinde vasküler yapıların formasyonu ve hücre proliferasyonunun gerçekleştiği rapor edilmiştir. Ayrıca FGF-2'nin ekspozite olmuş pulpaya uygulanması sonrası reperatif dentin formasyonunu başlattığı görülmüştür (S. G. Kim ve ark., 2012).

2.1.1.2.5 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

PDGF, plateletler tarafından salgılanan anjiyogenez ve hücre proliferasyonunda görevli bir büyüme faktörüdür. AA, BB, CC ve DD olmak üzere dört farklı homodimer izoformu bulunmakta olup buna ek olarak bir de PDGF-AB heterodimer formu bulunmaktadır. PDGF mezenkimal/progenitor hücrelerin yara bölgesinde kemotaksisini ve burada proliferasyon olmalarını indükler. Pulpada meydana gelen travma sonrası oluşan hemorajiyi kan pıhtısının oluşumu takip eder. Kan pıhtısındaki plateletler α -granülleri taşıyan PDGF'leri salgırlar ve yara bölgesine nötrofil ve makrofajların gelmesini uyarırlar. Plateletler erken yara iyileşmesinde granülasyon dokusunun oluşmasındaki diğer sinyal moleküllerini üretmek için bir rol oynar. PDGF-AB ve -BB izoformları sıçan dental pulpa hücrelerinde DSP'yi eksprese etmelerine rağmen PDGF'lerin pulpada dentin benzeri doku oluşumuna çok az bir etkileri olduğu rapor edilmiştir. PDGF'ler hücre proliferasyonu ve dentin matriks sentezini uyarırsa da hücre kültüründe ALP aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (S. G. Kim ve ark., 2012).

2.1.1.3 Doku İskelesi (Skaffold)

Doku mühendisliği yaklaşımının üçüncü basamağını ise; doku iskeleleri meydana getirmektedir. Hücrelere fiziksel destek sağlayan, hücrelerin tutunması ile fonksiyon görmeleri için gerekli olan uygun ortamı sunar ve üç boyutlu bir yapı oluşturarak elde edilecek dokunun formunu belirlemek görevleri arasındadır. Doku ile uyumlu olması ve bir reaksiyona sebep olmayan materyallerin kullanımı gerekli olup bu materyallerin gözenek yapısı, büyüklüğü ve yüzey özellikleri yönünden ihtiyaç duyulan mekanik özelliklere sahip olması gereklidir. Belirli bir zaman içinde de biyobozunur olmaları, biyolojik olarak istenen işlevlerini yerine getirirken toksik ve immünolojik etki göstermemesi bu materyallerde olması istenen özelliklerdir. Doku iskelelerinin

ekstrasellüler matriksi taklit etmesi için; kök hücrelerin proliferasyonunu, differansiasyonunu ve gelişmelerini sağlayacak büyüme faktörlerini, besinleri ve bakteriyel invazyonu önleyecek düzeyde antibiyotik barındırmaları gereklidir (Canoğlu E, 2008; Yuan ve ark., 2011).

Doku iskeleleri kaynağı, kimyasal kompozisyonu, hücre barındırmaları, fiziksel kompozisyonu ve uygulama yöntemlerine göre sınıflandırılabilir. Kaynağına göre sınıflandırıldığında doğal (fibrin, kollajen, kitosan, glikozaminoglikan, dentin matriks vb.) ve sentetik (PGA, PLLA, PLG) olmak üzere iki şekildedir. Doğal polimer doku iskelelerinin avantajları içinde; ekstrasellüler matriksin karakteristik özelliklerini taklit edebilmesi, biyobozunur ve biyouyumlu olması, hücre yaşamının ve fonksiyonunu devamının sağlaması gösterilmektedir. Buna karşın izolasyonunun zor olması, kaynağından ötürü immün cevaba sebep olabilmesi ve sınırlı mekanik ve geometrik özellik göstermeleri bu materyallerin klinik kullanımını sınırlayan etmenlerdir. Bu dezavantajlarından dolayı sentetik doku iskelelerinin kullanımı son yıllarda gittikçe artmıştır.

Kollagen, vücutta en çok bulunan yapısal proteinlerden biri olup, insan ve hayvanlardan kolaylıkla elde edilebilen doğal bir doku iskelesi materyalidir. İn vivo ortamdaki bozunma hızı, materyalin yoğunluğu ve moleküller arası çapraz bağların miktarının değiştirilmesi ile kontrol edilebilmektedir. Biyolojik özellikleri kemik yüzeyinde bulunan doğal proteinlere benzediğinden dolayı, özellikle kemik rejenerasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak materyalin birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Kollagen işlenmesi zor bir materyaldir, hayvansal kaynaklı patojenleri barındırma ve bulaştırma riski vardır, alıcıda immün cevap oluşumunu tetikleyebilir ve materyalin mekanik özellikleri istenilen seviyelerde değildir (Atala, 2005; Galler, D'Souza, Hartgerink, ve ark., 2011; Malhotra & Mala, 2012).

Trombositten zengin plazma (TZP), otojen olarak elde edilebilen bir doku iskelesidir. Trombosit büyüme faktörleri ve pıhtılaşma faktörleri oranı normal kan pıhtısından daha fazla olan, birinci jenerasyon trombosit konsantrasyonu olup içerisinde PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2, VEGF, FGF, EGF ve IGF gibi büyüme faktörlerini içerir. Aynı zamanda

kollagen ve antienflamatuar ajanların üretimini stimüle eder, lokal enflamatuar yanıtı düzenler, yara bölgesine hücrelerin toplanmalarını sağlayarak sert ve yumuşak doku iyileşmesinde görev alır (Torabinejad & Turman, 2011; Yeom ve ark., 2016).

Doğal doku iskelelerinden biri olan trombositten zengin fibrin (TZF), sert ve yumuşak dokularda yara iyileşmesine yardımcı ve immün sistemi destekleyici üç boyutlu bir yapı olup, trombosit, lökosit, sitokin ve büyüme faktörleri gibi kandan elde edilen bileşenlerden oluşur. TZF yara iyileşmesini, kemik oluşumu ve maturasyonunu, greft stabilizasyonunu ve hemostazı artırır, greft materyallerinin yerleştirilmelerini kolaylaştırır. TZF içinde bulunan trombositler, aktive olduktan sonra buldukları fibrin matrisi içine büyüme faktörleri salgırlar. Bu büyüme faktörleri periostta mitojenik cevabı tetikleyerek kemik dokusunun tamirine yardımcı olurlar (Das ve ark., 2016; Dohan ve ark., 2006; Dohan Ehrenfest, Del Corso, Diss, Mouhyi, & Charrier, 2010; Hotwani & Sharma, 2014; Sunitha Raja & Munirathnam Naidu, 2008).

Belirlenen koşullarda spesifik şekillerde, istenilen por büyüklüğünde, fiziksel ve kimyasal özelliklerde üretilebilmektedir. Buna ek olarak kontrollü degrade edilebilmeleri de sentetik doku iskelelerinin avantajlarından. Belirli uygulamalar daha sabit ve rijit doku iskelelerine ihtiyaç duyarken pulpa rejenerasyonunda daha yumuşak ve enjekte edilebilir doku iskelelerinin kullanılması önerilmektedir. Bunun nedeni kök kanalı çevresindeki dentin duvarının verilen hücrelerin ve biyomoleküller için yeterince rijit olmasıdır (Orti ve ark., 2018).

Doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılan başlıca materyaller şunlardır:

-Sentetik seramikler (Hidroksilapatit (HA) ve/veya Trikalsiyum fosfat (TCP), MTA, Biodentin), [11]
[SEP]

-Sentetik polimerler (PGA, PLA, PGA, PLLA, PLG) [11]
[SEP]

-İnorganik sığır kemiği (Bio-Oss) [11]
[SEP]

-Doğal polimerler (kollajen, kitosan, hiyaluronik asit) (Galler, D'Souza, Hartgerink, ve ark., 2011) [15]

PLA, PGA ve PLG doku mühendisliği alışmalrında sıklıkla kullanılan sentetik doku iskelelerinden olup insanlarda kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Bu materyaller biyoyumlu olmalarının yanı sıra toksik değillerdir ve non-enzimatik hidroliz ile degrade olurlar. Bu doku iskelelerinin en büyük avantajları porzl mikroyapıya sahip olmaları, dayanıklı ve çözünme hızlarının kontrol edilebilir olmasıdır. Termoplastik özelliğe sahip olmaları istenilen boyut ve şekilde üretilibilmeleri ve c boyutlu bir doku iskelesi olarak kullanılabilmelerini kolaylaştırmaktadır. Bu materyallerin en büyük dezavantajları ise implante edildikleri bölgede enflamasyona yol aabilmeleridir (El-Backly ve ark., 2008; Galler, D'Souza, Hartgerink, ve ark., 2011; Powers JM, 2007).

2.1.1.4 Dentin Pürüzlendirme Ajanları

2.1.1.4.1 EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)

Endodontide şelasyon ajanlarının kullanımını ilk olarak 1957 yılında Nygard-stby %15'lik EDTA (7.3 pH) kullanarak tanıtılmıştır. EDTA bir poliaminokarboksilik asit olup, renksiz ve suda çözünebilen katı bir ajandır. Kireç sökücü olarak kullanılmaya başlanan EDTA, kalsiyum ve demir gibi metal iyonlarını sekestre etme kabiliyeti sayesinde popüler bir ajan olarak günlük kullanıma girmiştir. EDTA ile bağlanan metal iyonları solüsyonda kalmaya devam etmesine rağmen reaktif özelliklerini kaybederler. Dentinin içindeki kalsiyum iyonları ile reaksiyona girerek çözülebilir kalsiyum şelatları oluşturur (Hulsmann, Heckendorff, & Lennon, 2003; Mohammadi, Shalavi, & Jafarzadeh, 2013).

EDTA en sık olarak kanal tedavisinde smear tabakasını uzaklaştırmak amacıyla %17'lik konsantrasyonda ve 1-5 dakika arasında değişen sürelerde uygulanmaktadır. şelasyon etkisi sayesinde kanal dolgu materyallerinin dentin duvarlarına daha iyi bağlanmasını sağlar. Ayrıca dentin geçirgenliğini arttırarak kanal içi medikamentlerin etkisini arttırırken dar ve kalsifiye kanalların aılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu zelliklerinin yanı sıra lubrikant özelliği sayesinde kanal aletlerinin kırılma riskini

azalttığı bilinmektedir (Calt & Serper, 2000, 2002; Hulsmann ve ark., 2003; White, Goldman, & Lin, 1987).

2.1.1.4.2 Fosforik Asit

Etch and rinse adeziv sistemler günümüzde hala kullanımda olup en eski ve ilk olarak kullanılan dentin bağlayıcı sistemdir. Bu sistemde kollajen fibrilleri açığa çıkarmak amacıyla ek bir asit uygulama basamağı mevcuttur (Pashley ve ark., 2011; Van Meerbeek ve ark., 2003). Dentinde fosforik asitin 30-40% arasında konsantrasyonda 15 saniye uygulanması altın standart olarak kabul edilmiştir (Gardner & Hobson, 2001). Fakat günümüzde dentinin fosforik asit ile pürüzlendirilmesi agresif bir yaklaşım olarak görülmektedir (Van Meerbeek ve ark., 2011). Dentine uygulanan fosforik asit kollajen fibrillerin açığa çıkmasını ve hidroksiapatitten tamamen ayrılmasını sağlar (De Munck ve ark., 2003; Van Meerbeek ve ark., 1996). Fosforik asit uygulanmış dentindeki kollajenin hızlı degradasyonu aktive olan MMP'lerden (Matriksmetalloproteinazlar) dolayı meydana gelmektedir. Fakat klorheksidin (CHX) ve doksisisiklin gibi MMP inhibitörlerinin kullanımı bu kollajen degradasyonunu önleyebilmektedir (Osorio ve ark., 2011). Dentin içinde bulunan MMP'lerden, MMP-2 ve MMP-9 inhibitörleri son yıllarda yoğun ilgi görmüştür (Niu ve ark., 2011). Kollajen degradasyonuna sebep olmasından ötürü maleik asit, sitrik asit ve EDTA gibi asitler de fosforik asit yerine alternatif olarak denenmiştir (Breschi ve ark., 2002; Sauro ve ark., 2010). Fakat fosforik asit halen etch-and-rinse adeziv sistemlerinde en çok kullanılan ajandır. Popüleritesine rağmen literatürde bu ajanın pulpal hücrelere olan etkisini gösteren birçok yayın mevcuttur. Fosforik asitin diğer bir dezavantajı ise kullanıldığında dentin geçirgenliğini arttırmasıdır (Pashley, 1992).

2.1.1.4.3 Fitik Asit (İnositol Hekzofosfat, IP-6)

Dentinin pürüzlendirilmesi ve inorganik smear tabakasının kaldırılması amacıyla da kullanılabilen fitik asit (inositol hekzofosfat - IP6), doğal olarak oluşan, bitkilerde ve memelilerde bulunan bir asittir. Buğday kepeğinden ucuz yollarla elde edilebilen yüksek derecede negatif yüklü bir maddedir. Yüksek negatif yüklü olma özelliği sayesinde

kalsiyum, magnezyum ve demir gibi katyonik iyonlarla şelasyon yapabilmektedir. fosforik asitle kıyaslandığında pulpa benzeri hücelere daha az toksik olduğu söylenmiştir. Aynı zamanda kök kanalındaki inorganik smear tabakasını uzaklaştırmada etkiliyken osteoblast benzeri hüceler (MC3T3-E1) ile de biyoyumlu olduğu rapor edilmiştir. EDTA ile smear tabakasını uzaklaştırma açısından kıyaslandığında daha geniş açıklıkta dentin tübülleri ve temiz yüzeyler görülmüştür. Ayrıca EDTA'nın osteoblast hücelerinin ALP etkilerini %17 dilüsyonda anlamlı derecede baskıladığı bildirilirken IP6'nın çeşitli dilüsyonlarındaki %11lik solüsyonunun bu etkiyi yapmadığı görülmüştür. IP6'nın bu etkisi zararlı hidroksil radikallerinin oluşumunu demir iyonunu bağlayarak hüceleri oksidatif yaralanmadan korumasıyla açıklanmıştır (Kong ve ark., 2015; Nassar ve ark., 2013; Nassar ve ark., 2015).

2.1.1.4.4 Sitrik Asit

Sitrik asit metallerle reaksiyona girerek non-iyonik çözünebilen şelat oluşturan bir şelasyon ajanıdır. Di Lenarda ve ark. smear tabakasının uzaklaştırılması yönünden EDTA ile aralarında anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir (Di Lenarda, Cadenaro, & Sbaizero, 2000). Endodontik tedavilerin son irrigasyon aşamasında %10'luk sitrik asit uygulamasının smear tabakasını etkili şekilde kaldırdığı belirtilmiştir. %17'lik EDTA'ya kıyasla biyoyumluluk açısından daha kabul edilebilir olduğunu rapor edilmiştir (Malheiros, Marques, & Gavini, 2005; Sceiza, Daniel, Santos, & Jaeger, 2001).

3. Gereç ve Yöntem

3.1 Etik Kurul

Çalışmaya "Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu" (16-12.1/46 karar numaralı) (Ek-1) ve "Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul" (77.637.435-81 karar numaralı) (Ek-2) onayı alındıktan sonra başlandı.

3.2 Deneylein *in vitro* Bölümünde Kullanılacak Dişlerin Seçim Kriterleri ve Çalışma Gruplarının Dağılımı

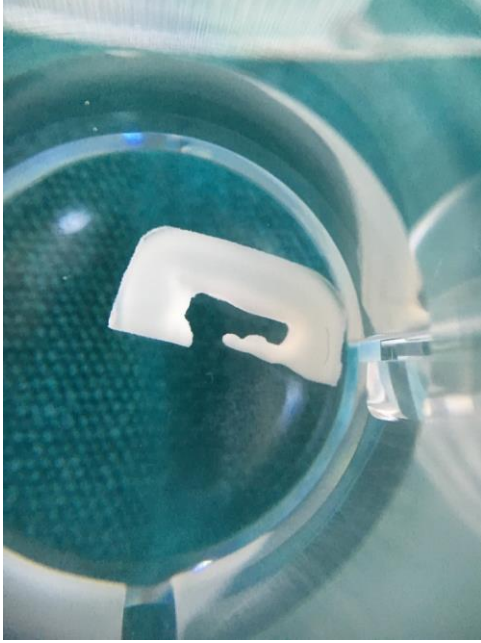
Deneylede kullanılacak dişlerin çalışmaya alınmasında;

- Dişlerin gömülü, ağıza sürmemiş çürüksüz 20 yaş dişleri olması
- Dişleri çekilen hastaların yaş aralığının 18-24 arasında olması
- Radyolojik olarak diş köklerinde bir periapikal patoloji olmamasına dikkat edildi.

Çalışma 40 adet gömülü 20 yaş diş çekildikten sonra dişler rastgele olacak şekilde 10 ayrı gruba ayrıldı. Dişler çekimden hemen sonra %1,5'luk sodyum hipoklorit ile 5 dakika boyunca dezenfekte edildikten sonra su soğutması altında aeratör yardımıyla uzun aksı boyunca iki ayrı parçaya kesildi. Periodontal küretler ve kanal eğeleri yardımıyla pulpa dokusu uzaklaştırıldı ve dişler tekrardan 5 dakika boyunca %1,5'luk sodyum hipoklorit ile dezenfekte edildi. Dezenfeksiyonu tamamlanan örnekler kron kısımları dışarıda kalacak şekilde akril bloklara gömüldü. Dişlerin mine tabakası, su soğutması altında elmas frezler yardımıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir dişten isomet hassas kesim cihazı (Buehler, Almanya) (Şekil 6) ve bıçağı (Buehler, Almanya) yardımıyla mine-sement sınırına kadar her biri 1 mm kalınlığında olmak koşuluyla 5 kesit alındı (Şekil 7, 8). Toplamda alınan 400 kesit rastgele olacak şekilde çalışma gruplarına eşit sayıda (her grup için 40 kesit) olacak şekilde ayrıldı. Kesitler deney aşamalarına kadar distile su içeren eppendorf tüplerinde saklandı.



Şekil 6. İso met hassas kesim cihazı



Şekil 7. Dentin kesitlerinin görünümü

Çalışmada 10 farklı grup (8 deney 2 kontrol) (Şekil 8) bulunmakta olup bunlar;

Kontrol Grubu (MKH ekimi ve asit uygulaması yapılmayan Kontrol grubu): Üzerinde hiçbir uygulama yapılmamış 40 kesit içeren kontrol grubu

Grup 2 (MKH ekimi yapılmayan EDTA grubu): Sadece 5 dakika süre ile %17'lik EDTA uygulaması yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 3 (MKH ekimi yapılmayan Sitrik Asit grubu): Sadece 5 dakika süre ile %10'luk Sitrik asit uygulaması yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 4 (MKH ekimi yapılmayan Fitik Asit grubu): Sadece 5 dakika süre ile %1'lik Fitik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) uygulaması yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 5 (MKH ekimi yapılmayan Fosforik Asit grubu): Sadece 30 saniye süre ile %37'lik Fosforik asit (Spident Fine Etch, C&V Dental, Türkiye) uygulaması yapıp deneye alınan 40 kesit

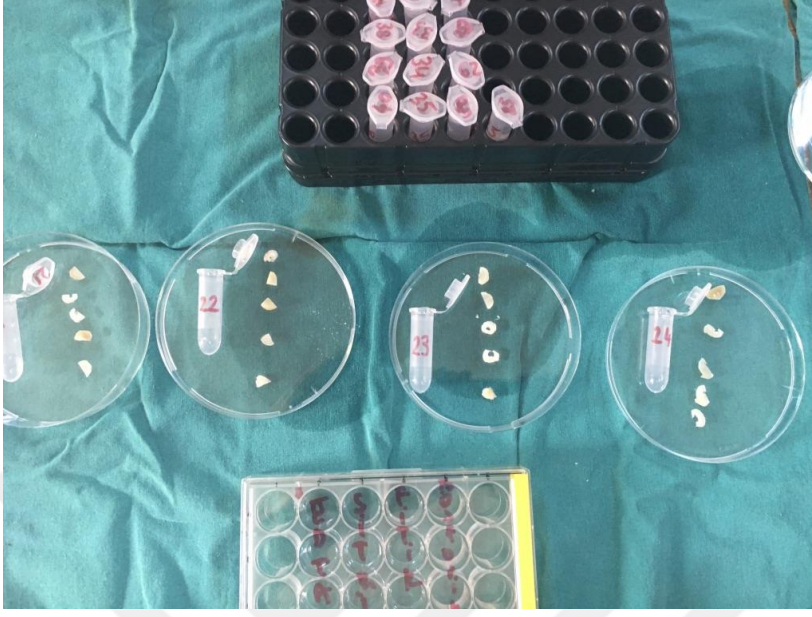
Grup 6 (MKH ekimi yapılan Kontrol grubu): Sadece kök hücre ekimi yapılmış 40 kesit içeren 2. kontrol grubu

Grup 7 (MKH ekimi yapılan EDTA grubu): 5 dakika süre ile %17'lik EDTA uygulaması sonrası kök hücre ekimi yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 8 (MKH ekimi yapılan Sitrik Asit grubu): 5 dakika süre ile %10'luk Sitrik asit uygulaması sonrası kök hücre ekimi yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 9 (MKH ekimi yapılan Fitik Asit grubu): 5 dakika süre ile %1'lik Fitik asit uygulaması sonrası kök hücre ekimi yapıp deneye alınan 40 kesit

Grup 10 (MKH ekimi yapılan Fosforik Asit grubu): 30 saniye süre ile %37'lik Fosforik asit uygulaması sonrası kök hücre ekimi yapıp deneye alınan 40 kesit

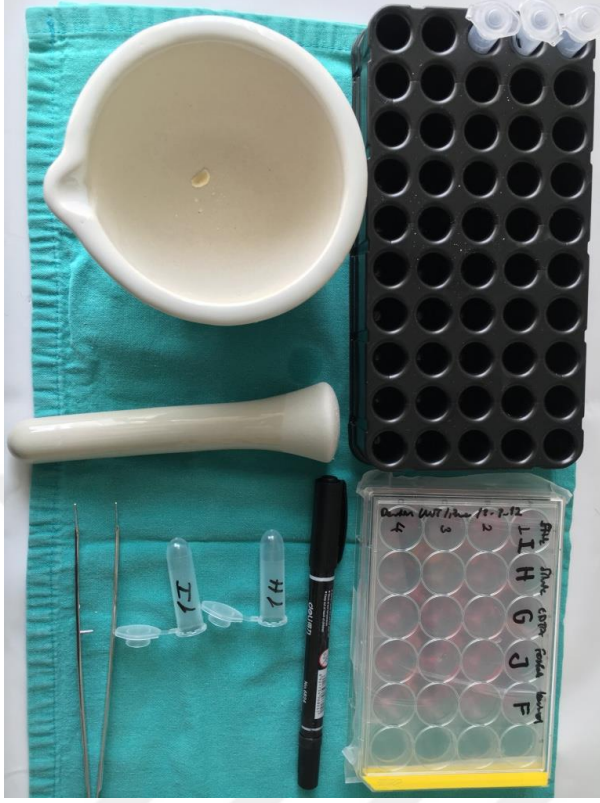


Şekil 8. Dentin kesitlerinin gruplara dağılımı

3.3 Deneyin *in vitro* Bölümündeki Çalışma Tekniği

3.3.1 MKH Ekimi Yapılmayan Gruplardaki Uygulamalar

Gruplara ayrılan diş kesitleri buldukları eppendorf tüplerinden çıkarılarak steril cerrahi örtü üzerine steril preseller yardımıyla taşındı ve steril pamuk rulolar yardımıyla örneklerin kurulanması sağlandı. Asit uygulaması yapılmayacak olan kontrol grubundaki kesitler steril bir havanda dövülerek toz haline getirildi (Şekil 9). Asit uygulaması yapılacak gruplardaki dişler her grup için belirtilen sürelerde asitlendikten sonra yine steril pamuk rulolar yardımıyla kurutuldu ve aynı yöntem kullanılarak toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnekler hassas tartıda ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra steril eppendorf tüplerine taşınarak deney işlemlerine kadar -85 °C derecede saklandı.



Şekil 9. Örneklerin toz haline getirilmesi

3.3.2 MKH Ekimi Yapılacak Gruplardaki Uygulamalar

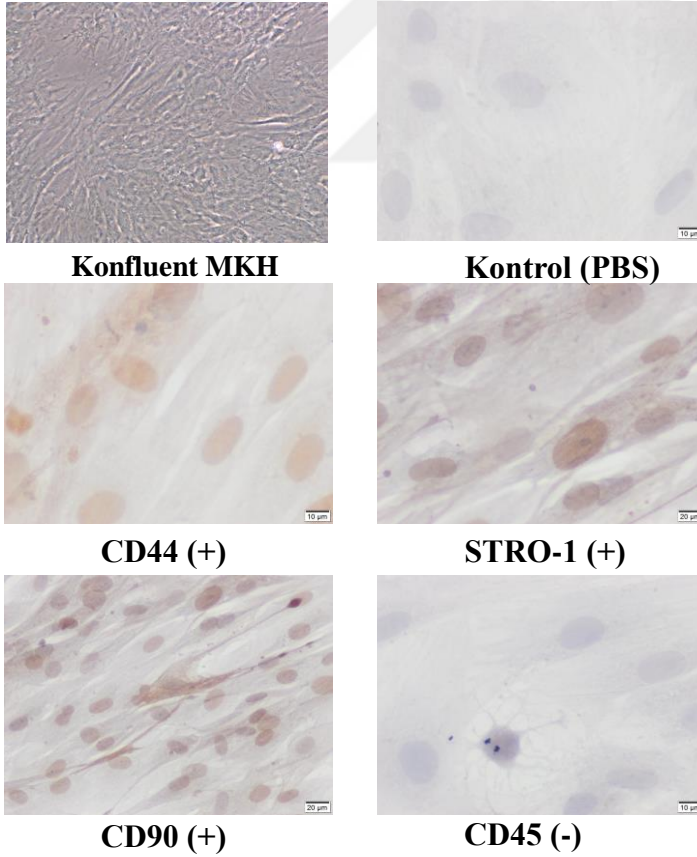
3.3.2.1 MKH'lerin İzolasyonu ve Kültür İşlemleri

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında daha önceden insan yanak yağ dokusundan elde edilmiş ve -80°C 'de dondurulmuş durumda olan insan adipöz doku kökenli mezenkimal kök hücreleri çözündürülerek kullanılmıştır. MKH'ler 25cm^2 'lik hücre kültür kabında %15 FBS (S0113, Biochrom, Berlin, Almanya), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Penisilin ve 100 UI/ml Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Almanya) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Almanya) içeren α -MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Almanya) kültür kabında 37°C 'de ve %5 CO_2 'li ortamdaki inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Kültür ortamında üç gün sonra yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının değiştirilmesi sonucu ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür kabına yapışan hücreler, kültür

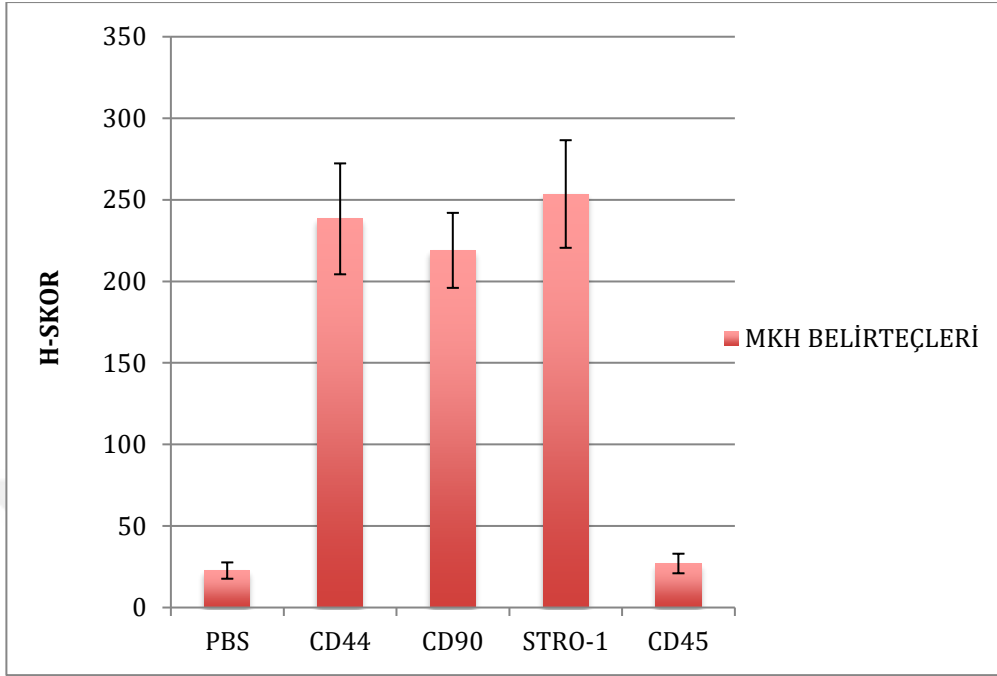
kabını %70-80 oranında kaplayıncaya kadar besiyeri iki günde bir defa değiştirildi. 18 gün sonra, inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japonya) altında hücrelerin üremeleri kontrol edildi. Kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile dolduğunda (%70-80 konfluente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. Birincil kültür sıfırncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3, P4 şeklinde belirtildi (Martinez-Lorenzo ve ark., 2009).

3.3.2.2 Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

MKH karakterizasyonunda pasaj 4 için yapılan immünohistokimyasal spesifik boyamalar kullanıldı (Şekil 10). MKH belirteçleri olarak STRO-1 (+), CD44 (+) ve CD90'ı pozitif (+) olarak eksprese ederken, CD45'i negatif (-) olan hücreler seçildi (Grafik 1).



Şekil 10. MKH karakterizasyonu için yapılan spesifik immünohistokimyasal boyamalar

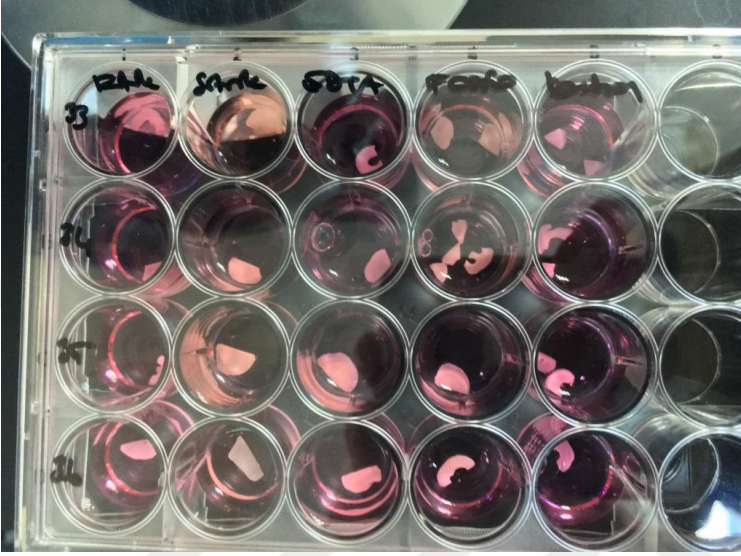


Grafik 1. Kök hücrenin karakterizasyonunu gösteren kontrol (PBS), STRO-1, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretlemesi için yapılan immünohistokimya bulgularının H-skor analizi

3.2.2.3 MKH'lerin Kesitlere Ekimi ve İnkübasyonu

Gruplara ayrılan diş kesitleri buldukları eppendorf tüplerinden çıkarılarak steril cerrahi örtü üzerine steril preseller yardımıyla taşındı ve steril pamuk rulolar yardımıyla örneklerin kurulanması sağlandı. Gruplarda belirtilen sürelerde asitleme işlemi yapıldıktan sonra örnekler steril PBS ile yıkandı. Örnekler kurutulduktan hemen sonra MKH ekimi için 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarına alındı (Şekil 11). Örneklerinin kültür aşamaları olası bir kontaminasyonu önlemek amacıyla laminar flow cihazının (Herasafe Biosafety Cabinet Class II, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) içerisinde gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 250 µL α-MEM (Hyclone, USA) içeren besiyeri eklendi ve 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1×10^6 hücre/cm² içeren 250 µL besiyeri kuyucuklara mikropipetler yardımıyla taşındı ve 37 °C'de 3 gün boyunca inkübasyonu beklenildi. İnkübasyon periyodunun sonunda örnekler buldukları medyumdan uzaklaştırıldı, kurutuldu ve havanda ezilerek toz

haline getirildi. Toz halindeki dentin örneklerinin ağırlıkları hassas tartı yardımıyla saptandı ve her gruptan 250 mg ağırlığındaki dentin tozları steril eppendorf tüplerine taşınarak deney işlemlerine kadar -85 °C derecede saklandı.



Şekil 11. Örneklerin üzerine MKH ekimi

3.3.3 Dentin Tozlarındaki Büyüme Faktörlerinin ELISA Yöntemi İle Ölçümü

Dentin tozlarındaki TGF- β 1, BMP-2, FGF-2, VEGF miktarlarının belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanıldı. ELISA kitleri (Fine Test ELISA Kit, Çin) kullanılabildiği kadar +4°C'de saklandı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda her örneğin üzerine ağırlığının 1:9 oranında steril PBS eklendi ve sonikatörde (Bandelin Sonoplus, Almanya) 20 saniye 3 döngü boyunca sonikasyon işlemi uygulandı. Örnekler 5000 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve deneyde kullanılacak süpernatant elde edildi.

3.3.3.1 Yıkama Tamponunun Hazırlanması

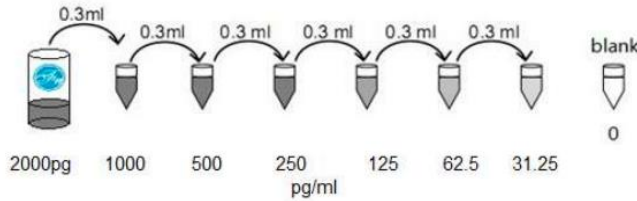
Yıkama tamponu, konsantre yıkama tamponunun 30 ml'sine 750 ml deiyonize su ilave edilip seyreltilerek hazırlandı.

3.3.3.2 Standart Solüsyonlarının Hazırlanması

Her bir ELISA kiti için belirtilen konsantrasyonlarda standart solüsyonlar hazırlandı.

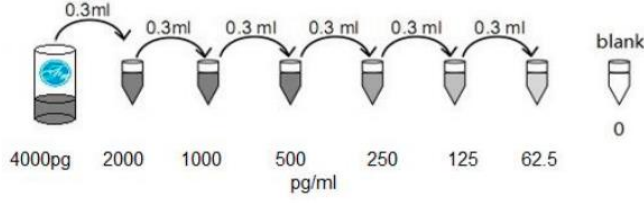
Anti-TGF- β 1 ve Anti-VEGF standart solüsyonları için;

- 2000 pg/ml standart solüsyonu için bir standart tüpe 1 ml Örnek/Standart seyreltme tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca beklendi.
- 1000 pg/ml'den 31.25 pg/ml standart solüsyonlarının eldesi için 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 31,25 pg/ml etiketlerini taşıyan eppendorf tüpleri hazırlandı.
- Her bir tüpün içine 0,3 ml Numune / Standart seyreltme tamponu ilave edildi.
- 2000 pg/ml standart solüsyonunun 0,3 ml'si, 1000 pg/ml içeren eppendorf tüpüne aktarıldı ve karıştırıldı.
- 1000 pg/ml içeren eppendorf tüpünden 0,3 ml solüsyon, 500 pg/ml içeren tüpe aktarıldı
- 500 pg/ml içeren eppendorf tüpünden 0,3 ml solüsyon, 250 pg/ml içeren tüpe aktarıldı
- 250 pg/ml içeren eppendorf tüpünden 0,3 ml solüsyon, 125 pg/ml içeren tüpe aktarıldı
- 125 pg/ml içeren eppendorf tüpünden 0,3 ml solüsyon, 62,5 pg/ml içeren tüpe aktarıldı
- 62,5 pg/ml içeren eppendorf tüpünden 0,3 ml solüsyon, 31,25 pg/ml içeren tüpe aktarıldı (Şekil 12).



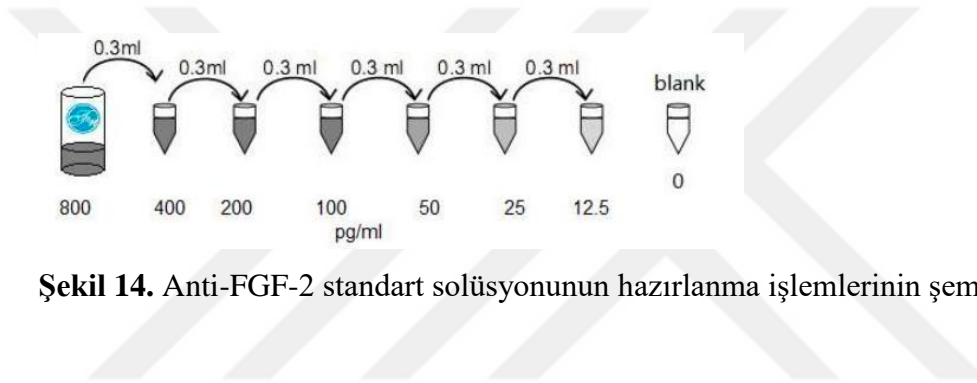
Şekil 12. Anti-TGF- β 1 ve Anti-VEGF standart solüsyonlarının hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi

Anti-BMP-2 standart solüsyonu için aynı işlemler 4000 pg/ml'den 62,5 pg/ml'ye kadar (4000-2000-1000-500-250-125-62,5 pg/ml) hazırlandı (Şekil 13).



Şekil 13. Anti-BMP-2 standart solüsyonunun hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi

Anti-FGF-2 standart solüsyonu için ise 800 pg/ml'den 12,5 pg/ml'ye (800-400-200-100-50-25-12,5 pg/ml) kadar olan dilüsyondaki solüsyonlar hazırlandı (Şekil 14).



Şekil 14. Anti-FGF-2 standart solüsyonunun hazırlanma işlemlerinin şematik gösterimi

3.3.3.3 Biotin-Belirleme Antikoru Hazırlanması

0,1 ml/kuyu x kuyu miktarı formülü ile çalışma solüsyonunun toplam hacmi hesaplandı. Biotin tespit antikoru, antikor seyreltme tamponu ile 1:100 oranında seyreltildi ve homojen bir hale gelmesi için karıştırılarak hazır hale getirildi.

3.3.3.4 HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

0,1 ml/kuyu x kuyu miktarı formülü ile çalışma solüsyonunun toplam hacmi hesaplandı. SABC solüsyonunun 1:100 oranında SABC tamponu ile seyreltildi ve iyice karıştırılarak hazır hale getirildi.

3.3.3.5 Çalışma Protokolü

- Standart ve örnekler kuyucuklara eklenmeden önce plate yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı

- 100 µl hacmindeki standart solüsyonları ve örnekler 96 kuyucuklu Anti-TGF-β1, Anti-BMP-2, Anti-FGF-2 ve Anti-VEGF antikorları ile kaplı plateler'e çift tekrar olacak şekilde mikropipetler yardımıyla taşındı ve 37°C'de 90 dakika süre ile inkübe edildi.
- Daha sonra her kuyucuğa 100 µl Biotin tespit antikör çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de 60 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı.
- Biotin ile inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra plate 3 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl SABC (HRP-Streptavidin Conjugate) çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi.
- Plate 5 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 90 µl TMB (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine) substratı eklendi ve 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi.
- 50 µl Durdurma çözeltisi her bir kuyucuğa karanlık bir odada mikropipetler yardımıyla eklendi ve hemen 450 nm absorbandsa ELISA mikro plate okuyucuda (Multiskan™ Fc Microplate Photometer, Thermo Scientific, Amerika) değerlendirmeye alındı.

3.3.4 Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

ELISA mikro plate okuyucudan alınan skorların istatistiksel analizi GraphPad (GraphPad Software, San Diego, Amerika) programı yardımıyla tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi kullanılarak tamamlandı. İstatistiksel kararlarda ($p<0,05$) seviyesi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

3.4 Deneyin *in vivo* Bölümündeki Çalışma Tekniği

3.4.1 Deneyin *in vivo* Bölümünde Kullanılacak Dişlerin Seçim Kriterleri, Hazırlanması ve Çalışma Gruplarına Dağılımı

Deneyde kullanılacak dişlerin çalışmaya alınmasında;

- Dişlerin maksiller tek köklü ve tek kanallı çürüksüz keser dişler olması
- Periodontal veya protetik sebeple çekilmiş dişler olması
- Radyolojik olarak diş köklerinde bir periapikal patoloji olmaması koşullarına dikkat edildi.

Çalışma 20 adet maksiller keser diş çekildikten sonra dişler rastgele olacak şekilde 10 ayrı gruba ayrıldı. Dişler çekimden hemen sonra %1,5'luk sodyum hipoklorit ile 5 dakika boyunca dezenfekte edildikten sonra su soğutması altında aeratör yardımıyla mine-sement sınırından horizontal yönde kesilerek kron kısımları uzaklaştırıldı. Kök parçalarının apeksten koronale olan 3 mm'lik kısımları da su soğutması altında aeratör yardımıyla uzaklaştırıldı. Kök kanalları içindeki pulpa dokusu kanal eğeleri yardımıyla uzaklaştırıldı ve dişler tekrardan 5 dakika boyunca %1,5'luk sodyum hipoklorit ile dezenfekte edildi. Dezenfeksiyonu tamamlanan örnekler uzunluğu 2 mm olacak şekilde her kök parçasından su soğutması altında aeratör yardımıyla 2 adet kök parçası elde edilmiştir. Toplamda elde edilen 40 örnek 10 gruba rastgele olarak ayrılmıştır. Tüm kök dentinlerinin ait oldukları gruplarda yapılacak olan uygulamalar öncesinde dar çapa sahip kısımlarına 1 mm kalınlığında olacak şekilde MTA uygulaması yapıldı. MTA materyalinin 15 dakika boyunca sertleşmesi beklendikten sonra gruplarda belirtilen uygulamalar yapıldı.

Çalışmada 10 farklı grup (8 deney 2 kontrol) bulunmakta olup bu gruplarda yapılan uygulamalar sırasıyla;

Grup 1 (MKH ekimi ve asit uygulaması yapılmayan Kontrol grubu): Asit ile yıkama yapılmadan, içerisine sadece PLG doku iskelesi yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 2 (MKH ekimi yapılmayan EDTA grubu): %17 EDTA ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine sadece PLG doku iskelesi yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 3 (MKH ekimi yapılmayan Sitrik Asit grubu): %10 Sitrik asit ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine sadece PLG doku iskelesi içeren 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 4 (MKH ekimi yapılmayan Fitik Asit grubu): %1 Fitik asit ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine sadece PLG doku iskelesi içeren 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 5 (MKH ekimi yapılmayan Fosforik Asit grubu): %37 Fosforik asit ile 30 saniye asit uygulaması yapıldıktan sonra içerisine sadece PLG doku iskelesi içeren 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 6 (MKH ekimi yapılan, asit uygulaması yapılmayan kontrol grubu): Asit ie yıkama yapılmadan, içerisine MKH + PLG doku iskelesi kombinasyonu yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 7 (MKH ekimi yapılan EDTA grubu): %17 EDTA ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine MKH + PLG doku iskelesi kombinasyonu yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 8 (MKH ekimi yapılan Sitrik Asit grubu): %10 Sitrik asit ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine MKH + PLG doku iskelesi kombinasyonu yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 9 (MKH ekimi yapılan Fitik Asit grubu): %1 Fitik asit ile 5 dakika yıkama yapıldıktan sonra, içerisine MKH + PLG doku iskelesi kombinasyonu yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

Grup 10 (MKH ekimi yapılan Fosforik Asit grubu): %37 Fosforik asit ile 30 saniye asit uygulaması yapıldıktan sonra, içerisine MKH + PLG doku iskelesi kombinasyonu yerleştirilen 4 adet insan dişi kök dentini

3.4.2 PLG Doku İskelesinin Hazırlanması

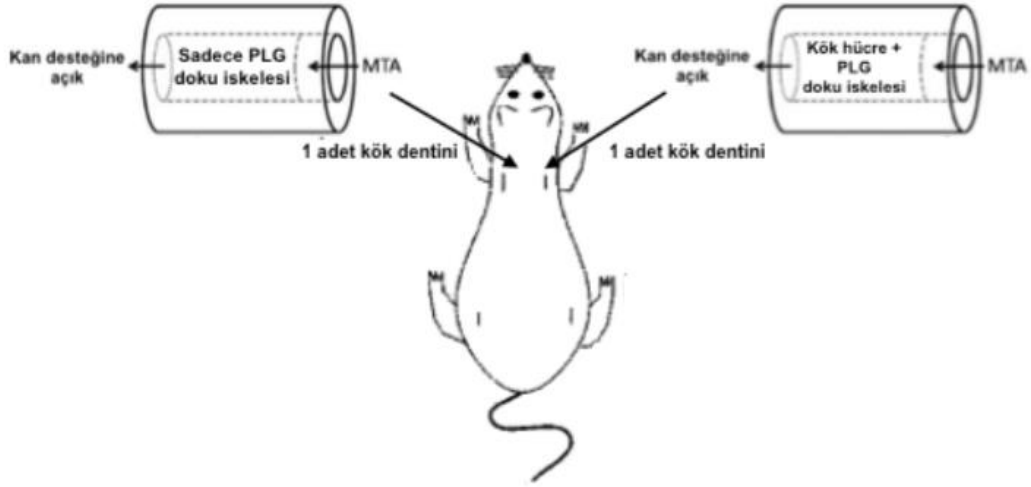
100 mg ağırlığındaki PLG mikropartikülleri (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) 4 ml kloroform içinde çözüldü ve emülsiyon elde edildi. Kloroformun evaporasyonu sonucu jel kıvamına gelen nanopartikül süspansiyonu deneylerde kullanılmıştır (Derman, Kızılbey, & Akdeste, 2013).

3.4.3 Hazırlanan Kök Dentinlerinin Farelerin Dorsumlarına Yerleştirilmesi

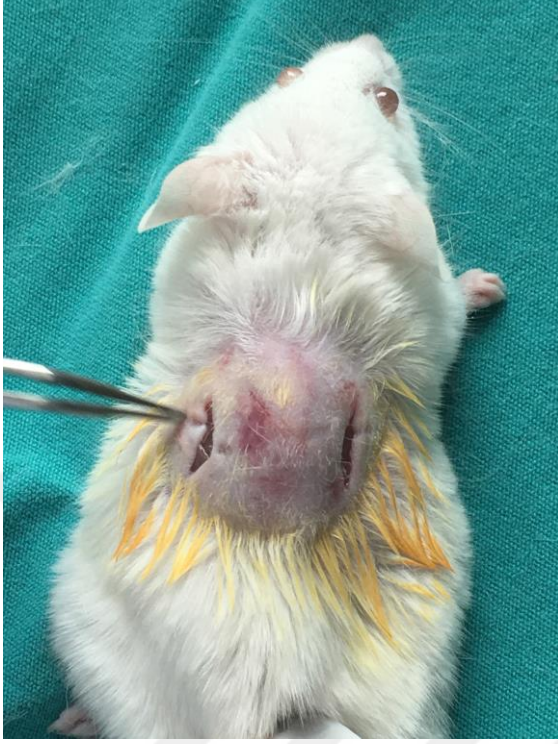
Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde 20 adet, ağırlıkları 20±5 gr arasında değişen 8 haftalık erişkin erkek

Balb/c fareler kullanılarak yapıldı. Fareler 3 gün boyunca adaptasyon ve sağlık problemi yaşamaması amacıyla bekletildi. Deneyler süresince hayvanlar stabil koşullar altında (22⁰C sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu. Hayvanların beslenmeleri kuru pelletler ve çeşme suyu ile sağlandı.

Deney farelerine genel anestezi altında operasyon yapılabilmesi için 75 mg/kg Ketamin-Hidroklorür ve 10 mg/kg Ksilazin intramuskuler olarak uygulandı. Her deney faresinin sağ ve sol dorsum bölgesine 1 cm'lik insizyonlar yapılarak cepler oluşturuldu. Oluşturulan ceplere karşılıklı gruplardan birer kök dentini yerleştirildi (Şekil 15-17). İnsizyon bölgesi rezorbe olabilen sütün materyali ile primer olarak kapatıldı ve histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için 2 ay boyunca beklenildi.



Şekil 15. Farelerin dorsumuna yerleştirilen kök dentinlerinin şematik gösterimi



Şekil 16. Farelerin dorsumlarına yapılan insizyonlar



Şekil 17. Farelerin dorsumuna kök dentinlerinin yerleştirilmesi

3.4.4 Deney Farelerinin Sakrifikasyonu, Kök Dentinlerinin Geri Toplanması, Fiksasyonu ve Dekalsifikasyonu

Deney fareleri dekapitasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildikten sonra sağ ve sol dorsum bölgelerine yerleştirilmiş olan kök dentinleri çıkarıldı. Çıkarılan kök dentinleri %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 72 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra EDTA solüsyonu içerisinde (0,1 M fosfat tamponda çözünmüş, pH:7.1) +4°C'de, solüsyon iki günde bir değiştirilerek, iki ay süreyle dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası kök dentinleri distile su ile yıkandı ve dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60'dan %80'e, 1'er saat %90'dan %100'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından şeffaflaştırma amacıyla 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve 30'ar dakika iki kez ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp, 60'ar dakika iki kez parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 1).

Tespit	% 10 Formalin	48 saat
Tespit Solüsyonunun Uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dekalsifikasyon	EDTA	1 ay
Dehidratasyon	% 60 Alkol	½ saat
	% 70 Alkol	½ saat
	% 80 Alkol	½ saat
	% 90 Alkol	1 saat
	% 95 Alkol	1 saat
	% 100 Absolü alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol: Ksilen (1:1)	15 dakika
	Ksilen	1/2 saat
	Ksilen	1/2 saat
İnfiltrasyon (60°C etüvde)	Ksilen-Parafin (1:1)	15 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Tablo 1. Dekalsifikasyon ve Parafin takip protokolü

3.4.5 Histokimyasal Boyama

3.4.5.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyaması

Parafin bloklara gömülü olan kök dentinlerinden Rotary mikrotom cihazı (RM 2135, Leica, Almanya) yardımıyla sagittal yönde 5 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon amacıyla bir gece 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra, 30'ar dakika boyunca iki değişim ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon amacıyla 2'şer dakika %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler, 5 dakika akar su altında yıkandı. Kesitlerin 2 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire, İngiltere) ile boyanmasının ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için tüm kesitler 5 dakika akar suda yıkandı ve asit-alkolde 1-2 saniye süreyle diferansiye edilip, 5 dakika akar suda tekrar yıkandı. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire, İngiltere) ile 30 saniye boyama ve 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla 1'er dakika %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler, şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 2). Preparatlar kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Japonya) ışık mikroskopunda (BX-43, Olympus, Japonya) deneyimli bir histolog gözü ile kör yöntemle boyamanın şiddetine göre +1 ve +5 arası yapılan değerlendirmede bağ dokusu oluşumu, ortama gelen inflamasyon hücreleri ve damarlanma incelendi ve gruplar arasındaki farklılıklar histolojik olarak değerlendirildi.

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Alkol	2 dakika
	% 80 Alkol	2 dakika
	% 70 Alkol	2 dakika
	% 60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiasyon	Asit-alkol	1-2 saniye
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Eozin	30 saniye
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 Alkol	1 dakika
	% 95 Alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 2. Hematoksilen Eozin boyaması parafin takip protokolü

3.4.5.2 Masson Trikrom (MT) Boyama

Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki seri kesitler kollagen yapının histolojik değerlendirilmesi için Masson Trikrom (HT15, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) ile boyandı. Kesitler öncelikle 1 gece 60°C etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika boyunca iki değişim ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon amacıyla 2'şer dakika %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler, 5 dakika akar su altında yıkandı. Bouin solüsyonunda 15 dakika mordantlama işlemi yapıldı. Kesitlerin akar suda 5 dakika yıkanmasının ardından, 10 dakika Weigert Demirli Hematoksilen ile hücre çekirdeklerinin boyanması sağlandı. Tekrar 10 dakika akar suda yıkanan örnekler Biebrich Scarlet-Asit Fuksin solüsyonunda 5 dakika bekletildi ve 10 dakika distile suda yıkandı. Fosfotungstik/Fosfomolibdik asit ile 5 dakika muamelenin ardından Anilin mavisi ile 5 dakika boyanma gerçekleştirildi. Yıkama yapmadan 2 dakika % 1'lik asetik asitten geçirilen kesitler 5 dakika distile suda yıkamayı takiben dehidrate edildi. Bunun için %96 alkolden hızlıca geçildi ve iki değişim %100 alkolde 3'er dakika bekletildi. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 3). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Japonya) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japonya) görüntüleri alındı ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Deneyimli bir histolog gözü ile kör yöntemle boyamanın şiddetine göre +1 ve +5 arası yapılan değerlendirmede bağ dokusu oluşumu, ortama gelen inflamasyon hücreleri ve damarlanma incelendi.

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Alkol	2 dakika
	% 80 Alkol	2 dakika
	% 70 Alkol	2 dakika
	% 60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Mordantlama	Bouin Solüsyonu	15 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Weigert Demirli Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Biebrich Scarlet-Asit Fuksin	5 dakika
Yıkama	Distile Su	10 dakika
Boyama	Fosfotungstik/ Fosfomolibdik Asit	5 dakika
Boyama	Anilin mavisi	5 dakika
Mordantlama	% 1'lik Asetik asit	2 dakika
Yıkama	Distile Su	5 dakika
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Hızlı geçilir.
	% 100 Alkol	3 dakika
	% 100 Alkol	3 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 3. Masson-Trikrom boyaması parafin takip protokolü

3.4.5.3 Alizerin Kırmızısı Boyaması

Bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki seri kesitlerin bir kısmı kalsifikasyonu değerlendirmek amacıyla Alizerin Kırmızısı (A5533, Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) ile boyandı. Kesitler bir gece 60°C etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika boyunca iki değişim ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon amacıyla 2'şer dakika %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler, 5 dakika distile suda yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere %2'lik Alizerin Kırmızısı boya solüsyonu ile 15 dakika boyama yapıldı. Daha sonra örnekler dehidratasyon amacıyla 5'er dakika %100 aseton ve 1:1 Aseton:Ksilene'den geçirildi ve şeffaflaştırma işlemi için 30'ar dakika iki değişim ksilene tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 4). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Japonya) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japonya) görüntüler alındı ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Deneyimli bir histolog gözü ile kör yöntemle boyamanın şiddetine göre +1 ve +5 arası yapılan değerlendirmede kalsifik doku oluşumu incelendi.

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Alkol	2 dakika
	% 80 Alkol	2 dakika
	% 70 Alkol	2 dakika
	% 60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	5 dakika
Boyama	%2'lik Alizarin kırmızısı	15 dakika
Dehidratasyon	% 100 Aseton	5 dakika
	1:1 Aseton:Ksilen	5 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 4. Alizarin Kırmızısı boyaması parafin takip protokolü

3.4.6 İndirekt İmmünohistokimyasal Boyama

3.4.6.1 İndirekt İmmünohistokimyasal Boyamalarda Kullanılan Belirteçler

DSP: Dentin ekstrasellüler matriksinde bulunan non-kollagenöz proteinlerden biri olup yapılan çalışmalarda odontoblastlar tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. Dişe özgü bir protein olduğu gösterilmekle beraber kemik dokusunda da eksprese edildiği rapor edilmiştir (Prasad, Butler, & Qin, 2010).

Enamelisin: Mine gelişiminin erken evrelerinde eksprese edilen dişe özgü bir matriks metalloproteinazdır. Hem ameloblastlar hem de odontoblastlar tarafından eksprese edildiği rapor edilmiştir (Begue-Kirn, Krebsbach, Bartlett, & Butler, 1998).

Osteonektin: Kemiğe özgü bir protein olup kemik trabeküllerinde lokalize olduğu rapor edilmiştir. Sıkıkla kemik matriksinde bulunmakta olup antikorları kemikle ve daha nadir olarak denin ile reaksiyona girdiği de bilinmektedir (Orsini ve ark., 2012).

Osteokalsin: Osteoblast farklılaşmasının geç evrelerinde salgılanan kemik dokusuna özgü bir proteindir. Osteoblastik ve osteoklastik aktivitede görev alan bu non-kollagenöz protein osteoblastlar tarafından eksprese edilir ve odontoblastik farklılaşmada yüksek oranda eksprese edildiği rapor edilmiştir (Orsini ve ark., 2012).

BMP-2: Osteoindüktif özellik taşıyan ve hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlayan, kemik ve kıkırdak gelişiminde önemli bir role sahip başlıca proteinlerden biridir. Yapılan çalışmalar dentinden salınımı sonucu farklılaşmış kök hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını indüklediğini rapor etmişlerdir (Casagrande ve ark., 2010; D. Chen, Zhao, & Mundy, 2004).

Ki67: Hücre çoğalmasının belirteçlerinden biri olan Ki-67, hücre bölünme döngüsünün tüm fazlarında mevcut olan bir proteindir. Hücre çoğalma döngüsünün aktif fazlarında olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir proliferasyon belirtecidir (Scholzen & Gerdes, 2000).

VEGF: Damar oluşumunun ve gelişimini sağlayan hücreler tarafından sekrete edilen bir proteindir. Damar oluşumunun ve gelişiminin belirteci olarak kullanılmaktadır (Scholzen & Gerdes, 2000)

İndüklenebilir Nitröz Oksit Sentaz (i-NOS): İmmün ve enflamatuvar olaylarda yüksek konsantrasyonda nitröz oksit üretiminde görevli temel bir enzimdir. Dinlenme halinde bulunun hücrelerde bulunmadığı da rapor edilmiştir (Qidwai & Jamal, 2010).

Endotelyal Nitröz Oksit Sentaz (e-NOS): Damarların endotel yapısında nitröz oksit üretiminden sorumlu aynı zamanda hücre çoğalması, plateletlerin agregasyonu, lökositlerin adhezyonunda görev alan bir enzimdir (Shu ve ark., 2015).

3.4.6.2 İmmünohistokimyasal Boyama Protokolleri

Alınan kesitler immünohistokimyasal boyamalar amacıyla bir gece 60 C°'lik etüvde tutuldu. Daha sonrasında 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, Fransa) ile sınırlandırılan ve % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA, ABD) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-DSP (MABT37, Millipore, Massachusetts, ABD), anti-Osteokalsin (ab13420, Abcam, Cambridge, UK), anti-Enamelisin (LS-C100449-400, LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, ABD), anti-Osteokalsin (ab13420, Abcam, Cambridge, UK), anti-Osteonektin (ab93876, Abcam, Cambridge, UK), anti-Ki-67 (1-800-799-9499, Biocare Medical, CA, ABD), anti-BMP-2 (NBP-1-52901, Novus Biologicals, CO, ABD), anti-ki67 (1-800-799-9499, Biocare Medical, CA, ABD), anti-VEGF (ab9546, Abcam, Cambridge, UK), anti-iNOS (sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD), anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043, Invitrogen-Histostain Plus Bulk Kit, CA, ABD) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Almanya) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, ABD) ile kapatıldı (Tablo 5). Işık mikroskop altında immünohistokimyasal boyanmalar incelendi ve boyanmanın yoğunluğu zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi. Örneklerin fotoğrafları SC50 Olympus kamera (Almanya) ile çekildi.

Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen II	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 Alkol	2 dakika
	% 80 Alkol	2 dakika
	% 70 Alkol	2 dakika
	% 60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
	PBS	10 dakika
Havuzcuk Oluşturma	Dako pen	
	Tripsin 37°C etüvde	15 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Peroksidaz Blok	% 3 Hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Bloklama	Non-immün bloklama solüsyonu	1 saat
Primer Antikorlar		18 saat+4°C nemli
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Sekonder Antikor	Biyotinle işaretli sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
	Streptavidin	30 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Boyama	DAB (Diamino Benzidine)	10 dakika
Yıkama	Distile su	3×5 dakika
Artalan Boyama	Mayer's Hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Kapama	Entellan	
İnceleme	Işık mikroskobu	

Tablo 5. İmmunohistokimya boyamaları için parafin takip protokolü

3.4.6.3 Terminal Deoksinükleotidil-Transferaz Aracılı Deoksiüridin Trifosfoat Nick-End İşaretleme (TUNEL) Boyaması

Doku içindeki DNA kırıklarının tespiti ve apoptozun belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan boyama yöntemidir (Elmore, 2007). Bundan dolayı çalışmamızdaki apoptik hücre ölümlerinin belirlenmesinde bu belirteçten yararlanıldı. Alınan 5 µm'lik kesitler bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak 10 dakika distile suda, daha sonra üç defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Dakopen (IM3580, Immunotech, Fransa) ile sınırlandırılan kesitlere 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20 µg/ml Proteinaz-K, 37°C'de 15 dakika uygulandı. Kesitler 5'şer dakika üç kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra, yeniden 5'şer dakika üç kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C'de 1 saat, plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Bu sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dakika bekletildikten sonra, 1'er dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından Anti-dioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dakika muamele edilen örnekler, 5'şer dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB ile 10 dakika boyama yapıldı ve üç kez 5'er dakika distile su ile yıkandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Almanya) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler, entellan (AML060, Scytek, Logan, Utah, ABD) ile kapatıldı (Tablo 6). Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı ve ortalamalar istatiksel olarak değerlendirildi.

Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen I	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen II	30 dakika
Rehidratasyon	% 95-%80-%70-%60 Alkol	2'şer dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
	PBS	3×5 dakika
Havuzcuk oluşturma	Dakopen	
	Proteinaz (37°C etüvde)	15 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Peroksidaz Blok	% 3 Hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Equilibration buffer		5 dakika
Enzim	TdT enzimi (37°C etüvde)	1 saat
Stop Wash Buffer		10 dakika
Yıkama	PBS	3×1 dakika
Anti-dioksigenin	Peroksidaz konjugatı	30 dakika
Yıkama	PBS	3×5 dakika
Boyama	DAB	10 dakika
Yıkama	Distile su	3×5 dakika
Artalan Boyama	Mayer's hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Kapama	Entellan	

Tablo 6. TUNEL boyama protokolü

3.4.7 Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi

Histolog gözüyle H&E boyaması ile grupların morfolojisine genel bakışta yeni oluşumun pulpaya benzerliği, dentin altı hücrenel yapılanmanın ve merkezi hücrenel yapılanmanın düzeni ve görüntüsü 1-5 arası skorlamayla işaretlendi. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi (Numata ve ark., 2013). Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi. Boyanma şiddeti ise 1+ = boyanma yok veya soluk; 2+ = orta dereceli; 3+ = yoğun olarak belirlendi. şiddetin yüzdeleri 40 büyütmeli alanlarda toplam hücrenin oranı olarak saptandı. Değerlendirmeler iki histolog tarafından kr olarak yapıldı. Daha sonra (1 x yüzdesi) + (2 x yüzdesi) + (3 x yüzdesi) formülü ile toplam skor hesaplandı. Sayılan beş alanın ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Elde edilen sonuçlar 100 ile 350 arasında değişen aralıkta skorlandı. Verilerin karşılaştırmaları tek GraphPad (GraphPad Software, San Diego, Amerika) programı yardımıyla tek yönlü varyans analizi (One Way-ANOVA) istatistik testiyle yapıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. Bulgular

4.1 Araştırmanın *in vitro* Bölümündeki Bulgular

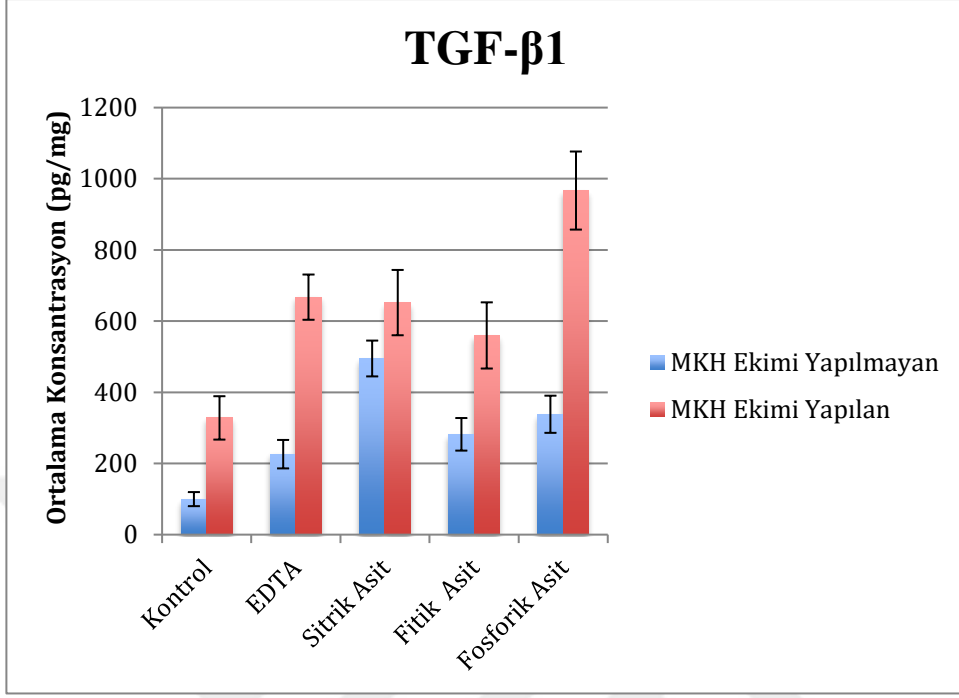
Çalışmamızın ana unsuru olan büyüme faktörlerinden elde ettiğimiz bulguları ayrı ayrı ele aldığımızda;

4.1.1 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki TGF- β 1 Bulguları

ELISA yöntemi ile TGF- β 1 miktarlarına bakıldığında MKH ekimi yapılmayan gruplar içinde sitrik asit grubunun en yüksek salınımına yol açtığı görüldü ve sonuçlar kontrol, EDTA ve fitik asit gruplarıyla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken ($p < 0,05$) fosforik asit grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Fosforik asit grubuyla fitik asit ve EDTA grupları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) görülmemiş olmasına rağmen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

MKH ekimi yapılan gruplara bakıldığında en yüksek TGF- β 1 salınımı fosforik asit grubunda görülmüş olup diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). EDTA, sitrik ve fitik asit grupları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) görülmemiş olmasına rağmen bu gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkiler olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Grupların kendi içlerindeki karşılaştırmalara bakıldığında ise tüm gruplarda MKH ekimi sonrası dramatik ve anlamlı düzeylerde bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Grafik 2, Tablo 7).



Grafik 2. Grupların TGF- β 1 salınımı açısından karşılaştırılması

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	99,8	19,7
MKH (-) EDTA	226,1	39,9
MKH (-) Sitrik Asit	495	50,3
MKH (-) Fitik Asit	281,9	45,7
MKH (-) Fosforik Asit	338,2	52,2
MKH (+) Kontrol	328	60,9
MKH (+) EDTA	667,3	63,5
MKH (+) Sitrik Asit	652	91,7
MKH (+) Fitik Asit	559,7	92,9
MKH (+) Fosforik Asit	966,8	109,7

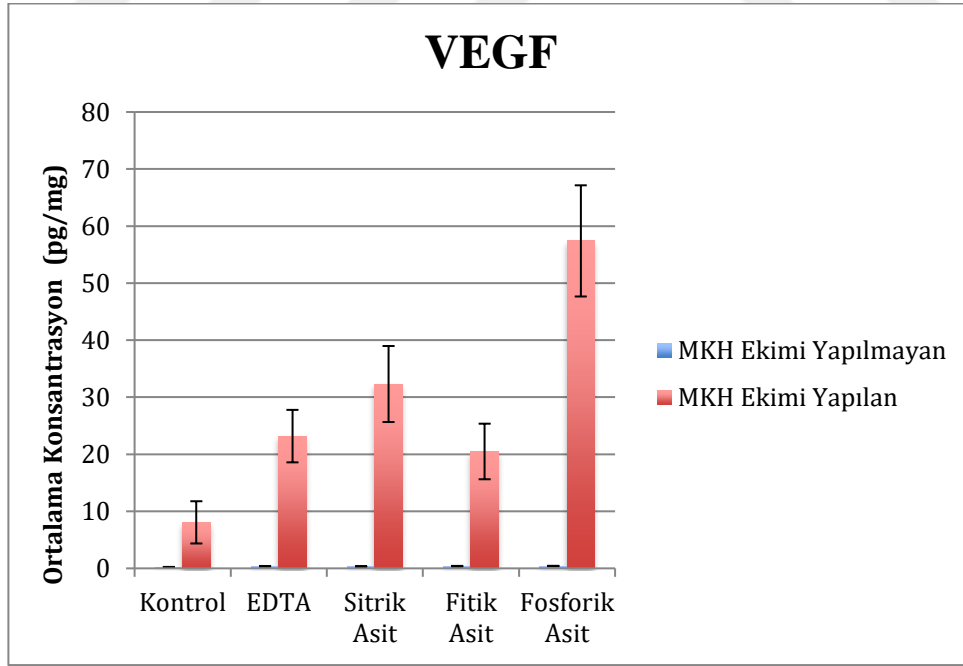
Tablo 7. Grupların TGF- β 1 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri

4.1.2 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki VEGF Bulguları

ELISA yöntemi ile VEGF miktarlarına bakıldığında MKH ekimi yapılmayan gruplarda çok eser miktarlarda VEGF salınımı olduğu görülmekle beraber gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

MKH ekimi yapılan gruplara bakıldığında ise fosforik asit grubunun en yüksek VEGF salınımına neden olduğu görülürken diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ilişkiler saptanmıştır ($p<0,05$). EDTA, sitrik asit ve fitik asit grupları arasında anlamlı olmayan düzeyde ($p>0,05$) ilişkiler saptanmış olmasına rağmen bu grupların kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha fazla VEGF salınımına neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Grupların kendi içlerindeki karşılaştırmalara bakıldığında ise tüm gruplarda MKH ekimi sonrası dramatik ve anlamlı düzeylerde bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 3, Tablo 8).



Grafik 3. Grupların VEGF salınımı açısından karşılaştırılması

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	0,22	0,02
MKH (-) EDTA	0,36	0,05
MKH (-) Sitrik Asit	0,32	0,04
MKH (-) Fitik Asit	0,37	0,06
MKH (-) Fosforik Asit	0,40	0,03
MKH (+) Kontrol	8,06	3,70
MKH (+) EDTA	23,18	4,60
MKH (+) Sitrik Asit	32,31	6,66
MKH (+) Fitik Asit	20,48	4,87
MKH (+) Fosforik Asit	57,40	9,74

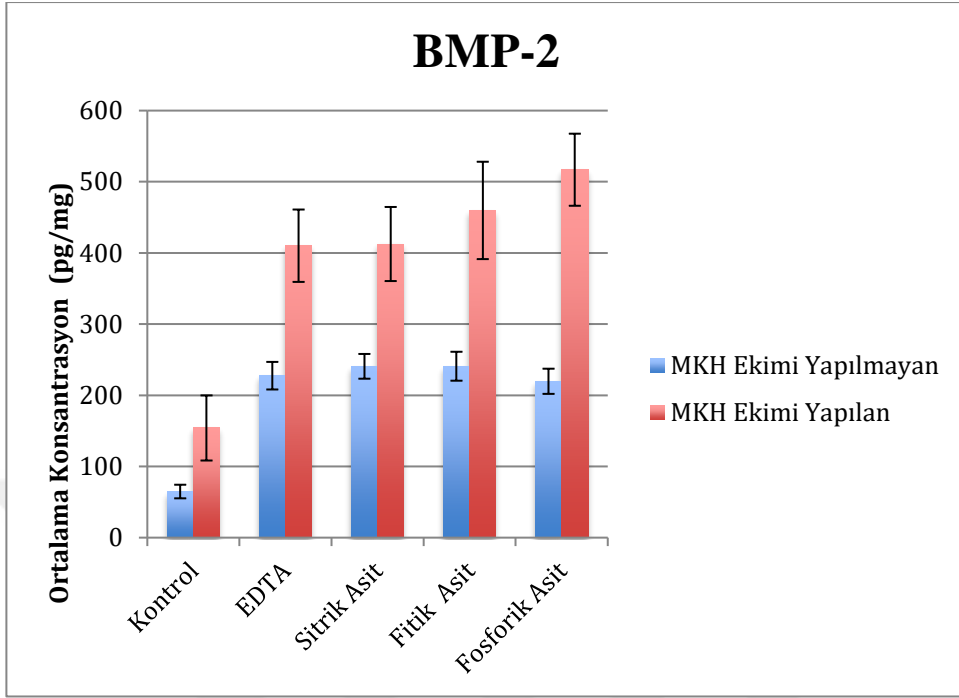
Tablo 8. Grupların VEGF salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri

4.1.3 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki BMP-2 Bulguları

ELISA yöntemi ile BMP-2 miktarlarına bakıldığında MKH ekimi yapılmayan gruplarda en çok salınım fitik asit grubunda gözlenmesine rağmen asit grupları arasında anlamlı düzeyde bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,05$). Asit grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,05$).

MKH ekimi yapılan gruplara bakıldığında ise benzer şekilde asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde ($p>0,05$) ilişkiler görülmesine rağmen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılıklar gözlenmiştir ($p<0,05$).

Grupların kendi içlerindeki karşılaştırmalara bakıldığında ise tüm gruplarda MKH ekimi sonrası dramatik ve anlamlı düzeylerde bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 4, Tablo 9).



Grafik 4. Grupların BMP-2 salınımı açısından karşılaştırılması

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	64,8	9,5
MKH (-) EDTA	227,5	19,3
MKH (-) Sitrik Asit	240,7	17,3
MKH (-) Fitik Asit	240,8	20,3
MKH (-) Fosforik Asit	219,6	17,6
MKH (+) Kontrol	154,1	45,7
MKH (+) EDTA	410,1	50,8
MKH (+) Sitrik Asit	412,5	52
MKH (+) Fitik Asit	459,7	68,3
MKH (+) Fosforik Asit	516,9	50,6

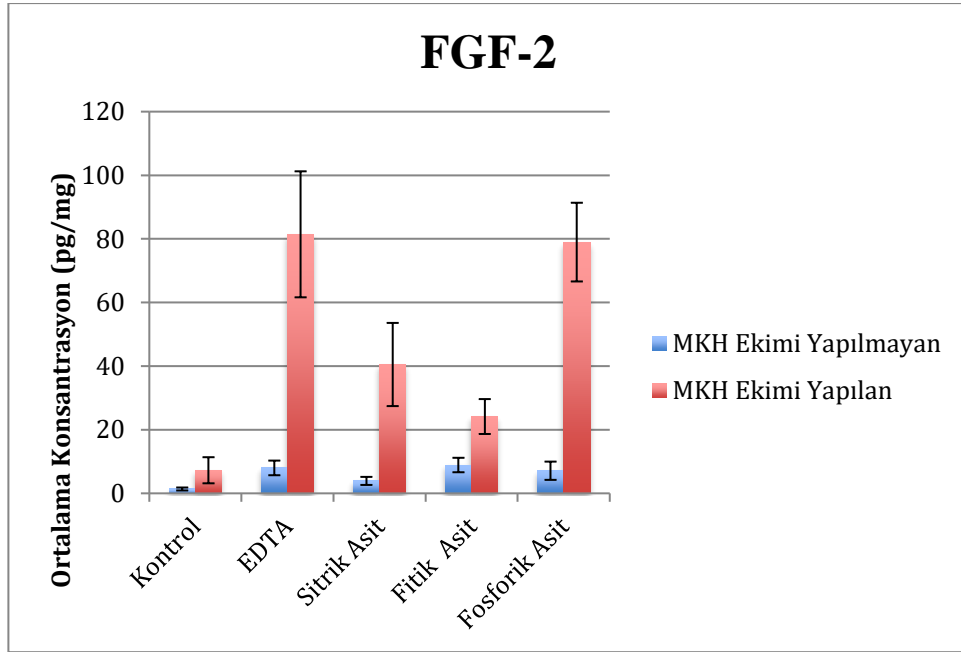
Tablo 9. Grupların BMP-2 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri

4.1.4 MKH Ekimi Yapılan ve Yapılmayan Gruplardaki FGF-2 Bulguları

ELISA yöntemi ile FGF-2 miktarlarına bakıldığında MKH ekimi yapılmayan gruplarda çok eser miktarlarda FGF-2 salınımı olduğu görülmekle beraber gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

MKH ekimi yapılan gruplara bakıldığında ise EDTA ve fosforik asit gruplarının en yüksek FGF-2 salınımına neden olduğu görülürken birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki varken ($p>0,05$) diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Sitrik asit ve fitik asit grupları arasında anlamlı olmayan düzeyde ($p>0,05$) ilişki saptanmış olmasına rağmen sitrik asit grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki görülmüştür ($p<0,05$). Fitik asit grubu ile kontrol grubu arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Grupların kendi içlerindeki karşılaştırmalara bakıldığında ise tüm gruplarda MKH ekimi sonrası dramatik ve anlamlı düzeylerde bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 5, Tablo 10).



Grafik 5. Grupların FGF-2 salınımı açısından karşılaştırılması

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	1,3	0,4
MKH (-) EDTA	7,9	2,3
MKH (-) Sitrik Asit	3,9	1,2
MKH (-) Fitik Asit	8,9	2,2
MKH (-) Fosforik Asit	7,1	2,8
MKH (+) Kontrol	7,2	4,1
MKH (+) EDTA	81,4	19,8
MKH (+) Sitrik Asit	40,5	13
MKH (+) Fitik Asit	24,1	5,4
MKH (+) Fosforik Asit	78,9	12,3

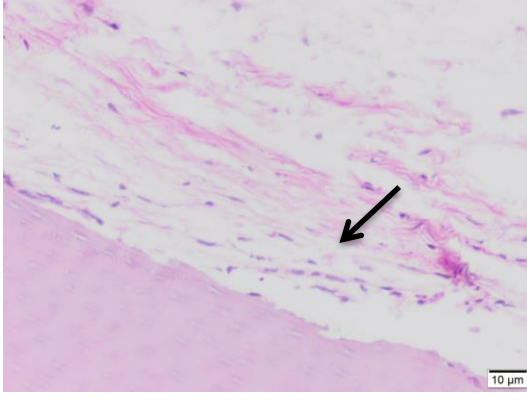
Tablo 10. Grupların FGF-2 salınımı için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2 Araştırmanın *in vivo* Bölümündeki Bulgular

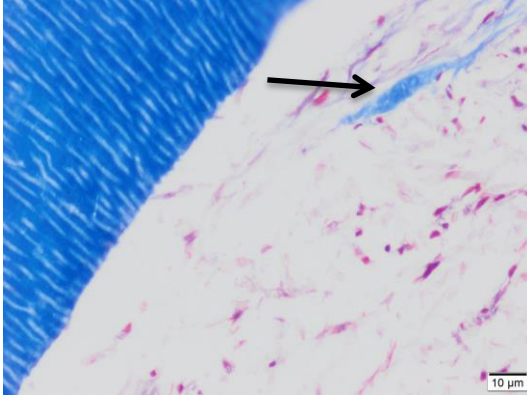
4.2.1 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal İncelemeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

4.2.1.1 MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu Bulguları

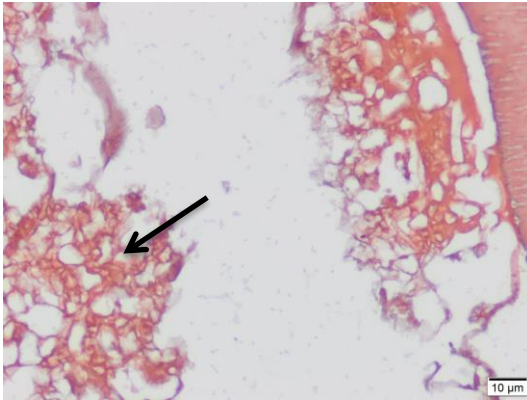
MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanılmadı. Dentin duvarlarında çok az sayıda hücre görülmüş olup bunların düzensiz olduğu saptanmıştır. Kanal duvarlarında organize olmamış hücre topluluklarının olduğu görülmekle beraber bu dokuların çoğunlukla bağ dokusu olduğu düşünülmektedir (Şekil 18). MT boyamalarında ise yer yer kollagen dokunun var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 19). Alizarin kırmızısı ile yapılan boyamalarda düşük yoğunlukta olsa yeni oluşan kalsifik dokular görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 18. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

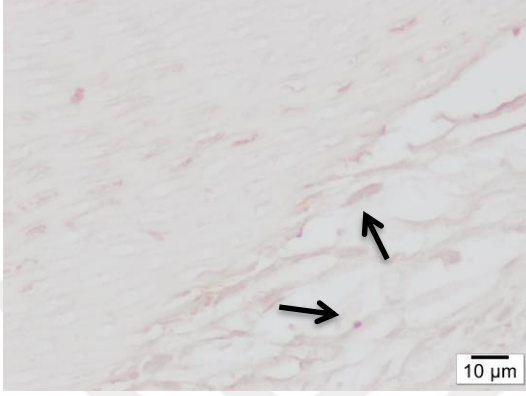


Şekil 19. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol grubundaki MT boyamalarındaki kollagen dokusunun görüntüsü

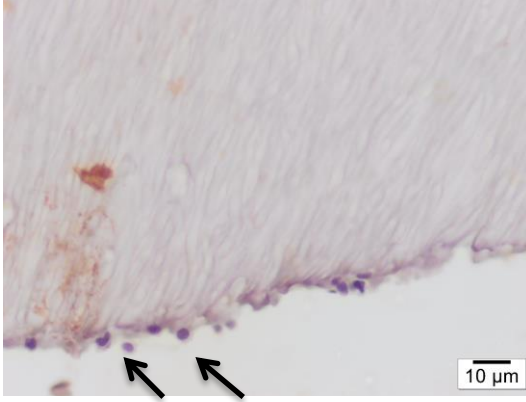


Şekil 20. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol grubundaki Alizarin kırmızı boyamalarındaki kollagen dokusunun görüntüsü

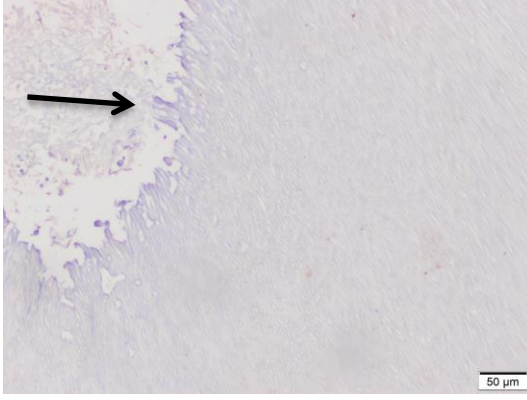
MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubundan immünohistokimyasal boyalarla elde edilen bulgulardan; Anti-Enamelisin (Şekil 21), Anti-DSP (Şekil 22), Anti-Osteokalsin (Şekil 23), Anti-Osteonektin (Şekil 24), Anti-BMP-2 (Şekil 25) boyaları ile görüntüler:



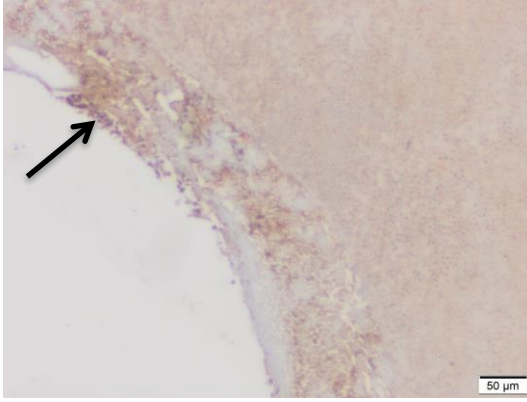
Şekil 21. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



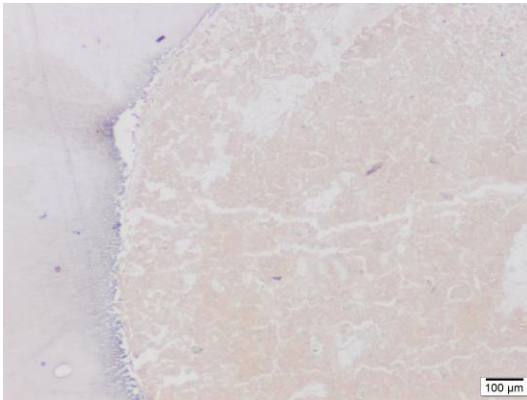
Şekil 22. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 23. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

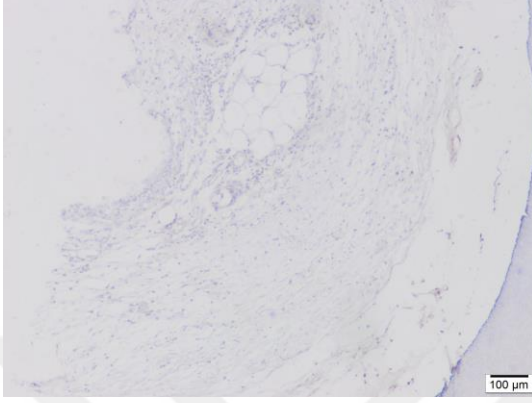


Şekil 24. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

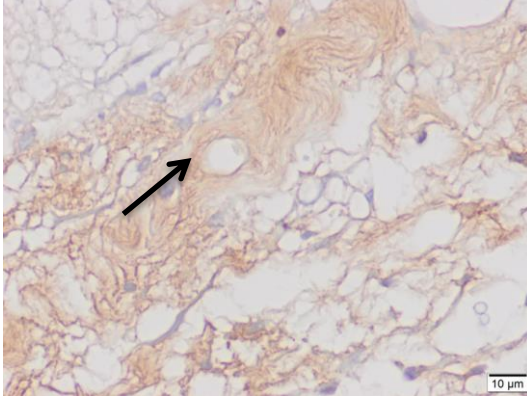


Şekil 25. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 26) ve Anti-VEGF (Şekil 27) boyamaları:

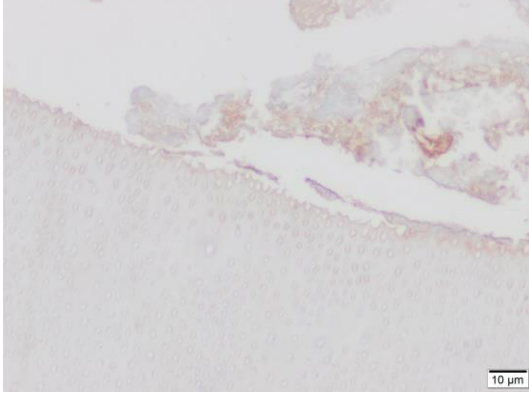


Şekil 26. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

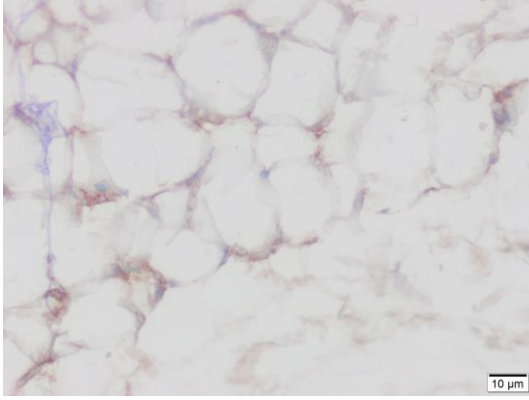


Şekil 27. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 28), Anti-iNOS (Şekil 29) ve TUNEL (Şekil 30) boyamalarının görüntüleri



Şekil 28. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



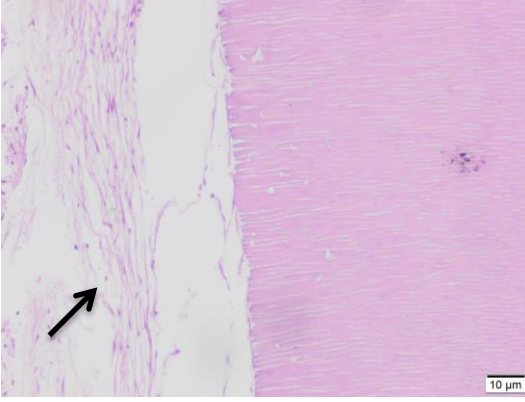
Şekil 29. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



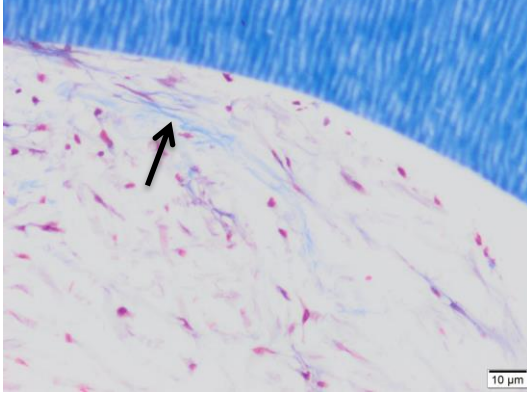
Şekil 30. MKH Uygulaması Yapılmayan Kontrol Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.2 MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu Bulguları

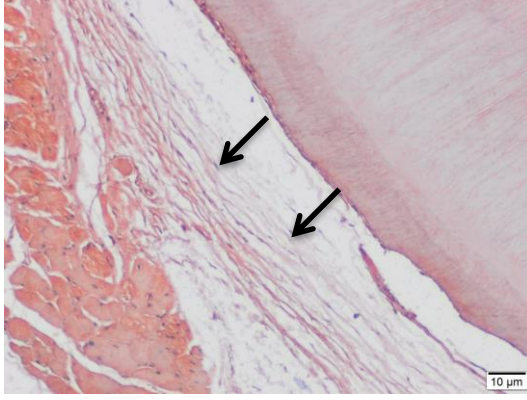
MKH uygulaması yapılan kontrol grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanılmamakla beraber MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubuna oranla daha fazla hücre ve daha yoğun bir doku formasyonu gözlenmiştir. MKH uygulaması yapılmayan dentin duvarlarında az sayıda hücre izlenmesine karşın MKH uygulaması yapılan kontrol grubunda daha fazla hücre olduğu görülmüştür. Hücrelerin genellikle fibroblast benzeri hücreler olabileceği düşünülmektedir (Şekil 31). MT boyamalarında ise yeni oluşan kollagen dokusu gözlenmiştir (Şekil 32). Alizarin kırmızısı boyaması ile yeni oluşan dokunun kalsifikasyona düzeyi saptanmıştır (Şekil 33).



Şekil 31. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

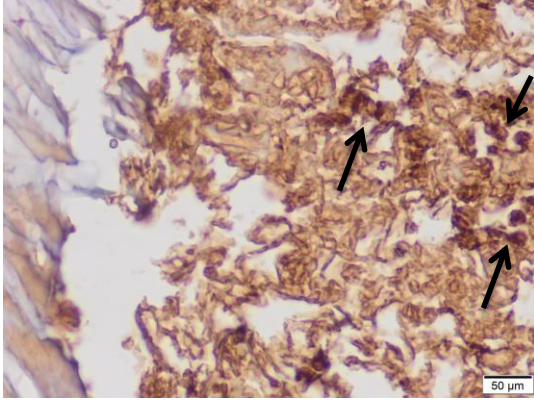


Şekil 32. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü

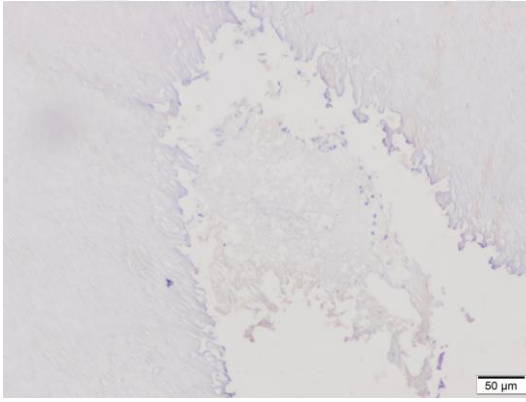


Şekil 33. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

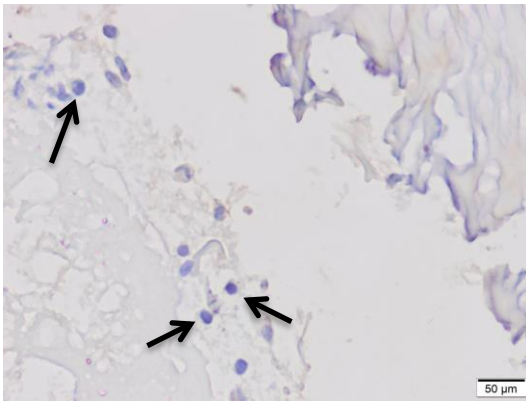
MKH uygulaması yapılan kontrol grubundan immünohistokimyasal boyalarla elde edilen bulgulardan; Anti-Enamelisin (Şekil 34), Anti-DSP (Şekil 35, 36), Anti-Osteokalsin (Şekil 37), Anti-Osteonektin (Şekil 38, 39) ve Anti-BMP-2 (Şekil 40) boyaları ile alınan görüntülerde az sayıda hücrenin bu boyalar ile az miktarda boyandığı görüldü.



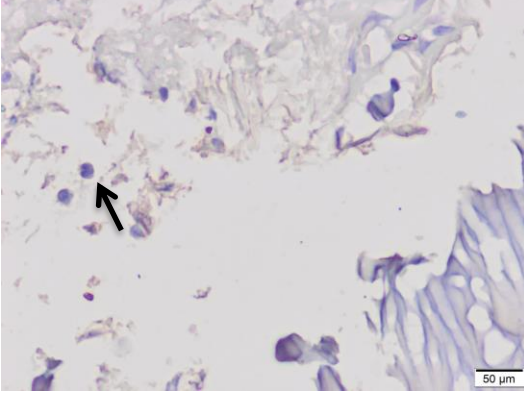
Şekil 34. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



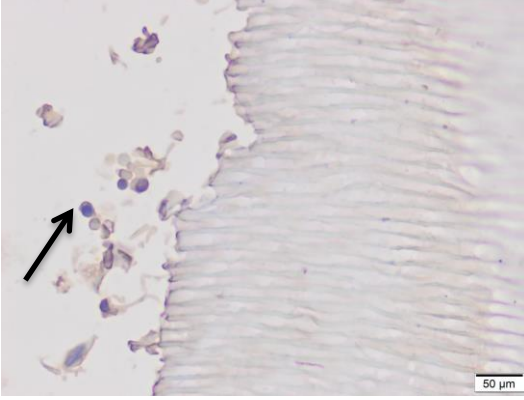
Şekil 35. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



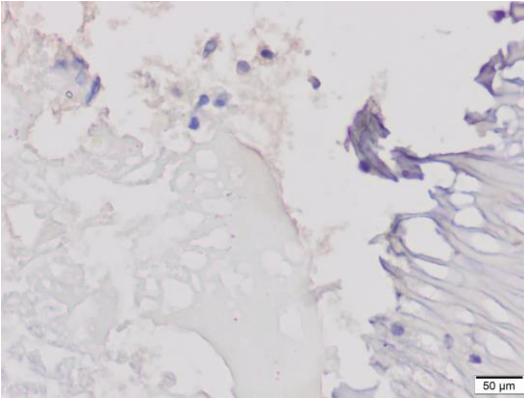
Şekil 36. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



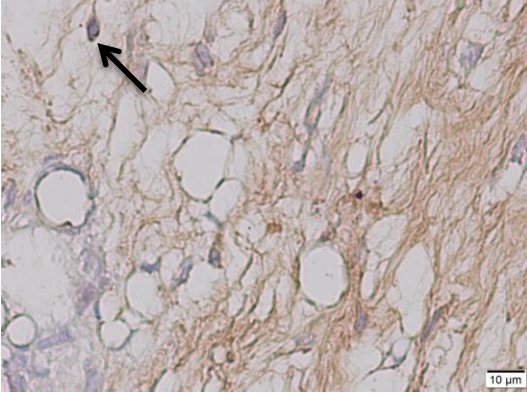
Şekil 37. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü



Şekil 38. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

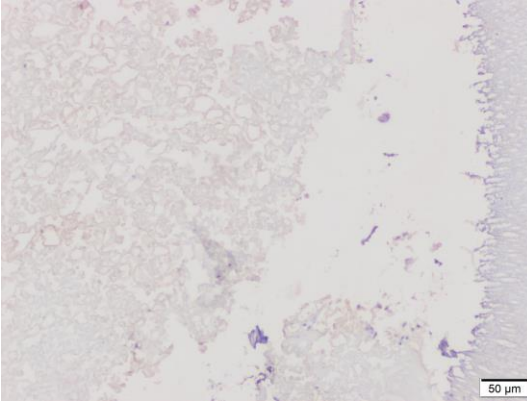


Şekil 39. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

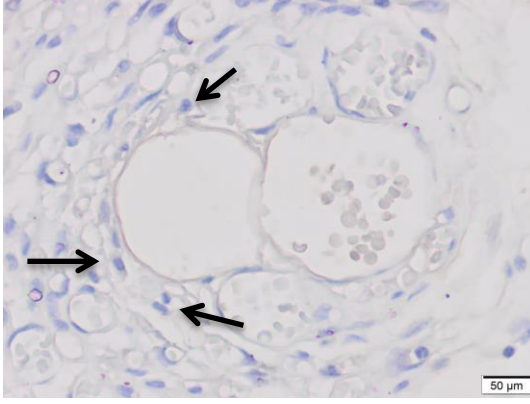


Şekil 40. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 41) ve Anti-VEGF (Şekil 42) boyamaları:

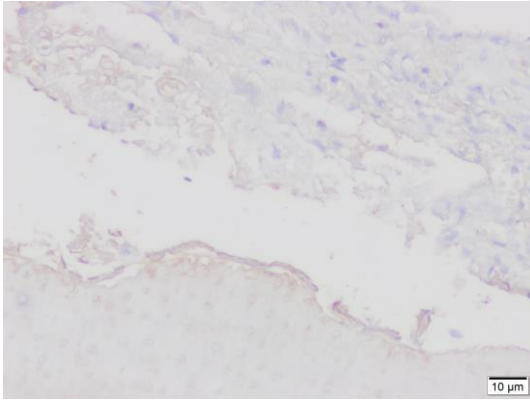


Şekil 41. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

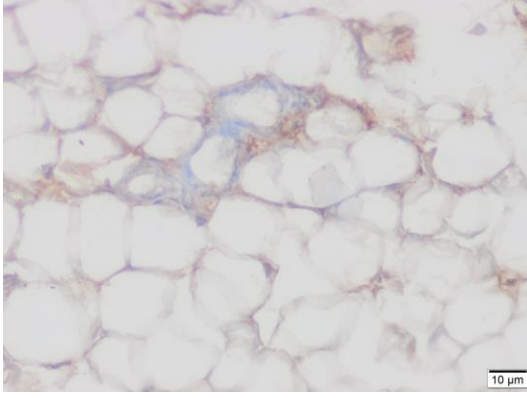


Şekil 42. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 43), Anti-iNOS (Şekil 44) ve TUNEL (Şekil 45) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 43. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



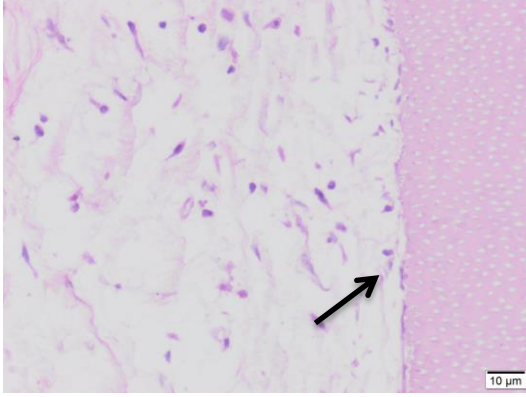
Şekil 44. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



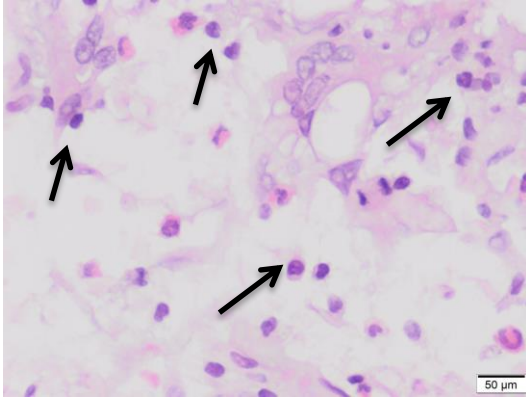
Şekil 45. MKH Uygulaması Yapılan Kontrol Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.3 MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu Bulguları

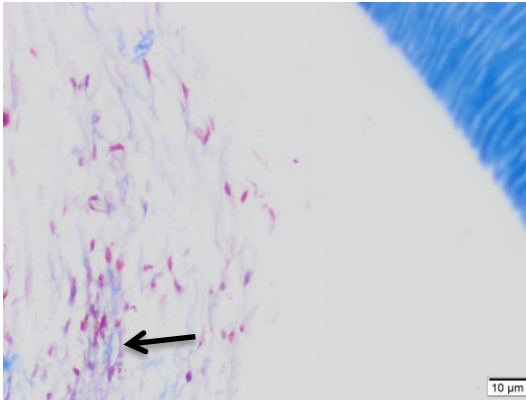
MKH uygulaması yapılmayan EDTA grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde yeni bağ dokusu oluşumu gözlenmesine karşın yapılmış olan immün boyalar bu dokunun pulpa benzeri doku olmadığı yönünde bulgu vermiştir. MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubuna benzer şekilde az sayıda ve düzensiz hücre toplulukları gözlenmiştir. Daha çok fibroblast benzeri hücrelerin baskın olduğu görülmüştür. Dentin duvarlarına bakıldığında ise MKH uygulaması yapılmayan gruplardakine benzer şekilde çok az sayıda hücre olduğu tespit edilmiştir (Şekil 46, 47). MT boyamalarında ise az da olsa yeni kollagen doku yapımının olduğu görülmüştür (Şekil 48). Alizarin kırmızısı ile yapılan boyama sonucunda yeni oluşan kalsifiye dokular görülmüştür (Şekil 49).



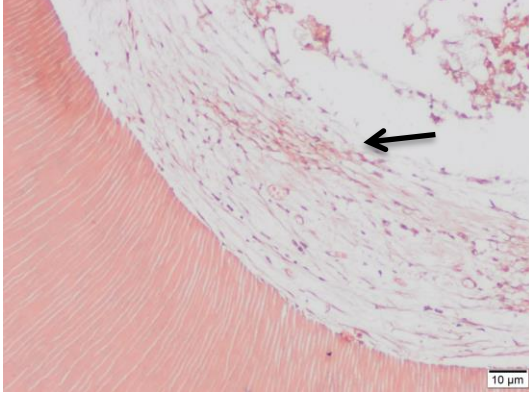
Şekil 46. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 47. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

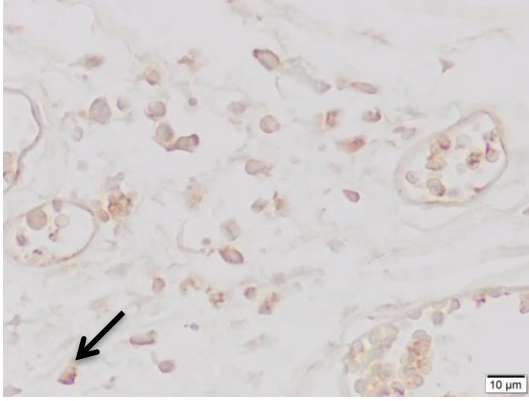


Şekil 48. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü

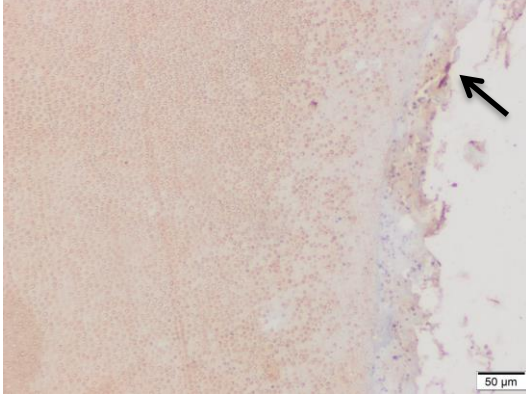


Şekil 49. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

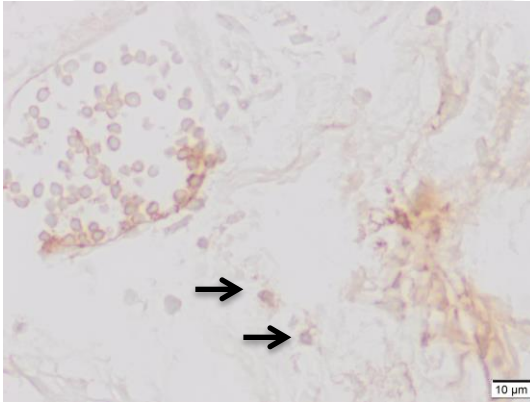
MKH uygulaması yapılmayan EDTA grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 50, 51), Anti-DSP (Şekil 52), Anti-Osteokalsin (Şekil 53), Anti-Osteonektin (Şekil 54) boyaları ve Anti-BMP-2 (Şekil 55) boyaları ile alınan görüntülerde çok az sayıda hücrenin bu boyalar ile boyandığı görüldü.



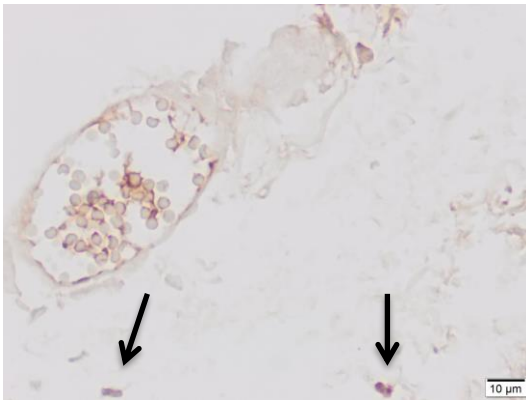
Şekil 50. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



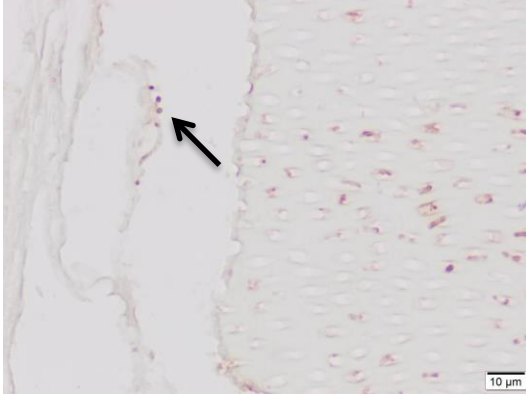
Şekil 51. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



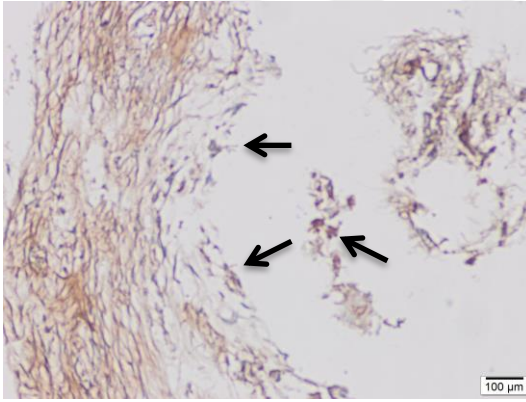
Şekil 52. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 53. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

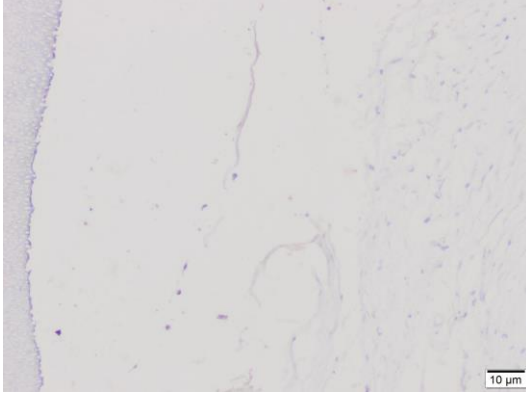


Şekil 54. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

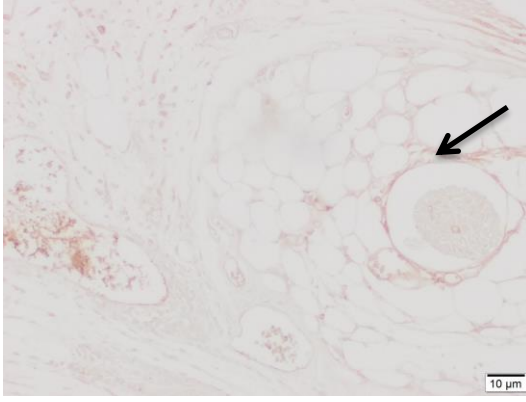


Şekil 55. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 56) ve Anti-VEGF (Şekil 57) boyamaları:

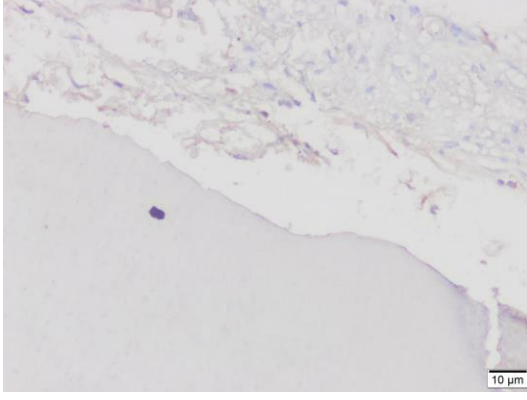


Şekil 56. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

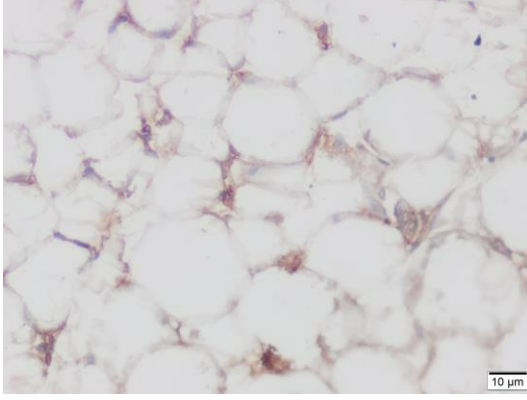


Şekil 57. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 58), Anti-iNOS (Şekil 59) ve TUNEL (Şekil 60) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 58. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



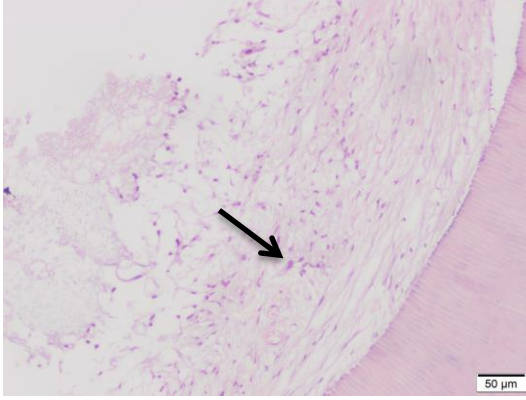
Şekil 59. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



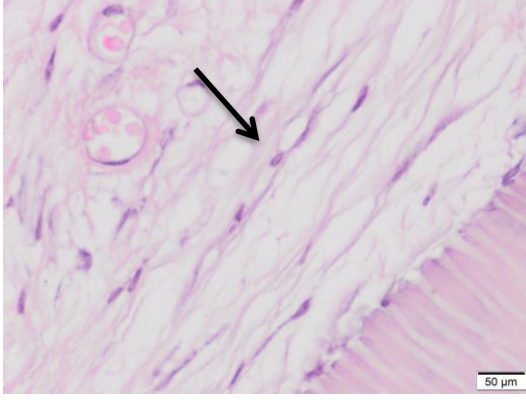
Şekil 60. MKH Uygulaması Yapılmayan EDTA Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.4 MKH Uygulamasý Yapýlan EDTA Grubu Bulgularý

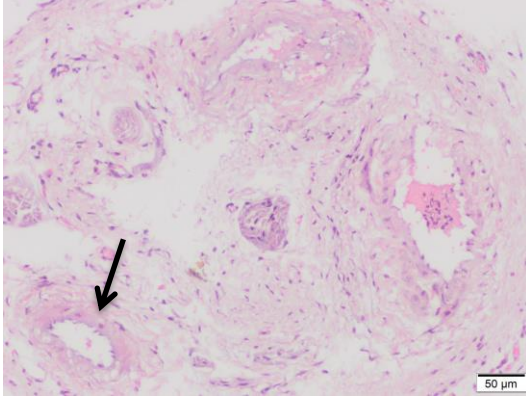
MKH uygulamasý yapılan EDTA grubu olarak ayrýlan diřlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanýldığı görülmüřtür. MKH uygulamasý yapılmayan EDTA grubuna kıyasla çok daha yoğun bir doku organizasyonu ve çok sayıda hücreye rastlanılmıřtır. Dokunun içinde belirgin damar yapıları da gözlenmiřtir. Dentin duvarlarına bakýldığında ise benzer řekilde çok sayıda hücre olduđu görülmüřtür (řekil 61, 62, 63). Yapýlan MT boyamasý sonucunda da MKH uygulamasý yapılmayan gruplara kıyasla daha yoğun kollagen formasyonu gözlenmiřtir (řekil 64). Alizarin kırmızı ile yapılan boyama sonucunda MKH uygulamasý yapılmayan EDTA grubuna kıyasla daha yoğun bir kalsifiye doku formasyonu olduđu görülmüřtür (řekil 65).



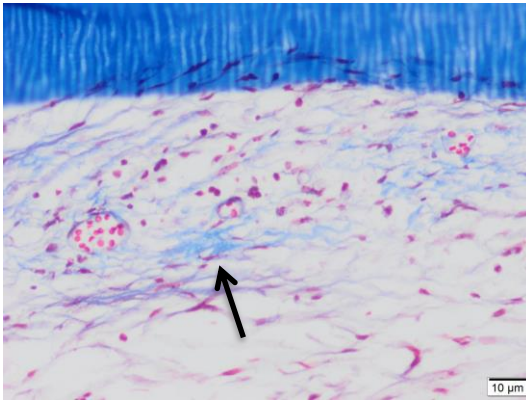
řekil 61. MKH Uygulamasý Yapýlan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



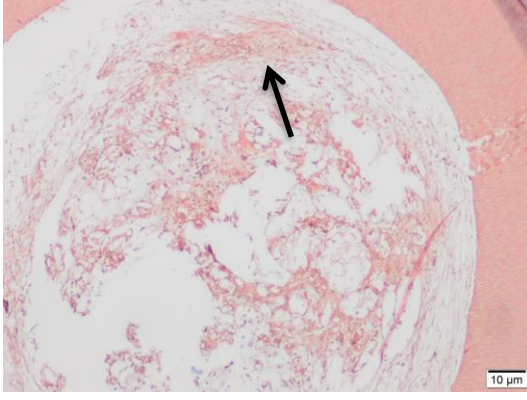
Şekil 62. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 63. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

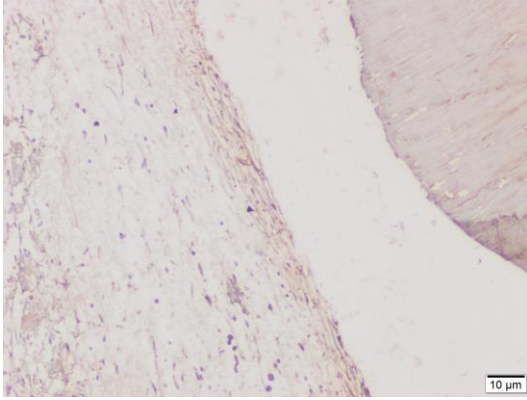


Şekil 64. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü

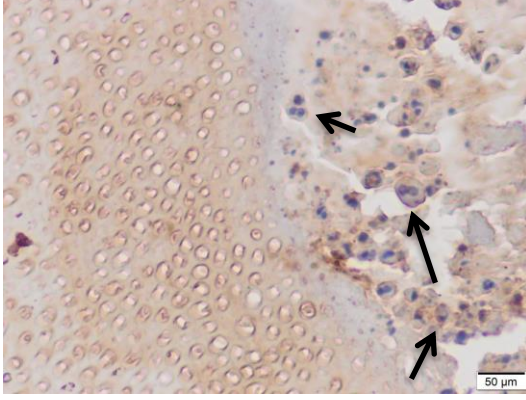


Şekil 65. MKH Uygulaması Yapılan EDTA grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

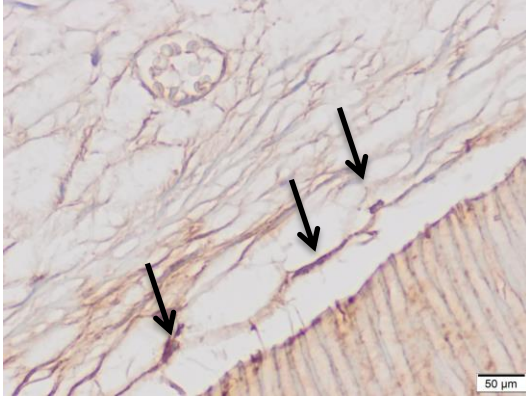
MKH uygulaması yapılan EDTA grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 66, 67), Anti-DSP (Şekil 68), Anti-Osteokalsin (Şekil 69, 70), Anti-Osteonektin (Şekil 71, 72) ve Anti-BMP-2 (Şekil 73) boyaları ile alınan görüntülerde MKH ekimi yapılmayan EDTA grubuna oranla daha çok sayıda gözlenen hücrelerin bu boyalar ile boyandığı görülmüştür.



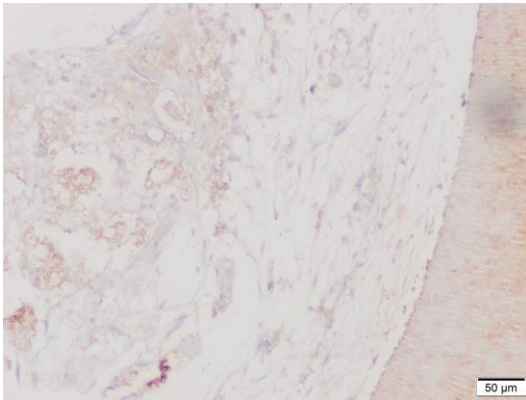
Şekil 66. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



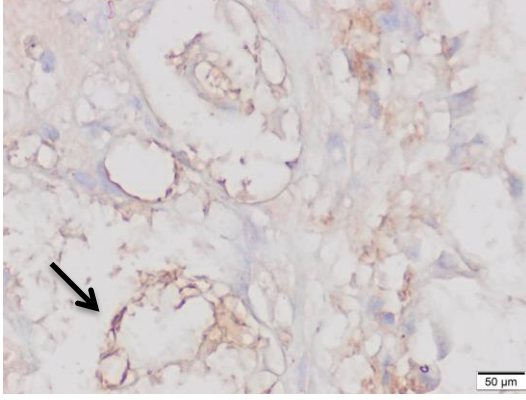
Şekil 67. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; dentin duvarının önünde odontoblastik rejenerasyona uğrayan kök hücrelerin Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



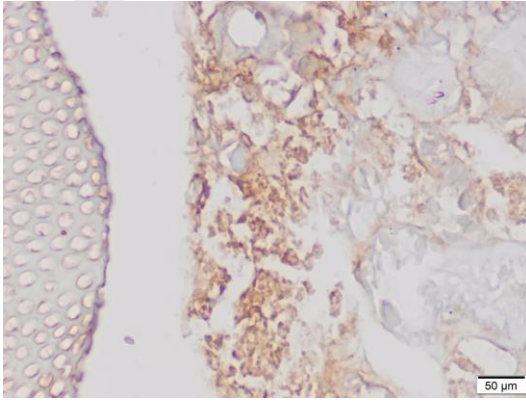
Şekil 68. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



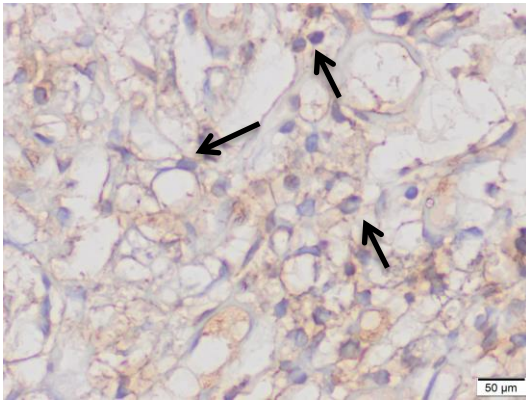
Şekil 69. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü



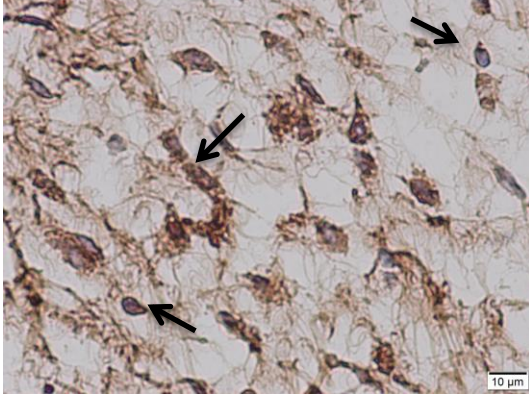
Şekil 70. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü



Şekil 71. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

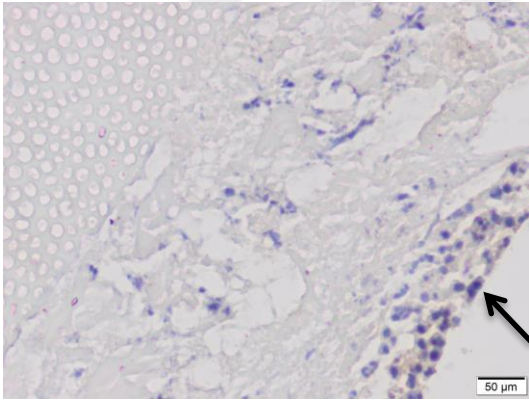


Şekil 72. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

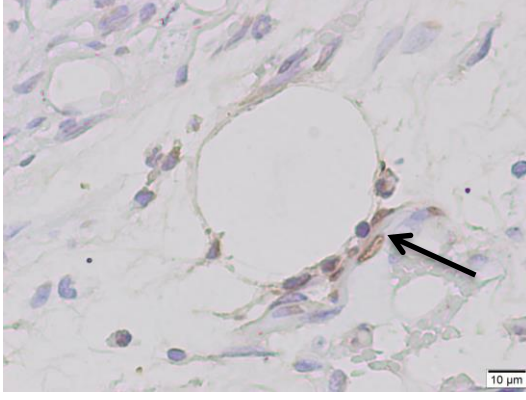


Şekil 73. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 74) ve Anti-VEGF (Şekil 75) boyamaları:

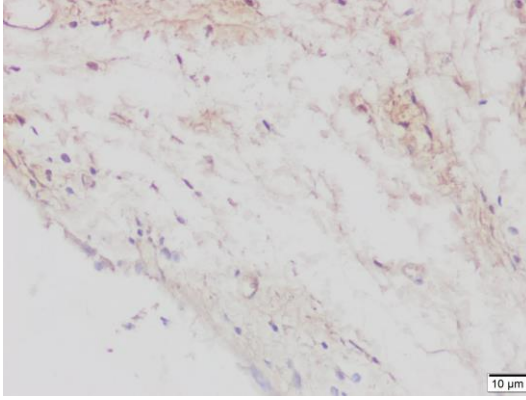


Şekil 74. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

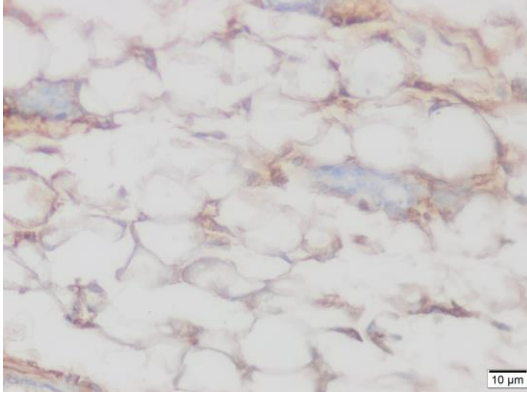


Şekil 75. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 76), Anti-iNOS (Şekil 77) ve TUNEL (Şekil 78) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 76. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



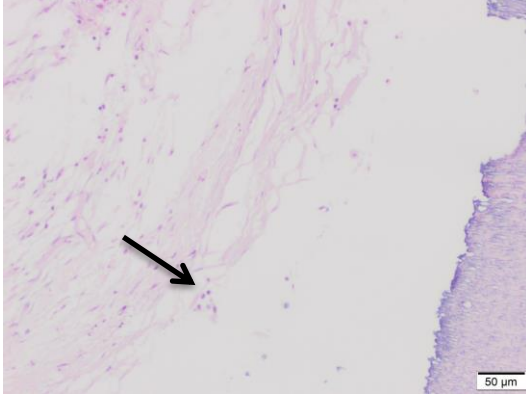
Şekil 77. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



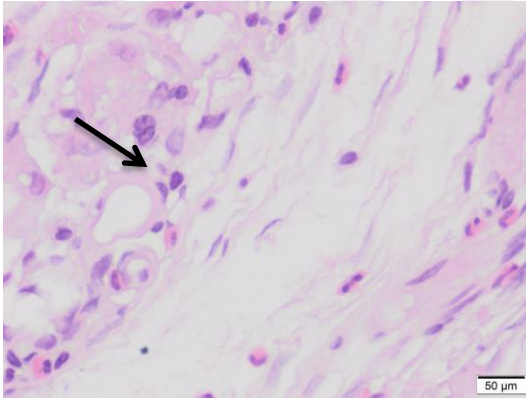
Şekil 78. MKH Uygulaması Yapılan EDTA Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.5 MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu Bulguları

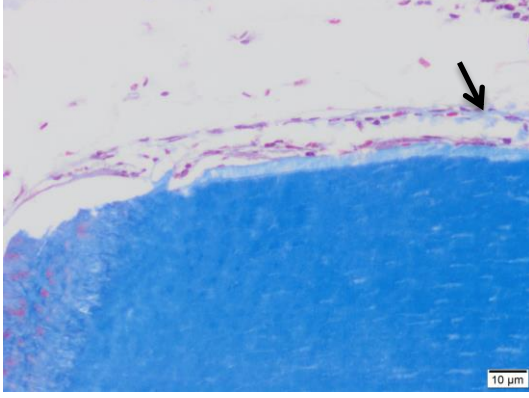
MKH uygulaması yapılmayan sitrik asit grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanılmamakla beraber MKH uygulaması yapılmayan diğer gruplardakine göre biraz daha yoğun ama düzensiz hücre toplulukları gözlenmiştir. Bağ dokusu ve fibroblast benzeri hücrelerin benzer şekilde baskın olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular çalışmamızın invitro bölümündeki, kök hücre ekimi yapılmayan gruplardan büyüme faktörlerinin özellikle TGF- β 1'in en yüksek olarak bulunduğu grup olarak sitrik asit grubunun saptanmış olmasıyla uyumlu görülmüştür. Dentin duvarlarına bakıldığında ise çok az sayıda hücre olduğu tespit edilmiştir (Şekil 79, 80). Yapılan MT boyamasında ise eser miktarda kollagen formasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 81). Alizarin boyaması ile yer yer yeni kalsifik doku oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 82).



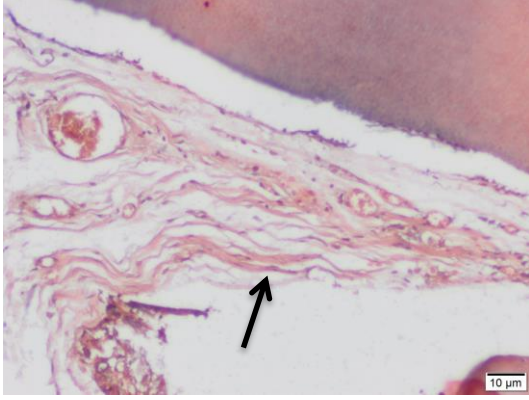
Şekil 79. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 80. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü. Ok ile gösterilen yuvarlak çekirdekli farklılaşmaya hazır kök hücreler fibroblastlardan zengin bağ dokusu arasında seyrek olarak görülmektedir.

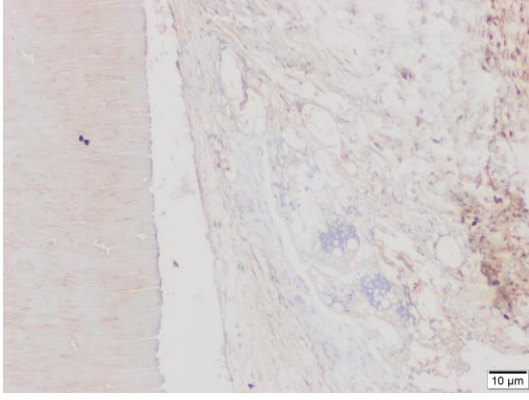


Şekil 81. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü

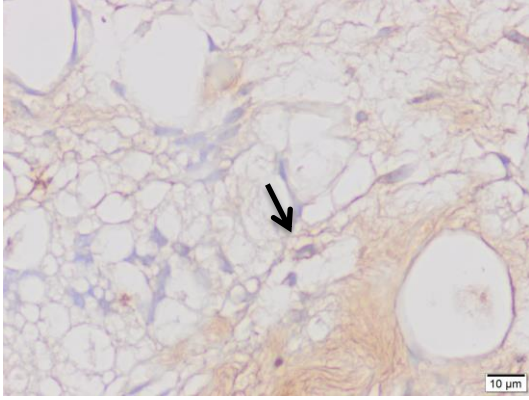


Şekil 82. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

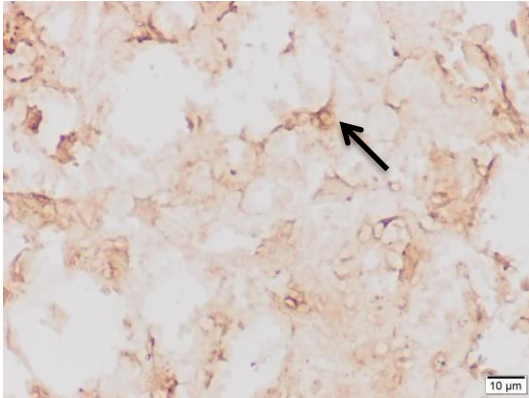
MKH uygulaması yapılmayan sitrik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 83, 84), Anti-DSP (Şekil 85, 86), Anti-Osteokalsin (Şekil 87), Anti-Osteonektin (Şekil 88) ve Anti-BMP-2 (Şekil 89) boyaları ile alınan görüntülerde az sayıda hücrenin boyandığı görülmüştür. Boyanan hücrelerin de bir düzen içinde olmadığı dağınık olarak yer aldığı da ayrıca gözlenmiştir.



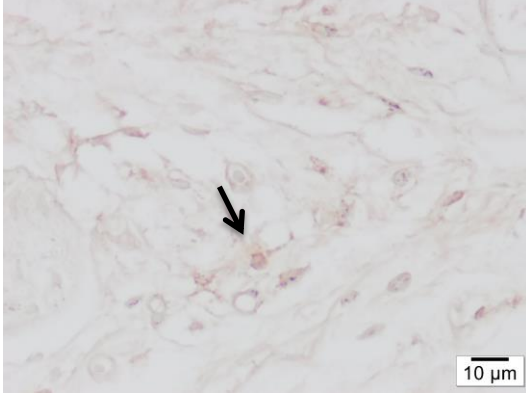
Şekil 83. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



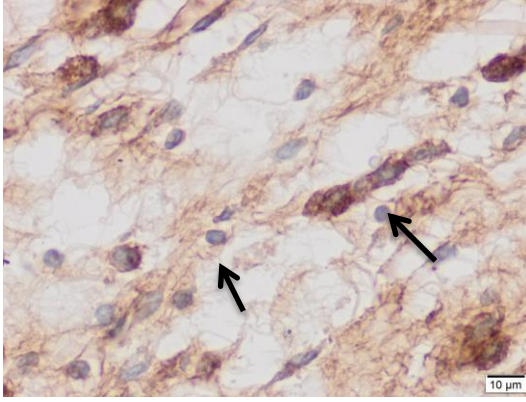
Şekil 84. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



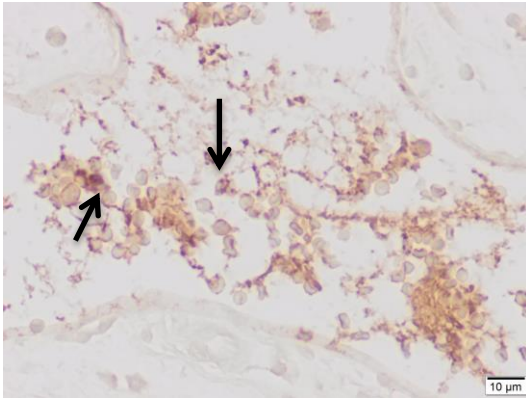
Şekil 85. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



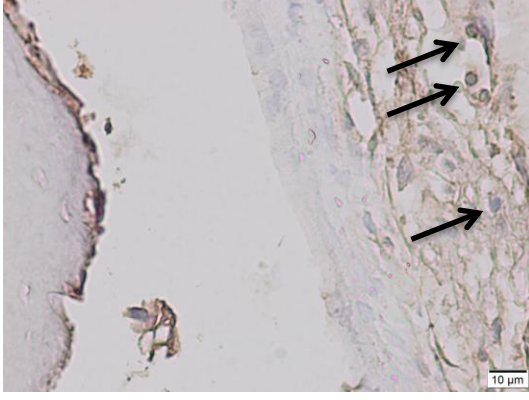
Şekil 86. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 87. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

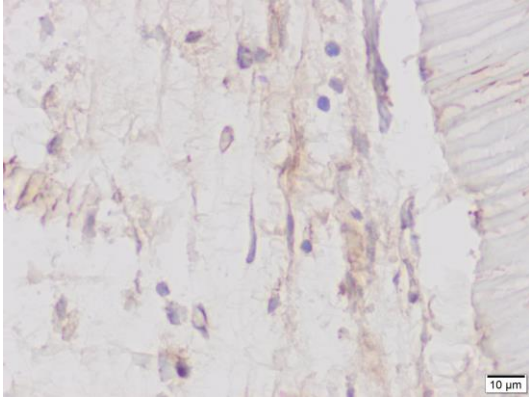


Şekil 88. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

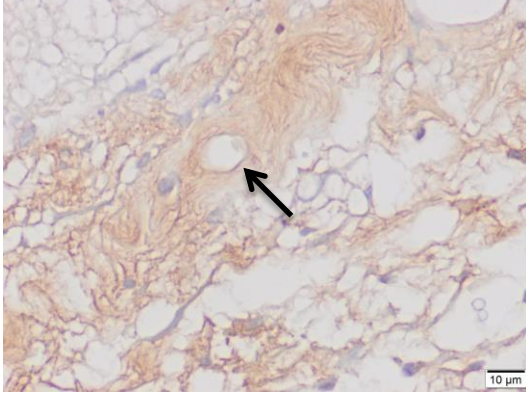


Şekil 89. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 90) ve Anti-VEGF (Şekil 91) boyamaları:

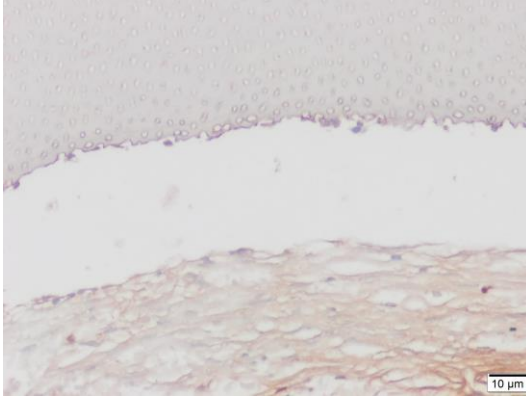


Şekil 90. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

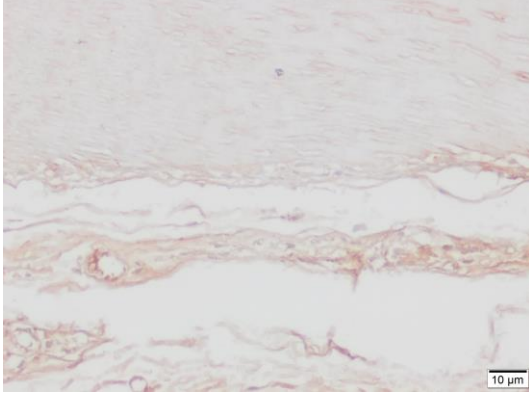


Şekil 91. MKH Uygulamasý Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-VEGF boyamasý ile görünümü

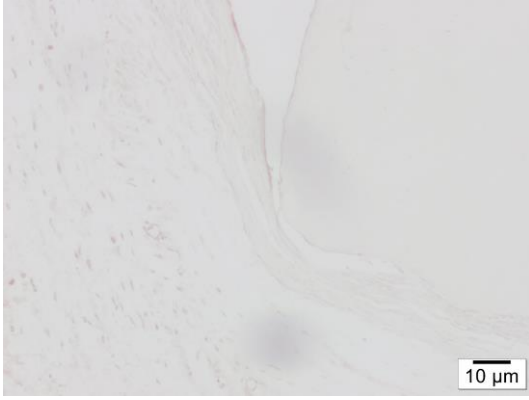
Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 92), Anti-iNOS (Şekil 93) ve TUNEL (Şekil 94) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 92. MKH Uygulamasý Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-eNOS boyamasý ile görünümü



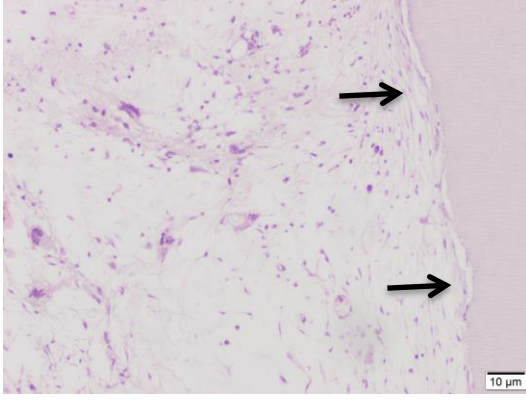
Şekil 93. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



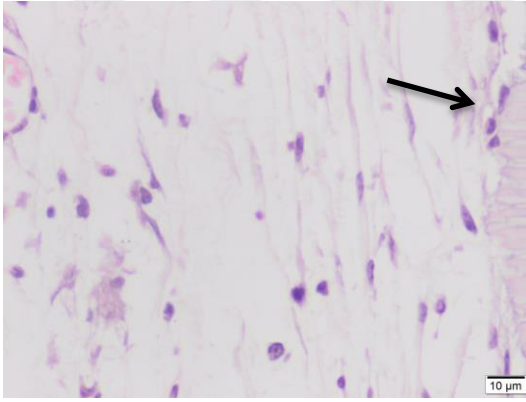
Şekil 94. MKH Uygulaması Yapılmayan Sitrik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.6 MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu Bulguları

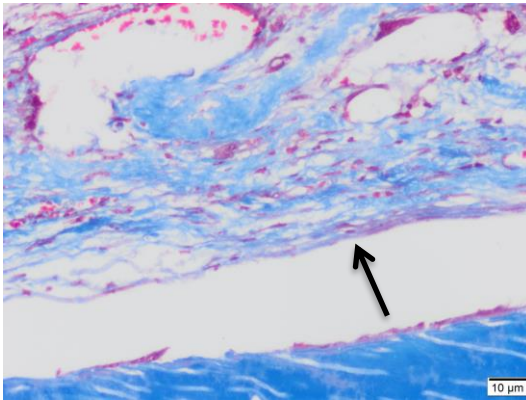
MKH uygulaması yapılan sitrik asit grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde daha düzenli ve daha çok sayıda hücre içeren, immün boyamalardan alınan sonuçlara göre de bir bölümüyle pulpa benzeri doku oluşumu gözlenmiştir. Dentin duvarlarına bakıldığında tek sıra halinde çok sayıda hücrenin var olduğu tespit edildi. Dokunun içinde belirgin damar yapıları da gözlenmiştir (Şekil 95, 96). Yapılan MT boyamalarında ise yoğun kollagen formasyonunun olduğu saptanmıştır (Şekil 97). Yapılan Alizarin kırmızısı boyaması sonucunda ise yoğun bir kalsifik doku formasyonu olduğu saptandı (Şekil 98).



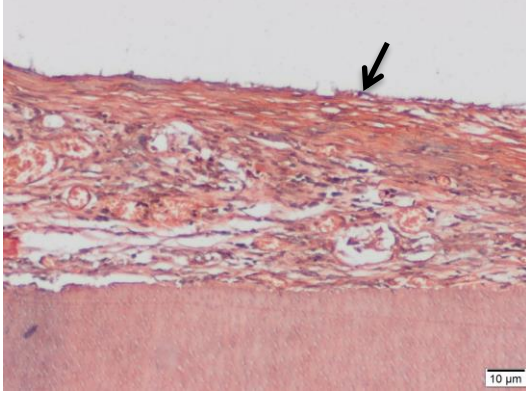
Şekil 95. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 96. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

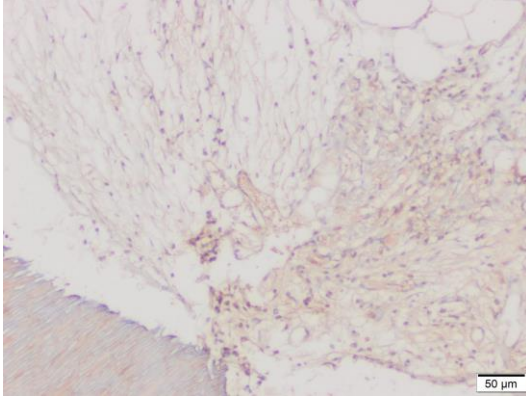


Şekil 97. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki MT boyamalarındayeni oluşan bağ dokusu içinde yoğun olarak organize olmuş kollagen yapının görüntüsü

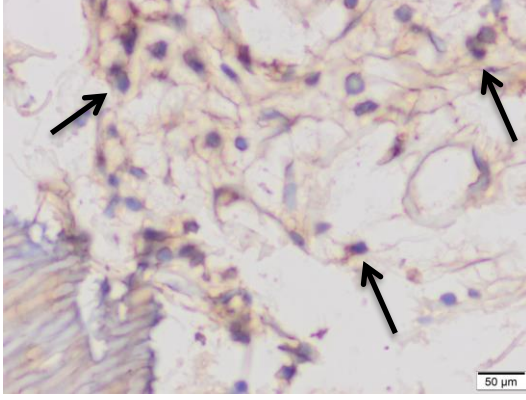


Şekil 98. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

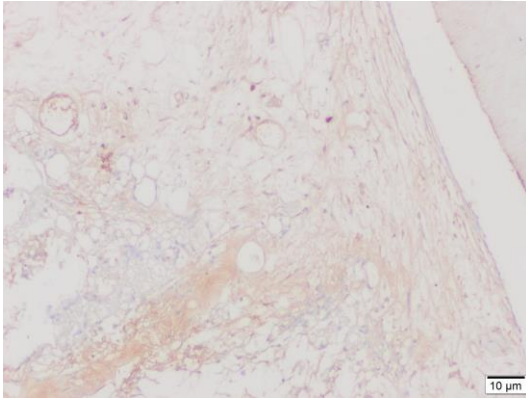
MKH uygulaması yapılan sitrik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 99, 100), Anti-DSP (Şekil 101, 102), Anti-Osteokalsin (Şekil 103), Anti-Osteonektin (Şekil 104) ve Anti-BMP-2 (Şekil 105) boyaları ile alınan görüntülerde rejenere olmuş hücrelerin olduğu saptanmıştır.



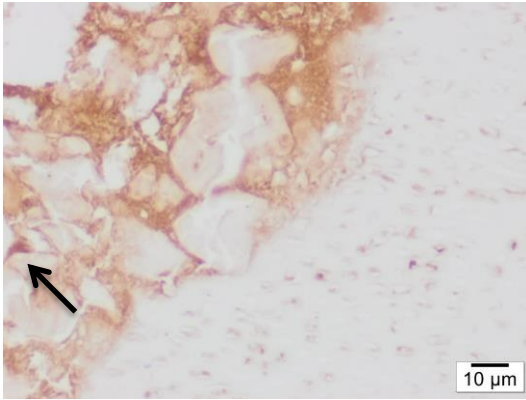
Şekil 99. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



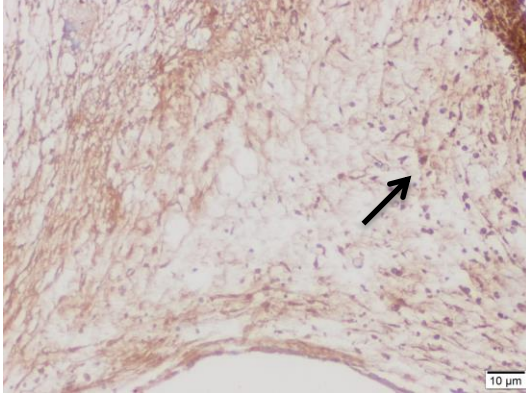
Şekil 100. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



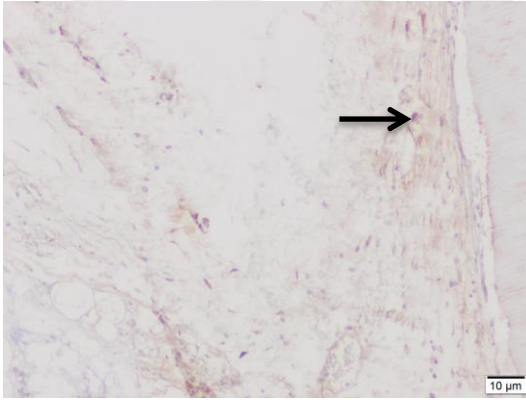
Şekil 101. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



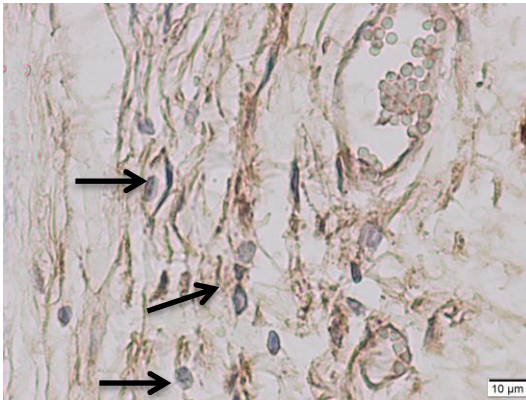
Şekil 102. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 103. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

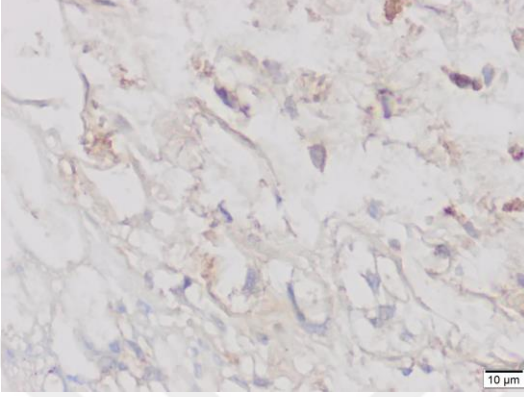


Şekil 104. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

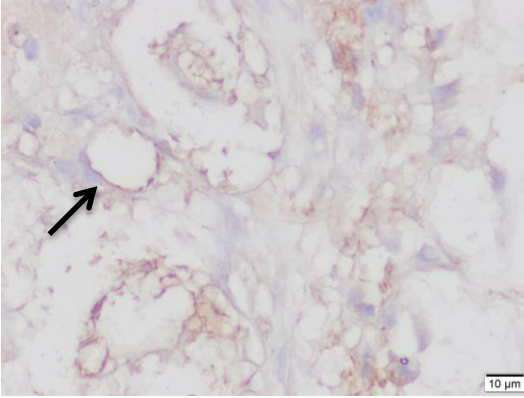


Şekil 105. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 106) ve Anti-VEGF (Şekil 107) boyamaları:

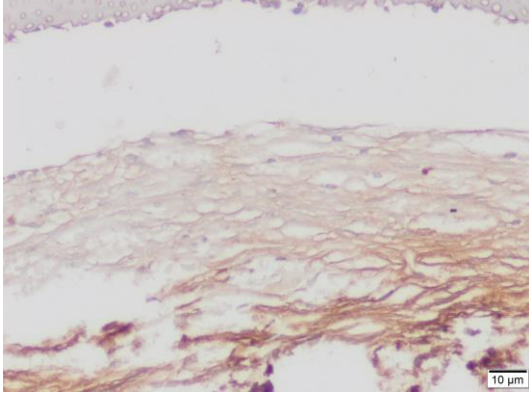


Şekil 106. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

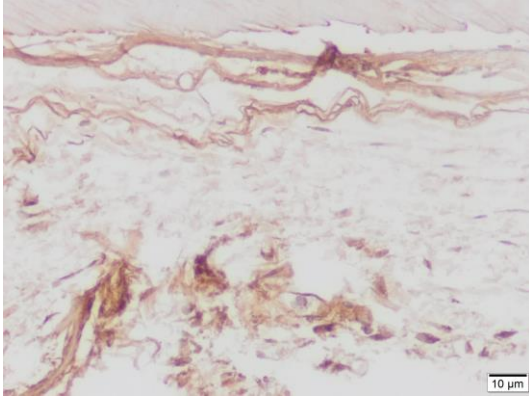


Şekil 107. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 108), Anti-iNOS (Şekil 109) ve TUNEL (Şekil 110) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 108. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



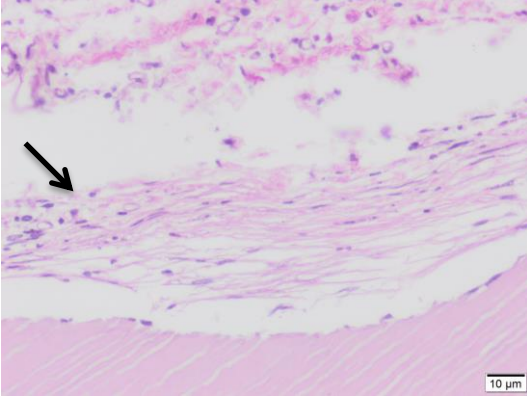
Şekil 109. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



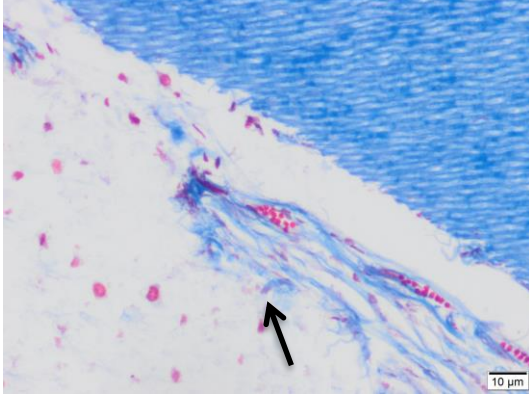
Şekil 110. MKH Uygulaması Yapılan Sitrik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.7 MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu Bulguları

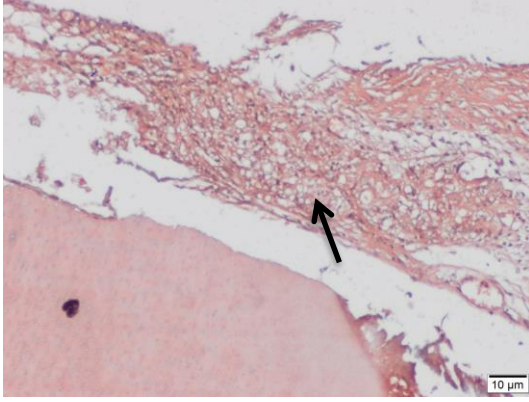
MKH uygulaması yapılmayan fitik asit grubu olarak ayrılan dişlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanılmamıştır. MKH uygulaması yapılmayan diğer gruplardakine benzer az sayıda ve düzensiz hücre toplulukları gözlenmiştir. Bağ dokusu ve fibroblast benzeri hücrelerin baskın olduğu düşünülmektedir. Belirgin bir damar yapılanması da tespit edilmiştir. Dentin duvarlarına bakıldığında ise benzer şekilde çok az sayıda hücre olduğu saptanmıştır (Şekil 111). Yapılan MT boyamalarında ise belirgin bir kollagen formasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 112). Yapılan Alizarin kırmızısı boyaması sonucunda ise yer yer yeni kalsifik doku formasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 113).



Şekil 111. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü

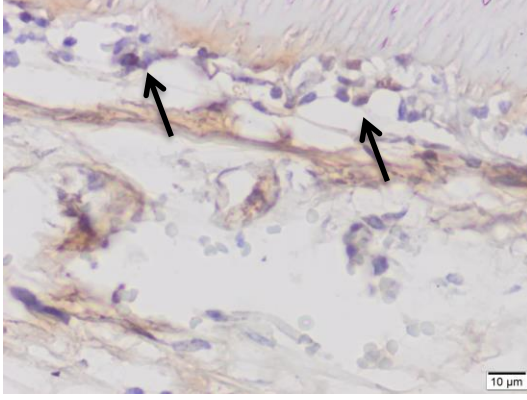


Şekil 112. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü

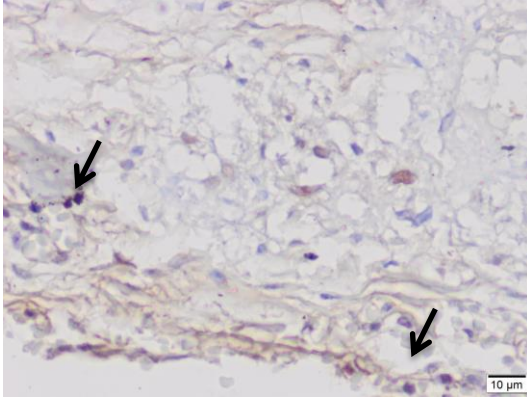


Şekil 113. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

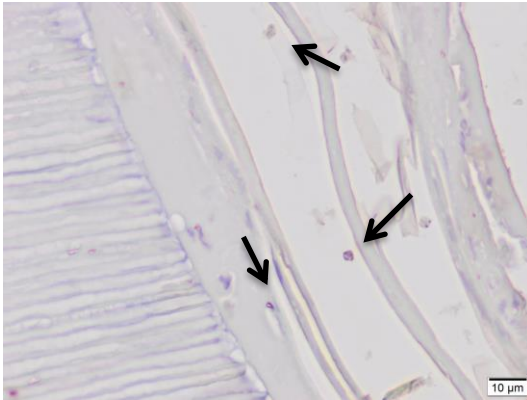
MKH uygulaması yapılmayan fitik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 114), Anti-DSP (Şekil 115), Anti-Osteokalsin (Şekil 116), Anti-Osteonektin (Şekil 117, 118) ve Anti-BMP-2 (Şekil 119) boyaları ile alınan görüntülerde az sayıda olduğu gözlenen hücrelerin boyandığı görüldü.



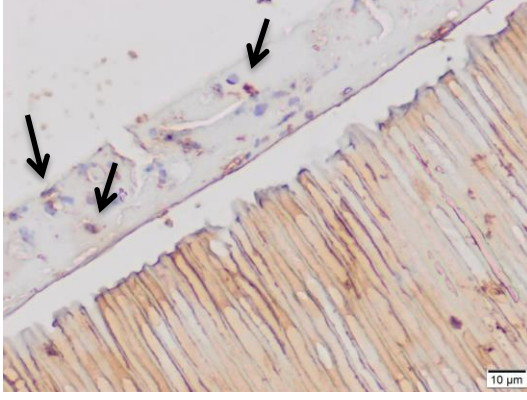
Şekil 114. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Dentin duvarında düzensiz olarak Anti-Enamelisin ile boyanmış hücrelerin görünümü



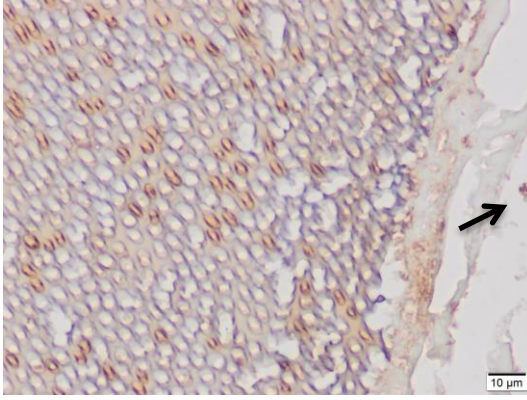
Şekil 115. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



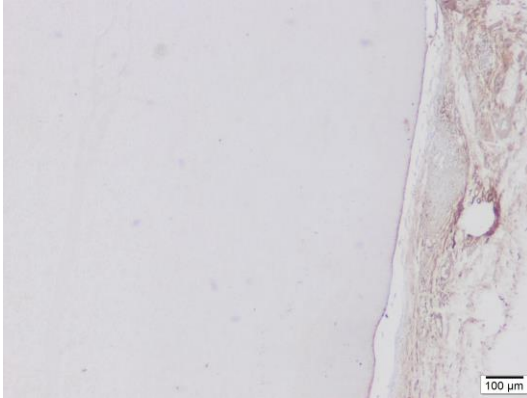
Şekil 116. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü



Şekil 117. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

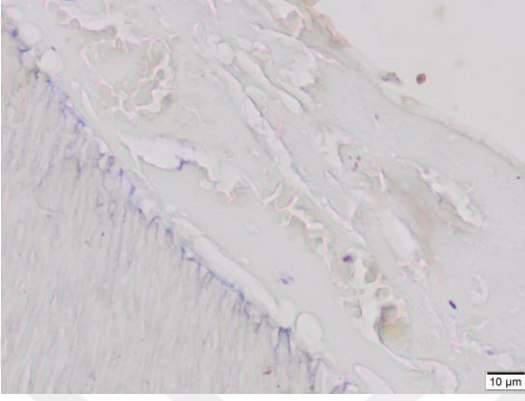


Şekil 118. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

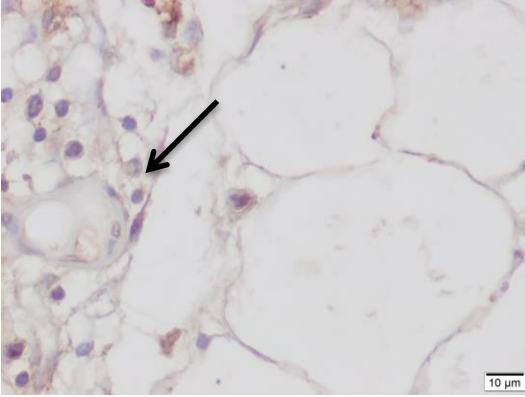


Şekil 119. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 120) ve Anti-VEGF (Şekil 121) boyamaları:

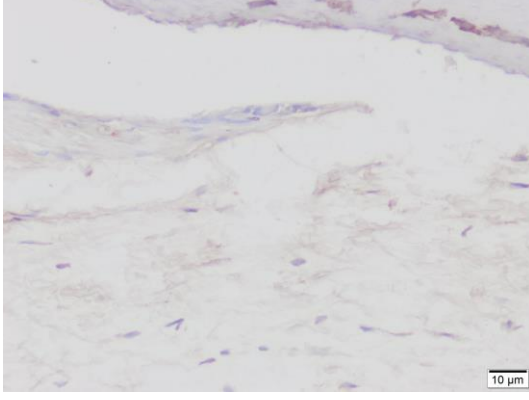


Şekil 120. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

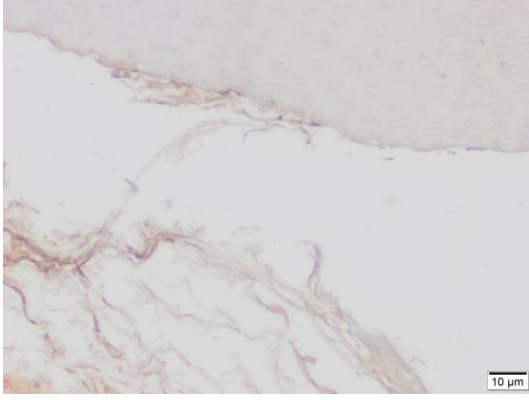


Şekil 121. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

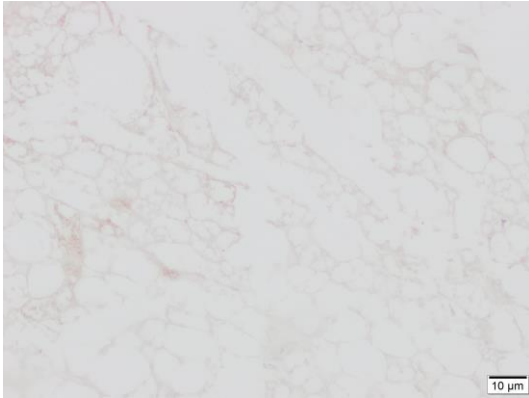
Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 122), Anti-iNOS (Şekil 123) ve TUNEL (Şekil 124) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 122. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



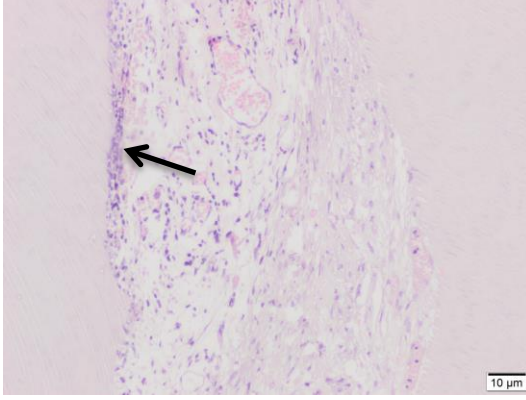
Şekil 123. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



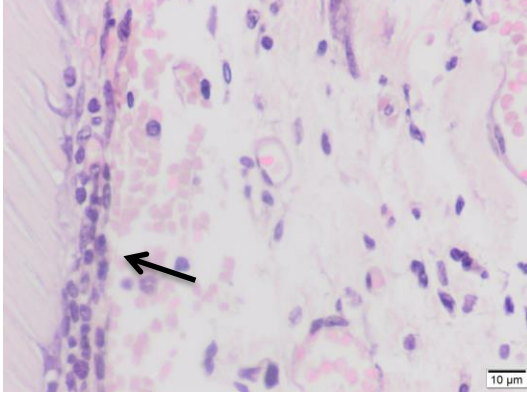
Şekil 124. MKH Uygulaması Yapılmayan Fitik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.8 MKH Uygulamasý Yapýlan Fitik Asit Grubu Bulgularý

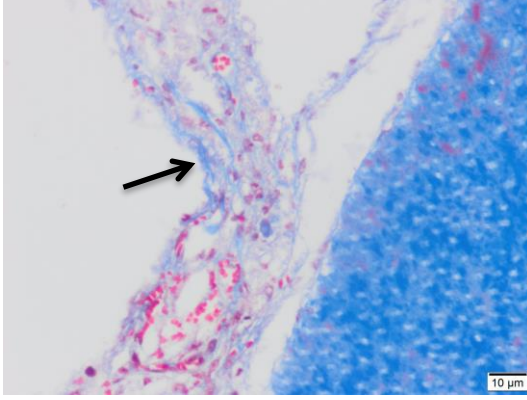
MKH uygulamasý yapýlan fitik asit grubundaki diřlerden elde edilen kesitlerde pulpa benzeri dokuya rastlanılmýřtır. MKH uygulamasý yapýlan gruplardakine benzer řekilde çok sayıda hücre topluluęu olduęu gözlenmiřtir. Dentin duvarlarına bakýldýęında çok katlý odontoblast benzeri hücrelerin olduęu grlmřtir. Dokunun içinde belirgin damar yapýlanmasý da gözlenmiřtir (řekil 125, 126). MT boyamasýnın sonucunda ise MKH uygulamasý yapýlan gruplarda olduęu gibi belirgin kollagen formasyonu olduęu grlmřtir (řekil 127). Alizarin kırmızısý ile yapýlan boyama sonucunda ise yoęun bir kalsifik doku formasyonu gözlenmiřtir (řekil 128).



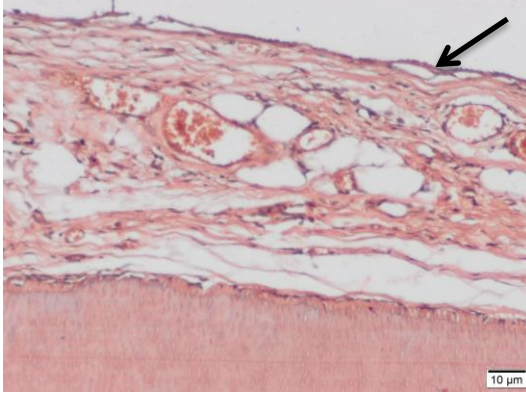
řekil 125. MKH Uygulamasý Yapýlan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarýndaki görüntüsü



Şekil 126. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü; dentin duvarlarında çok katlı ve düzenli odontoblast benzeri hücre yapılanması

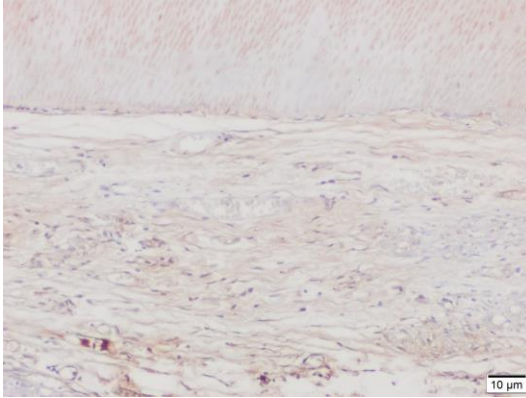


Şekil 127. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin MT boyamalarındaki görüntüsü; Yeni oluşan doku içinde yoğun kollagen yapımının görülmesi

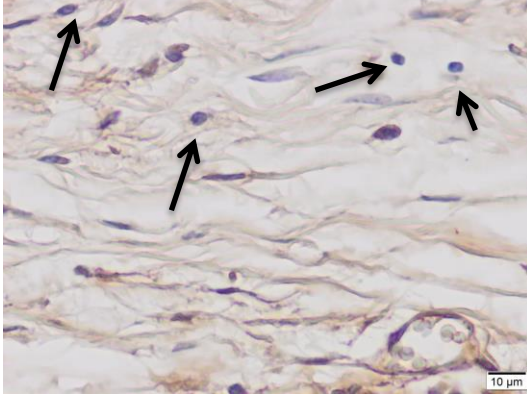


Şekil 128. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit grubundaki kök dentinin Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

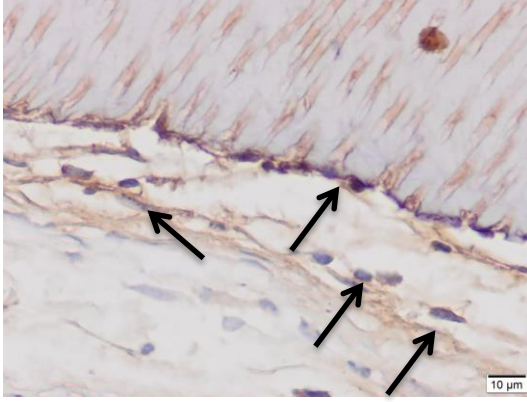
MKH uygulaması yapılan fitik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 129, 130), Anti-DSP (Şekil 131, 132), Anti-Osteokalsin (Şekil 133), Anti-Osteonektin (Şekil 134) ve Anti-BMP-2 (Şekil 135) boyaları ile alınan görüntülerde MKH uygulaması yapılmayan gruplara oranla daha fazla sayıda olduğu gözlenen hücrelerin boyandığı görüldü.



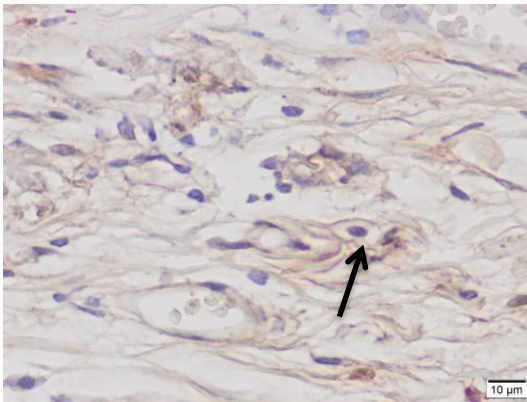
Şekil 129. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



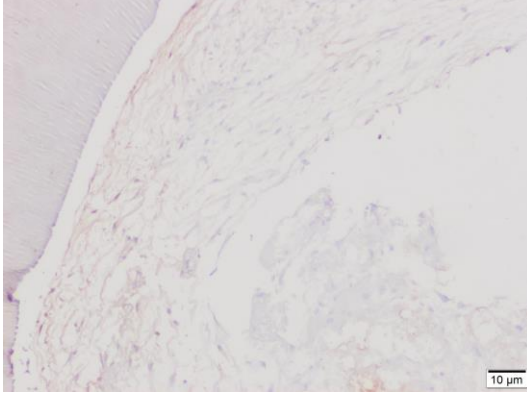
Şekil 130. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



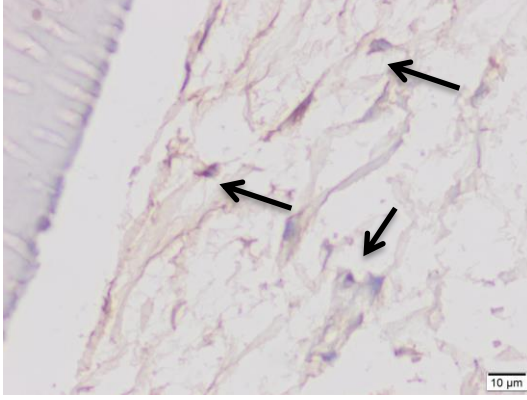
Şekil 131. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü; Dentin duvarı üzerinde sıralanmış yeni rejenere olmuş hücrelerin görünümü



Şekil 132. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 133. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

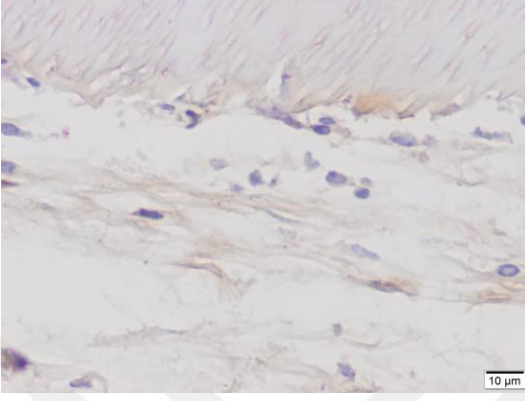


Şekil 134. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Ostenektin boyaması ile görünümü

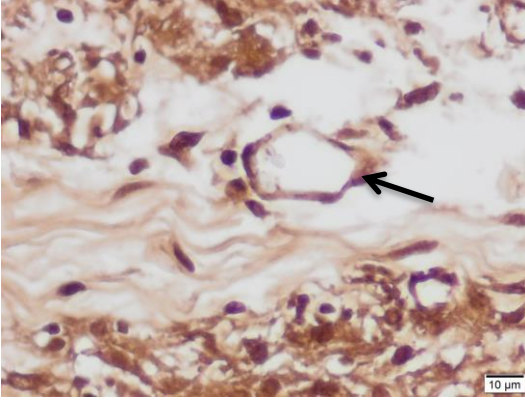


Şekil 135. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 136) ve Anti-VEGF (Şekil 137) boyamaları:

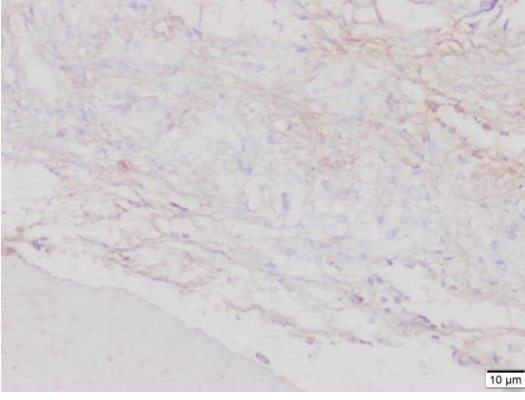


Şekil 136. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

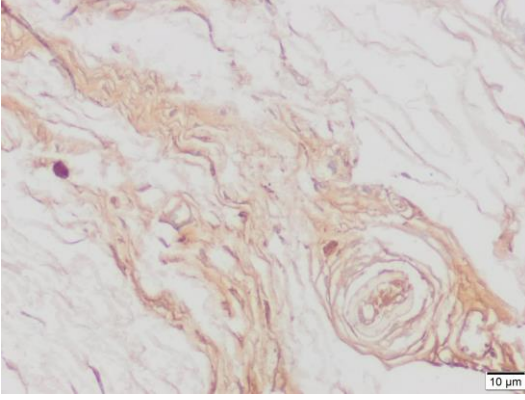


Şekil 137. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

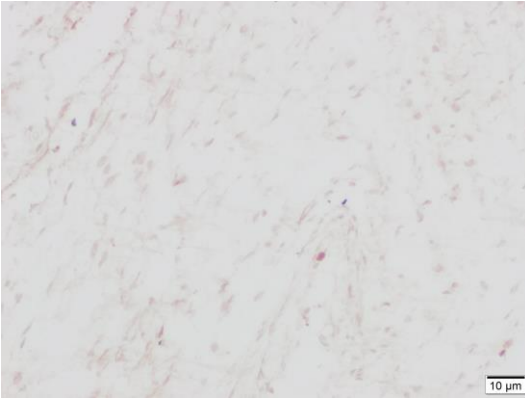
Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 138), Anti-iNOS (Şekil 139) ve TUNEL (Şekil 140) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 138. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



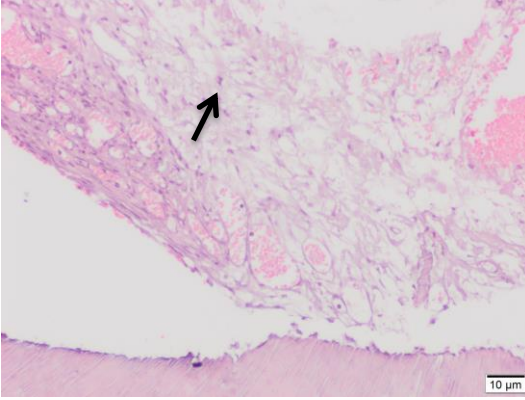
Şekil 139. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



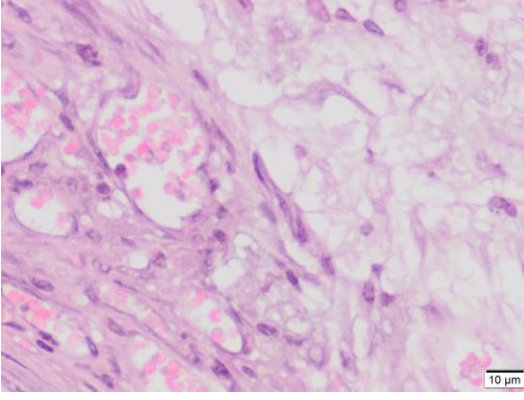
Şekil 140. MKH Uygulaması Yapılan Fitik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.1.9 MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu Bulguları

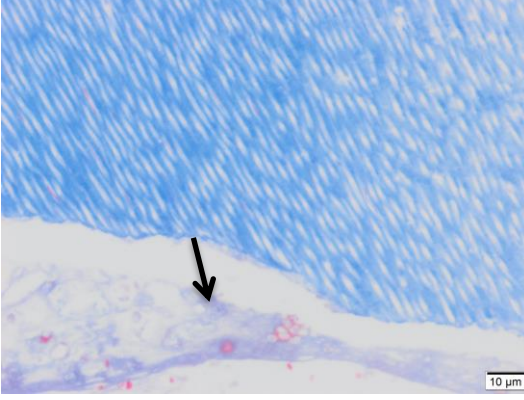
MKH uygulaması yapılmayan fosforik asit grubu dişlerden elde edilen kesitlerde MKH uygulaması yapılmayan diğer gruplardakine benzer olmakla beraber düzensiz ama çok sayıda hücre topluluklarının olduğu gözlenmiştir. Fakat bu hücreden zengin dokununda pulpa benzeri doku olmadığı sadece bağ dokusunun genel özelliklerini gösterdiği içerisinde bol miktarda damar yapılanmasının olduğu saptanmıştır. Dentin duvarlarına bakıldığında ise MKH uygulaması yapılmayan gruplardakine benzer şekilde çok az sayıda hücre olduğu görülmüştür. (Şekil 141, 142). Yapılan MT boyaması sonucunda orta yoğunlukta kollagen formasyonu olduğu saptanmıştır (Şekil 143). Alizarin kırmızısı boyaması sonucunda yer yer kalsifiye doku formasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 144).



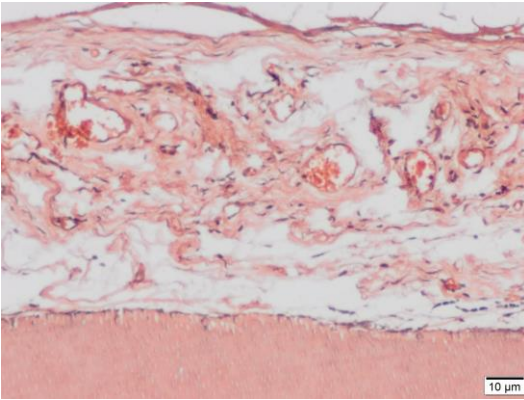
Şekil 141. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki bağ dokusu oluşumunun H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 142. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki hücreden ve damarlanmadan zengin yeni dokunun H&E boyamalarındaki görüntüsü

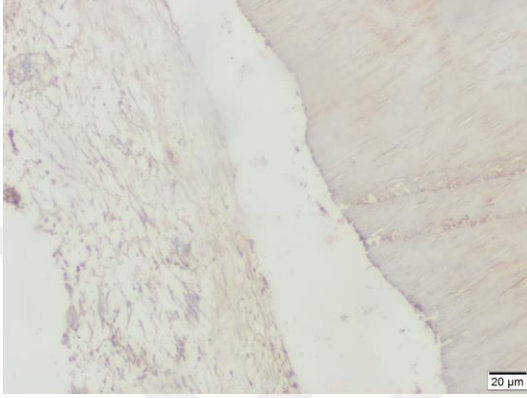


Şekil 143. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan bağ dokusu içindeki kollajen yapılanmasının MT boyamalarındaki görüntüsü

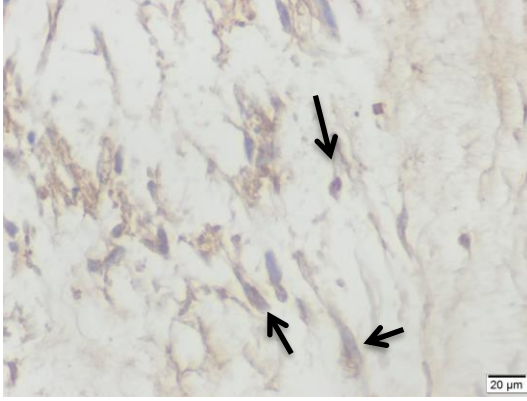


Şekil 144. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan kalsifiye dokunun Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

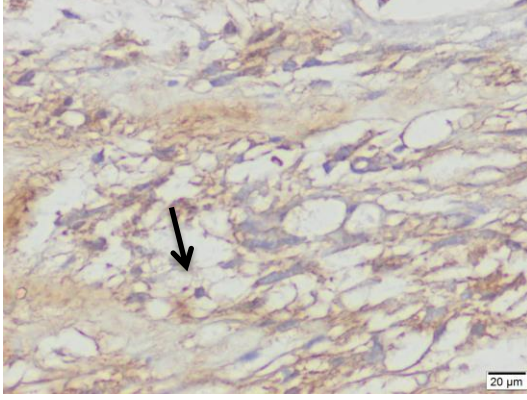
MKH uygulaması yapılmayan fosforik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 145, 146), Anti-DSP (Şekil 147), Anti-Osteokalsin (Şekil 148), Anti-Osteonektin (Şekil 149) ve Anti-BMP-2 (Şekil 150) boyaları ile alınan görüntülerde az sayıda boyanan hücre olduğu gözlenmiştir.



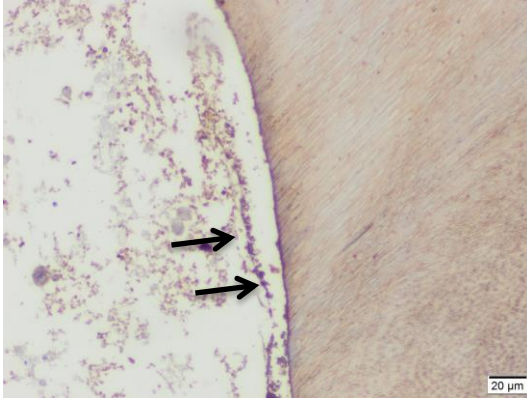
Şekil 145. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



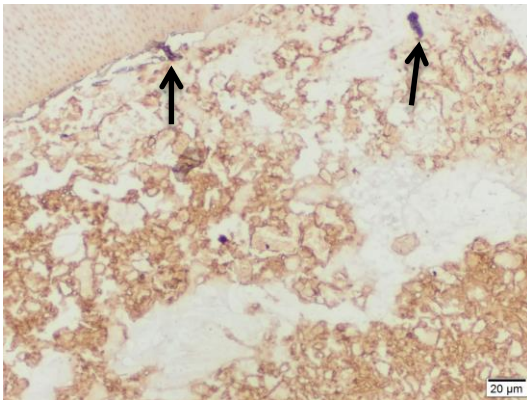
Şekil 146. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



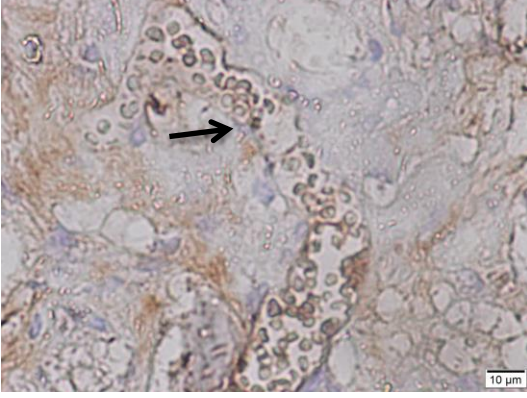
Şekil 147. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 148. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

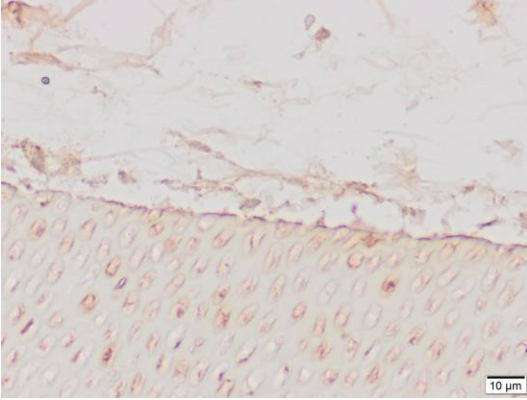


Şekil 149. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

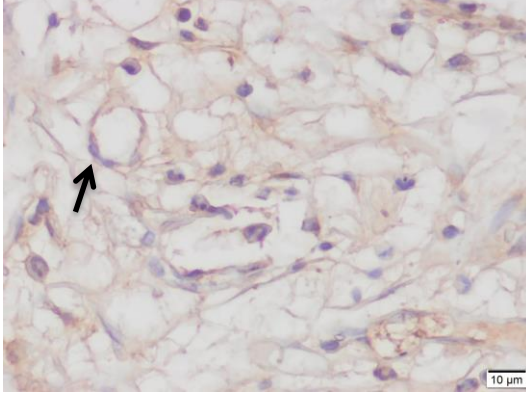


Şekil 150. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 151) ve Anti-VEGF (Şekil 152) boyamaları:

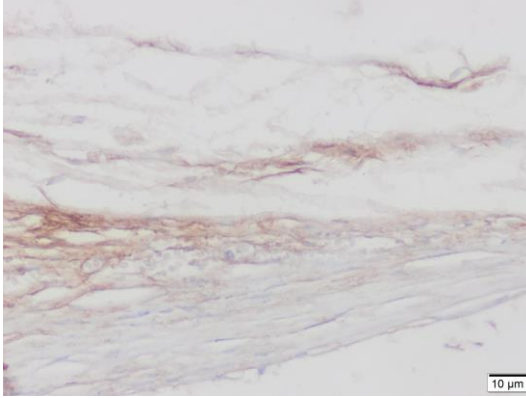


Şekil 151. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

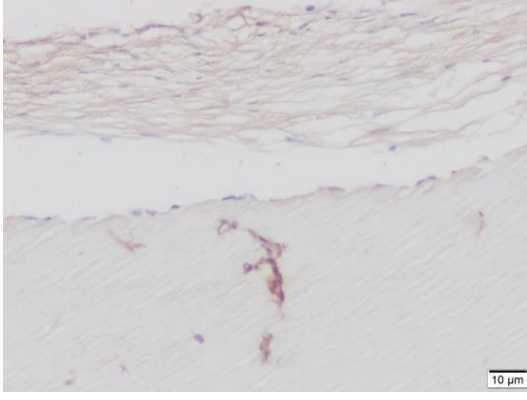


Şekil 152. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

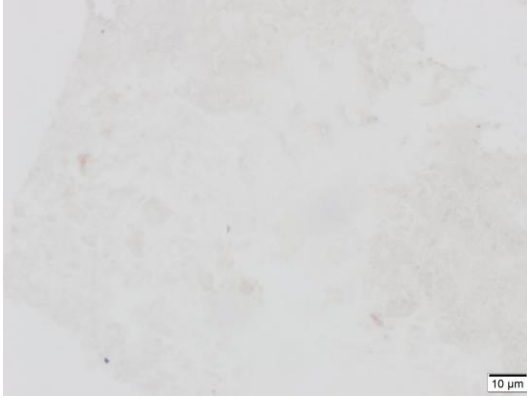
Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 153), Anti-iNOS (Şekil 154) ve TUNEL (Şekil 155) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 153. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



Şekil 154. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü

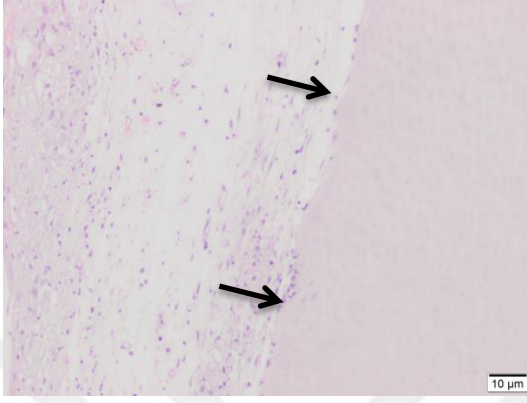


Şekil 155. MKH Uygulaması Yapılmayan Fosforik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

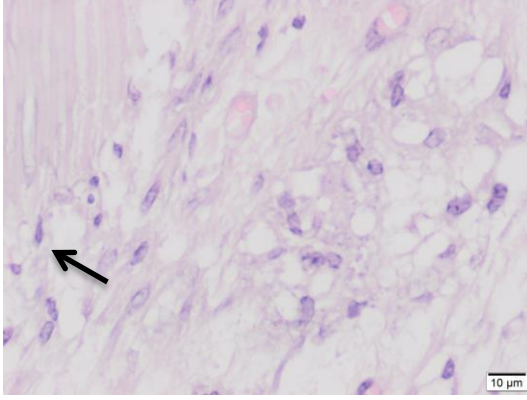
4.2.1.10 MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu Bulguları

MKH uygulaması yapıldıktan sonra tüm büyüme faktörlerinin dramatik olarak en yüksek seviyelere ulaştığı fosforik asit grubundaki dişlerden elde edilen kesitlerde de *in vitro* bulguları destekler nitelikte düzenli yapıda belirgin bir pulpa benzeri dokuya rastlanılmıştır. MKH uygulaması yapılmayan gruplardakinin aksine daha çok sayıda ve organize hücre toplulukları gözlenmiştir. Bağ dokusu ve fibroblast benzeri hücrelerin baskın olduğu düşünülürken, belirgin bir damar yapılanması da tespit edilmiştir. Dentin duvarlarına bakıldığında ise çok sayıda rejenere olan hücre olduğu saptanmıştır (Şekil 156, 157, 158). Yapılan MT boyamaları sonucunda ise yoğun bir kollagen

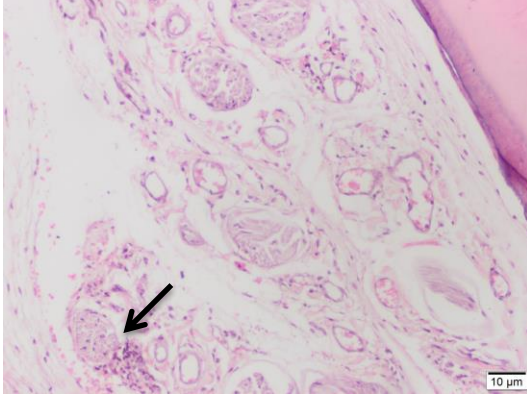
formasyonunun olduğu da görölmüştür (Şekil 159). Alizarin kırmızısı ile yapılan boyama sonucunda yoğun bir kalsifik doku formasyonu tespit edilmiştir (Şekil 160).



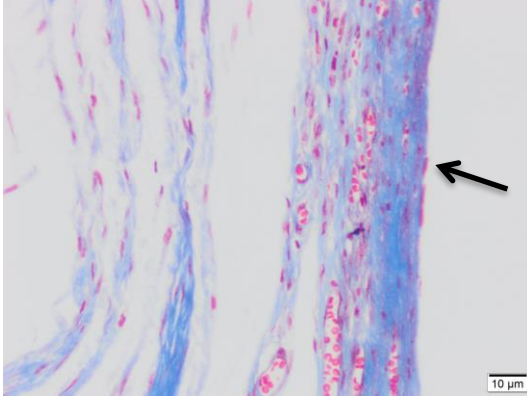
Şekil 156. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinin H&E boyamalarındaki görüntüsü



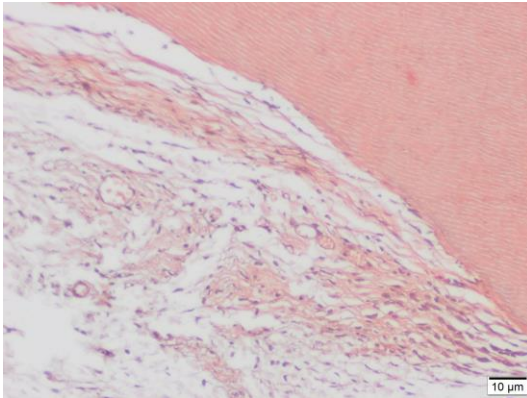
Şekil 157. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinin üzerinde farklılaşmaya çalışan ve odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmış hücrelerin H&E boyamalarındaki görüntüsü



Şekil 158. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki yeni oluşan bağ dokusunun H&E boyamalarındaki görüntüsü

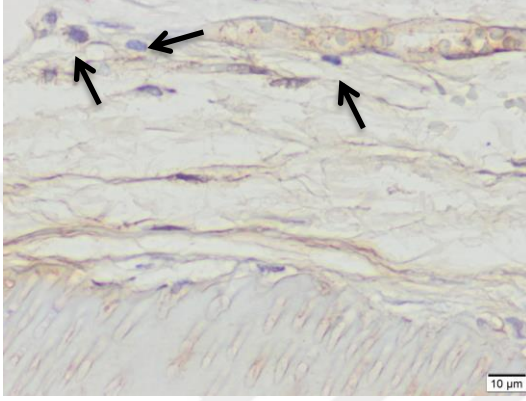


Şekil 159. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki kök dentinine komşu alandaki yoğun kollagen yapımının MT boyamalarındaki görüntüsü

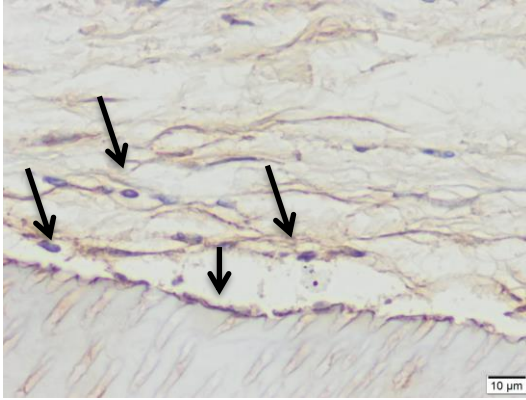


Şekil 160. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit grubundaki dentin duvarına komşu alandaki yoğun kalsifik doku yapımının Alizarin kırmızısı boyamalarındaki görüntüsü

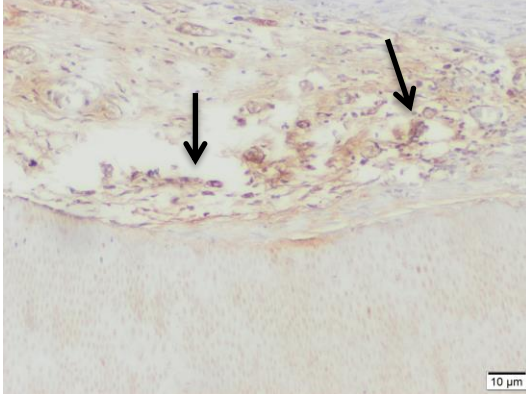
MKH uygulaması yapılan fosforik asit grubunda odontoblast hücrelerinin belirteçlerinden olan Anti-Enamelisin (Şekil 161), Anti-DSP (Şekil 162), Anti-Osteokalsin (Şekil 163), Anti-Osteonektin (Şekil 164) ve Anti-BMP-2 (Şekil 165) boyaları ile alınan görüntülerde hücrelerin bu boyalar ile yoğun bir şekilde boyandığı görülmüştür.



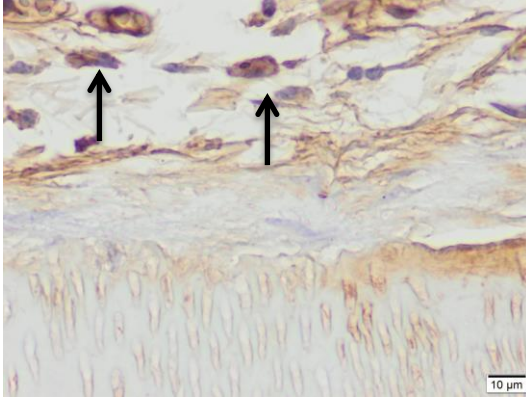
Şekil 161. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Enamelisin boyaması ile görünümü



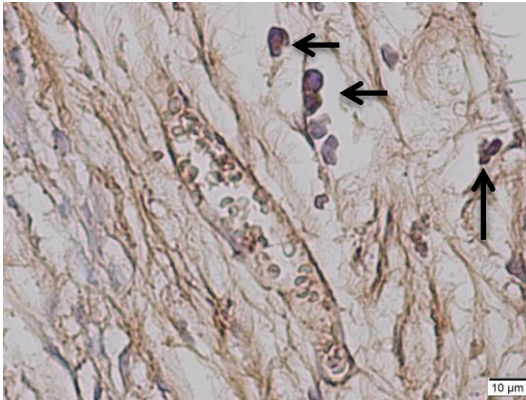
Şekil 162. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-DSP boyaması ile görünümü



Şekil 163. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteokalsin boyaması ile görünümü

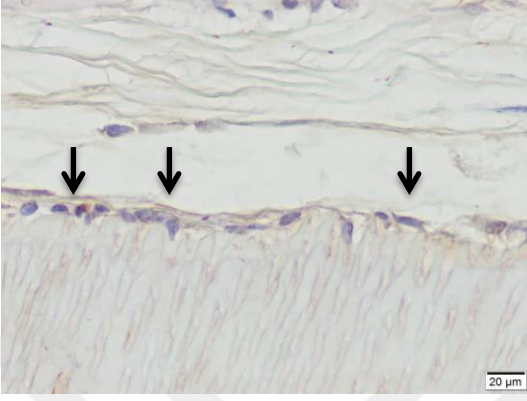


Şekil 164. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Osteonektin boyaması ile görünümü

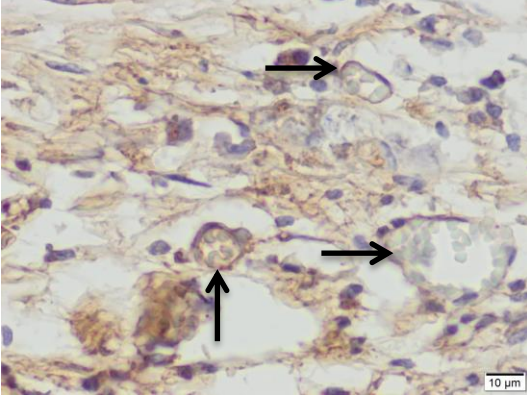


Şekil 165. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-BMP-2 boyaması ile görünümü

Hücrelerin çoğalma ve damarlaşma durumunu tanımlamak için yapılan Anti-Ki67 (Şekil 166) ve Anti-VEGF (Şekil 167) boyamaları:

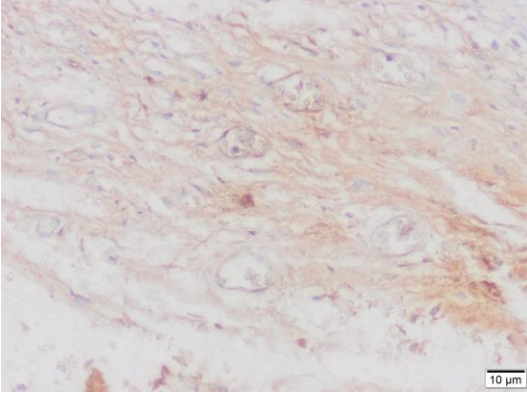


Şekil 166. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-Ki67 boyaması ile görünümü

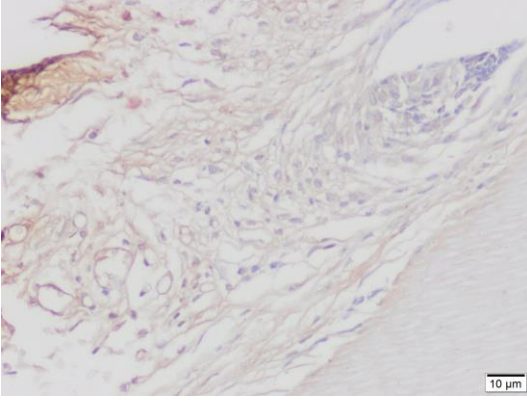


Şekil 167. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-VEGF boyaması ile görünümü

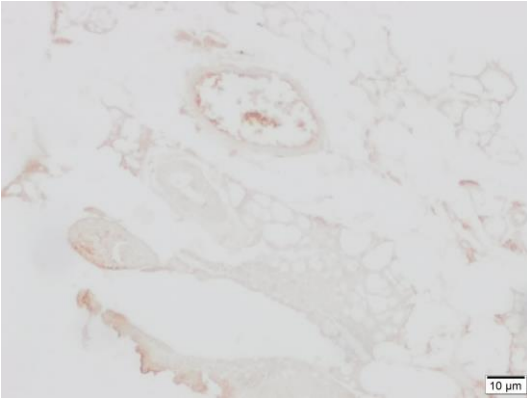
Hücrelerin oksidatif stres ve apoptoz durumlarını göstermek amacıyla yapılan Anti-eNOS (Şekil 168), Anti-iNOS (Şekil 169) ve TUNEL (Şekil 170) boyamalarının görüntüleri:



Şekil 168. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-eNOS boyaması ile görünümü



Şekil 169. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; Anti-iNOS boyaması ile görünümü



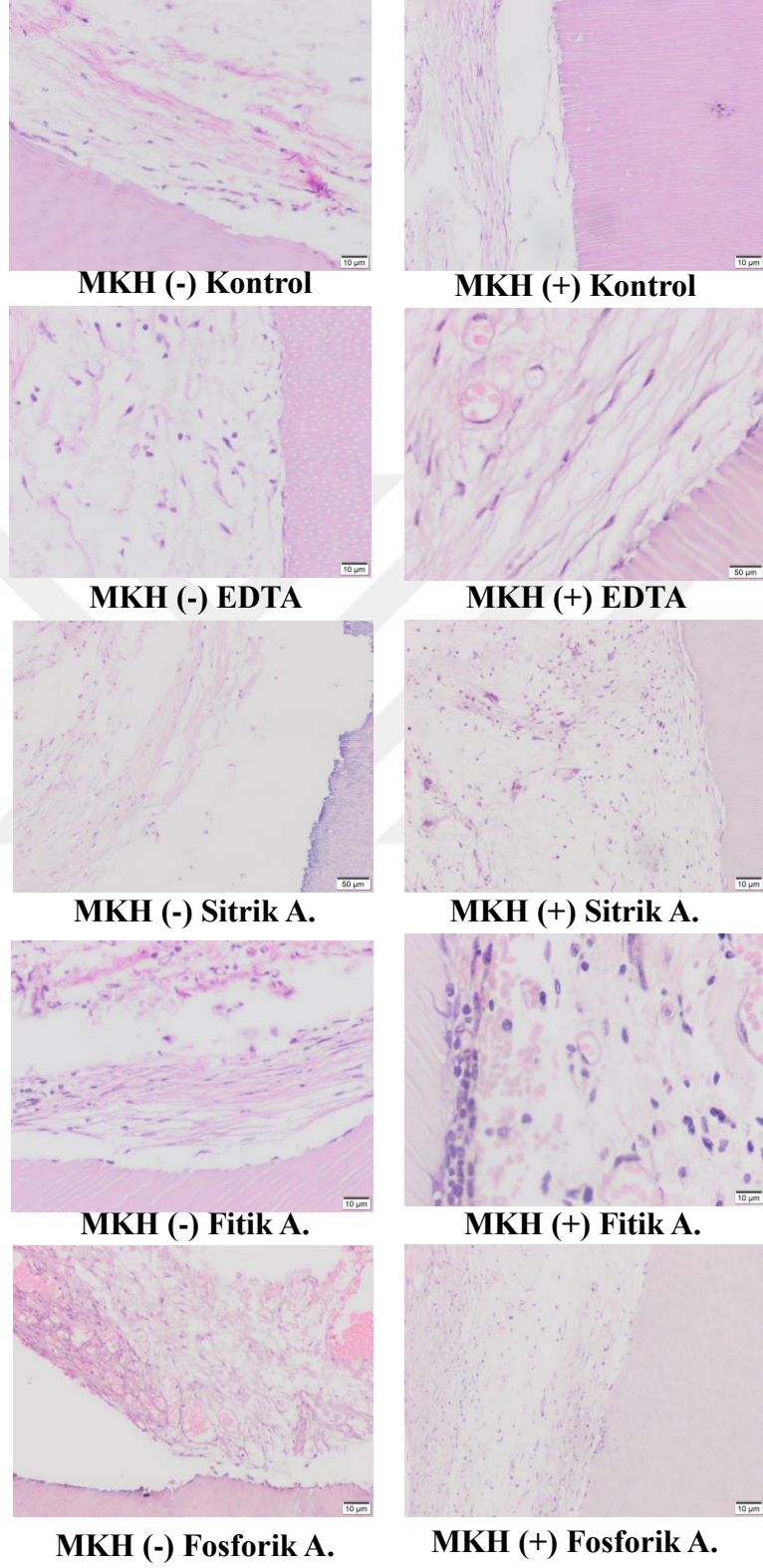
Şekil 170. MKH Uygulaması Yapılan Fosforik Asit Grubu; TUNEL boyaması ile görünümü

4.2.2 Grupların Birbirleriyle Karşılaştırılması

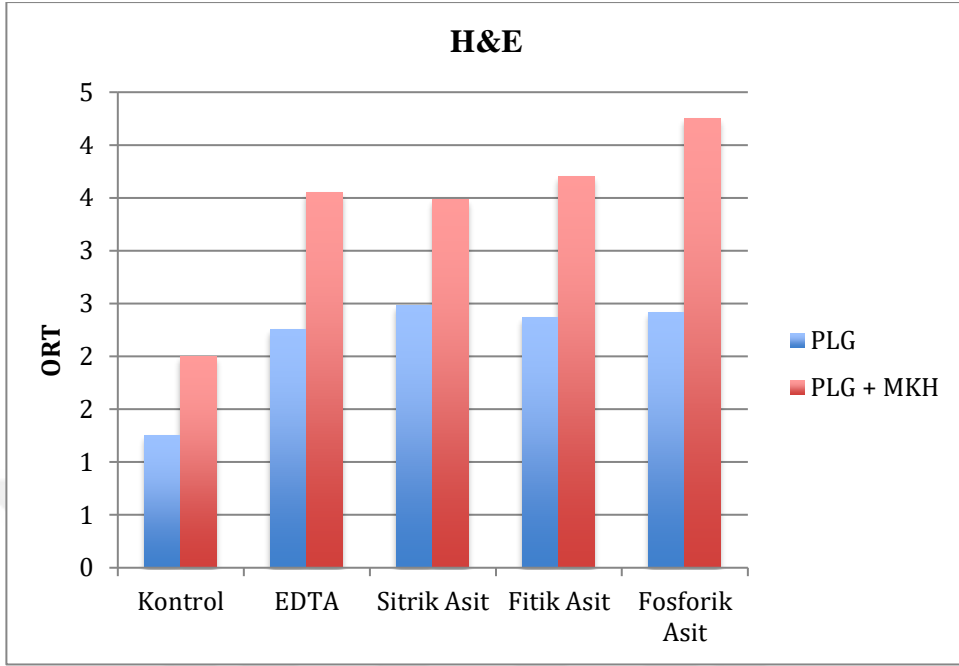
Gruplar arası karşılaştırmalar hem histolojik hem de immünohistokimyasal açıdan yapıldı. İlk karşılaştırma yönteminde dokulardaki hücre sayısı ve yoğunluğu, enflamasyon bulguları ve genel morfolojileri H&E boyaması sonuçları kullanılarak, yeni oluşan kollajen yapı MT boyası kullanılarak, kalsifik doku oluşumu Alizerin Kırmızısı boyaması kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirmeler uzman ve tecrübeli bir histolog gözüyle boyanma yoğunluklarına göre ve 1-5 arasında skorlama ile değerlendirildi. Sonuçlar yorumlandı ve grafikler yardımıyla gösterildi. İkinci karşılaştırmada ise immünohistokimyasal boyamaların sonuçları H-skor yöntemiyle analiz edildi ve istatistiksel veriler grafikler yardımıyla gösterildi.

4.2.2.1 Gruplar Arası Morfolojik Yapının Karşılaştırılması

Morfolojinin değerlendirilmesi amacıyla H&E boyamalarına bakıldığında MKH uygulaması yapılmayan gruplarda MKH uygulaması yapılan gruplara oranla belirgin derecede daha düzensiz ve daha az sayıda hücre toplulukları olduğu görülmüştür. Buna karşın MKH uygulaması yapılan asit gruplarında çok sayıda hücre topluluğu ve damar yapılanması gözlenmiştir. Gözlenen bu hücre topluluklarının MKH uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla çok daha organize olduğu ve özellikle dentin duvarlarında yer yer çok katlı hücre topluluklarına rastlanmıştır (Şekil 171, Grafik 6).

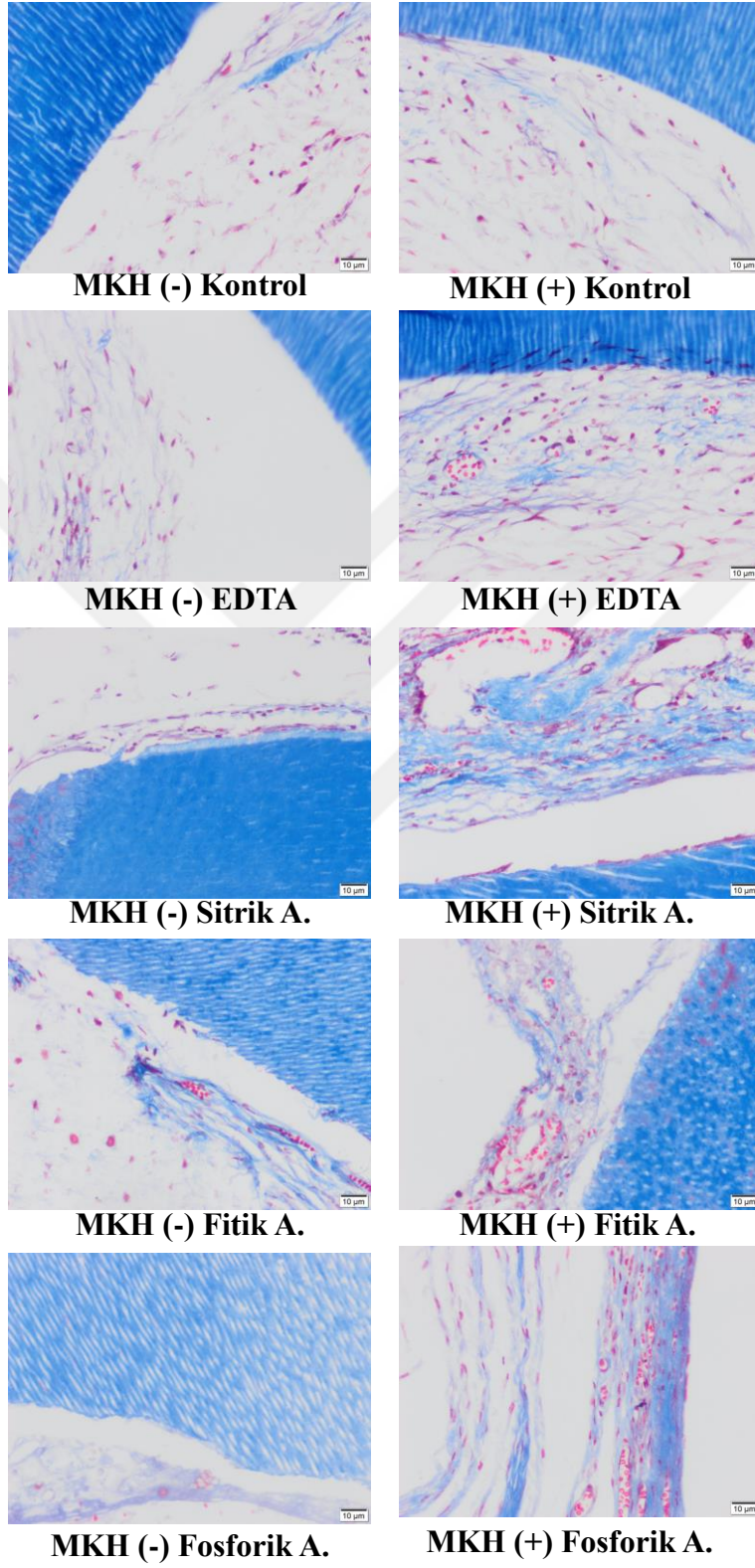


Şekil 171. Deney gruplarının H&E boyaması görüntüleri

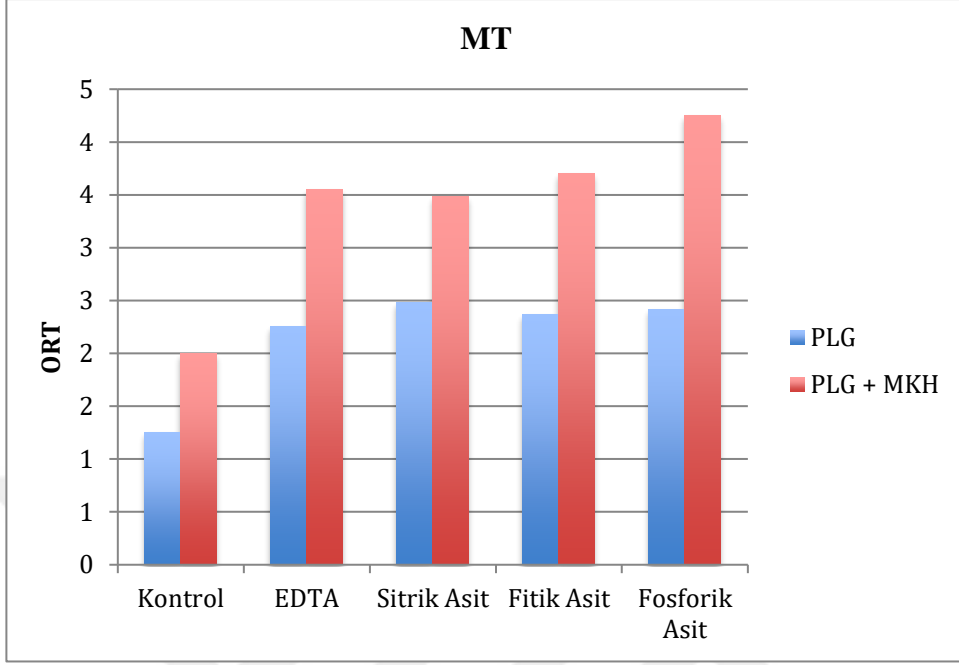


Grafik 6. Morfolojik yapının değerlendirilmesi için kullanılan H&E boyama sonuçları

Yeni oluşan bağ ve kollagen dokunun durumunu belirlemek amacıyla yapılan MT boyamaların gruplar arasındaki karşılaştırılmasında MKH uygulaması yapılan tüm gruplarda MKH uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla daha yoğun boyamalar olduğu tespit edildi. Özellikle asit uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla çok daha yoğun kollagen formasyonu olduğu görülmüştür. Tüm gruplar içinde ise en düşük boyanma yoğunluğunun MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubunda olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın invitro bölümünde sadece asitleme yapılmış gruplardaki dentinden elde edilen FGF-2 düzeyi eser miktardayken ortama MKH girmesiyle birlikte FGF-2 düzeyinin dramatik bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştı, bu bulguda bizim kök hücrelerin büyüme faktörlerinin düzeylerini oldukça belirgin olarak arttırdığı düşüncemizi doğrulamıştır. Kollagen yapımından temelde sorumlu olan fibroblastların rejenerasyonunda en önemli rolü üstlenen FGF-2'nin asitleme ve MKH uygulaması sonrasında ulaştığı yüksek seviye MKH'lerinin fibroblastik rejenerasyona oldukça yoğun olarak uğramalarının en iyi açıklamasıdır (Şekil 172, Grafik 7).

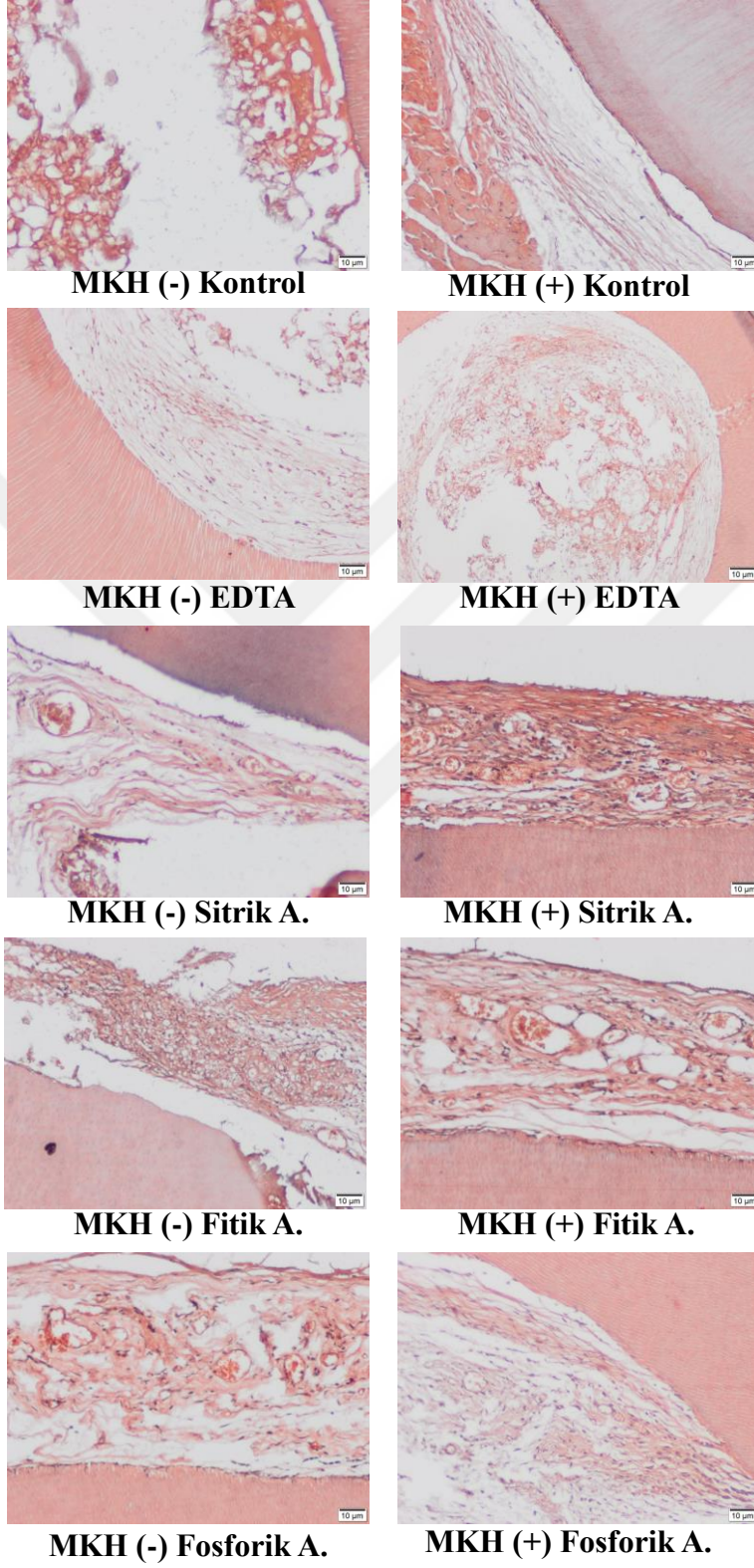


Şekil 172. Deney gruplarının MT boyaması görüntüleri

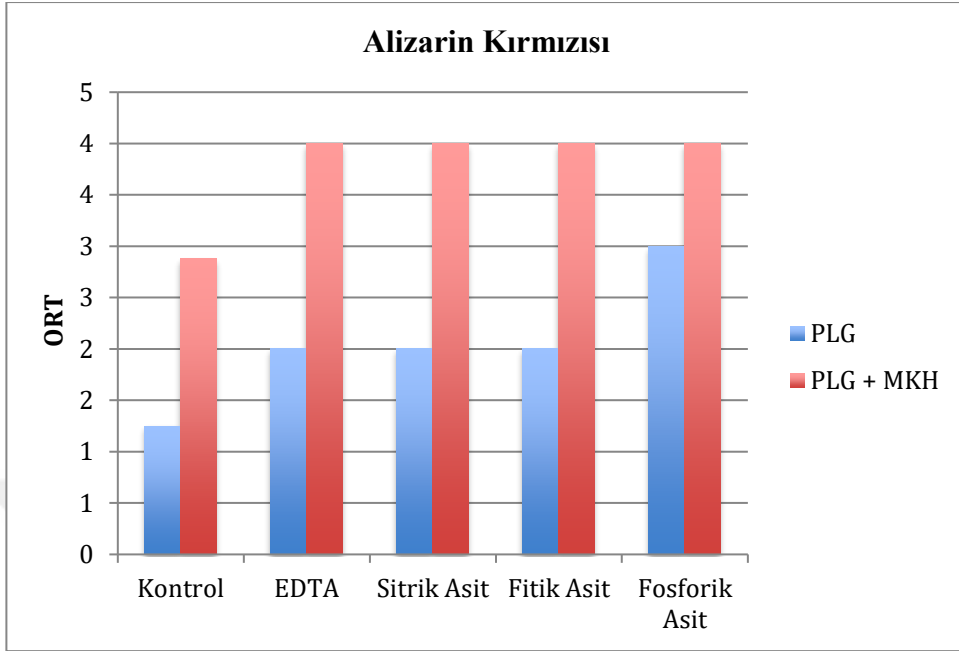


Grafik 7. Yeni oluşan bağ dokusu içindeki kollagen yapımının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan MT boyama sonuçları

Yeni oluşan kalsifiye dokunun durumunu belirlemek amacıyla yapılan Alizarin kırmızısı boyamalarının gruplar arasındaki karşılaştırılmasında MKH uygulaması yapılan tüm gruplarda MKH uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla daha yoğun boyamalar olduğu tespit edildi. Özellikle asit uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla çok daha yoğun kalsifiye doku formasyonu olduğu görülmüştür. Tüm gruplar içinde ise en düşük boyanma yoğunluğunun MKH uygulaması yapılmayan kontrol grubunda olduğu gözlenmiştir. Asit ve MKH uygulaması yapılan gruplarda görülen yoğun kalsifiye doku yapımının hem ortama verilen MKH'lerin hem de asitler ile dentinden salınan BMP-2 gibi faktörlerin kombine etkisi sonucu olduğu düşüncesindeyiz (Şekil 173, Grafik 8).



Şekil 173. Deney gruplarının Alizarin kırmızısı boyaması görüntüleri

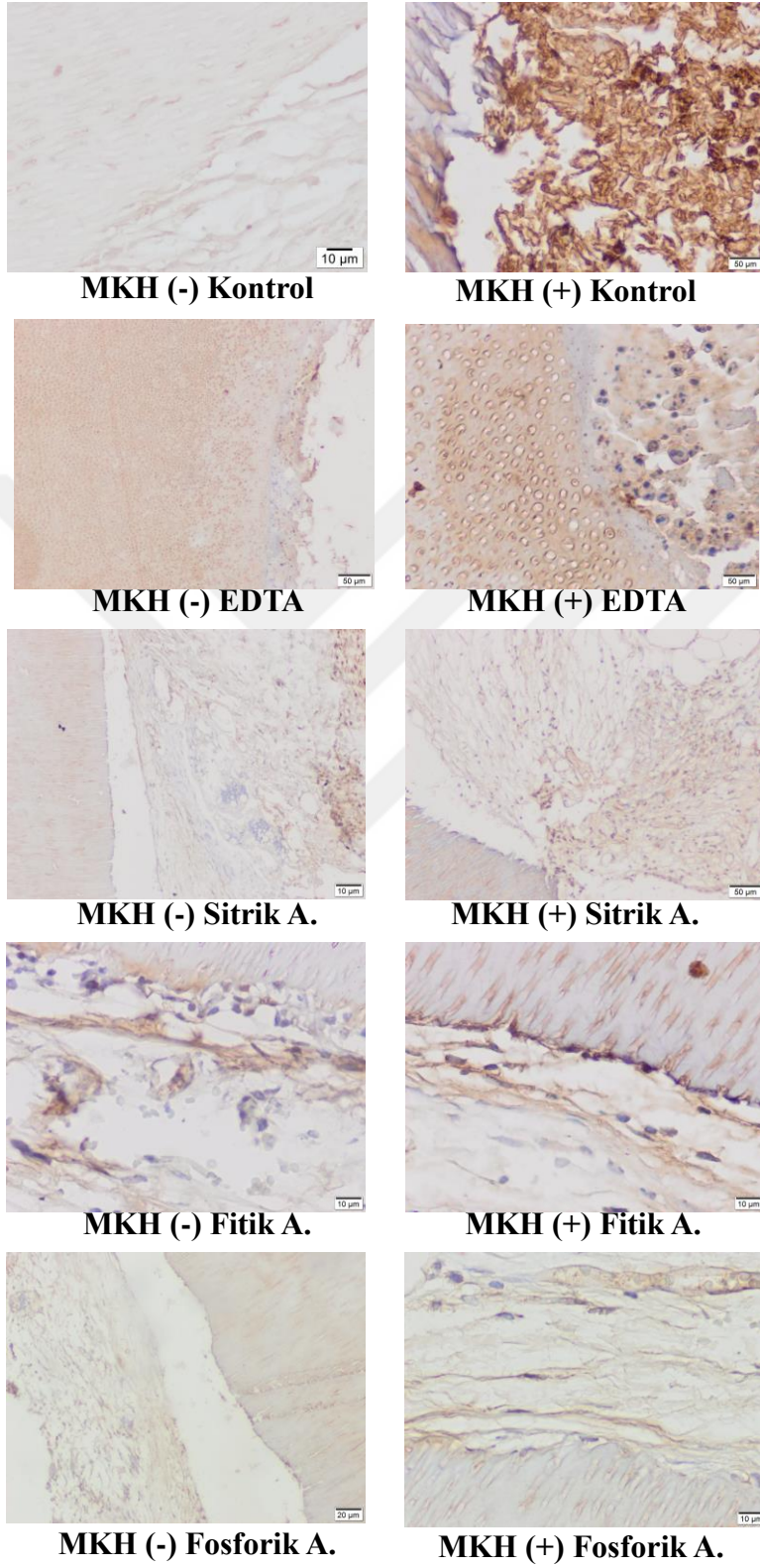


Grafik 8. Kök dentinleri içindeki kalsifiye doku yapımının değerlendirilmesi için kullanılan Alizarin kırmızısı boyama sonuçları

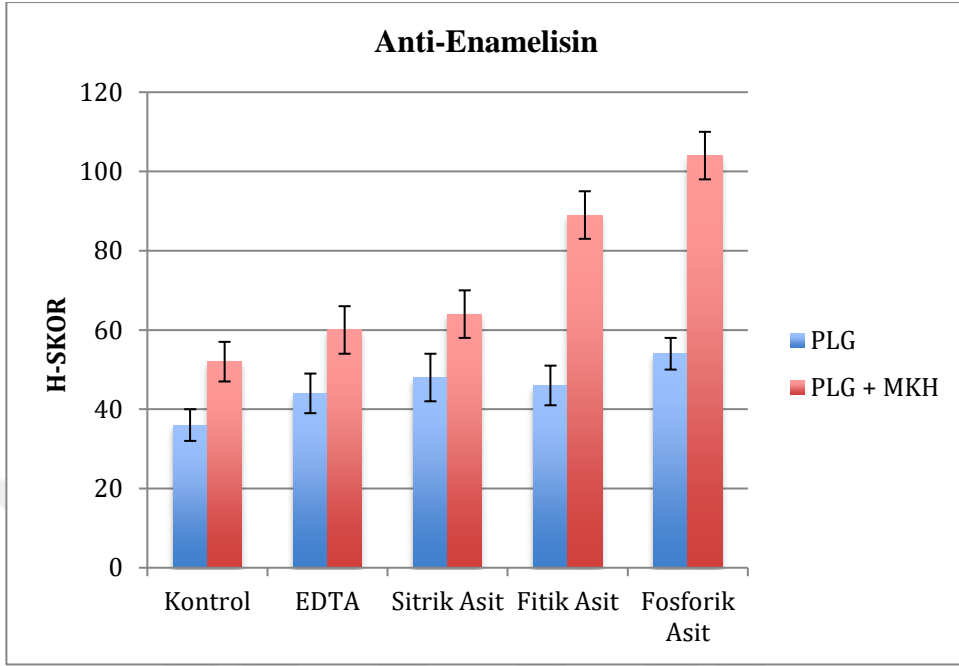
4.2.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

4.2.2.2.1 Anti-Enamelisin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Odontoblastlara özgü farklılaşma belirteçlerinden biri olarak kabul edilen anti-Enamelisin ile yapılan boyama sonuçları değerlendirildiğinde MKH uygulaması yapılmayan asit grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptanmasına rağmen ($p>0,05$), fosforik asit grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,05$). MKH uygulaması yapılan gruplara bakıldığında ise fitik ve fosforik asit gruplarında kendi aralarında anlamlı olmayan ($p>0,05$) fakat kontrol grubuna oranla anlamlı derecede daha yüksek H-skorlar tespit edilmiştir ($p<0,05$). EDTA ve sitrik asit grupları ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir fark saptanmıştır ($p>0,05$). Fosforik asit grubuyla hem EDTA hem de sitrik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu da görülmüştür ($p<0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan grupların kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise fitik ve fosforik asit gruplarında MKH uygulaması sonrası istatistiksel anlamlı düzeyde bir artış gözlenirken ($p<0,05$), diğer grupların kendi içlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 174, Grafik 9, Tablo 11).



Şekil 174. Deney gruplarının Anti-Enamelisin boyaması görüntüleri



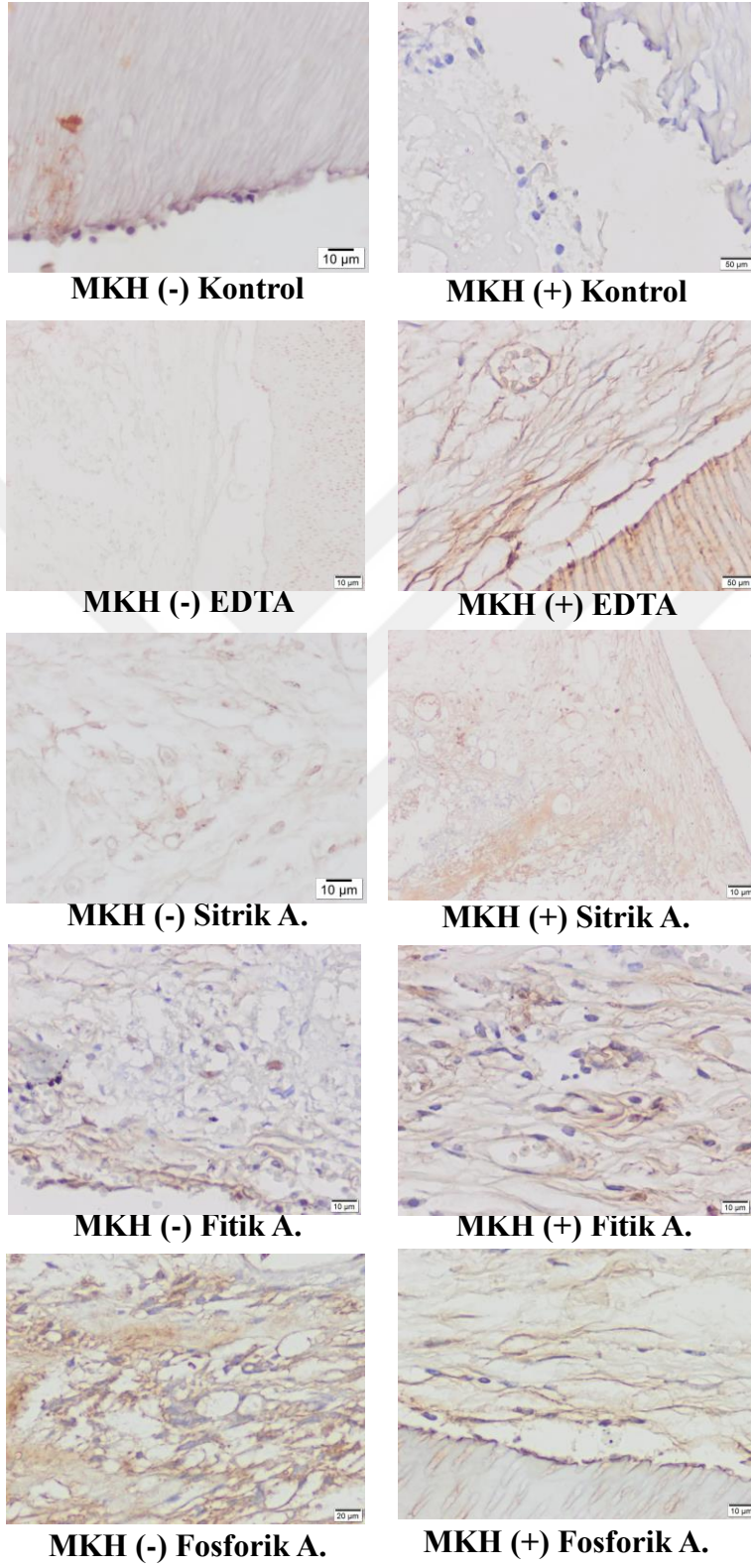
Grafik 9. Odontoblastlara özgü olarak kabul edilen farklılaşma belirteci olan Anti-Enamelisin boyama sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	36,3	4,6
MKH (-) EDTA	44,3	5,6
MKH (-) Sitrik Asit	48,3	6,5
MKH (-) Fitik Asit	46,3	5,7
MKH (-) Fosforik Asit	54,5	4,3
MKH (+) Kontrol	52,3	5,5
MKH (+) EDTA	60,3	6,3
MKH (+) Sitrik Asit	64,6	6,8
MKH (+) Fitik Asit	89,3	5,8
MKH (+) Fosforik Asit	104,8	6,4

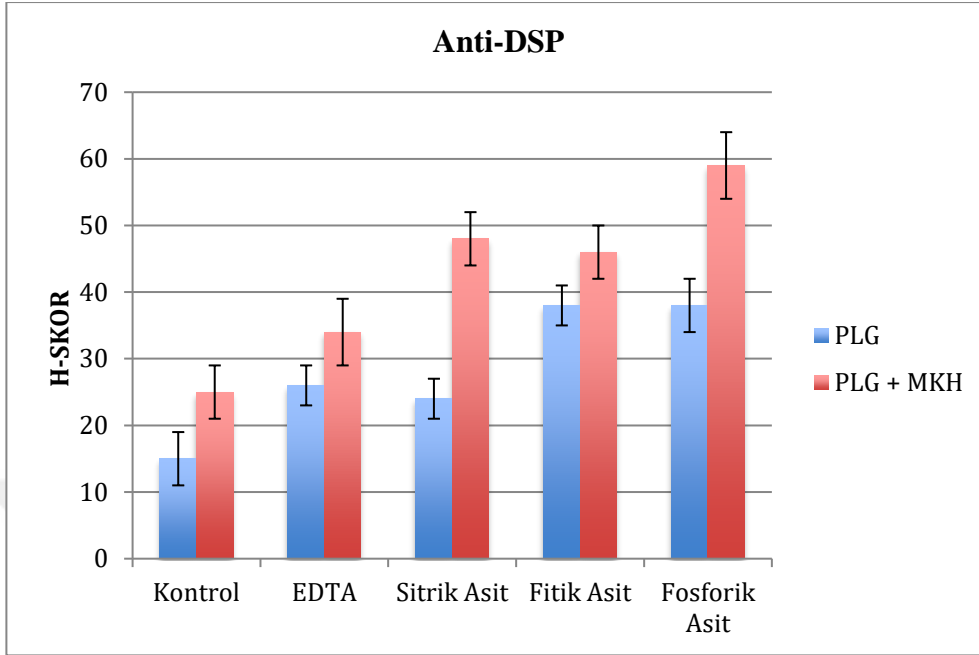
Tablo 11. Grupların anti-Enamelisin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.2 Anti-DSP Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Odontoblastlara özgü farklılaşma belirteçlerinden bir diğeri olarak kabul edilen anti-DSP ile yapılan boyama sonuçları değerlendirildiğinde MKH uygulaması yapılmayan gruplarda asit gruplarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yoğun boyandığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna karşın MKH uygulaması yapılmayan asit grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan gruplara bakıldığında ise fosforik asit grubunun kontrol ve EDTA gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yoğun boyandığı saptanmış olup ($p<0,05$), sitrik asit ve fitik asit gruplarıyla arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Kontrol grubu ve EDTA grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise kontrol, EDTA, sitrik ve fosforik asit gruplarında MKH uygulaması sonrası anlamlı derecede bir artış gözlenirken ($p<0,05$), fitik asit grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 175, Grafik 10, Tablo 12).



Şekil 175. Deney gruplarının Anti-DSP boyaması görüntüleri



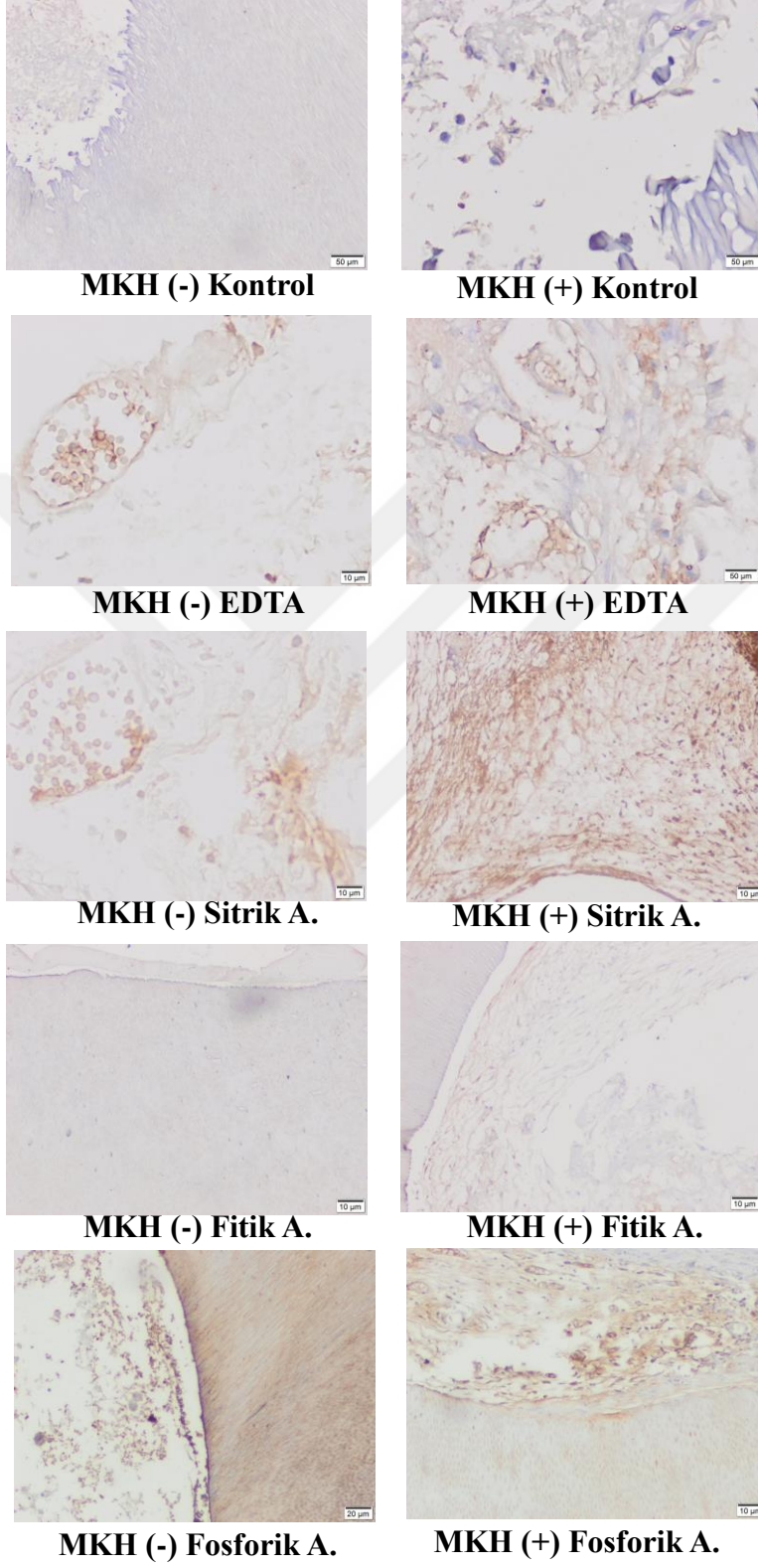
Grafik 10. Odontoblastlara özgü olarak kabul edilen farklılaşma belirteci olan Anti-DSP boyama sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	15,3	4,2
MKH (-) EDTA	26,3	3,6
MKH (-) Sitrik Asit	24,3	3,8
MKH (-) Fitik Asit	38,3	3,8
MKH (-) Fosforik Asit	38,3	4,1
MKH (+) Kontrol	25,6	4,2
MKH (+) EDTA	34,3	5,2
MKH (+) Sitrik Asit	48,3	4,8
MKH (+) Fitik Asit	46,3	4,4
MKH (+) Fosforik Asit	59,3	5,1

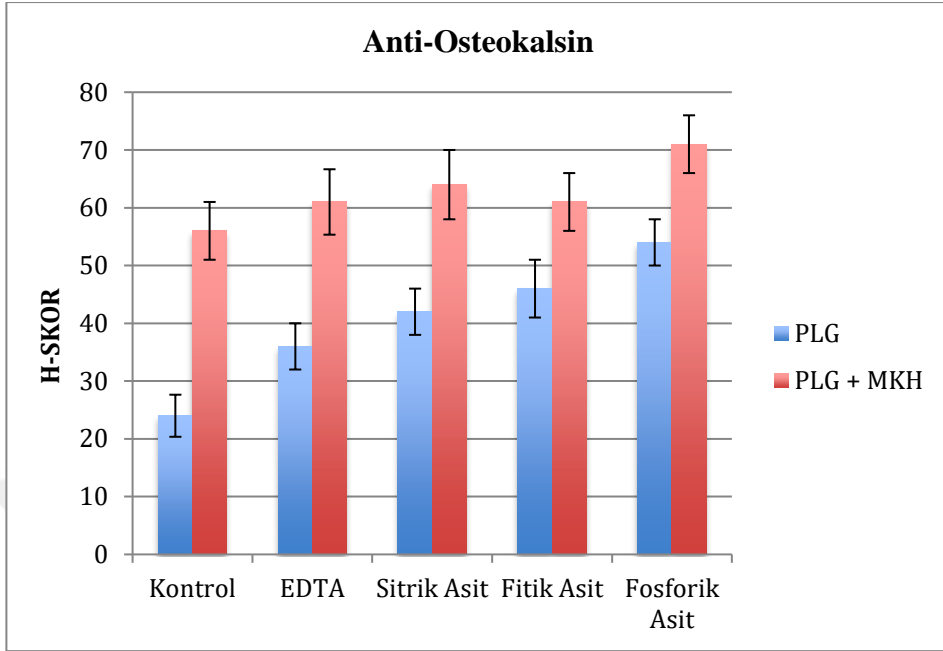
Tablo 12. Grupların anti-DSP boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.3 Anti-Osteokalsin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Anti-Osteokalsin boyaması rejenere olabilen kök hücrelerin geç dönem reaksiyonlarını görebilmek amacıyla kullanılmaktadır. MKH uygulaması yapılmayan grupların sonuçlarına bakıldığında en yoğun boyanma fosforik asit grubunda gözlenmiş olup kontrol ve EDTA gruplarıyla arasında anlamlı bir fark gözlenmiş olurken ($p < 0,05$), sitrik ve fitik asit gruplarıyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Sitrik asit ve fitik asit grupları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) saptanmamasına rağmen bu gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. EDTA grubu ile sitrik ve fitik asit grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir ilişki olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). MKH uygulaması yapılan gruplara bakıldığında ise en yoğun boyanma fosforik asit grubunda gözlenmiş olup kontrol grubuyla arasında anlamlı düzeyde bir fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Buna rağmen diğer asit gruplarıyla arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol, EDTA, sitrik ve fitik asit grupları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir ilişki olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise kontrol, EDTA, sitrik ve fosforik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,05$) gözlenmekle beraber fitik asit grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 176, Grafik 11, Tablo13). Bu bulgular bizde özellikle fosforik asit, sitrik asit ve fitik asit uygulamalarını takiben ortama kök hücrelerin de katılımı sonrasında geç dönemde MKH'lerin kalsifik rejenerasyondan sorumlu hücrelere dönüşüm göstereceği düşüncesini kuvvetlendirmiştir.



Şekil 176. Deney gruplarının Anti-Osteokalsin boyaması görüntüleri



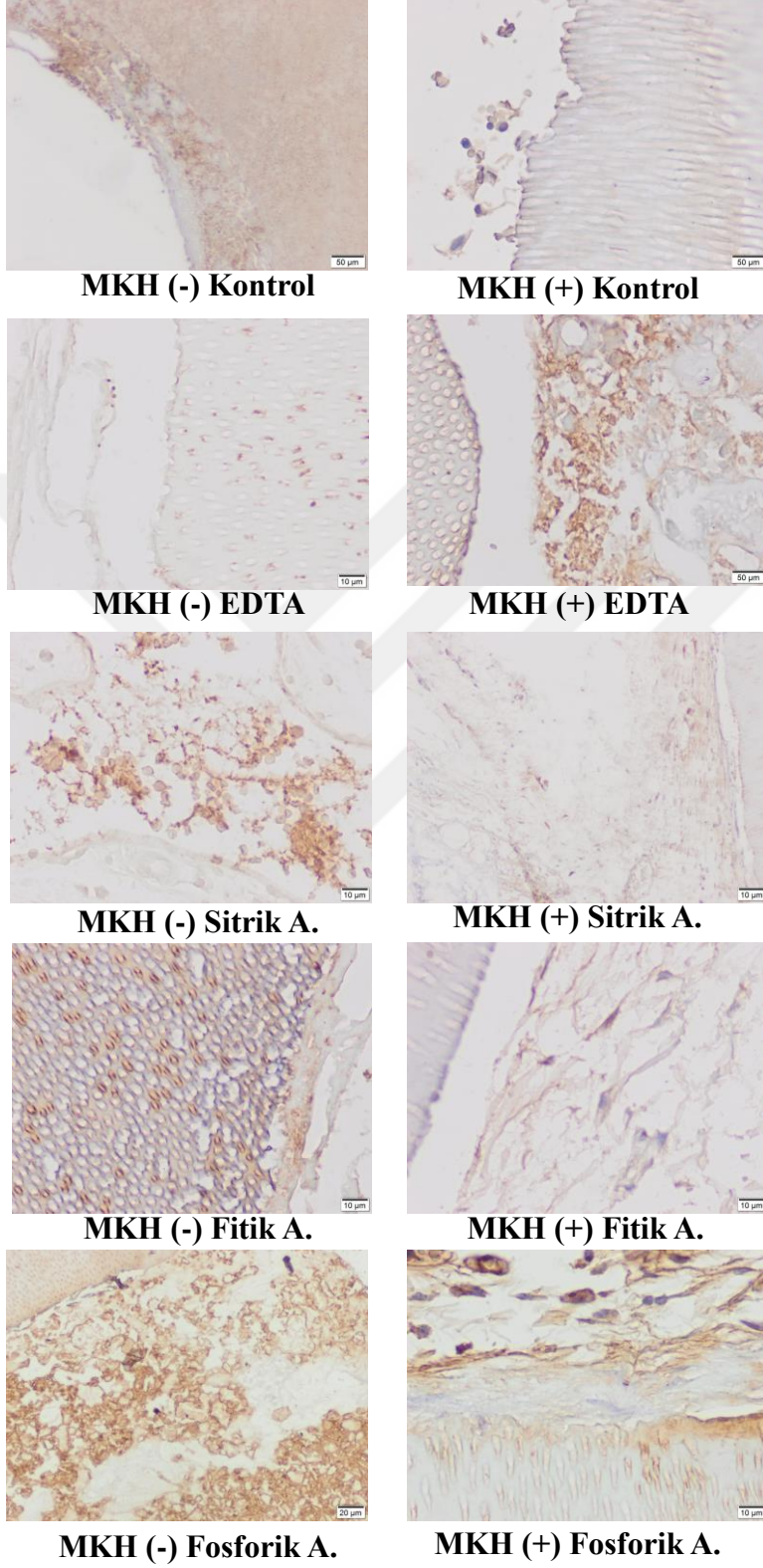
Grafik 11. Rejenere olan hücrelerin geç dönem reaksiyon belirteci olan Anti-Osteokalsin boyama sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	24,5	4,3
MKH (-) EDTA	36,3	3,9
MKH (-) Sitrik Asit	42,3	4,6
MKH (-) Fitik Asit	46,8	5,1
MKH (-) Fosforik Asit	54,3	4,5
MKH (+) Kontrol	56,3	5,3
MKH (+) EDTA	61,3	6,3
MKH (+) Sitrik Asit	64,3	5,8
MKH (+) Fitik Asit	61,6	5,6
MKH (+) Fosforik Asit	71,3	5,4

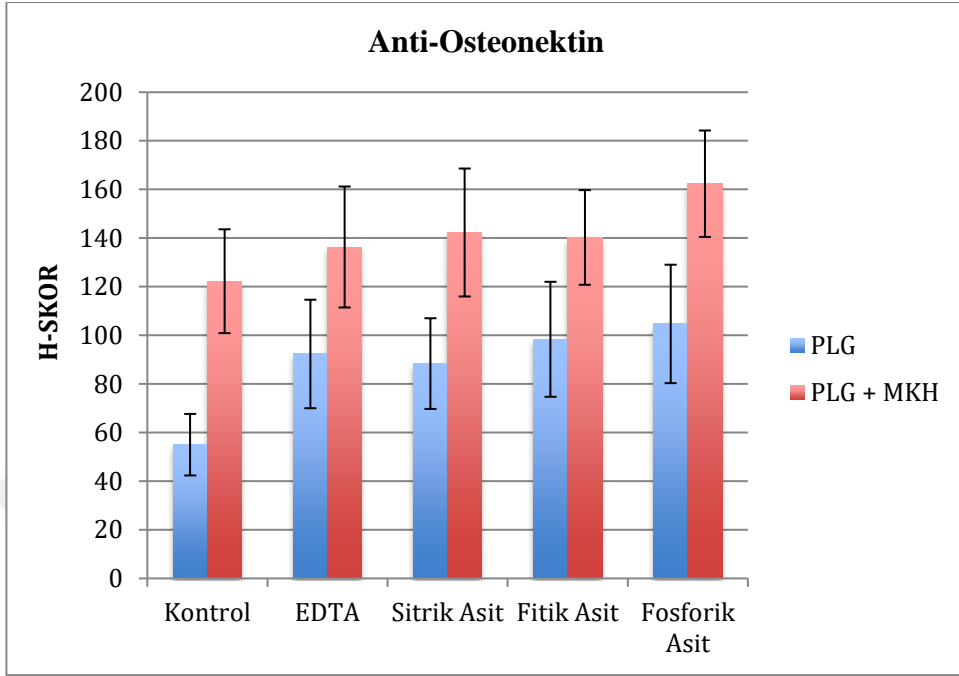
Tablo 13. Grupların anti-Osteokalsin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.4 Anti-Osteonektin Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Kalsifik rejenerasyon yapma gücü olan hücrelerin erken dönem reaksiyonlarının gösterilmesi için kullanılan anti-Osteonektin boyaması sonucunda hem MKH uygulaması yapılmayan hem de MKH uygulaması yapılan gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise tüm grupların kendi içlerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir ilişki saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 177, Grafik 12, Tablo 14). Bu grubun sonuçlarına bakıldığında, rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarında osteo ve odontojenik rejenerasyonların erken dönemden ziyade geç dönemlerde daha belirgin bir şekilde ortaya çıkacağı düşüncemiz pekişmiştir.



Şekil 177. Deney gruplarının Anti-Osteonektin boyaması görüntüleri



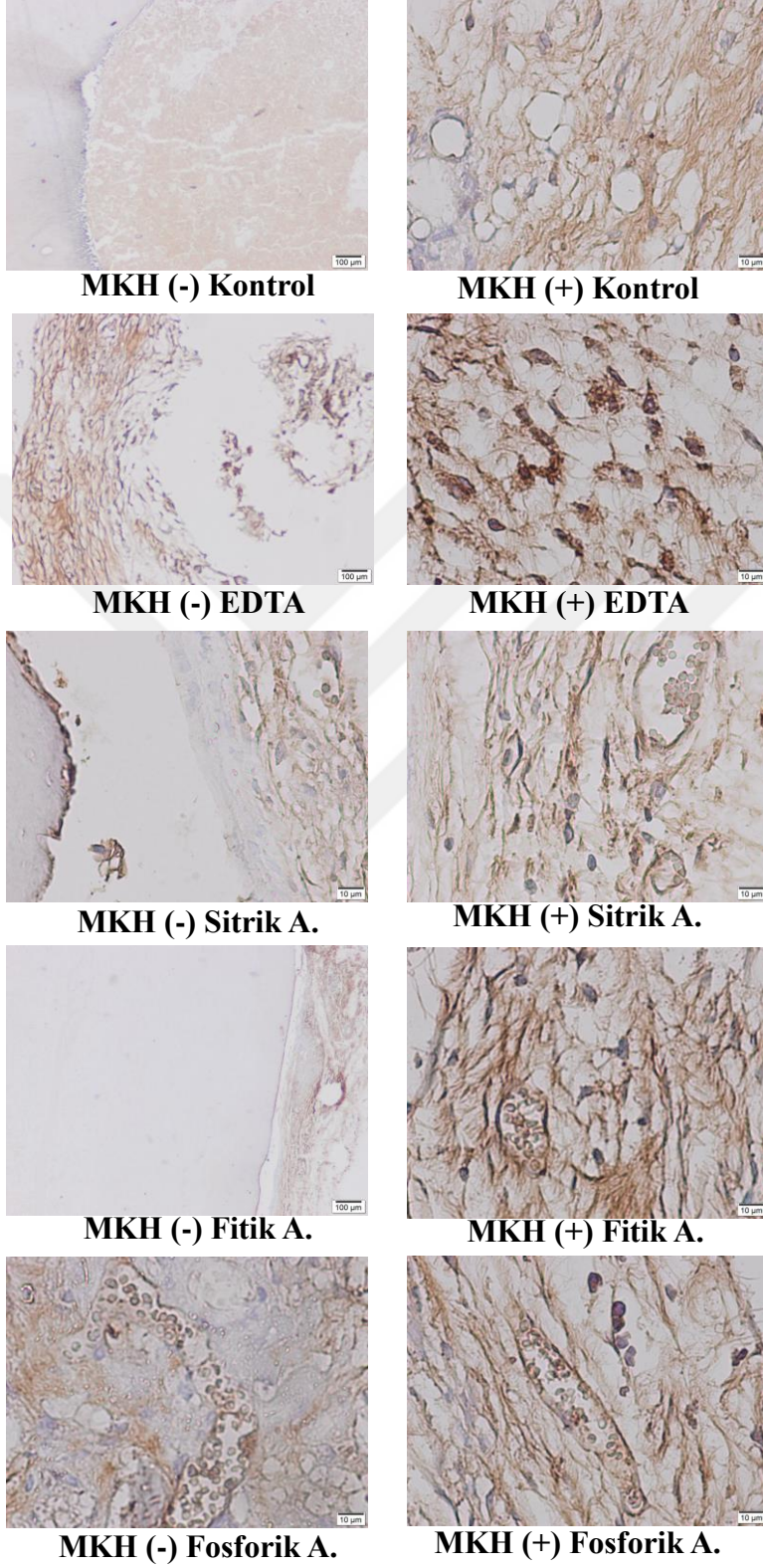
Grafik 12. Kalsifik rejenerasyon yapma gücü olan hücrelerin erken dönem reaksiyonlarının gösterilmesi için kullanılan Anti-Osteonektin boyama sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	55,5	12,6
MKH (-) EDTA	92,3	22,3
MKH (-) Sitrik Asit	88,3	18,6
MKH (-) Fitik Asit	98,3	23,6
MKH (-) Fosforik Asit	104,6	24,3
MKH (+) Kontrol	122,2	21,3
MKH (+) EDTA	136,3	24,8
MKH (+) Sitrik Asit	142,2	26,3
MKH (+) Fitik Asit	140,2	19,4
MKH (+) Fosforik Asit	162,3	21,8

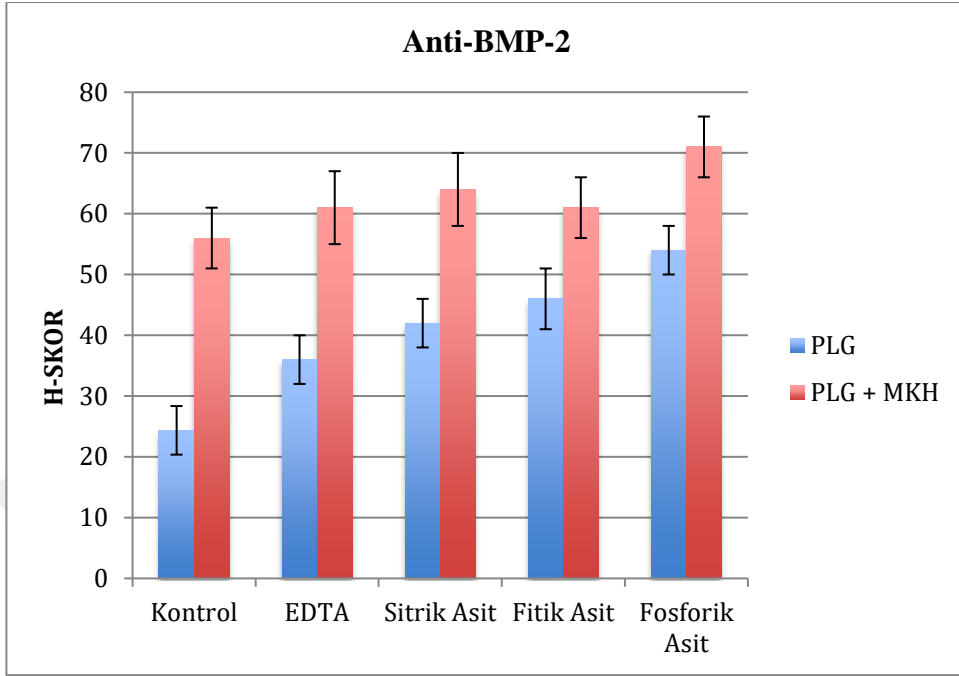
Tablo 14. Grupların anti-Osteonektin boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.5 Anti-BMP-2 Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Osteoblastik özelliği ve kalsifik rejenerasyon yeteneği yüksek olan hücrelerin boyanmasında kullanılan anti-BMP-2 boyaması sonucunda MKH uygulaması yapılmayan gruplarda fosforik asit grubu en yoğun boyanan grup olup kontrol ve EDTA grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Fakat sitrik asit ve fitik asit gruplarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir ilişki olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Fitik ve sitrik asit grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki saptanmış olup ($p<0,05$), EDTA grubu ile anlamlı olmayan düzeyde bir ilişki olduğu görülmüştür ($p>0,05$). EDTA ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan gruplara bakıldığında ise yalnızca fosforik asit ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir ilişki ($p<0,05$) varken diğer gruplar arasında anlamlı düzeyde bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise kontrol, EDTA, sitrik ve fosforik asit gruplarının kendi içlerinde anlamlı düzeyde farklar ($p<0,05$) saptanmış olup fitik asit grubunda istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Şekil 178, Grafik 13, Tablo 15).



Şekil 178. Deney gruplarının Anti-BMP-2 boyaması görüntüleri



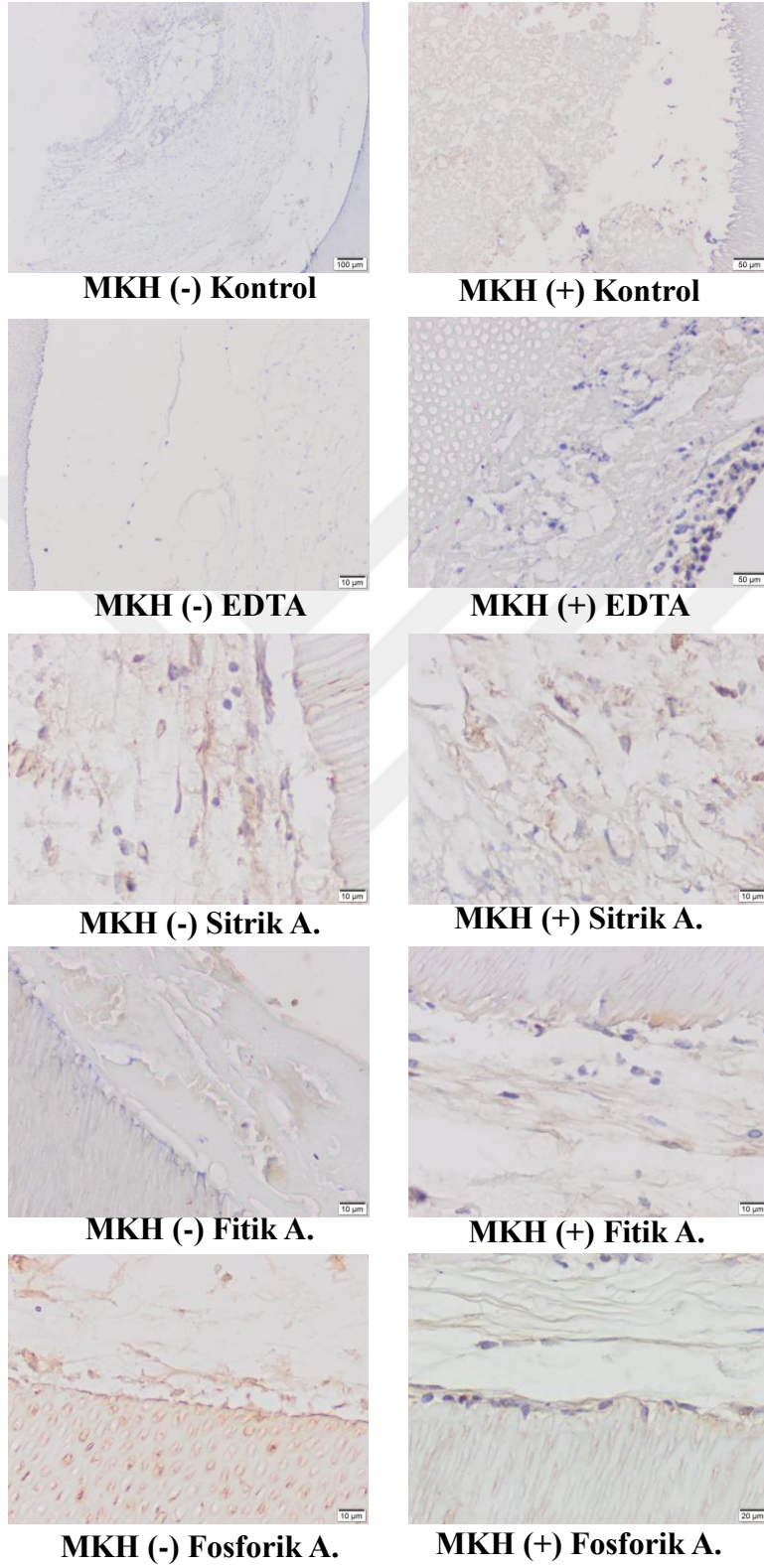
Grafik 13. Osteoblastik özelliği ve kalsifik rejenerasyon yeteneği yüksek olan hücrelerin boyanmasında kullanılan anti-BMP-2 boyaması sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	24,5	4,3
MKH (-) EDTA	36,3	3,9
MKH (-) Sitrik Asit	42,3	4,6
MKH (-) Fitik Asit	46,8	5,1
MKH (-) Fosforik Asit	54,3	4,5
MKH (+) Kontrol	56,3	5,3
MKH (+) EDTA	61,3	6,3
MKH (+) Sitrik Asit	64,3	5,8
MKH (+) Fitik Asit	61,6	5,6
MKH (+) Fosforik Asit	71,3	5,4

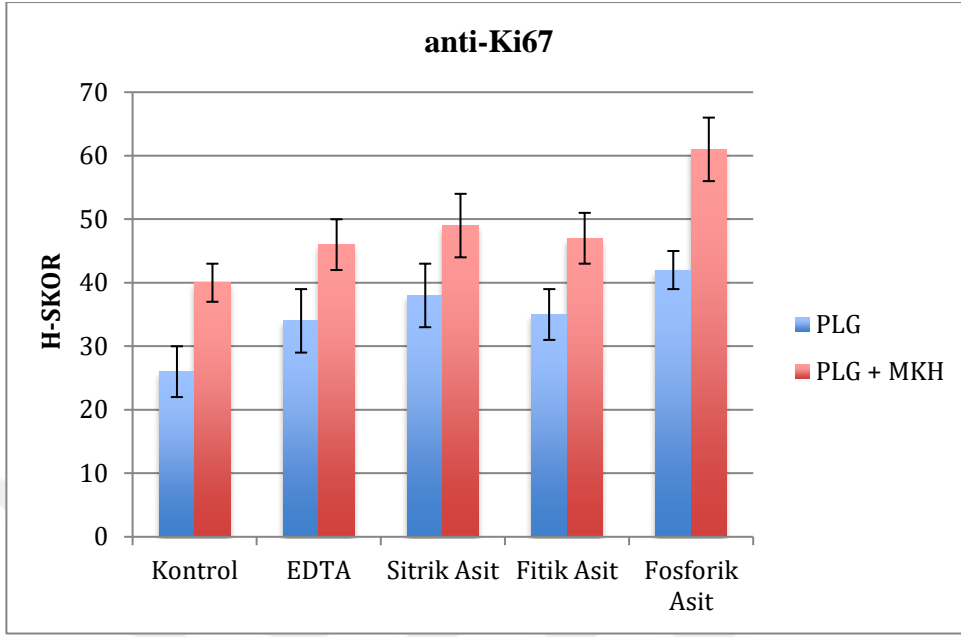
Tablo 15. Grupların anti-BMP-2 boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.6 Anti-Ki67 Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hücrelerin proliferasyonunu göstermek amacıyla kullanılan anti-Ki67 bulgularına bakıldığında MKH uygulaması yapılmayan gruplar için en yüksek H-skor değerinin fosforik asit grubunda olduğu görülmüş olup kontrol grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark olduğu saptandı ($p < 0,05$). Asit grupları arasında anlamlı bir fark ($p > 0,05$) bulunamamakla beraber kontrol, EDTA, sitrik ve fitik asit grupları arasında da anlamlı düzeyde bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). MKH uygulaması yapılan gruplara bakıldığında ise benzer şekilde en yoğun boyanma fosforik asit grubunda gözlenmiş olup kontrol, EDTA ve fitik asit gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki saptanmıştır ($p < 0,05$). Fosforik ve sitrik asit arasında da anlamlı olmayan düzeyde bir ilişkinin olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). Kontrol, EDTA, sitrik ve fitik grupları arasında da istatistiksel anlamda bir fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise kontrol ve fosforik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklar ($p < 0,05$) gözlenmiş olup, EDTA, sitrik ve fitik asit grupları içinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeylerde ilişkiler saptanmıştır ($p > 0,05$) (Şekil 179, Grafik 14, Tablo 16).



Şekil 179. Deney gruplarının Anti-Ki67 boyaması görüntüleri



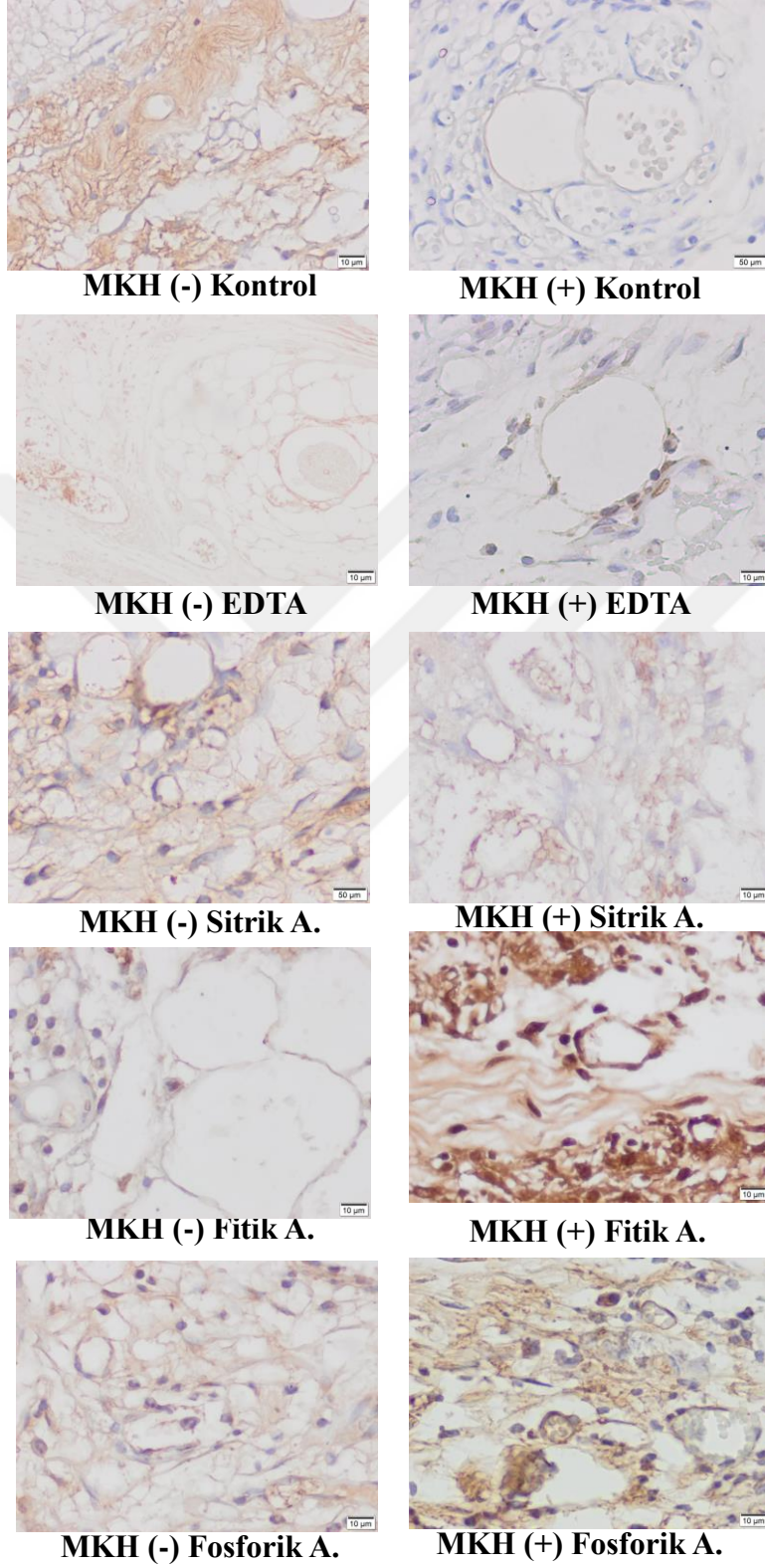
Grafik 14. Hücrelerin geçmişe dönük proliferasyonunu göstermek amacıyla kullanılan anti-Ki67 boyaması sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	26,3	4,3
MKH (-) EDTA	34,3	5,3
MKH (-) Sitrik Asit	38,8	5,3
MKH (-) Fitik Asit	35,6	4,6
MKH (-) Fosforik Asit	42,3	3,5
MKH (+) Kontrol	40,6	3,2
MKH (+) EDTA	46,3	4,6
MKH (+) Sitrik Asit	49,6	5,3
MKH (+) Fitik Asit	47,3	4,2
MKH (+) Fosforik Asit	61,3	5,3

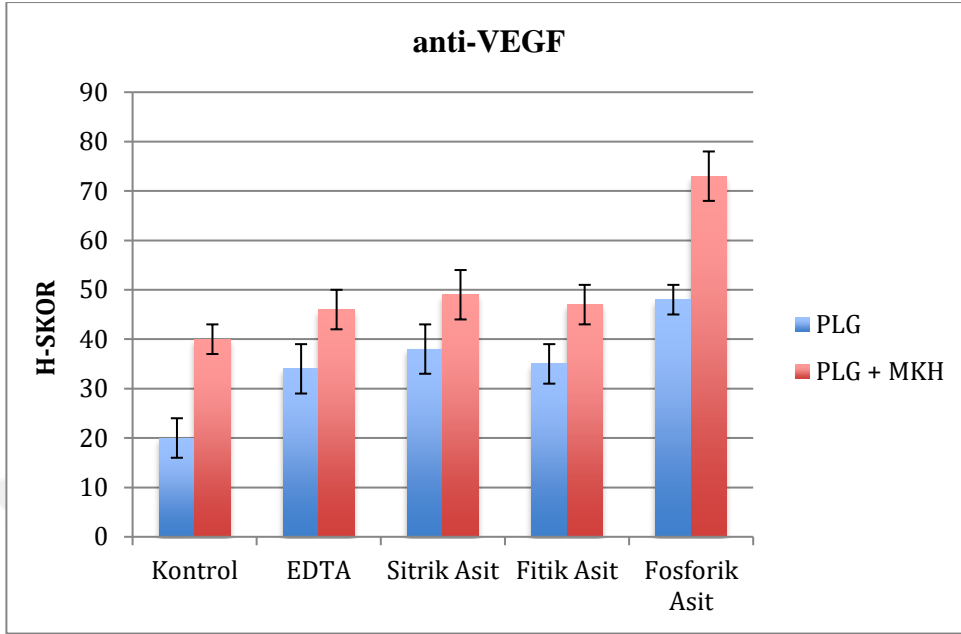
Tablo 16. Grupların anti-Ki67 boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

4.2.2.2.7 Anti-VEGF Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Yeni damar yapılanmasının gösterilmesi amacıyla kullanılan anti-VEGF boyamasının sonucunda MKH uygulanmayan gruplarda en yoğun boyanma fosforik asit grubunda görülmüş olup kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Buna rağmen fosforik asit grubu diğer asit gruplarıyla kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir ilişki olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Kontrol, EDTA, sitrik ve fitik asit grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan grupların sonuçlarına bakıldığında benzer şekilde fosforik asit grubunda en yoğun boyanmaların olduğu görülmekle beraber kontrol, EDTA ve fitik asit gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Buna rağmen fosforik asit grubuyla sitrik asit grubu arasında anlamlı düzeyde bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). MKH uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplarının kendi arasındaki ilişkilere bakıldığında ise kontrol ve fosforik asit grupları içinde istatistiksel olarak anlamlı farklar ($p<0,05$) gözlenmiş olup diğer asit gruplarında anlamlı olmayan düzeylerde artışların olduğu görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 180, Grafik 15, Tablo 17).



Şekil 180. Deney gruplarının Anti-VEGF boyaması görüntüleri



Grafik 15. Yeni damar yapılanmasının gösterilmesi amacıyla kullanılan anti-VEGF boyamasının sonuçları

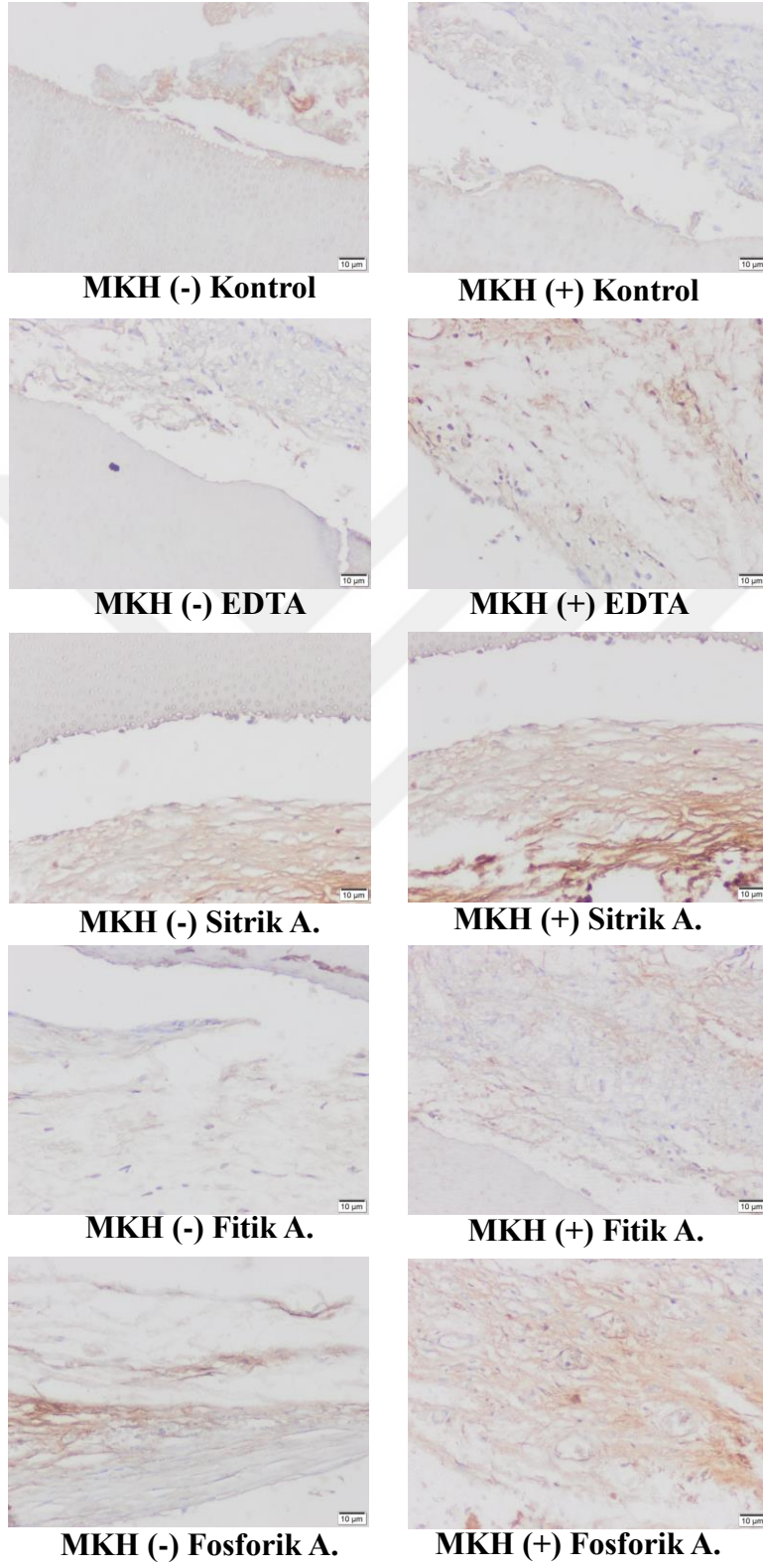
	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	20,3	4,3
MKH (-) EDTA	34,3	5,3
MKH (-) Sitrik Asit	38,8	5,3
MKH (-) Fitik Asit	35,6	4,6
MKH (-) Fosforik Asit	48,3	3,5
MKH (+) Kontrol	40,6	3,2
MKH (+) EDTA	46,3	4,6
MKH (+) Sitrik Asit	49,6	5,3
MKH (+) Fitik Asit	47,3	4,2
MKH (+) Fosforik Asit	73,3	5,3

Tablo 17. Grupların anti-VEGF boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

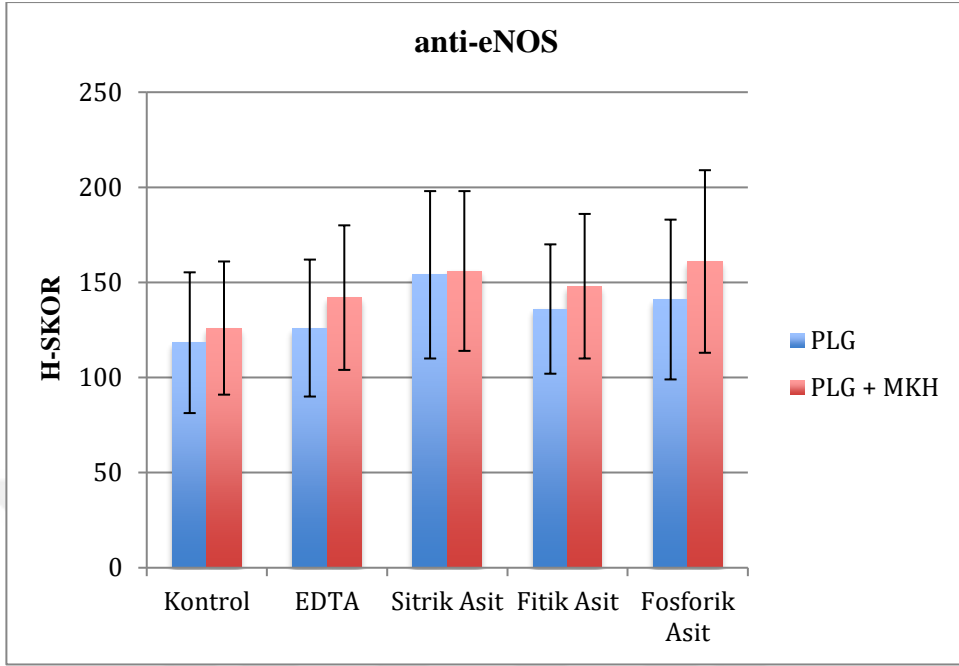
4.2.2.2.8 Anti-eNOS ve Anti-iNOS Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Endotelyal (eNOS) ve immün sistem (iNOS) içindeki aktif hücrelerin salgıladıkları Nitrik Oksit Sentaz enzimlerinin boyanmasında kullanılan bu iki boyamada, boyanma düzeylerinin tüm gruplarda bazal düzeyde olduğu ve gruplar arasında anlamlı olmayan bir ilişkinin varlığı saptandı ($p>0,05$). Bazal düzeydeki boyanmalar, hücresel faaliyetlerin gelişimlerinde enflamasyon gibi herhangi bir normal dışılığın olmadığı ifade anlamına gelmektedir. Asit veye kök hücre uygulamasının anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü (Şekil 181, 182, Grafik 16, 17, Tablo 18, 19).





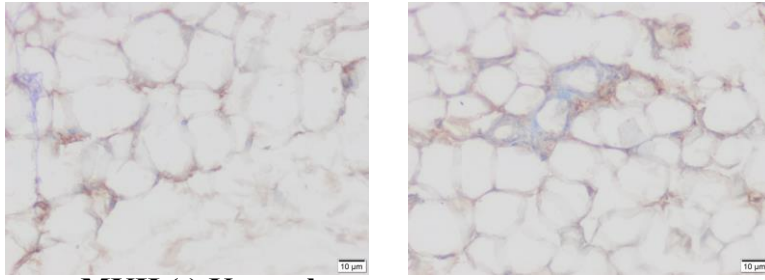
Şekil 181. Deney gruplarının Anti-eNOS boyaması görüntüleri



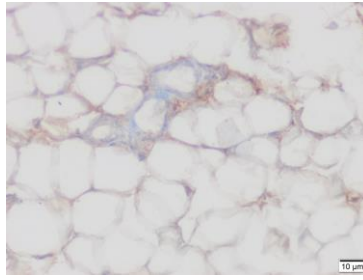
Grafik 16. Pulpa rejenerasyonunda ortamdaki oksidatif stresi belirlemek için yapılan anti-eNOS boyamasının sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	118,3	36,9
MKH (-) EDTA	126,6	36,7
MKH (-) Sitrik Asit	154,6	44,3
MKH (-) Fitik Asit	136,3	34,6
MKH (-) Fosforik Asit	141,3	42,2
MKH (+) Kontrol	126,3	35,6
MKH (+) EDTA	142,3	38,3
MKH (+) Sitrik Asit	156,3	42,2
MKH (+) Fitik Asit	148,3	38,3
MKH (+) Fosforik Asit	161,3	48,3

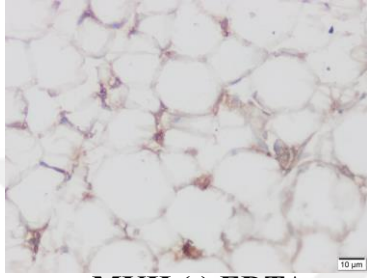
Tablo 18. Grupların anti-eNOS boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri



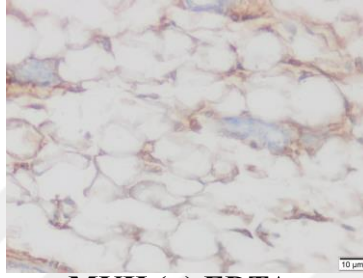
MKH (-) Kontrol



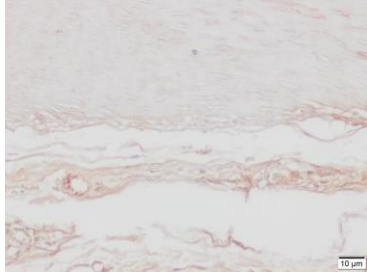
MKH (+) Kontrol



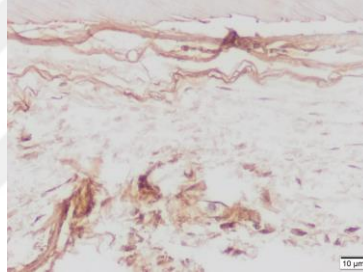
MKH (-) EDTA



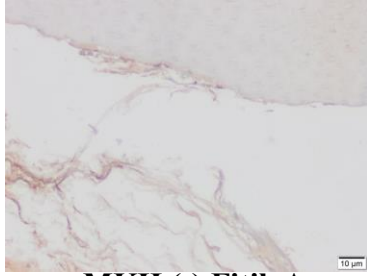
MKH (+) EDTA



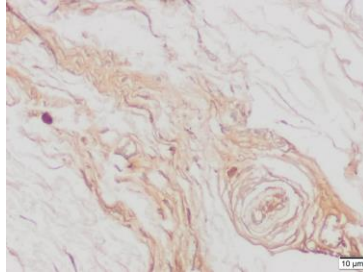
MKH (-) Sitrik A.



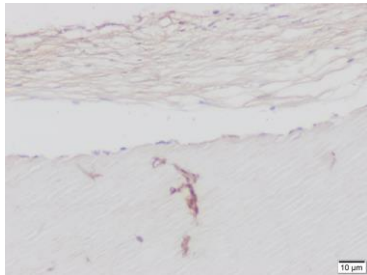
MKH (+) Sitrik A.



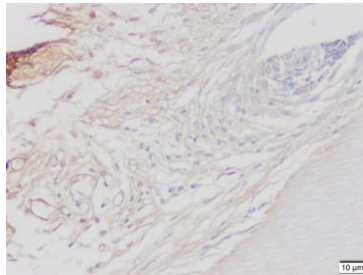
MKH (-) Fitik A.



MKH (+) Fitik A.

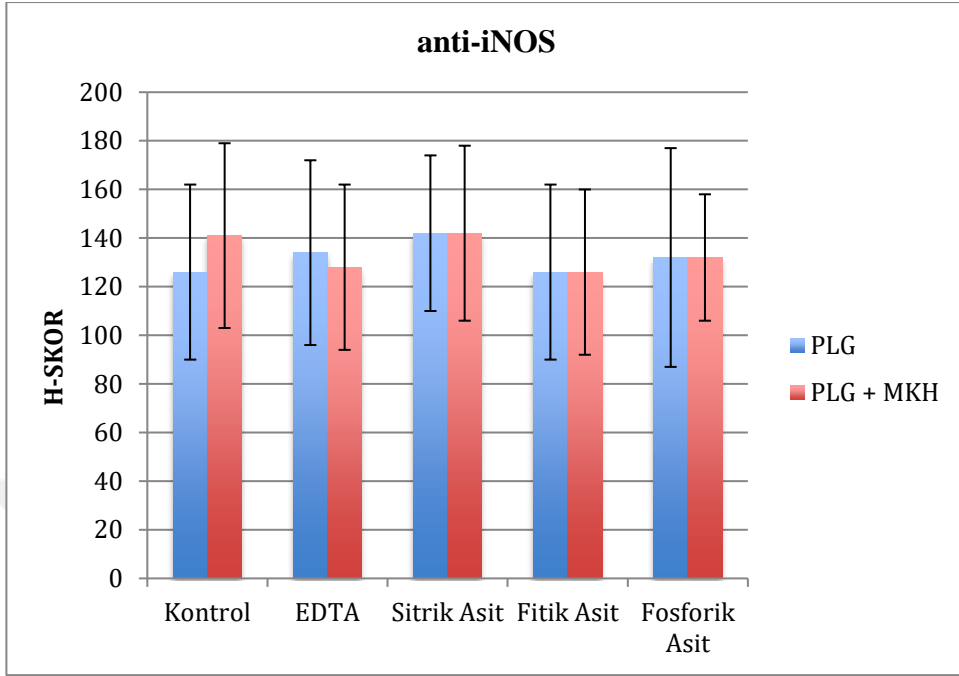


MKH (-) Fosforik A.



MKH (+) Fosforik A.

Şekil 182. Deney gruplarının Anti-iNOS boyaması görüntüleri



Grafik 17. Pulpa rejenerasyonunda oksidatif stresin bir diğer belirteci olan anti-iNOS sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	126,3	36,3
MKH (-) EDTA	134,6	38,3
MKH (-) Sitrik Asit	142,3	32,8
MKH (-) Fitik Asit	126,6	36,2
MKH (-) Fosforik Asit	132,6	45,7
MKH (+) Kontrol	141,6	38,3
MKH (+) EDTA	128,2	34,8
MKH (+) Sitrik Asit	142,3	36,4
MKH (+) Fitik Asit	126,3	34,3
MKH (+) Fosforik Asit	132,2	26,3

Tablo 19. Grupların anti-iNOS boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

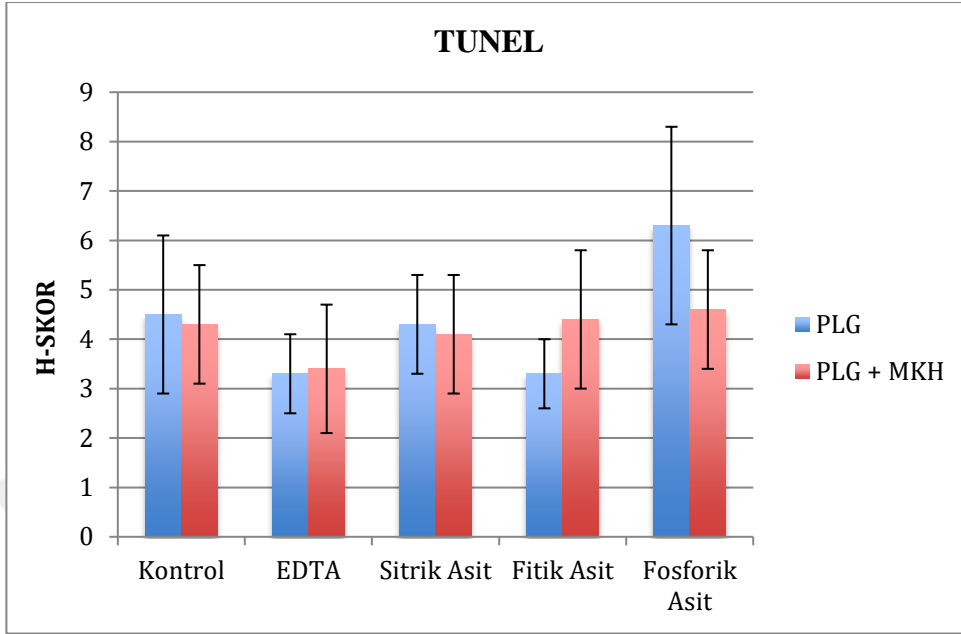
4.2.2.2.9 TUNEL Sonuçlarının Gruplar Arası Karşılaştırılması

Hücrelerdeki apoptoz durumunun gösterilmesinde kullanılan TUNEL boyamasında tüm gruplar arasında anlamlı olmayan bir ilişkinin varlığı saptandı ($p>0,05$). Asit veya kök hücre uygulamasının apoptozis üzerine anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü (Şekil 183, Grafik 18, Tablo 20).





Şekil 183. Deney gruplarının TUNEL boyaması görüntüleri



Grafik 18. Hücrelerin apoptozis belirteci olan TUNEL boyaması sonuçları

	Ortalama	Standart Sapma
MKH (-) Kontrol	4,5	1,6
MKH (-) EDTA	3,3	0,8
MKH (-) Sitrik Asit	4,3	1
MKH (-) Fitik Asit	3,3	0,7
MKH (-) Fosforik Asit	6,3	2,8
MKH (+) Kontrol	4,3	1,2
MKH (+) EDTA	3,4	1,3
MKH (+) Sitrik Asit	4,1	1,2
MKH (+) Fitik Asit	4,4	1,4
MKH (+) Fosforik Asit	4,6	1,2

Tablo 20. Grupların TUNEL boyaması için ortalama ve standart sapma değerleri

5. Tartışma

Çalışmamızın sonucunda, rejeneratif endodontik tedavide altın standart olarak kabul edilen son irrigasyon ajanı EDTA'ya alternatif dentin pürüzlendirme ajanlarının hem dentinden büyüme faktörlerinin salınımına hem de pulpa benzeri doku oluşumuna olan etkileri incelenmiştir. Çalışmanın bulgularına bakıldığında kullanılan dentin pürüzlendirme ajanlarının rejeneratif endodontik tedavilerde EDTA'ya alternatif olabileceği gösterilmiştir. Deneyin *in vitro* bölümündeki bulgulara bakıldığında test edilen asitlerin EDTA'ya kıyasla dentinden daha yüksek miktarda büyüme faktörü salınımına olanak sağladığı görülmüştür. Buna ek olarak rejeneratif endodontik tedavilerdeki klinik durumu demonstre edebilmek amacıyla dentin pürüzlendirilmesi sonrasında 3 gün süreyle uygulanan mezenkimal kök hücre kültürünün bu etkiyi dramatik bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Çalışmanın *in vivo* bölümündeki sonuçlara bakıldığında ise benzer şekilde EDTA'ya alternatif dentin pürüzlendirme ajanlarının odontoblastlara özgü olduğu kabul edilen belirteçleri daha yüksek oranda eksprese ettiği görülmüştür.

Pulpa rejenerasyonu amacıyla kullanılan doku mühendisliğinin temeli kök hücreler, biyoaktif moleküller ve doku iskelelerine dayanmaktadır. Biyoaktif moleküller, kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasını aynı zamanda ekstrasellüler matriks sekresyonu ve mineralizasyonunu düzenleyen büyüme faktörlerini içerir (Orti ve ark., 2018). Endodontik tedavilerdeki revitalizasyonda temel beklenti, sadece kök hücrelere dayanmamakla beraber büyüme faktörleri ve kemotaktik faktörlerin kombine etkisiyle periapikal dokulardan kanal içine hücrelerin akümüasyonu hedeflenmektedir. "Cell homing" yani endojen kökenli kök hücrelerin kemik iliği veya diğer kök hücre nişlerinden kemotaktik faktörler aracılığıyla dokudaki yara bölgesine migrasyonunu sağlama yöntemi son yıllarda rejeneratif endodontik tedavilerde sıklıkla araştırılan bir konu olmuştur. Bundan dolayı araştırmacılar dentin matriksi içinde gömülü olan büyüme faktörleri ve diğer sinyalleşme moleküllerinin, irrigasyon solüsyonları veya kanal içinde kullanılan medikamentler ile açığa çıkarma konusundaki çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Alghilan, Windsor, Palasuk, & Yassen, 2017; Duncan, Kobayashi, & Shimizu, 2018; Galler ve ark., 2016; Graham ve ark., 2006; Tomson ve ark., 2007).

Literatürde asitlerin dentinden büyüme faktörlerinin salınımına etkilerinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında EDTA'ya alternatif dentin pürüzlendirme ajanlarının kullanıldığı görülmüş olup bu çalışmalarda dentin disk modeli veya dentin tozu modellemeleri uygulanmıştır (Galler ve ark., 2015; Sadaghiani ve ark., 2016). Bu çalışmalarda genellikle dentinin asitlenmesi sonucu asit solüsyonuna geçen büyüme faktörü miktarları ölçülerek verilmiştir. Biz ise çalışmamızın *in vitro* bölümünün kurgulanmasında rejeneratif endodontik tedavilerdeki klinik uygulamalara benzerlik kurulması amacıyla asitle pürüzlendirilmiş dentin yüzeyinde kalan büyüme faktörlerinin ölçümünü hedef aldık.

TGF- β 1, dentinogenesisin embriyonal döneminde dentinin içinde gömülü olarak bulunan ve dentinin irritasyonu sonrası ortama çıkıp reaksiyoner veya reparatif dentin yapımında çok önemli görev üstlenen bir büyüme faktörüdür. Dentinin pürüzlendirilmesiyle yüksek miktarlarda açığa çıkabilen bir büyüme faktörü olması sebebiyle rejeneratif endodontik tedavilerde çok önemli role sahiptir. Bu özelliğinden dolayı literatürde en sıklıkla araştırılan büyüme faktörü olduğu görülmüştür (Deniz Sungur, Aksel, Ozturk, Yilmaz, & Ulubayram, 2019; Galler ve ark., 2015; Ivica, Zehnder, Mateos, Ghayor, & Weber, 2019; Sadaghiani ve ark., 2016). Çalışmamızın MKH uygulaması yapılmamış gruplarında TGF- β 1 adına en yüksek değerler dentinin sitrik asit ile pürüzlendirilmesinden elde edildiği görülmüş olup EDTA'ya kıyasla anlamlı derecede daha fazla TGF- β 1 salınımına olanak sağladığı saptanmıştır. Ivica ve ark. yaptıkları çalışmada insan dişi kök dentinlerini EDTA ve sitrik asit ile irriğe ettikten sonra PBS ortamına salınan TGF- β 1 miktarlarını araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda sitrik asitin EDTA'ya oranla anlamlı derecede daha fazla TGF- β 1 salınımına neden olduğunu görmüşlerdir (Ivica ve ark., 2019). Bulgularımız bu açıdan bakıldığında Ivica ve ark.'nın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Sadaghiani ve ark. ise dentin tozu modeli kullanarak EDTA, sitrik asit, poliakrilik asit ve fosforik asit ile 5 dakikalık süre boyunca yaptıkları dentin pürüzlendirmesi sonrası asit solüsyonuna geçen TGF- β 1 miktarlarını araştırdıkları çalışmalarında en yüksek TGF- β 1 salınımının EDTA grubunda olduğunu rapor etmişlerdir (Sadaghiani ve ark., 2016). Bulgularımız Sadaghiani ve ark.'nın bulgularıyla uyumluluk göstermemekte olup bu uyumsuzluğun nedeninin, bu

çalışmada dentinin pürüzlendirilmesi sonrasında asit solüsyonuna salınan TGF-β1 miktarının ölçülmesi olduğu düşünülmektedir. Rejeneratif endodontik tedavilerde, rejenerasyonda rol oynayacak büyüme faktörlerinin, asitleme sonrası kanal duvarlarında kalan miktarı önemlidir. Bu amaçla bizim çalışmamızda Sadaghiani ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak kanal duvarlarında kalan büyüme faktörleri ölçülmüştür.

Galler ve ark. 2015 yılında dentin disk modeli kullanarak EDTA ve sitrik asitin büyüme faktörü salınımına olan etkilerini araştırdığı çalışmasının sonucunda EDTA'nın sitrik asite göre TGF-β1 salınımı yönünden daha etkili bir ajan olduğunu rapor etmişlerdir (Galler ve ark., 2015). Bulgularımız Galler ve ark.'nın bulguları ile uyumluluk göstermemekte olup bunun nedeninin benzer şekilde asit solüsyonuna geçen büyüme faktörü miktarlarının ölçülmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak asidik solüsyonların ELISA yönteminin hassasiyetini etkileyebileceği de literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Doucet, Zhao, Fu, & Avrameas, 2013; Lakshman ve ark., 2009). Çalışmamızda bu olumsuz etkiler düşünülerek asitlenmiş dentin tozlarından PBS ortamına geçen protein miktarları ELISA yöntemiyle incelenmiştir. Çalışmamızda kök hücre ekimi sonrasında en yüksek TGF-β1 salınımı ise fosforik asit grubunda görülmüş olup diğer asitler ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ilişkiler olduğu saptanmıştır.

Sadaghiani ve ark. yaptığı ve kök hücre ekimi uygulamadıkları çalışmalarında fosforik asit sonuçlarının EDTA sonuçlarına göre anlamlı düzeyde düşük çıkması bizim çalışmamızın kök hücre ekimi yapılmayan fosforik asit grubunun bulgularıyla çelişmektedir (Sadaghiani ve ark., 2016). Bu uyumsuzluğun sebebi olarak ise yazarların dentini fosforik asit ile 5 dakika boyunca pürüzlendirmeleri olduğu düşünülmektedir. Uzun süreli fosforik asit uygulamasının dentinin biyokimyasını olumsuz düzeyde etkilediği ve matriksmetalloproteinazları aktive ederek dentin matriksinde degradasyona yol açtığı yapılan bir çok çalışmayla gösterilmiştir (Osorio ve ark., 2011; Tezvergil-Mutluay ve ark., 2013). Chae ve ark. yaptıkları çalışmada insan dişi kök fragmanlarını %17'lik EDTA, %10'luk sitrik asit, %10 ve %37'lik fosforik asit ile pürüzlendirdikten sonra dentinden açığa çıkan TGF-β1 miktarlarını ELISA yöntemiyle araştırmışlardır (Chae, Yang, & Kim, 2018). Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda dentinden en

yüksek miktarda TGF- β 1 salınımına %10'luk sitrik asit grubunda gözlemlemiştir. Bizim çalışmamızda da dentinden en yüksek miktarda TGF- β 1 salınımı sitrik asit grubunda gözlenmiş olup bulgularımız araştırmacıların bulguları ile tutarlılık göstermektedir.

VEGF, endotelial hücrelerin proliferasyonu, yara alanının neovaskülarizasyonu ile damar oluşumunda çok önemli role sahip olan heparin bağlayıcı bir proteindir (Schertl ve ark., 2019). Dokuların rejenerasyonunda yeni damar yapımı ve neovaskülarizasyon, kök hücrelerin beslenmesi ve oksijen desteğinin sağlanması açısından hayati bir öneme sahiptir (Duncan ve ark., 2018). Çalışmamızda dentinin asitlenmesi sonucunda çok düşük seviyelerde VEGF salınımı olduğu gözlenmiş ve gruplar arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Literatürde bu konuda yapılmış olan çalışmalara baktığımızda benzer şekilde çok düşük seviyelerde VEGF salınımı olduğunu görmekteyiz (Galler ve ark., 2015; Sadaghiani ve ark., 2016). Bu açıdan bakıldığında sonuçlarımız Sadaghiani ve ark. ile Galler ve ark.'nın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Dentinin asitle pürüzlendirilmesi sonrasında VEGF'nin ortamda eser miktarda bulunmasını Eppler ve ark. bu büyüme faktörünün diğer faktörlere göre çok yüksek hızla parçalanıp ortamdan uzaklaşmasına bağlamışlardır (Eppler ve ark., 2002). Roberts-Clark ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada dentin ekstrasellüler matriksindeki VEGF miktarının TGF- β 1 gibi diğer büyüme faktörlerine kıyasla çok daha eser miktarlarda olduğunu rapor etmiştir (Roberts-Clark & Smith, 2000). Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın sonuçları literatürdeki çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızdaki VEGF düzeylerinin araştırıldığı deneylerde mezenkimal kök hücre uygulaması sonrası tüm gruplarda dramatik bir artış gözlenmiş olup fosforik asit en etkili ajan olarak öne çıkmıştır. Mezenkimal kök hücre uygulaması sonrası görülen bu dramatik artışın sebebinin ise ortama verilen kök hücrelerinin VEGF sekresyonundan kaynaklandığı düşünülmekle beraber bu düşüncemiz literatürdeki çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (Ge ve ark., 2018; Jeanneau, Lundy, El Karim, & About, 2017; Yoshida ve ark., 2018).

BMP-2, dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastik differensiasyonu ve DSPP ekspresyonu üzerine önemli etkileri olan başlıca büyüme faktörlerinden biridir (S. Chen ve ark., 2008; Iohara ve ark., 2004). Çalışmamızda dentinden en çok BMP-2 salınımı

fitik asit grubunda gözlenmiş olup bunu sırasıyla sitrik asit, EDTA ve fosforik asit izlemiştir. Sadaghiani ve ark. yaptıkları çalışmada dentinden en çok BMP-2 salınımının sitrik asit grubunda olduğunu rapor etmişlerdir (Sadaghiani ve ark., 2016). Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın sonuçları Sadaghiani ve ark.'nın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda %1'lik fitik asit (IP6) uygulamasının fare osteoblast benzeri hücrelerinin differensiasyonunu olumsuz yönde etkilemediği ve %17'lik EDTA'ya göre daha az sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Nassar ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda her ne kadar sitotoksositeye ait araştırma yapılmamış olmasına rağmen tüm büyüme faktörleri için fitik asit grubunda rejenerasyonu olumsuz yönde etkileyen bir bulguya rastlanmamıştır. Bunlara ek olarak fitik asidin düşük üretim maliyetine sahip olması rejeneratif endodontik tedavilerde son irrigasyon solüsyonu olarak EDTA'ya alternatif bir ajan olarak kullanılabilmesi düşünülebilir. Çalışmamızdaki mezenkimal kök hücre ekimi sonrasında ise asit grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen en yüksek BMP-2 salınımı fosforik asit grubunda izlenmiş olup bunu sırasıyla fitik asit, sitrik asit ve EDTA takip etmiştir. Literatürde BMP-2 ile ilgili kök hücre ekimi yapılarak büyüme faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamasından ötürü çalışmamızın sonuçlarının bu alanda özgün olduğu düşünülmektedir.

FGF-2, dental pulpa hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunda görev alan önemli büyüme faktörlerinden biri olup, TGF- β 1 ile sinerjistik bir etki göstererek dental pulpa kök hücrelerinin odontoblast-benzeri hücrelere farklılaşmasını sağladığı rapor edilmiştir (He ve ark., 2008; Suzuki ve ark., 2011). Çalışmamızın bulgularına baktığımızda dentinin asitlenmesi sonrası düşük seviyelerde FGF-2 salınımı olduğu gözlemlenmiş olup gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Dentinden ortama salınmış olan FGF-2 miktarı, daha önce yapılmış çalışmalarla tutarlılık göstermektedir (Galler ve ark., 2015). Bunun nedeninin ise dentin içinde gömülü olan FGF-2'nin diğer büyüme faktörlerine kıyasla daha az miktarda olmasıyla açıklanabileceği rapor edilmiştir (Galler ve ark., 2015). Çalışmamızın VEGF bulgularına benzer şekilde mezenkimal kök hücre uygulaması sonrasında ortama salınan FGF-2 miktarlarında dramatik bir artış olduğu saptanmıştır. EDTA ve fosforik asit gruplarının diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak

anlamli düzeylerde daha fazla FGF-2 salinimina neden olduğu grlmŖtir. Mezenkimal kök hücre uygulaması sonrası görülen bu dramatik artıŖın sebebi olarak ise literatürde yapılan alıŖmalarda da gösterildiği gibi kök hücrelerin sekretuvar aktivitesinden kaynaklandđı dŖnlmektedir (Leuning ve ark., 2018).

alıŖmamızın *in vivo* bölümündeki bulgulara bakıldığında MKH uygulaması yapılan gruplardaki hücre yoğunluğunun ve doku organizasyonunun MKH uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla çok daha yoğun ve organize bir doku oluŖumuna olanak sağladığı grlmŖtir. Bunun nedeninin dıŖarıdan verilen kök hücrelerin asitler ile açığa çıkan büyüme faktörleri ile etkileŖime geçmesi sonucu daha yoğun ve organize bir doku rejenerasyonuna imkan sağladığını dŖnmekteyiz. MKH uygulaması yapılmayan gruplarda oluŖan dokulardaki hücre yoğunluğu ve doku organizasyonunun yetersiz düzeyde olması ise açığa çıkan büyüme faktörlerinin farelerin dorsumlarından kan yoluyla gelen MKH'lerin, dıŖarıdan verilen MKH'lere göre daha az sayıda olmasından dolayı olduğu dŖnlmektedir. Bu duruma ek olarak alıŖmamızın *in vitro* bölümünde 3 gün süre ile yapılan MKH ekimi sonrasında açığa çıkan büyüme faktörleri, MKH'lerin de sekretuvar etkisi sayesinde dramatik bir Ŗekilde artmıŖtır. Bu açıdan bakıldığında alıŖmamızın *in vivo* bölümündeki bulgularımız, *in vitro* bölümündeki bulgular ile tutarlılık göstermektedir ve MKH uygulamasının doku rejenerasyonuna önemli ölçüde katkı sağladığını dŖnmekteyiz.

alıŖmamızda kullanılan asitlerin doku rejenerasyonunu olumlu yönde arttırdığı grlmŖtir. Bulgularımız sonucunda, asit uygulaması ile açığa çıkan TGF- β 1, VEGF, BMP-2 ve FGF-2 gibi büyüme faktörlerinin dıŖarıdan verilen farklılaŖmamıŖ mezenkimal kök hücreleri etkileyerek bunların önemli bir bölümünün bağ dokusu hücrelerine ve bir bölümünün de odontoblast benzeri hücrelere farklılaŖmasını sağladığı grlmŖtir. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda odontoblastlara özgü olarak kabul edilen Enamelisin ve DSP gibi belirteçlerin asit ve MKH uygulaması yapılan gruplarda daha yoğun bir Ŗekilde eksprese edildiği grlmŖtir. Bunun aksine asit uygulaması yapılmayan kontrol gruplarında bu belirteçlerin çok dŖk seviyelerde saptandığı tespit edilmiŖtir. Bunun sebebinin dentinin içinde gömülü olarak bulunan büyüme faktörlerinin asit uygulaması yapılan gruplarda daha yoğun olarak açığa çıkması

ve bu faktörlerin MKH'ler ile etkileşimi sonucu daha etkin bir doku rejenerasyonu ile sonuçlandığını düşünmekteyiz. Kullanılan asitler arasında en yoğun ve organize doku rejenerasyonunun fosforik asit grubunda olduğu görülmüştür. Buna ek olarak odontoblast belirteçlerinden olarak kabul edilen Enamelisin ve DSP'nin de en yoğun olarak fosforik asit grubunda ekprese edildiği tespit edilmiştir. Çalışmamızın *in vitro* bölümünde 3 gün süre ile MKH ekimi sonrasında fosforik asit grubu araştırılan bütün büyüme faktörlerinde en yüksek değerlere sahip olan grup olarak öne çıkmıştır. Bu bulguların *in vivo* ortamdaki etkilerine baktığımızda da benzer şekilde fosforik asit grubunun diğer asit gruplarına oranla doku rejenerasyonunda daha etkili bir ajan olduğu saptanmıştır. Fosforik asit uygulaması, diğer asitler ile kıyaslandığında dentinden daha fazla büyüme faktörü salınımını sağlayarak pulpa benzeri doku oluşumunu daha olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Bu sonuçlarımız çalışmamızın *in vitro* bölümündeki bulgular ile tutarlılık göstermektedir.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında MKH'lerin kullanımı sonrası kanal içinde dentin, pulpa, periodontal ligament, kemik ve sement benzeri dokuların oluştuğu bildirilmiştir. Huang ve ark. immünsüpresif farelerin dorsumlarına 3 ay süre ile implante ettikleri ve içlerinde PLG doku iskelesi ile birlikte DPKH veya APKH içeren kök fragmanlarında yaptıkları çalışma sonucunda pulpa benzeri doku oluşumu ve odontoblast-benzeri hücreler gözlemlediklerini fakat bu hücrelerin düzensiz ve organize olmadıklarını rapor etmişlerdir (G. T. Huang ve ark., 2010). Araştırmacılar bu çalışmalarında kök kanallarını EDTA ve sitrik asit ile irrije ettikten sonra DPKH veya APKH ile doku iskelesi kombinasyonunu kanal içine yerleştirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarında kullandıkları immünohistokimyasal boyalardan olan anti-DSP bizim çalışmamızda da kullanılmış olup, dentin dokusu üstünde yeni rejenerasyon olan hücrelerin odontoblastik özelliklere sahip olduğunu göstermesi yönüyle bizim sonuçlarımızla oldukça uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmanın bulguları, çalışmamızın *in vivo* bölümündeki MKH ekimi yapılmış asit gruplarının bulguları ile benzerlik göstermektedir. Dissanayaka ve ark. içerisine DPKH ekimi yapılmış insan dişi kök dentinlerini 4 hafta süre ile immünsüpresif farelerin dorsumlarına transplante ettikleri çalışmaları sonucunda DPKH ekimi yapılmış gruplarda, içerisine DPKH ekimi

yapılmamış kontrol grubuna kıyasla çok daha yoğun pulpa-benzeri doku oluşumu ve odontoblast-benzeri hücrelerin olduğunu bildirmişlerdir (Dissanayaka ve ark., 2014). Araştırmacılar kontrol grubundaki dişlerde sadece kanal içine doğru büyüyen fare yağ dokusu olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak DPKH ekimi yapılan gruplardaki rejenere olan hücrelerin anti-DSP ile pozitif boyandıklarını da rapor etmişlerdir. Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamızdaki asit uygulaması ve MKH ekimi yapılan grupların bulguları ile tutarlılık göstermektedir.

Tran ve ark. yaptıkları çalışmada insan DPKH'lerini EDTA ile pürüzlendirilmiş dentin örnekleri üzerine ekimini yaptıktan sonra immünsüpresif farelere implante etmişlerdir. Sekiz hafta sonunda yaptıkları histolojik incelemeler sonucunda pürüzlendirilmiş dentin diski + DPKH grubunda yeni oluşan dokunun yoğunluğunun ve hücre sayısının arttığını ayrıca rejenere olan hücrelerin dentin diskine yakın bölgelerinde pulpal matriks oluşumunu gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Boş dentin diskinin kullanıldığı kontrol grubunda ise yeni doku oluşumuna rastlanılmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar EDTA ile pürüzlendirilmiş dentin diski + DPKH grubunda rejenere olan dokuların odontoblastlara özgü olduğu kabul edilen belirteçlerden DSPP ve DMP-1'i eksprese ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada dentin duvarlarında DPKH'lerinin ekstrasellüler matriks oluşumunu başlattığı ve dentin rejenerasyonuna katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır (Tran Hle & Doan, 2015). Bu sonuç, çalışmamızdaki asit uygulaması sonrasında açığa çıkan büyüme faktörleri sayesinde daha organize ve hücresel açıdan daha yoğun bir dokunun oluşumuyla beraber odontoblast benzeri hücrelerin rejenerasyonunda görülen artışı desteklediği düşünülmektedir.

Salehi ve ark. insan dişi dentin örneklerini EDTA veya fosforik asit ile demineralize ettikten sonra elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin farklılaşmamış fare DPKH'lerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda fare DPKH'lerinin 7 gün süre ile dentin matriks komponentleri ile etkileşimi sonucu proliferasyonlarının arttığını ve odontoblastlar tarafından eksprese edilen DMP-1'i eksprese ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca EDTA ile fosforik asit ile pürüzlendirerek elde ettikleri dentin matriks komponentleri arasında protein ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılığın bulunmadığını da bildirmişlerdir (Salehi, Cooper, Smith,

& Ferracane, 2016). Çalışmamızın *in vivo* bölümündeki bulgulara baktığımızda fosforik asit uygulaması sonrası DMP-1 gibi odontoblastlar tarafından eksprese edilen proteinlerden olan DSP ve Enamelisin'in EDTA'ya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla eksprese edildiği görülmüştür. Araştırmacıların yaptıkları çalışmanın *in vitro* ortamda olması, asitleme sürelerinin ve araştırdıkları belirteçlerin bizden farklı olmasının sonuçlar arasındaki farklılıkların temel nedeni olduğu düşünülmektedir.

Chen ve ark. çekilmiş insan premolar dişlerini %17'lik EDTA ile demineralize ederek elde ettikleri sıvı haldeki dentin matriks komponentlerini dentin tozuyla karıştırarak dentin matriks patı elde etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri dentin matriks patını domuz dişlerinde direkt pulpa kuafaj materyali olarak kalsiyum hidroksit ile karşılaştırdıkları çalışmalarının sonucunda dentin matriks patı kullanılan grupta pulpa kaplaması yapılan bölgede düzenli bir şekilde devam eden reperatif dentin formasyonu ve dentin köprüsü oluşumu meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Dentin matriks patı kullanılan grupta kalsiyum hidroksite göre daha kalın ve yoğun bir dentin köprüsü meydana geldiğini de bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının *in vitro* bölümünde ise dentin matriks patı ve kalsiyum hidroksitin insan DPKHleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda dentin matriks patının uygulandığı grupta DPKH'lerinin ALP, BSP ve DSP proteinlerini kalsiyum hidroksite kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek seviyelerde eksprese ettiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarının sonucunda araştırmacılar dentinin asitlenmesi ile elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin pulpa ve dentin rejenerasyonunda çok önemli görevi olduğunu belirtmişlerdir (J. Chen ve ark., 2017). Tüm bu bulgular ve ve yapılan yorumlar bizim çalışmamızın sonuçları ve özellikle asit uygulamaları sonrasındaki bulgularımız ile tamamen örtüşmektedir.

Li ve ark. yaptıkları çalışmada EDTA kullanarak demineralizasyonunu sağladıkları dentin matriksi ile demineralize edilmemiş dentin matriksinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak insan dental folikül kök hücrelerine olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının *in vitro* bölümünde demineralize edilmiş dentinin dental folikül kök hücreleri ile biyouyumlu olduğunu ve bu hücrelerin biyoaktivitelerini

arttırdıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının *in vivo* bölümünde ise dental folikül kök hücreleri içeren demineralize edilmiş dentin ve hidroksiapatit trikalsiyum fosfat doku iskelesi kombinasyonunu farelerin dorsumuna 8 hafta süre ile implante etmiş ve oluşan dokuları histolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda araştırmacılar demineralize edilmiş dentin grubunda tamamiyle bir dentin dokusu rejenerasyonu olduğunu ve odontoblast benzeri hücrelerin matriks sekresyonu yaptığını gözlemlemişlerdir. Hidroksiapatit trikalsiyumfosfat grubunda ise sadece kemik-benzeri dokuların oluştuğunu rapor etmişlerdir. Bunlara ek olarak demineralize edilmiş dentin grubunda, dentin ve odontoblastik aktivite belirteçleri olarak kabul edilen DSP ve DMP-1'in eksprese edildiğini göstermişlerdir (R. Li ve ark., 2011). Araştırmacıların bu bulguları ve asit ile demineralize edilmiş dentinin pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonuna olan olumlu etkileri bizim çalışmamızın bulguları ve yorumlanması ile uyumluluk göstermektedir.

Lee ve ark. insan yirmi yaş dişlerinden elde ettikleri dentin örneklerini %10'luk EDTA ile demineralize ederek elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin insan DPKHleri üzerine etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda EDTA demineralizasyonu ile elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin hücre ekspansiyonunu arttırdığını, apoptozis belirteci olan caspase 3'ün ekspresyonunu azalttığını, hücrelerin hayatta kalım belirteci olan Akt-1'i ve mineralize matriks depozisyonunu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca kemik ile ilişkili belirteçler olan ALP ve Osteopontin'in ekspresyonunda da anlamlı düzeylerde artış olduğunu rapor etmişlerdir (Lee, Colombo, Ayre, Sloan, & Waddington, 2015). Bizim çalışmamızda da dentinin EDTA ve test edilen diğer asitler ile pürüzlendirilmesi sonrasında kemik ile ilişkili belirteçlerden Osteokalsin, ve BMP-2 düzeylerinin seviyeleri incelenmiş olup kontrol grubuna göre anlamlı düzeylerde artış saptanmıştır.

Guo ve ark. EDTA ile pürüzlendirerek elde ettikleri dentin matriksinin fare dental folikül kök hücrelerine olan etkilerini *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarının *in vitro* bölümünde iki hafta süre ile yapılan hücre kültüründen sonra asitlenmiş dentin matriksinin fare dental folikül kök hücrelerinde

odontoblast belirteçlerinden DSP ve DMP-1'i, kemik ile ilişkili belirteçlerden Osteokalsin, BSP, Osteopontin ve Osteonektin'i eksprese ettiğini saptamışlardır. Çalışmalarının *in vivo* bölümünde araştırmacılar immünsüpresif farelerin dorsumlarına asitlenmiş dentin matriksi ile fare dental folikül hücre kombinasyonunu 4 hafta süreyle implante etmişlerdir. 4 haftalık implantasyon periyodundan sonra tam anlamıyla bir dentin rejenerasyonunun yanı sıra bu yeni oluşan dentinin DMP-1 ve DSP gibi odontoblast belirteçlerini eksprese ettiğini bildirmişlerdir (Guo ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da asit uygulaması yapılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla DSP ve Osteokalsin gibi belirteçlerin ekspresyonunun anlamlı düzeyde artmış olduğu görülmüş olup elde ettiğimiz sonuçlar araştırmacıların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Zhang ve ark. dentin matriks komponentlerinin damar yapılanmasına olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, EDTA pürüzlendirmesi sonrasında elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin *in vitro* ortamda endotelial hücrelere olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda EDTA pürüzlendirmesi ile elde ettikleri dentin matriks komponentlerinin, kontrol grubuna kıyasla damar sayısı, uzunluğu ve dallanmasında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artış olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca proanjyogenik büyüme faktörü olan VEGF ve VEGF reseptörü olan VEGFR2 geninin ekspresyonunda da artış olduğunu bildirmişlerdir (R. Zhang ve ark., 2011). Bizim çalışmamızın *in vivo* bölümünde de asit ve kök hücre uygulaması yapılan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla daha fazla damar formasyonu ve yeni damar yapımının belirteci olan anti-VEGF ile daha yoğun bir boyanma olduğu gözlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamız araştırmacıların sonuçları ile tutarlılık göstermektedir.

Asitler ile pürüzlendirme sonrasında elde edilen dentin matriks komponentlerinin etkileri sadece rejeneratif endodonti alanında değil ayrıca cerrahi işlemlerdeki kemik rejenerasyonunda da detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Reis-Filho ve ark. yaptıkları çalışmada EDTA ile pürüzlendirerek elde ettikleri dentin matriks komponentlerini ratların diş soketlerinde greft materyali olarak kullanmışlar ve kemik iyileşmesine olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda ratların diş soketlerinde meydana gelen yeni kemik formasyonunda anlamlı düzeylerde artış gözlemekle

beraber yaptıkları immünohistokimyasal incelemelerde VEGF ekspresyonunda da anlamlı düzeylerde artış saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda demineralize edilmiş dentin matriksinin osteokondüktif ve osteoindüktif etkilerinin olması nedeniyle yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda etkili bir greft materyali olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Reis-Filho ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da asit uygulaması sonrası kök fragmanlarında kemikleşme belirteçlerinden olan BMP-2, Osteokalsin ve Osteonektin düzeylerinde belirgin artış gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacıların çalışmalarında da olduğu gibi çalışmamızda da kök dentinleride asit uygulaması yapılmış gruplarda VEGF ekspresyonunun arttığı immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmiştir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın bulguları araştırmacıların bulguları ile büyük ölçüde örtüşmektedir.

de Oliveira ve ark. EDTA ile asitlenerek elde edilen dentin matriks komponentlerini ratların çekilmiş diş soketleride greft materyali olarak kullandıktan sonra yeni kemik formasyonu ve iyileşmeye olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda demineralize dentin matriks komponentlerinin kullanıldığı diş soketlerinde, uygulama yapılmamış kontrol grubuna kıyasla artmış sayıda gözlenen osteoblastların BMP-2 ve BMP-4 ile pozitif olarak boyandığını ve sonuç olarak demineralize dentin matriks komponentlerinin efektif bir kemik implant materyali olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (de Oliveira ve ark., 2013). Bizim çalışmamız sonucunda da asit uygulaması sonucu açığa çıkan dentin matriks komponentlerinin bulunduğu gruplarda BMP-2 seviyelerinin asit uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Çalışmamız her ne kadar araştırmacıların çalışmasıyla metodolojik yöntemler açısından farklılık gösteriyor olsa da asit ile demineralize edilmiş dentinden çıkan büyüme faktörlerinin kemik dokusunun ve osteoblastların belirteçlerinden olan BMP-2'nin ekspresyonunda görülen anlamlı düzeylerdeki artış açısından tutarlılık gösterdiğini düşünmekteyiz.

Galler ve ark. yaptıkları çalışmada, immünsupresif farelerin dorsumlarına implante ettikleri dentin disklerini önce sadece sodyum hipoklorit ile veya EDTA ile kombine kullanımı ile irrije ettikten sonra içerisine DPKH, TGF- β 1, VEGF ve FGF-2 karışımı içeren hidrojel doku iskelesi yerleştirmişlerdir. 6 hafta sonra toplanan örneklerde

yaptıkları histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar sonucunda sadece hidrojel içeren kontrol grubunda yeni doku formasyonu görmemekle birlikte sadece hidrojel artıklarının olduğunu rapor etmişlerdir. DPKH ve büyüme faktörü karışımı içeren gruplarda ise vaskülarize olmuş yumuşak bağ doku formasyonunun olduğunu ve fibroblast benzeri hücrelerin baskın olduğunu belirtmişlerdir. Sadece sodyum hipoklorit uygulaması yapılan gruptaki bulgulara bakıldığında, dentin sınırında rezorbsiyon lakünaları olduğu ve hücrelerin bir kısmının odontoklastlara farklılaştığını bildirmişlerdir. Bunun aksine sodyum hipoklorit uygulaması sonrası EDTA irrigasyonu yapılan grupta pulpa benzeri dokunun oluştuğu ve hücrelerin ataçmanlarını dentin tübüllerine uzattıklarını göstermişlerdir. Bunlara ek olarak EDTA uygulaması yapılan grupta anti-DSP boyası ile boyanan hücrelerin olduğunu fakat sadece sodyum hipoklorit uygulaması yapılan gruptaki hücrelerin bu boya ile spesifik olarak boyanmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar dentinin EDTA ile teması sonrasında kök hücrelerin tutunması ve odontoblastik yönde rejenere olabilmesi için daha uygun koşullar yarattığını söylemişlerdir. Bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında hem kontrol gruplarındaki hem de asit uygulaması yapılan gruplardaki bulgular, bu çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (Galler, D'Souza, Federlin, ve ark., 2011).

Li ve ark. köpek molar dişlerinde Dycal, kitosan membran ve TGF- β 1 yüklü kitosan membran ile yapılan direkt pulpa kuafajından 60 gün sonrasında yaptıkları histolojik inceleme sonucunda TGF- β 1 yüklü kitosan membran uygulanan grupta Dycal ve sadece kitosan membran kullanılan gruba oranla 3-6 kat daha kalın reperatif dentin formasyonu olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, TGF- β 1'in farklılaşmamış pulpal hücreler ile teması sonrasında bu hücrelerin odontoblastik farklılaşmasını uyardığını dolayısıyla da dentinogenetik aktiviteyi arttırdığı sonucuna varmışlardır (F. Li, Liu, Zhao, Wu, & Xu, 2014). Bu açıdan bakıldığında çalışmamızda başta fosforik asit olmak üzere yapılan asit uygulamaları sonrasında daha yüksek miktarda açığa çıkan TGF- β 1'in MKH'lerin farklılaşmasını sağlayarak, odontoblast belirteçlerinden olan anti-Enamelisin ve anti-DSP belirteçlerini eksprese etmelerini sağladığını düşünmekteyiz.

Yadlapati ve ark. yaptıkları hayvan çalışmasında insan premolar diş köklerinden elde ettikleri kök fragmanlarının içine VEGF yüklü fiber doku iskelesi yerleştirdikten sonra

farelerin dorsumuna implante etmişlerdir. 45 gün sonrasında yaptıkları histolojik inceleme sonucunda içi boş olan kontrol grubundaki dişlerde minimal düzeyde yeni damar ve bağ doku oluşumu gözlenirken, VEGF yüklü fiber doku iskelesi yerleştirilen grupta çok sayıda yeni damar formasyonu ve kanal içine yoğun bir bağ doku infiltrasyonu olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda VEGF'nin hem dental pulpa rejenerasyonunda hücrelerin beslenmesi için gerekli yeni damar yapılanmasının oluşumu hem de çevre dokulardaki hücrelerin kemotaksisi açısından önemli ve gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Yadlapati ve ark., 2017). Biz de çalışmamızın *in vivo* bölümünde asit uygulamaları sonrasında dentinden daha yüksek seviyelerde salınan VEGF'nin, asit uygulaması yapılmayan kontrol grubundaki sonuçlar ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha fazla yeni damar ve bağ doku oluşumuna olanak sağladığını düşünmekteyiz.

Yang ve ark. yaptıkları hayvan çalışmasında immünsüpresif farelerin dorsumlarına DPKH + FGF + fibrin ipek doku iskelesi kombinasyonunu içeren insan dişi kök fragmanları yerleştirmişlerdir. Transplantasyondan 7 hafta sonra içi boş olan kök fragmanlarını içeren kontrol grubunda, kök kanalının içinin subkutanöz bağ doku ile dolmuş olduğunu ve bu dokunun çoğunluğunun adipoz doku olduğunu belirtmişlerdir. DPKH + FGF + fibrin ipek doku iskelesi kombinasyonunu içeren kök fragmanlarının içinde ise vaskülarize bir bağ dokusunun oluştuğunu ve bu dokunun normal dental pulpa dokusuna benzediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları immünohistokimyasal inceleme sonucunda ise DPKH + FGF + fibrin ipek doku iskelesi kombinasyonu uygulaması yapılan gruptaki hücrelerin anti-DSP boyası ile pozitif boyandığını bildirmişlerdir. Buna ek olarak dentin duvarlarında yeni oluşan mineralize doku olduğunu ve yapılan MT boyaması ile normal pulpadakine benzer kollagen matriks deposiyonu olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda FGF uygulamasının hücresel ataçmanı ve proliferasyonu arttırdığını, bu sayede pulpal rejenerasyona ve dentin benzeri dokunun oluşumuna yardımcı olduğunu söylemişlerdir (J. W. Yang, Zhang, Sun, Song, & Chen, 2015). Çalışmamızda asit uygulaması sonrası dentinden açığa çıkan FGF-2'nin yeni kollagen formasyonunu kontrol grubuna kıyasla arttırdığını ve pulpa benzeri doku oluşumuna katkı sağladığını düşünmekteyiz.

6.Sonuç ve Öneriler

Çalışmamız sonucunda geldiğimiz noktaya baktığımızda, fosforik asit başta olmak üzere sitrik ve fitik asidin güncel rejeneratif endodontik tedavilerde altın standart olarak kabul edilen son irrigasyon ajanı EDTA'ya alternatif olarak kullanılabilceği görülmüştür. Çalışmamızın in vitro bölümünde incelenen tüm büyüme faktörlerinde sitrik, fitik ve fosforik asidin EDTA'ya kıyasla daha etkili bir dentin pürüzlendirme ajanı olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızın in vivo bölümünde yaptığımız histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda ise bahsedilen üç asidin kullanıldığı gruplardan elde edilmiş bulgularda gerek MKH uygulanmayan ve gerekse de MKH uygulaması yapılan gruplarda hem yeni bağ dokusu oluşumunun EDTA'nın kullanıldığı gruba kıyasla arttığı hem de hücrelerin apoptozisine yol açılmadığı görülmüştür. Buradan yola çıkılarak rejeneratif endodontik tedavilerde bu üç asidin kullanılabilir hale gelmesi amacıyla daha çok çalışma planlanması ve gereğinde de klinik araştırmalarda kullanılmaya başlanması düşüncesindeyiz. Bunlara ek olarak yapılacak araştırmalarda, daha fazla sayıda odontoblast ve kemik oluşumuna özgü belirteçlerin kullanıldığı ve bahsedilen asitlerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin de incelendiği farklı yöntemlerin kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. Kaynaklar

- Akgün, I. (2016). Mezenkimal Kök Hücre. *FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 1(1), 29-32.
- Akintoye, S. O., Lam, T., Shi, S., Brahim, J., Collins, M. T., & Robey, P. G. (2006). Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*, 38(6), 758-768. doi:10.1016/j.bone.2005.10.027
- Alaee, F., Hong, S. H., Dukas, A. G., Pensak, M. J., Rowe, D. W., & Lieberman, J. R. (2014). Evaluation of osteogenic cell differentiation in response to bone morphogenetic protein or demineralized bone matrix in a critical sized defect model using GFP reporter mice. *J Orthop Res*, 32(9), 1120-1128. doi:10.1002/jor.22657
- Alghilan, M. A., Windsor, L. J., Palasuk, J., & Yassen, G. H. (2017). Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J*, 50(7), 667-675. doi:10.1111/iej.12669
- Andreasen, J. O., Farik, B., & Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, 18(3), 134-137.
- Atala, A. (2005). Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. *Expert Opin Biol Ther*, 5(7), 879-892. doi:10.1517/14712598.5.7.879
- Ateş, U. (2016). Kök hücreyi tanıyalım *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 1(1), 19-28. doi:10.5606/fng.transplantasyon.2016.004
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8(3), 301-316.
- Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, 30(4), 196-200. doi:10.1097/00004770-200404000-00003
- Begue-Kirn, C., Krebsbach, P. H., Bartlett, J. D., & Butler, W. T. (1998). Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci*, 106(5), 963-970.
- Bluteau, G., Luder, H. U., De Bari, C., & Mitsiadis, T. A. (2008). Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*, 16, 1-9.
- Breschi, L., Gobbi, P., Mazzotti, G., Falconi, M., Ellis, T. H., & Stangel, I. (2002). High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. *Dent Mater*, 18(1), 26-35.
- Büyükakyüz, H. (2012). Diş ve Çevre Dokuları Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler. *İstanbul Diş Hekimleri Odası Dergisi*, 1(1), 2-5.
- Calt, S., & Serper, A. (2000). Smear layer removal by EGTA. *J Endod*, 26(8), 459-461. doi:10.1097/00004770-200008000-00007

- Calt, S., & Serper, A. (2002). Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*, 28(1), 17-19. doi:10.1097/00004770-200201000-00004
- Can A , K. S. (2009). Erişkin kök hücrelerin farklılaşmasındaki hücresel ve moleküler mekanizmalar. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 1(5), 57-65.
- Canoğlu E, Ç. Z. (2008). Rejeneratif pulpa tedavilerinde bir güncelleme. *Hacettepe Diş Hek. Fak. Derg. ,* 1(32), 21-27.
- Casagrande, L., Demarco, F. F., Zhang, Z., Araujo, F. B., Shi, S., & Nor, J. E. (2010). Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*, 89(6), 603-608. doi:10.1177/0022034510364487
- Chae, Y., Yang, M., & Kim, J. (2018). Release of TGF-beta1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. *Int Endod J*, 51(12), 1389-1397. doi:10.1111/iej.12951
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), 233-241. doi:10.1080/08977190412331279890
- Chen, J., Cui, C., Qiao, X., Yang, B., Yu, M., Guo, W., & Tian, W. (2017). Treated dentin matrix paste as a novel pulp capping agent for dentin regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 11(12), 3428-3436. doi:10.1002/term.2256
- Chen, S., Gluhak-Heinrich, J., Martinez, M., Li, T., Wu, Y., Chuang, H. H., . . . MacDougall, M. (2008). Bone morphogenetic protein 2 mediates dentin sialophosphoprotein expression and odontoblast differentiation via NF- κ B signaling. *J Biol Chem*, 283(28), 19359-19370. doi:10.1074/jbc.M709492200
- Chen, X., Bao, Z. F., Liu, Y., Liu, M., Jin, X. Q., & Xu, X. B. (2013). Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. *J Endod*, 39(5), 719-722. doi:10.1016/j.joen.2012.12.023
- Çetinkaya, D. (2007). Mezenkimal Kök Hücreler: Nerede? Ne Zaman? 4. *Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Bursa*, 8-14.
- Das, S., Jhingran, R., Bains, V. K., Madan, R., Srivastava, R., & Rizvi, I. (2016). Socket preservation by beta-tri-calcium phosphate with collagen compared to platelet-rich fibrin: A clinico-radiographic study. *Eur J Dent*, 10(2), 264-276. doi:10.4103/1305-7456.178298
- De Munck, J., Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Suzuki, K., . . . Vanherle, G. (2003). Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*, 82(2), 136-140. doi:10.1177/154405910308200212
- de Oliveira, G. S., Miziara, M. N., Silva, E. R., Ferreira, E. L., Biulchi, A. P., & Alves, J. B. (2013). Enhanced bone formation during healing process of tooth sockets filled with demineralized human dentine matrix. *Aust Dent J*, 58(3), 326-332. doi:10.1111/adj.12088
- Deniz Sungur, D., Aksel, H., Ozturk, S., Yilmaz, Z., & Ulubayram, K. (2019). Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. *Int Endod J*, 52(6), 838-846. doi:10.1111/iej.13066
- Derman, S., Kızılbey, K., & Akdeste, Z. (2013). Polymeric Nanoparticles. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 1(31), 107-120.

- Di Lenarda, R., Cadenaro, M., & Sbaizero, O. (2000). Effectiveness of 1 mol L-1 citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J*, 33(1), 46-52.
- Diascro, D. D., Jr., Vogel, R. L., Johnson, T. E., Witherup, K. M., Pitzenberger, S. M., Rutledge, S. J., . . . Schmidt, A. (1998). High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res*, 13(1), 96-106. doi:10.1359/jbmr.1998.13.1.96
- Dissanayaka, W. L., Zhu, L., Hargreaves, K. M., Jin, L., & Zhang, C. (2014). Scaffold-free Prevascularized Microtissue Spheroids for Pulp Regeneration. *J Dent Res*, 93(12), 1296-1303. doi:10.1177/0022034514550040
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e37-44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
- Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J. B. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol*, 81(4), 546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Doucet, J., Zhao, A., Fu, J., & Avrameas, A. (2013). Development and validation of an ELISA at acidic pH for the quantitative determination of IL-13 in human plasma and serum. *Dis Markers*, 35(5), 465-474. doi:10.1155/2013/290670
- Duncan, H. F., Kobayashi, Y., & Shimizu, E. (2018). Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. *Curr Oral Health Rep*, 5(4), 276-285. doi:10.1007/s40496-018-0194-y
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*, 56(3), 151-165. doi:10.1016/j.jpor.2012.06.001
- El-Backly, R. M., Massoud, A. G., El-Badry, A. M., Sherif, R. A., & Marei, M. K. (2008). Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J*, 34(2), 52-67. doi:10.1111/j.1747-4477.2008.00139.x
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Eppler, S. M., Combs, D. L., Henry, T. D., Lopez, J. J., Ellis, S. G., Yi, J. H., . . . Zioncheck, T. F. (2002). A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 72(1), 20-32. doi:10.1067/mcp.2002.126179
- Ferracane, J. L., Cooper, P. R., & Smith, A. J. (2013). Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *J Adhes Dent*, 15(5), 407-412. doi:10.3290/j.jad.a29536

- Ferretti, C., Borsari, V., Falconi, M., Gigante, A., Lazzarini, R., Fini, M., . . . Mattioli-Belmonte, M. (2012). Human periosteum-derived stem cells for tissue engineering applications: the role of VEGF. *Stem Cell Rev*, *8*(3), 882-890. doi:10.1007/s12015-012-9374-7
- Ferretti, C., & Mattioli-Belmonte, M. (2014). Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells*, *6*(3), 266-277. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.266
- Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*, *34*(5), 415-423. doi:10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, *4*(5), 267-274.
- Galler, K. M., Buchalla, W., Hiller, K. A., Federlin, M., Eidt, A., Schiefersteiner, M., & Schmalz, G. (2015). Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod*, *41*(3), 363-368. doi:10.1016/j.joen.2014.11.021
- Galler, K. M., D'Souza, R. N., Federlin, M., Cavender, A. C., Hartgerink, J. D., Hecker, S., & Schmalz, G. (2011). Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod*, *37*(11), 1536-1541. doi:10.1016/j.joen.2011.08.027
- Galler, K. M., D'Souza, R. N., Hartgerink, J. D., & Schmalz, G. (2011). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*, *23*(3), 333-339. doi:10.1177/0022034511405326
- Galler, K. M., Widbiller, M., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K. A., Hoffer, P. C., & Schmalz, G. (2016). EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J*, *49*(6), 581-590. doi:10.1111/iej.12492
- Gardner, A., & Hobson, R. (2001). Variations in acid-etch patterns with different acids and etch times. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, *120*(1), 64-67. doi:10.1067/mod.2001.114643
- Ge, Q., Zhang, H., Hou, J., Wan, L., Cheng, W., Wang, X., . . . Wu, X. (2018). VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Mol Med Rep*, *17*(1), 1667-1675. doi:10.3892/mmr.2017.8059
- Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. *Crit Rev Oral Biol Med*, *15*(1), 13-27.
- Graham, L., Cooper, P. R., Cassidy, N., Nor, J. E., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2006). The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*, *27*(14), 2865-2873. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.020
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(25), 13625-13630. doi:10.1073/pnas.240309797
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A., & Simmons, P. J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, *116*(Pt 9), 1827-1835.

- Guo, W., He, Y., Zhang, X., Lu, W., Wang, C., Yu, H., . . . Jin, Y. (2009). The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomaterials*, 30(35), 6708-6723. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.034
- Gültekin KE, D. O. (2013). Kök hücrelere giriş. *Gazikök*, 1, 10-18.
- H., G. (2009). Hematopoetik kök hücreler. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 1(5), 67-80.
- Handa, K., Saito, M., Tsunoda, A., Yamauchi, M., Hattori, S., Sato, S., . . . Narayanan, A. S. (2002). Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*, 43(2-3), 406-408.
- Hargreaves, K. M., Giesler, T., Henry, M., & Wang, Y. (2008). Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*, 34(7 Suppl), S51-56. doi:10.1016/j.joen.2008.02.032
- He, H., Yu, J., Liu, Y., Lu, S., Liu, H., Shi, J., & Jin, Y. (2008). Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*, 32(7), 827-834. doi:10.1016/j.cellbi.2008.03.013
- Helder, M. N., Knippenberg, M., Klein-Nulend, J., & Wuisman, P. I. (2007). Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng*, 13(8), 1799-1808. doi:10.1089/ten.2006.0165
- Hotwani, K., & Sharma, K. (2014). Platelet rich fibrin - a novel acumen into regenerative endodontic therapy. *Restor Dent Endod*, 39(1), 1-6. doi:10.5395/rde.2014.39.1.1
- Huang, G., Ye, S., Zhou, X., Liu, D., & Ying, Q. L. (2015). Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell Mol Life Sci*, 72(9), 1741-1757. doi:10.1007/s00018-015-1833-2
- Huang, G. T., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*, 16(2), 605-615. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0518
- Hulsmann, M., Heckendorff, M., & Lennon, A. (2003). Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*, 36(12), 810-830.
- Huysseune, A., & Thesleff, I. (2004). Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. *Bioessays*, 26(6), 665-671. doi:10.1002/bies.20039
- Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakasima, A., & Akamine, A. (2004). Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*, 83(8), 590-595. doi:10.1177/154405910408300802
- Ivica, A., Zehnder, M., Mateos, J. M., Ghayor, C., & Weber, F. E. (2019). Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid. *J Endod*, 45(1), 45-50. doi:10.1016/j.joen.2018.09.015
- Iwaya, S. I., Ikawa, M., & Kubota, M. (2001). Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*, 17(4), 185-187.
- İnan S , O. z. K. (2009). Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5), 11-23.

- İrem, M. (2011). Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ARŞİV 2011; 20: 168, 20(168)*.
- Jeanneau, C., Lundy, F. T., El Karim, I. A., & About, I. (2017). Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *J Endod, 43(9s)*, S17-s24. doi:10.1016/j.joen.2017.06.007
- Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H., . . . Choung, P. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng, 13(4)*, 767-773. doi:10.1089/ten.2006.0192
- Karaöz E., & E., O. (2004). Kök Hücreler. *ATİ Teknoloji A.Ş., Trabzon,, 1*, 92-93.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells, 24(5)*, 1294-1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342
- Kim, S., Shin, S. J., Song, Y., & Kim, E. (2015). In Vivo Experiments with Dental Pulp Stem Cells for Pulp-Dentin Complex Regeneration. *Mediators Inflamm, 2015*, 409347. doi:10.1155/2015/409347
- Kim, S. G., Malek, M., Sigurdsson, A., Lin, L. M., & Kahler, B. (2018). Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J*. doi:10.1111/iej.12954
- Kim, S. G., Zhou, J., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Chen, M., . . . Mao, J. J . (2012). Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am, 56(3)*, 563-575. doi:10.1016/j.cden.2012.05.001
- Koga, H., Muneta, T., Nagase, T., Nimura, A., Ju, Y. J., Mochizuki, T., & Sekiya, I. (2008). Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res, 333(2)*, 207-215. doi:10.1007/s00441-008-0633-5
- Kong, K., Islam, M. S., Nassar, M., Hiraishi, N., Otsuki, M., Yiu, C. K. Y., & Tagami, J. (2015). Effect of phytic acid etchant on the structural stability of demineralized dentine and dentine bonding. *J Mech Behav Biomed Mater, 48*, 145-152. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.03.027
- Lakshman, K. M., Bhasin, S., Corcoran, C., Collins-Racie, L. A., Tchistiakova, L., Forlow, S. B., . . . Lavallie, E. R. (2009). Measurement of myostatin concentrations in human serum: Circulating concentrations in young and older men and effects of testosterone administration. *Mol Cell Endocrinol, 302(1)*, 26-32. doi:10.1016/j.mce.2008.12.019
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., . . . Chien, K. R. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature, 433(7026)*, 647-653. doi:10.1038/nature03215
- Lee, C. P., Colombo, J. S., Ayre, W. N., Sloan, A. J., & Waddington, R. J. (2015). Elucidating the cellular actions of demineralised dentine matrix extract on a clonal dental pulp stem cell population in orchestrating dental tissue repair. *J Tissue Eng, 6*, 2041731415586318. doi:10.1177/2041731415586318
- Leuning, D. G., Beijer, N. R. M., du Fosse, N. A., Vermeulen, S., Lievers, E., van Kooten, C., . . . Boer, J. (2018). The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Sci Rep, 8(1)*, 7716. doi:10.1038/s41598-018-25700-5

- Li, F., Liu, X., Zhao, S., Wu, H., & Xu, H. H. (2014). Porous chitosan bilayer membrane containing TGF-beta1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater*, *30*(2), 172-181. doi:10.1016/j.dental.2013.11.005
- Li, R., Guo, W., Yang, B., Guo, L., Sheng, L., Chen, G., . . . Tian, W. (2011). Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials*, *32*(20), 4525-4538. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.008
- Liu, N., Lu, M., Tian, X., & Han, Z. (2007). Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, *211*(2), 279-286. doi:10.1002/jcp.20978
- Liu, Y. T., Lin, S. B., Huang, C. P., & Huang, C. M. (2008). A novel immunogenic spore coat-associated protein in *Bacillus anthracis*: characterization via proteomics approaches and a vector-based vaccine system. *Protein Expr Purif*, *57*(1), 72-80. doi:10.1016/j.pep.2007.08.016
- Malheiros, C. F., Marques, M. M., & Gavini, G. (2005). In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*, *31*(10), 746-748.
- Malhotra, N., & Mala, K. (2012). Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: past, current and future. *Aust Endod J*, *38*(3), 137-148. doi:10.1111/j.1747-4477.2012.00355.x
- Maria, O. M., Khosravi, R., Mezey, E., & Tran, S. D. (2007). Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis*, *13*(1), 11-16. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01324.x
- Martinez-Lorenzo, M. J., Royo-Canas, M., Alegre-Aguaron, E., Desportes, P., Castiella, T., Garcia-Alvarez, F., & Larrad, L. (2009). Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res*, *27*(11), 1499-1507. doi:10.1002/jor.20898
- Matur Ī, S. S. (2011). Current approaches in stem cell production. *Archives Medical Review Journal*, *20*(3), 168-186.
- Meuleman, N., Tondreau, T., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Libertalis, Meulaman, N., . . . Lagneaux, L. (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*, *76*(4), 309-316. doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00611.x
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(10), 5807-5812. doi:10.1073/pnas.0937635100
- Mohammadi, Z., Shalavi, S., & Jafarzadeh, H. (2013). Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics. *Eur J Dent*, *7*(Suppl 1), S135-142. doi:10.4103/1305-7456.119091
- Morsczech, C., Moehl, C., Gotz, W., Heredia, A., Schaffer, T. E., Eckstein, N., . . . Hoffmann, K. H. (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*, *29*(7), 567-575. doi:10.1016/j.cellbi.2005.03.020

- Morsczeck, C., Reichert, T. E., Vollner, F., Gerlach, T., & Driemel, O. (2007). [The state of the art in human dental stem cell research]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, *11*(5), 259-266. doi:10.1007/s10006-007-0071-7
- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Vollner, F., Galler, K., & Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*, *12*(2), 113-118. doi:10.1007/s00784-007-0170-8
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, *33*(4), 377-390. doi:10.1016/j.joen.2006.09.013
- Nassar, M., Hiraishi, N., Islam, M. S., Aizawa, M., Tamura, Y., Otsuki, M., . . . Tagami, J. (2013). Effect of phytic acid used as etchant on bond strength, smear layer, and pulpal cells. *Eur J Oral Sci*, *121*(5), 482-487. doi:10.1111/eos.12064
- Nassar, M., Hiraishi, N., Tamura, Y., Otsuki, M., Aoki, K., & Tagami, J. (2015). Phytic acid: an alternative root canal chelating agent. *J Endod*, *41*(2), 242-247. doi:10.1016/j.joen.2014.09.029
- Niu, L. N., Zhang, L., Jiao, K., Li, F., Ding, Y. X., Wang, D. Y., . . . Chen, J. H. (2011). Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*, *39*(8), 536-542. doi:10.1016/j.jdent.2011.05.004
- Numata, M., Morinaga, S., Watanabe, T., Tamagawa, H., Yamamoto, N., Shiozawa, M., . . . Miyagi, Y. (2013). The clinical significance of SWI/SNF complex in pancreatic cancer. *Int J Oncol*, *42*(2), 403-410. doi:10.3892/ijo.2012.1723
- Nygaard-Ostby, B., & Hjortdal, O. (1971). Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res*, *79*(5), 333-349. doi:10.1111/j.1600-0722.1971.tb02019.x
- Orsini, G., Ruggeri, A., Mazzoni, A., Nato, F., Manzoli, L., Putignano, A., . . . Breschi, L. (2012). A review of the nature, role, and function of dentin non - collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endodontic Topics*, *21*(1), 1-18.
- Orti, V., Collart-Dutilleul, P. Y., Piglionico, S., Pall, O., Cuisinier, F., & Panayotov, I. (2018). Pulp Regeneration Concepts for Nonvital Teeth: From Tissue Engineering to Clinical Approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. doi:10.1089/ten.TEB.2018.0073
- Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., Ruiz-Requena, M. E., Pashley, D., Tay, F., & Toledano, M. (2011). Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*, *119*(1), 79-85. doi:10.1111/j.1600-0722.2010.00789.x
- Ostby, B. N. (1961). The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*, *19*, 324-353.
- Ovalı, E. m. (2008). Mezenkimal Kök Hücreler ve Üretimi. *Türk Hematoloji Derneği'nin Eğitim Çalışmalarından - Mezenkimal Kök Hücre Kursu*, *1*, 7-10.
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K., & Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, *2*(5), 215-224. doi:10.1089/wound.2012.0406

- Pang, N. S., Lee, S. J., Kim, E., Shin, D. M., Cho, S. W., Park, W., . . . Jung, I. Y. (2014). Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*, *40*(6), 811-817. doi:10.1016/j.joen.2013.09.007
- Pashley, D. H. (1992). The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent*, *17*(6), 229-242.
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjaderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*, *27*(1), 1-16. doi:10.1016/j.dental.2010.10.016
- Petrino, J. A., Boda, K. K., Shambarger, S., Bowles, W. R., & McClanahan, S. B. (2010). Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod*, *36*(3), 536-541. doi:10.1016/j.joen.2009.10.006
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, *25*(11), 2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Powers JM, S. R. (2007). Tissue engineering. *Craig's restorative dental materials. 12th ed., 12th ed.*, 571-586.
- Prasad, M., Butler, W. T., & Qin, C. (2010). Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res*, *51*(5), 404-417. doi:10.3109/03008200903329789
- Qidwai, T., & Jamal, F. (2010). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol*, *72*(5), 375-387. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02458.x
- Rai, S., Kaur, M., & Kaur, S. (2013). Applications of stem cells in interdisciplinary dentistry and beyond: an overview. *Ann Med Health Sci Res*, *3*(2), 245-254. doi:10.4103/2141-9248.113670
- Reis-Filho, C. R., Silva, E. R., Martins, A. B., Pessoa, F. F., Gomes, P. V., de Araujo, M. S., . . . Alves, J. B. (2012). Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol*, *57*(5), 469-476. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.10.011
- Roberts-Clark, D. J., & Smith, A. J. (2000). Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*, *45*(11), 1013-1016.
- Sadaghiani, L., Gleeson, H. B., Youde, S., Waddington, R. J., Lynch, C. D., & Sloan, A. J. (2016). Growth Factor Liberation and DPSC Response Following Dentine Conditioning. *J Dent Res*, *95*(11), 1298-1307. doi:10.1177/0022034516653568
- Sağsöz, H., & Ketani, M. A. (2008). Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, *1*(2), 29 - 33
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., & Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, *52*(8), 2521-2529. doi:10.1002/art.21212
- Salehi, S., Cooper, P., Smith, A., & Ferracane, J. (2016). Dentine matrix components extracted with phosphoric acid enhance cell proliferation and mineralization. *Dent Mater*, *32*(3), 334-342. doi:10.1016/j.dental.2015.11.004
- Sato, I., Ando-Kurihara, N., Kota, K., Iwaku, M., & Hoshino, E. (1996). Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J*, *29*(2), 118-124.

- Sauro, S., Toledano, M., Aguilera, F. S., Mannocci, F., Pashley, D. H., Tay, F. R., . . . Osorio, R. (2010). Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater*, 26(4), 368-379. doi:10.1016/j.dental.2009.12.008
- Sceiza, M. F., Daniel, R. L., Santos, E. M., & Jaeger, M. M. (2001). Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod*, 27(12), 741-743.
- Schertl, P., Volk, J., Perduns, R., Adam, K., Leyhausen, G., Bakopoulou, A., & Geurtsen, W. (2019). Impaired angiogenic differentiation of dental pulp stem cells during exposure to the resinous monomer triethylene glycol dimethacrylate. *Dent Mater*, 35(1), 144-155. doi:10.1016/j.dental.2018.11.006
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322. doi:10.1002/(sici)1097-4652(200003)182:3<311::Aid-jcp1>3.0.Co;2-9
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., . . . Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155. doi:10.1016/s0140-6736(04)16627-0
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., . . . Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13726-13731.
- Shu, X., Keller, T. C. t., Begandt, D., Butcher, J. T., Biwer, L., Keller, A. S., . . . Isakson, B. E. (2015). Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci*, 72(23), 4561-4575. doi:10.1007/s00018-015-2021-0
- Skoglund, A., & Tronstad, L. (1981). Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod*, 7(7), 309-316. doi:10.1016/s0099-2399(81)80097-0
- Skoglund, A., Tronstad, L., & Wallenius, K. (1978). A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 45(1), 17-28. doi:10.1016/0030-4220(78)90217-7
- Sloan, A. J., Matthews, J. B., & Smith, A. J. (1999). TGF-beta receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. *Histochem J*, 31(8), 565-569.
- Sloan, A. J., Perry, H., Matthews, J. B., & Smith, A. J. (2000). Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *Histochem J*, 32(4), 247-252.
- Sloan, A. J., & Smith, A. J. (1999). Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol*, 44(2), 149-156.
- Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2007). Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*, 13(2), 151-157. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01346.x
- Smith, A. J. (2003). Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ*, 67(6), 678-689.
- Smith, A. J., & Lesot, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(5), 425-437.

- Smith, A. J., Matthews, J. B., & Hall, R. C. (1998). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci*, *106 Suppl 1*, 179-184.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., . . . Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, *1*, e79. doi:10.1371/journal.pone.0000079
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, *34*(2), 166-171. doi:10.1016/j.joen.2007.11.021
- Sunitha Raja, V., & Munirathnam Naidu, E. (2008). Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*, *19*(1), 42-46.
- Suzuki, T., Lee, C. H., Chen, M., Zhao, W., Fu, S. Y., Qi, J. J., . . . Mao, J. J. (2011). Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res*, *90*(8), 1013-1018. doi:10.1177/0022034511408426
- Tap O , İ. B., Çelik G. (2013). Mezenkimal kök hücreler. *Gazikök*(1), 37-49.
- Tekeli Senem, Naghavi, E. A., Gökçe, B., Gözde Sır, Gürkan Yiğittürk, Çavuşoğlu, T., & Uyanıkgil, Y. (2016). Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, *1*(2), 72-83. doi:10.5606/fng.transplantasyon.2016.013
- Tezvergil-Mutluay, A., Mutluay, M., Seseogullari-Dirihan, R., Agee, K. A., Key, W. O., Scheffel, D. L., . . . Pashley, D. H. (2013). Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. *J Dent Res*, *92*(1), 87-91. doi:10.1177/0022034512466264
- Thibodeau, B., & Trope, M. (2007). Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*, *29*(1), 47-50.
- Tomson, P. L., Grover, L. M., Lumley, P. J., Sloan, A. J., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2007). Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*, *35*(8), 636-642. doi:10.1016/j.jdent.2007.04.008
- Torabinejad, M., & Turman, M. (2011). Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*, *37*(2), 265-268. doi:10.1016/j.joen.2010.11.004
- Tran Hle, B., & Doan, V. N. (2015). Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell Tissue Bank*, *16*(4), 559-568. doi:10.1007/s10561-015-9503-z
- Trevino, E. G., Patwardhan, A. N., Henry, M. A., Perry, G., Dybdal-Hargreaves, N., Hargreaves, K. M., & Diogenes, A. (2011). Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod*, *37*(8), 1109-1115. doi:10.1016/j.joen.2011.05.013
- Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev*, *27*(2), 208-219. doi:10.1210/er.2005-0016
- Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P., & Stiesch, M. (2010). Stem cells--prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, *120*(10), 860-883.

- Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., & Shufflebarger, J. (2001). Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med*, *344*(20), 1511-1514. doi:10.1056/nejm200105173442004
- Van Meerbeek, B., Conn, L. J., Jr., Duke, E. S., Eick, J. D., Robinson, S. J., & Guerrero, D. (1996). Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *J Dent Res*, *75*(3), 879-888. doi:10.1177/00220345960750030401
- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., . . . Vanherle, G. (2003). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*, *28*(3), 215-235.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., & Van Landuyt, K. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*, *27*(1), 17-28. doi:10.1016/j.dental.2010.10.023
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, *287*(5457), 1442-1446.
- White, R. R., Goldman, M., & Lin, P. S. (1987). The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by endodontic filling materials. Part II. *J Endod*, *13*(8), 369-374. doi:10.1016/s0099-2399(87)80195-4
- Yadlapati, M., Bigueti, C., Cavalla, F., Nieves, F., Bessey, C., Bohluli, P., . . . Silva, R. M. (2017). Characterization of a Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Bioresorbable Delivery System for Pulp Regeneration. *J Endod*, *43*(1), 77-83. doi:10.1016/j.joen.2016.09.022
- Yang, J., Yuan, G., & Chen, Z. (2016). Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Front Physiol*, *7*, 58. doi:10.3389/fphys.2016.00058
- Yang, J. W., Zhang, Y. F., Sun, Z. Y., Song, G. T., & Chen, Z. (2015). Dental pulp tissue engineering with bFGF-incorporated silk fibroin scaffolds. *J Biomater Appl*, *30*(2), 221-229. doi:10.1177/0885328215577296
- Yeom, K. H., Ariyoshi, W., Okinaga, T., Washio, A., Morotomi, T., Kitamura, C., & Nishihara, T. (2016). Platelet-rich plasma enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts. *Int Endod J*, *49*(3), 271-278. doi:10.1111/iej.12443
- Yılmaz, M. (2008). Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması ve Fenotipik Özellikleri *Türk Hematoloji Derneği'nin Eğitim Çalışmalarından - Mezenkimal Kök Hücre Kursu*, 11-13.
- Yoshida, N., Edanami, N., Tohma, A., Takeuchi, R., Ohkura, N., Hosoya, A., . . . Yoshida, K. (2018). Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. *Int Endod J*, *51*(11), 1187-1195. doi:10.1111/iej.12940
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*, *327*(3), 449-462. doi:10.1007/s00441-006-0308-z
- Yuan, Z., Nie, H., Wang, S., Lee, C. H., Li, A., Fu, S. Y., . . . Mao, J. J. (2011). Biomaterial selection for tooth regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, *17*(5), 373-388. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0041

- Zhang, J., & Li, L. (2008). Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem*, 283(15), 9499-9503. doi:10.1074/jbc.R700043200
- Zhang, R., Cooper, P. R., Smith, G., Nor, J. E., & Smith, A. J. (2011). Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod*, 37(1), 26-30. doi:10.1016/j.joen.2010.08.042
- Zhao, S., Sloan, A. J., Murray, P. E., Lumley, P. J., & Smith, A. J. (2000). Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J*, 32(8), 489-494.
- Zhu, S. J., Choi, B. H., Huh, J. Y., Jung, J. H., Kim, B. Y., & Lee, S. H. (2006). A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(2), 164-169. doi:10.1016/j.tripleo.2005.04.006
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., . . . Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. doi:10.1089/107632701300062859

EKLER

EK-1: Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Belgesi

BAŐURU BİLGİLERİ					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farelerin Dorsunuma Yerleştirilen İnsan Diőı Kık Dentinlerinin Değişik Asitlerle Dağlanması Sonrası İnsan Dental Pulpa Kık Hücree Ekimi Yoluyula Yapılan Rejenaratif Endodontik Tedavilerde Oluşan Yeni Dokuların Histolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle KarŐılaŐtırılmal Olarak İncelenmesi.				
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Cemal ERONAT				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Pedodonti				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŐTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı				
VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-				
DESTEKLEYİCİ	Tübitak 3001 BaŐlangıç ARGE Projeleri Destekleme Programı				
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>	
	Gözlemsel İlaç Çalışması <input type="checkbox"/>	Tıbbi Cihaz klinik Araştırması <input type="checkbox"/>			
	In Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları <input type="checkbox"/>	İlaç Diőı Klinik Araştırma <input checked="" type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŐTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER					
Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	09.12.2016	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŐ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	09.12.2016	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/> İmza tarihi: 09.12.2016				
DIĞER	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ					
Karar Nu: 16-12.1/46	Tarih: 27.12.2016				
Yukarıda baŐuru bilgileri verilen çok merkezli klinik araştırma baŐuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda baŐuru formunda adı geçen merkezlerde araştırmaya baŐlanmasının etik ağdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU					
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği				
BAŐKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kablım (**)
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	E.Ü. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma BaŐurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
			22	28.09.2011/05	1/2



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 16-12.1/46				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Serbest	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI

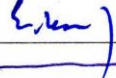
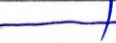


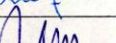
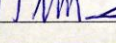
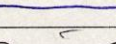

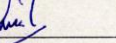
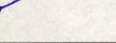

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
Sumru FESİCİOĞLU
EÜTF Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY		Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	--	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------

EK-2: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onay Belgesi

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	20 / 12 / 2016 / 77.637.435 - 81		
ARAŞTIRMANIN ADI	Farelerin Dorsumuna Yerleştirilen İnsan Dişi Kök Dentinlerinin Değişik Asitlerle Dağlanması Sonrası İnsan Dental Pulpa Kök Hücre Ekimi Yoluyla Yapılan Rejeneratif Endodontik Tedavilerde Oluşan Yeni Dokuların Histolojik ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Cemal ERONAT - Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Dt. Alp Abidin Ateşçi,- Prof.Dr. Mehmet İbrahim Tuğlu,- Uzm. Dr. Işıl Aydemir,- Doç. Dr. Çığır Biray Avcı,- Dr. Dt. Ceren Yücel Er		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input checked="" type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input type="checkbox"/>	Akademik <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	15 / 12 / 2016 / Tarih ve 79 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Hatice MAVİOĞLU Nöroloji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saim ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sivil Üye		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p> <p style="text-align: right;"> Prof. Dr. Emin KURT Başkan</p>			

Teşekkür

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana her konuda yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan büyük bir mutluluk duyduğum ve öğrencisi olduğum için kendimi hep şanslı hissettiğim doktora danışmanım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cemal ERONAT'a

Doktoramın ilk iki senesinde öğrencisi olduğum, doktora eğitimime başladığım günden bu yana bana her konuda yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aslı Topaloğlu AK'a,

Doktoram süresince bilimsel ve akademik tecrübelerini benden esirgemeyen, doktora eğitimimdeki tüm katkılarından ötürü Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Doktora başladığım günden bu yana birlikte çalışmayı keyifli hale getiren ve her türlü sıkıntıyı katlanabilir yapan başta Burç PEKPINARLI, Hazal Ezgi GERİHAN, Ece TURAN, Merve ÇITAK, İnci AKYILDIZ, Handan ÇELİK olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, bölümümüz hemşirelerine ve çalışanlarına,

Hayatım boyunca benden hiçbir zaman destek ve sevgilerini esirgemeyen, sonsuz sabır ve özveriyle hep yanımda olup beni bugünlere getiren, tüm bu zorlu süreci benimle paylaşan, yaşamımın her anında maddi manevi her zaman arkamda duran canım annem Nurhan ATEŞÇİ, canım babam Yusuf Ziya ATEŞÇİ ve en yakın arkadaşım olan kardeşim Ata Mert ATEŞÇİ'ye,

Doktora süresince hep yanımda olan, ilk günden itibaren pozitif enerji veren, desteğini, sabrını, anlayışını ve dostluğunu her zaman hissettiğim, sadece tez hazırlama sürecimde değil her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Seza CİNKAVUK, Haşmet TÜRKER, Berk KURTULDU, Yurdanur SÖZKESEN, Ece GÜNAY, Ömer YILMAZ, Murat SÖYLEMEZ, Doruk ÜNSAL, Yiğitcan YILMAZ ve Pelin SÖYLEMEZ'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir - 2019

Alp Abidin Ateşçi

Özgeçmiş

15.06.1991 tarihinde İzmir'de doğdum. İlköğrenimi İzmir Özel Türk Koleji İlköğretim Okulu'nda bitirdikten sonra orta öğretimimi Özel Ege İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimimi Bornova Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2009 yılında Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ni kazandım, 2014 yılında mezun oldum. 2014 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda doktora programına başladım.

İletişim: alpabidinate91@gmail.com