

**T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PEDODONTİ ANABİLİM DALI**

**MELATONİN VE OKSİRESVERATROLÜN DENTAL PULPA  
KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDE OLUŞTURDUĞU  
SİTOTOKSİK ETKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şeyma KESKİN**

**Pedodonti Anabilim Dalı  
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Fatih ŞENGÜL**

**ERZURUM  
2019**

T.C  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

MELATONİN VE OKSİRESVERATROLÜN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDE OLUŞTURDUĞU  
SİTOTOKSİK ETKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Şeyma KESKİN

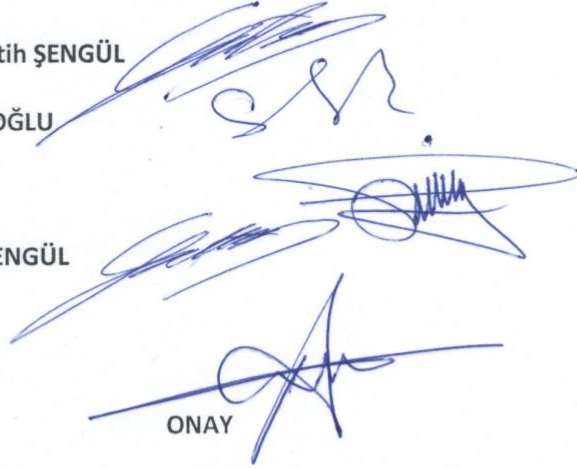
Tez Savunma Tarihi : 26.04.2019

Tez Danışmanı : Dr.Öğr.Üyesi Fatih ŞENGÜL

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Sera DERELİOĞLU

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Şaziye SARI

Jüri Üyesi : Dr.Öğr.Üyesi Fatih ŞENGÜL



ONAY

Bu Çalışma Yukarıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** Olarak Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Abdulvahit ERDEM  
Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi  
ERZURUM-2019

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	3
2.2. Biyoyumluluğa İlişkin Temel Kavramlar .....	7
2.3. Biyoyumluluğun Değerlendirilmesi .....	8
2.3.1. İn Vitro Testler.....	10
2.3.1.1. Sitotoksosite Testleri .....	10
2.3.1.2. Hücre Metabolizması ve Fonksiyonu İçin Uygulanan Testler .....	11
2.3.1.3. Bariyer Kullanılan Testler (İndirekt Testler) .....	11
2.3.1.4. Hücre Fonksiyon Ölçümünde Kullanılan Diğer Değerlendirmeler .....	11
2.3.1.5. Mutageniz Analizleri.....	12
2.3.1.6. XCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System, RTCA).....	12
2.3.2. Hayvan Deneyleri .....	13
2.3.3. Kullanım Testleri .....	14
2.4. Antioksidanlar.....	15
2.4.1. Melatonin .....	19
2.4.1.1. Melatonin ve Diş Gelişimi.....	20

2.4.1.2. Melatoninin Serbest Radikaller Üzerindeki Etkinliği.....	21
2.4.1.3. Oral Dokularda Melatonin Kullanımı.....	22
2.4.2. Oksiresveratrol.....	23
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>26</b>
3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	26
3.1.1. Dondurulmuş DPSC Hücrelerinin Çözdürülmesi.....	28
3.1.2. DPSC Hücrelerinin Pasajlanması.....	30
3.1.3. Canlı DPSC Hücrelerinin Sayılması.....	32
3.1.4. Hücrelerin E-platelere Ekilmesi.....	33
3.1.5. Melatonin ve Oksiresveratrolün Hücre Kültürlerine İlave Edilmesi .....	34
3.2. İstatistiksel Analiz .....	36
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
4.1. Melatonin.....	41
4.2. Oksiresveratrol.....	44
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>46</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>54</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>73</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>73</b>
<b>EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....</b>	<b>74</b>
<b>EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>75</b>

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatih şengül'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin ilerlemesinde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Taşkın Gürbüz'e (İstanbul Medeniyet Üniversitesi, İstanbul) ve Prof. Dr. Fikrettin şahin'e (Yeditepe Üniversitesi, İstanbul), deney aşamalarında laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu (Atatürk Üniversitesi, ERZURUM) ve Prof. Dr. Zekai Halıcı (Atatürk Üniversitesi, ERZURUM) başta olmak üzere tüm Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, hücrelerin çoğaltılması aşamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ali Taghizadehghalehjoughi'ye (Atatürk Üniversitesi, ERZURUM), istatistiksel analizlerinin yapılması ve yorumlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Ömer Akbulut'a (Atatürk Üniversitesi, ERZURUM), uzmanlık eğitimim boyunca tecrübelerinden istifade ettiğim ve üstümde büyük emekleri olan değerli hocalarım Doç. Dr. Sera Derelioğlu, Dr. Öğr. Üyesi Münevver Kılıç ve desteklerini hissettiğim hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Songur ve Dr. Öğr. Üyesi Tarek Seddik'e, başta göreve beraber başladığım kıdem arkadaşlarım olmak üzere ikinci ailem olarak nitelendirdiğim Pedodonti Anabilim Dalındaki tüm asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline, bu çalışmayı **2015/069 BAP** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

En önemlisi bugünlere gelmemi sağlayan, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam, kardeşlerim ve dualarıyla hep yanımda hissettiğim canım dedem Mahmut NAZLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Dt. şeyma KESKİN**

## ÖZET

### Melatonin ve Oksiresveratrolün Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi

**Amaç:** Bu çalışmada xCELLigence® cihazı kullanılarak melatonin ve oksiresveratrolün farklı dozlarının dental pulpa kök hücre (DPSC) proliferasyonuna olan etkisini 72 saat boyunca gözlemlemek ve bu materyallerin DPSC proliferasyonunu arttıran ve sitotoksik dozlarını saptamak amaçlanmıştır.

**Materyal Metot:** Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu dondurulmuş insan DPSC'si kullanılmıştır. DPSC'ler e-platelere ekildikten 24 saat sonra üçer farklı dozda melatonin (100 pM, 100 nM ve 100 µM) ve oksiresveratrol (10 µM, 25 µM, 50 µM) eklenmiştir. Deney gruplarının 72 saatlik gerçek zamanlı hücre indeks verileri ve IC<sub>50</sub> değerleri xCELLigence® cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Hücre indeks değerlerinin karşılaştırılması amacıyla tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve doğrusal regresyon analizleri kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmamızda kullandığımız antioksidan maddelerin tüm dozları değerlendirildiğinde; oksiresveratrol 10 µM ve melatonin 100 pM grupları kontrol grubunun üstünde, melatonin 100 nM grubu kontrol grubuyla benzer, oksiresveratrol 25 µM, oksiresveratrol 50 µM ve melatonin 100 µM grupları ise kontrol grubunun altında hücre indeks değerleri sergilemiştir. 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerleri melatonin için sırasıyla 946 nM, 1220 nM ve 1243 nM iken, oksiresveratrol için ise sırasıyla 23 µM, 22,2 µM ve 22,5 µM olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Melatonin ve oksiresveratrol çalışılan düşük dozlarda DPSC proliferasyonunu arttırırken, yüksek dozlarda DPSC üzerinde sitotoksik etki sergilemişlerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar, DPSC, melatonin, mezenkimal kök hücre, oksiresveratrol, xcelligence

## ABSTRACT

### Evaluation of Cytotoxic Effect of Melatonin and Oxyresveratrol on Dental Pulp Stem Cells

**Aim:** The aim of this study is to observe the effect of melatonin and oxyresveratrol's different doses on dental pulp stem cell (DPSC) proliferation for 72 hours by using xCELLigence® device and to determine DPSC proliferation and cytotoxic doses of these materials.

**Material Method:** In this study, the American Type Culture Collection frozen human DPSC was used. DPSCs were plated on e-plates and after 24 hours three different doses of melatonin (100 pM, 100 nM ve 100 µM) and oxyresveratrol (10 µM, 25 µM, 50 µM) were added. Real time cell index data was acquired by using xCELLigence® device for 72 hours and IC<sub>50</sub> values of experimental groups were obtained. In order to compare cell index values, paired samples t-test and linear regression analysis were used.

**Results:** When all doses of antioxidants used in our study was evaluated; cell index values of oxyresveratrol 10 µM and melatonin 100 pM groups were above the control group, melatonin 100 nM group were similar to the control group, oxyresveratrol 25 µM, oxyresveratrol 50 µM and melatonin 100 µM groups were below the control group. IC<sub>50</sub> values at 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>th</sup> hours were found to be 946 nM, 1220 nM and 1243 nM for melatonin and 23 µM, 22.2 µM and 22.5 µM for oxyresveratrol, respectively.

**Conclusion:** Melatonin and oxyresveratrol increased DPSCs proliferation at low doses and had cytotoxic effects on DPSCs at high doses.

**Key Words:** Antioxidants, DPSC, melatonin, mesenchymal stem cell, oxyresveratrol, xcelligence

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

®	: Tescilli
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
µmol/l	: Mikromol/litre
°C	: Santigrat derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Al	: Alüminyum
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
cm	: Santimetre
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
CRP	: C-reaktif protein
Cu	: Bakır
DFSCs	: Dental folikül kök hücreleri
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FBS	: Fetal sığır serumu
Fe	: Demir
FL	: Florida
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HEMA	: Hidroksietil metakrilat



HO·	: Hidroksil
HOCl	: Hipokloröz asit
IC <sub>50</sub>	: Maksimum dozun yarısını inhibe eden değer
IL	: İnterlökin
M	: Molar
Mel1aR	: Melatonin 1a reseptörü
Mel1bR	: Melatonin 1b reseptörü
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NAC	: N-asetil-l-sistein
NBT	: Nitroblue tetrazolium
nM	: Nanomolar
NO	: Nitrik oksit
ONOO·	: Peroksinitrit
Örn	: Örneğin
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDLSCS	: Periodontal ligament kök hücreleri
pM	: Pikomolar
PSA	: Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B
R <sup>2</sup>	: Regresyon eşitliğinin değişken açıklama ölçütü
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RTCA	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi

SCAP	: Apikal papilladan elde edilen kök hücreler
SHED	: Süt dişi pulpası kök hücreleri
TNF	: Tümör Nekrotize Edici Faktör
vb	: Ve benzeri
WST	: Suda çözünebilir tetrazolyum tuzu



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Plastisite özelliklerine göre kök hücre sınıflaması .....	5
Şekil 2.2. XCELLigence® cihazının çalışma prensibi .....	13
Şekil 2.3. Antioksidanların sınıflaması .....	17
Şekil 2.4. a) Veratrum grandiflorum b) Polygonum cupsidatum (Japon madımağı) .....	23
Şekil 2.5. Resveratrolün kimyasal yapısı .....	23
Şekil 2.6. Oksiresveratrolün kimyasal yapısı .....	25
Şekil 3.1. Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan satın alınan dondurulmuş insan DPSC hücreleri .....	26
Şekil 3.2. Çalkalayıcı su banyosu .....	28
Şekil 3.3. Santrifüj cihazı .....	28
Şekil 3.4. a. 25 cm <sup>2</sup> lik flasklar b. DPSC hücre solüsyonu .....	29
Şekil 3.5. “Inverted” Işık Mikroskobu .....	29
Şekil 3.6. Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu .....	30
Şekil 3.7. % 0.05 tripsin-EDTA .....	30
Şekil 3.8. CO <sub>2</sub> İnkübatörü .....	31
Şekil 3.9. Tripkan Mavisi .....	32
Şekil 3.10. a. Hücre Sayım Cihazı b. Sayım Aparatı .....	33
Şekil 3.11. a. Melatonin b. Oksiresveratrol c. DMSO d. Hassas terazi .....	34
Şekil 3.12. Spin Attırıcı .....	35
Şekil 4.1. DPSC hücrelerine 24. saat sonunda melatonin ve oksiresveratrol ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi .....	37
Şekil 4.2. 24. saat sonunda DPSC hücrelerine melatonin ve oksiresveratrol ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi .....	38

<b>Şekil 4.3.</b> Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının farklı zaman aralıkları için elde edilen ortalama hücre indeks değerleri ve standart sapmaları .....	39
<b>Şekil 4.4.</b> Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının zamana bağlı hücre indekslerine ilişkin dağılımları ve regresyon doğruları.....	40
<b>Şekil 4.5.</b> DPSC hücrelerine 24. saat sonunda 3 farklı dozda melatonin ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi .....	42
<b>Şekil 4.6.</b> 24. saat sonunda DPSC hücrelerine melatonin ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi.....	42
<b>Şekil 4.7.</b> Çeşitli dozlarda hazırlanan melatonin çözeltilerinin (100pM, 100nM,100 µM) 24.,48. ve 72. saatlerdeki slop grafikleri .....	43
<b>Şekil 4.8.</b> Melatoninin 24.,48. ve 72. saatlerdeki doz yanıt eğrileri .....	43
<b>Şekil 4.9.</b> DPSC hücrelerine 24. saat sonunda oksiresveratrol ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi .....	44
<b>Şekil 4.10.</b> 24. saat sonunda DPSC hücrelerine oksiresveratrol ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi.....	44
<b>Şekil 4.11.</b> 24,48 ve 72. saatlerde çeşitli dozlarda hazırlanan oksiresveratrol (10 µM, 25 µM ve 50 µM) çözeltilerinin slop grafikleri .....	45
<b>Şekil 4.12.</b> Oksiresveratrolün 24.,48. ve 72. saatlerdeki doz yanıt eğrileri .....	45

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Oral ve maksillofasiyal bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynakları .....	6
<b>Tablo 2.2.</b> Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları.....	9
<b>Tablo 3.1.</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve üretildiği firmalar.....	27
<b>Tablo 3.2.</b> Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan alet ve cihazlar.....	27
<b>Tablo 4.1.</b> Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının farklı zaman aralıkları için elde edilen ortalama hücre indeks değerleri ve standart sapmaları .....	38
<b>Tablo 4.2.</b> Hücre indeks değerlerinin saate bağlı regresyon analizi .....	40

## 1. GİRİŞ

Canlı dokularla temas eden bir materyalin biyoyumluluğu veya doku uyumluluğu; toksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler göstermemesi, sitotoksitesisi ise hücre hasarı olarak tanımlanmaktadır.<sup>1</sup> Bir materyalin biyolojik olarak kabul edilebilirliğinde toksik etkisinin olmaması veya tolere edilebilir düzeyde olması önemlidir. Diş hekimliğinde kullanılan birçok materyal ise pulpanın tolere edebileceğinden daha fazla toksik etkiye sahip olduğu için pulpa ile direkt teması istenmemektedir.<sup>2</sup> Özellikle dental materyallerin birçoğunda bulunan rezin monomerlerin indüklediği oksidatif stres, hücre içi antioksidanların kapasitesini aşan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine neden olmaktadır.<sup>3</sup>

Serbest radikal olarak da bilinen ROT, valans orbitallerinde eşleşmeyen elektronların varlığı ile karakterize olduğundan son derece reaktiftir. Bu özelliği sebebiyle ROT; protein, lipit, nükleik asit, amino asit, karbonhidrat ve vitaminler gibi hücrel moleküllere zarar vererek hücre fonksiyonlarında değişim, neoplazm gelişimi ve hücre ölümü gibi patolojilere neden olabilmektedir. Tüm bu etkileri göz önünde bulundurulduğunda ROT üretimi rezin monomer sitotoksitesisinde hücrel stresin erken belirteçlerinden biri olarak tanımlanmaktadır.<sup>4,5</sup>

Rezin içerikli dental materyallerin kullanımında olduğu gibi pulpitis sürecinde oluşan hipoksi ve beyazlatma ajanlarının kullanımı da pulpada ROT oluşumuna neden olabilmektedir.<sup>3, 6, 7</sup> Melatonin ve oksiresveratrol gibi antioksidan maddelerin ROT üretiminde belirgin bir azalmaya neden olduğu bilindiğinden; pulpa dokusuna yakın kavitelere kuafaj materyali olarak veya dolgu maddeleri ya da beyazlatma ajanlarının yapısına katılarak oluşan sitotoksitesinin azaltılabileceği düşünülmektedir.<sup>8</sup>

Ancak, tüm bu fikirleri uygulamaya geçirmeden önce bu iki antioksidan maddenin pulpa hücreleriyle olan biyoyumunun belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada anlık hücre canlılığını ölçen ve sitotoksik etkileri değerlendiren bir cihaz olan xCELLigence® cihazı kullanılarak, melatonin ve oksiresveratrolün farklı dozlarının dental pulpa kök hücre (DPSC) proliferasyonuna olan etkisinin 72 saat boyunca gözlemlenmesi ve bu antioksidan ajanların DPSC üzerinde sitotoksikite gösteren veya hücreleri proliferate eden dozlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda test edilen maddelerle ilgili hipotezler şu şekilde kurulmuştur:

**Hipotez 1:** Melatoninin insan DPSC'si üzerine uygulanan 100 pM, 100 nM ve 100 µM'lık dozlarının hücre indeks değerlerine etkileri bakımından aralarında farklılık bulunmamaktadır.

**Hipotez 2:** Oksiresveratrolün insan DPSC'si üzerine uygulanan 10 µM, 25 µM ve 50 µM'lık dozlarının hücre indeks değerlerine etkileri bakımından aralarında farklılık bulunmamaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri

Hasara uğramış bir organın fonksiyonlarını düzeltmek için hasarlı hücrelerin yerine yenisini koymanın en iyi seçenek olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle; farklı kaynaklardan elde edilebilen, çeşitli doku ve hücrelere dönüşüm sağlayabilen ayrıca hasarlı bölgelerin onarımını sağlayarak birçok tedavi yöntemine fayda sağlayabilecek olan kök hücreler rejeneratif tedavide oldukça büyük bir öneme sahiptir.<sup>9</sup>

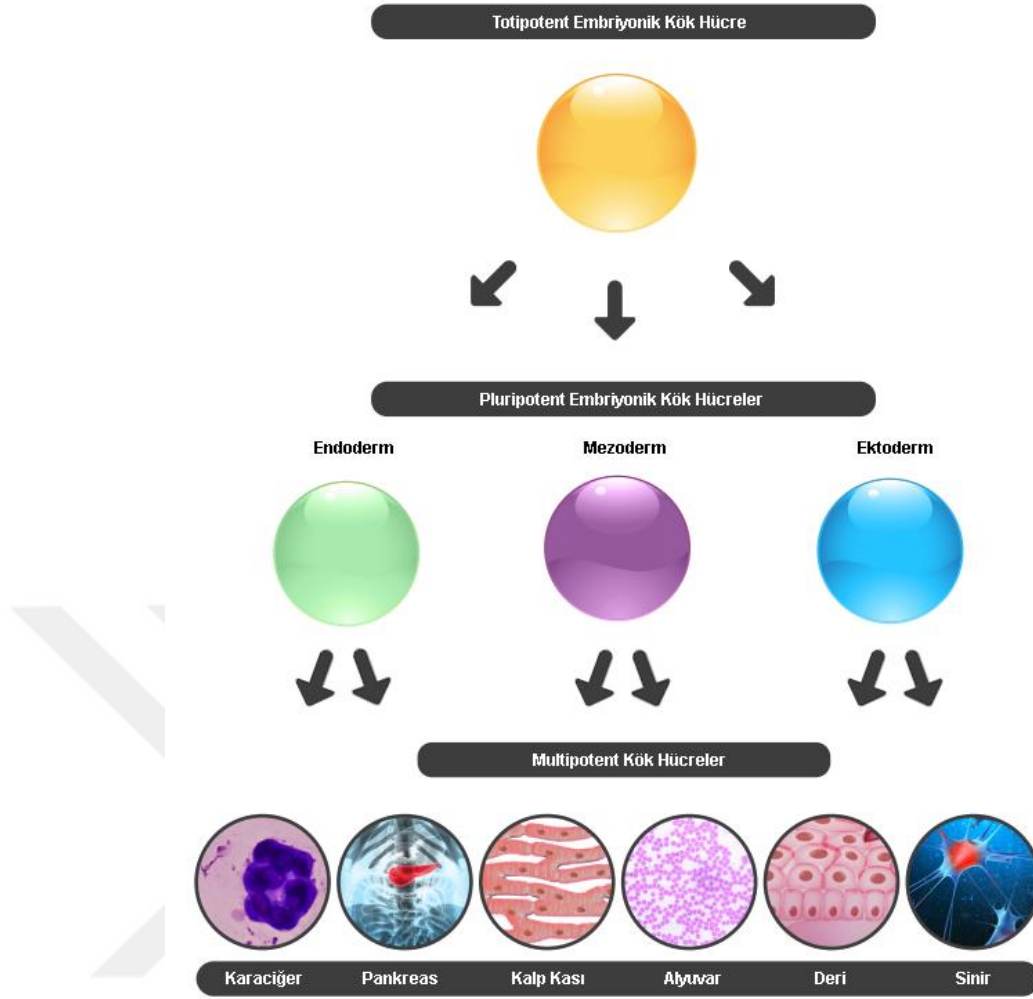
Kök hücreler bölünebilme, rejenerasyon ve farklılaşmış hücrelere öncülük etme (plastisite-farklılaşma) yetenekleri sergileyen farklılaşmamış hücrelerdir ve temel olarak embriyonik ve somatik (erişkin) kök hücreler olmak üzere iki bölümde incelenmektedir.<sup>10,11</sup>

Embriyonik kök hücrelerin tüm dokuları oluşturabilme yeteneği vardır.<sup>12</sup> Embriyonik kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri dikkate alındığında çok iyi bir kaynak gibi görünseler de etik sorunlar ve neoplastik potansiyelleri (teratoma) kullanımlarını kısıtlamaktadır.<sup>13</sup>

Bir organ veya dokudaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre grupları ise erişkin kök hücrelerini oluşturmaktadır. Bu hücrelerin, komşuluk ettiği doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme ve kendilerini yenileyebilme kabiliyetleri bulunmaktadır. Bu hücrelerin temel görevleri, buldukları dokuyu tamir etme ve dokunun devamlılığını sağlamaktır.<sup>14</sup> Kemik iliği,<sup>15</sup> santral sinir sistemi,<sup>16</sup> periferik kan,<sup>17</sup> deri epidermisi,<sup>18</sup> sindirim kanalı,<sup>19</sup> plsentta membranı,<sup>20</sup> amniyotik sıvı,<sup>21</sup> retina,<sup>22</sup> iç kulak,<sup>23</sup> nazal mukoza,<sup>24</sup> iskelet kası,<sup>25</sup> yağ dokusu,<sup>26</sup> göbek kordon kanı,<sup>27</sup> kornea,<sup>28</sup> pankreas,<sup>29</sup> karaciğer,<sup>30</sup> kalp,<sup>31</sup> akciğer<sup>32</sup> ve diş pulpası<sup>33</sup> gibi çeşitli dokular erişkin kök hücrelerine kaynak oluşturabilmektedir.



Kök hücreler plastisite özelliklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir.(Şekil 2.1) Totipotent hücre (her şeyi yapabilen) tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan hücelere denilmektedir. Totipotent özellik gösteren tek kök hücre tipi fertilize yumurta hücresidir.<sup>34</sup> Pluripotent kök hücreler endodermal (hepatositler, sindirim sistemi hücreleri, pankreatik beta hücreleri vb), mezodermal (kemik, kıkırdak, kas vb) ve ektodermal kökenli (saç, deri, nöron vb) tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeli gösteren embriyo kaynaklı hücrelerdir.<sup>35</sup> Organizmada birçok dokunun oluşmasına pluripotent hücreler kaynaklık etse de bu hücrelerin yeni bir birey oluşturması mümkün değildir. Multipotent kök hücreler ise pluripotent hücelere göre daha az hücre tipine dönüşebilir ve farklılaşmaları tek bir yön üzerine programlanmıştır. Pluripotent kök hücreleri (erişkin kök hücreler), biraz daha özelleşmiş olan multipotent kök hücrelerine dönüşmektedirler. Erken gelişim döneminde pluripotent kök hücelere, çocuklarda ve yetişkinlerde ise multipotent kök hücelere daha sık rastlanmaktadır.<sup>36, 37</sup>



**Şekil 2.1.** Plastisite özelliklerine göre kök hücre sınıflaması

Kök hücrelerin, içinde buldukları dokuya ait hücrelerin dışındaki diğer tip hücrelere farklılaşabileceği de vurgulanmıştır. Son zamanlarda kök hücre kaynağı olarak mezenkimal kök hücreler önem kazanmıştır. Oral ve maksillofasial bölgeler mezenkimal kök hücreler için kaynak oluşturabilmektedir (Tablo 2.1).<sup>38</sup> Oral bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynaklarına apikal papilla, eksfoliyе süt dişi, erişkin dental pulpası, dental folikül ve periodontal ligament dokuları örnek olarak verilebilir.<sup>38</sup>

**Tablo 2.1.** Oral ve maksillofasiyal bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynakları

<b>Kaynak</b>	<b>Elde edilen kök hücre</b>
Erişkin dental pulpası	Dental pulpa kök hücresi Dental pulp stem cell (DPSC)
Apikal papilla	Apikal papilladan elde edilen kök hücreler Stem cells of the apical papilla (SCAP)
Dental folikül	Dental folikül kök hücreleri Dental follicle stem cells (DFSC)
Eksfoliye süt dişi	Süt dişi pulpası kök hücreleri Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)
Periodontal ligament	Periodontal ligament kök hücreleri Periodontal ligament stem cells (PDLSC)

DPSC; proliferasyon ve plastisite yetenekleri oldukça yüksek, klonlanabilen, sürme sonrası dönemde yok olmayan multipotent özellikli mezenkimal kök hücreler olarak tanımlanmaktadır.<sup>33</sup>

20 yaş dişleri, çekilmiş süt dişleri ve ortodontik tedavi, periodontal problem veya travma sebebiyle çekilmiş dişler başlıca pulpa kök hücre kaynaklarını oluşturmaktadır. Çekim endikasyonlarının olması ve sık bulunmaları, 20 yaş dişlerini dental pulpa kök hücre çalışmalarında tercih sebebi yapmaktadır. Ayrıca, bu dişlerin ağızda en son gelişen dişler olması sebebiyle genç bireylerde gelişimini henüz tamamlamamış, pulpa dokusu açısından oldukça zengin 20 yaş dişlerine rastlamak mümkündür.<sup>39</sup>

SHED yetişkin pulpasına oranla daha fazla proliferasyon kapasitesine ve hücre popülasyonuna sahiptir. Bununla birlikte daha immatür özellikteki multipotent hücrelerden oluşmaktadır. Ancak bu hücrelerin DPSC gibi pulpa-dentin kompleksi oluşturamadıkları bilinmektedir.<sup>40, 41</sup>

## 2.2. Biyouyumluluğa İlişkin Temel Kavramlar

Biyoyumluluk ya da doku uyumluluğu bir materyalin canlı dokularla temas halindeyken sistemik ve lokal toksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler göstermemesi olarak tanımlanmaktadır<sup>1</sup>. Toksikite ise materyalin kimyasal yollarla biyolojik sistemlerde hasar oluşturabilme özelliğidir. Sitotoksikite hücre hasarı, apoptozis ise programlı hücre ölümünü belirtmektedir. Materyalin deoksiribonükleik asit (DNA) yapısında oluşturduğu değişiklik genotoksikite, bunun sonraki nesillere aktarımı ise mutajenite olarak tanımlanmaktadır.<sup>42</sup>

Biyoyumluluk kavramı materyalin çeşidine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir.<sup>43</sup> Materyaller sistemik toksikite, lokal reaksiyonlar (sitotoksikite, nekroz, enflamasyon, apoptozis vb) ve alerjik reaksiyonlar oluşturabilir. Materyalin biyouyumluluğu, yapısından salınan komponentler ve bunların hücresel düzeyde oluşturduğu etkilere bağlıdır. Biyouyumlu bir materyal tamamen inert (etkisiz) olmayabilir, ancak klasik yaklaşımla tolere edilebilir olması beklenmektedir.

Günümüzde restoratif diş hekimliğinde kullanılan birçok materyalin içeriğinde rezin bulunmaktadır. Resin esaslı materyallerin en çok kullanıldıkları alanlar ise kompozit rezinler, adeziv sistemler ve rezin simanlardır.<sup>44</sup> Bu materyaller her ne kadar estetik olduğu için tercih edilseler de pulpa üzerinde sitotoksik etkiye sahiptirler. Her ne kadar dental rezinlerdeki sitotoksik etkiden genel olarak serbest monomerler sorumlu tutulsa da bazı ek mekanizmalar öne sürülmüştür:

1. Monomer-polimer dönüşümü sırasında ortaya çıkan serbest monomerlerin kısa süreli salınımı
2. Erozyon ve bozulma sonucu zamanla oluşan sızıntı maddeler
3. Restoratif materyal ve diş dokusu ara yüzünde bulunan bakterilerin rolü

4. Rezin içerikli materyaller tarafından salınan ve sitotoksik reaktif oksijen türleri (ROT) üreten fenton reaksiyonunda rol oynayan  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  gibi iyonların salınımı

5. Rezin monomerlerden salınan HEMA'nın, hücre S-G fazlarını bloke etmesi sonucu gerçekleşen ROT üretimi ve hücre apoptozisi<sup>45</sup>

ROT, valans orbitallerinde eşleşmeyen elektronların varlığı ile karakterize moleküllerdir ve bu durum onları son derece reaktif hale getirir. Normal koşullarda insan vücudundaki diğer dokularda olduğu gibi pulpa dokusunda da ROT ve bunların salınım ve kontrolünü sağlayan antioksidan sistemi arasında bir denge mevcuttur. Fakat, rezin monomerlerin indüklediği oksidatif stres mevcut antioksidan sistemin kapasitesini aşan bir ROT üretimine neden olmaktadır. Bundan dolayı ROT üretimi hücrel stresin erken belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. ROT artışı hücrenin lipid, karbonhidrat, protein gibi yapıtaşlarını hasara uğratabilir dahası DNA'yı oksidatif hasara uğratarak apoptozise neden olabilmektedir. Ayrıca, kesin olmamakla birlikte ROT artışının mutajeniteye sebep olması da mümkündür.<sup>44</sup>

### **2.3. Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi**

Biyolojik yapıların, materyallerin olası zararlarından korunabilmesi için öncelikle sitotoksikite mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir. Yeni materyallerin biyolojik olarak kabul edilebilir olmasını sağlamak için günümüzde birkaç test yöntemi kullanılmaktadır. Bu testler in vitro testler, hayvan deneyleri ve kullanım testleri olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları

<b>Test</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
In vitro testler	Uygulaması hızlıdır Ucuzdur Standardize edilebilir Büyük ölçekte taramalar yapılabilir İyi deneysel kontrol sağlanabilir Etkileşim mekanizmasında mükemmelliğe sahiptir	İn-vivo testlerle ilişkisi sorgulanabilir
İn-vivo testler	Kompleks sistemik etkileşimlere izin verir Yanıtlar in-vitro testlerden daha kapsamlıdır İn-vitro testlerden daha anlamlı sonuçlar verir	Materyal kullanımıyla ilişkisi sorgulanabilir Pahalıdır Zaman alıcıdır Yasal/etik kaygılar mevcuttur Kontrolü zordur Yorumlanması ve ölçülmesi zordur
Kullanım testleri	Malzeme kullanımının uygunluğu güvence altına alınmıştır	Çok pahalıdır Çok zaman alıcıdır Yasal / etik kaygılar daha fazladır Kontrol etmek zor olabilir Yorumlanması ve ölçülmesi zordur

### **2.3.1. İn Vitro Testler**

In vitro deneylerde iki tip hücre kullanılabilir. Primer hücreler, doğrudan bir hayvandan alınan ve kültürlenmiş hücrelerdir. Bu hücreler kültürde sadece sınırlı bir süre için büyürler, ancak genellikle in vivo hücre özelliklerinin birçoğunu muhafaza ederler. Sürekli olarak gelişen hücreler veya hücre hattı ise, süresiz büyümelerini sağlamak için önceden kültürde farklılaştırılmış olan hücrelerdir. Bu dönüşümden dolayı, bu hücreler in vivo özelliklerinin hepsini koruyamazlar, fakat genel özelliklerini sergilemektedirler. Primer hücre kültürleri, materyallerin sitotoksitesini ölçmek için sürekli hücre hatlarından daha elverişli görünmektedir. Bununla birlikte, tek bir bireyden gelen birincil hücreler, sınırlı genetik değişkenliğe sahiptir, davranışlarını değiştiren viral veya bakteriyel ajanları barındırabilir ve çoğu kez kültür içine yerleştirildiğinde in vivo işlevlerini hızla kaybederler. Ayrıca, sürekli hücre hatlarının genetik ve metabolik stabilitesi, standartlaştırma deney yöntemlerine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak, hem primer hem de sürekli hücreler in vitro testlerde önemli rol oynarlar ve her ikisi de materyalleri değerlendirmek için kullanılabilir. <sup>46</sup>

In vitro testler; sitotoksite testleri, hücre metabolizması ve fonksiyonu için uygulanan testler, bariyer kullanılan testler (indirekt testler), hücre fonksiyonunu ölçmek için kullanılan diğer değerlendirmeler ve mutagenез analizleri olarak sınıflandırılabilir. <sup>47</sup>

#### **2.3.1.1. Sitotoksite Testleri**

Sitotoksite testleri, bir materyalin neden olduğu hücre ölümünü, bu materyale maruz kalmadan önceki ve sonraki hücre sayısını veya hücre büyümesini ölçerek değerlendirmektedir. Sitotoksite testlerine membran geçirgenlik testleri örnek olarak verilebilir. <sup>1</sup>

### **2.3.1.2. Hücre Metabolizması ve Fonksiyonu İçin Uygulanan Testler**

DNA sentezini veya protein sentezini ölçen testler ise hücre metabolizması ve fonksiyonunu ölçen testler grubunda değerlendirilmektedir. Sitotoksosite için yaygın olarak kullanılan bir enzimatik test olan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] testinin yanı sıra NBT (nitroblue tetrazolium), XTT [2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanil tuzu] ve WST (suda çözünebilir tetrazolyum tuzu) testlerinin hepsi farklı tetrazolyum tuzlarına dayanan kolorimetrik analizlerdir. Alamar mavisi testi ise zaman içinde hücrelerin sürekli olarak izlenmesini sağlayan bir floresan indikatörü kullanarak hücre proliferasyonunu niceliksel olarak ölçen bir test yöntemidir.<sup>48</sup>

### **2.3.1.3. Bariyer Kullanılan Testler (İndirekt Testler)**

Bariyer kullanılan testler ise hücreler ve materyaller arasında genellikle doğrudan temas bulunmadığından, in-vivo koşulları taklit etmek için geliştirilmiştir. Bu testler, hücreler ve materyal arasında bir bariyer oluşturmak için agaroz kullanan bir agar kaplama yöntemini ve filtrenin bir tarafına tek hücreli bir tabakanın yetiştirilerek diğer tarafındaki difüze olabilen maddeyle etkileşimi sağlayan millipore filtre analizini içermektedir. Agar difüzyonu ve millipore filtre testleri, materyaller arasında kalitatif bir sitotoksik sıralamayı sağlayabilmektedir.<sup>49</sup>

### **2.3.1.4. Hücre Fonksiyon Ölçümünde Kullanılan Diğer Değerlendirmeler**

Hücre fonksiyonunu ölçmek için kullanılan diğer değerlendirme yöntemlerindeki amaç bağışıklık fonksiyonunu, lenfosit veya makrofajlardan sitokin üretimini, lenfosit proliferasyonunu ve kemotaksisi ölçmektedir. Hücre döngü değişimi veya kompleman aktive etme yeteneğini değerlendiren testler de bulunmaktadır. Bu testlerin in vivo önemi henüz belirlenmemiştir, ancak bir materyalin biyoyumluluğunu değerlendirmek için gerekli olan hayvan testlerinin sayısını azaltabilmek için umut vericidir.<sup>47, 50</sup>



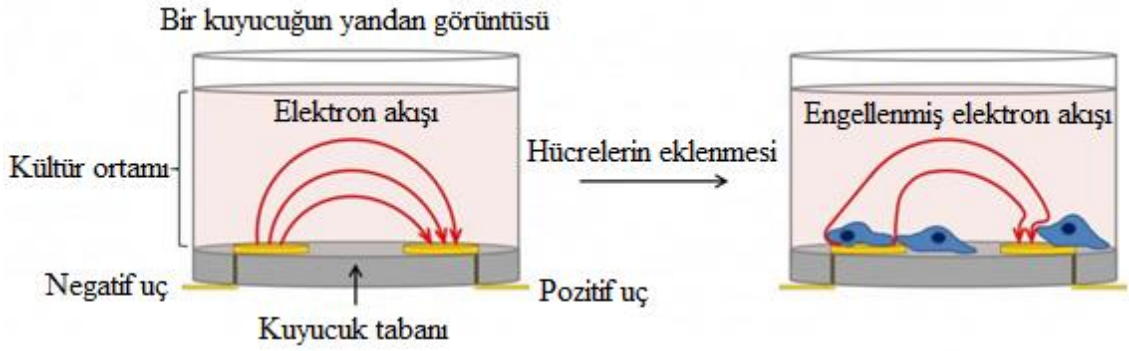
### **2.3.1.5. Mutageniz Analizleri**

Mutageniz analizleri, bir biyomateryalin hücrenin genetik materyali üzerindeki etkisini değerlendirmektedir. Bir materyalin hücrenin genlerini etkileyebileceği çok çeşitli mekanizmalar vardır. Genotoksik mutajenler çeşitli mutasyonlar yoluyla hücre DNA'sını doğrudan değiştirmektedir. Genotoksik kimyasallar, doğal hallerinde mutajen olabilmekte veya mutajen olması için bu kimyasalların aktivasyonu veya biyotransformasyonu gerekebilmektedir, bu durumda ise promutajenler olarak adlandırılmaktadırlar. Epigenetik mutajenler DNA'yı kendileri değiştirmezler, ancak hücrenin biyokimyasını değiştirerek, bağışıklık sistemini değiştirerek, hormon gibi davranarak veya diğer mekanizmalarla tümör büyümesini desteklemektedirler. Karsinogenez ise in vivo kansere neden olma kabiliyetidir.<sup>47</sup> Ames testi ve Stiller'in hücre dönüşüm testi mutageniz testlerine örnek olarak verilebilir.<sup>51, 52</sup>

### **2.3.1.6. XCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System, RTCA)**

Geleneksel yöntemlerde hücre proliferasyonu ve hücre ölümleri belirlenirken, hücrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak bunlar üzerinde biyokimyasal ölçümler yapılmaktadır. Günümüzde, xCELLigence® gibi sistemlerde hücre kültüründe meydana gelen çoğalma ve ölümler, eş zamanlı ve devamlı bir şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin (empedans) belirlenmesiyle gösterilebilmektedir.

XCELLigence® sisteminin temel ilkesi, alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan e-plate yüzeyine yapışan hücre miktarı arttıkça akıma karşı oluşan direncin artması, yüzeye yapışan hücre miktarı azaldıkça, direncin de buna bağlı olarak azalması olgusuna dayanmaktadır (Şekil 2.2). XCELLigence® sistemi aracılığıyla hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gerçek zamanlı ve sürekli olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar ekranına aktarılabilir.



**Şekil 2.2.** XCELLigence® cihazının çalışma prensibi

Bu cihaz genel olarak hücre kültürü laboratuvarlarında hücre karakterizasyonunu belirleme, proliferasyon-sitotoksite tayini, adezyon, reseptör aracılı sinyal iletimi gibi çalışmaların yapılmasında kullanılmaktadır. Geleneksel test yöntemlerine göre eşzamanlı ölçüm yapabilmesi, testlerin daha kolay ve kısa sürede yapılması, daha az invaziv olması ve daha güvenilir sonuçlar vermesi avantajları arasında sıralanabilir.<sup>53 53</sup>

### 2.3.2. Hayvan Deneyleri

Hayvan deneylerinde genellikle fareler, sıçanlar, hamsterler veya gine domuzları kullanılsa da koyun, maymun, kedi ve köpek gibi hayvanların kullanımı da söz konusu olabilmektedir. Biyouyumluluğun değerlendirilmesi için kullanılan hayvan testleri, malzemenin nihai kullanımına ilişkin olarak hayvana yerleştirilmediği için kullanım testlerinden farklıdır. Hayvan testleri hücresel cevabın yanında biyolojik sistemlerin verdiği tepkileri de değerlendirebilmesi açısından in vitro testlere göre daha kapsamlıdır. Fakat in vitro testlere göre daha pahalıdır, daha çok zaman alır ve yorumlanması da daha zordur (Tablo 2.2).<sup>54</sup>

Müköz membran irritasyon testi, deri hassasiyet testi, implantasyon testleri ve subkütanöz testler hayvan testlerine örnek olarak verilebilir. Müköz membran irritasyon testi, bir materyalin müköz membranda veya tahriş olmuş deride inflamasyona neden olup

olmadığını belirlemede kullanılmaktadır.<sup>47, 55</sup> Deri hassasiyet testinde, deri hipersensitivite reaksiyonlarının gelişimini test etmek için materyaller intradermal olarak enjekte edilmekte, ardından test maddesini içeren yapışkan bantlarla ikincil tedavi uygulanmaktadır.<sup>56</sup> İmplantasyon testleri, deri altı doku veya kemiğe temas edecek materyalleri değerlendirmek için kullanılmaktadır. İmplantasyon bölgesinin yeri materyalin kullanımıyla belirlenmektedir ve bağ, kemik veya kas dokusunu içerebilmektedir.<sup>57</sup> Restoratif materyallerin kenarları diş etine temas ettiği için amalgam ve alaşımlar test edilirken ise endodontik ve periodontal tedavi materyallerinde olduğu gibi, doğrudan yumuşak doku ile temas edecek materyaller için kullanılan subkütanöz testler kullanılmaktadır.<sup>58</sup>

### **2.3.3. Kullanım Testleri**

Kullanım testleri hayvanlarda veya katılımcı insanlarda uygulanabilmektedir. İnsanlarda uygulandığında daha çok klinik deneme olarak adlandırılmaktadır. Materyalin amaçlanan klinik kullanımına benzer bir durumda yerleştirilmesini gerektirdiklerinden diğer hayvan testlerinden farklılık sergilerler. Biyoyumluluğun uygun bir şekilde belirlenmesi; testin zaman, yer, çevre ve yerleştirme tekniği de dahil olmak üzere, materyalin klinik kullanımının her bakımdan taklit edilmesi ile doğru orantılıdır.<sup>54</sup> Bu nedenle, hayvan kullanım testlerinde genellikle köpekler, mini domuzlar veya maymunlar gibi insanlara benzer ağız ortamlarına sahip olan daha büyük hayvanlar kullanılmaktadır. Bu testler, bir malzemenin biyoyumlu ve klinik olarak yararlı olup olmayacağına kesin bir cevap verdikleri için altın standarttır. Diş hekimliğinde, dental pulpa, periodonsiyum ve mukozal/gingival dokular kullanım testlerinin ana hedefleridir. Dental pulpa irritasyon testi, mukozal/gingival kullanım testleri ve kemik içerisindeki implantların değerlendirilmesi bu testlere örnek olarak verilebilir.<sup>47, 59</sup>

Dental pulpa irritasyon testlerinde genel olarak dental pulpada test edilecek materyaller çürüksüz, sağlam dişlerde açılan kavitelere yerleştirilmektedir. Daha sonra mikroskopik inceleme için dişler çekilip parçalara ayrılarak nekrotik ve inflamatuvar yanıtla göre gruplanmaktadır. Dental pulpa irritasyon testlerinde sağlam dişlerin kullanılması, iltihaplı pulpa dokusunun uygulanan materyale sağlam pulpadan farklı yanıt verebileceği endişesini taşımaktadır. Bu nedenle pulpitis indüklenmiş dişler üzerinde, reparatif dentin miktarını ölçen testlere ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>60, 61</sup>

Mukoza ve gingival kullanım testlerinde, dişeti ve mukozal dokulara doğrudan temas eden materyallerin doku cevabı, bu materyallerin subgingival uzantılara sahip kavitelere yerleştirilmesiyle değerlendirilmektedir. Materyalin dişeti dokuları üzerindeki etkisi gözlenir ve yanıtlar epitel ve komşu bağ dokularındaki mononükleer inflamatuvar hücrelerin (esas olarak lenfositler ve nötrofiller) sayısına bağlı olarak hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılır. Bu tür bir çalışmadaki zorluklar, restoratif materyalin yüzey pürüzlülüğü, açık / çıkıntılı kenar boşlukları, restorasyonun aşırı veya az konturlu olması nedeniyle gingival dokuda bir dereceye kadar mevcut olan inflamasyon ve bakteri plağının sık görülmesidir.<sup>47</sup>

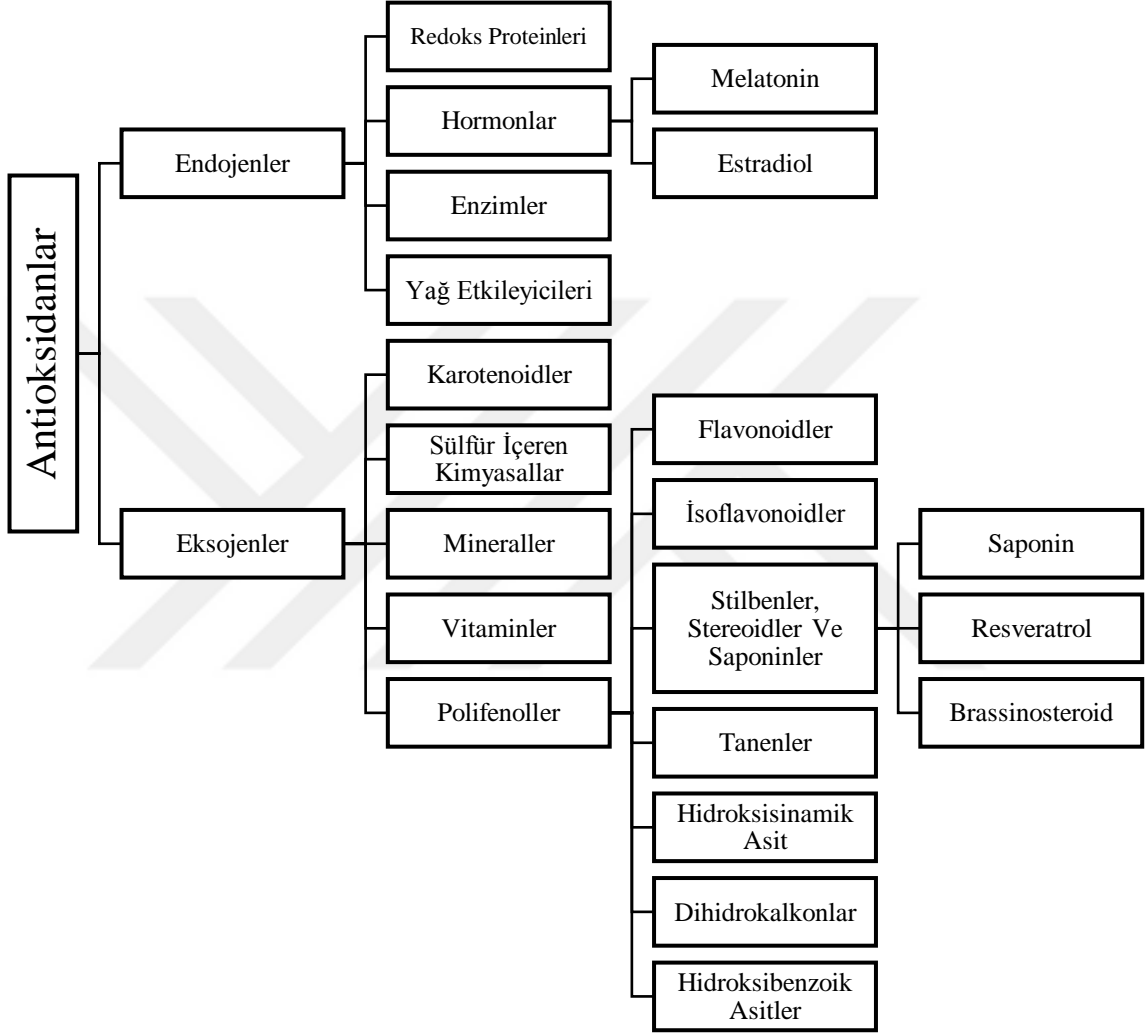
#### **2.4. Antioksidanlar**

ROT; proteinler, lipidler, nükleik asitler, amino asitler, karbonhidratlar ve vitaminler gibi hücresel moleküllere zarar verebilmektedir. Lipid peroksidasyonuna neden olarak toksik lipid türevlerini üretmeleri hücre fonksiyonlarını değiştirebilmekte ve hücre ölümüne neden olabilmektedir.<sup>5</sup> Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, yapısal bozulmayla sonuçlanarak hücresel fonksiyon için kritik olan, sinyalizasyona dahil olma gibi işlevsel özellikleri de değiştirebilmektedir. Ayrıca, ROT'un sebep olduğu nükleik asit hasarları, DNA mutasyonunu teşvik ederek neoplazmaların gelişimiyle de sonuçlanabilmektedir.<sup>4</sup>

Ağız boşluğundaki vasküler fonksiyonun nitrik oksit (NO) ve ROT ile düzenlenmesi, oral lezyonların ve ülserlerin indüksiyonu ve iyileşmesi sürecinde özellikle önemli görünmektedir. Genel olarak, enfekte ya da enfekte olmayan oral lezyonlar, hasar gören bölgede ROT'da artışa yol açan bağışıklık tepkisini tetikleyerek lokal vasküler yatağın vazodilatasyonunun bozulmasına, bu bölgedeki kan dolaşımının kötüleşmesi sonucu oksijen ve besin maddelerinin yetersizliğine dolayısıyla doku rejenerasyonunda azalmaya neden olmaktadır.<sup>8</sup>

ROT üretimi iyi kontrol edildiğinde ve ihtiyaç duyulan bölgeyle sınırlı olduğunda, serbest radikaller sistem için faydalı olabilmektedir. Bununla birlikte, kontrolsüz olduklarında, organizma homeostazını bozarak; hipertansiyon, ateroskleroz, romatoid artrit, diyabet, kanser, nörolojik bozukluk, Alzheimer, Parkinson ve ağız hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olabilmektedir.<sup>8</sup>

ROT oluşumunu önleyen antioksidanlar vücutta detoksifikasyonu sağlama, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleme ve bu maddelerin meydana getirdiği hasarı önlemede görevli savunma sistemi olup temel olarak endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında toplanabilir.<sup>62</sup> Antioksidanlara ait detaylı sınıflama ise Şekil 2.3'de gösterilmiştir.<sup>63</sup>



Şekil 2.3. Antioksidanların sınıflaması

Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini dört farklı şekilde göstermektedirler.

1. Serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirebilirler (Örn. süperoksit dismutaz).
2. Zincirleme şekilde ilerleyen ve serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırabilirler (Örn. atokoferol).
3. Direkt olarak ROT konsantrasyonunu azaltabilirler (Örn. glutasyon, melatonin).
4. Bazı maddeler ise geçiş metalleri ile şelat oluşturarak etkilerini gösterirler. (Örn. bu yolla laktoferritin, transferrin ve ferritin demirle; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler. Resveratrol de serbest radikalleri tutup metal şelasyonu yaparak oksidatif hasarı önlemektedir)<sup>64, 65</sup>

Büyük klinik araştırmaların çoğunda A, C ve E vitaminleri gibi mevcut antioksidan ajanların ROT ve reaktif nitrojen türlerine karşı yeterli koruma sağlayamadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, daha doğru ve daha kompleks bir şekilde ters oksidatif stres lezyonları ve inflamasyon yapacak daha etkili doğal anti-oksidanlar üzerine olan ilgi artmıştır. Buna hem bitki antioksidanları<sup>66</sup> hem de endojen antioksidan enzimleri dahildir.<sup>67</sup> İlginç olarak, pinealositlerdeki çeşitli enzimatik basamaklar ve ağız boşluğunu da içeren gastrointestinal yol astarındaki sayısız enteroendokrin hücreleri üzerinden L-triptofandan kaynaklanan melatonin ve çeşitli bitkilerden elde edilen eksojen bir antioksidan olan oksiresveratrol olağandışı özelliklere sahiptir ve terapötik açıdan son derece umut vericidirler.<sup>8</sup>

### 2.4.1. Melatonin

Melatonin (N-Asetil-5-Metoksitriptamin) ilk kez 1958 yılında Lerner ve ark. tarafından keşfedilmiştir.<sup>68</sup> Melatonin vücudun değişik yerlerinde, sirkadyen ritimlerin kontrolü,<sup>69, 70</sup> vücut ısısının düzenlenmesi,<sup>71</sup> hayvanlarda cinsel gelişim ve üreme döngüsünün düzenlenmesi,<sup>72, 73</sup> bağışıklık sisteminin aktivasyonu<sup>74, 75</sup> ve anti-tümör aktivitesi<sup>76</sup> gibi sayısız fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Melatonin ve metabolitleri, bir serbest radikal süpürücü ve antioksidan olarak işlev görebilme özelliği nedeniyle potansiyel olarak anti-aging etki uygularlar.<sup>77, 78</sup> Melatoninin insan büyüme hormonunun<sup>79</sup> ve adrenokortikal hormonların<sup>80, 81</sup> salgılanmasını kontrol ettiğini gösteren bazı raporlar da bulunmaktadır. İn vitro olarak osteoblast differansiyasyonunu, in vivo olarak ise kemik oluşumunu arttırdığı gösterilen melatoninin diş gelişimi veya büyümesinde de rol oynadığı belirtilmiştir.<sup>82-88</sup>

Pineal bezde pinealositler tarafından gerçekleştirilen melatonin sentezi ışık mevcudiyetinde engellenir. Gün içinde minimum düzeyde salınan melatonin, gece saat 12.00 ile 2.00 arasında daha yüksek seviyelere ulaşır. 40-45 yaşından sonra ise melatonin üretiminde azalma olur ve bu azalma yaş ilerledikçe devam eder.<sup>89</sup>

Plazmadaki melatoninin gündüz/gece dalgalanması doğrudan göz retinasından gelen noradrenerjik sinirsel uyarıyla kontrol edilmektedir.<sup>90</sup> Bununla birlikte, son çalışmalar, melatoninin sadece beyinde değil retina, kemik iliği, bağırsaklar, yumurtalık, Harderian bezi, plasenta, böbrekler, solunum yolu ve son olarak da melatoninin bulunduğu gastrointestinal yol ile pineal cisimlere göre yaklaşık 500 kat fazla miktarda üretilen enteroendokrin hücreleri gibi sayısız hücreden sentezlenen bir indolamin olduğunu göstermiştir.<sup>91-93</sup>



Melatonin, tüm dokulardaki membran reseptörlerine bağlanabildiğinden sayısız fizyolojik olayı etkilemektedir.<sup>94,95</sup> Mükemmel lipofilik özelliklerinden ötürü, hücre içine girebilen melatonin çekirdekte yüksek konsantrasyonlarda ve hücrelerin mitokondrisinde de bulunmaktadır.<sup>96, 97</sup> Ayrıca, melatonin, kemik iliği ve tükürükte de yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir.<sup>98</sup> Melatonin bir hormon olarak düşünülmemektedir, çünkü birkaç organda sentezlenmekte ve spesifik bir hedef üzerinde etkili olmamaktadır, ancak moleküler hasara karşı güçlü bir hücre koruyucusudur.<sup>99</sup>

Melatonin için kan-beyin bariyeri ve plasenta gibi morfolojik ve fizyolojik engeller yoktur.<sup>100</sup> Kandaki melatoninin %70'i proteinlere bağlıdır ve sadece serbest yüzdesinin (toplam melatoninin % 30'u) tükürük yoluyla ağız boşluğunu da içeren çevre dokulara yayılabilmesi dolayısıyla, tükürük bezleri vasıtasıyla ağız boşluğuna giren plazma melatonininin oranı %24 ila %33 arasında değişim sergilemektedir.<sup>91</sup> Bundan dolayı sirkadyen ritimleri ve melatonin salgısını izlemek için tükürükteki melatonin düzeyinin değerlendirilmesi güvenilir bir tekniktir.<sup>101</sup>

Melatonin birkaç yolla (örn. oral olarak, intraperitoneal olarak, diş implantlarında doğrudan etki alanına) uygulanabilmekte ve ülkeye bağlı olarak reçeteli veya reçetesiz bir ilaç olarak satılmaktadır. Bu molekül uzun raf ömrüne sahiptir, pahalı değildir, diğer ilaçlara kıyasla çok az yan etkiye sahiptir ve çok geniş bir emniyet marjıyla kullanılabilir. Bu özellikler, dokular üzerindeki geniş etki yelpazesıyla birlikte, onu farklı amaçlar için potansiyel bir tedavi ajanı haline getirmektedir.<sup>102</sup>

#### **2.4.1.1. Melatonin ve Diş Gelişimi**

Diş germinin hücreleri dişleri çevreleyen çene kemiğinin büyümesiyle uyumlu olacak şekilde diş oluşturur. Shuku Kumasaka ve arkadaşları<sup>88</sup> diş gelişimi sırasında çeşitli insan ve fare diş germlerinde ve çevresindeki osteoblastlarda melatoninin en güçlü transmembran reseptörü olan Mel1aR'nin eksprese edildiğini otaya

koymuşlardır. Ayrıca, melatoninin vitro olarak insan osteoblastlarındaki differansiyasyonu arttırdığı ve in vivo olarak farelerde kemik formasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir.<sup>87</sup> Bu durum, melatonin gibi sistemik hormonların diş gelişimini ve iskelet gelişimi düzenleyebileceği olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, melatoninin kemik oluşumunun yanı sıra diş gelişimini de etkilediği düşünülebilir. Melatoninin gelişen diş morfolojisini korumak için diş germlerindeki odontojenik hücrelerin proliferasyon, differansiyasyon ve / veya fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülebilir.<sup>88</sup> Ayrıca, ameloblastların sirkadyen ritmi düzenleyerek yavaş bir şekilde mine prizmalarını (4-8 µm) oluşturduğu da bilinmektedir.<sup>103</sup>

#### **2.4.1.2. Melatoninin Serbest Radikaller Üzerindeki Etkinliği**

Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Hücre çekirdeğine kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine üstünlük sağlamaktadır.<sup>65, 104</sup> Melatonin antioksidan etkinliğini direkt ve indirekt etki olmak üzere iki farklı mekanizmayla göstermektedir.

Direkt antioksidan etki ile hidroksil ( $\text{HO}^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hipokloröz asit ( $\text{HOCl}$ ), nitrik oksit ( $\text{NO}^\cdot$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir.

Melatonin indirekt etkisini ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimleri DNA seviyesinde eksprese ederek ve peroksinitrit artışına neden olan nitrik oksit sentaz enzimini inhibe ederek göstermektedir.

Klasik antioksidanlar (E vitamini, C vitamini ve  $\beta$ -karoten) ROT üzerinde etki gösterdikten sonra ROT'lara kıyasla daha az zararlı olan prooksidan maddelere dönüşürler. Melatonini klasik antioksidanlardan ayıran özellik ise oksidan maddelere etki ettikten sonra, ara kademelerde ve son aşamada oluşan ürünlerin yine antioksidan özellik göstermesidir. Bu özellik bir antioksidan için oldukça değerlidir ve "suicidal" veya "terminal antioksidan" olarak adlandırılmaktadır.<sup>104</sup>

#### **2.4.1.3. Oral Dokularda Melatonin Kullanımı**

M. Czesnikiewicz-Guzik ve arkadaşları<sup>8</sup> yaptıkları çalışmada sağlıklı gönüllüler üzerinde açlık koşullarında, melatoninin tükürük konsantrasyonunun plazmanın % 50'si olduğunu ortaya koymuştur. Ekzojen melatonin, damak gibi ağız boşluğunun mukozal kısmının kısıtlı alanına topikal olarak uygulandıktan sonra mukozadan hızla absorbe olarak 30 dk içerisinde intragastrik olarak alınan dozla eşit plazma indol konsantrasyonlarına ulaşmaktadır. Aynı zamanda tükürük içine salınan melatonin miktarlarının da melatoninin oral veya intragastrik uygulaması ile elde edilen plazma indol konsantrasyonlarına paralel olması ilginçtir. Bilindiği kadarıyla, bunlar, farelerde sınırlı alana uygulanan melatoninin oral emilimine ilişkin ilk raporlardır. Sonuçlar önemli klinik etkilere sahip olabilir, çünkü melatonin, protezle indüklenen stomatit, gingivitis, diş çekimi nedeniyle ortaya çıkan lezyon ve ülserasyonların iyileşmesi, oral kavitedeki cerrahi sonrası travma ve lazer kullanılarak yapılan vestibular plastik operasyonları da kapsayan çeşitli oksidatif stres hastalıklarında doğrudan oral mukozaya uygulanabilir. Dolayısıyla, topikal melatonin uygulamasının, inflamasyon süreçleriyle mücadelede ve ağız boşluğundaki erozyonları ve ülserlerin iyileşmesini hızlandırmada etkili olabileceği düşünülmektedir.<sup>8</sup>

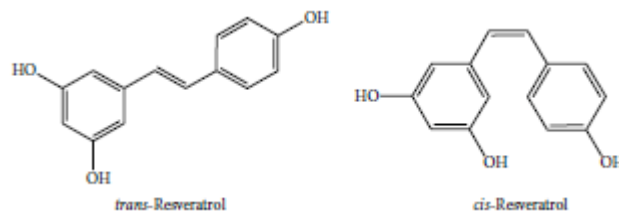
Melatonin farmakolojik ve fizyolojik dozlarda, vasküler ve diğer dokuların bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar. Melatoninin antioksidan özellikleri, lokal inflamatuvar lezyonların tedavisi ve iyileşme sürecinin hızlandırılması için çok yararlı olabilir.<sup>105, 106</sup> Cutando ve arkadaşları<sup>107</sup> köpeklerde küçük ve büyük azaların çekiminden sonra alveolar sokete lokal melatonin uygulamasının olumlu etkilerini bildirmişlerdir.

#### 2.4.2. Oksiresveratrol

Resveratrol (2,3',5'-trihydroxy-*trans*-stilbene) polifenol yapısında doğal bir antioksidan maddedir. *Trans*- ve *cis*- olmak üzere iki izoformu mevcuttur ve *trans*-resveratrolün biyolojik olarak daha aktif olduğu bilinmektedir.<sup>108</sup> Resveratrol, ilk olarak Takaoka tarafından 1939 yılında *Veratrum grandiflorum* bitkisinin köklerinden, daha sonra da 1963 yılında *Polygonum cuspidatum*'un (Japon madımağı) köklerinden izole edilmiştir.<sup>109</sup>



Şekil 2.4. a) *Veratrum grandiflorum* b) *Polygonum cuspidatum* (Japon madımağı)



Şekil 2.5. Resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrol, stres, yaralanma, aşırı güneş ışığı, ultraviyole radyasyon, enfeksiyon ve mantar saldırılarına karşı çeşitli bitkiler tarafından üretilen bir fitoaleksindir ve üzüm kabuğu, dut, yer fıstığı, yaban mersini, böğürtlen ve Japon madımağı gibi çeşitli bitkilerden elde edilmektedir. Fitoaleksiner, patojenik mikroorganizmalara karşı bitkiler tarafından korunma amaçlı üretilen kimyasal maddelerdir.<sup>110-113</sup>

Fransız popülasyonunda yağlı diyet ve sigara tüketiminin yüksek olmasına rağmen kardiyak hastalıkların az görülmesi, şarap tüketiminin fazla olmasına bağlanmış ve bu tablo “Fransız Paradoksu” olarak isimlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda da bu paradoks etkeninin resveratrol olabileceği ileri sürülmüştür.<sup>114, 115</sup> Resveratrolün, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, antiviral, anti-artritik, antidiyabetik, östrojenik ve antiaging etkiler gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinin olduğu da gösterilmiştir.<sup>116-119</sup> Ayrıca, hemorajik travmaya bağlı organ yaralanmalarında (akciğer, karaciğer, kalp, bağırsak ve damar endoteli) resveratrolün koruyucu etkisi olduğu da bildirilmiştir.<sup>120</sup>

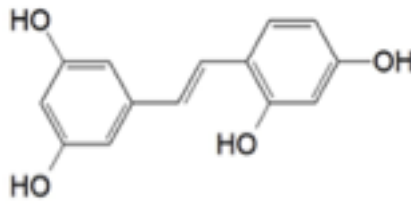
Uysal ve arkadaşları<sup>121</sup> yaptıkları bir çalışmada rapid maksiller ekspansiyon yapılmış sıçanlarda lokal resveratrol uygulamasının kemik oluşumunu stimüle ettiğini ve retansiyon periyodunu kısalttığını gözlemlemiş, bu nedenle resveratrol’ün kemik fraktürlerinin tedavi edilmesinde ve distraksiyon osteogenezinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Resveratrolün inflamatuvar mediatörler üzerindeki etkisinin ölçüldüğü bir meta-analiz çalışmasında serum C-reaktif protein (CRP) seviyesinde önemli bir azalmaya sebep olduğu fakat IL-6 ve TNF $\alpha$  seviyelerinde etkisi olmadığı tespit edilmiştir.<sup>122</sup>

Feng-Ming Wang ve arkadaşları DPSC üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda resveratrolün TNF $\alpha$  kaynaklı sitokinleri baskıladığını bulmuşlar ve buna dayanarak resveratrolün vital pulpa tedavilerinin akut inflamasyon fazında faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır.<sup>123</sup>

Atalayın ve arkadaşları<sup>124</sup> dört farklı bonding ajanın fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksitelerini resveratrol eklemeyen önce ve sonra değerlendirmişler, bonding ajanların hücrelerde ROT üretimi ve DNA hasarını indüklediğini fakat resveratrol ilavesiyle bu etkilerde azalma meydana geldiğini bulmuşlardır.

Oksiresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene) dut ağacından elde edilen ve resveratrole göre fazladan bir hidroksil grubu taşıyan resveratrol analogudur.<sup>125, 126</sup>



**Şekil 2.6.** Oksiresveratrolün kimyasal yapısı

Oksiresveratrolün de resveratrole benzer şekilde antioksidan<sup>125</sup>, antiinflamatuar<sup>126</sup>, antikanserojen<sup>127</sup>, antidiyabetik<sup>128</sup> etkilerinin yanı sıra Herpes simpleks-I<sup>129</sup> ve Varisella zoster<sup>130</sup> virüslerine karşı antiviral etkinliği de ispatlanmıştır. Ayrıca, anti-obeziter, kolesterol düşürücü ve karaciğer ve sinirlerde koruyucu etki göstermesi de bilinen diğer avantajlarıdır.<sup>126</sup>

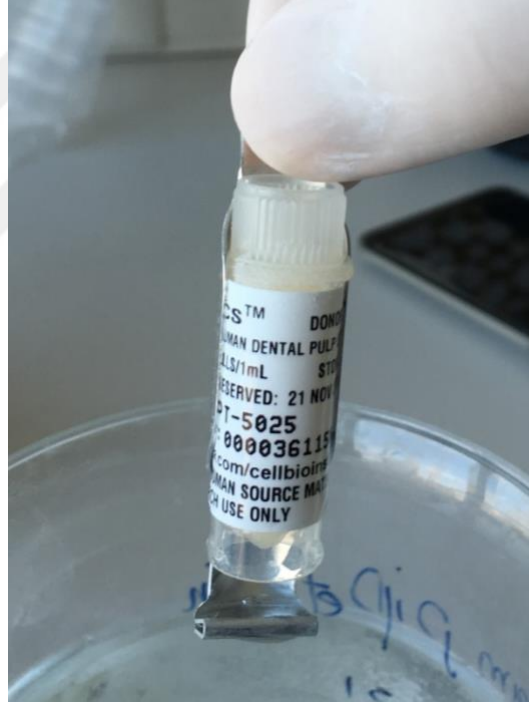
Joung ve arkadaşları<sup>131</sup> oksiresveratrolün membran geçirgenliğini arttırarak ve ATPaz aktivitesini inhibe ederek metisilin dirençli Staphylococcus aureus üzerinde güçlü bir antibakteriyal etki gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak, kolaylıkla okside olması bir dezavantaj olarak düşünülmektedir.<sup>126</sup>

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması için 27.12.2018 tarihinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 8. toplantısında 28 karar numarası ile etik kurul onayı alınmış olup, çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

#### 3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection, ATCC) satın alınan dondurulmuş DPSC hücreleri kullanılmıştır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan satın alınan dondurulmuş insan DPSC hücreleri

**Tablo 3.1.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve üretildiği firmalar

Kimyasal maddeler	Firma
DPSC Mediumu	Lonza, Verviers <sup>®</sup> , Belçika
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Lonza, Verviers <sup>®</sup> , Belçika
Tripsin-EDTA	Gibco <sup>®</sup> ,New York, ABD
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Almanya
Melatonin	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , St. Louis, ABD
Oksiresveratrol	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , St. Louis, ABD
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Verviers, Belçika
Fetal sığır serumu (FBS)	BioWest <sup>®</sup> , Miami, FL
Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B (PSA)	Lonza <sup>®</sup> , Walkersville, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , St. Louis, ABD
L-Glutamin	Gibco <sup>®</sup> ,New York, ABD

**Tablo 3.2.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan alet ve cihazlar

Adı	Firma
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Vestel <sup>®</sup> , Türkiye ®
Class II Biyogüvenlik kabini	Biokim, Türkiye
Çalkalayıcı su Banyosu	Memmert <sup>®</sup> , Almanya
Hassas Terazı	Shimadzu <sup>®</sup> , Japonya
Hücre Sayım Cihazı	Innovatis <sup>®</sup> , Virjinya
“Inverted” Işık Mikroskobu	Leica <sup>®</sup> , Almanya
CO <sub>2</sub> İnkübatörü	NuAire <sup>®</sup> , Amerika
Pipet seti	Eppendorf <sup>®</sup> , Almanya
RTCA DP	Roche <sup>®</sup> , İsviçre
Santrifüj	Hettich Universal 32 <sup>®</sup> , İngiltere
Spin atırıcı	Grant-bio <sup>®</sup> , İngiltere
Steril Cam Pipetler(5, 10 ml)	Gibco <sup>®</sup> , İngiltere



### 3.1.1. Dondurulmuş DPSC Hücrelerinin Çözdürülmesi

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de %10 DMSO ile dondurulmuş DPSC hücrelerinin çözünmesi için kriyo tüpler çalkalayıcı su banyosunda birkaç dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.2. Çalkalayıcı su banyosu

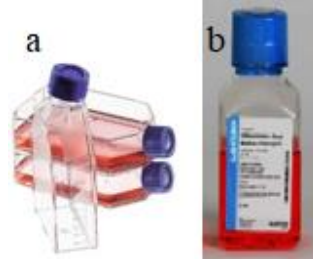
2. DMSO'nun hücre canlılığını azaltmaması için kriyo tüp içerisine hızlı bir şekilde 5 ml DPSC solüsyonu ilave edildikten sonra hücreler 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınmıştır.

3. Falkon tüp içerisine yaklaşık 5 ml daha DPSC solüsyonu ilave edilerek 1200 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.3. Santrifüj cihazı

4. Falkon tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüp dibine çöken hücrelerin üzerine 10 ml DPSC solüsyonu eklenerek birkaç kez pipetaj yapılmış ve hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alınmıştır.



**Şekil 3.4. a.** 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar **b.** DPSC hücre solüsyonu

5. Flasklar, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alınarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 48 saat sonra üremeye başlayan hücrelerin kullandıkları eski besi ortamı dökülmüş ve yerine 10 ml taze DPSC solüsyonu ilave edilmiştir.

6. Hücreler flask tabanını kaplayana kadar DPSC solüsyonu 3 günde bir yenilenmiştir.

7. Hücrelerin flask tabanını kaplaması 7. günde gözlenmiş ve hücre canlılığını / devamlılığını sağlamak amacıyla hücrelerin pasajlanması işlemine geçilmiştir.



**Şekil 3.5.** “Inverted” Işık Mikroskobu

### 3.1.2. DPSC Hücrelerinin Pasajlanması

1. Flasklardaki hücre yoğunluğu %85'den fazla olduğunda pasajlama yapılmıştır.
2. Mevcut besi yeri döküldükten sonra flasklar bir kez PBS kullanılarak yıkanmıştır.



Şekil 3.6. Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu

3. Tripsinizasyon amacıyla hücrelerin üzerine 2 ml %0.05 tripsin-EDTA ilave edilerek flasklar 5 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir.



Şekil 3.7. % 0.05 tripsin-EDTA

4. İnkübatörden çıkan flaskların hafifçe tabanlarından vurularak tüm hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlanmış ve flaslara FBS besi yeri ilave edilerek tripsin inaktive edilmiş ve sonrasında DPSC ile 4 ml'ye tamamlanmıştır.

5. Flask içerisinde bulunan hücre ve DPSC solüsyonu karışımı 15 ml'lik santrifüj tüp içerisine alınmış ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifuj edilmiştir.

6. Santrifüj sonrası tüp içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken hücrelerin üzerine 1 ml DPSC solüsyonu eklenmiştir. Bu sırada birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.

7. 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara 10 ml DPSC solüsyonu koyulmuş ve içine homojen dağılmış olan hücreden ilave edilmiştir.

8. Hücrelerin yüzeye tutunmaları ve üremeye devam etmeleri için flaslara inkübatöre kaldırılmıştır.



**Şekil 3.8.** CO<sub>2</sub> İnkübatörü

### 3.1.3. Canlı DPSC Hücrelerinin Sayılması

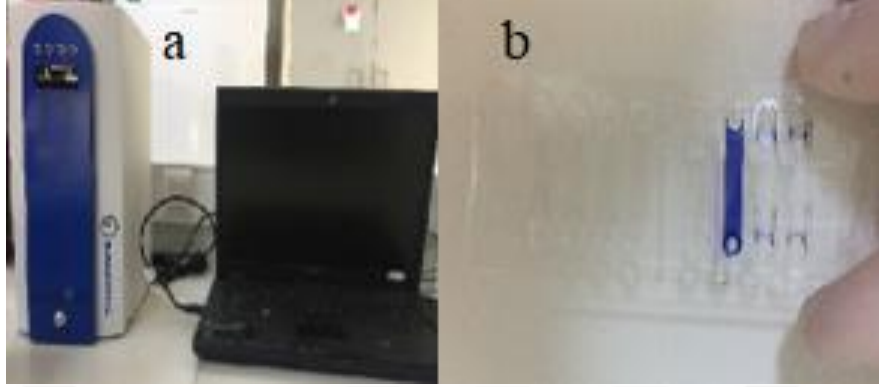
Canlı hücrelerin sayılmasında negatif yüke sahip tripan mavisini boya kullanılmıştır. Bu boya hücre içine girmediği için mikroskop altında incelendiğinde, hücre membranı zarar görmemiş yani canlılığını korumuş hücreler beyaz renkte görünürken; canlılığını kaybetmiş hücreler ise boyayı absorbe etmelerinden dolayı mavi renkte görünmektedirler.



Şekil 3.9. Tripan Mavisini

1. DPSC hücrelerine uygulanan tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere DPSC solüsyonu eklenmiş ve flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımı 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındıktan sonra 1500 rpm de 5 dakika santrifuj edilmiştir.
2. Santrifüj sonrası, santrifüj tüpü içerisinde bulunan süpernatant uzaklaştırılmış, çöken hücrelerin üzerine 1 ml DPSC solüsyonu eklenmiş ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.
3. Homojen süspansiyondan 10 µl alınıp steril ependorfa konulmuş, üzerine 100 µl PBS eklenmiş ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.

4. 90 µl tripan mavisi ilave edilerek birkaç kez pipetaj yapılmıştır. Bu karışımdan 20 µl alınıp hücre sayar cihazında sayılmıştır.



**Şekil 3.10. a. Hücre Sayım Cihazı b. Sayım Aparatı**

5. XCELLigence® cihazının çalışma prensibine göre her bir kuyucukta 5000 canlı hücre bulunması gerektiğinden, mevcut santrifüj tüpündeki hücre-DPSC solüsyon karışımından alınacak miktar hücre sayar cihazının verilerine göre hesaplanmıştır.

#### **3.1.4. Hücrelerin E-platelere Ekilmesi**

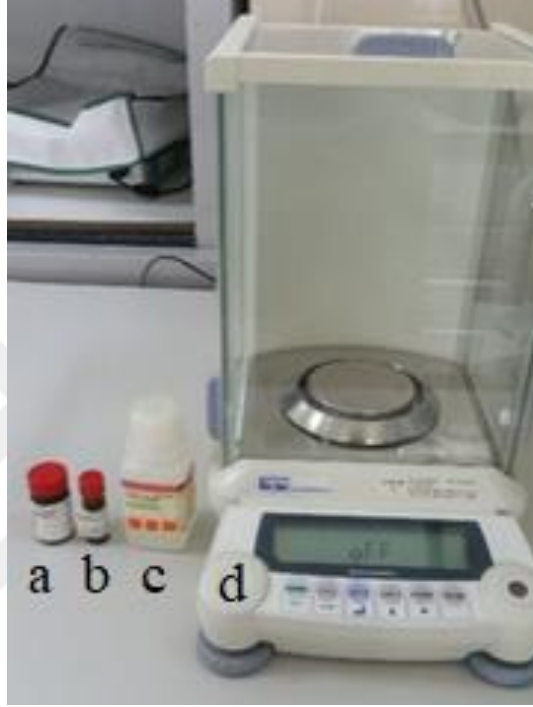
1. XCELLigence® cihazının e-plateleri okuması için 21 kuyucuğa 50 µl DPSC solüsyonu konulmuştur.

2. Daha sonra 5000 canlı DPSC içeren 50 µl DPSC solüsyonu ilave edilerek her bir kuyucuk içerisindeki solüsyon-hücre karışımı miktarı 100 µl'ye tamamlanmıştır.

3. Hücrelerin e-platelere tutunması amacıyla plateler inkübatöre kaldırılarak 24 saat beklenmiştir.

### 3.1.5. Melatonin ve Oksiresveratrolün Hücre Kùltürlerine İlave Edilmesi

1. XCELLigence® cihazında hücrelerin tutunduğu görùldükten sonra, melatonin ve oksiresveratrol miktarları hassas terazi yardımıyla tartılarak dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş ve depo solüsyonlar elde edilmiştir.



Şekil 3.11. a. Melatonin b. Oksiresveratrol c. DMSO d. Hassas terazi

2. Melatonin için hazırlanan depo solüsyon DMEM (%15FBS-%1PSA-%2 glutamin) solüsyonu ile seyreltilerek melatoninin deneyde kullanılacak 100pM, 100nM ve 100  $\mu$ M'lık derişimleri elde edilmiştir.

3. Oksiresveratrol için hazırlanan depo solüsyon DMEM (%15FBS-%1PSA-%2 glutamin) solüsyonu ile seyreltilerek oksiresveratrolün deneyde kullanılacak 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M'lık derişimleri elde edilmiştir.

4. Grand-bio spin attırıcı cihaz kullanılarak hazırlanan derişimlerin homojen hale gelmesi sağlanmıştır.



**Şekil 3.12.** Spin Attırıcı

5. 24 saat sonunda, e-plate tabanına tutunmuş hücreler üzerinde bulunan süpernatant uzaklaştırılmış ve yerine farklı dozlarda hazırlanan melatonin ve oksiresveratrol çözeltilerinin her bir dozu üçer kuyucuğa 100'er µl olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu oluşturulması amacıyla da üç kuyucuk üzerine sadece 100 µl DMEM solüsyonu eklenmiştir.

6. Son olarak melatonin ve oksiresveratrolün DPSC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek amacıyla plateler xCELLigence® cihazına konularak etüve kaldırılmıştır.

7. Sistem, 15 dakika ara ile gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp, 72 saat süre boyunca veriler toplanmış ve hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren grafikler elde edilmiştir.



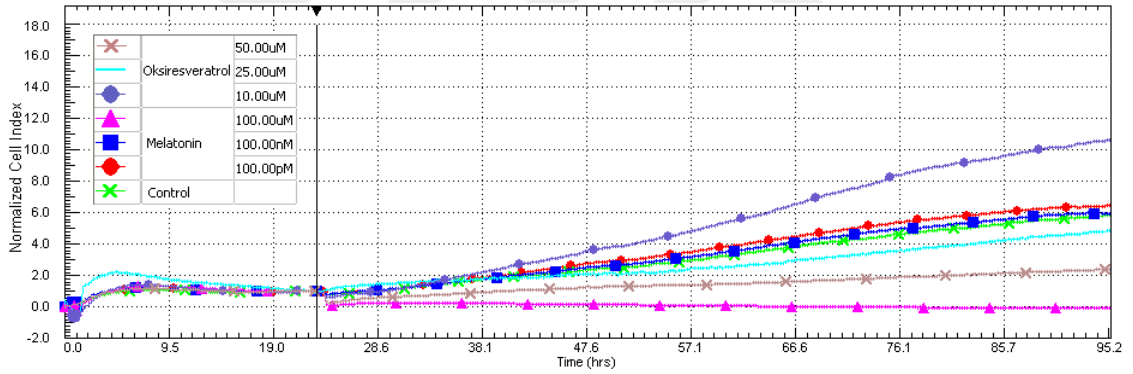
### 3.2. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel değerlendirmeler SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago IL, ABD) istatistik programında %5 önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir. 3 farklı zamanda hücre indeks değerlerinin dağılımı histogram ve q-q plot grafikleriyle değerlendirilmiştir. Normal dağılım sergileyen verilerin ileri analizinde 7 farklı grupta 3 farklı zamanda ölçülen hücre indeks değerleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Analizlerde gruplar arası farklılığı belirlemede ise duncan testi kullanılmıştır.

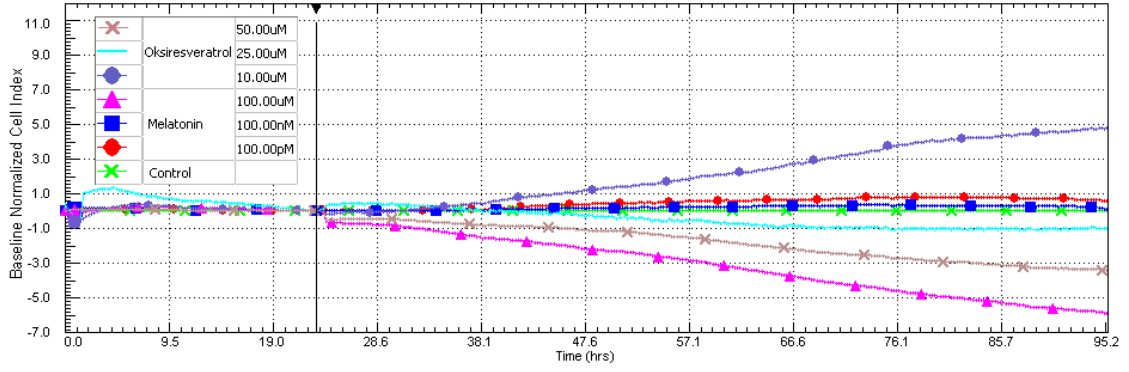
Hücrelerin zamana bağlı proliferasyonuna ait doğrusal regresyon analizleri GraphPad Prism 7.0a for Mac OS X (GraphPad Software, Inc., La Jolia California, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

Melatonin ve oksiresveratrolün DPSC proliferasyonuna olan etkisini xCELLigence® cihazında 72 saat süreyle takip ettiğimiz çalışmada, melatonin ve oksiresveratrolün üçer farklı konsantrasyonunda çalışılmış ve deney her konsantrasyon için üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Grafiklerde her bir gruba ait üç farklı kuyucuktan elde edilen empedans ortalamaları hücre indeksi olarak sunulmuştur. DPSC hücrelerine 24. saatte melatonin ve oksiresveratrol ilavesini takiben hücre indekslerinde gözlenen değişim Şekil 4.1’de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla hücre indeks değerlerinde gözlenen değişim ise Şekil 4.2’de kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi olarak sunulmuştur.



**Şekil 4.1.** DPSC hücrelerine 24. saat sonunda melatonin ve oksiresveratrol ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi



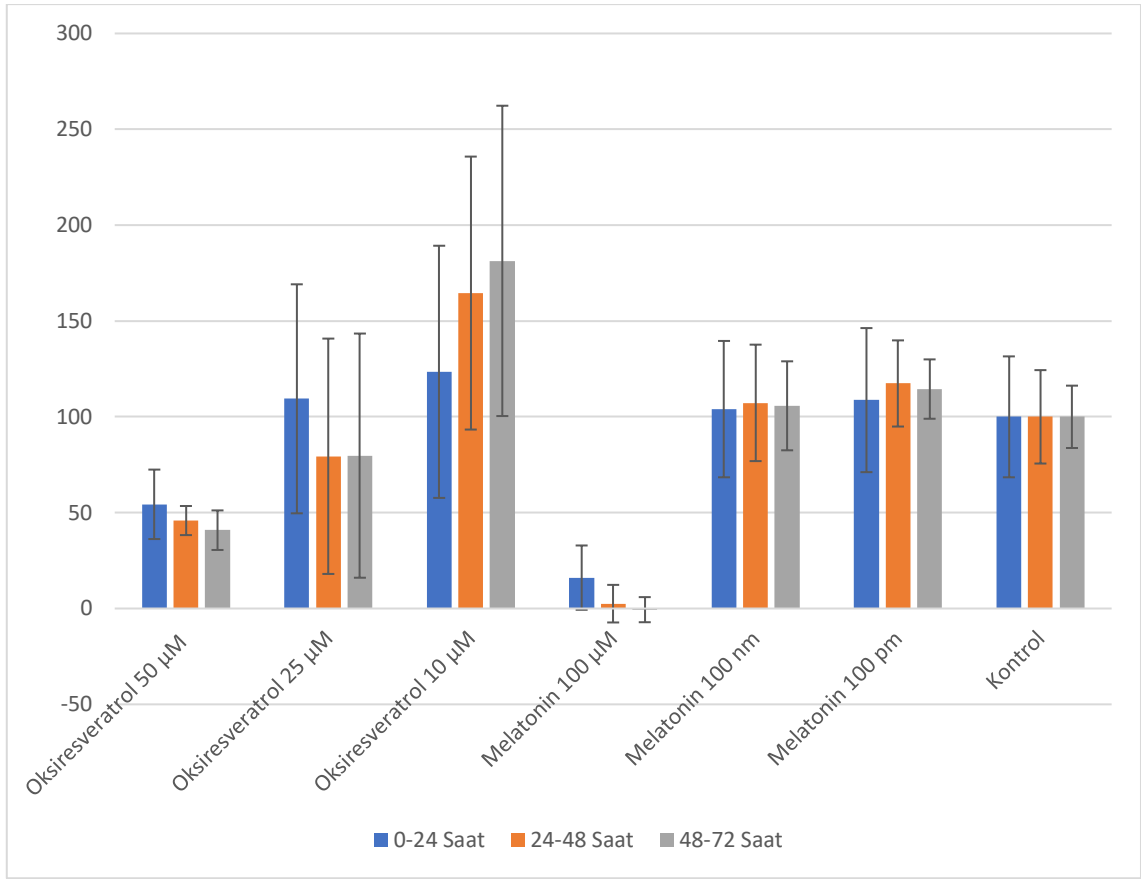
**Şekil 4.2.** 24. saat sonunda DPSC hücrelerine melatonin ve oksiresveratrol ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değışimi

İlk 24 saat e-platelelere tutunması için bırakılan DPSC hücrelerine melatonin ve oksiresveratrol ilave edildikten sonraki 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen ortalama hücre indeks değeri Tablo 4.1’de verilmiştir (Şekil 4.3.). Ortalama hücre indeks verileri değeri değerlendirildiğinde melatonin 100  $\mu$ M ve oksiresveratrol 50  $\mu$ M gruplarında kontrole göre daha düşük değeri (toksik etki) gözlemlenmiştir. Benzer şekilde oksiresveratrol 25  $\mu$ M grubunda da 24. saatten sonra toksik etki tespit edilmiştir. Her üç zaman diliminde melatonin 100 nM grubunda kontrol grubuna benzer proliferasyon oranı saptanırken, melatonin 100 pM ve oksiresveratrol 10  $\mu$ M gruplarında kontrol grubundan daha yüksek proliferasyon oranları elde edilmiştir ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 4.1.** Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının farklı zaman aralıkları için elde edilen ortalama hücre indeks değeri ve standart sapmaları

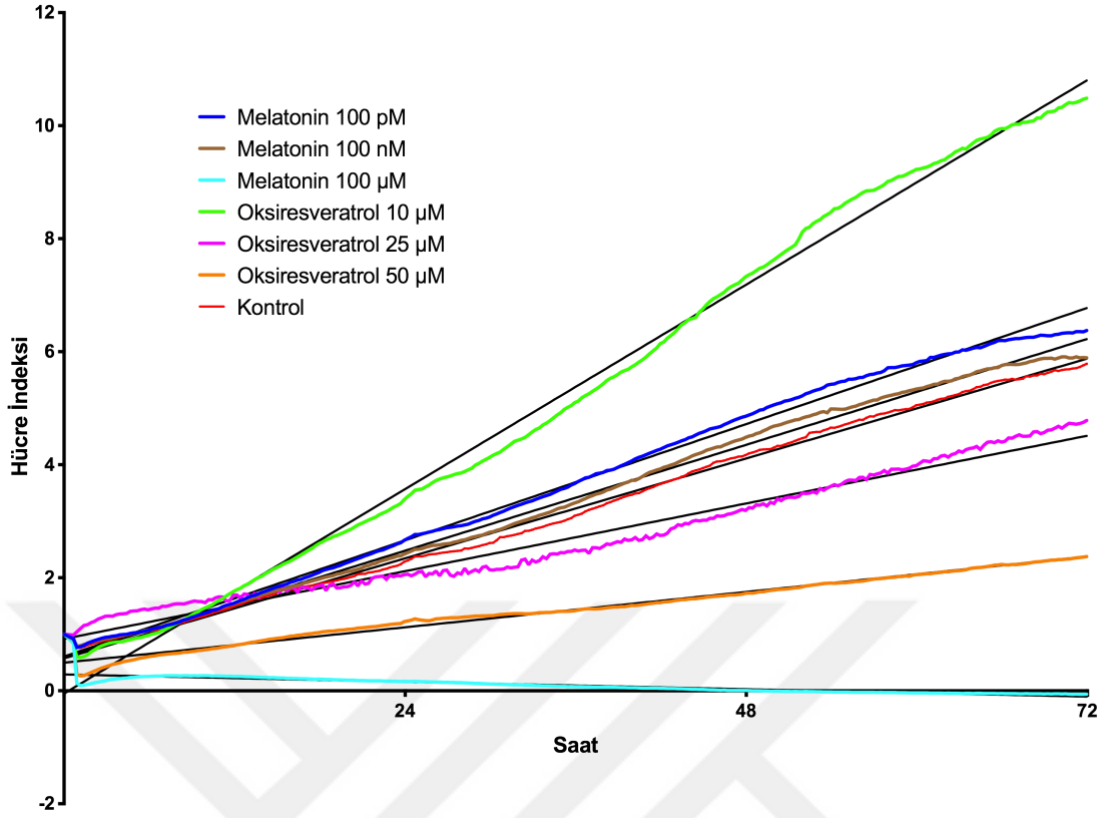
	0-24 Saat	0-48 Saat	0-72 Saat
Melatonin 100 pM	1.62 $\pm$ 0.56 <sup>d</sup>	2.67 $\pm$ 1.23 <sup>e</sup>	3.71 $\pm$ 1.83 <sup>e</sup>
Melatonin 100 nM	1.56 $\pm$ 0.53 <sup>c,d</sup>	2.48 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	3.43 $\pm$ 1.8 <sup>d</sup>
Melatonin 100 $\mu$ M	0.23 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
Oksiresveratrol 10 $\mu$ M	1.85 $\pm$ 0.98 <sup>e</sup>	3.53 $\pm$ 2.42 <sup>f</sup>	5.41 $\pm$ 4.06 <sup>f</sup>
Oksiresveratrol 25 $\mu$ M	1.64 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	2.08 $\pm$ 1.58 <sup>c</sup>	2.73 $\pm$ 2.43 <sup>c</sup>
Oksiresveratrol 50 $\mu$ M	0.81 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	1.13 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	1.44 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>
Kontrol	1.5 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	2.34 $\pm$ 1.05 <sup>d</sup>	3.24 $\pm$ 1.61 <sup>d</sup>
p	<0.001	<0.001	<0.001

a, b, c... : Aynı sütundaki farklı harfle işaretli ortalamalar istatistiksel olarak farklıdır. ( $p < 0.05$ )



**Şekil 4.3.** Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının farklı zaman aralıkları için elde edilen ortalama hücre indeks değerleri ve standart sapmaları

Hücre indeks değerlerinin melatonin ve oksiresveratrol eklenmesinden itibaren geçen 0-72 saatlik zaman diliminde saate bağlı olarak değişimleri bütün gruplar için ayrı ayrı doğrusal regresyon analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen regresyon eşitlikleri, regresyon eşitliğinin değişken açıklama ölçütü ( $R^2$ ) ve regresyon doğrusu eğiminin önemliliği Tablo 4.2’de sunulmuştur. “ $y=a+bx$ ” formülü kullanılan doğrusal regresyon denkleminde y hücre indeks değerini, a regresyon sabitini, b regresyon katsayısını, x ise materyaller eklendikten sonra geçen zamanın saat olarak değerini ifade etmektedir.



**Şekil 4.4.** Antioksidan ajanlar eklendikten sonra deney gruplarının zamana bağlı hücre indekslerine ilişkin dağılımları ve regresyon doğruları

**Tablo 4.2.** Hücre indeks değerlerinin saate bağlı regresyon analizi

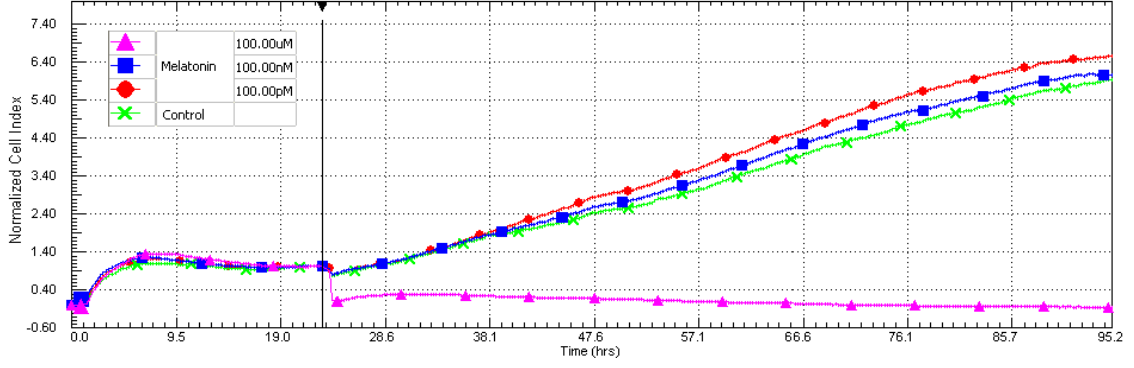
Grup	Regresyon denklemi	R <sup>2</sup>	p
Melatonin 100 pM	$Y = 0.6058 + 0.0857 * X$	0.9958	<0.0001
Melatonin 100 nM	$Y = 0.6057 + 0.07807 * X$	0.9962	<0.0001
Melatonin 100 µM	$Y = 0.2891 - 0.00543 * X$	0.7628	<0.0001
Oksiresveratrol 10 µM	$Y = -0.04943 + 0.1508 * X$	0.9943	<0.0001
Oksiresveratrol 25 µM	$Y = 0.9182 + 0.04994 * X$	0.9713	<0.0001
Oksiresveratrol 50 µM	$Y = 0.4974 + 0.02609 * X$	0.9842	<0.0001
Kontrol	$Y = 0.5749 + 0.07368 * X$	0.9968	<0.0001

R<sup>2</sup>: Varyasyon açıklama katsayısı

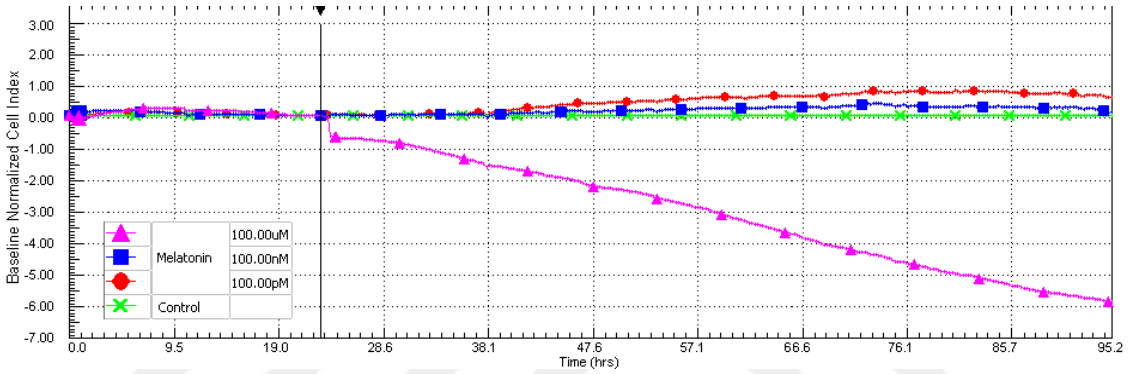
Oksiresveratrol 10 µM grubunda bir saatteki indeks değeri artışı 0.1508 olarak diğer grupların hepsinden daha büyüktür. Ayrıca, oksiresveratrol 10 µM, melatonin 100 pM ve melatonin 100 nM grupları kontrol grubunun üstünde; oksiresveratrol 25 µM, oksiresveratrol 50 µM ve melatonin 100 µM grupları ise kontrol grubunun altında regresyon katsayısına sahiptir. Bütün gruplarda varyasyon açıklama katsayısı %98'in üzerinde iken sadece melatonin 100 µM grubunda %76 olarak daha düşük tespit edilmiştir. Ayrıca, regresyon eşitliklerindeki eğimi veren regresyon katsayısı bütün denklemlerde sıfırdan anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

#### **4.1. Melatonin**

100 pM, 100 nM ve 100 µM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda hazırlanan melatonin çözeltilerinin DPSC proliferasyonuna olan etkisi Şekil 4.5-6'da verilmiştir. 100 pM'lık ve 100 nM'lık melatonin konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre DPSC hücrelerinin proliferasyonunda artış meydana getirdiği, fakat çalışmamızdaki en yüksek doz olan 100 µM'lık melatonin konsantrasyonunun toksik etki sergilediği gözlenmiştir. Kontrol grubu esas alınarak değerlendirildiğinde, DPSC hücrelerine melatoninin 100 µM'lık konsantrasyonu eklenir eklenmez etki gösterirken 100 nM ve 100 pM'lık konsantrasyonların etki göstermesi daha uzun bir süre almıştır. 100 pM'da gözlenen proliferasyon artışının 100 nM'dan daha fazla olduğu, 100 µM'lık konsantrasyonda ise melatonin ilavesini takiben DPSC hücrelerinin proliferasyonu olmayı bırakıp ölmeye başladığı tespit edilmiştir. Verilerden yola çıkılarak artan dozlara bağlı olarak melatoninin DPSC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinde artış görülürken, daha düşük dozlarda hücre proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiştir.

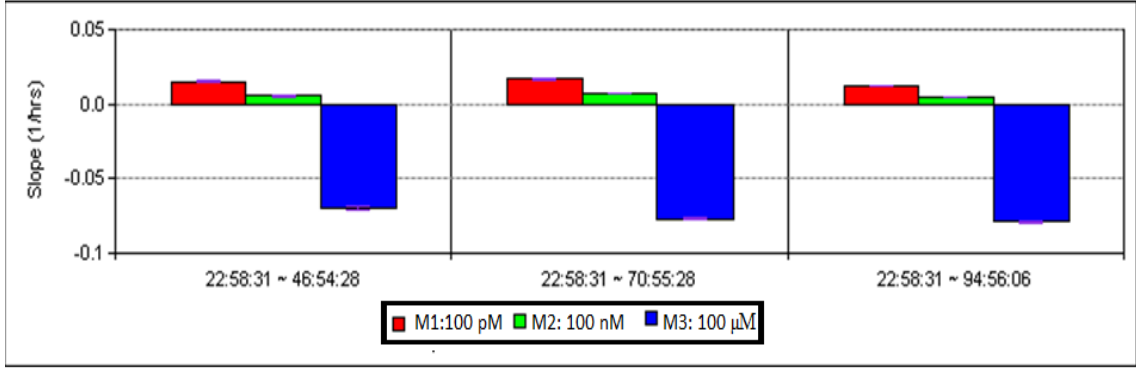


**Şekil 4.5.** DPSC hücrelerine 24. saat sonunda 3 farklı dozda melatonin ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi



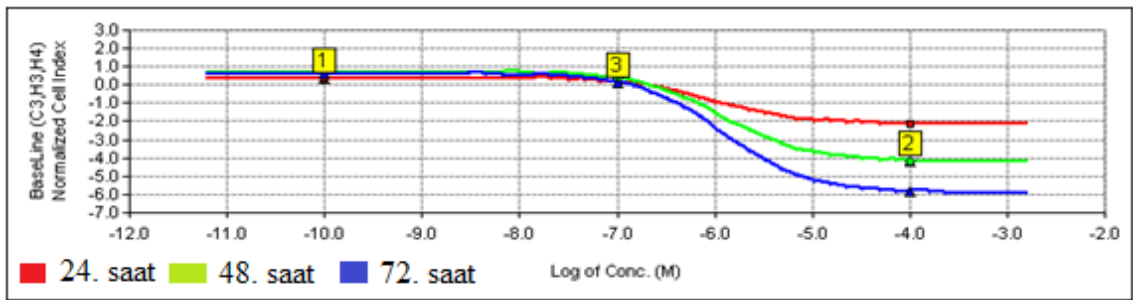
**Şekil 4.6.** 24. saat sonunda DPSC hücrelerine melatonin ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi

Melatonine ait farklı dozların 24., 48. ve 72. saatteki slop grafikleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Slop grafiğinde belirtilen zaman aralığı için gözlenen pozitif değerler hücre sayısındaki artışı gösterirken, negatif değerler ise hücre sayısında meydana gelen azalmayı dolayısıyla materyalin toksik olduğunu belirtmektedir. 100  $\mu\text{M}$ ’lık melatoninin toksik etkisinin ilerleyen zamana bağlı olarak giderek arttığı gözlenmiştir. 100  $\text{pM}$ ’lık konsantrasyonun 100  $\text{nM}$ ’a kıyasla her üç zaman diliminde de daha fazla hücre artışı sağladığı Şekil 4.7’de açıkça görülmektedir.



**Şekil 4.7.** Çeşitli dozlarda hazırlanan melatoninin çözeltilerinin (100pM, 100nM,100 μM) 24.,48. ve 72. saatlerdeki slop grafikleri

Melatoninin 24., 48. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyon eğrilerinden elde edilen doz yanıt eğrileri Şekil 4.8’de sunulmuştur. Bu grafikten hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon yani  $IC_{50}$  değerleri 24. saatte 946 nM ( $R^2=1$ ), 48. saatte 1220 nM ( $R^2=1$ ) ve 72. saatte 1243 nM ( $R^2=1$ ) olarak tespit edilmiştir. Bu değerler cihaz tarafından kontrol grubu hariç tüm doz gruplarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki logaritmalarının alınarak hücre indeks değerlerine karşı grafik çizilmesiyle hesaplanmıştır.

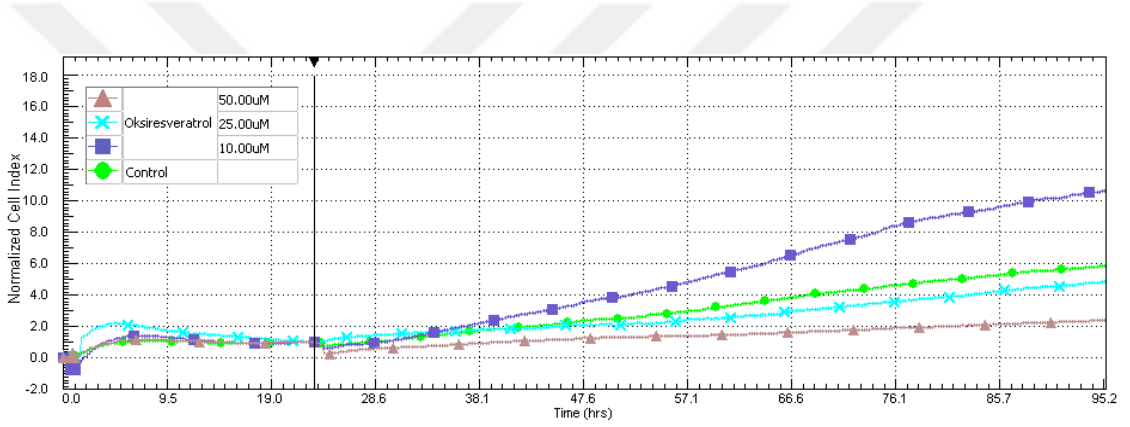


**Şekil 4.8.** Melatoninin 24.,48. ve 72. saatlerdeki doz yanıt eğrileri

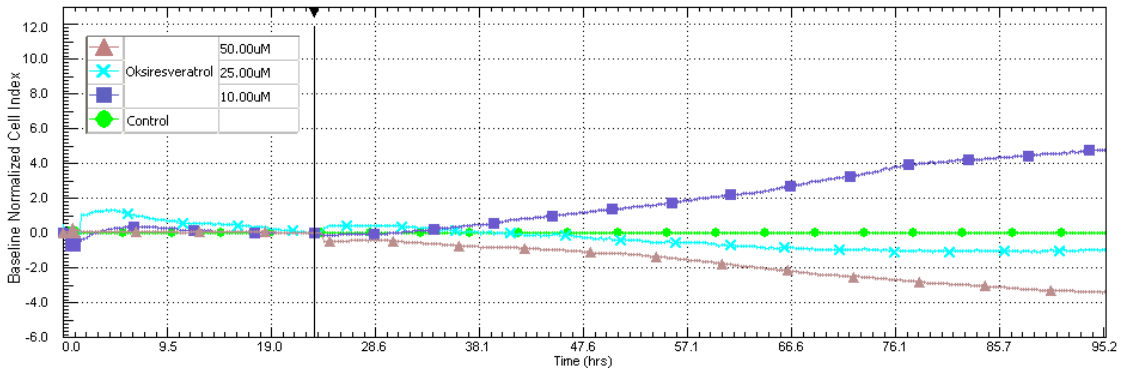


## 4.2. Oksiresveratrol

Üç farklı dozda (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M) hazırlanan oksiresveratrol çözeltisinin tüm konsantrasyonlarında oksiresveratrol eklenmeden hemen önceki hücre indeks değerlerine kıyasla DPSC hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.9). Fakat kontrol grubuyla kıyaslandığında, (Şekil 4.10) sadece 10  $\mu$ M'lık oksiresveratrol dozunun hücre proliferasyonunu belirgin şekilde arttırdığı göze çarpmaktadır. Melatonine benzer şekilde oksiresveratrolün de daha düşük dozlarda hücre proliferasyonunu arttırdığı, daha yüksek dozlarda ise toksik etki gösterdiği söylenebilir.

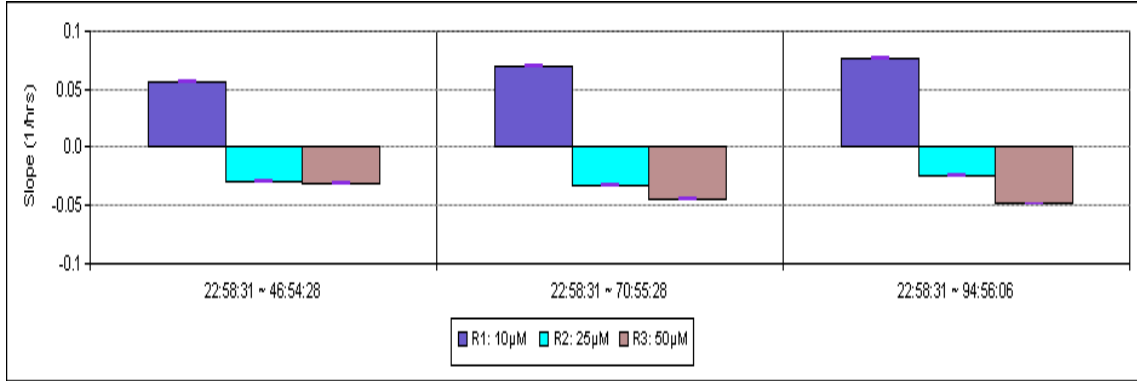


Şekil 4.9. DPSC hücrelerine 24. saat sonunda oksiresveratrol ilavesini takiben 72 saat süreyle xCELLigence® cihazında gözlemlenen hücre indeks değişimi



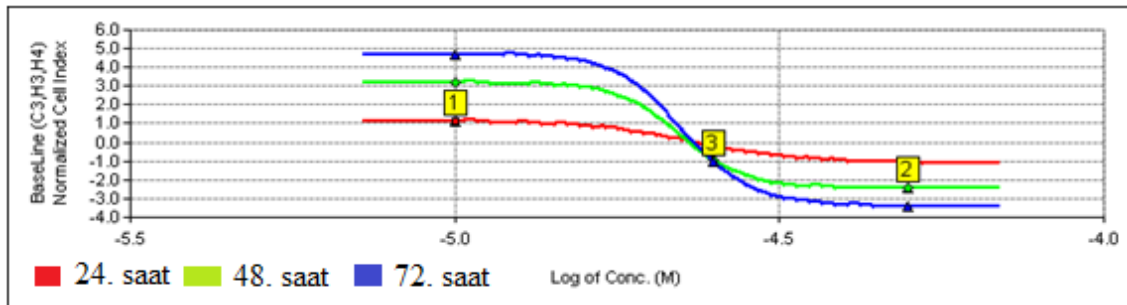
Şekil 4.10. 24. saat sonunda DPSC hücrelerine oksiresveratrol ilavesini takiben kontrol grubuna göre standardize edilmiş hücre indeks değişimi

24., 48. ve 72. saatlerdeki slope grafikleri incelendiğinde sadece 10  $\mu\text{M}$ 'lık oksiresveratrol dozunda bütün zaman dilimlerinde hücre proliferasyonu gözlenmiş ve bu proliferasyon oranının zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11). 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozda ise 25  $\mu\text{M}$ 'a göre toksik etki daha fazladır ve zamana bağlı olarak giderek artmıştır.



**Şekil 4.11.** 24,48 ve 72. saatlerde çeşitli dozlarda hazırlanan oksiresveratrol (10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ ) çözeltilerinin slope grafikleri

Oksiresveratrole ait 24., 48. ve 72. saatlerdeki doz yanıt eğrileri Şekil 4.12'de sunulmuştur. Bu grafiğe göre oksiresveratrolün  $\text{IC}_{50}$  değerleri 24. saatte 23  $\mu\text{M}$  ( $R^2=1$ ), 48. saatte 22,2  $\mu\text{M}$  ( $R^2=1$ ) ve 72. saatte 22,5  $\mu\text{M}$  ( $R^2=1$ ) olarak kaydedilmiştir.



**Şekil 4.12.** Oksiresveratrolün 24.,48. ve 72. saatlerdeki doz yanıt eğrileri

## 5. TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan materyaller hücrelerde ROT üretimini indükleyerek sitotoksisite oluşturabilmektedir. Bu nedenle ROT miktarını minimum seviyede tutarak dental materyallerin biyouyumluluğunun artırılması amacıyla antioksidanlardan yararlanılması düşünülebilir. Endojen bir antioksidan olan melatonin ve eksojen bir antioksidan olan oksiresveratrolün ROT üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde çalışılsa da DPSC üzerindeki etkilerine dair çalışmalar kısıtlıdır.<sup>3, 7</sup> Çalışmamızda çeşitli dozlardaki melatonin ve oksiresveratrolün insan DPSC'leri üzerindeki proliferatif ve sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Pulpanın hücresel yapısını fibroblastlar, makrofajlar, odontoblastlar, lenfositler, mast hücreleri ve farklılaşmamış kök hücreler oluşturmaktadır. Genel olarak kök hücrelerin uzun süreli kendilerini yenileme ve birden fazla hücreye dönüşüm yetenekleri bulunmaktadır. DPSC'nin esas görevi ise zarar görmüş dişlerde kendini yenileme özelliğini kullanarak bulunduğu dokuyu onarmak ve doku devamlılığını sağlamaktır. Ayrıca, DPSC'lerde odontojenik farklılaşma sonucu tersiyer dentin oluşumu da gözlenmektedir. DPSC'lerin çekilmiş dişlerden kolayca elde edilebilmesi de önemli bir avantajdır.<sup>132</sup> Bu tez çalışmasında melatonin ve oksiresveratrolün pulpa sağlığına olan etkisini incelemek amaçlandığından, bahsedilen tüm avantajları göz önünde bulundurularak DPSC'ler üzerinde çalışılmıştır.

Yeni bir materyalin biyouyumluluğu incelenirken hücre kültürü çalışmaları yapılacak işlemlerin ilk basamağını oluşturmaktadır. Hücre kültüründen alınan sonuçlar klinik koşulları taklit eden diğer in vitro test yöntemleri ile desteklenmelidir. Daha sonra göreceli olarak daha pahalı, zaman alıcı ve etik açıdan sorgulanması gereken hayvan testleri uygulanmaktadır. Biyouyumluluğun değerlendirilmesindeki son aşama ise in vivo değerlendirme testleridir.<sup>133</sup> Melatonin ve oksiresveratrolün DPSC'ler üzerindeki

etkinliğini ölçen çalışmaların yetersizliğinden dolayı çalışmamız biyouyumluluk değerlendirme yöntemlerinin ilk aşamasını oluşturan hücre kültür çalışmalarından başlatılmıştır. Bulduğumuz sonuçlar ileride yapılacak diğer test yöntemleriyle de desteklenmelidir. Mevcut çalışmada toksik çıkan dozların daha sonra yapılacak in-vivo deneylerle de desteklenmesi gerekmektedir.

Hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde daha çok XTT, MTT, WST-1 ve florans mikroskopisi gibi tek bitiş noktasını değerlendiren analizler tercih edilmektedir. Fakat, bu yöntemler kullanılarak test edilecek her zaman aralığı için yapılması gereken ölçümlerde aynı şartların sağlanması zordur. Çalışmamızda kullandığımız xCELLigence® RTCA cihazının eşzamanlı ölçüm yapabildiğinden, MTT ve diğer geleneksel test yöntemlerinde olduğu gibi tüm test edilecek zaman aralıkları için ayrı hücre ekimi yapılmasına gerek kalmamaktadır.<sup>134</sup> Bu özellik sayesinde standardizasyon sağlandığı için hücre çalışmalarında kısa sürede, daha kolay, güvenilir ve gerçek zamanlı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Rezin içerikli dental materyallerin kullanımında olduğu gibi pulpitis sürecinde oluşan hipoksi ve beyazlatma ajanlarının kullanımı da pulpada ROT oluşumuna neden olabilmektedir.<sup>3, 6, 7</sup> ROT'un zararlı etkilerini önlemek adına DPSC'ler üzerinde antioksidanların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda, farklı antioksidanlar karşısında hücre proliferasyonunun arttığı<sup>135, 136</sup> veya etkilenmediği<sup>137, 138</sup> tespit edilmiştir.

Wang ve arkadaşları,<sup>135</sup> saponin (eksojen antioksidan) olarak da bilinen ginsenositlerin 0,1-20 µmol/l aralığındaki dozlarıyla insan DPSC'si üzerinde çalışmışlar ve 0,5-10 µmol/l aralığındaki (özellikle 5 µmol/l) dozlarda hücre proliferasyonunda belirgin bir artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir. Debeljak Martacic ve arkadaşları<sup>136</sup> da antioksidan bir ajan olan N-Asetil-l-sisteinin (NAC) çekilmiş süt dişlerinden elde edilen

pulpa kök hücreleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmişlerdir. NAC'ın kontrole oranla çalışılan en düşük dozunun (0.1 mM) hücre sayısını artırırken, en yüksek dozunun (2.0mM) ise hücre çoğalmasını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Kim ve arkadaşları<sup>137</sup> ise tarçının ana maddelerinden biri olan ve antioksidan özelliği yüksek olan sinnamaldehitin çalışılan dozlarının (1-50 µM) insan DPSC'leri üzerinde proliferatif veya sitotoksik etki göstermediğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Wang ve arkadaşları<sup>138</sup> da endojen bir antioksidan olan  $10^{-7}$  M 17-β estradiolun DPSC'nin proliferasyon yeteneğini etkilemediğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da melatonin ve oksiresveratrolün, ginsenositler ve NAC'a benzer şekilde DPSC proliferasyonunda artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Düşük dozlarda DPSC proliferasyonunu artırıp yüksek dozlarda toksik özellik göstermeleri bakımından ise en çok NAC ile benzerlik göstermektedirler.

Antioksidan maddelerin pulpa üzerindeki olumlu etkilerini göz önünde bulundurarak bu maddelerin direkt pulpa kuafaj materyali olarak kullanıldığı hayvan çalışmaları mevcuttur. Alaçam ve arkadaşları,<sup>139</sup> 3 köpeğin 48 dişinde Sınıf V kavite preperasyonu hazırlamışlar ve mekanik olarak pulpa açılması meydana getirdikleri dişlerde antioksidan bir enzim olan katalazın (0.8 ve 1.6 mg) etkinliğini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubunda direkt kuafaj materyali olarak sadece potasyum-fosfat tamponu emdirilmiş pamuk peletimlerin kullanıldığı deneyde 7. gün sonunda gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken 90. gün sonunda katalaz kullanılan grupta daha iyi bir doku iyileşmesi sağlandığını gözlemlemişlerdir. Sabir ve arkadaşları<sup>140</sup> da 8-16 haftalık sıçanların üst birinci azı dişlerinde açtıkları Sınıf I oklüzal kavitelere pulpayı ekspose etmişler ve kuafaj materyali olarak propolisten elde edilen flavonoid ve flavonoid olmayan materyalleri ve kontrol grubu olarak da çinko oksit ojenolü kullanmışlardır. Araştırmacılar, sadece flavonoid kullanılan grupta dental enflamasyon gözlenmeksizin 4. haftada dentin köprüsü oluşmasının, flavonoidlerin antioksidan ve

antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin bulunduğu bilinen melatonin ve oksiresveratrolün DPSC üzerinde proliferatif etki gösteren dozlarının tespit edilmesi daha sonra yapılacak olan çalışmalarda direkt kuafaj materyali olarak kullanılabilme veya kuafaj materyallerinin yapısına eklenebilme ihtimalini düşündürülebilir.

Endojen bir antioksidan olan melatoninin başta sirkadyen ritimlerin kontrolü olmak üzere birçok görevi bulunmaktadır.<sup>69-76</sup> Yapılan çalışmalar sonucu melatoninin antioksidan<sup>104</sup>, anti inflamatuvar<sup>8</sup>, antimitotik<sup>141</sup>, anti kanser ve anti-aging<sup>77, 78</sup> etkiler gösterdiği de ispatlanmıştır. Satomura ve arkadaşları,<sup>87</sup> çalışmalarında in vitro olarak insan osteoblastlarında differansiyasyonu arttırdığını ve in vivo olarak farelerde kemik formasyonunu stimüle ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, diş gelişiminde de rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>88</sup> Çekim yaralarının iyileştirilmesi,<sup>107</sup> periodontitis ve gingivitise bağlı inflamasyonun hafifletilmesi,<sup>142</sup> alveolar kemik kayıplarının azaltılması,<sup>143</sup> herpes gibi viral enfeksiyonların tedavisi,<sup>144</sup> implantlarda osteointegrasyonun artırılması,<sup>95</sup> ve oral kanserlerin tedavisi<sup>145</sup> amacıyla diş hekimliği alanında yapılan çalışmalarda melatoninin antioksidan etkisi nedeniyle başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Oksiresveratrol antioksidan<sup>125</sup>, antiinflamatuvar<sup>126</sup>, antikanserojen<sup>127</sup>, antidiyabetik<sup>128</sup> ve antiviral<sup>129, 130</sup> etkinliği bulunan bir resveratrol (eksojen bir antioksidan) analogudur. Diş hekimliği alanında oksiresveratrolün endodontik<sup>146</sup> ve periodontal<sup>147</sup> patojenlere, kandida enfeksiyonlarına,<sup>148</sup> ve oral biyofilmin oluşumunu önleme ve mevcut biyofilmi yok etme<sup>149</sup> üzerinde olumlu etkilerinin olduğu çalışmalar mevcuttur.

Melatoninin terminal antioksidan özelliğinin yanı sıra birçok çalışmada başarılı sonuçlar sergileyen oksiresveratrol ve melatoninin DPSC üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaların kısıtlı olması bu çalışmada melatonin ve oksiresveratrolün tercih edilme sebebi olmuştur.

Melatoninin ve oksiresveratrolün DPSC üzerindeki etkinliğini ölçen çalışmaların kısıtlı olmasından dolayı DPSC kültürünün yanında başka hücre kültürü çalışmalarında kullanılan dozları da referans alınarak çalışmamızda kullanılacak dozlara karar verilmiştir.<sup>76, 124, 150-154</sup>

Bulgularımıza göre melatonin düşük dozlarda (100pM ve 100nM) DPSC proliferasyonunu arttırırken, çalışılan en yüksek dozda (100 µM) DPSC proliferasyonunu engellemiştir. Melatonine benzer şekilde oksiresveratrol de çalışılan en düşük dozda (10 µM) hücre proliferasyonunu arttırmış, yüksek dozlarda (25 µM ve 50 µM) ise toksik etki göstermiştir.

Ji-Guo Li ve arkadaşları<sup>155</sup> farelerde akut pulpitis sırasında serumda melatonin seviyesinde bir azalma olduğunu tespit etmişler ve intragastrik olarak melatonin uygulamasının akut pulpitis semptomlarını azalttığını belirtmişlerdir. Buradaki ve çalışmamızdaki bulguların her ikisi de daha sonra yapılacak olan çalışmalarda melatoninin pulpitis tedavisinde terapötik amaçla kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Qin Liu ve arkadaşları<sup>152</sup> hücre sayım kiti kullanarak  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  ve  $10^{-12}$  M melatoninin 5 gün boyunca DPSC üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında artan melatonin dozuyla beraber toksik etkinin de arttığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde artan dozla beraber toksik etkinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak, Qin Liu ve arkadaşları 3.,4. ve 5. günlerde melatonin uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla DPSC proliferasyonunda inhibisyon gözlemlemişlerdir. Antioksidanların pulpa hücre proliferasyonuna olan etkisinin değerlendirildiği diğer

çalışmalarda ise DPSC proliferasyonunun antioksidan ilavesinden etkilenmediği veya arttığı belirtilmektedir. <sup>135-138</sup> Bizim çalışmamızda da Qin Liu ve arkadaşlarıyla hemen hemen aynı dozlar kullanılmış fakat hücre proliferasyonunu azaltan ve arttıran dozlarda farklılık olduğu görülmüştür. Bu durum kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanmış olabilir; xCELLigence® cihazı eş zamanlı ölçüm yapabildiğinden diğer klasik yöntemlere göre daha hassas sonuçlar sunabilmektedir. Bununla birlikte bu konuda daha fazla hücre kültürü çalışması yapılması daha güvenilir bir yaklaşım tarzı oluşturacaktır.

Atalayın ve arkadaşları<sup>124</sup> çeşitli dozlarda (0.25-100  $\mu$ M) resveratrolün fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmişler ve hücre proliferasyonunu en çok arttıranın 0.5  $\mu$ M'lık resveratrol dozu olduğunu, bizim de çalışmamızda kullandığımız 10, 25 ve 50  $\mu$ M'lık dozlarda ise kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda azalma olduğunu belirtmişlerdir. İki çalışma arasındaki farklılık çalışmaların farklı hücreler üzerinde gerçekleştirilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmanın sonunda seçilen dozların doğruluğunu teyit etmek için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin çalışılan doz aralığında olması seçtiğimiz dozların doğruluğunun kanıtı niteliğindedir. Ayrıca, çalışmamızda IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmiş olması daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak dozların belirlenmesinde avantaj oluşturacaktır.

Çalışmamızdaki tüm gruplar beraber değerlendirildiğinde, en fazla DPSC proliferasyonunun oksiresveratrol 10  $\mu$ M grubunda, en fazla toksik etkinin melatonin 100  $\mu$ M grubunda tespit edilmesinin yanı sıra oksiresveratrol için belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin melatoninden daha yüksek olması sebebiyle oksiresveratrolün genel olarak melatoninden daha başarılı sonuçlar verdiği düşünölmektedir.



Çalışmamızda her iki antioksidan maddenin de farklı dozlarının DPSC'ler üzerinde proliferatif veya toksik etkiler oluşturabilmesinden dolayı melatonin ve oksiresveratrolün insan DPSC'si üzerine uygulanan farklı dozlarının hücre indeks değerlerine etkileri bakımından aralarında farklılık bulunmadığı yönünde kurulmuş olan hipotez 1 ve hipotez 2 reddedilmiştir. Ancak, literatürde bu konuyla ilgili çalışma sayısı oldukça azdır ve daha sonra yapılacak çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda melatonin ve oksiresveratrol belirli dozlarda proliferatif etki göstermiş olsalar da en güçlü proliferatif etki oksiresveratrol 10  $\mu$ M grubunda, en fazla toksik etki ise melatonin 100  $\mu$ M grubunda gözlemlenmiştir

2. Ortalama hücre indeks verileri değerlendirildiğinde melatonin 100  $\mu$ M ve oksiresveratrol 50  $\mu$ M gruplarında kontrole göre daha düşük değerler saptanmıştır. Oksiresveratrol 25  $\mu$ M grubunda da 24. saatten sonra benzer şekilde toksik etki tespit edilmiştir. 100 nM melatonin grubu tüm zaman dilimlerinde kontrole yakın sonuçlar verirken hücre proliferasyonunu belirgin şekilde arttıran gruplar ise 100 pM melatonin ve 10  $\mu$ M oksiresveratrol grubudur.

3. 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerleri melatonin için sırasıyla 946 nM, 1220 nM ve 1243 nM iken, oksiresveratrol için ise sırasıyla 23  $\mu$ M, 22,2  $\mu$ M ve 22,5  $\mu$ M olarak kaydedilmiştir.

4. Saatteki hücre indeks artışı oksiresveratrol 10  $\mu$ M grubunda diğer tüm gruplardan fazla bulunmuştur.

5. Genel olarak oksiresveratrol melatonininden daha başarılı sonuçlar sergilemiştir.

6. Melatonin ve oksiresveratrol, DPSC üzerinde ROT oluşumuna neden olabilecek beyazlatma ajanları ya da rezin içerikli maddeler gibi materyallerin toksisitesini azaltmak için yapılarına katılabilir veya direkt kuafaj materyallerine eklenebilir. Ancak, bu hedeflerin gerçekleştirilebilmesi için sitotoksikite oluşum mekanizmalarının da değerlendirildiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 1996, 12: 186-193.
2. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *European Journal of Oral Sciences*, 1998, 106: 696-706.
3. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 48: 277-288.
4. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18: 1033-1077.
5. Zhang L, Wei W, Xu J, Min F, Wang L, Wang X, Cao S, Tan DX, Qi W, Reiter RJ. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation in vivo as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. *Journal of Pineal Research*, 2006, 40: 326-331.
6. Dalyanoğlu MM. Diş beyazlatıcı ve antioksidan ajanların etkilerinin Dental Pulp Stem Cell (DPSC) hücre dizisinde incelenmesi. 2016.
7. Majd ES, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*, 2003, 24: 3-9.
8. Czesnikiewicz-Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007, 58 Suppl 3: 5-19.
9. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş Hekimliğinde Kök Hücre ve Dental Pulpa Kök Hücreleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2012, 29: 115-120.
10. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells and Development*, 2004, 13: 452-455.

11. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 2008, 12: 113-118.
12. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Diseases*, 2007, 13: 11-16.
13. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *European Journal of Cancer*, 2006, 42: 1257-1272.
14. Aktaş Y, Aydoğdu S, Diker E. Kardiyovasküler Tedavide Yeni Ufuklar: Hücresel Kardiyomiyoplasti ve Kök Hücre Transplantasyonu. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi. The Anatolian Journal of Cardiology*, 2003, 3: 340-347.
15. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
16. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes and Development*, 1996, 10: 3129-3140.
17. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 2426-2431.
18. Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends in Cell Biology*, 2002, 12: 185-192.
19. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1998, 353: 821-830.

20. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 2005, 23: 1549-1559.
21. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Human Reproduction*, 2003, 18: 1489-1493.
22. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 2000, 287: 2032-2036.
23. Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nature Medicine*, 2003, 9: 1293-1299.
24. Murrell W, Feron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Developmental Dynamics*, 2005, 233: 496-515.
25. Zammit P, Beauchamp J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation*, 2001, 68: 193-204.
26. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 2001, 7: 211-228.
27. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hango G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86: 3828-3832.
28. Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*, 2004, 22: 355-366.

29. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 7999-8004.
30. Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *American Journal of Pathology*, 1991, 139: 535-552.
31. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005, 433: 647-653.
32. Wu M, Wei YQ. Development of respiratory stem cells and progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 2004, 13: 607-613.
33. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 13625-13630.
34. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001, 105: 829-841.
35. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal of Anatomy*, 2002, 200: 277-282.
36. Kansu E. Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2005, 36: 191-197.
37. Kansu E. Stem hücre plastisitesi, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Mayıs 2004, Kapadokya 18-22.

38. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 2011, 22: 91-98.
39. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*, 2008, 4: 21-26.
40. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 2005, 8: 191-199.
41. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 5807-5812.
42. Schmalz G, Arenholdt-Bindslev D. Basic Aspects. İçinde:Schmalz G, Arenholdt-Bindslev D (editörler). *Biocompatibility of dental materials*, Berlin Heidelberg, Springer, 2009: 1-12.
43. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2001, 86: 203-209.
44. Atalayn Ç, Tezel H, Ergücü Z. Rezin Esaslı Dental Materyallerin Sitotoksitesine Genel Bir Bakış. *Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2016, 37: 47-53.
45. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clinical Oral Investigations*, 2008, 12: 1-8.
46. Ryu W-S. Diagnosis and Methods. İçinde:Ryu W-S (editör). *Molecular virology of human pathogenic viruses*, 2017: 47-62.

47. Ferracane J, Mitchell J. Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. İçinde:Sakaguchi RL, Powers JM (editörler). *Craig's restorative dental materials*, St. Louis, Mo., Elsevier/Mosby, 2012: 109-133.
48. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. İçinde:Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Trask OJ, Jr., Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X (editörler). *Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD), 2004.
49. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep*, 2015, 3: 617-620.
50. Haeffner-Cavaillon N, Kazatchkine MD. Methods for assessing monocytic cytokine production as an index of biocompatibility. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 1994, 9 Suppl 2: 112-115.
51. Styles JA. Mammalian cell transformation in vitro. Six tests for carcinogenicity. *British Journal of Cancer*, 1978, 37: 931-936.
52. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, 70: 2281-2285.
53. xCELLigence RTCA DP Real Time Cell Analyzer – Dual Purpose. <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/>. 09.01.2019.



54. Wataha JC. Biocompatibility of Dental Materials. İçinde:Anusavice KJ, Phillips RW (editörler). *Phillips' science of dental materials*, St. Louis, Mo., Saunders, 2003: 189-192.
55. Kimoto H, Ito Y, Matsumoto S, Hosoki E. A simple method for oral mucosal irritation test by intraoral instillation in rats. *Journal of Toxicological Sciences*, 2016, 41: 233-239.
56. Ryu HY, Lee S, Ahn KS, Kim HJ, Lee SS, Ko HJ, Lee JK, Cho MH, Ahn MY, Kim EM, Lim JH, Song KS. Oral Toxicity Study and Skin Sensitization Test of a Cricket. *Toxicol Res*, 2016, 32: 159-173.
57. Mondelli JAS, Hoshino RA, Weckwerth PH, Cerri PS, Leonardo RT, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, da Silva GF. Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate Flow and Biodentine. *International Endodontic Journal*, 2018.
58. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *International Endodontic Journal*, 2003, 36: 281-287.
59. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 1994, 22 Suppl 2: S21-24.
60. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 2008, 106: 609-614.
61. Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 1987, 57: 1-8.

62. Karabulut H, Gülay M. Antioxidants. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 2016, 1: 65-76.
63. Wootton-Beard PC, Ryan L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 2011, 44: 3135-3148.
64. Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tip araştırmaları dergisi*, 2011, 9: 73-83.
65. Özel GSK, Birdane YO. Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2014, 7: 41-52.
66. Ryszawa N, Kawczynska-Drozd A, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik T, Naruszewicz M, Korbut R, Guzik TJ. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, 57: 611-626.
67. Kawczynska-Drozd A, Olszanecki R, Jawien J, Brzozowski T, Pawlik WW, Korbut R, Guzik TJ. Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 2006, 19: 764-767.
68. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80: 2587-2587.
69. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*, 1983, 219: 1089-1091.
70. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*, 1997, 138: 627-634.

71. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 1824-1828.
72. Esquifino AI, Villanua MA, Agrasal C. Effect of neonatal melatonin administration on sexual development in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1987, 27: 1089-1093.
73. Kennaway DJ, Rowe SA. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 1995, 49: 423-435.
74. Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *Journal of Pineal Research*, 2000, 29: 129-137.
75. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, 2: 167-179.
76. Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research*, 1988, 48: 6121-6126.
77. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of Pineal Research*, 2005, 38: 1-9.
78. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 2007, 42: 28-42.

79. Forsling ML, Wheeler MJ, Williams AJ. The effect of melatonin administration on pituitary hormone secretion in man. *Clinical Endocrinology*, 1999, 51: 637-642.
80. Kostoglou-Athanassiou I, Treacher DF, Wheeler MJ, Forsling ML. Melatonin administration and pituitary hormone secretion. *Clinical Endocrinology*, 1998, 48: 31-37.
81. Cagnacci A, Soldani R, Yen SSC. Melatonin enhances cortisol levels in aged but not young women. *European Journal of Endocrinology*, 1995, 133: 691-695.
82. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 22041-22047.
83. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 1219-1229.
84. Turgut M, Kaplan S, Turgut AT, Aslan H, Guvenc T, Cullu E, Erdogan S. Morphological, stereological and radiological changes in pinealectomized chicken cervical vertebrae. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 392-399.
85. Machida M, Dubousset J, Yamada T, Kimura J, Saito M, Shiraishi T, Yamagishi M. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *Journal of Pineal Research*, 2006, 41: 1-7.
86. Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *Journal of Pineal Research*, 1999, 27: 106-110.
87. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, Nagayama M. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic

- differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *Journal of Pineal Research*, 2007, 42: 231-239.
88. Kumasaka S, Shimosuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, Davaadorj P, Saito I, Satomura K. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochemistry and Cell Biology*, 2010, 133: 577-584.
89. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 1991, 12: 151-180.
90. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research*, 1996, 73: 125-130.
91. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 38: 313-316.
92. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Czesnikiewicz-Guzik M, Kwiecien S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2007, 58: 381-405.
93. Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik M, Pawlik WW, Hahn EG. Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 375-385.
94. Girgert R, Hanf V, Emons G, Grundker C. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 2009, 47: 23-31.

95. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Munoz F, Lopez-Pena M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45: 174-179.
96. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1472: 206-214.
97. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Macias M, Munoz Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R. Cell protective role of melatonin in the brain. *Journal of Pineal Research*, 1995, 19: 57-63.
98. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *Journal of Periodontology*, 2007, 78: 1094-1102.
99. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34: 75-78.
100. Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *Journal of Pineal Research*, 1998, 25: 129-134.
101. Laakso ML, Porkka-Heiskanen T, Alila A, Stenberg D, Johansson G. Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *Journal of Pineal Research*, 1990, 9: 39-50.
102. Permuy M, Lopez-Pena M, Gonzalez-Cantalapiedra A, Munoz F. Melatonin: A Review of Its Potential Functions and Effects on Dental Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18.

103. Smith TM. Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel. *Journal of Anatomy*, 2006, 208: 99-113.
104. Topal T, Öter S, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 2009, 19: 137-143.
105. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 99-104.
106. Guzik TJ, Olszanecki R, Sadowski J, Kapelak B, Rudzinski P, Jopek A, Kawczynska A, Ryszawa N, Loster J, Jawien J, Czesnikiewicz-Guzik M, Channon KM, Korbut R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2005, 56: 313-323.
107. Cutando A, Arana C, Gomez-Moreno G, Escames G, Lopez A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *Journal of Periodontology*, 2007, 78: 576-583.
108. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 2012, 158: 182-193.
109. Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. [Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (*Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc.)]. *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1963, 83: 988-990.

110. Singh CK, Kumar A, Lavoie HA, Dipette DJ, Singh US. Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution? *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 2013, 238: 482-490.
111. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Gruoso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015: 837042.
112. Sato M, Maulik G, Bagchi D, Das DK. Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radical Research*, 2000, 32: 135-144.
113. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 1997, 30: 91-113.
114. Law M, Wald N. Why heart disease mortality is low in France: the time lag explanation. *BMJ*, 1999, 318: 1471-1476.
115. Liu BL, Zhang X, Zhang W, Zhen HN. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 2007, 6: 1833-1836.
116. Han G, Xia J, Gao J, Inagaki Y, Tang W, Kokudo N. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2015, 9: 1-12.
117. Yang T, Li S, Zhang X, Pang X, Lin Q, Cao J. Resveratrol, sirtuins, and viruses. *Reviews in Medical Virology*, 2015, 25: 431-445.
118. van Duursen MBM. Modulation of estrogen synthesis and metabolism by phytoestrogens in vitro and the implications for women's health. *Toxicology Research (Camb)*, 2017, 6: 772-794.



119. Dei Cas M, Ghidoni R. Cancer Prevention and Therapy with Polyphenols: Sphingolipid-Mediated Mechanisms. *Nutrients*, 2018, 10: e940.
120. Liu FC, Tsai YF, Tsai HI, Yu HP. Anti-Inflammatory and Organ-Protective Effects of Resveratrol in Trauma-Hemorrhagic Injury. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015: 643763.
121. Uysal T, Gorgulu S, Yagci A, Karlioglu Y, Gunhan O, Sagdic D. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 2011, 14: 80-87.
122. Haghghatdoost F, Hariri M. Can resveratrol supplement change inflammatory mediators? A systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2019, 73: 345-355.
123. Wang FM, Hu Z, Liu X, Feng JQ, Augsburg RA, Gutmann JL, Glickman GN. Resveratrol represses tumor necrosis factor alpha/c-Jun N-terminal kinase signaling via autophagy in human dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 2019, 97: 116-121.
124. Atalayin C, Armagan G, Konyalioglu S, Kemaloglu H, Tezel H, Ergucu Z, Keser A, Dagci T, Onal B. The protective effect of resveratrol against dentin bonding agents-induced cytotoxicity. *Dental Materials Journal*, 2015, 34: 766-773.
125. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, 2003, 9: 64-76.
126. Matencio A, Garcia-Carmona F, Lopez-Nicolas JM. The inclusion complex of oxyresveratrol in modified cyclodextrins: A thermodynamic, structural, physicochemical, fluorescent and computational study. *Food Chemistry*, 2017, 232: 177-184.

127. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16: 5650-5653.
128. Ahn E, Lee J, Jeon YH, Choi SW, Kim E. Anti-diabetic effects of mulberry (*Morus alba* L.) branches and oxyresveratrol in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26: 1693-1702.
129. Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Suzuki M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research*, 2008, 80: 62-70.
130. Sasivimolphon P, Lipipun V, Likhitwitayawuid K, Takemoto M, Pramyothin P, Hattori M, Shiraki K. Inhibitory activity of oxyresveratrol on wild-type and drug-resistant varicella-zoster virus replication in vitro. *Antiviral Research*, 2009, 84: 95-97.
131. Joungh DK, Mun SH, Choi SH, Kang OH, Kim SB, Lee YS, Zhou T, Kong R, Choi JG, Shin DW, Kim YC, Lee DS, Kwon DY. Antibacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 12: 1579-1584.
132. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 2008, 12: 113-118.
133. Schmalz G. Determination of Biocompatibility. İçinde: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (editörler). *Biocompatibility of dental materials*, 1st Baskı. Verlag Berlin Heidelberg, Springer, 2009: 13-43.

134. Real-Time and Dynamic Monitoring of Cell Proliferation and Viability for Adherent Cells. <https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/Monitoring-Cell-Proliferation-and-Viability-for-Adherent-Cells.pdf>. 13.03.2019.
135. Wang P, Wei X, Zhang F, Yang K, Qu C, Luo H, He L. Ginsenoside Rg1 of Panax ginseng stimulates the proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation and gene expression profiles of human dental pulp stem cells. *Phytomedicine*, 2014, 21: 177-183.
136. Debeljak Martacic J, Borozan S, Radovanovic A, Popadic D, Mojsilovic S, Vucic V, Todorovic V, Kovacevic Filipovic M. N-Acetyl-l-cysteine enhances ex-vivo amplification of deciduous teeth dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 2016, 70: 32-38.
137. Kim N-Y, Ahn S-G, Kim S-A. Cinnamaldehyde protects human dental pulp cells against oxidative stress through the Nrf2/HO-1-dependent antioxidant response. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 815: 73-79.
138. Wang Y, Zheng Y, Wang Z, Li J, Wang Z, Zhang G, Yu J. 10(-7) m 17beta-oestradiol enhances odonto/osteogenic potency of human dental pulp stem cells by activation of the NF-kappaB pathway. *Cell Proliferation*, 2013, 46: 677-684.
139. Alacam A, Tulunoglu Ö, Oygür T, Bilici S. Effects of topical Catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 333-339.
140. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *Journal of Oral Science*, 2005, 47: 135-138.
141. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2004, 13: 56-65.

142. Reiter R, Rosales-Corral S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *Journal of Periodontal Research*, 2015, 50: 9-17.
143. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *Journal of Periodontology*, 2007, 78: 1094-1102.
144. Boga JA, Coto-Montes A, Rosales-Corral SA, Tan DX, Reiter RJ. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this "molecular handyman"? *Reviews in Medical Virology*, 2012, 22: 323-338.
145. Liu R, Wang HL, Deng MJ, Wen XJ, Mo YY, Chen FM, Zou CL, Duan WF, Li L, Nie X. Melatonin Inhibits Reactive Oxygen Species-Driven Proliferation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Vasculogenic Mimicry in Oral Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018: 3510970.
146. Teanpaisan R, Ruangkiatkul P, Thammasitboon K, Puripattanavong J, Faroongsarng D. Effectiveness of Artocarpus lakoocha extract, poloxamer 407, on Enterococcus faecalis in vitro. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2013, 4: 219-224.
147. Phoolcharoen W, Soompon S, Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Kuvatanasuchati J, Pavasant P. Anti-periodontal pathogen and anti-inflammatory activities of oxyresveratrol. *Natural Product Communications*, 2013, 8: 613-616.
148. Kim S, Lee DG. Oxyresveratrol-induced DNA cleavage triggers apoptotic response in Candida albicans. *Microbiology*, 2018, 164: 1112-1121.
149. Teanpaisan R, Senapong S, Puripattanavong J. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of Artocarpus lakoocha (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, 13: 1149-1155.

150. Liu J, Zhou H, Fan W, Dong W, Fu S, He H, Huang F. Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54: 170-178.
151. Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *Journal of Pineal Research*, 2007, 42: 411-418.
152. Liu Q, Fan W, He Y, Zhang F, Guan X, Deng Q, Lu X, He H, Huang F. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *Archives of Oral Biology*, 2017, 83: 33-39.
153. Türkmen D, Yurtçu E, Ergun MA, Menevşe A. İnsan epidermoid larinks karsinom (HEp-2) hücre serisinde resveratrol'ün apoptotik etkisi. *Gazi Medical Journal*, 2007, 18: 117-120.
154. Şahin E. Resveratrol ile muamele edilmiş yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücre sitokinlerinin A549 kanser hücresine etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2015.
155. Li JG, Lin JJ, Wang ZL, Cai WK, Wang PN, Jia Q, Zhang AS, Wu GY, Zhu GX, Ni LX. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *Am J Transl Res*, 2015, 7: 66-78.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>
Adı Soyadı : Şeyma KESKİN
Doğum Tarihi : 13.06.1990
Doğum Yeri : Üsküdar/ İstanbul
Medeni hali : Bekar
Uyruğu : TC
Adres : Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı 25240 / ERZURUM
Tel : 05542287284
Faks : 0442 236 09 45
E-mail : dt.seymakeskin@gmail.com
<b>Eğitim</b>
Lise : Kabataş Erkek Lisesi
Lisans ve Yüksek lisans : İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2008-2013)
Uzmanlık : Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı (2014-2017)
<b>Yabancı Dil Bilgisi</b>
İngilizce : YDS 50, Eylül 2013

## EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

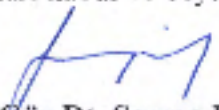
T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

### ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Uzmanlık Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Fatih ŞENGÜL danışmanlığında sunulan “Melatonin ve Oksiresveratrolün Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Iathenticate Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	3	15
Genel Bilgiler	13	30
Materyal ve Metod	15	35
Bulgular	1	10
Tartışma	3	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 16 / 04 / 2019

  
Arş. Gör. Dt. Şeyma KESKİN  
İmza

  
Dr. Öğr. Üyesi Fatih ŞENGÜL  
İmza

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP  
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



Bölümü : Dekanlık  
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/354  
Konu : Etik Kurul Kararı

27.12.2018

Sayın:Arş.Gör.Dr. Şeyma KESKİN  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Pedodonti Anabilim Dalı  
Araştırma Görevlisi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz "Melatonin ve Oksiresveratrolün Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Sítotoksik Etkinin Değerlendirilmesi" isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR  
Etik Kurul Başkanı

Eki \_\_\_\_\_ :  
1 Adet Etik Kurul Kararı





ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP  
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Ary.Gör.Dr.Şeyma KESKİN	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	Melatonin ve Oksiroveratrolün Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Değerlendirilmesi	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 08 Karar No: 28	Tarih: 27.12.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereğini, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.  Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR  
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.M.Hamidullah UYANIK  
Üye

Doç.Dr.Aygenur AKSOY  
Üye

Doç.Dr.Atila ÇAYIR  
Üye

Dr.Öğr.Üy. İsmail FIRINCI

Dr.Öğr.Üy.Zahide KOŞAN  
Üye

Emrah MELİTLİOĞLU  
Üye