



**FARKLI PULPA KAPLAMA MATERYALLERİNİN
İNSAN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
TOPLAM ANTİOKSİDAN - OKSİDAN SEVİYELERİNİN VE
GEN EKSPRESYON ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Arş. Gör. Dt. Seçkin AKSU

Pedodonti Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ

Uzmanlık Tezi – 2017

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

**FARKLI PULPA KAPLAMA MATERYALLERİNİN
İNSAN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ TOPLAM ANTİOKSİDAN - OKSİDAN
SEVİYELERİNİN VE GEN EKSPRESYON
ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seçkin AKSU

**Pedodonti Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ**

**ERZURUM
2017**

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

**FARKLI PULPA KAPLAMA MATERYALLERİNİN İNSAN DENTAL
PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TOPLAM ANTİOKSİDAN-
OKSİDAN SEVİYELERİNİN VE GEN EKSPRESYON ANALİZLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seçkin AKSU

Tez Savunma Tarihi : 04.04.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Feridun BAŞAK


Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ceyhan ALTUN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sera DERELİOĞLU

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fatih ŞENGÜL

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Abdul Vahit ERDEM

Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi

ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diş Dokuları.....	4
2.1.1. Dentin Dokusu	4
2.1.1.1. Primer Dentin.....	5
2.1.1.2. İnterglobüler Dentin.....	5
2.1.1.3. Predentin	6
2.1.1.4. Sekonder Dentin	6
2.1.1.5. Tersiyer Dentin	6
2.1.1.6. Dentin Tübülleri.....	7
2.1.1.7. Sirkumpulpal Dentin.....	8
2.1.1.8. İntertübüler Dentin.....	8
2.1.2. Pulpa Dokusu	8
2.1.2.1. Pulpa Tabakaları	9
2.1.2.2. Pulpanın Hücresel Komponentleri.....	11
2.2. İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri	14
2.3. Pulpa - Dentin Kompleksindeki Biyolojik Belirteçler.....	15
2.4. Pulpa - Dentin Kompleksinin Cevapları	18

2.4.1. Pulpa - Dentin Kompleksinin Çürüğe Karşı Cevabı.....	18
2.4.2. Pulpa - Dentin Kompleksinin Mekanik Etkenlere Karşı Cevabı.....	18
2.4.3. Pulpa - Dentin Kompleksinin Termal Etkenlere Karşı Cevabı.....	20
2.4.4. Pulpa - Dentin Kompleksinin Dental Materyallere Karşı Cevabı	20
2.5. Pulpa - Dentin Kompleks Cevabının İndüklenmesi Amacıyla Pulpa Kaplaması İçin Kullanılan Dental Materyaller	21
2.5.1. Kalsiyum Hidroksit.....	21
2.5.2. Mineral Trioksit Agregat	22
2.5.3. Bioseramikler.....	23
2.5.4. Çinko Oksit Öjenol	27
2.6. Dental Materyaller ve Oksidatif Stres	28
2.7. Pulpa ve Hücresele Ölüm Mekanizması.....	29
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	33
3.2. Örneklerin Hazırlanması.....	36
3.3. Biyokimyasal Analizler	40
3.3.1. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS).....	40
3.3.2. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS).....	42
3.3.3. TAS ve TOS Analizlerinin İstatistiksel Değerlendirilmeleri.....	43
3.4. Gen Ekspresyon Analizleri	43
3.4.1. RNA İzolasyonu	43
3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	44
3.4.4. Gen Ekspresyon Analizlerinin İstatistiksel Analizleri.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. TAS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Sonuçları.....	47

4.2. TAS Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri	49
4.3. TOS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulguları.....	50
4.4. TOS Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri	51
4.5. Gen Ekspresyon Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulguları	52
4.5.1. TGF- β 1 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları	52
4.5.2. BMP-2 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları	54
4.5.3. ALP Geni Ekspresyon Analizi Bulguları.....	56
4.5.4. Bcl-2 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları	58
4.6. Gen Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri	60
5. TARTIŞMA.....	62
5.1. TAS-TOS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulgularının Tartışılması.....	65
5.2. Gen Ekspresyon Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulgularının Tartışılması.....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	86
EKLER	117
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	117
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	118

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmayı değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, Fakültemiz Dekan Yardımcısı ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, uzmanlık eğitimimde büyük emeği geçen, klinik tecrübelerinden çokça istifade ettiğim, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sera DERELİOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), çalışmamızın her aşamasında bana büyük destek veren ve binlerce teşekkürü borç bildiğim, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih ŞENGÜL'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), uzmanlık eğitimim boyunca her zaman desteğini hissettiğim, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Münevver Kılıç'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), (2015/308) BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, Pedodonti Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım ve ikinci ailem olarak hissettiğim tüm asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline;

Bugünlere gelmemi sağlayan, destek ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen çok değerli annem, babam ve halama; en önemlisi her konuda yanımda olan sevgili eşim Uzm. Dt. Burak AKSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dt. Seçkin AKSU

ÖZET

Farklı Pulpa Kaplama Materyallerinin İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerindeki Toplam Antioksidan - Oksidan Seviyelerinin ve Gen Ekspresyon Analizlerinin Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli pulpa kaplama materyallerinin (ProRoot® MTA, Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair ve ZnOEu) insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkilerinin TAS - TOS analizleri ve TGF-β1, BMP-2, ALP, Bcl-2 biyobelirteçlerini ifade eden genlerdeki ekspresyon analizleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan dondurulmuş insan dental pulpa kök hücreleri kullanılmıştır. Filtre difüzyon testi, ISO standartlarına uygun şekilde uygulanmıştır. 24. ve 72. saatler sonunda; TAS-TOS biyokimyasal analizleri sonrasında gen ekspresyon değerleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (n=3). Ölçümler arasındaki bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular: İlk 24 saatte sadece ProRoot® MTA grubunun antioksidatif savunma mekanizması yüksek bulunmuştur. 24. ve 72. saatler arasında oksidatif strese karşı koruyuculuğun tüm gruplarda artmış olduğu ve en yüksek koruyuculuğun Biodentine™ ve Pulpine Mineral gruplarında; en zayıf koruyuculuğun ise ZnOEu grubunda olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Diğer materyallere kıyasla Biodentine™ ve Endo Repair materyallerinde TGF β1, BMP-2 ve ALP gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05). 24. ve 72. saatler arasında tüm grupların Bcl-2 ekspresyon değerlerinde azalma gerçekleştiği tespit edilmiştir. 72 saat sonunda kontrol grubuna kıyasla Endo Repair ve ProRoot® MTA gruplarında yüksek Bcl-2 gen ekspresyonu gözlemlenmiştir (p<0.05).

Sonuç: Elde edilen TAS ve TOS değerlerine göre tüm materyallerin pulpa kök hücreleri üzerinde antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirdiği belirlenmiştir. Biodentine™ ve Endo Repair gruplarının, biyoyumlulukları yanı sıra biyoaktivitelerinin de iyi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alkalen Fosfataz, Biodentin, B Hücreli Lenfoma Geni-2, Çinko Oksit Öjenol, Hücre Kültürü, Kalsiyum Fosfat, Kemik Morfogenetik Faktör 2, Mineral Trioksit Agregat, Oksidatif Stres, Propolis, Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1, Toplam Antioksidan Seviyesi, Toplam Oksidan Seviyesi.

ABSTRACT

Evaluation of Total Antioxidant - Oxidant Status and Gene Expression Values of Various Pulp Capping Materials on Human Dental Pulp Stem Cells

Aim: The aim of this study was to evaluate the effects of various pulp capping materials (ProRoot® MTA, Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair and ZnOEU) on human dental pulp stem cells with TAS-TOS analyzes and gene expression values remarking TGF-β1, BMP-2, ALP and Bcl-2 biomarkers.

Materials and Methods: In our study, American Type Culture Collection human dental pulp stem cells were used. The filter diffusion test was applied in accordance with ISO standards. At the end of the 24th and 72nd hours; after TAS and TOS biochemical analysis, gene expression levels were measured by qRT-PCR method (n=3). Kruskal Wallis Variance Analysis and Mann-Whitney U test were used for independent group comparisons between the measurements.

Results: During the initial 24 hours, we observed that only the ProRoot® MTA group had a high antioxidative defensive mechanism. We determined that the antioxidative defense level had been increased in all groups with the highest value in Biodentine™, Pulpine Mineral groups while the lowest antioxidative defense level seen in ZnOEU group in between the 24-72nd hours ($p < 0.05$). TGF β1, BMP-2 and ALP gene expressions were found to be more frequent in Biodentine™ and Endo Repair materials in relative to the other materials. ($p < 0.05$). It was observed that Bcl-2 gene expression levels decreased in all materials at the end of 72nd hours. Endo Repair and ProRoot® MTA groups performed overexpression in comparison to the control group after 72 hours ($p < 0.05$).

Conclusion: According to the TAS and TOS values, it was determined that all materials have an oxidative effect on pulp and act antioxidant defense mechanism. We also found that Biodentine™ and Endo Repair groups had good bioactivity as well as the biocompatibility.

Keywords: Alkaline Phosphatase, B cell lymphoma-2 gene, Biodentine, Bone Morphogenetic Protein-2, Calcium Phosphate, Cell Culture, Mineral Trioxide Aggregate, Oxidative Stress, Propolis, Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status, Transforming Growth Factor Beta-1, Zinc Oxide Eugenol.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS⁺	: 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline)
ALP	: Alkalen Fosfataz
Ark	: Arkadaşları
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
Bcl	: B hücreli lenfosit
BF	: Büyüme Faktörü
BHK-21	: Hamster böbrek fibroblastları hücre kültürü
BMP	: Kemik Morfogenetik Büyüme Faktörü
BrDU-LI	: Hücre Proliferasyon Oranı
BSP	: Kemik Sialoproteini
°C	: Santigrat Derece
Ca(OH)₂	: Kalsiyum Hidroksit
cDna	: Komplementer DNA
CEM	: Kalsiyumla Güçlendirilmiş Siman
Cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
CSCR	: Rezin İçerikli Kalsiyum Silikat Siman
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSP	: Dentin Sialoproteini
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EquiV./L	: Equivalent/ Litre
FAS/ TRAIL-R	: Apoptozisle ilişkili ölüm reseptörleri

FBS	: Fetal Sığır Serumu
FITC/PI	: Apoptotik Hücre Oranı
hDPCS	: İnsan Dental Pulpa Kök Hücresi
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
hMW-MSCs	: İnsan Kemik Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreleri
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Ig	: İmmüoglobulin
IL	: İnterlökin
ISO	: Uluslararası Standartlar Örgütü
g	: Yer Çekim İvmesi
gr	: Gram
M	: Molarite
max	: Maksimum
MDPC	: Fare Odontoblast Hücreleri
MHC	: Major Histocompatibility Complex
Min	: Minimum
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MPP	: Matriks Metalloproteinaz
µm	: mikronmetre
µL	: Mikrolitre
MTA	: Mineral Trioksit Agregat

MTT	: [3-(4,5DimetilTiazol-2)-2,5 DifenilTetrazolyum Bromit]
NAC	: N-Asetilsistein
Nb₂O₅	: Niobiyum Oksit
OCN	: Siyanat iyonu
OCP	: Oktakalsiyum Fosfat
OP	: Osteopontin
ort	: Ortalama
PDL	: Periodontal Ligament
PDLSC	: Periodontal Ligament Kök Hücreleri
pH	: Hidrojen gücü
PRP	: Plateletten Zengin Plazma
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
®	: Tescilli
RNA	: Ribonükleik asit
ROM	: Reaktif Oksijen Metabolitleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RUNX/MSX	: Osteojenik belirteçler
Saos	: İnsan osteoblastik hücreleri
SCAP	: Apikal Papilladan Elde Edilen Kök Hücreler
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	: Standart Hata
SHED	: Süt Dişi Pulpası Kök Hücreleri
SMAD	: Caernohabdit Elegan proteinleri içeren Drosophila protein homologları
Sn	: Saniye

SS	: Standart Sapma
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TAK	: Toplam Antioksidan Kapasite
TAS	: Toplam Antioksidan Seviyesi
TBARS	: Tiobarbütirik Asit
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TM	: Ticari Marka
TNF	: Tümör Nekrotize Edici Faktör
TOD	: Toplam Oksidan Durum
TOS	: Toplam Oksidan Seviyesi
TP	: Toplam Peroksit
VEGF	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
ZnO_{Eu}	: Çinko Oksit Öjenol
ZrO₂	: Zirkonyum Oksit
(+)	: 24. saate kıyasla 72 saat sonundaki istatistiksel anlamlı artma
(-)	: 24. saate kıyasla 72 saat sonundaki istatistiksel anlamlı azalma

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Beckman Coulter, Allegra X-30R Santrifüj Cihazı.....	34
Şekil 3.2. Leica İverted Mikroskop	35
Şekil 3.3. Hücrelerin üretim kabı tabanını konfluensinin tespiti	35
Şekil 3.4. CO ₂ İnkübatörü	35
Şekil 3.5. 24'lük Well Plate	36
Şekil 3.6. ProRoot® MTA	38
Şekil 3.7. Biodentine™	38
Şekil 3.8. Pulpine Mineral	38
Şekil 3.9. Endo Repair	39
Şekil 3.10. Çinko Oksit Öjenol (ZnOEu)	39
Şekil 3.11. İnsert membranlar	39
Şekil 3.12. Materyallerin hazırlanışı.....	40
Şekil 3.13. İnsert membrana yerleştirilmiş materyallerin steril kabin içerisinde UV ışınına maruz bırakılmaları	40
Şekil 3.14. TAS ve TOS Analiz Ticari Kitleri	43
Şekil 3.15. Qiagen RNeasy Mini Kit	45
Şekil 3.16. Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	45
Şekil 3.17. qRT-PCR cihazı	45
Şekil 3.18. Fast Start Essential DNA Probes Master kiti	46
Şekil 4.1. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri	48
Şekil 4.2. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri	50

Şekil 4.3. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TGF- β 1 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri	53
Şekil 4.4. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki BMP-2 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri	55
Şekil 4.5. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki ALP gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri	57
Şekil 4.6. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki Bcl-2 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri	59



TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Propolis çeşitlerinin komponentleri ve biyolojik etkileri	27
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan pulpa kaplama materyallerinin içerik ve üretici firmaları.....	37
Tablo 4.1. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri.....	47
Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’	48
Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’	49
Tablo 4.4. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı TAS değerlerinin Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p’ değerleri.....	49
Tablo 4.5. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri.....	50
Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’	51
Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’	51
Tablo 4.8. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı TOS değerlerinin Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p değerleri’	52
Tablo 4.9. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TGF- β 1 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri	52

Tablo 4.10. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	53
Tablo 4.11. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	54
Tablo 4.12. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki BMP-2 ortalama ve standart sapma değerleri	55
Tablo 4.13. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	56
Tablo 4.14. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	56
Tablo 4.15. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki ALP gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri...	57
Tablo 4.16. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	58
Tablo 4.17. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	58
Tablo 4.18. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki Bcl-2 ortalama ve standart sapma değerleri	59
Tablo 4.19. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	60
Tablo 4.20. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'	60
Tablo 4.21. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı gen ekspresyon değerlerinin Mann - Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen 'p değerleri' ...	61

1. GİRİŞ

Diş hekimliği alanına her geçen gün farklı özelliklere sahip birçok yeni materyal dahil edilmektedir. Teknolojideki gelişmelere rağmen biyouyumlu, yüksek antimikrobiyal ve mekanik özelliklere sahip biyomateryal gereksinimi halen devam etmektedir.¹ Restoratif materyallerin pulpanın canlılığını devam ettirebilmesi için toksik olmaması ve aynı zamanda doku üzerinde iyileştirici potansiyele sahip olması büyük önem taşımaktadır.

Çocuklarda oluşan dental ve orofasiyal problemlerle mücadele etmek amacıyla ortaya çıkmış olan çocuk diş hekimliğinde de; önleyici, koruyucu, restoratif ve endodontik amaçlar başta olmak üzere farklı amaçlarla, çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Bu materyallerin doğrudan veya dolaylı olarak canlı doku ile temas halinde olmaları dolayısıyla biyouyumlu olmaları gerekmektedir. Restoratif materyallerin biyouyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda çeşitli test yöntemleri bulunmakla birlikte yaygın olarak hayvan deneyleri ve hücre kültürü testleri kullanılmaktadır.² Hücre kültürü test yöntemleri daha iyi standardize edilebilir ve tekrarlanabilir özellikte olmalarının yanında hayvan deneylerine kıyasla uygulanmaları kolay, daha az zaman alan ve ekonomik testler oldukları için tercih edilmektedir.^{3,4}

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için Uluslararası Standartlar Organizasyonu [International Organization for Standardization (ISO)] tarafından birtakım kriterler belirlenmiştir. ISO standartlarında in vitro sitotoksosite değerlendirmeleri için önerilen test metotları; direkt hücre kültürü (direkt temas testi ve ekstrakt testi), bariyer test metodu, agar difüzyon testi ve milipor filtre difüzyon testidir.^{1,2} Diş hekimliğinde kullanılan materyaller için farklı temas yöntemleriyle yürütülmüş toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Farklı temas şekillerinin sitotoksosite

sonuçları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya göre direkt temas ve indirekt testler arasında iyi bir ilişki bulunmuş, en az hassasiyeti ise ekstrat testi göstermiştir.⁵⁻⁷

Aerobik organizmaların oksijen kullanımından sonra yaklaşık %1-2 oranında, serbest radikaller şeklinde reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir.⁸ Serbest radikal üretimi, antioksidan savunma mekanizması tarafından baskılanmaktadır. Bu durum gerçekleşmediğinde meydana gelen oksidatif stres biyomoleküllere çeşitli mekanizmalar yoluyla hasar vermektedir.⁹ Oksidatif stres, son yıllarda toksisitenin olası bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.¹⁰ Biyolojik sıvılardaki toplam antioksidan seviyesi (TAS) değerlerinin ölçülmesinin kolay, hızlı uygulanan ve çok sayıdaki örnek değerlerinin birlikte analiz edilmesine imkân sağladığı belirtilmiştir.¹¹

Çocuk diş hekimliğinde çeşitli amaçlarla kullanılan materyallerin sitotoksik özellikleri ile ilgili olarak ulaşılabilen verilerin sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.¹² Bu nedenle çalışmamızda çocukların dental işlemleri içerisinde yaygın şekilde yer bulan vital pulpa tedavilerinde direkt veya indirekt pulpa kaplaması amacıyla kullanılan bazı materyallerin (ProRoot® MTA, Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair ve ZnOEU) insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSC) üzerinde zamanla meydana getirdikleri sitotoksik etkilerinin, in vitro milipor filtre difüzyon yöntemi kullanılarak Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) analizi değerleri incelenerek ortaya konulması amaçlanmıştır.

Pulpa dokusunun periferik olarak dentin matriksi ile doğrudan temas halinde düzenlenmiş olan odontoblast adı verilen özel hücrelerden oluşan mezenkimal orijinli yumuşak bir doku olması ve vital pulpa tedavilerinin amacının, pulpa – dentin kompleksinin canlılığının korunması olması dolayısıyla dental materyallerin toksik etkilerinin yanı sıra enflamasyonu sınırlandırma ve tersiyer dentinogenezis mekanizmasını indüklemeye yetenekleri ile doku üzerindeki biyoaktivitelerinin

değerlendirilmesi de son derece önemlidir.¹³ Bu nedenle çalışmamızda, materyallerin uygulanmasıyla pulpadaki TGF- β 1, BMP-2, ALP ve Bcl-2 biyobelirteçlerini ifade eden genlerdeki gen ekspresyonları Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polimerase Chain Reaction, qRT-PCR) yöntemi ile değerlendirilerek kalsifikasyon, mineral depozisyonu, odontoblast benzeri hücrelerin diferansiyasyonu, tamir sürecindeki etkinlik ve apoptozisin önlenmesi özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda test edilen H0 hipotezleri şu şekilde kurulmuştur: (1) Kullanılan materyallerin 24. ve 72. saatlerdeki antioksidan - oksidan seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır; (2) kullanılan materyallerin 24. ve 72. saatlerdeki gen ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Dokuları

Gastrointestinal sistemin başlangıcında büyük öneme sahip olan, kron ve kök olmak üzere iki kısımdan oluşan diş organının ağız içerisinde görünen bölümünü ifade eden kron kısmını vücuttaki en mineralize doku olan mine dokusu örtmektedir. Sadece kron bölümünde bulunan mine dokusu, ameloblast hücrelerinin salgıladığı organik matriksin kalsifikasyonu sonucu üretilmektedir.¹⁴⁻¹⁷ Hem kronunda hem de kökte bulunan ve diş yapısının sert dokuları içerisinde hacimce en büyük kısmını oluşturan dentin dokusu ise odontoblast hücrelerinin salgıladığı kollajenden zengin organik matriksin kalsifikasyonu ile oluşmaktadır. Dentin dokusunun asıl görevi, pulpa dokusu için koruma ve mine dokusu için ise destek sağlamaktır. Sadece kök kısmında yer alan sement dokusu ise, diş organının diğer kalsifiye dokusudur ve mine ile dentinden daha az mineral içermektedir.^{16, 17}

Ektomezankim hücreleri veya nöral krest hücreleri tarafından üretilen pulpa dokusu ise gevşek bağ dokusudur.¹⁷ Dentini oluşturan odontoblast hücrelerinin gövdeleri pulpa içerisinde bulunmakta iken sitoplazmik uzantıları ise dentin tübülleri içine uzanmaktadır. Yapı ve kompozisyonlarındaki farklılıklara rağmen birbirleriyle çok yakın ilişkide bulunmaları; birinde oluşan fizyolojik ve patolojik reaksiyonların diğerini de etkilemesi sebebiyle pulpa ve dentin dokularını birlikte ele almak son derece önemlidir ve pulpa - dentin kompleksi adı altında incelenmeleri doğru bir yaklaşımdır.^{15, 16, 18, 19}

2.1.1. Dentin Dokusu

Pulpa - dentin kompleksinin sert doku fragmanını oluşturan dentin dokusunu ağırlıkça yaklaşık %70 oranında inorganik maddeler, %20 oranında organik matriks,

%10 oranında ise su oluşturmaktadır. İnorganik bölümün en önemli komponentini $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ formülüne sahip olan hidroksiapatit meydana getirmektedir. Organik matriksin ise %90 oranındaki büyük bölümünü kollajen¹⁶, geri kalan %10 oranındaki bölümünü ise glikoproteinler, fosfoproteinler, proteoglikanlar, büyüme faktörleri ve yağlar meydana getirmektedir.^{20, 21} Dentin dokusu, morfolojik yapı ve histolojik özelliği bakımından süt ve sürekli dişler için benzer olmakla beraber süt dişlerinde prenatal ve postnatal olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Prenatal dentinin yoğun ve homojen yapısına karşılık postnatal dentinin daha az yoğun ve daha poröz bir yapısının olduğu belirtilmektedir.^{16, 20}

2.1.1.1. Primer Dentin

Dişin gelişimi sırasında oluşmaya başlayan dentin tipi olan primer dentinin büyük bölümü diş sürmeden önce oluşmaktadır.¹⁹ İlk oluşan dentin, manto dentini olarak tanımlanmaktadır. Primer dentin tabakasının en üstünde, konumuna göre mine veya sement tabakasının hemen altında yer alan manto dentininin kalınlığı ancak 150 µm kadardır. Altında kalan dentine göre daha az mineralizedir.^{16, 20} Odontoblast hücrelerinin primer dentini oluşturmalarının ardından dişin sürmesi sonrasında da dentin yapımına daha yavaş şekilde devam etmeleri sırasında dentin içine uzantılarını bırakmaları sonucunda dentin tübülleri oluşmaktadır. Dentin dokusunun canlı bir doku olduğunun göstergelerinden biri de odontoblast uzantılarının dentin tübüllerinin içinde bulunmasıdır.²⁰

2.1.1.2. İnterglobüler Dentin

Primer dentinin manto dentine yakın bölgelerinde bulunan; dentin oluşumu sırasında, vitamin D eksikliği veya florür iyonunun fazla alınması gibi faktörlere bağlı olarak mineralize olmamış veya daha az mineralize dentin alanları ise interglobüler

dentin alanlarıdır. Hipomineralizasyonun nedeni mineralizasyon esnasında kalsifiye olmuş küresel alanların olgun dentin içinde tam olarak birleşmemesidir.²²

2.1.1.3. Preentin

Mineralize olmamış organik matriksin odontoblast tabakası ve mineralize dentin arasında bulunan bölümü, preentin adını almaktadır. Özellikle tip I ve tip II primer kollajenden oluşan makromoleküler yapısının yanı sıra glikoproteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve dentin fosfoproteininden meydana gelen^{21, 23} preentin tabakası, süt dişlerinin koronal bölgesinden kökün orta üçlüsüne doğru azalım göstermekte ve apikal bölgede kaybolmaktadır.²⁴

2.1.1.4. Sekonder Dentin

Kök gelişiminin tamamlanmasından sonra oluşan dentin ise sekonder dentin olarak tanımlanmaktadır.¹⁶ Embriyonik dönemde primer dentinogenezis sırasında gerçekleşen olaylar dizisi, olgun diş için pulpadaki tamir mekanizmalarının başlamasını sağlayan sekonder dentinogenezis şeklinde tekrar gerçekleşmektedir.²⁵ Aynı odontoblast hücreleri tarafından oluşturulmaları nedeniyle primer dentin tabakasına kıyasla daha düzensiz olsa bile sekonder dentin tabakasının da tübüler yapının devamlılık gösterdiği görülmektedir. Kök oluşumunun tamamlanmasının ardından dişin fonksiyonel olmasını sağlamak amacıyla odontoblastların primer dentinin pulpal tarafında üretimine devam ettiği sekonder dentini primer dentinden ayıran en önemli farklılık, daha yavaş bir hızda salgılanmasıdır.¹⁷

2.1.1.5. Tersiyer Dentin

Pulpanın mikrobiyal, mekanik, termal, veya kimyasal faktörler tarafından hasarlanması; çeşitli inflamatuvar cevapları aktive eden kompleks vasküler, lenfatik ve lokal doku reaksiyonlarını tetiklemektedir.²⁶ Dişin çürük, restoratif işlemler, kimyasallar ve travma gibi değişik uyaranlara cevap olarak yaşamı boyunca şekillenmeye devam

eden dentin matriksine ise tersiyer dentin adı verilmektedir. Tersiyer dentin; irregüler sekonder dentin, irritasyon dentini, reaksiyoner dentin ya da reperatif dentin olarak da ifade edilmektedir.^{16, 25}

Çevresel uyarana cevap olarak pulpa - dentin ara yüzeyinde depolanan bir dentin matriksi tabakası olarak tanımlanan tersiyer dentinin oluşmasına neden olan stimulus nispeten ılımlı derecedeysen, etkilenen fakat yaşamaya devam eden odontoblastların dentin matriksi sekresyonu ve depolanma hızında bir artış meydana gelmektedir. Bu şekilde uyarana bir cevap olarak, varlığını sürdüren post - mitotik odontoblast hücreleri tarafından salgılanan tersiyer dentin matriksine reaksiyoner dentin adı verilmektedir.²⁷

Primer dentin ve fizyolojik sekonder dentin sekresyonundan sorumlu olan orjinal post - mitotik odontoblastların ölümüne neden olacak kadar daha kuvvetli bir uyarın varlığında ise, pulpa - dentin kompleksindeki şartlar elverişli olduğunda odontoblast benzeri hücreler tarafından salgılanan tersiyer dentin matriksine reperatif dentin adı verilmektedir.²⁷⁻²⁹

Primer ve sekonder dentinden farklı olarak tersiyer dentin, sadece dış uyarılardan etkilenen bölgelere yakın pulpal yüzeylerde, sekonder odontoblastlar yani odontoblast benzeri hücreler tarafından üretilmektedir. Bu dentinin özellikleri ve miktarı, meydana gelen odontoblast cevabı ile orantılıdır. Bu cevabı uyarının yoğunluğu, şiddeti ve süresi belirlemektedir. Tersiyer dentin pulpayı koruma amaçlıdır. Düzensiz ve az sayıda dentin kanallarına sahiptir.^{30, 31}

2.1.1.6. Dentin Tübülleri

Derin dentinin hacimce %30'unu, yüzeyel dentinin ise %1'ini oluşturan ve materyallerin dentine geçişini üstlenen major kanallar dentin tübülleri olarak adlandırılmaktadır. Mine - dentin ve sement - dentin birleşiminden pulpaya kadar bütün dentin boyunca uzanmaktadırlar. Dış dentin, merkezi dentin ve pulpal dentinde mm²'de

sırasıyla 15000, 25000 ve 55000 tübül bulunmaktadır. Dentin tübüllerinin çapı; mine dentin sınırında 0,6-0,8 µm, dentinin orta bölgesinde 1,2 µm ve pulpal kısımda ise yaklaşık 2,5 µm'dir.³² Dentin tübüllerinin her birinin içinde bir odontoblast uzantısı ve dentin lenfi adı verilen sıvı bulunmaktadır. Dentin lenfi albumin, immunglobulin G (IgG), transferin, tenascin ve proteoglikan gibi kompleks protein karışımlarını içermektedir.^{22, 30, 33} Ayrıca, sinir lifleri ve mineralize olmamış kollajen lifler de bulunabilmektedir.³⁴ Pulpaya yaklaştıkça çapları genişleyen tübüllerin içindeki dentin lenfinin odontoblastlardan dışarıya doğru yaptığı ve odontoblastların mekanoreseptör gibi davrandığını gösteren hareket, dentin duyarlılığının birincil etkenidir.³⁵

2.1.1.7. Sirkumpulpal Dentin

Sirkumpulpal dentin, dentin tübüllerini çevrelemesi dolayısıyla pulpaya doğru sıklığı artan, nispeten daha hipermineralize olan peritübüler ve intratübüler dentin tiplerinden oluşan dentin grubudur.^{31, 36}

2.1.1.8. İntertübüler Dentin

İntertübüler dentin, dentin tübülleri arasında kalan ve dentine gerilme kuvveti sağlayan, iyi mineralize dentin tipidir. Yapısında; fosfoprotein, proteoglikan, -karboksiglutamat içeren proteinler, glikoproteinler ve bazı plazma proteinleri bulunmaktadır. İntertübüler dentin, predentin bölgesinde dentin alanının yaklaşık %12'sini, mine-dentin sınırında ise %96'sını kaplamaktadır. Dentinde birim hacme düşen kollajen miktarı mine - dentin sınırından pulpaya doğru azalmaktadır.^{22, 37}

2.1.2. Pulpa Dokusu

Pulpa - dentin kompleksinin yumuşak doku fragmanını oluşturan ve dişin apikal bölgesine kadar uzanan dental pulpa dokusu; hücreler, lifler, kan damarları ve sinir ağları içermekte olan, rijit mineralize dokuyla çevrelenmiş, oldukça küçük hacimli (~10–100 µl) ve yüksek derecede özelleşmiş bir mezenşimal dokudur.^{22, 38, 39}

Pulpanın yapısına ve işleyişine bakıldığında, görevinin embriyonel hayatta dentin sentezlemek, post-erüptif safhada da daha uzun zaman iş görebilmesi için çeşitli nedenlerle hasar gören dentinin fizyolojik ve biyolojik vitalitesini hassas bir alarm sistemi olan ağrı mekanizması sayesinde korumak olduğu görülmektedir.³⁹

Pulpa, içerdığı kompleks yapı ile bir takım görevlerde rol almaktadır.²⁵ Bunlar;

Nutritif fonksiyon: Kapiller ağ aracılığı ile pulpa - dentin bütününün beslenmesini sağlamaktadır.

Defansif fonksiyon: Odontoblastların yaralanmasıyla pulpa - dentin kompleksi savunmaya geçmektedir.

Sinirsel fonksiyon: Pulpanın duyu sinirleri, Nervus Trigemini'nin (V. kafa çifti) maksiller ve mandibuler kollarının dallanmalarıdır. Motor sinirler, otonom sinir sisteminin sempatik bölümünden gelmektedir.

Formatif fonksiyon: Bu fonksiyon sayesinde diş canlı kaldığı sürece dentin oluşturarak, aşınma ve çürük nedeni ile pulpanın açılmasını önleyerek aynı zamanda savunma fonksiyonunu desteklemektedir.²⁵

2.1.2.1. Pulpa Tabakaları

Pulpa dokusu periferden merkeze doğru odontoblastik tabaka, hücreden fakir tabaka, hücreden zengin tabaka ve santral pulpa tabakası olmak üzere dört tabakadan meydana gelmektedir.

Odontoblastik Tabaka: En dış bölümde yer alan ve preentinle komşuluk gösteren odontoblastik tabakada sinir lifleri, odontoblast hücre gövdeleri ve hücreler arasında terminal kapiller bulunmaktadır.^{16,24} Kollajen sentezleyerek mineralize olabilen dentin matrisi meydana getirmelerinin^{20,40} yanı sıra dentin sialoproteini, proteoglikan, ve fosforin sentezlemektedirler.^{16,20,21} Dentine özgü olan fosforin diğer mezenşimal hücrelerde bulunmamaktadır.⁴¹ Odontoblastlar ayrıca dentinogenezisde rol oynayan

alkalen fosfataz ve predentin matriksi tarafından resorbe edilen materyallerin parçalanmasında görev aldığı bilinen asit fosfataz enzimlerini salgılamaktadır.¹⁹

Hücreden Fakir Tabaka: Odontoblastik tabakanın altında bulunan yaklaşık olarak 40 µm genişliğindeki hücreden fakir tabaka, Weil Zonu ya da Subodontoblastik Tabaka olarak da adlandırılmaktadır. Bu bölümde, miyelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır.^{19,42} Bu tabakada yer alan duyuşal sinirlerin spesifik ağrı reseptörleri odontoblastik tabakanın içerisine girmekte ve %10 -20'si dentin tübülleri içine kadar uzanabilmektedirler.¹⁶ Hücreden fakir tabaka, pulpanın fonksiyonel durumuna bağılı şekilde varlık göstermektedir. Hızlı dentin üreten genç pulpa dokusunda ve reparatif dentin üretimi görülen yaşlı pulpa dokusunda görülmemektedir.¹⁹ Süt dişi pulpa dokusunda da varlığından bahsedilmemektedir.²⁴

Hücreden Zengin Tabaka: Sürme esnasında pulpanın merkezindeki hücrelerin periferine doğru hareket etmesi sonucunda oluşan tabakada çok sayıda fibroblast hücresi, makrofaj, lenfosit, dendritik hücre ve farklılaşmamış mezenşimal hücre bulunmaktadır. Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerinin görevi hasarlanan odontoblastların yerine,¹⁹ odontoblast benzeri hücrelerin⁴³ oluşmasını sağlamaktır.

Santral Pulpa Tabakası: Pulpa özü olarak da ifade edilen en iç tabakada büyük kan damarları ve sinir lifleri ve pleksuslar bulunmaktadır. Pulpa dokusunda proprioseptif sinir lifleri bulunmamaktadır.¹⁹ Myelinli A- lifi ve miyelinsiz C- lifi olmak üzere iki tip somatik afferent sinir lifi ağrı impulsu taşımaktadır. Daha seyrek olarak sempatik sinir sisteminden gelen miyelinsiz sinir lifleri bulunmaktadır. Kan damarlarının üzerinde sonlanan sinir uçları sayesinde kan akımının düzenlenmesinde vasomotor kontrol yapılmaktadır.⁴⁴

2.1.2.2. Pulpanın Hücresel Komponentleri

Pulpanın hücresel komponentini oluşturan elemanlar; odontoblastlar, fibroblastlar ve immunokomponent hücre grubundaki makrofajlar, dentritik hücreler, polimorf nüveli lökositler, mast hücreleri, indiferansiye mezenşim hücreleridir.¹⁶

Odontoblastlar: Dişlerin gelişimi sırasındaki ve sonrasındaki dentin formasyonundan sorumlu olması bakımından pulpa - dentin kompleksindeki en önemli hücresel elemandır. Pulpanın en dış bölümünde tek sıra halinde dizilim gösteren odontoblastlar, gevşek bağ dokusu karakterindeki pulpanın predentinle arasındaki sınırı oluşturmaktadır. Koronal pulpada uzun ve silindir şeklinde olan bu hücreler özellikle pulpa boynuzlarında çok sayıda olmaları nedeniyle yalancı çok katlı bir görünüm almaktadır. Odontoblastların boyları birbirinden farklı olup çekirdekleri farklı seviyelerde bulunmaktadır. Genellikle kök pulpasının orta üçlüsünde kübik görünüm kazanmakta, kökte krona kıyasla daha geniş alana yayılmış olmaları ve birim alanda daha az sayıdaki tübül sayısı nedeniyle apikal açıklığa doğru giderek yassılaşılmaktadır.²²

Hücrelerin arasında yaklaşık olarak 30 µm ile 40 µm büyüklüğünde boşluklar ve komşu odontoblastlar ile özel bağlantı oluşumları bulunmaktadır. Bu oluşumlar; desmozomlar, geçirgen bağlantılar (gap junction) ve sıkı bağlantılardır (tight junction). Kök gelişiminin tamamlanması sonrası odontoblastların boyları kısalmakta ve organelleri sayıca azalma göstermektedir.⁴⁵

Ayrıca odontoblastlar, prolifer olma yeteneği sınırlı olan post mitotik nöral kret kökenli oldukça özelleşmiş hücrelerdir.^{39,46} Dentin dokusunun organik matriksi için gerekli olan kollajen ve proteoglikanların ayrıca kemik sialoproteini, dentin sialoproteini, dentin fosfoproteini, dentin sialofosfoproteini, dentin matriks proteini-1, fosforin, osteokalsin, osteonektin, osteopontin gibi dentin biyobelirteçleri olarak bilinen nonkollajenöz proteinlerin üretilmesinde görev almaktadır.³⁹

Dışın reperatif özelliği, yüzeysel çürük lezyonlarının odontoblastik hücrelerin sekretuar aktivitesini arttıracak şekilde stimule etmesi olarak ortaya çıkmaktadır.⁴⁷ Eğer uygun şartlar oluşursa odontoblastlar, primer ve sekonder dentine göre mineralizasyon açısından daha az organize olmuş reaksiyoner tersiyer dentini oluşturur.³⁸ Oluşan bu yeni dentin, pulpayı bakteri ve bakteri ürünlerine karşı korumaktadır.

Fibroblastlar: Pulpa dokusunda en fazla bulunan hücre tipi fibroblastlardır. Pulpanın predominant hücre tipi grubu olan fibroblastlar, jelatin yapısındaki interselüler matriksin yapımından sorumludur.³⁹ Tip I ve tip III kollajenin yanı sıra proteoglikan, fibronektin ve glikozaminglikan sentezlemektedir. Böylece ekstraselüler matriks proteinleri üretilmektedir. Fibroblastlar aynı zamanda pulpadaki kollajen yıkımından da sorumludur. Genç fibroblastların odontoblastlara farklılaşabilme yeteneği nedeniyle de pulpanın vitalitesi fibroblastların sağlıklı olmasıyla ilişkilidir. Bu nedenle fibroblast sayısındaki azalmayla pulpadaki kollajen liflerin artışı birbiriyle paralellik göstermektedir. Fibroblastların pulpa boyunca yayılım gösterdikleri ve özellikle subodontoblastik tabakanın altındaki hücreden zengin tabakada buldukları görülmektedir.³⁹ Farklılaşan fibroblastlar poligonal şekillidir ve ekstraselüler matriks içerisinde eşit dağılım göstermektedir.²⁶

Makrofajlar: Monosit ve lenfositlerden farklılaşarak kan dolaşımı ile pulpaya katılan^{16,48} makrofajlar, dokulara girip histiyositlere dönüşüm göstermektedir. Çoğunlukla kan damarlarının yakınında bulunan makrofajların büyük bölümü aktif olarak fagositoz ve endositoz yapmaktadır. Fagosite ettiklerinin parçalanmasını lizozomal enzimler ile gerçekleştirmektedir.¹⁹ Fagositoz dışında yüzeyleindeki MHC (Major Histocompatibility Complex) sınıf II molekülü ile antijen tanıma ve T lenfositlerin hafıza hücrelerine antijen sunma görevi üstlenebilmektedir.^{25,49} Makrofajlar, enflamatuarlarla aktive edildiklerinde IL-1 (İnterlökin-1), TNF (Tümör

Nekrotize Edici Faktör), bazı sitokinler, büyüme faktörleri gibi enflamasyon sürecindeki oluşumları da sentezleyebilmektedir.¹⁹ Aktif yaşam süreleri bir hafta kadardır.^{16,48}

Dentritik Hücreler: Antijen sunan hücreler olarak tanımlanan dentritik hücreler,²⁰ özellikle lenfoid dokular olmak üzere tüm bağ dokularına dağılım göstermektedir. İsimlerini aldıkları dendritik sitoplazmik uzantıları ve hücre membranları üzerindeki antijen tanıyıcı MHC sınıf II molekülleri ile varlık göstermektedir. Odontoblast tabakasının yakınında veya pulpanın orta kısımlarında bulunabildikleri gibi sitoplazmik uzantıları dentin tübüllerinin içine girebilmektedir.⁵⁰ Pulpada inflamasyon varlığında artmaktadır.⁵¹ Makrofajlara benzer şekilde protein antijenlerini fagosite edip parçalayarak MHC sınıf II reseptörleri sayesinde gerçekleştirdikleri antijen sunma görevleriyle T hücrelerinin indüklenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir.¹⁹

Lenfositler: Sağlıklı bir pulpanın, immün cevabı başlatması için gerekli olan makrofaj ve dendritik hücrelerin yanı sıra hücrel immünite bakımından T-lenfositlere sahip olması önem taşımaktadır.^{50,52}

B-lenfositler ve polimorf nüveli lökositler ise sağlıklı pulpada az sayıda bulunmaktadır.^{16,51,53}

Mast Hücreleri: Pulpada kronik enflamasyon varlığında bağ dokusu içerisinde küçük gruplar şeklinde ve özellikle kan damarları ile ilişkili olarak gözlemlenen mast hücreleri, sağlıklı pulpa dokusunda seyrek olarak bulunmaktadır.⁵⁰ Enflamasyondaki rolleri nedeniyle büyük önem taşıyan mast hücrelerinin granülleri heparin, histamin ve antikoagülan gibi çeşitli medyatörler içermektedir.¹⁹

İndiferansiye Mezenşim Hücreleri: Hücreden zengin tabaka ve santral pulpa tabakasındaki kapiller boyunca yaygın bulunan yıldız şeklindeki hücrelerin ışık mikroskobu altında fibroblastlardan ayrılması oldukça zordur. İhtiyaç duyulduğunda odontoblastlara, fibroblastlara, makrofajlara ve osteoklastlara farklılaşabilmektedir.

Yaşlanmış pulpada sayı ve aktivasyonlarının azalmasına bağlı olarak pulpanın tamir yeteneğinin de azaldığı öngörülmektedir.^{16,41}

2.2. İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri

Son zamanlarda önemle üzerinde durulan kök hücreler, kendi kendine yenilenebilme ve diferansiye olabilme özelliğine, çeşitli potens ve farklılaşma kapasitesine (plastisite) sahip diferansiye olmamış mezenşim hücreleridir.^{39,54} Farklılaşma yetilerine göre ‘totipotent’, ‘pluripotent’ ve ‘multipotent’ olarak sınıflandırılmaktadır.³⁹ Totipotent hücreler, limitsiz farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipi olan fertilize yumurta hücresi, organizmayı oluşturan tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşabilmektedir.^{55,56} Pluripotent hücreler, ektodermal (nöron, deri, saç vb.), mezodermal (kan, kas, kemik, kıkırdak vb.) ve endodermal (hepatositler, sindirim sistemi hücreleri vb.) kökenli olmak üzere, vücuttaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme yeteneğine sahip embriyonik hücrelerdir. Multipotent kök hücreler ise erişkin bireylerin dokularında mevcut olan ve tek germ yaprağına ait hücelere farklılaşabilen hücrelerdir.⁵⁶

Embriyonik kök hücrelerin plastisite özelliğinin erişkin kök hücrelerinden daha fazla olması, bu hücreleri daha önemli kılmaktadır.⁵⁷ Ancak, elde edilmeleri konusundaki etik tartışmaları⁵⁸ veya teratom oluşturma riskleri⁵⁹ nedeniyle araştırmacılar erişkin kök hücreler üzerinde durmaktadır.⁵⁶

Diş dokuları, ektodermal kaynaklı nöral kret hücreleri ile mezenşimal bileşenlerden köken almaktadır.^{60,61} Gelişim evresinde çok sayıda çeşitli kök hücre rol oynamaktadır. Bunlar; dental epiteliyal kök hücreler, dental pulpa kök hücreleri (DPSC), süt dişi pulpası kök hücreleri (SHED), apikal papilladan elde edilen kök hücreler (SCAP), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC) ve dental folikül progenitör hücreleridir.⁶²

Dental pulpa dokusundan elde edilmesinin kolay olarak tanımlanması ve etik sorun yaratmaması, elde edilen ekstraksiyonun yüksek proliferasyon yeteneği, yüksek plastisite yeteneği, biyomateryaller ile dokuların yeniden yapılandırılmasında kullanımlarının mümkün olması, uzun yaşam süreleri, güvenle dondurulup saklanabilmeleri (kriyoprezervasyon) gibi özellikleri ile multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerin tedavi amacıyla kullanımı açısından gerekli nitelikleri taşıdığını göstermektedir.^{56, 63-66}

2.3. Pulpa - Dentin Kompleksindeki Biyolojik Belirteçler

‘Biyolojik belirteç’ veya ‘biyobelirteç’ terimi, doğru ve tekrarlanabilir şekilde ölçülebilen ve normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik müdahaleye karşı farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak değerlendiren göstergeler olarak tanımlanmıştır.^{67,68} Hüresel düzeyde işlevsel, biyokimyasal veya moleküler etkileşimi olan yanıtlar olarak düşünülebilir. Teşhis ve tedavide yardımcı olması tıbbi alanda önemli bir araştırma konusu olarak gösterilmektedir.

Pulpa - dentin kompleksinde meydana gelen olayların araştırılmasında pulpanın çeşitli faktörlere karşı verdiği cevapların değerlendirilmesi üzerine yapılan araştırmalarda büyük önem taşımaktadırlar.²⁸ Birçok araştırmada çoğunluğunu biyolojik olarak aktif büyüme ve morfogenetik faktörlerinin oluşturduğu biyobelirteçlerin dentinogenezisi başlattığı; hücre büyümesini, diferansiyasyonunu ve fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir.⁶⁹⁻⁷⁹ Diş oluşumu ve gelişimi sırasındaki epitelyal - mezenşimal etkileşimler şeklindeki erken morfogenetik olayların yanı sıra mine ve dentin oluşumundan sırasıyla sorumlu olan ameloblast ve odontoblastların farklılaşması gibi geç dönem olaylarında da sorumlu oldukları gösterilmiştir.⁸⁰⁻⁸²

Gelişimin çan safhasında iç mine epiteli ve bazal membran, dental papillanın perifer hücrelerini odontoblastlara dönüşmek üzere uyarmaktadırlar. Büyüme – gelişim

aşamasındaki bu farklılaşmadaki belirteçlerin osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein (BSP), dentin sialoprotein (DSP), matriks metalloproteinaz (MPP), katepsin molekülleri ve özellikle Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF) ailesi olmak üzere büyüme faktörlerinin olduğu düşünülmektedir.^{81, 83} Dentin köprüsü oluşumunu sağlamak üzere odontoblast benzeri hücrelerin oluşması yönünden de benzer bir süreç gerektiği için tamir esnasında da önemli uyarıcı moleküller olmaları son derece olağan bulunmaktadır.⁸³⁻⁸⁷

TGF ailesinin sadece dentin matriksinde bulunan üyesi TGF- β 1'dir. Aynı zamanda sadece TGF- β 1'in dentin matriksinin proteoglikanlarıyla, decorin ve biglikanla etkileşebildiği diğer izoformların ise daha az etkileşebildikleri belirtilmektedir.⁸⁶

Dentin matriksinde bulunan büyüme faktörlerinin fonksiyonel aktivitelerinin oldukça fazla olduğu ifade edilmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi odontoblast benzeri hücrelerin farklılaşmasının yanı sıra migrasyon ve hücre proliferasyonunu da uyarabilmektedirler. Dentin matriksinde kan damarları ile ilişkili büyüme faktörlerinin varlığının tamir bölgelerinde yeni kapillerin oluşumu için önemli olabileceği düşünülmektedir. TGF- β 'lar, pulpadaki enflamatuar yanıtın azaltılması görevini de üstlenmektedirler.⁸⁸

Büyüme faktörlerinin dentin matriksinden dokuların hasarı veya klinik restoratif işlemlerin sonucu olarak salındığı belirtilmektedir. TGF- β 1 büyüme faktörünün kalsiyum hidroksit ile pulpa kaplanması sonrasında dentin köprüsü yapılmasının başlamasına katkı sağlamak amacıyla dentin matriksinden salınan bir materyal olduğu belirtilmektedir.²² Dental yaralanma bölgelerinde biyolojik olayların uyarılarını sağlayan anahtar yapılar olarak, reaksiyoner ve reperatif tersiyer dentinogenezis sürecinde dentin köprüsü oluşumunu sağlamak üzere tersiyer dentin matriksi sekresyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir.⁷²

TGF ailesine dahil olan Kemik Morfogenetik Protein'lerin (BMP) diş gelişiminde ve yaralanma sonrasındaki doku tamirinde görev aldıkları belirtilmektedir. Özellikle BMP-2, BMP-4 ve BMP-7 (OP-1) proteinleri tarafından osteodentin ve tübüler reparatif dentin üretiminin indüklendiği bildirilmiştir.^{73,89} Ekspoz olmamış pulpaya, TGF-β1 ve BMP-7 moleküllerinin doğrudan veya dentin bariyerinden uygulanmasının kültür ortamındaki diş kesitlerinde bu moleküllerin reaksiyoner dentin yapımını uyarıcı özelliklerini ortaya koyulmuştur. Çalışmalarda; TGF, BMP ve insülin benzeri büyüme faktörü moleküllerinin odontoblast benzeri hücre farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir.^{88,90,91}

BMP-2 sekresyonu, doğumdan yaklaşık 20 gün sonrasına kadar devam eden diş sitodiferansiyasyonu süresince postnatal odontoblastlar ve ameloblastlar tarafından meydana gelmektedir.⁹² Genç odontoblastlardaki BMP-2 geninin delesyonu, kökte daha fazla etkilenmenin söz konusu olduğu kron ve kök dentin miktarında azalmaya neden olmaktadır. Dolayısıyla mineralize olmayan düzensiz sahalarla karakterize defektif dentin formasyonu ve dismorfik dentin tübüleri görülmektedir. Odontoblastlardaki BMP-2'nin eksikliği sonucunda amelogenezisde de aksaklık problemi ortaya çıkmasına karşın mine kalitesinde büyük değişiklikler görülmemektedir. Yokluğunda damarlanmanın ve perisitlerin azalmasının da görülmesinin neticesinde BMP-2'nin dental pulpa gelişiminde de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.^{68,93}

Odontoblast benzeri hücrelerin diferansiyasyonunun göstergesi ve gelişimden ziyade özellikle tamir sürecinde adı geçmekte olan Alkalen Fosfataz (ALP) ise farklı dokulardaki kalsifikasyon ve erken mineral depozisyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, pulpa hücrelerinin yüksek düzeyde ALP aktivitesi sergilediğini göstermektedir. Pulpal yaralanma sonrası tamir ve iyileşmede önemli bir role sahiptir.⁶⁸

2.4. Pulpa - Dentin Kompleksinin Cevapları

Diğer bağ dokularında olduğu gibi dışarıdan gelen tüm etkileyici faktörlere karşı pulpa dokusu da inflamasyonla cevap vermektedir. İnflamasyon derecesi dokuda meydana gelen hasarın şiddeti ve yoğunluğuyla orantılıdır. Etkinin şiddeti ve süresi ile orantılı olarak pulpanın geçici bir inflamasyondan irreversibl sonuçlar ve total nekroza değişen sonuçlar ile karşılaştığı görülmektedir.⁹⁴

2.4.1. Pulpa - Dentin Kompleksinin Çürüğe Karşı Cevabı

Pulpanın çürük nedeniyle çeşitli şekillerde etkilenmesine neden olan birçok unsur bulunmaktadır. Dişin mineralizasyon kompozisyonu, bireyin tükürük kalitesi (tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, antibakteriyel niteliği), oral hijyen ve beslenme alışkanlıkları yanı sıra çürük lezyonunun, etkilerini gerçekleştireceği dentin dokusu ve tübüllerin durumu, karyojenik mikroorganizmaların tipi ve aktiviteleri gibi çeşitli faktörler pulpanın kendini savunma cevabı üzerinde etkili olmaktadır.⁹⁵ Bu durumun dentin tübüllerinin skleroze olarak geçirgenliğini azaltması, tersiyer dentinogenezisi indüklemesi, pulpanın enflamatuvar cevapları ile kendini savunma çabaları yanı sıra hiperemi, seröz pulpitis, ülseröz pulpitis, hiperplastik pulpitis, nekroz şeklindeki ileri derecedeki enflamasyon türleri ile sonuçlanabilmesi bu faktörlerin etkisiyle olmaktadır.^{96,97}

2.4.2. Pulpa - Dentin Kompleksinin Mekanik Etkenlere Karşı Cevabı

Yetişkinlere oranla küçük yaş grubunda daha fazla gözlemlenen sıklıkla okul veya ev kazaları sonucundaki travma hikayeleri, tırnak yeme gibi kötü alışkanlıklar veya hızlı ortodontik hareket, hızlı separasyon, pin yerleştirilmesi esnasında yaşanabilecek olumsuzluklar, odontoblastik uzantıların kesilmesi ile pulpanın dehidratasyonu ve odontoblastik nükleusların aspirasyonuna neden olabilecek şekilde kavite açılması gibi iatrojenik nedenlerden dolayı pulpa dokusu farklı derecelerdeki

mekanik etkilerle zedelenebilmektedir.^{35,98} Pulpa yüzeyindeki odontoblastik tabakanın dejenerasyonu ile birlikte periferdeki etkilenme yeterince şiddetli olduğunda pulpada hemoraji meydana gelebilmektedir. Etkilenme derecesine bağlı olarak daimi pulpa zedelenmeleri, kalsifikasyonlar ve nekrozlarla oldukça sık karşılaşılmaktadır.⁹⁹

Yüksek irtifadaki basınç değişikliklerinin semptomsuz kronik pulpitisli bir dişi ağrılı hale getirmesi veya idiyopatik ağrılarla karakterize çatlak diş sendromu durumları da mekanik etkenlerin yarattığı etkilerin göstergeleridir.

Atrizyon ve abrazyon gibi patolojik durumlarda da sekonder dentin hızlı bir şekilde depolanamadığında travmatik okluzyon periradiküler bölgede yer alan nörovasküler yapıdaki tekrarlayan irritasyonlar ile birlikte pulpada irreversible etkilenmeler oluşturmaktadır.¹⁰⁰

Bir diğer iatrojenik mekanik etki, kavite preparasyonu sırasında dentinin kesilmesi neticesinde meydana gelen çökeltme sonucunda hidroksiapatit kristalleri, denatüre kollagen artıkları, kan, mikroorganizma ve tükürük içerikli bir organik yapı olan smear tabakasının difüzyon bariyeri görevi üstlenerek ağız sıvılarının ve bakterilerin pulpaya difüzyonuna engel olması ve dentin tübüllerinin tıkanması dolayısıyla dentin geçirgenliğinin azalmasına neden olmasıdır.¹⁰¹

Preparasyon sonucunda açığa çıkan dentinde uzun dönemde gerçekleşen tersiyer dentin ve dentin sklerozu yanında meydana gelen pulpal enflamasyonda kapillerin permeabilitesindeki artışa bağlı olarak plazma proteinleri damar dışına geçiş göstermekte, zedelene pulpal damarlardan yüksek moleküler ağırlığa sahip plazma proteinleri dentin sıvısının dışı doğru hareketiyle dentin geçirgenliğini etkilemektedir.¹⁰²

2.4.3. Pulpa - Dentin Kompleksinin Termal Etkenlere Karşı Cevabı

Kavite preparasyonu sırasında dentin kanallarının kesilmesinin kesilen bölgenin altındaki pulpa yüzeyinin üzerindeki odontoblastik tabakanın dejenerasyonu belirtilmektedir. Hafif zedelenme durumu dentin kanalları altında tersiyer dentin oluşumuyla sonuçlanırken ileri derecede zedelenme pulpada kanama meydana gelmesiyle sonuçlanmaktadır. Pulpa zedelenmesi açısından hızın önemi 300 rpm ile başlamaktadır. En fazla odontoblastik hasar 50.000 rpm ile görülürken uygun soğutma kullanılması ile bu değer 150.000-200.000 rpm seviyelerine çıkarılabilmektedir.¹⁰³

Dentinin aşırı ısıtılması ya da yanması, odontoblastların yer değiştirmesine ve tübül içeriğinin bozulmasına neden olan en önemli etkenlerdir.¹⁰² Pulpanın dayanabildiği sıcaklık olan 46 santigrat derece geçildiğinde pulpada ciddi hasarlar görülmektedir.¹⁰³ Derin bir kavite preparasyonu sonucu ısı kaynağının pulpaya yaklaşması ile pulpada odontoblast sayısının azalması ve odontoblastların dentin tübüllerine aspirasyonunun gösterildiği çalışmalar da mevcuttur.¹⁰⁴

2.4.4. Pulpa - Dentin Kompleksinin Dental Materyallere Karşı Cevabı

İndirekt kuafaj ya da özellikle pulpayla irtibat halindeki direkt kuafaj restorasyonlarında kullanılan materyallerin akut olarak veya uzun süreçte sitotoksik etki göstermeleri, hipersensitivite reaksiyonlarını uyarmaları gibi sonuçlarla karşılaşılabilmektedir. Pulpada makrofaj ve dev hücrelerin rol aldığı yabancı cisim reaksiyonu şeklindeki kronik bir inflamatuvar stimulustan ziyade dental materyallerin pulpal cevabı diş ömrünün kalını için bir avantaj olarak kullanabilen ve tersiyer dentinogenezisi indükleyebilen şekilde seçilmeleri son derece önem taşımaktadır.¹⁰⁵

2.5. Pulpa - Dentin Kompleks Cevabının İndüklenmesi Amacıyla Pulpa Kaplaması İçin Kullanılan Dental Materyaller

2.5.1. Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksit, Ca(OH)_2 formasyonuna sahip, beyaz ve kokusuz bir maddedir. 1930 yılında Herman¹⁰⁶ tarafından pulpa kaplama ajanı olarak endodonti alanına girmiş olan ve genel olarak vital pulpa üzerine kaplama materyali olarak Mineral Trioksit Agregat'ın kullanım alanı bulmasına kadarki süreçte altın standart olarak kabul edilen materyal; apeksifikasyon, kök perforasyonlarının tamiri, internal ve eksternal rezorpsiyonların tedavisi ve kanal tedavilerinde ara seanslarda kanal içi medikament olarak da kullanım alanı bulmaktadır.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ 12,5-12,8 aralığındaki yüksek pH değerine sahip olup pat ya da toz/likit formlarında bulunabilen kalsiyum hidroksit, antimikrobiyal aktivitesini hem yüksek alkali özelliği, hem de ileri derecede reaktif bir serbest radikal olan hidroksil iyonunun salınımı ve bu iyonun çeşitli biyomoleküller ile reaksiyona girmesi sayesinde göstermektedir.¹¹⁰ Dentine yerleştirildiğinde koruyucu bir bariyer olarak dentin kanallarını bloke edip dentinin mineral yapısındaki çözünmeleri de engellemekte ve alkali pH sayesinde çürük asitlerini nötralize etmektedir.^{109, 110}

Kalsiyum hidroksit, dentin rejenerasyonunu uyarma kapasitesi olduğu bilinen ve kök pulpasının canlı kalmasını sağladığı belirtilen ilk amputasyon ajanıdır.¹⁰⁹ Yüksek pH değerinden dolayı ekspozite vital pulpa dokusunda 2 mm'lik bir yüzeysel nekroz alanı oluşturmaktadır. Bu tabakanın hafif şiddette bir enflamasyon cevabı sayesinde bölgede bakterilerin üremesi engellenmekte ve sert doku oluşumu uyarılmaktadır.^{107,111,112}

Kalsiyum hidroksitin alkali etkisi ani ve kısadır. Pulpa hücreleriyle yapılan in vitro çalışmalarda, hücre proliferasyonu üzerinde uzun süren negatif etkisinin olmadığı ve 24 saat sonunda hücre gelişimi için yeterli pH değerine ulaşıldığı öne sürülmüştür.^{113,114} Ayrıca İda ve ark. dentinle temas eden kalsiyum hidroksitin hemen

nötral pH'a döndüğünü saptamışlarsa da bazı araştırmacılar, kalsiyum hidroksitle bir araya gelen dentinin pH'sının 11-12'ye yükseldiğini gözlemlemişlerdir.¹¹⁵⁻¹¹⁷

2.5.2. Mineral Trioksit Agregat

Mineral Trioksit Agregat (MTA), dişhekimliği alanına 1993 yılında Loma Linda Üniversitesi'nde görev yapan Dr. Mahmoud Torabinejad tarafından lateral perforasyonların tamiri amacıyla üretilmesi ile sunulmuştur.¹¹⁸ Tip 1 Portland çimentosunun bir çeşidi olan MTA içeriğinde trikalsiyum oksit, silikat oksit, bizmut oksit, trikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, tetrakalsiyum alimunoferrit gibi hidrofilik partiküller bulunmaktadır.^{118,119}

MTA tozu, su ile karıştırıldığında yaklaşık 3 saatte sertleşen koloidal jel haline gelmektedir. Sertleşme reaksiyonunun başlangıcında pH 10,2 iken sertleşme reaksiyonu sonrasında yaklaşık olarak kalsiyum hidroksitin pH değeri olan 12,5 değerine yükselmektedir.¹¹⁹

Gri ve beyaz olmak üzere her iki çeşidi ağırlık olarak % 75'i Portland çimentosundan, % 20'si bizmut oksitten ve %5'i alçıdan meydana gelmektedir. Alçı, materyalin sertleşme zamanını düzenlerken yapıya eklenen bizmut oksit ise, radyoopasite sağlamaktadır. Beyaz ve gri MTA'nın içerik özellikleri birbirine benzemektedir, ancak renklesme problemini ortadan kaldırmak amacıyla 2002 yılında materyalin içinden tetrakalsiyum aluminoferrit çıkarılarak beyaz MTA geliştirilmiştir.¹²⁰

Toksisitesinin oldukça düşük olduğu bilinen materyalin yüksek antimikrobiyal özellikleri bulunmaktadır.^{120,121} Ek olarak sementogenezi indükleyip sementin ve periodontal ligamentin gelişimini hızlandırmakta ve kemik oluşumunu tetiklemektedir.

İnsan dokularıyla direkt temasa girdikten sonra kalsiyum hidroksit oluşturarak hücre tutunması ve çoğalması için kalsiyum iyonu salmaktadır. Aynı zamanda IL-4, IL-6 ve IL-8 gibi immunositokinlerin salınımını uyarmakta ve sert doku oluşturan

hücrelerin proliferasyon, diferansiyasyon ve migrasyonunu desteklemektedir.¹²² Biyoaktif dentin matriks proteini salgılayabilme yeteneği ile apikal veya koronalde dentin köprüsü oluşturabilme aktivitesinin kalsiyum hidroksite göre daha kısa zamanda ve daha yüzeysel bir nekroz yaratarak meydana geldiği belirtilmektedir.^{107,123-125}

2.5.3. Bioseramikler

MTA'nın uzun sertleşme zamanı, renklenme ve manipülasyonunun zor olması gibi dezavantajları olması nedeniyle geliştirilen materyallerin ilk sırasında Biodentin yer almaktadır.¹²⁶⁻¹²⁸ Yapısı MTA ile benzer olan Biodentin'in toz içeriğinde trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve radyoopasiteyi sağlamak için zirkonyum oksit bulunmaktadır. Likit fraksiyonu ise sertleşme zamanını azaltan kalsiyum klorit ve suda çözünebilen polimerden oluşmaktadır. MTA'nın 3-4 saatlik sertleşme zamanı ile karşılaştırıldığında 12 dakika ile biodentinin sertleşme zamanı oldukça kısadır. Aynı zamanda MTA'ya göre basınç altında yüksek direnç gösterdiği; örtücülük, biyouyumluluk ve antibakteriyel özelliklerinin daha üstün olduğu belirtilmektedir.¹²⁹ Biyolojik ve hayvan çalışmalarında biodentinin dental pulpa hücrelerinden TGF- β 1 salınımını indüklediği ve direkt pulpa kaplaması için uygun bir materyal olduğu gösterilmiştir.^{127,130, 131}

Biodentinde olduğu gibi kök kanalı dolusunda, perforasyon tamir materyali, vital pulpa tedavisi ve apeksifikasyon tedavilerinde kullanılabilen trikalsiyum silikat bazlı antibakteriyel özellikli bir diğer materyal Bioagregat'tır.¹²¹ İçeriğinde trikalsiyum silikat, hidroksiapatit, amorfoz silikon dioksit ve tantalum oksit bulunmaktadır. Trikalsiyum silikat ana fazı oluşturur, tantalum oksit ise radyoopasite özelliği için eklenmiştir. Bioagregat'ın içinde MTA 'daki Portland siman ve bizmut oksit yerine tantalyum oksit bulunmaktadır.¹³²

Fibroblast, osteoblast ve mezenşimal hücrelerin farklılaşmasını hızlandıran, biyoyumlu ve biyoaktif bir materyaldir. Aynı zamanda, antibakteriyel ve antifungal özellikleri mevcuttur.^{133,134} Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada MTA ile karşılaştırıldığında bioagregatın kollajen-1, osteokalsin ve osteopontin üretimini düzenleyen genlerde artışa neden olduğu belirlenmiştir.¹³⁵ Aynı zamanda, Biodentin ile benzer şekilde IL-1 β , IL-6 ve IL-8 salınımını ve insan dental pulpa hücrelerindeki odontoblastik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir.¹³⁶

Bu grupta yer alan kalsiyum ile zenginleştirilmiş siman, 2006 yılında endodontik dolum materyali olarak üretilmiştir. Simanın tozunda kalsiyum oksit, sülfür trioksit, fosfor pentaoksit ve silikon dioksit bulunmaktadır. Bu materyalin pH değeri 10,7 civarındadır ve alkali özellik göstermektedir. Akışkanlık, film kalınlığı ve sertleşme zamanı (yaklaşık 50 dakika) gibi fiziksel özellikleri MTA ile benzerdir.¹³⁷ Biyoyumlu ve hidroksiapatit formasyonunun indüklenmesinde rol oynayan materyal, yüksek derecede antimikrobiyal etkinlik göstermektedir.¹³⁸ Aynı zamanda, putty ve enjektörlü pat formları bulunan kök kanal dolgu ve tamir materyali olarak kullanılan iRoot BP Plus (Kanada) ve Endosequence (Brassaler, ABD) materyalleri bu grupta yer almaktadırlar.^{128,137}

Kalsiyum fosfat simanlar, biyoyumlu oluşları ve osteokondüktif etkileri ile kemik ve periodontal defektlerinin tedavilerinde kullanılan bir diğer biyoseramik dental materyaldir.¹³⁹ Aynı zamanda, pulpayı uyarmakta ve reperatif dentin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ancak sertleşme zamanının uzun olması, basınç altında düşük dayanıklılık göstermesi gibi dezavantajlar gösterdiğinden daha sonra hızlı sertleşen α -trikalsiyum fosfatlar (α -TCP) geliştirilmiştir ve vital pulpa tedavilerinde, perforasyon tamirlerinde ve kök ucu kapama materyali olarak kullanıma sunulmuştur.^{128,140}

Pulpa kaplaması için kullanılan diğer biyoaktif materyaller ise propolis ve mezenşimal hücre farklılaşmasını uyaran ve daha çok periodontal defektlerin rejenerasyonunda kullanılan mine matriks türevleridir.^{141,142} Propolis, işçi arıların bitkilerin filiz ve tomurcuklarından topladıkları reçinemsî maddeleri ve bitki salgılarını salgıladıkları enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları sarıdan kahverengiye kadar değişen renkte suda erimeyen oda sıcaklığında yarı katı halde olan bir üründür.^{108,143-145} Doğal bir ürün olan propolis; antimikrobiyal¹⁴⁶, antienflamatuar¹⁴⁷, antioksidatif^{148,149} ve antitümörosidal^{150,151} özellikler göstermektedir. Antienflamatuar etkisini hidrofolat redüktaz inhibisyonu sağlayarak prostoglandin sentezini inhibe etmesi ile göstermekte ve akut enflamasyonda lipooksijenaz ve siklooksijenaz üretimini baskılamaktadır.¹⁴⁷ Bakterilerin hücre bölünmesini engellemekte, bakteri hücre duvarına etki etmekte ve bakteriyel enfeksiyon sırasında fagositik aktiviteyi arttırarak immun sistemi güçlendirmektedir. B ve T lenfositlerin üretimi ve aktivasyonunu arttırarak immunostimulatör etki yaratmaktadır.¹⁵² Aynı zamanda içeriğindeki çinko ve demir gibi elementler kollajen sentezi için önem taşımaktadır.¹⁵³

Tıpta kanser, kalp damar hastalıkları, diabet, tüberküloz, ülser, solunum yolu hastalıkları, HIV gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanım alanı bulan propolis; diş hekimliği alanında diş macunları, gargaralar, polisaj patları, boyama tabletleri içeriklerine dahil olmakta ve son yıllarda antienflamatuar ve immunomodulatör etkileri nedeniyle kanal içi medikament, kariostatik ajan, hassasiyet giderici, avülse dişler için uygun saklama ortamı ve irrigasyon solüsyonu olmak üzere diş hekimliğinde artan bir popularite elde etmeye başlamaktadır.^{108,144,153-155}

Özellikleri ve bileşenlerinin oluşturulduğu mevsim ve coğrafi konuma göre farklılık gösterdiği materyal esas olarak flavonoidler, diğer fenolik bileşikler ve esansiyel yağlardan oluşmaktadır.^{156,157} ‘3-4 dihidroksi’ konfigürasyonu ile bütün

flavonoidlerin süperoksit, peroksit, alkoksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır ile şelasyon oluşturabilme, μ -tokoferol rejenerasyonu gibi foksiyonlarıyla antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca flavonoid ve diğer bitki fenoliklerinin vazodilatatör, immünostimulan, antiallerjik, antiviral ve östrojenik etkileri bulunmaktadır. Fosfolipaz A₂, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile anti-inflamatuar etki göstermektedirler.¹⁵⁸ Dolayısıyla fagositik aktivitenin indüklenmesi ve hücrel immünitenin desteklenmesi hususunda propolisin zengin içeriği büyük önem taşımaktadır.

Tablo 1’de komponentleri ve biyolojik etkileri gösterilen propolisin yapısında bulunan arjinin, C vitamini, provitamin A ve B kompleksleri gibi diğer unsurlar da iyileştirici özelliklerine katkı sağlamaktadır.^{153,155,157} Şellit, kontakt stomatit, perioral egzema, dudakların soyulması, labial ödem, ağız içi yanma ve dispne şeklindeki nadir görülen alerjik reaksiyonlar gibi dezavantajları olsa da özellikle daha doğal tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmakta olan küçük yaş grupları için alternatif seçenek oluşturmaktadır.^{159,160}

Tablo 2.1. Propolis çeşitlerinin komponentleri ve biyolojik etkileri

Propolis Çeşitleri ve Komponentleri	Biyolojik Etkileri
Bütün çeşitlerinde bulunan polifenoller ve flavonoidler	Antibakteriyel, antiviral, antifungal, antioksidan, antiaging, antiülseratif, antitümöral, antialerjik, anti-inflamatuar, antiosteoporotik, antitrombojenik, antiaterosklerotik, kardioprotektif, immunomodulör, hepatoprotektif
Kafeik asit fenetil ester	Antioksidan, anti-inflamatuar, antitümöral, antibakterial, antiviral, fungusit, immunomodulör, kardioprotektif, hepatoprotektif, antiosteoporotik
Poliprenil benzofenonlar (Küba, Venezuela ve Brezilya)	Antioksidan, anti-inflamatuar, antitümöral
Artepillin C (Tayvan)	Antioksidan, anti-inflamatuar, antitümöral, apoptosisi uyarıcı
Propolins (Tayvan)	Antioksidan, antikanserojen, apoptosisi uyarıcı
Terpenler (Yunanistan, Hırvatistan, Brezilya)	Antibakteriyel, antifungal
Furfuran (Kanarya Adaları)	Antibakteriyel
Esansiyel yağlar (Brezilya, Polonya)	Antibakteriyel

2.5.4. Çinko Oksit Öjenol

Çinko oksit öjenol (ZnO_{Eu}) eas olarak dentine uygulandığında pulpanın ağrı ve hassasiyetini azaltan bu nedenle de sedatif olarak kabul edilen bir materyaldir. Kaviteye uygulandığında prostoglandin sentezini inhibe ederek antiinflamatuvar etki yapmakta, antibakteriyel etki göstermekte, pulpadaki sinir aktivitesini inhibe edip ağrı impulslarını bloke ederek anesteziik etki yaratmaktadır.¹⁶¹

Çinko oksit öjenol ile yapılan indirekt pulpa kaplamalarında sağlıklı dentin üzerinde düşük dozda elde edilen bu terapötik etkilerin aksine pulpa gibi bir nemli doku

üzerine uygulanırsa doku sıvılarından su elde ederek öjenol serbestlenmesini sağladığından yüksek dozlarda vasküler değişim, ileri derecede vazodilatasyon, sinir aktivitesi inhibisyonu ile nörotoksik etki, nekroz ve antijenik özellik gözlemlenerek sitotoksik etki gösterdiği ve prognozu olumsuz etkileyebildiği belirtilmiştir.¹⁶¹⁻¹⁶³

Hume ve ark.'nın, insan pulpa hücreleri ve sıçan fibroblastlarıyla gerçekleştirdiği çalışmada 10^{-3} M konsantrasyonundaki öjenolün hücre solunumuna etkisinin en az olduğunu ve aynı konsantrasyonda uzun süre tatbik edildiğinde ise hücre solunumunu engelleyerek ölümüne neden olduğunu belirtmiştir.¹⁶⁴ Rowe ve ark.,¹⁶⁵ Tronstad ve Mjor¹⁶⁶ gibi araştırmacıların ise direkt kuafajda kalsiyum hidroksitten daha iyi sonuç verdiğini belirtmelerine karşın Holland ve ark.,¹⁶⁷ Sela ve Ulmansky¹⁶⁸ gibi araştırmacıların ise, bu maddenin pulpada kronik yangıya neden olduğu, dentin köprüsü oluşturmadığı ve pulpa nekrozuna yol açtığına dair çalışmaları mevcuttur. Ayrıca pulpadaki kronik yangı uzun süre devam ettiğinde internal rezorpsiyona neden olacağı bildirilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı direkt kuafaj ve amputasyon tedavisinde kullanımı tartışmalıdır.

2.6. Dental Materyaller ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres,¹⁰ aerobik organizmaların oksijen kullanımının (mitokondriyal elektron transportu, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve çözünme reaksiyonları) doğal bir sonucu olarak meydana gelen serbest radikal olarak adlandırılan yaklaşık %1-2 oranındaki reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) mevcut dengeyi bozacak şekilde birikimi sonucu gelişmektedir.^{8,22} Hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretiminin artışı, prooksidan / antioksidan dengesinin prooksidanlar lehine kaymasıyla sonuçlanmakta, çeşitli mekanizmalar yoluyla en fazla lipidler olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve enzimler gibi biyomoleküller üzerinde hasar oluşturmakta ve antioksidan savunmasını tetiklemektedir.⁹ Önemli olan

husus, tüm metabolik olaylarda oluşmakta olan serbest radikallerin, organizmada hasarlara neden olacak seviyelerde savunma mekanizmalarının cevap veremeyeceği miktarda meydana gelmesidir. Ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, alerji, diabet, katarak gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı bildirilen radikallerin biyomoleküller ile etkileşimler sonucunda meydana gelebilecek olan mutasyonlar; oksidatif DNA hasarı ile birlikte kanser etkeni bile olabilmektedir.^{22,169}

ROM oluşumunun engellenmesi veya meydana getirdiği hasarların sınırlandırılması için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirilmektedir. Endojen veya eksojen kaynaklı olabilen antioksidanlar, canlı hücrelerdeki protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyerek veya geciktirerek savunma işlevini yerine getirmektedir.¹⁷⁰ Farklı oksidan ve antioksidanların plazma konsantrasyonlarının ölçümleri için kullanılacak olan tekniklerin karmaşık, pahalı, zaman alıcı ve laboratuvar aşamalarının çok yoğun olması gibi dezavantajları nedeniyle örneklerin oksidan ve antioksidan seviyeleri toplam olarak ölçülmektedir.¹⁷¹

Diş hekimliği alanında kullanılan dental materyaller diğer kimyasallar gibi hücrelerle direkt temas neticesinde redoks düzenleme kapasitesinin üzerinde serbest radikaller oluşturarak oksidatif stresi indükleyici uyaranlardır.²² Oksidatif stres durumunun oksidatif stresin bir mekanizması olarak kabul görmesinden dolayı materyallerin hücreler üzerinde yarattığı serbest radikal oluşumu ve devreye giren antioksidan savunmanın değerlendirilmesi önem taşımaktadır.¹⁰

2.7. Pulpa ve Hücresel Ölüm Mekanizması

Hücrenin dayanabileceği sınırdan yüksek seviyede bir stresle karşılaşması durumunda, yapısında ve fonksiyonunda gerçekleşen değişiklikler sonucunda hücresel hasar meydana gelmektedir. Hasarın hafif derecede olması hücrede geçici bir morfolojik

değişimden hipertrofi, atrofi, hiperplazi, displazi, metaplazi, rejenerasyon gibi yapısal değişimler yaratırken yüksek derecelerde hücre ölümü gerçekleştirebilmektedir.¹⁷²

Serbest radikallerin mekanizmasında büyük öneme sahip biyokimyasal değişimler yarattığı hücre ölümünün başlıca apoptoz ve nekroz olmak üzere nekroapoptoz, proptoz, onkoz, otofaji, mitotik katastrof gibi birçok çeşidi bulunmaktadır. Ölüm mekanizmasını başlatan ve değiştirebilen etkenlere, terminal hücresel olaylara, ölümün dokular üzerindeki etkilerine göre bahsedilen ölüm çeşidi gerçekleşmektedir.¹⁷³

Apoptoz: Oksidatif stres gibi etkenlerle veya genetik faktörlerle aktive olan, hücre tipine göre farklılıklar gösteren programlanmış hücre ölüm çeşididir. Fizyolojik olarak gelişim esnasında veya olgun organizmadaki herhangi bir hücre hasarı sonrasında hücrelerin genetik olarak hafızalarında mevcut olan intihar programı olarak kabul edilmektedir.^{172,174} Mitokondriyel hasar, çekirdek zarı parçalanması, DNA parçalanması, apoptotik cisimleri oluşumu sonrasında bu cisimlerin makrofajlar veya komşu hücreler tarafından parçalanması esas alınmaktadır.¹⁷⁴

Esas olarak apoptoz sürecinde hücre içi ve hücre dışı kaspazlar, Bcl-2 protein ailesi, Apoptotik Proteaz Active Edici Faktör-1 ve p53 geni görev almaktadır.¹⁷³ Mitokondrinin dış zar geçirgenliğini düzenleyen ve mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar da dahil olmak üzere oksijen serbest radikal üretiminin hücre içi alanlarına lokalize olan Bcl-2 ailesi, apoptoz mekanizmasının başlangıç safhalarında görev alıyor olsa da asıl olarak antiapoptotik bir onkoprotein ailesidir.¹⁷⁵

Kaspazların öncü formunu durdurarak veya kaspaz akışını direkt aktive eden sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesine engel olarak antiapoptotik etki göstermektedir. Hücreleri H₂O₂ kaynaklı oksidatif ölümlerden

koruyan Bcl-2'nin fazla ekspresyonunun lipid peroksidasyonunu tamamen bastırmak için işlev görmesi dolayısıyla antioksidan yolağı düzenlediğini belirten çalışmalar mevcuttur.¹⁷⁶

Apoptoz mekanizmaları ve rol oynayan biyokimyasal ve genetik faktörlerin aydınlatılması sayesinde birçok hastalık için yeni tedavi olanakları gündeme gelmektedir.¹⁷⁷ Diş hekimliği için gelişim sürecinde,¹⁷⁸ ağız hastalıklarının ilerlemesinde,¹⁷⁹ periradiküler lezyonlarda,¹⁸⁰ rezorpsiyondaki enflamatuar süreçte¹⁸¹ rolü olan apoptoz konusunun anlaşılması pulpa hastalıklarının tedavisinde de yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasını sağlamaktadır. Pulpaya olan etkisini seçici şekilde apoptozu indükleyerek ve inhibe ederek gösteren materyallerin geliştirilmesi önem taşımaktadır.¹⁸²

Nekroz: Organellerin şişmesi, plazma membranının yırtılması, hücrel içeriğin kontrolsüz salınımı ile karakterize,¹⁸³ pasif, genlerle programlanmayan, apoptozdan histolojik ve fizyolojik olarak çok farklı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmaktadır.¹⁸⁴ Hücre ölümünü takiben hücrel içeriğin hücreler arasında yayılması durumunda makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuyu parçaladıkları şiddetli bir enflamasyon meydana gelmektedir.¹⁸⁵

Arkasında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen mitokondriyal, lizozomal ve nükleer değişimler, lipid dejenerasyonu ve kalsiyum konsantrasyon artışının mitokondride kaspaz olmayan kalpain, katepsin gibi proteazların aktivasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Sinyal transdüksiyon yolları ve katabolik mekanizma ile düzenlenen kontrolsüz ölüm formunda Fas/CD95, TRAIL-R gibi ölüm reseptörleri rol oynamaktadır.¹⁸⁶

Pulpa dokusunda da diğer dokularda olduğu gibi geri dönüşümü olmayan bir hasar sonucunda şiddetli bir enflamasyon sonucu patolojik hücre ölümü neticesinde

hücre şişmesi, membran parçalanması, etkilenen hücrelerin gerçekleşmektedir. Kan dolaşımının kesilmesi sonucunda koagülatif nekroz, dolaşım bozulmasının söz konusu olmadığı ancak proteolitik enzimlerin yer aldığı likefaksiyon nekrozu olmak üzere iki tip gerçekleşmektedir.¹⁸⁷

Çalışmamızda, çeşitli pulpa kaplama materyallerinin hDPSC üzerindeki; Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) biyokimyasal analizlerinin ve TGF- β 1, BMP-2, ALP, Bcl-2, gen ekspresyonları analizlerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.



3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (2015/308) desteklenmiş olup Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 19 Ağustos 2011 tarih ve 28030 sayılı ‘‘Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik’’ hükümlerine bağlı kalınarak ve Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu onayı alınarak Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) dondurulmuş hDPSC kullanılmıştır. Krayoflakonda bulunan 10^6 kadar hücre, 13. pasajda elde edilmiştir. Hızlı bir şekilde ılık suyla çözülerek yeni besi yeriyle birlikte 5 dakika süre ve 800 rpm devirde santrifüj işlemi (Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge) (Şekil 3.1.) gerçekleştirilmiştir. Santrifüjasyon sonrası üstte kalan sıvı (süpernatant bölüm) atılarak geriye kalan kısım (pellet) içerisindeki hücreler, hDPSC hücrelerine özel olarak hazırlanan besi yeri (Sigma - Aldrich Life Science) ile karıştırılarak 25 cm^2 alanındaki hücre kültürü üretme kabına ekilmiştir.

Bir hafta sonunda normal ışık mikroskobu yapısında, ancak objektifleri mikroskop tablası altına yerleştirilmiş, özellikle hücre kültürlerini incelemeye elverişli bir mikroskop türü olan ters mikroskop (İnverted Flouresant Microscope) (Leica, Germany) (Şekil 3.2) ile hücreler kontrol edilmiştir. Hücrelerin üretim kabı tabanının %90 ve üzerini kapladıkları (konfluens) tespit edildikten sonra (Şekil 3.3.) kültür kabındaki besi yeri aspire edilmiştir. Kabın dibinde biriken hücreler, besi yerinin tamamen uzaklaştırılması için pH değeri 7.0 olan Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma - Aldrich Life Science) ile yıkama işlemine maruz bırakılmıştır. Tripsin - etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (0.05%, 0.02%, Sigma - Aldrich Life

Science) solüsyonlarıyla devam edildikten sonra 37 °C'de ve %5 CO₂, %95 nemli inkübatörde (Esco CelCulture CO₂ Incubator) (Şekil 3.4.) yaklaşık olarak 5-10 dakika inkübasyon yapılmıştır. Bu işlem sonrasında mikroskopik olarak incelendiğinde hücrelerin üretim kabı tabanından ayrıldıkları gözlemlenmiştir. 15 ml'lik eppendorf tüpüne alınan kültüre Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, South America) ilavesiyle tripsinin etkisiz hale getirilmesi işlemi devamında tekrar 5 dakika ve 800-1000 rpm devirde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant bölüm atıldıktan sonra pellet içerisindeki hücreler, hDPSC özel besi yeriyle karıştırılarak well plate (Şekil 3.5.) olarak adlandırılan Poli-D-Lysin kaplı 24 kuyucuklu plakalara ekilerek etüvde inkübe edilmiştir.

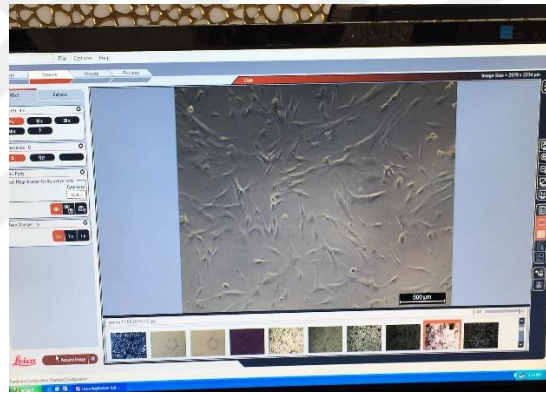
Etüve bırakılan 24'lük well platelerin içerisindeki besi yeri her üç günde bir alınarak yeni besi yeri ilavesi yapılmıştır. Well platelerin konfluens oranı %90 ve üzeri olduğunda deneyin yapılmaya hazır olduğu anlaşılabilir olarak örneklerin hazırlanması aşamasına geçilmiştir.



Şekil 3.1. Beckman Coulter, Allegra X-30R Santrifüj Cihazı



Şekil 3.2. Leica İverted Mikroskop



Şekil 3.3. Hücrelerin üretim kabı tabanını konfluensinin tespiti



Şekil 3.4. CO₂ İnkübatörü



Şekil 3.5. 24'lük Well Plate

3.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan materyaller sırasıyla; ProRoot® MTA (Denstply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA) (Şekil 3.6), Biodentine™ (Septodont, Saint – Maurdes – Fosses, France) (Şekil 3.7), Pulpine Mineral (Hoffmann's Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany) (Şekil 3.8.), Endo Repair (Hoffmann's Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany) (Şekil 3.9.) ve Çinko Oksit Öjenol (Cavex Holland BV, Haarlem, The Netherlands) (Şekil 3.10.) şeklinde çalışma gruplarını oluşturmaktadır (Tablo 3.1). Sadece kök hücrelerinden oluşan grup ise, kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

Deney günü well platedeki tüm besi yerleri taze besi yeriyle değiştirilmiştir. Üretici firmaların önerileri doğrultusunda steril kabin içerisinde (Şekil 3.11.) hazırlanan materyaller öncelikle, hücrelerle dolaylı temas sağlayan ve dentin tabakasını modellemek için 0,3 µm boyutlarında açıklıkları bulunan ve tabanı 6.5 mm çapında olan insert membranların (Cell Culture Insert, Tranparent PET Membran, 24 Well 3.0 µm pore size) (Şekil 3.13.) tabanını 3 mm kaplayacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Sterilizasyon amacıyla bir saat ultraviyole ışımına maruz bırakılmalarının (Şekil 3.14.) ardından insert membranların 24'lük well platedeki hücrelerle bir araya getirilmeleri sonrasında analizlere başlanmıştır. Tüm süre boyunca hücrelerin -80 °C'de bekletilmesi sağlanmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan pulpa kaplama materyallerinin içerik ve üretici firmaları

Materyal	İçerik	Üretici Firma
ProRoot® MTA	Toz: Trikalsiyum Silikat, Trikalsiyum Alüminat, Trikalsiyum Oksit, Silikat Oksit, Bizmut Oksit Likit: Distile Su	Denstply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA
Biodentine™	Toz: Trikalsiyum Silikat, Dikalsiyum Silikat, Kalsiyum Karbonat, Zirkonyum Oksit Likit: Kalsiyum Klorit	Septodont, Saint – Maurdes – Fosses, France
Pulpine Mineral	Toz: Kalsiyum Bileşikleri, Hidroksiapatit Likit: Etanol, Propolis	Hoffmann’s Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany
Endo Repair	Toz: Kalsiyum Fosfat, Hidroksiapatit Likit: Distile Su	Hoffmann’s Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany
Çinko Oksit Öjenol (ZnOEu)	Toz: Çinko Oksit Likit: Öjenol	Cavex Holland BV, Haarlem, The Netherlands



Şekil 3.6. ProRoot[®] MTA



Şekil 3.7. Biodentine[™]



Şekil 3.8. Pulpine Mineral



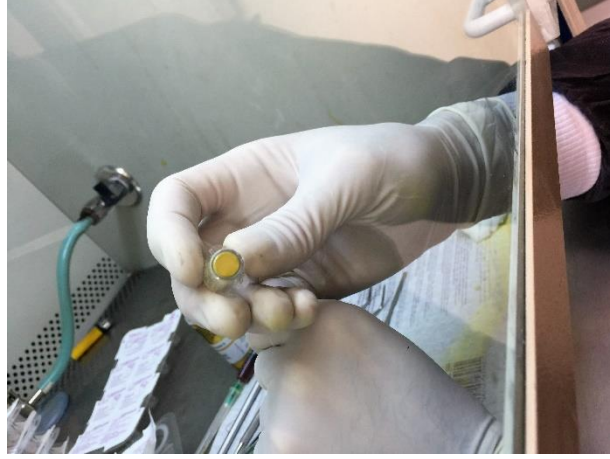
Şekil 3.9. Endo Repair



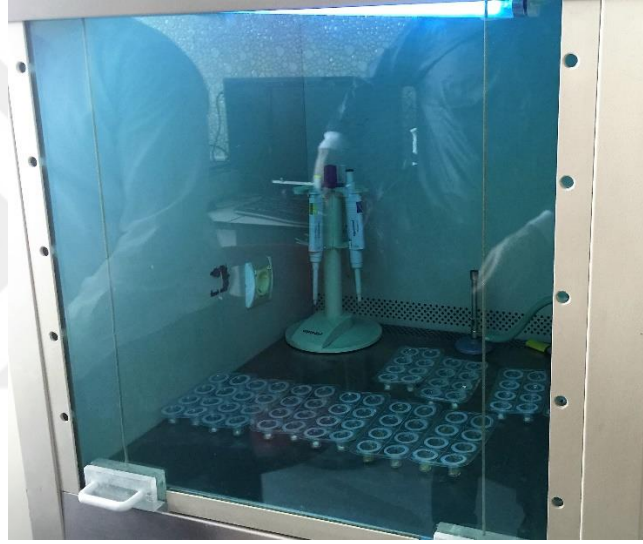
Şekil 3.10. Çinko Oksit Öjenol (ZnOEu)



Şekil 3.11. İnsert membranlar



Şekil 3.12. Materyallerin hazırlanışı



Şekil 3.13. İnsert membrana yerleştirilmiş materyallerin steril kabin içerisinde UV ışınına maruz bırakılmaları

3.3. Biyokimyasal Analizler

Kullanılan dental materyallerin zamana bağlı olarak insan dental pulpa kök hücre kültürleri üzerine biyokimyasal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 24 ve 72 saat sonunda toplanan hücre sıvıları üzerinden her gruptan üçer örnek olmak üzere Toplam Antioksidan Seviyesi ve Toplam Oksidan Seviyesi özel kitler ile ölçülmüştür (Şekil 3.14.).

3.3.1. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)

Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK), Toplam Antioksidan Aktivitesi

(TAA), Total Antioksidan Status, Toplam Antioksidan Yanıtı olarak farklı isimler alabilen TAS analizi için, 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) olarak ifade edilen özel, renkli bir katyonik radikalın ortamdaki antioksidan moleküllerinin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olmasını temel alan; çözeltilerde konsantrasyonu belli olmayan ve bir reaktif ile oluşturulan maddenin renginin şiddetinin, aynı maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltisinin rengi veya derişimi bilinen başka bir renk ile karşılaştırılarak niteliksel analizi olarak ifade edilen kolorimetrik yöntem kullanılmıştır.¹⁸⁸ Bu işlem için Rel Assay Diagnostics® (Gaziantep, Turkey) firması tarafından sunulan ticari kitler kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu (Buffer solüsyonu, 50 ml)
- Reaktif 2 Solüsyonu (Renkli ABTS⁺ solüsyonu, 10 ml)
- Standart 1 Solüsyonu (Distile su, 10 ml)
- Standart 2 Solüsyonu (1.0 mmol Trolox Equiv./L eşdeğer solüsyon, 10 ml)

Örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonu eklenerek 600 nm' de ilk absorbans değerleri okunmuştur. Daha sonra kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme sonunda 660 nm' de ikinci absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun şekilde hesaplanarak E vitaminin suda çözünebilen bir analogu olan ve yüksek hidrofilik - lipofilik dengeli antioksidanlardan 'Troloks' maddesine¹⁸⁹ eşdeğer antioksidan kapasite 'mmol Trolox Equiv./L' cinsinden belirtilmiştir.

TAS (mmol Trolox Equiv./L) = $[(\Delta \text{ Standart 1 absorbans değeri}) - (\Delta \text{ Örnek absorbans değeri})] / [(\Delta \text{ Standart 1 absorbans değeri}) - (\Delta \text{ Standart 2 absorbans değeri})]$

3.3.2. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)

Toplam Oksidan Durumu (TOD), Total Oksidan Status, Toplam Peroksit (TP), Serum Oksidasyon Aktivitesi (SOA) olarak farklı isimlendirilebilen TOS analizi için, TAS analizinde olduğu gibi kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Yöntem, ortamdaki ferroz iyonunun yapısını ferrik iyonuna kümülatif olarak oksitleyen oksidan mekanizmasından yola çıkılarak asidik ortamda ferrik iyonlarının ksenol orange rengi ile kompleks meydana getirmesi temeline dayanmaktadır.¹⁹⁰ Sonuç olarak, örneklerdeki oksidan miktarıyla bağlantılı olan renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS ticari kitleri kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu (Buffer solüsyonu, 50 ml)
- Reaktif 2 Solüsyonu (Prokromojen solüsyonu, 10 ml)
- Standart 1 Solüsyonu (TOS ticari kitinde yer almamaktadır.)
- Standart 2 Solüsyonu (Stabilize Standart Stok Solüsyonu (SSSS), 800 mm H₂O₂ Equiv./L) 10 ml)

Örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm' de ilk absorbans değeri okunmuştur. Daha sonra 25 µl Reaktif 2 solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 530 nm' de ikinci absorbans değeri okunmuştur. Elde edilen değerler aşağıdaki formül kullanılarak 'mmol H₂O₂ Equiv./ L' cinsinden belirtilmiştir.

TOS (mmol H₂O₂ Equiv./ L) = [(Δ Örnek absorbans değeri) / (Δ Standart 2 absorbans değeri)] x 20



Şekil 3.14. TAS ve TOS Analiz Ticari Kitleri

3.3.3. TAS ve TOS Analizlerinin İstatistiksel Değerlendirilmeleri

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata (SH) olarak verilmiştir. Ölçümler arasındaki bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve takiben Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

3.4. Gen Ekspresyon Analizleri

İnserit membranlar aracılığıyla materyaller ile bir araya getirilmesinden 24 saat sonra Tripsin ile plate yüzeyinden kaldırılan hücreler, steril bir tüpe alınarak 800 rpm hızında 5 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant bölüm TAS ve TOS biyokimyasal analizleri için işleme alınırken dibe çöken hücreler her gruptan üçer örnek olmak üzere gen ekspresyon analizleri için işleme alınmıştır.

3.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit (Şekil 3.15.) kullanılmıştır. Üzerine 1ml Qiazole solüsyonu eklenen hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 200 μ l kloroform ilavesi yapılarak 15 sn çalkalama işlemi yapılmıştır. 2-3 dk süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1200 g'de 15 dk ve 4°C'de santrifüj edilen numunelerin süpernatant kısımları atılarak üzerine 1:1 oranında etanol eklenip vorteksenerek toplama tüpüne konulmuştur. Bu numune ürünü oda sıcaklığında 8000

g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Aşama tekrarlandıktan sonra 700 µl RW1 solüsyonu RNeasy kolonuna eklenmiştir. Kolon kapağı kapatılarak aynı koşullardaki santrifüj ardından 500 µl RPE solüsyonunun RNeasy kolonuna ilave edilmesi sonrası 8000 g'de 2 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir. Bu noktada RNeasy kolonu 1.5 ml'lik başka bir tüpe aktarılmıştır. Sonrasında kolon üzerine 30-50 µl RNase free su ilave edilerek kapağı kapatılmıştır. 1 dk süreyle 8000 g'de tekrar santrifüj edilmiştir. Üretici firmanın önerileri doğrultusundaki tüm işlemler bitirildikten sonra RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Sentezinde Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Şekil 3. 16) kullanılan 14 µl'lik solüsyon içeriğinde 2 µl genomik DNA Wipe out – Buffer 7x solüsyonu, 1 µl RNase içeren ve 11 µl RNase içermeyen su mevcuttur. Bu solüsyon 2 dk 42°C'de tutulduktan sonra içerisine Revers Transkripsiyon Master Mix' den 1 µl, Quantscript RT Buffer 5x'den 4 µl, RT Primer 1 µl alınarak 14 µl' lik ilk karışımla beraber 20 µl bir karışım elde edilmiştir. Bu karışımı içeren tüpler Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) cihazına (Rotor Gene Q) (Şekil 3. 17) yerleştirilmiştir. 42°C'de 15 dk ve 95°C'de 3 dk ısıya maruz bırakıldıktan sonra bir sonraki analiz aşamasına kadar -20°C'de bekletilmişlerdir.

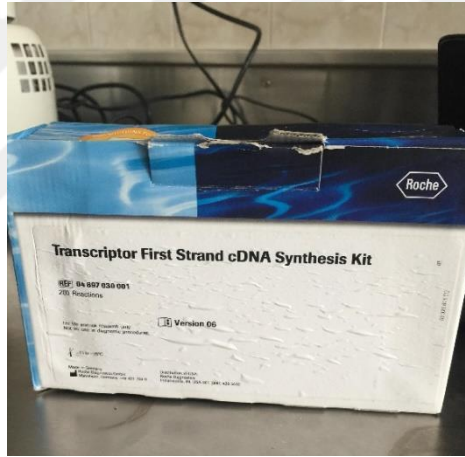
3.4.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polimerase Chain Reaction, qRT-PCR)

cDNA sentezi ardından ekspresyon okuma işlemi için kullanılacak her tüpün içerisinde 0.25 µl Forward, 0.25 µl Reverse Primer, 0.15 µl Prob, 3 µl cDNA, 3 µl Master Mix ve 12.75 µl su eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. 95°C'de 10 sn, 60°C'de 30 sn olan döngüsel süreç Rotor Gene Q cihazında (Şekil 3.4.3) gerçekleştirilmiştir.

İstenilen genlerin ifadesini kontrol eden DNA dizilerinin tespitinde Fast Start Essential DNA Probes Master kiti (Şekil 3.18) kullanılmıştır.



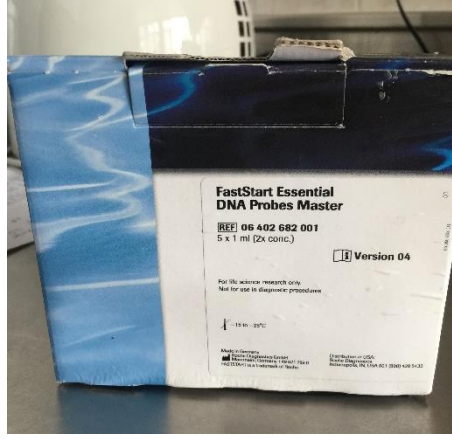
Şekil 3.15. Qiagen RNeasy Mini Kit



Şekil 3.16. Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit



Şekil 3.17. qRT-PCR cihazı



Şekil 3.18. Fast Start Essential DNA Probes Master kiti

3.4.4. Gen Ekspresyon Analizlerinin İstatistiksel Analizleri

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata (SH) olarak verilmiştir. Ölçümler arasındaki bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve takiben Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. TAS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Sonuçları

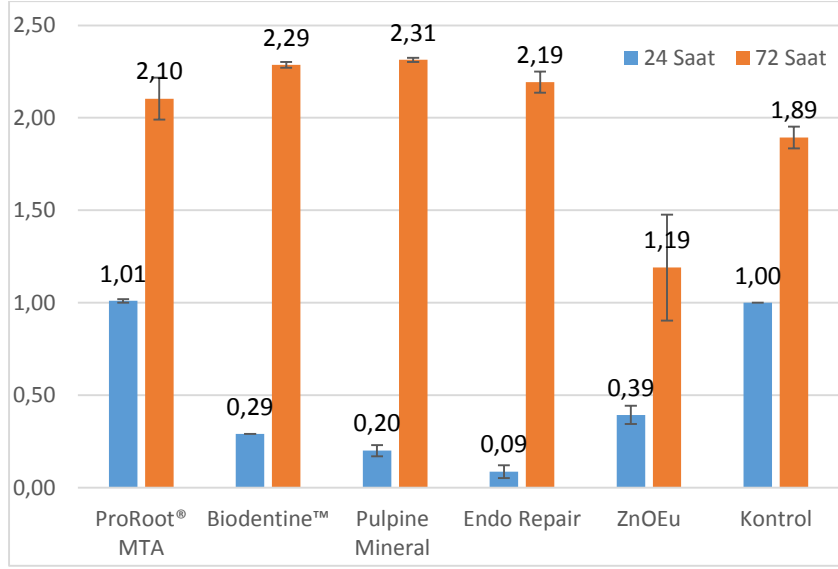
HDPSC üzerine insert membran yöntemiyle uygulanan 5 farklı pulpa kaplama materyalinin ve herhangi bir materyal uygulanmamış kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonunda belirlenen TAS bulgularının grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.1’ de verilmiştir (Şekil 4.1.).

Tablo 4.1. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat (Ortalama ± SS)	72 Saat (Ortalama ± SS)
Kontrol	1.000 ± 0.000*	1.893 ± 0.058*
ProRoot® MTA	1.010 ± 0.010	2.103 ± 0.113*
Biodentine™	0.290 ± 0.000*	2.286 ± 0.015*
Pulpine Mineral	0.200 ± 0.030*	2.313 ± 0.011*
Endo Repair	0.086 ± 0.035*	2.193 ± 0.056*
ZnOEu	0.393 ± 0.049*	1.190 ± 0.285*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05). SS: Standart Sapma

Çalışmamızda, 24 saat sonunda kontrol ve ProRoot® MTA grupları arasında, 72 saat sonunda ise Pulpine Mineral - ProRoot® MTA ve Pulpine Mineral - Biodentine™ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p>0.05) (Tablo 4.2, Tablo 4.3).



Şekil 4.1. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

TAS (24 saat)	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	0.121				
Biodentine™	*0.025	*0.037			
Pulpine Mineral	*0.037	*0.0495	*0.037		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.037	*0.0495	
ZnOEu	*0.037	*0.0495	*0.037	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

Tablo 4.3. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

TAS (72 saat)	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.0495				
Biodentine™	*0.0495	*0.0495			
Pulpine Mineral	*0.046	0.275	0.072		
Endo Repair	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.046	
ZnOEU	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

4.2. TAS Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri

Deney materyallerininin 24. ve 72. saat arasındaki ‘p değerleri’ Tablo 4.4’ de verilmiştir. 72. saat sonunda kontrol grubu hariç diğer gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında TAS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma tespit edilmiştir (p<0.05).

Tablo 4.4. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı TAS değerlerinin Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p’ değerleri

Gruplar	24 – 72 saat TAS karşılaştırılması p değerleri
Kontrol	1.000
ProRoot® MTA	*0.0495 (+)
Biodentine™	*0.037 (+)
Pulpine Mineral	*0.046 (+)
Endo Repair	0.0495 (+)
ZnOEU	*0.0495 (+)

* (p<0.05)

TAS değerlerininin 24 saate kıyasla 72 saate gözlenen artma

(+)

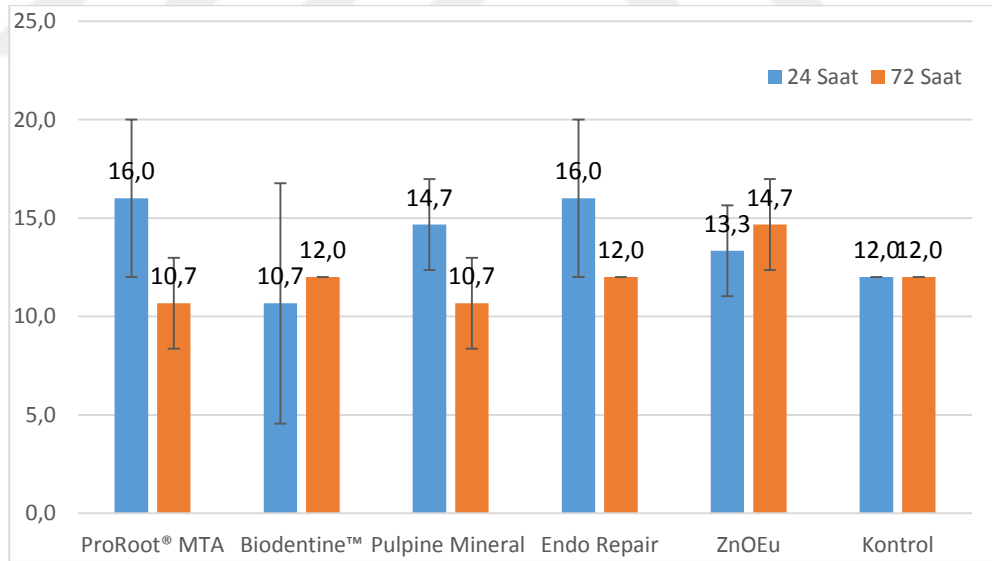
4.3. TOS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulguları

Çalışma gruplarına ait 24 ve 72 saat sonundaki TOS değerlerinin grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.5’ de verilmiştir (Şekil 4.2).

Tablo 4.5. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	12.000 ± 0.000	12.000 ± 0.000
ProRoot® MTA	16.000 ± 4.000	10.670 ± 2.314
Biodentine™	10.670 ± 6.111	12.000 ± 0.000
Pulpine Mineral	14.670 ± 2.310	10.670 ± 2.314
Endo Repair	16.000 ± 4.000	12.000 ± 0.000
ZnOEu	13.333 ± 2.310	14.670 ± 2.314

*(p<0.05)



Şekil 4.2. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri

Çalışmamızın TOS bulguları değerlendirildiğinde, 24 ve 72 saat sonunda sadece ZnOEu - Pulpine Mineral arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.6. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

TOS (24 saat)	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	0.121				
Biodentine™	1.000	0.261			
Pulpine Mineral	0.114	0.637	0.346		
Endo Repair	0.121	1.000	0.261	0.637	
ZnOEu	0.317	0.346	0.637	*0.0495	0.346

* (p<0.05)

Tablo 4.7. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

TOS (72 saat)	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	0.317				
Biodentine™	1.000	0.317			
Pulpine Mineral	0.317	1.000	0.317		
Endo Repair	1.000	0.317	1.000	0.317	
ZnOEu	0.114	0.099	0.114	*0.0495	0.114

* (p<0.05)

4.4. TOS Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri

TOS değerlerinin çalışma gruplarına ait 24 ve 72 saat arasındaki farklılığı Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p değerleri’ Tablo 4.8’ de verilmiştir. TOS değerlerinde 24. saate kıyasla 72. saat sonunda hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık tespit edilmemiştir (p<0.05).

Tablo 4.8. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı TOS değerlerinin Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p değerleri’

Gruplar	24 – 72 saat TOS karşılaştırılması p değerleri
Kontrol	1.000
ProRoot® MTA	0.105
Biodentine™	1.000
Pulpine Mineral	0.099
Endo Repair	0.121
ZnOEu	0.456

* (p<0.05)

4.5. Gen Ekspresyon Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulguları

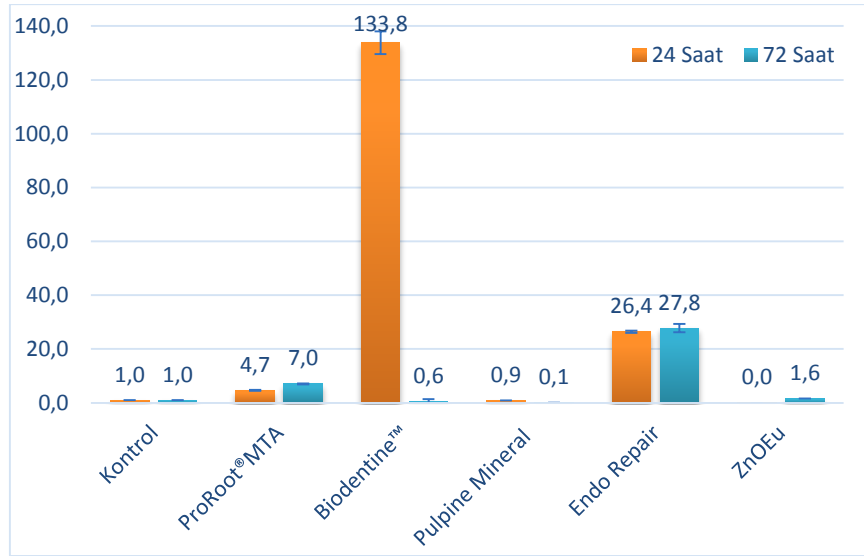
4.5.1. TGF-β1 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları

Çalışma gruplarına ait TGF-β1 gen ekspresyonu değerlerinin 24 ve 72 saat sonundaki grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.9’ da verilmiştir (Şekil 4.3). TGF-β1 geni ekspresyonu bakımından tüm gruplar 24 saatlik zaman dilimi için kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sergilemişlerdir (p<0.05). TGF-β1 geni ekspresyonu bakımından 72 saat sonunda ise, sadece Biodentine™ – Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Tablo 4.9. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 saat ve 72 saat sonundaki TGF-β1 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
ProRoot® MTA	4.683 ± 0.188*	7.047 ± 0.202*
Biodentine™	133.7 ± 4.242*	0.598 ± 0.740
Pulpine Mineral	0.922 ± 0.025*	0.114 ± 0.004*
Endo Repair	26.41 ± 0.461*	27.75 ± 1.537*
ZnOEu	0.004 ± 0.000*	1.628 ± 0.026*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05). SS: Standart Sapma



Şekil 4.3. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TGF-β1 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, 24 saat için Biodentine™>Endo Repair>ProRoot® MTA>Kontrol> Pulpine Mineral>ZnOEU iken 72 saatte ise; Endo Repair>ProRoot® MTA>ZnOEU>Kontrol=Biodentine™>Pulpine Mineral olarak sıralanmışlardır (Tablo 4.10, Tablo 4.11).

Tablo 4.10. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi 'p değerleri'

TGF-β1	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentin™	Mineral Pulpine	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentin™	*0.034	*0.046			
Mineral Pulpine	*0.037	*0.0495	*0.046		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.046	*0.0495	
ZnOEU	*0.034	*0.046	*0.043	*0.046	*0.046

* (p<0.05)

Tablo 4.11. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

TGF-β1	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentin™	Mineral Pulpine	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentin™	0.513	*0.0495			
Mineral Pulpine	*0.037	*0.0495	*0.0495		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	
ZnOEU	*0.034	*0.046	*0.046	*0.046	*0.046

* (p<0.05)

4.5.2. BMP-2 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları

Çalışma gruplarına ait 24. ve 72. saat sonundaki BMP-2 gen ekspresyonu değerlerinin grup ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.12’ de verilmiştir (Şekil 4.4).

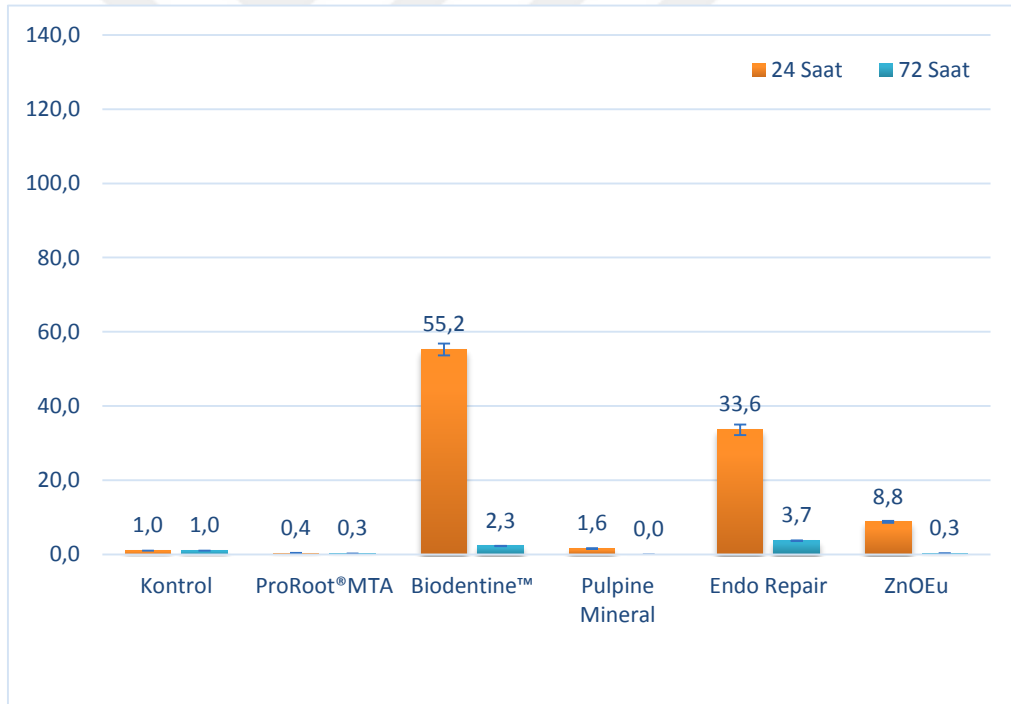
BMP-2 geni ekspresyonu bakımından bütün gruplar kontrol grubuna kıyasla her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sergilemiştir (p<0.05). Grupların BMP-2 gen ekspresyonu oranları arasındaki farklılık ikili olarak karşılaştırıldığında hem 24 saat hem de 72 saat için bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14).

Gruplar karşılaştırıldığında, BMP-2 geni ekspresyonu değerleri 24 saat sonunda sırasıyla; Biodentine™>Endo Repair>ZnOEU> Pulpine Mineral >Kontrol>ProRoot® MTA iken 72 saatte ise; Endo Repair>Biodentine™>Kontrol>ZnOEU> ProRoot® MTA> Pulpine Mineral şeklinde sıralanmışlardır.

Tablo 4.12. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki BMP-2 ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama \pm S.S	72 Saat Ortalama \pm S.S
Kontrol	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000
ProRoot [®] MTA	0.388 \pm 0.004*	0.273 \pm 0.003*
Biodentin [™]	55.21 \pm 1.583*	2.292 \pm 0.024*
Pulpine Mineral	1.628 \pm 0.052*	0.017 \pm 0.000*
Endo Repair	33.61 \pm 1.440*	3.732 \pm 0.092*
ZnOEu	8.777 \pm 0.254*	0.340 \pm 0.024*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$). SS: Standart Sapma



Şekil 4.4. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki BMP-2 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.13. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

BMP-2	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentine™	*0.037	*0.0495			
Pulpine Mineral	*0.037	*0.0495	*0.0495		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	
ZnOEu	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

Tablo 4.14. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

BMP-2	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.034				
Biodentine™	*0.037	*0.046			
Pulpine Mineral	*0.037	*0.046	*0.0495		
Endo Repair	*0.037	*0.046	*0.0495	*0.0495	
ZnOEu	*0.037	*0.046	*0.0495	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

4.5.3. ALP Geni Ekspresyon Analizi Bulguları

Çalışma gruplarına ait, 24. ve 72. saat sonundaki ALP geni ekspresyonunun ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.15’ de verilmiştir (Şekil 4.5). Grupların ALP geni ekspresyonu oranlarının arasındaki farklılık ikili olarak karşılaştırıldığında hem 24 saat hem de 72 saat için bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 4.16 ve Tablo 4.17).

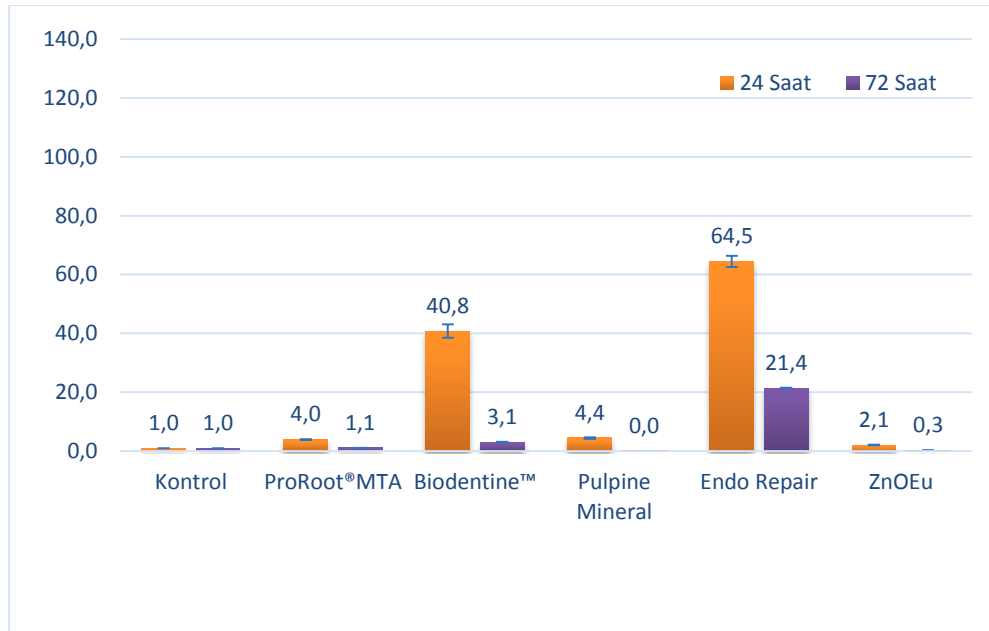
ALP geni ekspresyonu bakımından grupların tamamı kontrol grubuna kıyasla her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sergilemişlerdir (p<0.05). Gruplar karşılaştırıldığında ALP geni ekspresyonu değerleri 24 saat sonunda sırasıyla;

Endo Repair>Biodentine™>Pulpine Mineral>ProRoot® MTA>ZnOEu>Kontrol iken 72 saat sonunda ise; Endo Repair>Biodentine™>ProRoot® MTA>Kontrol>ZnOEu>Pulpine Mineral olarak sıralanmışlardır.

Tablo 4.15. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki ALP gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
ProRoot® MTA	3.982 ± 0.111*	1.094 ± 0.047*
Biodentine™	40.827 ± 2.263*	3.054 ± 0.138*
Pulpine Mineral	4.444 ± 0.295*	0.044 ± 0.001*
Endo Repair	64.46 ± 1.931*	21.35 ± 0.171*
ZnOEu	2.085 ± 0.062*	0.310 ± 0.004*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05). SS: Standart Sapma



Şekil 4.5. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki ALP gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.16. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

ALP	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentine™	*0.037	*0.0495			
Pulpine Mineral	*0.037	*0.0495	*0.0495		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	
ZnOEU	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

Tablo 4.17. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

ALP	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentine™	Pulpine Mineral	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentine™	*0.037	*0.0495			
Pulpine Mineral	*0.037	*0.0495	*0.0495		
Endo Repair	*0.034	*0.046	*0.046	*0.046	
ZnOEU	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	*0.0495

* (p<0.05)

4.5.4. Bcl-2 Geni Ekspresyon Analizi Bulguları

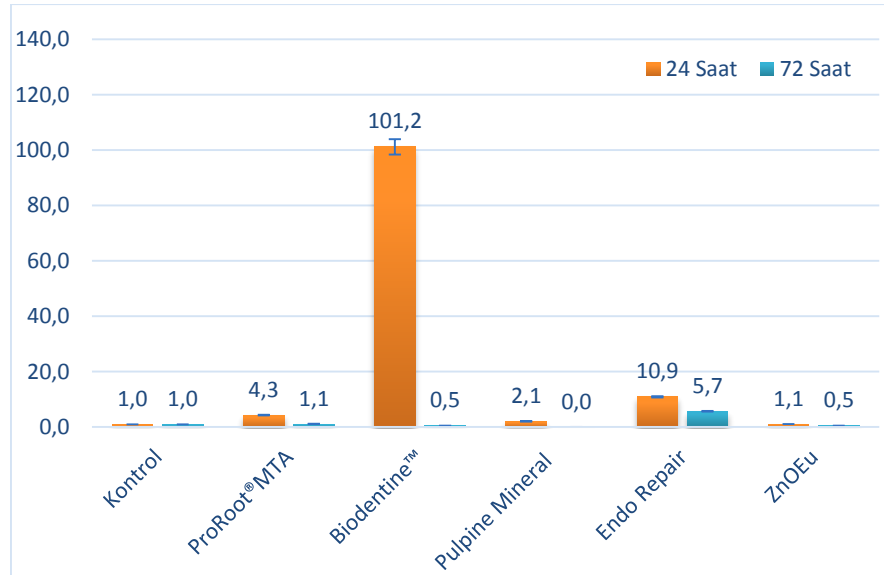
24 ve 72 saat sonunda çalışma gruplarına ait Bcl-2 ekspresyonu değerlerinin grup ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.18’ de verilmiştir (Şekil 4.6). Bcl-2 gen ekspresyonu bakımından grupların tamamı kontrol grubuna kıyasla her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sergilemişlerdir (p<0.05). 72 saat sonunda Biodentine™ - ZnOEU grupları arasındaki ilişki dışında her iki zaman diliminde bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0.05) (Tablo 4.19 ve Tablo 4.20).

Gruplar karşılaştırıldığında Bcl-2 geni ekspresyonu değerleri, 24 saat sonunda Biodentine™>Endo Repair>ProRoot® MTA>Pulpine Mineral>ZnOEU>Kontrol şeklinde iken 72 saat sonunda ise; Endo Repair>ProRoot® MTA>Kontrol>Biodentine™ =ZnOEU>Pulpine Mineral olarak sıralanmışlardır.

Tablo 4.18. Pulpa kaplama materyallerinin ve kontrol grubunun 24 ve 72 saat sonundaki Bcl-2 ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
ProRoot® MTA	4.307 ± 0.091*	1.102 ± 0.048*
Biodentin™	101.1 ± 2.804*	0.495 ± 0.026*
Pulpine Mineral	2.095 ± 0.058*	0.030 ± 0.000*
Endo Repair	10.90 ± 0.241*	5.696 ± 0.104*
ZnOEU	1.112 ± 0.022*	0.472 ± 0.010*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05). SS: Standart Sapma



Şekil 4.6. Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki Bcl-2 gen ekspresyonu ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.19. Çalışmada kullanılan materyallerin 24 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

Bcl-2	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentin™	Mineral Pulpine	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentin™	*0.037	*0.0495			
Mineral Pulpine	*0.034	*0.046	*0.046		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.046	
ZnOEu	*0.034	*0.046	*0.046	*0.043	*0.046

* (p<0.05)

Tablo 4.20. Çalışmada kullanılan materyallerin 72 saat sonundaki Mann-Whitney U testi ‘p değerleri’

Bcl-2	Kontrol	ProRoot® MTA	Biodentin™	Mineral Pulpine	Endo Repair
ProRoot® MTA	*0.037				
Biodentin™	*0.037	*0.0495			
Mineral Pulpine	*0.037	*0.0495	*0.0495		
Endo Repair	*0.037	*0.0495	*0.0495	*0.0495	
ZnOEu	*0.037	*0.0495	0.127	*0.0495	*0.046

* (p<0.05)

4.6. Gen Analizlerinin Zaman Karşılaştırmalı Değerlendirilmeleri

Gen ekspresyonunun çalışma gruplarına ait 24. ve 72. saatler arasındaki farklılığın Mann - Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ‘p değerleri’ Tablo 4.21’ de verilmiştir. 24 ve 72 saat arasındaki farklılık TGF-β1 geninde sadece Endo Repair için benzer bulunmuş, kontrol grubu dışındaki diğer materyallerde ise tüm genler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

24. saate kıyasla 72. saat sonundaki TGF-β1 bakımından MTA ve ZnOEu materyallerinde gen ekspresyonu değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

artma; Biodentine™, Pulpine Mineral ve ZnOEU gen ekspresyonu değerlerinde ise; istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (p<0.05).

BMP-2, ALP ve Bcl-2 açısından değerlendirildiğinde ise, üçünün de 24. saate kıyasla 72. saat sonundaki gen ekspresyonu değerlerinde bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (p<0.05).

Tablo 4.21. Grupların 24 saat ile 72 saat karşılaştırmalı gen ekspresyon değerlerinin Mann - Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen 'p değerleri'

Gruplar	TGF-β1	BMP-2	ALP	Bcl-2
ProRoot® MTA	*0.050 (+)	*0.046 (-)	*0.050 (-)	*0.050 (-)
Biodentine™	*0.046 (-)	*0.050 (-)	*0.050 (-)	*0.050 (-)
Pulpine Mineral	*0.050 (-)	*0.050 (-)	*0.050 (-)	*0.046 (-)
Endo Repair	0.275	*0.050 (-)	*0.046 (-)	*0.050 (-)
ZnOEU	*0.043 (+)	*0.046 (-)	*0.050 (-)	*0.046 (-)

* (p<0.05)

(+) Gen ekspresyonu değerlerinde 24 saate kıyasla 72 saatte gözlenen artma

(-) Gen ekspresyonu değerlerinde 24 saate kıyasla 72 saatte gözlenen azalma

5. TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan birçok materyal, çeşitli dokular (yanak, dil, periodonsiyum, mine, pulpa – dentin kompleksi) ile bir araya geldiğinde farklı lokal reaksiyonlar meydana getirebilmektedir. Materyaller üzerinde yapılan biyouyumluluk çalışmaları sayesinde dokular üzerindeki lokal toksik etkilerin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir.^{191,192}

Özellikle çocuklardaki dental ve orofasiyal problemlerin çözümünü amaçlayan çocuk diş hekimliğinde restoratif ve endodontik amaçlar için kullanılan, dokularla doğrudan veya dolaylı olarak temas halinde bulunan materyallerin biyouyumlu olması büyük önem taşımaktadır. Öte yandan materyallerin mekanik özellikleri ile ilişkili oldukça fazla literatür bilgisi bulunduğu halde; biyolojik etkileri ile ilgili veriler nispeten daha az bulunmaktadır.²²

Çalışmamızda, çocukların dental tedavileri içerisinde önem taşıyan vital pulpa tedavilerinde direkt veya indirekt pulpa kaplaması amacıyla kullanılan bazı materyallerin (ProRoot® MTA, Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair ve ZnOEU) hDPSC üzerinde, in vitro insert membran yöntemi kullanılarak 24. ve 72. saatler sonunda meydana getirdiği oksidatif stresin TAS ve TOS analizleri ile, enflamasyon ve tersiyer dentinogenezis mekanizmasının indüklenme durumunun ise TGF-β1, BMP-2, ALP ve antiapoptotik Bcl-2 biyobelirteçlerini ifade eden genlerdeki ekspresyon analizleri ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

Günümüzde yeni bir materyalin biyolojik olarak kabul edilebilirliğini belirlemek amacıyla genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit in vitro test yöntemleri ile başlanmakta, daha pahalı ve uzun zaman gerektiren hayvan ve insan testleri ile devam edilmektedir. Dental materyallerin in - vitro koşullarda biyolojik özelliklerini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir.¹ Hücre kültürü

yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır.

Yeni biyomateryallerin özelliklerinin değerlendirilmesi çalışmalarında dentin rejenerasyonu için büyük önem taşıyan ve farklılaşma yeteneği açısından farklı hücre popülasyonlarına sahip olan pulpa dokusundan elde edilen kök hücrelerden başarıyla yararlanılmaktadır.¹⁹³ Çalışmamızda kullanılmak üzere; elde edilmesinin kolay olması, etik sorun yaratmaması, yüksek proliferasyon ve plastisite yeteneği, biyomateryaller ile dokuların yeniden yapılandırılmasında kullanımlarının mümkün olması ve uzun yaşam süreleri gibi nitelikleri dolayısıyla hDPSC tercih edilmiştir.^{56,63-66}

İlk olarak 2000 yılında Gronthos ve ark.⁶³ tarafından üçüncü büyük azı dişinden izole edilmiş olan hDPSC'nin in vitro ortamda osteoblastik ve kondrositik hücrelere, in vivo ortamda ise odontoblastik hücrelere dönüştüğü belirtilmiştir. Baghaban Eslaminejad ve ark.,¹⁹⁴ 2010 yılında, hDPSC'nin SHED'e oranla daha hızlı ve yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olduğunu ve rejeneratif diş hekimliği çalışmalarında seçilecek materyale karar verirken bu bilginin göz önünde bulundurulması gerektiğini bildirmişlerdir.

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) tarafından birtakım kriterler belirlenmiştir. ISO standartlarında in vitro sitotoksikite değerlendirmelerinde önerilen test metotları; direkt hücre kültürü (direkt temas testi ve ekstrakt testi), bariyer test metodu, agar difüzyon testi ve milipor filtre difüzyon testidir.^{1,2}

Materyaller ile direkt hücre temasının gerçekleştiği testlerde ağız ortamındaki dentinin pulpa ile kaviteye uygulanan materyal arasında bir bariyer görevi üstlenmesi klinik durumu, tam olarak yansıtamamaktadır. Bu nedenle dentin tübülleri gibi, test materyali bileşenlerinin difüzyonuna izin veren çeşitli oluşumları taklit etme amacıyla

bariyer sistemleri geliştirilmiştir.^{2, 195} Bu sistemlerde materyalin insert membran içine yerleştirilerek besi yeri içerisinde asılı bir şekilde tutulması sağlanmaktadır. Bariyer görevi gören insert membranın alt kısmında bulunan porlar, bileşenlerin geçişine izin vererek besi yeri tabanında bulunan hücrelerle temas etmesini sağlamaktadır.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Aynı zamanda çalışılan materyallerin siman özellikleri taşımaları disk şeklinde hazırlanmalarına izin vermediğinden dolayı ‘direkt temas testi’ ve klinik uygulamalara yakın sonuçlar elde edilmek istendiğinden ‘ekstrat yöntemi’ ekarte edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 3 µm boyutlarında por büyüklüğü bulunan insert membran sistemi (Cell Culture Insert, Tranparent PET Membran, 24 Well 3.0 µm pore size) kullanılmıştır.

Güven ve ark.’nın 2007 yılında, MTA’nın iki farklı ticari markasının (ProRoot MTA ve MTA Angelus) insan gingival fibroblast hücreleri üzerindeki TGF-β1 ve BMP-2 gen ekspresyonları üzerine etkilerini; Eshagh A. Saberi ve ark.’nın ise 2016 yılında, Biodentin, MTA, kalsiyumdan zenginleştirilmiş siman (CEM) ve oktakalsiyum fosfat (OCP) materyallerinin insan gingival fibroblast hücreleri ve insan apikal papilla kök hücreleri (SCAP) canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirdiklerini çalışmalarında 0.4 µm boyutlarında por büyüklüğü bulunan insert membran sistemi kullanmışlardır.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Poggio ve ark.²⁰²’nin 2015 yılında Dycal[®], Calcicur[®], Calcimol LC[®], TheraCal LC[®], ProRoot MTA[®], MTA-Angelus[®], and Biodentine[®] materyallerinin fare odontoblast hücreleri (MDPC-23) üzerindeki biyouyumluluklarını 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirdikleri çalışmalarında da Transwell insert membran sistemleri kullanılmıştır. Paranjpe ve ark.²⁰³’nin 2011 yılında, MTA’nın insan dental pulpa kök hücreleri ile bir araya geldiğinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) üzerine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında da benzer şekilde 0,4 µm por büyüklüğü bulunan membran sistemi tercih edilmiştir. Eid ve ark.²⁰⁴’nin 2014 yılında, gri ve beyaz

MTA'nın kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreleri üzerindeki osteojenik biyobelirteçleri değerlendirdikleri çalışmalarında ise, 0.3 µm por büyüklüğü bulunan membran sistemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda üretici firma önerilerine uygun olarak hazırlanan materyaller Güven ve ark.'nın çalışmaları ile benzerlik göstererek insert membranların tabanını 3 mm kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Direkt temas yönteminin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda da, materyallerin içerisine yerleştirildikleri teflon disk kalıplarının 5 mm çapında ve 3 mm kalınlığında olduğu görülmektedir.^{130, 204-206}

5.1. TAS-TOS Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulgularının Tartışılması

Son yıllarda oksidatif stresin bir toksisite mekanizması olarak kabul edilmesi, biyoyumluluğun belirlenmesi için oksidatif stres analizlerinin sitotoksisite değerlendirme testleri arasında yer edinmesine neden olmuştur.¹⁰ Normal aerobik metabolizma reaksiyonları sonucunda oluşabilen hidrojen peroksit, süper oksit veya hidroksil radikali gibi ROM'ların fazla miktarda olmasının hücre ve dokulara zarar verme potansiyeli bulunduğu bildirilmiştir.⁸

ROM oluşumunun engellenmesi veya meydana getirdiği hasarların sınırlandırılması için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirilmektedir. Bir hücrenin metabolik prooksidan üretimi antioksidan kapasitesini aştığında oksidatif stres oluşmaktadır. Literatürde antioksidanlar tarafından bu serbest radikallerin genellikle uzaklaştırıldığı veya yok edildiğini bildiren çalışmalar yer almaktadır.^{8,207} Bu şekilde oksidatif strese bağlı doku hasarının en aza indirildiği rapor edilmiştir.²⁰⁷ Çalışmamızda, materyallerin hDPSC üzerinde oluşturduğu oksidatif stresin değerlendirilmesi amacıyla TAS ve TOS biyokimyasal analizleri için özel kitler (Rel Assay Diagnostics®) kullanılmıştır.

Çalışmamızda, 24. saat sonunda kontrol ve ProRoot® MTA grupları arasında, 72 saat sonunda ise Pulpine Mineral - ProRoot® MTA ve Pulpine Mineral - Biodentine™ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.2, Tablo 4.3).

TAS değerlerinin 24 saatlik değerlendirilmesi neticesinde sadece ProRoot® MTA grubunun kontrol grubu ile benzerlik gösterecek şekilde antioksidatif koruyuculuk sergilediği, diğer grupların bu seviyenin altında kaldıkları görülmektedir. Grupların 72 saat sonundaki karşılaştırılmalarında ise Pulpine Mineral ve Biodentine™ materyallerinin birbirleriyle benzerlik göstererek en yüksek koruyuculuğa sahip oldukları ve tüm materyallerin TAS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artmanın gerçekleştiği gözlemlenmektedir. ($p<0.05$). Bu artışın nedeninin, hücrelerde meydana gelen ilk 24 saatlik akut oksidatif stres cevabı sonrasında hücrelerin korunması ve oksidatif dengenin sağlanması amacıyla materyallerin antioksidan kapasiteyi arttırmaya yönelik etki göstermesi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızın TOS bulguları değerlendirildiğinde ise, 24 ve 72 saat sonunda ZnOEu - Pulpine Mineral materyalleri dışında deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7). TOS değerlerinde 24. saate kıyasla 72. saat sonunda hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma veya azalma tespit edilmemiştir ($p<0.05$). Bu durumda materyallerin hücreler üzerinde meydana getirdiği olağan oksidan seviyeleri arasında farklılık bulunmadığı sonucuna varılmaktadır.

Minamikawa ve ark.²⁰⁸'nin 2011 yılında, rat pulpa hücreleri üzerinde yaptıkları ve antioksidatif durumu anlamaya yönelik farklı bir yöntem kullandıkları çalışmalarında, MTA'nın antioksidan aminoasitlerden N-asetilsistein (NAC)'i detoksifiye etme potansiyeli değerlendirilmiştir. Oksidatif aktiviteyle ilgili olarak da

ROM ve Glutasyon seviyesinin de ölçüldüğü çalışmada bulgularımızla benzer şekilde MTA'nın hücresel redoks sisteminde bir iyileşme ile ilişkili olduğu ortaya konulmaktadır.

Güven ve ark.²⁰⁹'nın 2012 yılında iki farklı self-etch adezivin insan gingival fibroblast hücre kültürü üzerindeki çalışmamızla benzer şekilde oluşan oksidatif stresin ve TGF- β 1 ve BMP-2 biyobelirteçlerinin 24. ve 72. saatlerde değerlendirildiği çalışmada ise oksidatif stresin en büyük indikatörünün lipid peroksidasyonu olması dolayısıyla tiobarbitürik asit reaktif (TBARS) analizi gerçekleştirilmiştir.

Gülçin ve ark.,²¹⁰ TAS analizine ek olarak 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil-2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) ve N,N-dimetil-*p*/9-fenilendiamin aktivite testleri ile öjenoldeki (4-alil-2-metoksifenol) fenolik komponent dolayısıyla antioksidan özelliğinin fazla olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da direkt uygulamalarda pulpa dokusunda yüksek dozda öjenol serbestlenmesinin sitotoksik etki gösterdiğini önceden bildiğimiz¹⁶¹⁻¹⁶³ ZnOEU materyalini diğer gruplarla karşılaştırdığımızda ilk 24 saatte benzer şekilde MTA dışındaki gruplara göre antioksidan aktivitesinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Fakat koruyucu etkinliğini 72 saat sonuna kadar devam ettiremediği ve 72 saat sonunda TAS değerinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunduğu gösterilmiştir.

Niu ve ark.,²¹¹ 2015 yılında; iki farklı hidrolik tipteki simanın hDPCS üzerindeki hücre canlılığı ve çoğalması, plazma membran bütünlüğü, erken apoptoz için Caspase aktivitesi, mitokondriyal metabolik aktivite ve hücre içi DNA içeriğini inceledikleri çalışmalarında oksidatif stresi de değerlendirmişlerdir. Çalışmamızla benzer şekilde materyalleri ZnOEU ile karşılaştırmışlar ve ZnOEU grubunu pozitif kontrol grubu olarak kabul etmişlerdir. Hücre içi ROM ölçümü için CellROX[®] Orange Oxidative Stress Reagent (Life Technologies, Thermo Fisher) kullandıkları çalışmalarında 24 saat

sonunda kalsiyum alüminosilikat içerikli simanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamış iken ZnOEu gubuna göre sitotoksiteleri oldukça az olarak bulunmuştur.

Wataha ve ark.,¹⁹¹ biyouyumluluğun çeşitli etkenlerle ilişkili olmakla birlikte zamana ve şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebildiğini ve ilk uygulandığında biyouyumlu olan bir materyalin, zaman ve şartların değişmesiyle zıt özellik gösterebileceğini açıklamışlardır. Schmalz ve ark.²² ise; bir materyalin biyouyumluluğunu, bu materyalden salınan bileşenlerin özelliklerinin belirlediğini ve bu bileşenlerin hücrelerde interlökin salgılanması, iltihabi cevap ve hücre ölümü gibi çeşitli cevaplara sebep olabileceğini bildirmiştir.

Sitotoksitenin belirlenmesi için diş hekimliği alanında sık kullanılan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] analizi, enzimatik bir testtir. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler ile ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin boyanma esasına dayanan bu test türü, dental materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.²¹²⁻²¹⁴

Genel olarak MTA materyalinin geleneksel materyallere göre daha biyouyumlu olduğuna dair çok sayıda makale bulunmaktadır. Amalgam, Süper EBA ve IRM gibi ara restoratif materyallere göre MTA'nın toksisitesinin düşük olduğu gösterilmiştir.^{129, 215-218} Al-Haj Ali ve ark.²¹⁹ insan periodontal ligament hücreleri (PDL) üzerine farklı konsantrasyonlarda uyguladıkları propolis, formokrezol, demir sülfat ve gri mta materyalleri sonrasında yaptıkları MTT analizi sonucunda 24 saat sonunda sadece propolis ve gri MTA gruplarında PDL fibroblastlarının canlılığını sürdürdüğünü gözlemlemiştir.

Biodentin, pulpa kaplama materyali olarak kullanılan bir kalsiyum silikat simanıdır. Odontoblastik tabakanın parsiyel hasarında pulpa iyileşmesinde olumlu etkide bulunduğu belirtilen materyalin birçok hücre tipi üzerinde biyouyumlu olduğunu bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak hDPSC üzerine sınırlı sayıda araştırma mevcuttur.²²⁰⁻²²³ Zanini ve ark.'nın fare dental pulpa kök hücreleri (OD-21) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında ise, Biodentin maruziyetinden 2 gün sonra hücrelerin canlılığında belirgin bir azalma olduğu ortaya konulmuştur. Yazarlar düşük canlılığın, ortama salınan Ca^{+2} iyonlarının toksik etki yaratması ve pH artışının fazla olması nedeniyle oluşabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızdaki Biodentin™ grubunun TAS değerlerinin 24. saatten 72. saate kadar gösterdiği anlamlı artışın nedeni de belirtilen bu faktörlere karşı savunmaya yönelik oluşan antioksidan cevabı olabilir. 24 saatlik hDPSC'ye maruz kaldıktan sonra Biodentine karşı oluşan sitotoksisiteyi fark eden diğer bir çalışma da Luo ve ark.'a aittir.²²⁴ İlk günden itibaren 3., 5. ve 7. günlerde hücre canlılığının kademeli olarak artışı izlenmiştir. Çalışmamızla benzerlik gösteren bu durumun nedeni, materyallerle bir araya getirildiğinde hücreler üzerinde oluşan akut şok etkisi olabilir. Aynı zamanda farklı olarak Attik ve ark.²²⁵ Biodentin'e maruz bırakılan odontoblast benzeri hücre grubunun (MG63) 24 saat sonunda MTA grubuna benzer şekilde yüksek hücre canlılığı sergilediğini ortaya koymuşlardır. Farklı sonuçlar ise, tercih edilen farklı hücre hatları veya temas yöntemleri ile ilgili olabilir.

Diş hekimliğinde daha sıklıkla kanal içi medikament, karyostatik ajan, hassasiyet giderici, avülse dişler için uygun saklama ortamı ve irrigasyon solüsyonu olmak üzere kullanım alanı bulan ve doğal bir antioksidan^{148, 149} olduğu bilinen propolisin yeni pulpa kaplama ajanı olarak içeriğinde yer aldığı Pulpine Mineral materyalinin değerlendirildiği çalışmamızda ise; farklı olarak 24 saat sonunda MTA, Biodentine™ ve ZnOEU'dan daha az antioksidan özellik gösteren propolisin, antioksidan özelliğinin

72 saat sonunda tüm materyallerden anlamlı düzeyde fazla olacak şekilde ortaya çıktığı görülmektedir. Bu iyileştirici özelliğin; yapısında Arginin, C vitamini, provitamin A, B kompleksleri ve bakır, demir, çinko elementleri ile biyoflavonoidler gibi mineralleri barındırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.¹⁰⁷

Najeh ve ark.²¹⁹'nın ise; 2015 yılında propolis, formokresol, ferrik sülfat ve MTA materyallerinin değişik konsantrasyonlarını insan periodontal ligament hücreleriyle bir araya getirdikleri çalışmalarında MTT analizi sonucu 24 saat sonunda MTA ve propolisin benzer şekilde diğer materyallerden daha biyouyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Silva ve ark.²²⁶ da benzer şekilde alternatif endodontik materyaller arasında en az iritan özellik gösterenin propolis olduğunu belirtmişlerdir.

Jahromi ve ark.¹⁰⁸ MTT testi ile dental pulpa fibroblastları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında propolisin fibroblast hücrelerinin canlılığını korumak için kalsiyum hidroksitten daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Al-Shaher ve ark.,²²⁷ in vitro ortamda düşük konsantrasyondaki propolisin PDL ve dental pulpa hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında oldukça düşük toksisite gözlemlenmiştir. Sönmez ve ark.²²⁸ ise farklı olarak, propolisin yüksek konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki yarattığını belirtmişlerdir. Sonuçlardaki değişkenliğin nedeninin araştırmaların farklı dokular üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki propolis içerikli materyallerin farklı ajanlarla karşılaştırılması olabileceği düşünülebilir.

Eshagh A. Saberi ve ark.²²⁹'nın Biodentin, MTA, CEM ve OCP materyallerinin in vitro koşullarda insan gingival fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında insert membran yöntemi ile 24., 48. ve 168. saatlerde MTT testi gerçekleştirilmiştir. İlk 24 saatlik sürede, tüm materyaller arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte 24 saatten sonra MTA ve

Biodentin grupları benzer şekilde diğer materyallerden daha az toksik bulunmuştur. Çalışmamızda yer alan kalsiyum fosfat içerikli Endo Repair materyalinin iki zaman aralığında da diğer materyallerle karşılaştırıldığında benzer şekilde antioksidan özelliğini tam olarak gösteremediği görülmektedir.

Poggio ve ark.²⁰²'nin, 2015 yılında Dycal[®], Calcicur[®], Calcimol LC[®], TheraCal LC[®], ProRoot MTA[®], MTA-Angelus[®], and Biodentine[™] materyallerinin fare odontoblast hücreleri (MDPC-23) üzerindeki biyouyumluluklarını 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirdikleri çalışmalarında MTA ve Biodentin'in diğer yüksek sitotoksikite gösteren kalsiyum hidroksit içeren ürünlere göre oldukça uyumlu olduğu gösterilmiştir. İlk 24 saatlik sürede ProRoot MTA[®], MTA-Angelus[®], Biodentine[®] materyalleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış iken 72 saat sonunda tüm grupların canlılığında azalma ile birlikte ProRoot MTA[®] and MTA-Angelus[®] gruplarının birbirleriyle benzer şekilde ve diğerlerinden daha fazla doku dostu olduğu belirtilmiştir (p<0.05). Bizim çalışmamızda ise; ilk 24 saatte ProRoot MTA[®] materyalinin koruyuculuğunun daha yüksek olacak şekilde Biodentine[™] ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. İlk 24 saate kıyasla 72. saatte Biodentine[™] grubunun doku üzerinde oluşturduğu antioksidatif savunmanın ProRoot MTA[®] grubundan daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Farklı etkiler, materyallerdeki konsantrasyon değişikliklerinin biyouyumluluk üzerinde yarattığı pH değişimlerine bağlanabilmektedir.²³⁰⁻²³⁴

Öte yandan yine aynı araştırmacılar tarafından fare odontoblastları üzerinde yapılmış olan benzer bir çalışmada, Biodentin uygulanan hücrelerin 24. saatte Dycal uygulanmış olan hücrelere göre yüksek canlılığa sahip olduğu saptanmış; ProRoot MTA ve MTA Angelus gruplarının iyi ve benzer canlılık göstermelerinin yanı sıra Biodentin grubuna göre daha az hücre canlılığı gösterdikleri belirtilmiştir. 72. saatte tüm grupların

hücre canlılığında azalma görüldüğü, gruplar arasında Biodentin uygulanan hücrelerde canlılık oranının yüksek olduğu bildirilmiştir.²³⁵

Saberi ve ark.²⁰¹'nin 2015 yılında Biodentin, MTA, CEM ve Oktakalsiyum fosfat materyallerinin SCAPs üzerindeki 24, 48 ve 168. saatlerdeki biyouyumluluklarını MTT analizi ile değerlendirdikleri çalışmalarında en az sitotoksik materyal CEM olmak üzere tüm grupların iyi bir biyouyumluluk sergilediği gösterilmiştir. Daha iyi bir gözleme için çalışma sürelerinin 168 saate çıkarılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

5.2. Gen Ekspresyon Analizlerinin 24 ve 72 Saatlik Bulgularının Tartışılması

Pulpa dokusunun periferik olarak dentin matriksi ile doğrudan temas halinde düzenlenmiş olan odontoblast özel hücrelerinden oluşan mezenkimal orijinli yumuşak bir doku olması ve vital pulpa tedavilerinin amacının, birlikte ele alınan pulpa – dentin kompleksinin canlılığının korunması olması dolayısıyla dental materyallerin toksik etkilerinin yanı sıra enflamasyonu sınırlandırma ve tersiyer dentinogenezis mekanizmasını indüklemeye yeteneklerinin değerlendirilmesi son derece önemlidir.¹³

Çalışmamızda reperatif dentinogenezise yön vererek olayları düzenleyen, çeşitli in vitro ve in vivo yaklaşımlar kullanılarak yapılan yoğun araştırmalara konu olan biyobelirteçlerden ilk olarak TGF- β 1 gen ekspresyonu üzerine çalışılmıştır.^{71,236} TGF- β süper ailesi embriyonik gelişimde, hücre çoğalması ve farklılaşmasında, hücre dışı matriks döngüsünde ve epitelyal, mezenşimal, nöronal hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinin birçok fonksiyonunda görev almaktadır.²³⁷ Aynı zamanda antienflamatuar cevabın oluşturulmasında ve dentin üzerinde özellikle fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) tarafından upregüle edilip ALP aktivitesinin artırılmasında, mineralize nodüllerin oluşumunda, dentin sialoprotein ve dentin matriks protein-1'in ekspresyonunun indüklemesinde önemli rol oynamaktadır.²³⁸ Chang ve ark.,²³⁹

yaptıkları çalışmada TGF- β 1'in apikal papilla kök hücrelerinin kollajen içeriğini artırdığını ve çoğalmalarını indüklediğini bulmuşlardır.

Çalışmamızda gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, ilk 24 saat için özellikle Biodentine™ ve Endo Repair gruplarında yüksek olmakla beraber tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olacak şekilde TGF- β 1 gen ekspresyonu görülmektedir. 72 saat sonunda ise; Endo Repair, ProRoot® MTA ve ZnOEU gruplarındaki ekspresyon derecelerinin kontrol grubuna kıyasla fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer gruplara kıyasla en az ekspresyon sergileyen grup 24 saatte sonunda ZnOEU, 72 saat sonunda ise Pulpine Mineral olarak belirlenmiştir (Tablo 4.10, Tablo 4.11).

Çalışmamızda ayrıca TGF- β süper ailesinin bir alt grubunu oluşturmakta olan ve şimdiye kadar 20'den fazla alt grubu tanımlanmış olan BMP ailesinin pulpa hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını stimüle ederek mineralizasyon için özellikle büyük önem taşıyan BMP-2 alt grubu değerlendirilmiştir.²⁴⁰ BMP-2'nin hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptosis gibi bazı biyolojik aktivitelerde de etkileri bulunmaktadır.²⁴¹ Dolayısıyla, BMP2'nin in vitro ve in vivo ortamlarda dental pulpa progenitör kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını uyarmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.²⁴²

Çalışmamızda yer alan gruplar karşılaştırıldığında, BMP-2 geni ekspresyonu değerlerinin 24 saat sonunda TGF- β 1 gen ekspresyonu değerleriyle benzerlik gösterecek şekilde sırasıyla Biodentine™ ve Endo Repair gruplarında en yüksek olduğu görülmektedir. 72 saat sonundaki değerler, Endo Repair grubunda en yüksek olmak üzere ilk 24 saatle paralellik sergilemektedir. Diğer gruplara kıyasla en az ekspresyon sergileyen grup 24 saatte sonunda ProRoot® MTA, 72 saat sonunda ise Pulpine Mineral olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14).

Çalışmamızda biyoaktivitenin değerlendirilmesi için üçüncü sırada, farklı dokulardaki kalsifikasyon ve erken mineral depozisyonundan sorumlu ve odontoblast benzeri hücreler için diferansiyasyon ve gelişimden daha fazla tamir sürecinde adı geçmekte olan ALP gen ekspresyonuna bakılmıştır. Yapılan çalışmalar pulpa hücrelerinin yüksek düzeyde ALP aktivitesi sergilediğini göstermektedir. Pulpal yaralanma sonrası tamir ve iyileşmede önemli bir rol sahibidir.⁶⁸ ALP' nin salgıladığı serbest fosfat moleküllerinin ortamdaki Ca⁺² iyonlarıyla reaksiyona girmesiyle oluşan çökelti hidroksiapatit moleküler ünitesi gibi davranmaktadır.²⁴³ Çalışmamızda yer alan gruplar karşılaştırıldığında en yüksek ALP geni ekspresyonu değerlerinin 24 ve 72 saat sonunda sırasıyla Endo Repair ve BiodentineTM gruplarında en yüksek ekspresyon derecesi tespit edilmiştir. 24 saat sonunda en az ekspresyon kontrol grubunda iken, 72 saat sonunda Pulpine Mineral grubunda tespit edilmiştir.

Chang ve ark.,²³⁹ TGF-β1'in düşük konsantrasyonlarda (0,5-1 ng/ml) apikal papilla kök hücrelerinin ALP aktivitesini stimüle ettiğini fakat 5 ng/ml den yüksek konsantrasyonlarda ALP aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda TGF-β1 ile ALP değerlerinin tam bir paralellik göstermeyişi bu duruma bağlanabilir.

MTA'nın fibroblast hücrelerinde ve osteoblastik hücrelerde sitomorfoloji değişikliği yapmaması özelliğinin yanında biyoaktif dentin matris proteininin serbest bırakılmasına neden olduğu ve bu nedenle koronal veya apikaldeki sert doku köprüsünün başlatabildiğini, hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü uyarabildiğini, sonuç olarak sert doku ve periodontal doku rejenerasyonunu uyarabildiğini anlatan çalışmalar bulunmaktadır.^{107, 123} Örneğin, Min-Seock Seo ve ark. hDPSC üzerinde 24 ve 72 saat sonra qRT-PCR analizi gerçekleştirdikleri çalışmalarında MTA'nın önemli düzeyde TGF-beta1 gen ekspresyonu artışı sergilediğini belirtmişlerdir.²⁴⁴

Çalışmamızda ise, araştırmacıların sonucuna benzer olarak MTA grubundaki ekspresyon düzeyi 72 saat sonunda belirgin bir artış göstermektedir.

Chang ve ark.²⁴⁵'nin hDPCs üzerine uyguladıkları MTA, insan plasenta ekstraktı ve ikisinin kombinasyonu sonrasında gerçekleştirilen MTT analizi, ALP aktivitesinin değerlendirilmesi, hücre büyümesi ve farklılaşmasını belirten belirteçlerin Alizarin Red boyası ve qRT-PCR ile gösterilmesi uygulamaları sonucunda tüm grupların hücre büyümesi ve farklılaşmasını indüklediği, kombine grupta daha az inflamatuvar cevapla birlikte dentin köprüsü, odontoblastik tabaka ve tübül oluşumun gözlemlenmesi bakımından rejeneratif endodonti için daha yararlı olduğu gösterilmiştir.

Rodrigues EM ve ark.²⁴⁶'nin hDPCs üzerine uyguladıkları MTA ve MTA Plus materyallerinin sitotoksitelerinin yanı sıra osteojenik biyoaktiviteyi gösteren BMP-2, ALP ve osteokalsin belirteçlerinin mRNA ekspresyonlarını değerlendirdikleri çalışmalarında iki materyalin de toksik olmadığı ve gen ekspresyonlarının MTA Plus grubunda daha anlamlı düzeyde arttığı belirtilmiştir. Çalışmamızda ise, MTA'nın ALP gen ekspresyonu üzerindeki olumlu etkisini BMP-2 ekspresyonuna yansıtamadığı görülmektedir. Bunun nedeni, iki biyobelirtecın pulpa üzerinde sert doku indüklenmesi açısından benzer özellikler taşımasına rağmen eşit derecede etki oluşturmaması olabilir.

Kusum ve ark.¹⁴⁴ tarafından süt dişlerinde pulpa kaplama ajanları olarak MTA, Biodentin ve propolisın klinik ve radyografik değerlendirilmesinin 3., 6. ve 9. aylarda gerçekleştirildiği araştırmada çalışmamızın sonuçları ile paralellik gösterecek şekilde, MTA ve Biodentin materyallerinin kendi aralarında benzerlik göstererek propolis grubuna göre daha az pulpal enflamasyonun var olduğu klinik ve dentin köprüsünün daha fazla izlendiği radyografik başarı sergiledikleri gösterilmiştir.

Güven ve ark.¹⁹⁹ ise, MTA'nın iki farklı ticari ürünü ile insan gingival fibroblast hücreleri üzerine yaptıkları çalışmalarında 24 ve 72 saat sonunda hücre canlılığını MTT

analizleri, TGF- β 1 ve BMP aktivitelerini aynı zamanda Enzime Bağlı İmmunolojik Yöntem (ELISA) ile değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu ve ProRoot MTA grupları karşılaştırıldığında, 24 ve 72 saatteki TGF- β 1 düzeyleri için kontrol ve ProRoot MTA grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmamızda ise, iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmekle birlikte ProRoot MTA grubu, kontrol grubuna en yakın değerlere sahip olan grup olarak tespit edilmiştir. Güven ve ark. ayrıca, kontrol grubunun BMP-2 ekspresyon düzeyinin test gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğunu ($p < 0.001$) ve zaman içinde artmadığını belirtmişlerdir.²⁴⁷ Araştırmanın sonuçları ile farklı olarak çalışmamızda, ProRoot MTA grubunun BMP-2 ekspresyon seviyesinin her iki zaman diliminde de kontrol grubundan düşük olduğu gözlemlenmiştir. TGF- β 1'in osteoblast farklılaşması üzerinde etki göstermesine zıt şekilde BMP-2 aracılı stimülasyonu veya BMP-2 kaynaklı matriks mineralizasyonu inhibe edici özelliğinin de olabildiği ile ilgili makalelerin de var olması çalışmamızdaki TGF- β 1 ve BMP-2 değerlerinin paralellik göstermemesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Hwang ve ark.²⁴⁸ 2008 yılında, 12 adet ratın sağ üst birinci molar dişleri üzerinde MTA uygulaması yaptıkları çalışmalarında, TGF- β 1'in reparatif dentinogenezis üzerindeki rolünü anlamak amacıyla qRT-PCR ile hDPCs üzerindeki BSP ve DSP ekspresyonları, immünofloresans ile TGF- β 1 reseptörleri ve TGF- β 1 tarafından fosforile edildiğinde aktif hale geçen ve tekrar TGF- β 1 transkripsiyonunu uyaran Smad (Caernohabdit Elegan proteini içeren Drosophila protein homologları) proteinlerini incelemişlerdir. DSP, odontoblast ve odontoblast benzeri hücrelerde eksprese edilirken, BSP odontoblast benzeri hücrelerde daha güçlü şekilde eksprese edilmiştir. Smad proteinleri ve TGF- β 1, reparatif dentinde normal dentine göre daha fazla olarak belirtilmiştir. Reperatif dentinin dentinojenik ve osteojenik özelliklerinin TGF- β 1

tarafından indüklendiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda TGF-β1 ile BMP-2 ve ALP biyobelirteçlerinin gen ekspresyon değerlerinin materyaller için benzerlik göstermeleri reperratif dentinogenezis için taşıdıkları önemi vurgulamaktadır. Daha sonraki çalışmalarda BSP ve DSP gibi biyobelirteçlerin de değerlendirilmesinin katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Biodentin aktivitesiyle ilgili sınırlı sayıda ve özellikle hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Örneğin; Boukpassi ve ark.²⁴⁹ ile Shayegan ve ark.²⁵⁰ hayvan dişleri üzerinde Biodentin ile gerçekleştirdikleri histolojik çalışmalarında 7 günlük sürede hızlı bir sert doku oluşumunu bildirmişlerdir. Ayrıca iltihaplanmanın 15 günlük süre ile sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. Laurent ve ark.¹³⁰ ise, insan dental pulpa hücre kültürü üzerine direkt olarak trikalsiyum silikat bazlı siman olan Biodentine™ materyalinin TGF-β1 sekresyonu üzerine etkisini MTA, kalsiyum hidroksit ve Xeno III adeziv rezin ile karşılaştırdıkları çalışmalarında materyallerin uygulanmasından 24 saat sonra ELISA ile TGF-beta1 sekresyonunu analiz etmişlerdir. Çalışmamızla benzer şekilde özellikle Biodentine™ materyalinin erken ve önemli düzeyde TGF-β1 sekresyonu gerçekleştirdiği görülmüştür. About ve ark. insan dental pulpa hücrelerinin Biodentin ile β-gliserofosfat birlikte kültür edildiğinde odontoblastik hücrelere farklılaşabildiğini söylemişlerdir.²³⁶

Nikfarjam ve ark.²⁰⁶ insan süt dişi dental pulpa fibroblastları üzerinde Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile TGF-β1 ve prokollajen tip I sekresyonlarını değerlendirerek Biodentin'in MTA'dan daha fazla olmak üzere gösterdiği yüksek performansı ortaya koymuşlardır.

A. L. Gomes-Cornelio ve ark.²⁵¹ 'nın MTA Plus, Biodentin ve rezin içerikli kalsiyum silikat bazlı simanların (CSCR ZrO2 ve CSCR Nb2O5) insan osteoblastik hücreleri (Saos-2) üzerine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında MTT analizi

ile hücre canlılığına, ALP osteojenik markerinin qRT-PCR ile gen ekspresyonu ve alizarin boyası (ARS) ile mineralizasyon odaklarının tespiti aracılığıyla ALP aktivitesine bakmışlardır. qRT-PCR' nin sonuçlarına göre bir günlük maruziyet sonrasında tüm gruplardaki ALP ekspresyonun çalışmamızdan farklı şekilde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu ortaya konulmuştur. Üç gün sonra MTA Plus grubunun, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük düzeyde bir gen ifadesi göstermeye devam ettiği; Biodentin ve CSCR ZrO₂ gruplarının kontrol ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. CSCR Nb₂O₅ grubunda ALP ekspresyonunun kontrol grubunun 3 katı kadar fazla olduğu tespit edilmiştir. ALP aktivitesinin zamana bağlı olarak belirgin şekilde gösterdiği artış neticesinde 7. günde tüm gruplarda en yüksek ALP aktivitesi gözlemlenmiştir. Çalışmamızda araştırmacıların sonuçlarından farklı olarak, tüm materyallerin 24. ve 72. saatler arasında ALP gen ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi 7. ve hatta 21. günlerde de ALP aktivitesinin izlenmeye devam edilmesi durumunda sonuçların değişebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda A. L. Gomes-Cornelio ve ark.'nın çalışmalarında uygulanan materyallerin 1:8 oranında dilüe edildikten sonra uygulanması da bu farklılık üzerinde etkili olabilir. Hücre canlılığının tüm materyaller için doza bağlı olarak değiştiği, 7 gün sonrasında materyallerin tamamında yüksek ALP gen ekspresyonu görüldüğü fakat 3 gün sonunda en yüksek ekspresyon ve hücre canlılığının rezin içerikli kalsiyum silikat bazlı simanda gözlemlendiği sonucuna varılmıştır.²⁵¹

Eid ve ark.²⁰⁴ beyaz ve gri ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) materyallerinin insan kemik kaynaklı mezenşimal kök hücreleri (hMW-MSCs) üzerindeki birçok hedef osteojenik belirtecin (ALP, RUNX2, OSX, OPN, MSX2 ve OCN) ekspresyonunu qRT-PCR ve Western Blot yöntemi uygulayarak 1, 3, 7 ve 10 gün boyunca saptadıkları çalışmalarında ALP ekspresyonu açısından 7. ve 10. günlerde

gri MTA'da daha fazla olmak üzere gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. ALP ekspresyon değerlendirilmesinde 7 günden sonrasının değerlendirilmesinin önem taşıdığı anlaşılmaktadır.

Yavlal ve ark.²⁵² 2014 yılında, Biodentine™, ProRoot® MTA, formokrazol, demir sülfat ve kalsiyum hidroksit materyallerinin 50 adet kök rezorpsiyonu tamamlanmış süt dişlerinden elde ettikleri mezenşimal kök hücreleri üzerindeki sitotoksitelerini 1., 3. ve 7. günlerde MTT testi, rejeneratif özelliklerini qRT-PCR ile ALP, tip I kollajen ve osteonektin analizleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak MTA daha biyouyumlu bulunmuş olup diğer materyaller arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Aynı zamanda 1. 7. ve 21. Günlerde değerlendirilen tip I kollajen, osteonektin ve ALP analizlerinde ise, Biodentin grubu MTA grubundan daha iyi bulunmuştur. Çalışmamızda benzer şekilde biyouyumluluğun ProRoot® MTA, biyoaktivitenin ise Biodentine™ grubunda daha yüksek olarak tespit edildiği görülmektedir. Ayrıca Yavlal ve ark.'nın çalışmasında kullanılan analiz yöntemlerinin ve sürelerinin farklılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Zohreh Ahangari ve ark.²⁵³ 2011 yılında, propolisin dentin kalitesi ve diş pulpası kök hücrelerinin varlığı üzerine biyoaktif bir madde olarak etkisini 48 adet maksiller ve mandibular domuz dişi üzerinde değerlendirdikleri klinik ve immunohistokimyasal çalışmada propolisin hiçbir pulpal enflamasyon, enfeksiyon ve nekroz oluşturmaksızın kök hücrelerin uyarılmasını sağladığını ifade etmektedir. Aynı zamanda hDPSC stimülasyonu bakımından propolis ve kalsiyum hidroksit arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir. Farklılıklar, çalışmanın domuz dişleri üzerinde klinik ve immunohistokimyasal özellikte olmasından dolayı olabilmektedir.

Parolia ve ark.²⁵⁴ tarafından propolis, MTA ve Dycal ile pulpa kaplanması yapılan insan küçük azı dişlerinin çekilmesinin ardından 15. ve 45. günlerde histolojik

değerlendirmesinin yapıldığı başka bir çalışmada ise, birbiriyle benzerlik gösteren propolis ve MTA gruplarında daha fazla dentin köprüsü ve daha az pulpal enflamasyon izlenmiştir. Çalışmamızda ise; propolis içerikli Pulpine Mineral materyalinin biyoaktivite özelliğinin biyouyumluluk özelliği kadar ortaya konulamadığı görülmekte, gelecekte in vivo çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Ozono JE ve ark.²⁵⁵ kalsiyum hidroksit, propolis ve ikisinin kombinasyonu şeklindeki materyallerle kapladıkları domuz süt dişleri pulpa dokusunun 7, 21 ve 42 gün sonra histolojik analizlerini gerçekleştirdikleri çalışmalarında 42 gün sonunda tüm gruplarda pulpal enflamasyon olmaksızın sert doku gelişimini gösterilmiştir. Moradi ve ark. tarafından 2015 yılında MTA, Propolis ve plateletten zengin plazma (PRP) materyalleriyle direkt pulpa kaplaması uygulanmış köpek dişlerindeki odontoblastik farklılaşmanın immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildiği çalışmada da benzer şekilde propolisin TGF- β 1 oluşumunu indükleyebildiği ve pulpa hücreleri yoluyla kollajen sentezleyebildiği gösterilmiştir.²⁵⁶ PRP ve Propolis'in aynı zamanda pulpa – dentin kompleksindeki önemli biyobelirteçlerden olan fibronektin ve tenaskin ekspresyonları üzerine de indüktif etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca Propolis'in odontoblastların farklılaşması için önemli olan TGF- β 1 üretimini uyarabilme yeteneğini gösteren Ansorge ve ark. çalışma sonuçlarıyla uyum göstermektedir.²⁵⁷ Bretz ve ark.²⁵⁸ tarafından rat dental pulpa hücrelerinde ile onarıcı dentin oluşumunu bildirdikleri ve Sabir ve ark.²⁵⁹ tarafından 4 hafta sonra kısmi dentin köprüsü oluşumunun izlendiği ve flavonoid içerik sayesinde pulpal enflamasyonun sınırlandırıldığı belirtildiği çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda ise, araştırmacıların sonuçlarından farklı olarak propolis içerikli grubun TGF- β 1, BMP-2 ve ALP gen ekspresyonlarındaki 24 saatteki artmayı 72 saate kadar sürdürmediği ve ekspresyonun diğer materyallerden anlamlı düzeyde az olarak gerçekleştiği görülmektedir ($p < 0.05$).

Bu farklılık, çalışmamızın hayvan dişleri üzerinde gerçekleştirilmiş klinik ve immunohistokimyasal çalışmalardan farklı şekilde in vitro olarak hDPSC üzerindeki etkilerini değerlendirmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda son olarak gen ekspresyon seviyesine baktığımız parametre Bcl-2'dir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bad), antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenen apoptoz için belirleyici bir role sahiptir.²⁶⁰⁻²⁶² Gelişim ve diferansiyasyon boyunca canlılığın düzenlenmesinde fonksiyon gören ve yetişkin dokularında fizyolojik olarak eksprese edilen Bcl-2, hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan bir apoptoz inhibitörüdür.²⁶³ Fazla ekspresyonunun radyasyon, UV, p53, kemoterapötik ilaçlar gibi değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü engellediği veya belirgin biçimde azalttığı belirtilmektedir.^{260, 264}

Pulpa dokusunda da diğer dokularda olduğu gibi geri dönüşümü olmayan bir hasar neticesinde şiddetli bir enflamasyon ile birlikte patolojik hücre ölümü gerçekleşebileceği için kullanılan dental materyallerin bu durumu tersine çevirmeye yönelik davranması son derece önem taşımaktadır. TAS ve TOS analizleri sonrasında antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun değerlendirilmesinin de hücre canlılığının ortaya konulmasını açısından destekleyici olacağı düşünülmüştür.

Gruplar karşılaştırıldığında Bcl-2 geni ekspresyonu değerlerinin, 24 saat sonunda sırasıyla Biodentine™ ve Endo Repair gruplarında en yüksek olmakla birlikte materyallerin tümünde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu görülmektedir. 72 saat sonunda ise, sırasıyla Endo Repair ve ProRoot® MTA gruplarında gen ekspresyonu en yüksek olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, ZnOEu ve Pulpine Mineral grupları daha az gen ekspresyonu sergilemektedir. Bu sıralamanın TAS ve TOS analizlerinden farklı olması, biyokimyasal

analizlerin hücre canlılığın miktarını birebir gösteren ölçümler olmamalarına bağlanabilir. Ayrıca antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi, hücre ölümünün yalnızca apoptoz şeklinde olan bölümünü yansıtmaktadır. Etkilenen hücrelerin ölümü kaçınılmaz ise apoptotik döngüye katılmaları, nekroza yönelmelerine kıyasla daha çok istenen bir durum olmasına karşın ayrımı belirten ve hücre ölümünü direkt olarak gösteren analizlerin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kartika ve ark.¹⁰⁷ nın 2015 yılında MTA, propolis ve kalsiyum hidroksit preparatlarının hamster böbrek fibroblastlarından elde edilen BHK21 hücre kültürleri üzerinde meydana getirdiği genotoksisiteyi Single – Cell Jel Elektroforezis Metodu ile değerlendirdikleri çalışmalarında MTA'nın apoptozise gidişi kolaylaştırdığı, kalsiyum hidroksitin ise nekroza neden olduğu ve propolisin DNA hasarı yaratmadığını belirtilmiştir. Çalışmamızda ölüm mekanizmasının bu şekildeki ayrımı yapılmamış olmasına karşılık propolisin apoptozise karşı olan direnci benzerlik göstermektedir.

Ek olarak genellikle kolay uygulanabilir olması, fazla zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlı olan Akım Sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin-5 gibi antikolar kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptandığı çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Örneğin; sitotoksik değerlendirilmenin toplam hücre sayısı, apoptotik hücre oranı (Anneksin-5/FITC/PI), hücre proliferasyon oranı (BrDU-LI) ve SEM ile hücre morfolojisi tespiti ile yapıldığı bir tez çalışmasında ise; MTA (Angelus MTA), kalsiyum hidroksit (Dycal), ışıkla sertleşen rezin içerikli kalsiyum hidroksit (Calcimol LC) ve ışıkla sertleşen rezin içerikli MTA (TheraCal)'nın fare fibroblastlarına (3T3) 24 ve 72 saatlik etkileri direkt kontakt metodu kullanılarak değerlendirilmiştir.²⁶⁵ MTA materyalinin sitotoksitesi diğer materyallerden daha az olduğu tespit edilmiştir. TAS değerlerinin ilk 24 saatlik ve Bcl-2

gen ekspresyonu değerlerinin 72. saat bulguları, bu araştırmadaki MTA analiziyle paralellik sergiliyor olsa da karşılaştırıldığı materyallerin ve kullanılan yöntem farklılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Biodentine (Septodont, Saint- Maur-des-Fosses, France), MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil), Theracal LC (Bisco Inc., Schamburg, IL, USA) ve IRM (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany) materyallerinin SHEDs üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik etkilerinin karşılaştırıldığı Gonzales ve ark.²⁶⁶ tarafından yapılan çalışmada MTT analizinin yanı sıra apoptozis ve hücre fenotiplerindeki değişiklikler Akım Sitometri Yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ek olarak Alizarin Red boyaması ile kalsifiye matriks depozisyonlarının analiz edildiği çalışmada Biodentin, çalışmamızdan farklı olarak tüm yönleriyle diğer materyallerden fazla başarı sergilemiştir. Kullanılan kök hücre çeşidinin ve yöntemlerin farklılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Bortoluzzi ve ark.²⁰⁵ tarafından kalsiyum silikat simanların hDPSC üzerindeki osteojenik potansiyelinin qRT-PCR kullanılarak ALP enzim aktivitesinin incelendiği çalışmada, hücre canlılığı MTT analizine ek olarak Akım Sitometri Yöntemi ile değerlendirilmiştir. Biodentin ve TheraCal LC' nin sitotoksik etkilerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu ve osteojenik farklılaşmanın Biodentin ile güçlendiği sonucuna varılmıştır. Her iki materyal de çalışmanın pozitif kontrol grubunu oluşturan ZnOEu grubuna göre iyi bulunmuştur.

Çalışmamızda H₀ hipotezlerimizin reddedildiğini, kullandığımız materyallerin farklı oranlarda sitotoksik etki ve biyoaktivite sergilediğini gözlemlemekteyiz. Zamanla ortaya koyulan toksisite değerleri ve oksidatif stresle ilişkilerini destekleyen kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Klinik koşullarda uygulanan pulpa kaplama materyallerinin; doğru endikasyon verilmiş dişlere uygulanmaları, pulpa ile aralarında dentin dokusunun bulunup bulunmaması, doğru hazırlanıp yerleştirilmeleri, diğer materyallerle

etkileşimlerinin değişkenlik gösterebilmesi gibi ağız ortamındaki in vivo koşullarda farklılık sergileyebilmeleri mümkündür. Bu sebeple, materyallerin biyouyumlulukları ve biyoaktivitelerinin artırılmasına yönelik uzun süreli takip gerektiren ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda kullanılan materyallerin, 24 ve 72 saat sonunda insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde benzer olmakla birlikte oksidatif etki meydana getirdikleri tespit edilmiştir.

2. İlk 24 saat için sadece ProRoot® MTA grubunun antioksidatif savunma mekanizmasının kontrol grubuyla benzer şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. 24. ve 72. saatler arasında tüm grupların antioksidatif savunma düzeyinde artış meydana geldiği, en uzun süreli koruyuculuğun Biodentine™ ile propolis içerikli Pulpine Mineral gruplarında ve en zayıf koruyuculuğun ZnOEu grubunda olduğu tespit edilmiştir.

3. Tersiyer dentinogenezisin indüklenmesi mekanizmasında mineralizasyon için önemli biyobelirteçler olan TGF β 1, BMP-2 ve ALP gen ekspresyonlarının tüm materyaller için gerçekleşmesi ile birlikte Biodentine™ ve kalsiyum fosfat içerikli Endo Repair materyallerinde daha fazla meydana geldiği gösterilmiştir. İlk 24 saatlik dönemde Biodentine™, 72 saatlik daha uzun dönemde Endo Repair materyalinin biyoaktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4. Antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonlarının ilk 24 saatte tüm materyallerde kontrol grubuna kıyasla artış görülmekle birlikte en yüksek ekspresyonun diğer gen analizlerine benzer şekilde Biodentine™ ve Endo Repair materyallerinde görüldüğü tespit edilmiştir. İlk 24 saate kıyasla 72 saat sonunda tüm materyaller için apoptozisten koruyucu gen ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. 72 saat sonunda yalnızca Endo Repair ve ProRoot® MTA grupları kontrol grubuna kıyasla fazla ekspresyon sergilemiştir.

5. Klinik açıdan başarılı materyallerin biyouyumluluklarını ve biyoaktivitelerini arttırmaya yönelik girişimlerin ön planda olduğu daha uzun süreleri kapsayan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg*, 2011, 21: 141-149.
2. Murray P, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral Cirugía Bucal (Internet)*, 2007, 12: 258-266.
3. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *Journal of endodontics*, 2001, 27: 96-102.
4. Brännström M, Vojinović O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *ASDC journal of dentistry for children*, 1976, 43: 83-89.
5. Saw T, Cao T, Yap A, Ng M. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicology in vitro*, 2005, 19: 145-154.
6. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola C, Savarino L, Stea S, Montanaro L, Pizzoferrato A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicology in vitro*, 1999, 13: 801-810.
7. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical oral investigations*, 1998, 1: 154-162.
8. Gutteridge J, Quinlan G, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: Changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1994, 124: 263-273.

9. Cooke M, Evans M, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The Faseb Journal*, 2003, 17: 1195-1214.
10. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, 15: 91-96.
11. Miller N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 1993, 84: 407-412.
12. Cox C, Keall C, Keall H, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *The Journal of prosthetic dentistry*, 1987, 57: 1-8.
13. Aggarwal S, Rego A, Kshirsagar S, Rai V, Gupta P, Borkar A. A Comparative Evaluation of the Influence of Sol-Gel Derived Nanoparticle Bioglass Particulate vs Calcium Hydroxide as a Direct Pulp Capping Agent-A Histological Analysis. *Endodontology*, 2015, 27: 24-28.
14. Zhou Z, Zheng J. Tribology of dental materials: a review. *Journal of physics D: applied physics*, 2008, 41: 113-116.
15. Avery J, Avery N. *Structure and Function of the Teeth*. In: Piesco NP, Simmelink J. *Oral Development and Histology*. 2002, p.21-43.
16. Özçobanoğlu G, Durutürk L. Süt dişlerinde pulpa ve dentinin histolojik yapısal özellikleri. *Acta Odontologica Turcica*, 2013, 30: 99.
17. Boushell L, Sturdevant J. Clinical Significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology, and Occlusion. *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry*, 2014: 1-40.

18. Goldberg M, Lasfargues J. Pulpo-dentinal complex revisited. *Journal of dentistry*, 1995, 23: 15-20.
19. Pashley D, Liewehr F. Structure and functions of the dentin-pulp complex. *Pathways of the Pulp*, 2006, 9: 460-513.
20. Sumikawa D, Marshall G, Gee L, Marshall S. Microstructure of primary tooth dentin. *Pediatric Dentistry*, 1999, 21: 439-444.
21. Goldberg M, Takagi M. Dentine proteoglycans: composition, ultrastructure and functions. *The Histochemical Journal*, 1993, 25: 781-806.
22. Demirci T, Gürbüz T, Şengül F. Dental Rezin Kompozitlerin Sitotoksitesisi: Bir İn Vitro Çalışma. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2014, 24: 10-15.
23. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2001, 12: 331-349.
24. Fox A, Heeley J. Histological study of pulps of human primary teeth. *Archives of Oral Biology*, 1980, 25: 103-110.
25. Pashley D. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1996, 7: 104-133.
26. Bjørndal L, Ivar A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries-Characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence International*, Vol. 32: 717-736.
27. Smith A, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch J, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 2003, 39: 273-280.
28. Yıldırım S, Alaçam A. Vital pulpa tedavilerinde protein ve gen terapileri. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 2007, 31: 54-63.

29. Rutherford B, Fitzgerald M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1995, 6: 218-229.
30. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1993, 4: 679-728.
31. Pashley D. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning microscopy*, 1989, 3: 161-174; discussion 174-166.
32. Pashley D. Dentin-Predentin Complex and Its Permeability: Physiologic Overview. *Journal of Dental Research*, 1985, 64: 613-620.
33. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Archives of Oral Biology*, 1994, 39: 185-190.
34. Dai X, Ten Cate A, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Archives of Oral Biology*, 1991, 36: 775-778.
35. Mjör I, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence International*, 2002, 33: 172-182.
36. Kinney J, Balooch M, Marshall S, Marshall G, Weihs T. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Archives of Oral Biology*, 1996, 41: 9-13.
37. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology*, 1976, 21: 355-362.
38. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of Endodontics*, 2005, 31: 711-718.
39. Demarco F, Conde M, Cavalcanti B, Casagrande L, Sakai V, Nör J. Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal*, 2011, 22: 3-13.

40. Weinstock M, Leblond C. Synthesis, migration, and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after [3H] proline administration. *The Journal of Cell Biology*, 1974, 60: 92-127.
41. d'Souza R, Bachman T, Baumgardner K, Butler W, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *Journal of Dental Research*, 1995, 74: 702-709.
42. Paula J, Waterhouse J, Whitworth J, Anna B. Endodontic treatment for the primary and young, permanent dentition. *Pathways of the pulp. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby*, 2006: 812-814.
43. Murray P, About I, Lumley P, Franquin J, Remusat M, Smith A. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 277-285.
44. Johnson W. Pulp-dentin Biology in Restorative Dentistry. *Journal of Prosthodontics*, 2003, 12: 153-154.
45. Marion D, Jean A, Hamel H, Kerebel L, Kerebel B. Scanning electron microscopic study of odontoblasts and circumpulpal dentin in a human tooth. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology*, 1991, 72: 473-478.
46. Arana-Chavez V, Massa L. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36: 1367-1373.
47. Smith A, Lumley P, Tomson P, Cooper P. Dental Regeneration and Materials—a Partnership. *Clinical oral investigations*, 2008, 12: 103-108.
48. Greely C. Pulp therapy for the primary and young permanent dentition. *Pediatric Dental Medicine. Philadelphia: Lea & Febiger*, 1981: 456-460.

49. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *Journal of Dental Research*, 1992, 71: 1196-1202.
50. Sakurai K, Okiji T, Suda H. Co-increase of Nerve Fibers and HLA-DR and/or Factor-XIIIa-expressing Dendritic Cells in Dentinal Caries-affected Regions of the Human Dental Pulp: An Immunohistochemical Study. *Journal of Dental Research*, 1999, 78: 1596-1608.
51. Mjör I, Sveen O, Heyeraas K. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: Normal structure and physiology. *Quintessence International*, 2001, 32: 286-368.
52. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1998, 9: 179-200.
53. Rapp R, El-Labban N, Kramer I, Wood D. Ultrastructure of fenestrated capillaries in human dental pulps. *Archives of Oral Biology*, 1977, 22: 317-319.
54. Nör J. Buonocore memorial lecture: tooth regeneration in operative dentistry. *Operative dentistry*, 2006, 31: 633-642.
55. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir G, Tatarkiewicz K, Song K, Sharma A, O'Neil J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97: 7999-8004.
56. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *Acta Odontologica Turcica*, 2012, 29: 115-120.
57. Gardner R. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal of Anatomy*, 2002, 200: 277-282.

58. Murray P, Garcia-Godoy F, Hargreaves K. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, 2007, 33: 377-390.
59. Weissman I. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000, 100: 157-168.
60. Thesleff I, Åberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone*, 1999, 25: 123-125.
61. Peters H, Balling R. Teeth: where and how to make them. *Trends in Genetics*, 1999, 15: 59-65.
62. Morszeck C, Schmalz G, Reichert T, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 2008, 12: 113-118.
63. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97: 13625-13630.
64. Todorović V, Marković D, Milošević-Jovčić N, Petakov M, Balint B, Čolić M, Milenković A, Čolak I, Jakanović V, Nikolić N. Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatološki Glasnik Srbije*, 2008, 55: 170-179.
65. Zhang W, Walboomers X, Shi S, Fan M, Jansen J. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Engineering*, 2006, 12: 2813-2823.
66. Tekeli S, Arisu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. 2016, 2: 72-83.

67. Colburn W, DeGruttola V, DeMets D, Downing G, Hoth D, Oates J, Peck C, Schooley R, Spilker B, Woodcock J. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Biomarkers Definitions Working Group. *Clinical Pharmacol & Therapeutics*, 2001, 69: 89-95.
68. Emilia E, Neelakantan P. Biomarkers in the dentin-pulp complex: role in health and disease. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2015, 39: 94-99.
69. Smith A. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Research*, 2002, 36: 223-232.
70. Tziafas D, Smith A, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 77-92.
71. Smith A, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2001, 12: 425-437.
72. Smith A. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of Dental Education*, 2003, 67: 678-689.
73. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Archives of Oral Biology*, 1990, 35: 493-497.
74. Bang G, Nordenram Å, Anneroth G. Allogenic demineralized dentin implants in jaw defects of Java monkeys. *International Journal of Oral Surgery*, 1972, 1: 126-136.
75. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Dental Traumatology*, 1989, 5: 279-286.

76. Nakashima M. An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. *Archives of Oral Biology*, 1990, 35: 277-281.
77. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *Journal of Dental Research*, 1990, 69: 75-81.
78. Smith A, Tobias R, Plant C, Browne R, Lesot H, Ruch J. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *Journal de Biologie Buccale*, 1990, 18: 123-129.
79. Lianjia Y, Yuhao G, White FH. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1993, 295: 305-312.
80. Cobourne M, Sharpe P. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Archives of Oral Biology*, 2003, 48: 1-14.
81. Ruch J, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1995, 39: 51-68.
82. Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin H. Control of ameloblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1995, 39: 69-92.
83. Begue-Kirn C, Smith A, Ruch J, Wozney J, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *International Journal of Developmental Biology*, 2004, 36: 491-503.
84. Begue-Kirn C, Smith A, Lorient M, Kupferle C, Ruch J, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast

- differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1994, 38: 405-420.
85. Finkelman R, Mohan S, Jennings J, Taylor A, Jepsen S, Baylink D. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF-IGF-II, and TGF- β in human dentin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1990, 5: 717-723.
 86. Cassidy N, Fahey M, Prime S, Smith A. Comparative analysis of transforming growth factor- β isoforms 1–3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of Oral Biology*, 1997, 42: 219-223.
 87. Roberts-Clark D, Smith A. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 1013-1016.
 88. Sloan A, Smith A. Stimulation of the dentine–pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1–3 in vitro. *Archives of Oral Biology*, 1999, 44: 149-156.
 89. Rutherford R, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Archives of Oral Biology*, 1993, 38: 571-576.
 90. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges J, Couble M, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF β 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of Dental Research*, 2000, 79: 1689-1696.
 91. Sloan A, Rutherford R, Smith A. Stimulation of the rat dentine–pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 173-177.
 92. Åberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Developmental Dynamics*, 1997, 210: 383-396.

93. Yang W, Harris M, Cui Y, Mishina Y, Harris S, Gluhak-Heinrich J. Bmp2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. *Journal of Dental Research*, 2012, 91: 58-64.
94. Walton R, Torabinejad M. Pulp and periradicular pathosis. *Principle and Practice of Endodontics*, 2002: 55-63.
95. Massler M. Pulpal reactions to dental caries. *International Dental Journal*, 1967, 17: 441.
96. Trowbridge H. Histology of pulpal inflammation. *Seltzer and Benders Dental Pulp. Carol Stream: Quintessence*, 2002: 227-245.
97. Kidd E, Bjørndal L, Beighton D, Fejerskov O. Caries removal and the pulp-dentinal complex. İçinde: *Dental Caries. the Disease and Its Clinical Management*, Blackwell Publishing Ltd, 2008.
98. Bayırlı G. *Pulpa patolojisi ve tedavileri*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul 1992: 235-290
99. Alaçam T, Uzel İ, Alaçam A, Aydın M. Endodonti. 2. Baskı. Ankara: Barış Yayınları, 2000: Bölüm 6.
100. Grossman LLI, Oliet S, Del Río C. *Endodontic practice*. Baskı. Lea & Febiger, 1988.
101. Torabinejad M, Handysides R, Khademi A, Bakland L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2002, 94: 658-666.
102. Mjör I. Initial reactions to tooth preparation. *Pulp-dentin biology in restorative dentistry*. Chicago: *Quintessence Books*, 2002: 23-38.
103. Nelson J, Carlos E, Cornyn J. Reactions of rat odontogenic tissues to heat. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology*, 1990, 70: 773-779.

104. Nyborg H, Brännström M. Pulp reaction to heat. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1968, 19: 605-612.
105. Kim S, Trowbridge H. Pulpal reaction to caries and dental procedures. *Pathways of the Pulp*. St. Louis: Mosby, 1998: 414-433.
106. Maria de Lourdes R, Holland R, Reis A, Bortoluzzi M, Murata S, Dezan E, Souza V, Alessandro L. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *Journal of Endodontics*, 2008, 34: 1-6.
107. Kunarti S, Subiyanto A. Genotoxicity test of propolis extract, mineral trioksida agregat, and calcium hydroxide on fibroblast BHK-21 cell cultures. *Dental Journal*, 2015, 48: 16-21.
108. Jahromi M, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *Journal of Dental Research, Dental clinics*, 2014, 8: 130.
109. Eymirli A, Serper A. Endodontide Kalsiyum Hidroksit Kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences Special Topics*, 2010, 1: 16-23.
110. Çalışkan M. *Endodontide tanı ve tedaviler*, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: 179-204.
111. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*, 2007, 40: 2-10.
112. Ribeiro D, Marques M, Salvadori D. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *Journal of Endodontics*, 2004, 30: 593-596.

113. Das S. Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral medicine*, 1981, 52: 76-84.
114. Hanks C, Bergenholtz G, Kim J. Protein synthesis in vitro, in the presence of Ca (OH) 2-containing pulp-capping medicaments. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1983, 12: 356-365.
115. Hasselgren G, Kerekes K, Nellestam P. pH changes in calcium hydroxide-covered dentin. *Journal of Endodontics*, 1982, 8: 502-505.
116. Ida K, Maseki T, Yamasaki M, Hirano S, Nakamura H. The pH values of pulp-capping agents. *Journal of Endodontics*, 1989, 15: 365-368.
117. Tronstad L, Andreasen J, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, 1981, 7: 17-21.
118. Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Ford T. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics*, 1995, 21: 349-353.
119. Camilleri J, Montesin F, Brady K, Sweeney R, Curtis R, Ford T. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials*, 2005, 21: 297-303.
120. Camilleri J, Pitt Ford T. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic Journal*, 2006, 39: 747-754.
121. Zhang H, Pappen F, Haapasalo M. Dentin enhances the antibacterial effect of mineral trioxide aggregate and bioaggregate. *Journal of Endodontics*, 2009, 35: 221-224.
122. Ruparel N, Teixeira F, Ferraz C, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endodontics*, 2012, 38: 1372-1375.

123. Bakland L, Andreasen J. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dental Traumatology*, 2012, 28: 25-32.
124. Oguntebi B, Heaven T, Clark A, Pink F. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. *Journal of Endodontics*, 1995, 21: 79-82.
125. Ford T, Torabinejad M, Abedi H, Bakland L, Kariyawasam S. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *The Journal of the American Dental Association*, 1996, 127: 1491-1494.
126. Zhou H-m, Shen Y, Wang Z-j, Li L, Zheng Y-f, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *Journal of Endodontics*, 2013, 39: 478-483.
127. Gupta A, Makani S, Vachhani K, Sonagria H, Attur K, Nayak R. Biodentine: An Effective Pulp Capping Material. *Sch. J. Dent. Sci.*, 2016; 3(1):15-19.
128. Tuncer D. Restoratif Diş Tedavisinde Pulpa Kaplamaları. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2016, 14: 94-103.
129. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska-Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 2013, 39: 743-747.
130. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine™ induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *International Endodontic Journal*, 2012, 45: 439-448.

131. Sheshmani BBDM In *Biodentin: The new bioactive cement for DPC*, The First International & 4th National Congress on health Education & Promotion, 2011, Tabriz university of medical sciences: 2011.
132. Bilgiç A, Bodrumlu E. Biyoseramik esaslı kök kanal patları: Derleme. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2016, 14: 111-117.
133. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal*, 2010, 43: 1116-1121.
134. Dohaitem A, Al-Nasser A, Al-Badah A, Al-Nazhan S, Al-Maflehi N. An in vitro evaluation of antifungal activity of bioaggregate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2011, 112: e27-e30.
135. Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z, Yan P. Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *Journal of Endodontics*, 2010, 36: 1145-1148.
136. Jung J, Woo S, Lee B, Koh J, Nör J, Hwang Y. Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 2015, 48: 177-184.
137. Rochet N, Balaguer T, Boukhechba F, Laugier J, Quincey D, Goncalves S, Carle GF. Differentiation and activity of human preosteoclasts on chitosan enriched calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 2009, 30: 4260-4267.
138. Rahimi S, Mokhtari H, Shahi S, Kazemi A, Asgary S, Eghbal M-J, Mesgariabbasi M, Mohajeri D. Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012, 17: e907-911.

139. Asgary S, Eghbal M, Ehsani S. Periradicular regeneration after endodontic surgery with calcium-enriched mixture cement in dogs. *Journal of Endodontics*, 2010, 36: 837-841.
140. Gandolfi M, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso M, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental Materials*, 2010, 26: 974-992.
141. Doğan B, Yıldırım H, Ağralı Ö. Mine Matriks Türevleri. Mine Matriks Türevleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Periodontology*, 2015, 1: 38-44.
142. Birkan Ö. Use of enamel matrix derivatives and autogenous bone graft combination in the treatment of periodontal intrabony defects. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2013, 3: 48-54.
143. Kudo D, Inden M, Sekine S, Tamaoki N, Iida K, Naito E, Watanabe K, Kamishina H, Shibata T, Hozumi I. Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro. *Neuroscience Letters*, 2015, 589: 92-97.
144. Kusum B, Rakesh K, Richa K. Clinical and radiographical evaluation of mineral trioxide aggregate, biodentine and propolis as pulpotomy medicaments in primary teeth. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 2015, 40: 276-285.
145. Parolia A, Thomas M, Kundabala M, Mohan M. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 2010, 2: 210-215.
146. Drago L, Mombelli B, Vecchi E, Tocalli M, Gismondo M. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *Journal of Chemotherapy*, 2000, 12: 390-395.

147. Mirzoeva O, Calder P. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1996, 55: 441-449.
148. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochemistry International*, 1990, 21: 593-597.
149. Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J, Shani J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *International Journal of Radiation Biology*, 1990, 57: 461-465.
150. Chen C, Weng M, Wu C, Lin J. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2004, 1: 175-185.
151. Matsuno T. Isolation and characterization of the tumoricidal substance from Brazilian propolis. *Honeybee Sci*, 1992, 13: 49-54.
152. Bogdanov S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, 2014, 1: 1-40..
153. Malhotra S, Gupta V. Use of propolis in pediatric dentistry. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 2014, 3: 93.
154. Banskota A, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 2001, 15: 561-571.
155. Agrawal N, Gupta N, Tewari R, Garg A, Singh R. Oral health from hive: potential uses of propolis in Dentistry. 2014.

156. Toreti V, Sato H, Pastore G, Park Y. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013.
157. Esmeraldo M, Carvalho M, Carvalho R, Lima R, Costa E. Inflammatory effect of green propolis on dental pulp in rats. *Brazilian oral research*, 2013, 27: 417-422.
158. Çimen M. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1999, 19: 296-304.
159. Hasan T, Rantanen T, Alanko K, Harvima R, Jolanki R, Kalimo K, Lahti A, Lammintausta K, Lauerma A, Laukkanen A. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995–1997 and 2000–2002 in Finland—a multicentre study. *Contact Dermatitis*, 2005, 53: 40-45.
160. Czarnobilska E, Obtulowicz K, Dyga W, Spiewak R. The most important contact sensitizers in Polish children and adolescents with atopy and chronic recurrent eczema as detected with the extended European Baseline Series. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2011, 22: 252-256.
161. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: a clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 1992, 73: 729-737.
162. Watts A, Paterson R. Pulpal response to a zinc oxide–eugenol cement. *International endodontic journal*, 1987, 20: 82-86.
163. Görgül G, Alaçam T, Ömürlü H, Karaoğlu T, Burgu İ. Yeni bir çinko oksit öjenol kanal patının sitotoksisitesinin değerlendirilmesi. *Acta Odontologica Turcica*, 1996, 13: 1-5.
164. Hume W. An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *Journal of dental research*, 1984, 63: 881-884.

165. Rowe A. Reaction of the rat molar pulp to various materials. *British dental journal*, 1967, 122: 291.
166. Tronstad L, Mjör I. Capping of the inflamed pulp. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 1972, 34: 477-485.
167. Holland R, Mello W, Souza V, Nery M, Bernabé P, Otoboni F. The influence of the sealing material in the healing process of inflamed pulps capped with calcium hydroxide or zinc oxide-eugenol cement. *Acta de odontologia pediatrica*, 1981, 2: 5-9.
168. Sela J, Ulmansky M. Reaction of normal and inflamed dental pulp to Calxyl and zinc oxide and eugenol in rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 1970, 30: 425-430.
169. Guyton K, Kensler T. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 523-544.
170. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, 1997, 3: 92-95.
171. Urso M, Clarkson P. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003, 189: 41-54.
172. Wyllie A, Kerr J, Currie A. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 1980, 68: 251-306.
173. Sinha A, Natale C, Santacroce R, Di Corcia M. Cell death: apoptosis versus necrosis. *International journal of oncology*, 2002, 21: 165-170.
174. Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. Redox Regulation of the Caspases during Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 854: 328-335.
175. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 1999, 13: 1899-1911.

176. Hockenbery D, Oltvai Z, Yin X, Milliman C, Korsmeyer S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *cell*, 1993, 75: 241-251.
177. Hart S. The drama of cellular death. *Bioscience*, 1994, 44: 451-455.
178. Cerri P, Freymüller E, Katchburian E. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *The Anatomical Record*, 2000, 258: 136-144.
179. Polverini P, Nor J. Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1999, 10: 139-152.
180. Onishi Y, Tanimoto Y, Kizaki H. Inflammation and apoptosis. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 1997, 38: 65-76.
181. Hughes D, Boyce B. Apoptosis in bone physiology and disease. *Molecular Pathology*, 1997, 50: 132.
182. Bamford M, Walkinshaw G, Brown R. Therapeutic applications of apoptosis research. *Experimental cell research*, 2000, 256: 1-11.
183. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 2007, 87: 99-163.
184. Walker N, Harmon B, Gobe G, Kerr J. Patterns of cell death. *Methods and achievements in experimental pathology*, 1987, 13: 18-54.
185. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, El-Deiry W, Golstein P, Green D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 2009, 16: 3-11.
186. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, 2005, 1: 112-119.

187. Van Hassel H. Physiology of the human dental pulp. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 1971, 32: 126-134.
188. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 277-285.
189. Forrest VJ, Kang Y, McClain D, Robinson D, Ramakrishnan N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 16: 675-684.
190. Regoli F, Winston G. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied pharmacology*, 1999, 156: 96-105.
191. Wataha J. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of prosthetic dentistry*, 2001, 86: 203-209.
192. Hanks C, Wataha J, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 1996, 12: 186-193.
193. Mestieri L, Gomes-Cornelio A, Rodrigues E, Salles L, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *Journal of Applied Oral Science*, 2015, 23: 467-471.
194. Eslaminejad M, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*, 2010, 7: 185-195.
195. Wennberg A. In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials—the millipore filter method. *International endodontic journal*, 1988, 21: 67-71.

196. Tang A, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *Journal of biomedical materials research*, 1999, 45: 214-222.
197. Babich H, Sinensky M. Indirect cytotoxicity of dental materials: a study with Transwell inserts and the neutral red uptake assay. *Alternatives to laboratory animals: Atla*, 2000, 29: 9-13.
198. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1979, 13: 109-120.
199. Guven G, Cehreli Z, Ural A, Serdar M, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *Journal of endodontics*, 2007, 33: 447-450.
200. Farhadmollashahi N, Ghotbi F, Karkeabadi H, Havaei R. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 2016, 10: 75.
201. Saberi EA, Karkehabadi H, Mollashahi NF. Cytotoxicity of Various Endodontic Materials on Stem Cells of Human Apical Papilla. *Iranian endodontic journal*, 2016, 11: 17-23.
202. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2015, 66: 181-188.

203. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson J. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *Journal of endodontics*, 2011, 37: 1691-1695.
204. Eid A, Hussein K, Niu L, Li G, Watanabe I, Al-Shabrawey M, Pashley D, Tay F. Effects of tricalcium silicate cements on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Acta biomaterialia*, 2014, 10: 3327-3334.
205. Bortoluzzi E, Niu L, Palani C, El-Awady A, Hammond B, Pei D, Tian F, Cutler C, Pashley D, Tay F. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dental Materials*, 2015, 31: 1510-1522.
206. Nikfarjam F, Beyer K, König A, Hofmann M, Butting M, Valesky E, Kippenberger S, Kaufmann R, Heidemann D, Bernd A. Influence of Biodentine®-A Dentine Substitute-On Collagen Type I Synthesis in Pulp Fibroblasts In Vitro. *PloS one*, 2016, 11: e0167633.
207. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 1996, 239: 70-76.
208. Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*, 2011, 37: 637-641.
209. Guven G, Cehreli S, Altun C, Cehreli Z, Serdar M, Ural A. The Effects of One-Step Self-Etch Adhesives on the Induction of Oxidative Stress and Production of TGF- β 1 and BMP-2 by Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, 20: 1597-1610.

210. Gülçin I. Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. *Journal of medicinal food*, 2011, 14: 975-985.
211. Niu L, Watson D, Thames K, Primus C, Bergeron B, Jiao K, Bortoluzzi E, Cutler C, Chen J, Pashley D. Effects of a discoloration-resistant calcium aluminosilicate cement on the viability and proliferation of undifferentiated human dental pulp stem cells. *Scientific reports*, 2015, 5-11.
212. Uzun İ, Bayındır F. Dental materyallerin biyouyumluluk test yöntemleri. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, 2011, 28: 115-122.
213. Issa Y, Watts D, Brunton P, Waters C, Duxbury A. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, 2004, 20: 12-20.
214. Sjögren G, Sletten G, Dahl J. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *The Journal of prosthetic dentistry*, 2000, 84: 229-236.
215. Pelliccioni G, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot™ MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, 15: 167-173.
216. Zhu Q, Haglund R, Safavi K, Spangberg L. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *Journal of endodontics*, 2000, 26: 404-406.
217. Bonson S, Jeansonne B, Lallier T. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *Journal of dental research*, 2004, 83: 408-413.
218. Okiji T, Yoshida K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *International Journal of Dentistry*, 2009, 2009.

219. Ali A, Najeh S. In vitro toxicity of propolis in comparison with other primary teeth pulpotomy agents on human fibroblasts. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 2015.
220. Koubi G, Colon P, Franquin J, Hartmann A, Richard G, Faure M, Lambert G. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clinical oral investigations*, 2013, 17: 243-249.
221. Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V, Lympieri S, Panopoulos P, Anastasiadou E, Kontakiotis EG. Interaction of dental pulp stem cells with Biodentine and MTA after exposure to different environments. *Journal of Applied Oral Science*, 2016, 24: 481-486.
222. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*, 2011, 37: 1240-1246.
223. Zanini M, Sautier J, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *Journal of endodontics*, 2012, 38: 1220-1226.
224. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He W. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *Journal of dentistry*, 2014, 42: 490-497.
225. Attik G, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosgeat B. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *International endodontic journal*, 2014, 47: 1133-1141.

226. Silva F, Almeida J, Sousa S. Natural medicaments in endodontics: a comparative study of the anti-inflammatory action. *Brazilian oral research*, 2004, 18: 174-179.
227. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of endodontics*, 2004, 30: 359-361.
228. Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 2005, 102: 371-376.
229. Saberi E, Farhadmollashahi N, Ghotbi F, Karkeabadi H, Havaei R. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 2016, 10: 75.
230. Balto H. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *Journal of endodontics*, 2004, 30: 25-29.
231. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *Journal of endodontics*, 2003, 29: 814-817.
232. Duarte M, de Oliveira Demarchi A, Yamashita J, Kuga M, de Campos Fraga S. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2003, 95: 345-347.
233. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *Journal of endodontics*, 2005, 31: 376-379.
234. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*, 2008, 41: 408-417.

235. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Annali di stomatologia*, 2014, 5: 69.
236. About I, Bottero M-J, de Denato P, Camps J, Franquin J, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Experimental cell research*, 2000, 258: 33-41.
237. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Developmental biology*, 1994, 162: 18-28.
238. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell biology international*, 2008, 32: 827-834.
239. Chang H, Chang M, Wu I. Transforming Growth Factor Beta 1–modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla of Human Tooth. 2015, 41: 1272-1280.
240. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of endodontics*, 2004, 30: 205-208.
241. Chen D, Zhao M, Mundy G. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, 2004, 22: 233-241.
242. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Journal of dental research*, 2004, 83: 590-595.

243. Kuru L, Griffiths G, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is up regulated in regenerating human periodontal cells. *Journal of periodontal research*, 1999, 34: 123-127.
244. Seo M, Hwang K, Lee J, Kim H, Baek S. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Journal of endodontics*, 2013, 39: 242-248.
245. Chang S, Kim J, Kim M, Kim G, Yi J, Lee D, Kum K, Kim E. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2016, 74: 298-306.
246. Rodrigues E, Cornélio A, Mestieri L, Fuentes A, Salles L, Rossa-Junior C, Faria G, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *International endodontic journal*, 2016.
247. Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn F, Kawai S, Gallea S, Stiot V, Blanchet A, Courtois B, Baron R. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β 1 on osteoblast differentiation. *Bone*, 2001, 29: 323-330.
248. Hwang Y, Hwang I, Park J, Lee D, Son H. Influence of TGF- β 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- β 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *Journal of molecular histology*, 2008, 39: 153-160.
249. Boukpepsi T, Décup F, Septier D, Chaussain-Miller C, Goldberg M In *RD94 In indirect pulp-capping situation induces reactionary dentin formation*, IADR-CED congress in Munich, Germany, 2009, 1: 9-12.

250. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele A. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *pediatric dentistry*, 2012, 34: 202e-208e.
251. Gomes-Cornélio A, Rodrigues E, Salles L, Mestieri L, Faria G, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *International endodontic journal*, 2016.
252. Yavlal G, Kargül B. The Evaluation of Cytotoxic and Regenerative Effects of Recently Used Pulpotomy Materials; at Cellular Level. 2015.
253. Ahangari Z, Naseri M, Jalili M, Mansouri Y, Mashhadiabbas F, Torkaman Pharm A. Effect of propolis on dentin regeneration and the potential role of dental pulp stem cell in Guinea Pigs. *Cell J*. 2012; 13 (4): 2230228. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2012, 13: 223.
254. Parolia A, Kundabala M, Rao N, Acharya S, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Australian dental journal*, 2010, 55: 59-64.
255. Ozório J, de Oliveira D, de Sousa-Neto M, Perez D. Standardized propolis extract and calcium hydroxide as pulpotomy agents in primary pig teeth. *Journal of Dentistry For Children*, 2012, 79: 53-58.
256. Moradi S, Saghravani N, Moushekhian S, Fatemi S, Forghani M. Immunohistochemical evaluation of fibronectin and tenascin following direct pulp capping with mineral trioxide aggregate, platelet-rich plasma and propolis in dogs' teeth. *Iranian endodontic journal*, 2015, 10: 188.
257. Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-

- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2003, 58: 580-589.
258. Bretz W, Chiego D, Marcucci M, Cunha I, Custódio A, Schneider L. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1998, 53: 1045-1048.
259. Sabir A, Tabbu C, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *Journal of oral science*, 2005, 47: 135-138.
260. Tilli C, Stavast-Kooy A, Ramaekers F, Neumann H. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *Journal of cutaneous pathology*, 2002, 29: 79-87.
261. Thorup K, Jacobsen K. BAX protein is not expressed by basal cell carcinomas. *British Journal of Dermatology*, 1998, 139: 472-474.
262. Delehedde M, Cho S, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar A, McDonnell T. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*, 1999, 85: 1514-1522.
263. Ramdial P, Madaree A, Reddy R, Chetty R. bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *Journal of cutaneous pathology*, 2000, 27: 283-291.
264. Cho S, Hahm J, Hong Y. Analysis of p53 and BAX mutations, loss of heterozygosity, p53 and BCL2 expression and apoptosis in basal cell carcinoma in Korean patients. *British Journal of Dermatology*, 2001, 144: 841-848.
265. Tacettinoğlu E. Vital pulpa tedavilerinde kullanılan materyallerin sitotoksik etkilerinin incelenmesi Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Diş Hekimliği Bölümü / Endodonti Anabilim Dalı, 2014.

266. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Ortolani-Seltenerich P, Álvarez Muro T, Lozano A, Forner L, Llena C, Moraleda J, Rodríguez-Lozano F. Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *International endodontic journal*, 2017.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Seçkin AKSU
Doğum tarihi	: 17.10.1990
Doğum yeri	: Konak / İzmir
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı 25240 ERZURUM
Tel	: 0536 526 72 71 / 0442 231 18 28
Faks	: 0442 236 09 45
E-mail	: dtseckinaksu@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: İzmir Atatürk Lisesi (2004-2008)
Lisans ve Yüksek Lisans	: Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2008-2013)
Uzmanlık	: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı (2014-2017)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: ÜDS: 77,5 / 2012 Sonbahar Dönemi

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURULU

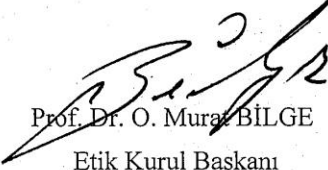
Sayı : 04

06 /01/ 2017

PEDODONTİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

03.01.2017 tarih ve 03 sayılı yazınız ekinde gönderilen ve Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ yöneticiliğinde yürütülmekte olan ve Arş. Gör. Dt. Seçkin AKSU ve Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU tarafından hazırlanan “*Çeşitli Pulpa Kaplama Materyallerinin İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerindeki Toplam Antioksidan Seviyesi, Toplam Oksidan Seviyesi ve Gen Ekspresyonu Analizlerinin Değerlendirilmesi*” konulu uzmanlık tezi çalışması ile ilgili etik kurul başvurusu kurulumuz tarafından incelenmiş olup, konu ile ilgili alınan karar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz ve rica ederim.


Prof. Dr. O. Murat BİLGE
Etik Kurul Başkanı

Eki: Etik Kurul Kararı

Adres: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı ERZURUM

Tel : (442) 2360942



T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURULU

Oturum Tarihi: 06/01/2017

Oturum Sayısı: 01/2017

KARAR

SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ Gör. Dt. Seçkin AKSU
Araştırmanın Açık Adı	Çeşitli Pulpa Kaplama Materyallerinin İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerindeki Toplam Antioksidan Seviyesi, Toplam Oksidan Seviyesi ve Gen Ekspresyonu Analizlerinin Değerlendirilmesi
Karar No	04.
Alınan Karar	Prof. Dr. Taşkın GÜRBÜZ yöneticiliğinde yürütülmekte olan ve Arş. Gör. Dt. Seçkin AKSU tarafından hazırlanan “ <i>Çeşitli Pulpa Kaplama Materyallerinin İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerindeki Toplam Antioksidan Seviyesi, Toplam Oksidan Seviyesi ve Gen Ekspresyonu Analizlerinin Değerlendirilmesi</i> ” konulu uzmanlık tezi çalışması, Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 19 Ağustos 2011 tarih ve 28030 sayılı “Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik” hükümlerine bağlı kalınarak yapılmak şartıyla kabul edilmesinde bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oybirliği ile karar verildi.


Prof. Dr. O. Murat BİLGE

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Nuran YANIKOĞLU

Prof. Dr. Yusuf Ziya BAYINDIR

Prof. Dr. Kezban Meltem ÇOLAK TOPÇU

Yrd. Doç. Dr. Ali KİKİ