



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**TRİKALSİYUM SİLİKAT ESASLI SİMANLARIN APİKAL  
PAPİLLA KÖK HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dt. Melike ÖZBEK  
Endodonti Anabilim Dalı

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Asiye Nur DİNÇER

KASIM 2021

## ONAY

**Kurum:** Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

**Programın Seviyesi:** Yüksek Lisans ( ) Uzmanlık (x) Doktora ( )

**Anabilim Dalı:** Endodonti Anabilim Dalı

**Tez Sahibi:** Melike ÖZBEK

**Tez Başlığı:** Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

### JÜRİ ÜYELERİ

### İMZA

Üye

(Danışman)

Doç. Dr. Asiye Nur DİNÇER

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

.....

Üye

Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Selen Nihal SİSLİ

Başkent Üniversitesi Adana Uyg. ve Araşt. Merkezi  
Yüreğir Başkent Hastanesi

.....

Üye (Yedek)

Doç. Dr. Makbule Bilge AKBULUT

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

.....

Üye (Yedek)

Dr. Öğr. Üyesi Durmuş Alperen BOZKURT

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

.....

## TEŞEKKÜR

Hocam olmasından gurur duyduğum, kıymetli tüm değerlere nasıl sahip çıkılabileceği konusunda bana örnek olan, mesleki çabanın dur durak bilmeden geliştirilmesi durumunda daha azimlisini göremeyeceğim, desteğini her zaman aldığım ve omzunda ellerini daima hissettiğim çok değerli hocam *Doç. Dr. Asiye Nur DİNÇER'e*

Bilgi birikimi ve tecrübesini asla esirgemeyen, öğrencisi olmaktan büyük mutluluk duyduğum, öğrettiklerinin ve güler yüzünün etkisinin hayatımdan asla silinmeyeceği çok kıymetli hocam, anabilim dalı başkanımız *Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER'e*

Endodontik bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra hayata dair de birçok konuda da fikrini aldığım için şanslı hissettiğim, gerektiğinde hoca, gerektiğinde abla, gerektiğinde arkadaş olup yanımda olan *Dr. Öğr. Üyesi Betül Aycan UYSAL'a*

Bilgi paylaşımının ve sohbetini hiçbir zaman doyamayacağım, hocalığı ve arkadaşlığı çok kıymetli olan *Uzm. Dt. Gamze NALCI'ya*

Uzmanlık eğitimimde ve tüm bu süreç boyunca karşılaştığım tüm zorluklarda üzerimde çok emeği olan, birçok kez destek ve yardımımı aldığım, fikirleri ve sevgisi benim için çok özel olan *Dr. Öğr. Gör. Fatma KAPLAN'a*

Endodontist olabilmemde ve bu süreçte ayakta durup ilerleyebilmemde yanımda olan *Dt. Gözde KOTAN'a*, *Dt. Çağrı CEYLİ'ye*, *Dt. Abdülkadir TİFTİK'e*, *Dt. Fuad SADIGLI'ya* ve *Dt. Nurefşan GÜRSOY'a*

Canım arkadaşlarım *Uzm. Dt. Gülsün AYDOĞMUŞ'a*, *Dt. Meryem ÇAKIR'a*

Çok sevgili babam *Osman ÖZBEK'e*, annem *Serpil ÖZBEK'e* ve dayım *Selçuk SIZI'ya*

Hayatıma katkısı varlığıyla başlayıp ömrüm boyunca sürececek olan biricik kardeşim *Fatma Meltem ÖZBEK'e*

En derin duygularıyla teşekkür ederim.

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Melike ÖZBEK

## İÇİNDEKİLER

ONAY .....	II
TEŞEKKÜR.....	III
BEYAN.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ .....	VIII
TABLO LİSTESİ .....	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY .....	XIII
1.GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Kök Hücreler.....	3
2.1.1 Karakterizasyon.....	5
2.2 Büyüme Faktörleri .....	6
2.3 İskele .....	7
2.4 Mineral Trioksit Agregat .....	12
2.4.1 Kimyasal Özellikler .....	13
2.4.2 Fiziksel Özellikler .....	15
2.4.3 Biyolojik Özellikler-Biyoyumluluk .....	23
2.5 Çalışmada Kullanılan Canlılık Testi ve Farklılaşma Değerlendirme Yöntemleri .....	26

2.5.1 MTS .....	26
2.5.2 Alizarin Red Boyama.....	28
2.5.3 Alkalen Fosfataz.....	29
2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR).....	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	32
3.1 Etik Kurul Onayı.....	32
3.2 Hastaların Dahil Edilme Kriterleri .....	32
3.3 Hücre Kültürünün Elde Edilmesi .....	33
3.4 Apikal Papilla Kök Hücrelerin Pasajlanması.....	34
3.5 Akış Sitometrisi Yöntemi ve Kök Hücre Karakterizasyonu .....	36
3.6 MTA Disklerinin Hazırlanması .....	37
3.7 Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve MTS ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi...40	
3.7 Alkalın Fosfataz Aktivitesi İle Odontojenik Farklılaşmanın İncelenmesi.....	41
3.8 Alizarin Red Boyama ile Kalsifikasyon Odaklarının Görülmesi.....	42
3.9 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR) .....	44
3.10 İstatistiksel Analiz.....	46
4.BULGULAR .....	47
4.1 SCAP Karakterizasyonu.....	47
4.2 MTS ile SCAP Canlılığının Değerlendirilmesi.....	47
4.3 Alkalın Fosfataz Aktivitesi.....	49
4.4 QRT-PCR Bulguları .....	50
4.5 Alizarin Red Boyama .....	53
5.TARTIŞMA .....	55
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64

7.KAYNAKLAR .....	65
8.EKLER.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>HERS</b>	Hertwing epitel kını
<b>MTA</b>	Mineral trioksit agregat
<b>RET</b>	Rejeneratif endodontik tedavi
<b>SCAP</b>	Apikal papilla kök hücreleri
<b>iPAPC</b>	İnflamatuvar periapikal progenitör hücreler
<b>DFSC</b>	Diş folikülü kök hücreleri
<b>DPSC</b>	Diş pulpası kök hücreleri
<b>PDLSC</b>	Periodontal ligament kök hücreleri
<b>BMSC</b>	Kemik iliği kök hücreleri
<b>TGPC</b>	Diş germ progenitör hücreleri
<b>SGSC</b>	Tükürük bezi kök hücreleri
<b>SHED</b>	Süt dişlerinden elde edilen kök hücreler
<b>OESC</b>	Oral epitelyal kök hücreleri
<b>GMSC</b>	Dişeti kaynaklı mezenkimal kök hücreler
<b>PSC</b>	Periosttan elde edilen kök hücreler
<b>MSC</b>	Mezenkimal kök hücre
<b>FACS</b>	Floresan antikor hücre sınıflandırması
<b>TGF-Beta</b>	Transforme edici büyüme faktörü beta
<b>BMP</b>	Kemik morfojenik proteinlerinden
<b>IGF-1</b>	İnsülini benzeri büyüme faktörü-1
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>PDGF</b>	Platelet kökenli büyüme Faktörü
<b>PRP</b>	Trombositten zengin plazma
<b>ECGF</b>	Epitelyal hücre büyüme faktörü
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>PLGA-PEG</b>	Polilakti-ko-glikolik asit-polietilenglikol
<b>MTA</b>	Mineral trioksit agregat
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>SiO<sub>2</sub>,</b>	Silikon Dioksit
<b>CaO,</b>	Kalsiyum Oksit
<b>MgO,</b>	Magnezyum Oksit
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Potasyum Sülfat
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sodyum Sülfat
<b>PC</b>	Portland çimentosu
<b>3CaO·SiO<sub>2</sub></b>	Trikalsiyum Silikat
<b>2CaO·SiO<sub>2</sub></b>	Dikalsiyum Silikat
<b>WMTA</b>	Beyaz mineral trioksit agregat

<b>GMTA</b>	Gri mineral trioksit agregat
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskobu
<b>FeO</b>	Demir Oksit
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Alüminyum Oksit
<b>KH</b>	Kalsiyum hidroksit
<b>IRM</b>	Ara restoratif materyal
<b>pH</b>	Hidrojen gücü (power of hydrogen)
<b>°C</b>	Santigrad derece
<b>HBSS</b>	Hank'in dengeli tuz çözeltisi
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalsiyum Klorür
<b>Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Bizmut Oksit
<b>Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Tantalum Oksit
<b>mm</b>	Milimetre
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>PDL</b>	Periodontal ligament
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>ZOE</b>	Çinko oksit öjenol
<b>MTS</b>	(5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil tiyazol)-3-(4sülfofenil) Tetrazolyum
<b>nm</b>	Nanometre
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub></b>	Alizarin red
<b>ALP</b>	Alkalen fosfataz
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>OCN</b>	Osteokalsin
<b>Col1A1</b>	Tip I kollajen
<b>RUNX2</b>	Runt bağımlı transkripsiyon faktörü
<b>DMEM</b>	Dulbecco'nun modifiye edilmiş temel ortamı
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>PSA</b>	Penisilin streptomisin amfoterisin
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS</b>	Dimetilsülfoksit
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsiyum
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>CD</b>	Yüzey farklılaşma antijeni

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b> Kullanılan siman çeşitleri ve içerikleri .....	38
<b>Tablo3. 2</b> Primer Listesi.....	46



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3. 1: Kabin .....	33
Şekil 3. 2: DMEM .....	34
Şekil 3. 3 : İnkübatör .....	34
Şekil 3. 4 : PBS.....	35
Şekil 3. 5: Tripsin EDTA.....	36
Şekil 3. 6 : Santrifüj.....	36
Şekil 3. 7 : Akış Sitometri Cihazı .....	37
Şekil 3. 8 : MTA Diskleri .....	39
Şekil 3. 9 : UV ile Sterilizasyon .....	40
Şekil 3. 10 : Hazırlanmış MTS Solüsyonu .....	41
Şekil 3. 11 : Elisa Reader.....	41
Şekil 3. 12 : Hürelere boya eklenmeden önce.....	42
Şekil 3. 13 : Alizarin Red Boyası .....	43
Şekil 3. 14 : Alizarin Red ile boyanan hücreler.....	43
Şekil 3. 15 : Işık mikroskobu.....	44
Şekil 3. 16 : Spektrofotometre .....	45
Şekil 3. 17 : Bio-Rad RT-PCR cihazı.....	45
Şekil 4 . 1 : MTS testi sonuçları.....	48
Şekil 4 . 2 : Alkalın fosfataz aktivitesi oranları .....	49
Şekil 4 . 3: OCN gen ekspresyonu oranları .....	51
Şekil 4 . 4: RUNX2 gen ekspresyonu oranları .....	51
Şekil 4 . 5: COL1A1 gen ekspresyonu oranları.....	52
Şekil 4 . 6 : Boyama öncesi ışık mikroskobu ile hücrelerin görünümleri.....	53
Şekil 4 . 7: Boyama sonrası ışık mikroskobu ile hücrelerin görünümleri .....	54

## ÖZET

### TRİKALSİYUM SİLİKAT ESASLI SİMANLARIN APİKAL PAPİLLA KÖK HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Bu tez çalışmasının amacı trikalsiyum silikat esaslı simanların apikal papilla kök hücrelerine (SCAP) etkisinin sitotoksosite ve odontojenik farklılaşma açısından değerlendirilmesidir.

Trikalsiyum silikat içerikli olan ProRoot WMTA (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN, ABD), Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL), Pd MTA White (Produits Dentaires SA, İsviçre) simanlardan 5x2 boyutunda diskler elde edildi (n=3). Apeksi açık çekilmiş yirmi yaş dişlerinden SCAP hücreleri kültüre edildi. Simanların SCAP üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil tiyazol)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum) yöntemi kullanıldı. Ayrıca odontojenik farklılaşma için alkalın fosfataz aktivitesi değerlendirildi. PCR yöntemi ile OCN (Osteokalsin), col1A1 (kollajen 1), RUNX2 (Runt-related transcription factor2) gen ekspresyonları incelendi. Sert doku oluşumunun görsel olarak değerlendirilmesi amacıyla Alizarin Red boyama yapıldı. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ve ardından GraphPad Prism 5 yazılımı kullanılarak çoklu karşılaştırma Anova Tukey testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanıldı ve  $p<0,05$  olması durumunda anlamlı farklılığın olduğu kabul edildi.

Sitotoksosite 1., 4., 7. ve 14. günlerde MTS yöntemi ile test edildi. 1. ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. 7. ve 14. Gün ProRoot WMTA ile Neo MTA Plus gruplarının kontrol grubuna göre canlılık üzerinde etkisinde anlamlı farklılık gözlenmezken; Pd MTA White grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p<0,05$ ). MTA çeşitleri arasında en düşük ALP aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Pd MTA White grubunda olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Odontojenik farklılaşma konusunda aktif olması beklenen üç farklı gende de Neo MTA Plus, Pd MTA White ve ProRoot WMTA gruplarında ekspresyon gözlemlendi. Tüm MTA çeşitleri negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Çalışmada incelenen tüm MTA gruplarında kalsifiye odaklar Alizarin Red boyama ile izlendi.

Yapılan bu *in vitro* çalışmanın bulguları göz önüne alındığında trikalsiyum silikat esaslı bu üç MTA'nın SCAP üzerinde farklı sitotoksik ve odontojenik farklılaşma etkileri olduğu görülmüştür. Farklı trikalsiyum silikat esaslı simanların, çeşitli ve birbirini destekleyen yöntemlerle hem *in vivo* hem de *in vitro* ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** MTA, MTS, Sitotoksosite, Odontojenik farklılaşma

## SUMMARY

### EFFECTS OF TRICALCIUM SILICATE BASED CEMENTS ON APICAL PAPILLA STEM CELL SURVIVE

The purpose of this thesis is to evaluate the effect of tricalcium silicate based cements on apical papilla stem cells (SCAP) in terms of cytotoxicity and odontogenic differentiation.

5x2 discs were obtained from ProRoot WMTA (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN, USA), Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL), Pd MTA White (Produits Dentaires SA, Switzerland) cements containing tricalcium silicate (n=3). SCAP cells were cultured from wisdom teeth with open apex. The MTS (5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethyl thiazole)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium) method was used to evaluate the cytotoxic effect of cements on SCAP. Also, alkaline phosphatase activity was surveyed for odontogenic differentiation. Osteocalcin (OCN), Type I collagen (Col1A1), RUNX2 (Runt-related transcription factor2) gene expressions were analyzed by PCR method. Alizarin Red staining was performed for the visualization of hard tissue formation. The statistical analysis was performed using one-way analysis of variance followed by multiple comparison Anova Tukey test using GraphPad Prism 5 software. In all statistical evaluations, 0.05 was used as the level of significance and accepted that there was a significant difference when test results indicated  $p < 0.05$ .

Cytotoxicity was tested on the 1st, 4th, 7th and 14th days by the MTS method. No statistically significant difference was observed on the 1st and 4th days. While there was no significant difference at the effect of ProRoot WMTA and Neo MTA Plus groups on viability compared to the control group; a statistically significant decrease was observed in the Pd MTA White group ( $p < 0.05$ ) at 7th and 14th days. Among the MTA varieties, the lowest ALP activity was found to be statistically significant in the Pd MTA White group ( $p < 0.05$ ). Expression of three different genes which were expected to be active in odontogenic differentiation was observed in Neo MTA Plus, Pd MTA White and ProRoot WMTA groups. All MTA varieties were found to be statistically significantly higher than the negative control group ( $p < 0.05$ ). In all MTA groups which were examined in the study, calcium deposits observed with the method Alizarin Red staining.

Considering the findings of this *in vitro* study, it was observed that these three tricalcium silicate-based MTAs had different cytotoxic and odontogenic differentiation effects on SCAP. There is a need for further studies of different tricalcium silicate based cements, both *in vivo* and *in vitro*, with various and mutually supportive methods.

**Keywords:** MTA, MTS, Cytotoxicity, Odontogenic differentiation

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Diş gelişimi; tomurcuk, takke, çan aşamalarını, diş kökü gelişimini ve diş sürmesini içeren karmaşık bir fizyolojik süreçtir [1, 2].

Diş epitel ve nöral krest kaynaklı mezenkimal hücreler arasındaki etkileşim diş gelişimi için gereklidir. Kuron oluşumu neredeyse tamamlandıktan sonra, Hertwing epitel kımı (HERS) adı verilen epitel kılıfının çift tabakasının rehberliğinde diş kökü gelişmeye başlar. HERS, dış ve iç mine epitelinden oluşur ve apikal yönde büyür [3].

Olgunlaşmamış (immatür) dişlerde pulpa nekrozu meydana geldiğinde kök gelişimi durur ve apikal kapanma sağlanamaz. Bu durumda kanal tedavisi yapmak, kanalın boyutu, ince ve kırılğan dentin duvarları ve geniş açık apeks nedeniyle zor bir durumdur [4].

Olgunlaşmamış dişin pulpa nekrozu tedavisinde amaç, apikal periodontitis oluşumunu önlemek veya iyileştirmek, devam eden kök gelişimini teşvik etmek ve özellikle hem immünolojik hem de duyuşal perspektiflerden pulpal dokusunun fonksiyonel yeterliliğini geri kazandırmaktır [5]. Ne yazık ki, alternatif prosedürler (örneğin implantlar), bu genç hastalarda hala büyüyen kraniyofasiyal iskelet nedeniyle sıklıkla kontrendikedir [6].

Nekrotik pulpalı/apikal periodontitisli kök ucu kapanmamış (immatür) kalıcı dişler, geleneksel olarak kök kanal dolgusundan önce apikal sert doku bariyeri oluşumunu indüklemek için kalsiyum hidroksit(KH) kullanılarak çoklu seanslarla ya da apikalde mineral trioksit agregat (MTA) tıkaçları ile tek seansta apeksifikasyon prosedürleriyle tedavi edilmektedir [7].

İmmatür kalıcı dişlerin uzun süreli kalsiyum hidroksit tedavisi, kök kırığı riskini arttırmaktadır [8]. Apikaldeki açıklığın MTA ile tıkaçlanması tedavi süresini

kısaltabilmektedir [7]. Kalsiyum hidroksit apeksifikasyonunun ve apikal MTA tıkaçının tedavi başarısı benzerdir. Apeksifikasyon prosedürlerinin kanal boşluğundaki nekroze dokunun canlılığını geri kazanma ve kök olgunlaşmasını (kök kanal duvarlarının kalınlaşması ve/veya apikal kapanma) destekleme potansiyeli bulunmamaktadır [4].

Diş hekimliğinde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında çalışmaların yapılması ile, rejeneratif endodontik prosedürlerin rutin klinik uygulama olabilmesi için prosedürler ve protokoller geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır [9].

Bu çalışmalar doğrultusunda rejeneratif endodontik tedavi prosedürü oluşturulmuştur ve gelişmeye devam etmektedir. Kök kanalında rejenerasyonu sağlamak için temizlenen kök kanalına kök hücrelerin yerleştirilmesi sonrası kanal ağızları trikalsiyum silikat içerikli simanlar ile kapatılmaktadır [10]. Yaptığımız çalışmada rejeneratif endodontik tedavide apikal papilla kök hücreleri ile temasta bulunan üç farklı MTA çeşidinin (ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White) sitotoksik etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Piyasada kolay bulunabilir bir MTA çeşidi olmasına rağmen Pd MTA White ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma mevcut değildir. Pd MTA White 'ın diğer MTA çeşitleri ile sitotoksite ve sert doku oluşumuna etkisini karşılaştırmak da çalışmanın amaçlarındanındır. MTA çeşitlerinin odontojenik farklılaşmaya olan etkileri alkalın fosfataz aktivitesi ve tip I kollajen, osteokalsin, Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü (RUNX2) genleri üzerindeki ekspresyon seviyeleri düzeyinde incelenmiştir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

Rejeneratif endodontik tedavi (RET), nekrotik pulpalı immatür daimi dişlerin enfeksiyon, travma veya gelişimsel anomalisi nedeniyle hasar gören pulpa-dentin kompleksini yenilemeyi amaçlayan biyoloji temelli tedavi yöntemidir [10]. Bu tedavi yönteminin temel amacı, apikal dokularda önceden var olan kök hücrelerden rejenerasyon yaparak veya uzaktaki kök hücreleri dezenfekte edilmiş kök kanalına yerleştirerek, pulpa veya pulpa benzeri dokuya farklılaşmalarını kolaylaştıracak koşulları sağlayarak pulpanın işlevini eski haline getirmektir [11].

Nygaard Ostby kök kanalı dezenfekte edildikten sonra, dişin periapexindeki kök hücrelerin yeni doku oluşumu için iskele görevi görebileceğini göstermiştir.[12].

1993-2007 döneminde doku mühendisliği alanında önemli gelişmeler elde edilmiştir [13]. Doku mühendisliği, biyoloji ve mühendislik alanlarını doku onarımı yerine doku rejenerasyonuna odaklanan bir disipline entegre etmektedir. Doku rejenerasyonu meydana gelmesi için şu unsurlar gerekmektedir: Hedeflenen dokuya uygun bir kök/progenitör hücre kaynağı, büyüme faktörleri ve yapı iskeleleri [6].

### **2.1 Kök hücreler**

Kök hücreler pluripotent ve multipotent hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Pluripotent kök hücreler, üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ait özelleşmiş hücreler olma kapasitesine sahiptir. Multipotent kök hücreler de farklılaşma kapasitesine sahiptir, ancak yalnızca türetildikleri dokunun özel hücrelerine dönüşürler. Gerçek pluripotent kök hücreler yalnızca gelişmekte olan embriyoda veya somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere indüksiyonu sonrasında görülmektedir [14].

Oral bölgedeki dokularda farklı kök hücre popülasyonları tanımlanmıştır. Bunlar arasında apikal papilla kök hücreleri (SCAP), inflamatuvar periapikal progenitör hücreler (iPAPC), diş folikülü kök hücreleri (DFSC), diş pulpası kök hücreleri (DPSC), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC), kemik iliği kök hücreleri (BMSC), diş germ progenitör hücreleri (TGPC), tükürük bezi kök hücreleri (SGSC), dökülen süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHED), oral epitelyal kök hücreleri (OESC), dişeti kaynaklı mezenkimal kök hücreler (GMSC) ve periosttan elde edilen kök hücreler (PSC) bulunur [15, 16].

Apikal papilla ve onun yerleşik kök hücreleri (SCAP) ilk olarak 2006 yılında tanımlanmıştır [17]. Apikal papilla, büyük proliferatif ve odontojenik farklılaşma kapasitesine sahip farklılaşmamış mezenkimal kök hücre (MSC)'lerin yoğun bir rezervuarıdır [18, 19]. SCAP, Hertwing epitelyal kök kılıfı tarafından, kök gelişimini ve şeklini belirleyen bir dizi karmaşık epitelyal-mezenkimal etkileşim yoluyla düzenlenmektedir. Ayrıca, apikal papillanın kök kanal boşluğu ile süreklilik içinde dişlerin apekslerine yakınlığı, bu zengin kök hücre kaynağını RET için hazır hale getirmektedir [20]. 2011 yılında rejeneratif işlemlerde uyarılmış kanama basamağını takiben mezenkimal kök hücre varlığını değerlendirmek için bir çalışma yapılmıştır. Rejeneratif prosedürler sırasında kök kanallarına önemli miktarda mezenkimal kök hücre akışı olduğu ve bunun MSC belirteçlerinin ekspresyonunda 700 kattan fazla bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu hücreler klinik örneklerden toplanabilir ve eş odaklı mikroskop altında incelenebilmektedir. Bu çalışma RET'lerin kök hücre temelli tedaviler olduğunu göstermektedir [21].

Komşu diş pulpasına kıyasla apikal papilladaki kan damarlarının nispeten düşük yoğunlukta olmasına rağmen, apikal papillayı çevreleyen diş folikülünde yüksek oranda bulunmaktadır. Bu vaskülarize bölge SCAP'ye besin sağlamak için kılcal bir yatak görevi görmektedir. SCAP, dental folikül gibi apikal çevre dokulardan ve apikal periodontitiste bulunan çok vaskülarize granülomatöz dokudan difüzyon yoluyla besin ve oksijen alma yeteneğine sahiptir. Ayrıca hipoksik ortamların dental kök hücrelerin proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve anjiyojenik potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, SCAP

ve çevresindeki kök hücrelerin, apikal periodontitis ve apikal apseler gibi olumsuz koşullarda hayatta kalmak ve farklılaşma potansiyellerini sürdürmek üzere donatıldığı görülmektedir [22-25].

Apikal papilla kök hücreleri de gelişmekte olan insan daimi dişlerinin apeksinde bulunan yumuşak dokudan izole edilmektedir. DPSC'ler tarafından sergilenen potansiyele benzer şekilde, SCAP *in vitro* olarak odontoblastlara, sementoblast benzeri hücrelere, adipositlere ve bağ dokusuna farklılaşabilmektedir [17]. Hayvan modellerini kullanan *in vivo* çalışmalar, SCAP'nin odontojenik kapasitesini ortaya çıkarmıştır [18]. DPSC'ler ile karşılaştırıldığında, SCAP gelişmiş proliferasyon oranları ve mineralizasyon potansiyeli sergilemektedir [26]. DPSC'ler ve SCAP, çekim endikasyonu olan kalıcı dişlerden elde edilebilir. SHED, düşme zamanı gelen süt dişlerinden minimal invaziv işlemler ile elde edilebilir, bu da onları nispeten zengin bir MSC kaynağı yapar ve kolay erişilebilir otolog bir hücre kaynağı sunar. Toplu olarak, tüm bu kök hücreler diş dokusu mühendisliği için, özellikle dentin/pulpa doku rejenerasyonu alanında potansiyel göstermektedir [27].

### 2.1.1 Karakterizasyon

MSC'leri tanımlamak için gereken minimum kriterleri tanımlayan bir bildiri yayımlanmıştır. Bu kriterler [28]:

- Hücrelerin plastiğe yapışması ve kültüre edildiğinde fibroblast benzeri morfolojiye sahip koloniler oluşturması gerekmektedir.
- Yüzey belirteçleri arasında CD45 ifadesi eksik olmalı; CD105, CD73 ve CD90 bulunmalıdır.
- Farklılaşma kapasiteleri için, MSC'ler *in vitro* olarak osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere farklılaşabilmelidir.

Kök hücreler, yaygın olarak kullanılan dört teknikle karışık hücre popülasyonlarından tanımlanıp izole edilmektedir:

1. Hücrelerin spesifik antikor belirteçleri ile boyanması ve floresan antikor hücre sınıflandırması (FACS) adı verilen bir işlemde bir akış sitometresi kullanılması;
2. İmmünomanyetik boncuk kullanımı;
3. İmmünohistokimyasal boyama;
4. Fenotip, kemotaksis, proliferasyon, farklılaşma ve mineralizasyon aktivitesi dahil fizyolojik ve histolojik kriterler.

FACS, protein belirteci CD34 ile birlikte, CD34 eksprese eden insan kök hücrelerini periferik kandan, göbek kordonu kanından ve hücre kültürlerinden ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [29]. Farklı kök hücre türleri, genellikle zarlarında farklı proteinler bulunmaktadır ve bu nedenle aynı kök hücre protein belirteci tarafından tanımlanmaz. En çok çalışılan diş kök hücreleri pulpal kök hücrelerdir. Dental pulpa kök hücreleri, von Willebrand faktörü CD146, alfa düz kas aktin ve 3G5 proteinlerini eksprese etmektedir[30]. Dental pulpa kök hücreleri ayrıca spesifik proliferasyon, farklılaşma ve mineralize edici aktivite paternleri olan bir fibroblast fenotipine sahiptir [31].

## **2.2 Büyüme faktörleri**

Büyüme faktörleri, hücre üzerindeki reseptörlere bağlanan ve hücreyel çoğalma ve/veya farklılaşmayı indükleyen proteinlerdir [32]. Birçok büyüme faktörü oldukça çok yönlüdür, çok sayıda hücre tipinde hücreyel bölünmeyi uyarır, diğerleri ise daha hücreye özgüdür [33]. Kök hücre ve doku mühendisliği tedavilerinin bir parçası olarak kullanılacak belirli işlevlere sahip çeşitli büyüme faktörleri tanımlanmıştır [34-36]. Proliferasyon hızını artırmak, hücrelerin başka bir doku tipine farklılaşmasını indüklemek, mineralize matrisi sentezlemek ve salgılamak için uyararak gibi birçok kök hücre aktivitesini kontrol etmek için kullanılmaktadır [37, 38].

Dentin, doku yanıtlarını uyarabilen birçok protein içerir. Diş dokularının demineralizasyonu, kavite aşındırma ajanlarının, restoratif materyallerin ve hatta

çürüklerin uygulanmasının ardından büyüme faktörlerinin salınmasına neden olmaktadır [39]. Kalsiyum hidroksitin terapötik etkisinin önemli bir kısmı, büyüme faktörlerinin dentin matrisinden salınmasını sağlamaktır [40]. Serbest salınımdan sonra, bu büyüme faktörleri, pulpa-dentin onarımının bir yanıtı olan üçüncül dentinogenezin birçok olayının sinyalizasyonunda anahtar rol oynamaktadır [41, 42].

Büyüme faktörleri, özellikle transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-  $\beta$ ), odontoblast farklılaşması için hücresel sinyalleşmede ve dentin matrisi sekresyonunun uyarılmasında etkili olmaktadır. Bu büyüme faktörleri odontoblastlar tarafından salgılanmaktadır ve dentin matrisinin içinde birikir ve burada dentin matrisinin diğer bileşenleri ile etkileşim yoluyla aktif bir formda korunmaktadır [43, 44]. Saflaştırılmış dentin protein fraksiyonlarının eklenmesi, üçüncül dentin matrisi sekresyonunda bir artışı uyarmaktadır [45].

Diş gelişiminde ve rejenerasyonda bir diğer önemli büyüme faktörü grubu, kemik morfojenik proteinlerinden (BMP) oluşmaktadır [45, 46]. Rekombinant insan BMP2'si, kültürde yetişkin pulpa kök hücrelerinin bir odontoblastoid morfolojisine farklılaşmasını uyarmaktadır [47-49]. TGF-  $\beta$  1-3 ve BMP7'nin benzer etkileri bulunmaktadır [50, 51]. Rekombinant BMP 2, 4 ve 7 *in vivo* olarak onarıcı dentin oluşumunu indüklemektedir [52, 53]. Rekombinant insan insülini benzeri büyüme faktörü-1(IGF-1)'in kollajen ile birlikte uygulanmasının, dentin köprüsü oluşturmayı ve tübüler dentin oluşumunu indüklediği bulunmuştur. Bu, pulpa kuafajından önce büyüme faktörlerinin eklenmesi veya dentin ve pulpa rejenerasyonunu uyarmak için bu faktörleri restoratif ve endodontik materyallere dahil etme potansiyelini göstermektedir [54].

### 2.3 İskele

SCAP'ın hayatta kalmasını ve farklılaşmasını desteklemesi için, kök kanalının fiziksel ve biyokimyasal mikro ortamını taklit edecek bir iskele tedavi için gerekli faktörlerden biridir. Bu iskeleler uygun bir şekilde sunulan büyüme faktörlerini ve diğer

biyoaktif molekülleri içermelidir. Ayrıca SCAP yapışmasını ve göçünü destekleyen hücre dışı matrisi de içermelidir. Bu şekilde doku rejenerasyonu için bir şablon görevi görmesi amaçlanmaktadır [55]. TGF-  $\beta$ 1, BMP-2, VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve PDGF (Platelet Kökenli Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörlerini içeren yapı iskeleleri ayrıca odontojenik farklılaşmayı ve pulpal revaskülarizasyonu destekler [56].

Birkaç çalışma, bir iskele yokluğunun, SCAP'nin kök kanal sistemine girmesini ve canlı hücrelerin kanal duvarlarına yapışmasını engellediğini ve bu nedenle pulpa-dentin kompleksini yenilenmediğini belirlemiştir. Bu durum, başarılı bir RET'e sahip olmak için doku büyümesinde şablon olarak hizmet etmek üzere bir SCAP iskelesinin gerekliliğini açıkça göstermektedir [57, 58].

SCAP'ın hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklemek için uygun bir iskele seçilirken, şunlar dikkate alınmalıdır [55, 59]:

- a. Biyouyumlu olmalı; SCAP canlılığını ve odontojenik farklılaşmayı desteklemeli ve biyolojik olarak konağa zarar vermeyen ürünlere dönüşmelidir;
- b. Hücre göçüne, vaskülarizasyona ve ayrıca besinlerin ve atıkların yayılmasına izin vermek için yeterli, kontrol edilebilir gözenekliliğe sahip yapısı olmalı;
- c. Etkilenen dişin konumuna ve anatomisine uygun mekanik özellik göstermeli;
- d. Biyolojik olarak çözünebilir olmalı, öyle ki olgun hücreler yapı iskelesinin tamamen yerini alabilmelidir. Sert doku oluşumu RET'in bir hedefi olsa da, dentinin yüksek mineral içeriği ve kırılmaya karşı direnci artıran üstün fiziksel özellikleri nedeniyle dentin oluşumu semente tercih edilmektedir.
- e. Klinik uygulanabilir olması için, endodontik bir biyomateryal, hastalar ve diş hekimleri için uygun maliyette olmalıdır [60].

Kanamamın indüklenmesi ve kanal içi kan pıhtısı oluşumu ile iskele elde edilmesi rejeneratif endodontide kullanılan güncel bir prosedürdür [61]. Apeksleri açık immatür dişlerde, indüklenmiş kanama, SCAP'ın dişin periradiküler dokularından apikal foramen yoluyla kök kanal boşluğuna iletilmesiyle sonuçlanır ve böylece yabancı kök hücre enjekte etme ihtiyacını ortadan kaldırır [57]. İndüklenmiş kanama ayrıca endojen hemostatik faktörlerin kanal boşluğuna girmesine ve SCAP'nin hayatta kalması ve büyümesi için gerekli süreçleri destekleyen bir fibrin oluşturmasına izin verir. Kanal içi kan pıhtısının avantajları, SCAP göçünü, farklılaşmasını, vaskülarizasyonunu ve doku rejenerasyonunu desteklemek için gerekli büyüme faktörlerini içeren çapraz bağlı fibrinden oluşan otolog bir yapı iskelesi sağlaması ve bir yabancı cisim tepkisine neden olmamasıdır [58, 61, 62].

Kanal içi kan pıhtılarının kullanımını karmaşıklaştıran zorluklar arasında, kök hücrenin kanal boşluğuna düzensiz girişinin bir sonucu olarak kararsızlıkları ve öngörülemeyen klinik sonuçları ile bazı hastalarda kanama ve hemostaz başlatmadaki zorluklar yer almaktadır [62]. Bu olumsuzluklara engel olmak ve daha tutarlı, etkili yapı iskeleleri için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte, kanal içi kan pıhtısının son derece elverişli ve klinik olarak uygulanabilir özellikleri göz önüne alındığında, güvenilirliğini artırmak için stratejilerin araştırılması, bu iskeleyi RET için altın standart olarak güvence altına almaktadır [60].

Endodontik iskelelerin, önceden form verilmiş veya enjekte edilebilir çeşitleri de geliştirilmektedir. Önceden form verilmiş iskeleler, hedef konumda sabitlendiğinde sabit kalan kesin üç boyutlu yapıya sahipken, enjekte edilebilir iskelelerin uyumlu yapısı, iskelenin varış yerinin anatomisine tam olarak uymasına izin verir. Enjekte edilebilir yapı iskelelerinin akışkanlığı, pulpa-dentin rejenerasyonu bağlamında, kök kanal boşluğunun düzensiz topolojisine uyum sağlama konusundaki kritik yetenekleri dahil olmak üzere, önceden form verilmiş yapı iskelelerine göre bir dizi avantaj sunar. Enjekte edilmeden önce SCAP ile karıştırılma kapasiteleri, sinyal moleküllerine maruz kalmayı, hücre yapışmasını ve diğer süreçlerin başlatılmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, endojen hücreleri kanal boşluğuna toplayan hücresiz endodontik biyomateryaller, diş hekimliğinde

henüz rutin olmayan rejeneratif hücre izolasyonu, kök hücre bankasının aktif olmayışı ve kök kanalına yerleştirme gibi engellerden dolayı klinik olarak daha az tercih edilmektedir [59, 60].

Trombositten zengin plazma (PRP), hem rejeneratif endodonti hem de diğer cerrahi doku rejenerasyon prosedürlerinde sayısız *in vitro* ve klinik çalışmada kullanılan otolog enjekte edilebilir bir iskeleyi temsil etmektedir [57, 58, 60, 63].

Artan sayıda trombosit, SCAP büyüme ve çoğalma oranlarını artıran ve doku rejenerasyon sürecini hızlandıran degranülasyon yoluyla salınan daha büyük miktarda büyüme faktörü ile sonuçlanmaktadır [58, 63]. Bu büyüme faktörleri, tümü revaskülarizasyonun uyarılmasına yardımcı olan ve hücre proliferasyonunu artıran PDGF, TGF-  $\beta$ , IGF, VEGF, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Epitelyal Hücre Büyüme Faktörü (ECGF) içermektedir [57]. Bunlar doku rejenerasyonunun kritik unsurlarıdır ve PRP iskelesinin etkili olmasına katkıda bulunur. PRP yapı iskeleleri ile gözlenen klinik başarının, bu büyüme faktörlerinin, SCAP gibi periapikal bölgede bulunan kök hücreleri çekmede ve kök kanal boşluğuna göçlerini kolaylaştırmada oynadığı rolden kaynaklanmaktadır [64]. PRP'nin faydaları, başarılı bir RET için temel olan yüksek anjiyogenez ve revaskülarizasyona izin vermesidir. Ayrıca PRP, yabancı cisim tepkisi ve patojen geçişinden kaçınması ve sentetik yapı iskelelerine göre uygun maliyetli uygulamasının yanı sıra servikal sızdırmazlığı da sağlayan bir iskeledir [65].

PRP iskelesinin kanal dışından elde edilip kanala enjeksiyonunun RET'te kullanılması ile kanal içi kan pıhtısının iskele olarak kullanılması benzer klinik sonuçlar vermektedir. İki yöntem de apikal bir kanamanın indüklenmesini önleyerek daha az kök kanal obliterasyonu riski içermektedir. Ancak PRP iskelesinin kullanımı, kan alma işlemine uymayan pediatrik hastalardan kan alımı zorluğu, klinikte PRP'yi işlemek için gerekli ek ekipman ve reaktifler gerektirmesi ve bileşimindeki değişkenlik nedeniyle sınırlıdır [57, 63, 66].

Konak kaynaklı yapı iskelelerine daha öngörülebilir bir alternatif sağlamak için, SCAP'nin kök kanal boşluğuna verilmesi ve doku rejenerasyonu için doğal olarak türetilen çok sayıda biyomateryal geliştirilmiştir. Bu iskeleler arasında aljinat, hyaluronik asit ve

türevleri ve kitosan bulunur. Doğal olarak türetilen yapı iskeleleri, hücre tanıma ve tutunmaya yardımcı olan sinyal molekülleri gibi çeşitli avantajlar sunar [59]. Bununla birlikte, doğal kaynaklı ürünlerin kullanımı, patojen bulaşma olasılığı, yabancı cisim tepkisi, zayıf mekanik özellikler ve ürün değişkenliği sebebi ile kullanımı sınırlıdır [55, 59].

Doğal polimer kollajen, diş pulpasında ve onu örten dentin matriksinde en bol bulunan bileşendir [67]. Dentin matriksindeki Tip I kollajen, kalsifikasyon için odak noktaları sağlar ve doğal doku ile biyolojik uyumluluğunun yanı sıra düşük antijenik özellik göstermektedir. Bu sebeple iskele olarak kullanılabilir [68]. Kollajen, preodontoblastların organizasyonunu ve yeni oluşturulan odontoblastların diş pulpasına yapışmasını indükleyerek dentinogenez için bir çerçeve oluşturmaktadır. İskeleyle ekilen kök hücrelerin farklılaşması üzerindeki kollajenin indüktif potansiyeli, doku mühendisliği için önemli ölçüde avantajlı ortam oluşturmaktadır [69]. Sakai ve arkadaşları insan süt dişlerinden alınan kök hücrelerin, bir kollajen matriste kültürlendikten sonra kendilerini kapiller benzeri mikrodamarlar halinde şekillendirdiğini açıklamaktadır [70]. Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* yapılan çok sayıda çalışma, kollajen sünger ve jel iskelelerinin diş pulpası kök hücrelerinin (DPSC) çoğalmasına ve bu kök hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasına ve ayrıca sert doku sentezine yardımcı olduğunu göstermiştir. Bu durum kollajen sünger ve jellerin iskele için uygun bir malzeme olduğunu göstermektedir [67, 71, 72].

Birkaç sentetik yapı iskelesi, SCAP'ten dentin-pulpa dokusunun rejenerasyonu için potansiyel adaylar olarak incelenmiştir ve esas olarak hidrojel formundadır. SCAP dağıtımı için araştırılan sentetik yapı iskeleleri arasında nanolifli mikro küreler, hidrojeller ve polilakti-ko-glikolik asit-poli-etilenglikol (PLGA-PEG) nanoparçacıkları bulunur. Bu biyomalzemeler patojenleri bulaştırma riskinden kaçınır, istenen bir bağışıklık tepkisini indükler ve mekanik yapısı, gözeneklilik ve biyolojik bozunma hızı gibi özelliklerin tek tip olmasını sağlayan tutarlı bir üretim süreçlerine sahip olmaktadır [59, 61]. Bununla birlikte, sentetik yapı iskeleleri, doğal olarak türetilmiş yapı iskelelerinin iç sinyalleme yeteneklerinden yoksundur ve karmaşık üretimlerinden kaynaklanan yüksek maliyetlere sahiptir [59].

## 2.4 Mineral Trioksit Agregat

Mineral trioksit agregat (MTA), 1990'ların başından beri endodontik uygulamalar için araştırılan bir biyomateryaldir. MTA ilk olarak 1993 yılında bilimsel literatürde tanımlanmıştır [73] ve 1998 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından endodontik kullanım için onay almıştır [74].

MTA laboratuvar ve klinik çalışmalara dayanarak, birçok klinik uygulamada uygun bir malzeme olarak kabul edilmektedir [75]. Pulpa kaplaması, pulpotomi, kök perforasyon tedavisi ve kök kanal dolgusu dahil olmak üzere çeşitli endodontik kullanımlar için ideal bir diş materyalidir [76]. MTA uygun sızdırmazlık yeteneği, çözünürlük ve basınç dayanımı sergilemektedir. MTA'nın sertleşme reaksiyonları nem varlığında başlar ve sertleşme sırasında kalsiyum hidroksit salınımı ve pH'da artış meydana gelmektedir [77].

Fosfat tamponlu salin (PBS) ile doğrudan temas halindeyken, MTA ile doldurulmuş kök kanal duvarları üzerinde hidroksiapatit yapısına benzeyen bir tabaka oluşmaktadır. Bu tabakanın dayanıklılığını ve sızdırmazlık kabiliyeti sebebiyle MTA'nın endodontik işlemlerde dolgu materyali olarak uygun bir bariyer olduğu sonucuna varılmıştır [78].

Camilleri ve Pitt Ford tarafından 2006 yılında yapılan bir incelemede, geleneksel maddelere kıyasla MTA'nın daha az sitotoksik özellik gösterdiği belirtilmiştir [79].

MTA, sert doku oluşumunu indükleyen (7), sert doku oluşumu için elverişli ortam oluşturabilen ve biyouyumlu olan biyoaktif bir malzeme (6) olarak kabul edilmektedir [80, 81].

### 2.4.1 Kimyasal özellikler

MTA, rafine Portland çimentosu ve bizmut oksitin bir karışımıdır ve eser miktarda SiO<sub>2</sub>, CaO, MgO, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerdiği bildirilmektedir. Ana bileşen olan Portland çimentosu (PC), dikalsiyum silikat, trikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, alçıtaşı ve tetrakalsiyum alüminoferrit karışımıdır [78, 82, 83].

MTA steril su ile 3:1 toz/sıvı oranında karıştırılır ve nemli bir pamuk pelet ile geçici olarak doğrudan temas ettirilmesi sağlanıp bir sonraki randevuya kadar bırakılması önerilmektedir. Steril su ile karıştırılan MTA, yaklaşık 3-4 saat sonra koloidal bir jel oluşturmaktadır [83, 84]. Çevreleyen dokulardan gelen nem, sertleşme reaksiyonuna yardımcı olmaktadır [73]. Hidratlı MTA ürünleri, karıştırıldıktan üç saat sonra 12.5'e yükselen 10.2'lik bir başlangıç pH'ına sahiptir [82, 84]. Sertleşme işlemi, trikalsiyum silikat (3CaO·SiO<sub>2</sub>) ve dikalsiyum silikatın (2CaO·SiO<sub>2</sub>) hidrasyon reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır [83]. Benzer amaçlar için kullanılan diğer malzemelerden daha zayıf olmasına rağmen, MTA basınç dayanımının nem varlığında 21 güne kadar arttığı bildirilmektedir [84]. MTA mikrosertliği ve hidrasyon davranışının fizyolojik koşullara (pH 7) kıyasla inflamatuvar ortamdaki (pH 5) düşük pH'tan olumsuz etkilendiği bildirilmektedir [85].

Çözünen MTA, diğer simanlara benzer şekilde, hidratlarının birbirine kenetlendiği bir kütle içinde kristalleşerek katılaştığı bildirilmiştir [85].

2002 yılına kadar, gri renkli tozdan oluşan sadece bir MTA materyali bulunurken ve estetik kaygıları gidermek için ProRoot WMTA (Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, ABD) olarak beyaz mineral trioksit agregat (WMTA) tanıtılmıştı. Böylece iki tür MTA malzemesi kategorize edilmiştir: geleneksel gri MTA (GMTA) ve WMTA. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elektron probe mikro analizi, GMTA ve WMTA arasındaki farkları karakterize etmiştir. GMTA ile WMTA arasındaki ana farkın Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO ve FeO konsantrasyonlarında olduğunu göstermiştir [83, 86]. WMTA'nın %54,9

daha az  $Al_2O_3$ , %56.5 daha az  $MgO$  ve %90.8 daha az  $FeO$  içerdiği bulunmuştur, bu da renk değişiminin büyük olasılıkla  $FeO$  azalmasının nedeni olduğu sonucuna varmaktadır [86]. Her iki MTA ve PC türü arasındaki temel fark, potasyum eksikliği ve bizmut oksitin varlığıdır [87]WMTA'nın ayrıca genel olarak GMTA'dan daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu bildirilirken[88], magnezyumdaki azalmanın WMTA'nın daha açık rengine katkıda bulunabileceği de öne sürülmüştür [83].

2005 yılında Dammaschke ve arkadaşları donmuş MTA yüzeyindeki kükürt miktarının MTA'nın toz formlarından 3 kat daha fazla olduğunu ve bu tabakanın simanı daha fazla hidrasyondan koruduğunu ve MTA'nın sertleşme süresini arttırdığını bildirmiştir [83]. Bu trisülfat tabakası, 2 mm kalınlığındaki tabakalar 24 saatten fazla neme maruz kaldığında WMTA eğilme mukavemetinin önemli ölçüde azaldığı bildirildiği için koruyucu bir işlev gördüğü bildirilmektedir [89]. MTA'nın, artan sıvı/toz oranı ile daha fazla porozite ve artan çözünürlüğü ile internal kapiller ve su kanalları ile karakterize edilen poroziteli bir matris oluşturduğu gözlenmiştir [90]. GMTA'nın pH seviyesinin 11 veya 12 arasında olduğu ve çözünürlük seviyelerinin zamanla stabil olduğu rapor edilmiştir [91]. WMTA'nın çözünürlüğü, sertliği ve radyopasitesinin iki portland çimentosu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada , WMTA'nın önemli ölçüde daha az çözünür olduğunu, daha yüksek Vickers sertliği sergilediğini ve daha fazla radyopak olduğu bildirilmiştir [92].

Bizmut, MTA hidrasyonundan sonra kalsiyum hidroksit çökmesini etkilemektedir. Bizmut oksit asidik ortamda çözüldüğünden, MTA'nın inflamatuvar dokular gibi asidik bir ortama yerleştirilmesinin bizmut oksit salınımına neden olabileceği öne sürülmüştür [93]. Ayrıca bizmut oksit hücre kültüründe hücre çoğalmasını olumlu etkilemediğinden MTA'nın biyoyumluluğunu azaltacağı bildirilmiştir [94]. MTA, dokularda bulunan doğal sıvılarla etkileşime girme potansiyeline sahip aktif bir biyomateryaldir [80].

WMTA ve GMTA'nın kalitatif bir yüzey analizi, GMTA'nın kristal boyutunun WMTA'nın kristal boyutundan yaklaşık 8 kat daha büyük olduğunu göstermiştir. Görüntüler oksijenin GMTA ve WMTA'nın hem kristal hem de amorf fazları boyunca dağıldığını ve bu nedenle tüm elementlerin oksit formunda mevcut olduğunu

göstermektedir [95]. Mevcut literatür sonuçlarına dayanarak, MTA'nın kimyasal bileşimi ile ilgili yayınlanmış çalışmalar arasında bazı farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar, MTA tozu ile karıştırmak için kullanılan çeşitli sıvılar ve bileşimini test etmek için çeşitli ekipmanlarla ilgili olduğu düşünülmüştür [84, 86, 96].

## **2.4.2 Fiziksel özellikler**

MTA tozunun hidrasyonu, sert bir yapıya katılan bir kolloidal jel ile sonuçlanmaktadır. Karışımın özellikleri, toz/sıvı oranı, karıştırma yöntemi (yani, sıkışan hava miktarı), yoğunlaşma için kullanılan basınç, ortamın nemi, MTA tipi, depolama ortamı tipi, ortamın pH değeri, araç tipi, karıştırma ve değerlendirme arasındaki süre, malzemenin kalınlığı ve sıcaklık MTA'nın fiziksel özelliklerini etkilemektedir [83, 85, 97, 98].

### **2.4.2.1 Çalışma süresi**

MTA'nın ortalama çalışma süresi 165+/-5 dakika olup amalgam, Süper EBA ve ara restoratif materyalden (IRM) daha uzundur [84]. GMTA, WMTA'dan önemli ölçüde daha yüksek başlangıç ve son sertleşme süreleri sergiler [77, 99]. WMTA'nın PC ile karşılaştırıldığında daha uzun sertleşme süresi, WMTA'daki daha düşük kükürt ve trikalsiyum alüminat seviyelerine atfedilir [83]. MTA'nın uzun sertleşme süresi, malzemenin en büyük dezavantajlarından biridir [98, 100, 101].

ProRoot WMTA için son sertleşme süresi 228 dakika olarak bildirilmektedir [102]. Yapılan bir çalışmada Neo MTA Plus için başlangıç sertleşmesi 130.dk olarak belirlenirken 315. dakika son sertleşme süresi olarak belirtilmiştir [103].

Pd MTA White'in çalışma süresi için üretici firmanın belirttiği aralık şöyledir: Başlangıç sertleşmesi karıştırıldıktan 10 dakika sonra başlar ve 15 dakikanın sonunda sertleşme tamamlanır. Tedaviye devam etmek için sertleşmenin tamamlanmasına gerek olmadığı belirtilmektedir (Produits Dentaires).

#### **2.4.2.2 Sertleşme genişmesi**

Çeşitli MTA türlerinin sertleşme genişmesine ilişkin çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. İki araştırma, WMTA'nın GMTA'dan daha fazla geniştiğini göstermiştir [77, 99]. Başka bir araştırma, malzemenin yüzeyini Hank'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS) veya steril su ile kapladıktan sonra GMTA'nın WMTA ile genişlemesini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada GMTA, steril su veya HBSS ile WMTA'dan önemli ölçüde daha fazla geniştiği bulunmuştur [104]. GMTA, HBSS'de steril suya göre daha az geniştiği, buna karşılık, WMTA genişmesinin, HBSS'de steril suya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. HBSS'de depolanan GMTA ve WMTA'nın farklı genişme davranışı daldırma sıvısının ( $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$ ) bileşiminden veya MTA'nın iki formülasyonu arasındaki kimyasal bileşimdeki farklılıktan kaynaklandığı belirtilmiştir [82, 86, 95]. Bu durum, MTA'nın farklı ortamlarda saklanması sertleşme genişmesini etkilediğini göstermektedir [104].

#### **2.4.2.3 Çözünürlük**

MTA'nın çözünürlük derecesi hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Çoğu araştırma, MTA'nın çözünürlüğünün düşük olduğunu veya hiç olmadığını bildirmektedir [84, 96, 99, 105]. Bununla birlikte, uzun süreli bir çalışmada artan çözünürlük bildirilmiştir [91]. WMTA'nın fiziksel özellikleri GMTA ile karşılaştırıldığında, GMTA önemli ölçüde daha fazla çözünürlük göstermektedir. PC ile WMTA karşılaştırıldığında değişen sonuçlar rapor edilmiştir. Bir çalışma, hem normal hem de beyaz PC'nin (WPC) WMTA'dan önemli ölçüde daha az çözünürlük sergilediğini bildirmiştir [99]. Bu bulgular,

WMTA'nın iki farklı PC tipinden daha az çözünür olduğunu gösteren başka bir çalışma ile çelişmektedir [96]. Farklılıklar, bu araştırmalarda kullanılan PC türüne atfedilmektedir. Ek olarak, toz-su oranı çözünürlük miktarını etkilemektedir. Daha yüksek su-toz oranları MTA gözenekliliğini ve çözünürlüğünü arttırmaktadır [90]. Suda çözünmeyen MTA'ya bizmut oksit ilavesi de MTA çözünmezliğinin bir başka nedenidir. MTA'nın hidrasyonu üzerine bir deneyde Camilleri [93], bizmut oksidin MTA'nın hem kalsiyum hem de silikat içerikleri ile reaksiyonunu doğrulamıştır.

Yapılan bir araştırma, WMTA'nın farklı pH değerlerine sahip fizyolojik çözeltilere daldırıldıktan 7 gün sonra ağırlığını azalttığını, buna karşın malzemenin daldırıldıktan 30 gün sonra ağırlığının arttığını bildirmiştir. Araştırmacılar ağırlık kaybını kalsiyum hidroksit salınımına ve WMTA ağırlığındaki artışı malzeme yüzeyinde apatit kristallerinin oluşumuna bağlamışlardır [106].

MTA'dan  $Ca^{+2}$  salınımı çeşitli araştırmalarla rapor edilmiştir [107, 108]. Antunes Bortoluzzi ve arkadaşları  $CaCl_2$ 'yi WMTA'ya ekleyerek ilk 24 saat boyunca WMTA'dan kalsiyum salınımında önemli bir artış olduğunu ortaya çıkarmıştır [108]. Bir hücre kültürü ortamında yüksek miktarda kalsiyumun hücre proliferasyonunu aşağı regüle edebileceği doğrulanmıştır [109]. Yapay olarak kökleri rezorbe hale getirilen dişlerle yapılan bir çalışmada kök ucu dolgusu olarak MTA kullanıldığında önemli ölçüde  $Ca^{+2}$  salınımı görülmüştür [107]. Çoğu çalışmada çözünürlük değerlendirme yönteminin, MTA'nın suya yerleştirilmesinden önceki ve sonraki ağırlık farkına dayandığı vurgulanmaktadır [84, 90-92]. Materyal çözünürlüğünü değerlendirmek için standart bir yöntem olmasına rağmen, bu yöntem aslında çözünürlüğü değil suda çözünür materyalin elüsyonunu ölçmektedir. Katı bir malzemenin çözünürlüğü, belirli bir miktarda çözücü içinde çözülebilen bir maddenin miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, malzemenin suda depolanmasından önce ve sonra ağırlık farkının ölçülmesi, malzeme parçacıkları depolama sırasında simandan ayrılabileninden veya siman suyu emebileceğinden, çözünürlük oluşmayabilmektedir. Bu siman içeriğinin bir kısmının depolama ortamına bırakılmasına rağmen gerçek çözünürlüğün değerlendirilmesini engellemektedir [110,

111]. MTA çözünürlüğündeki farklılığın diğer nedenleri arasında malzemenin daldırma süresi, MTA tipi ve toz-sıvı oranı yer almaktadır [90, 99, 112, 113].

Neo MTA Plus ile yapılan bir daldırma çalışmasında  $Ca^{+2}$  salınımının daldırmadan hemen sonra başladığı ve üç saat sonra en yüksek düzeye ulaştığı görülmüştür.  $Ca^{+2}$  salınımının yedi gün sonra azaldığı görülse de 28. günde hala devam ettiği belirtilmiştir [103].

#### **2.4.2.4 Basınç dayanımı**

MTA'nın basınç dayanımı, 24 saat sonra amalgam, IRM ve Super EBA'dan önemli ölçüde daha az bulursa da; 3 hafta sonra Super EBA, IRM ve MTA arasında basınç dayanımı açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır [84]. MTA, bizmut oksit ilavesiyle öncelikle trikalsiyum ve dikalsiyum silikattan oluşmaktadır. Dikalsiyum silikat hidratasyon hızı trikalsiyum silikatınkinden daha yavaş olduğu için, MTA'nın basınç dayanımı ve itme dayanımı (push-out strength), karıştırmadan birkaç gün sonra maksimuma ulaşmaktadır [114, 115]. WMTA ve GMTA'nın basınç dayanımı ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bir çalışma, karıştırmadan 3 ve 28 gün sonra WMTA'nın basınç dayanımının GMTA'ninkinden önemli ölçüde daha az olduğunu bildirmiştir [99]. Buna karşılık, GMTA ve WMTA'nın basınç dayanımını karşılaştıran diğer iki araştırma, WMTA için daha fazla basınç dayanımı bildirmiştir [97, 116] Genel olarak, MTA'nın basınç dayanımı, kondensasyon basıncından önemli ölçüde etkilenmemektedir [117].

MTA'nın türü, malzemeyle karıştırılan sıvı, malzeme üzerindeki kondensasyon basıncı, karıştırma sıvısının pH değeri ve MTA'nın saklama durumu gibi çeşitli faktörler MTA'nın basınç dayanımını etkilemektedir [97, 116, 117].

Biodentine (Septodont, SaintMaur-des-Fossés, France), ProRoot WMTA (Dentsply International, Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN), White MTA Angelus (Angelus Dental Industria de Productos S/A, Londrina, Brazil) ve Neo MTA Plus ile yapılan bir çalışmada en yüksek basınç dayanımının Biodentine'de olduğu

görülmüştür. Neo MTA Plus'ın basınç dayanımı White MTA Angelus ve ProRoot WMTA'dan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur [118].

#### **2.4.2.5 Eğilme dayanımı**

Torabinejad ve Chivian perforasyon onarımı, pulpa kaplaması veya apikal tıkaç için GMTA kullanıldığında üzerine ıslak pamuk pelet yerleştirilmesini tavsiye etmiştir [119]. Bir araştırma, sertleşme süresinin WMTA'nın eğilme dayanımı üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Malzeme karıştırılıp bir veya iki taraftan nem alması sağlanmıştır. Önerildiği gibi iki taraflı nem, 24 saat sonra önemli ölçüde daha fazla eğilme dayanımı göstermiştir. Araştırmacılar tarafından WMTA'nın her iki taraftan nem almasından 72 saat sonra bükülme dayanımı düştüğü için pamuk peletlerinin 24 saat sonra çıkarılması gerektiğini öne sürülmüştür. Sınırlı literatür temelinde, ilk 24 saat boyunca MTA üzerine nemli bir pamuk peletinin yerleştirilmesinin eğilme dayanımını arttırdığı görülmüştür [89].

#### **2.4.2.6 Push-out dayanımı**

Perforasyon onarım materyallerinin push out dayanımı önemli bir faktördür çünkü perforasyon onarımından kısa bir süre sonra diş fonksiyonel olduğunda materyal yer değiştirebilir. MTA beyazlatma malzemelerine (salinle karıştırılmış sodyum perborat, Superoksol, Superoksol ile karıştırılmış sodyum perborat) daldırıldıktan sonra IRM veya Super EBA'ya kıyasla daha düşük itme dayanımına sahiptir [120]. MTA'nın push out dayanımı üzerinde nemin önemi doğrulanmıştır [115]. Mevcut verilere dayanarak, MTA'nın bir işlem alanına yerleştirildikten sonra yeterli nemi aldığına eğilme , basınç ve push out dayanımı gibi optimal fiziksel özellikleri kazandığı görülmektedir [121].

Neo MTA Plus'ın; Biodentine ve ProRoot WMTA ile kıyaslandığı bir çalışmada push out dayanımının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Neo MTA Plus'ın kök dentinine bağlanmasının Biodentine ve ProRoot WMTA'dan önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir [122].

#### **2.4.2.7 Yer değiştirme**

Bir araştırmada, apeksleri açık dişlerde kök ucu dolgu materyali olarak kullanılan MTA'nın yer değiştirmesi araştırılmış ve apikal bariyerin 4 mm kalınlığının, 1 mm kalınlığa göre yer değiştirmeye karşı önemli ölçüde daha fazla dirençli olduğu görülmüştür. Bu, MTA'nın kalınlığının, apikal bir bariyer olarak kullanıldığında yer değiştirmeyi doğrudan etkilediğini göstermektedir [123].

#### **2.4.2.8 PH**

MTA'nın pH değeri karıştırıldıktan sonra 10.2'dir. Bu değer 3. saatte 12.5'e yükselmektedir [84]. MTA, uzun süre boyunca yüksek pH değerini korumaktadır. Bu durum MTA'dan sürekli kalsiyum salınımından ve KH oluşumundan kaynaklanmaktadır. Mevcut veriler, MTA'nın suyla karıştırılmasının KH oluşumuna ve yüksek pH ortamına yol açtığını göstermektedir [91]. Farklı zaman periyotlarındaki pH değerleri karşılaştırıldığında, hem WMTA hem de GMTA, karıştırıldıktan hemen sonra iki tip PC'den(portland çimentosu) önemli ölçüde daha yüksek pH değerleri sergilemektedir. Ancak karıştırıldıktan 30 dakika sonra test edilen malzemeler arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. 60.dakikada GMTA, WMTA'dan ve her iki PC tipinden önemli ölçüde daha düşük bir pH değerine sahiptir [77, 99].

Neo MTA Plus için yapılan çalışmada pH değeri karıştırıldıktan üç saat sonra 11'in üzerine çıktığı görülmüştür [103].

Üretici firmanın belirttiğine göre Pd MTA White'm ilk karıştırıldığında pH'ı 10 iken karıştırıldıktan üç saat sonra 12 ye çıkmaktadır (Produits Dentaires).

#### **2.4.2.9 Radyopasite**

MTA için ortalama radyopasite eşdeğeri 7.17mm alüminyum kalınlığıdır [84]. Bu değer, ayrı bir araştırmada Süper EBA veya IRM için bildirilen değerden yüksektir [124]. Aynı materyalleri kullanan farklı bir çalışmada Super EBA ve IRM için MTA'dan daha fazla radyopasite bildirilmiştir [125]. WMTA'nın radyopasitesini GMTA'nınki ile karşılaştıran 2 ayrı çalışma, WMTA için daha fazla radyopasite bildirmiştir. Her iki materyalde de radyopasite üretmek için benzer miktarda bizmut oksit kullanıldığından, WMTA'daki diğer maddelerin varlığı, ikisi arasındaki bu farkın nedeni olduğu düşünülmüştür [77, 99].

Daha önceki bir çalışmada bildirildiği gibi çoğu MTA bazlı simanda radyopaklaştırıcı bir ajan olan bizmut oksit ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) bulunmaktadır ve bu madde kalsiyum silikatların hidrasyon süreçlerinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak özellikle sodyum hipoklorit ile temas halinde olması diş renklenmelerine sebep olmaktadır. Bu renklenmeleri azaltmak için Neo MTA Plus radyopasite ajanı olarak tantalum oksit ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) içermektedir [126]. Farklı radyopasite ajanı içerse de Neo MTA Plus 3mm. Al kalınlığından daha opak görüntü vermektedir [103]

Pd MTA White siman içinde radyopaklığı sağlamak üzere bizmut oksit bulunmaktadır (Produits Dentaires).

#### **2.4.2.10 Partikül büyüklüğü**

Birçok araştırma MTA'nın parçacık boyutunu ve şeklini değerlendirmiştir [83, 85, 95]. Dammaschke ve arkadaşları, WMTA'nın mekanik ve biyouyumluluk özelliklerini

partiküllerinin homojenliğine ve malzemenin yüzey morfolojisine bağlı olduğunu belirtmiştir [83]. Birçok araştırma, WMTA, GMTA ve PC'nin partikül boyutunu ve şeklini karşılaştırmıştır. Bu çalışmalar, WMTA'nın partikül boyutunun GMTA'lardan daha ince olduğunu [82, 95], PC'nin GMTA ile birçok benzerliğe sahip olduğunu göstermektedir [127]. Lee ve arkadaşları GMTA tozu için 1-10 mm arasında değişen partikül boyutları bildirirken [85], Camilleri WMTA tozunun hidrasyondan önce 1 ila yaklaşık 30 mm'den küçük partiküllere sahip olduğunu bildirmiştir [93]. Çimentonun fiziksel özellikleri kristal boyutundan etkilenmektedir. Daha küçük parçacıklar, karıştırma sıvısı ile yüzey temasını artırır ve daha erken sertleşmenin yanı sıra kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Bir çalışma, bazı MTA parçacıklarının, bazı dentin tübüllerinin çapından daha küçük olan 1.5 mm kadar küçük olduğunu bildirmiştir [127]. Yapılan bir çalışmada, etilendiamintetraasetik asidin (EDTA) MTA hidrasyonu, mikrosertlik ve hücre yapışması üzerindeki olumsuz etkilerini gösterilmiştir [128]. Mevcut bilgiler, WMTA'nın GMTA'ya kıyasla daha ince parçacıklara sahip olduğunu göstermektedir. Parçacık boyutları bu malzemelerin kullanım özelliklerini etkilemektedir [121].

Neo MTA Plus'ın partikül büyüklüğü ile ilgili 2015 yılında yapılan bir çalışmada Neo MTA Plus'ın partikül büyüklüğünün konvansiyonel MTA ile karşılaştırıldığında daha küçük olduğu bulunmuştur [129].

#### **2.4.2.11 Mikrosertlik**

MTA'nın mikrosertliği, ortamın pH değeri, malzemenin kalınlığı, yoğuşma basıncı, karışımda tutulan hava miktarı, nem, malzemenin asitle aşındırılması ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir [83, 85]. Asidik bir ortamın hem GMTA hem de WMTA'nın mikrosertliği üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmaktadır [130]. Çevrenin MTA'nın hidrasyon davranışı üzerindeki etkisini değerlendiren bir araştırma, hidrasyon fazındaki MTA'nın iğne benzeri ve baskın kübik kristallerden oluştuğunu belirlemiştir. Asidik ortamda kübik kristaller arasında büyüyen iğne benzeri kristaller görülmemiştir. Azalan mikrosertlik, bu iğne benzeri kristallerin yokluğuna bağlanmıştır [85]. Malzemeler

apikal bariyer olarak kullanıldığında GMTA ve WMTA'nın 2 mm ve 5 mm kalınlıklarındaki mikrosertlikleri araştırılmıştır. MTA'nın formülasyonu veya kullanılan yerleştirme tekniği ne olursa olsun, 5 mm kalınlık 2 mm kalınlıktan önemli ölçüde daha sert bulunmuştur [131]. MTA kondensasyonu sırasında daha fazla basınç kullanılmasının sonucunda mikrosertliğin azaldığı görülmüştür [117]. İki ayrı araştırma, EDTA ve asit-etch prosedürünün MTA mikrosertliğini önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir [128, 132]. Mevcut veriler, daha az nem, düşük pH değerleri, bir şelatlama maddesinin kullanılması ve daha fazla kondensasyon basıncının MTA mikrosertliğini olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir [121].

### **2.4.3 Biyolojik özellikler-Biyoyumluluk**

Bir dizi biyoyumluluk ve mutajenite çalışması, MTA'nın biyoyumlu bir materyal olduğunu göstermektedir [133, 134]. MTA biyoyumluluğu üzerine bir meta-analizin sonuçları, MTA'nın Super EBA, IRM ve amalgamdan daha biyoyumlu olduğunu bildirmektedir [135].

Murin serebral kortikal hücreler ile MTA, Diaket, amalgam ve Super EBA'nın nörotoksik etkileri hem glial hem de nöronal kültürde karşılaştırıldığı bir çalışmada, MTA dışındaki tüm malzemelerin, karıştırıldığı ve sertleştiği koşullarda toksik olduğunu göstermiştir [136]. WMTA'nın nosiseptif ve anti-nosiseptif etkileri, bir sıçan hayvan modelinde değerlendirildiğinde WMTA nöral dokuları tahriş etmediği ve öjenole kıyasla orofasiyal nosiseptif ağrı gidermede daha etkili olduğu görülmüştür [137].

MTA'nın mikrosirkülasyon üzerindeki etkisini değerlendiren ve tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, MTA yerleştirilmesinden 4 hafta sonra mikrosirkülasyonun tamamen düzeldiğini ve yeni damarların oluştuğunu gösterilmiştir [138]. Başka bir çalışmada pulpa damarlarının düz kas kasılmasını taklit etmesi için bir sıçan aortik halka modeli kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonuçları, MTA'nın doza bağlı bir şekilde damar kontraksiyonunu indüklediğini gösterilmiştir [139]. Mevcut bilgilere

dayanarak, MTA'nın mutajenik ve nörotoksik olmadığı ve bir damarın kasılmasını etkileyebilmesine rağmen mikro sirkülasyon üzerinde bir yan etki oluşturmadığı sonucuna varılabilir [140].

Torabinejad ve arkadaşları, taze karıştırılmış ve ayarlanmış MTA ve amalgamın Süper EBA veya IRM'den daha az sitotoksik olduğunu göstermiştir [141]. İnsan periodontal ligament (PDL) hücre kültürleri üzerine yapılan bir başka çalışmada, MTA ile amalgam ve Super EBA'yı karşılaştırmıştır. Sonuçlar, taze karıştırılmış MTA'nın Super EBA veya amalgamdan daha düşük sitotoksosite sergilediğini gösterdi. Daha yüksek bir ekstrakt konsantrasyonunda karıştırıldıktan yirmi dört saat sonra MTA, test edilen tüm materyaller arasında en az miktarda sitotoksosite gösterdi; daha düşük bir ekstrakt konsantrasyonunda, Süper EBA, amalgam veya MTA'dan daha yüksek sitotoksosite gösterdi [142].

WMTA ve GMTA'nın kimyasal bileşimindeki farklılıklar nedeniyle, her iki MTA tipinin sitotoksitesini üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır [94, 143]. Osteoblast ve MG63 osteosarkom hücrelerinin kullanıldığı bir çalışma, 13 gün sonra WMTA yüzeyine ilk hücre bağlanmasından sonra, eski hücre tipinin WMTA üzerinde yaşayamazken, aynı süre içinde GMTA üzerinde büyüdüğünü belirlemiştir [144]. Buna karşılık, WMTA ve GMTA'nın oral keratinosit ve sementoblast hücre kültürleri ile inkübasyonunu karşılaştıran bir araştırma, GMTA'ya kıyasla WMTA yüzeyinde her iki hücre tipinin daha fazla proliferasyonunu göstermiştir [145]. Osteoblast hücre kültürleri üzerine bir başka araştırma, 1 günlük ve 28 günlük kültüre edilmiş WMTA ve GMTA numunelerini karşılaştırmış ve hem GMTA hem de WMTA'nın 1 günlük kültürlenmiş numuneleri, 28 günlüklere göre daha fazla biyouyumluluk göstermiştir [94]. Bu sonuçların aksine, başka bir deney, 12 günlük kürlenmiş GMTA'nın 1 günlük kürlenmiş GMTA'ya kıyasla hücre çoğalmasını önemli ölçüde arttırdığını bulmuştur [145]. İnsan alveolar kemiği, fibroblast ve makrofaj hücre kültürleri ile yapılan diğer iki çalışma, sitotoksosite ve hücre proliferasyonu açısından GMTA ve WMTA arasında hiçbir fark göstermemiştir [146]. Yapılan bir araştırma, sementoblastların hayatta kalma oranının ve morfolojik görünümünün düşük WMTA konsantrasyonundan etkilenmediğini göstermiştir. Bununla

birlikte, malzemenin yüksek konsantrasyonu (20 mg/mL), hücre canlılığını azalttığı ve mineralizasyonun yanı sıra sementoblastlar tarafından kemik sialoprotein üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir [147].

Yapılan bir araştırma, MTA ve KH'nin 3T3 fibroblast hücreleri üzerindeki etkisini incelemiş ve MTA'nın KH'ye kıyasla önemli ölçüde daha kısa bir sitotoksosite süresine sahip olduğunu göstermiştir [148]. MTA veya güta-perka ile doldurulmuş ve bir CO2 lazeri ile tedavi edilen kök uçları üzerinde yapılan bir insan PDL hücre kültürü çalışmasında, SEM gözlemi, ne lazerle ışınlanmış alana ne de güta-perka'ya hücre tutunması göstermemiştir. Buna karşılık, MTA'ya hücre tutunması ve lazer ışınlanması olmaksızın kök yüzey alanı gözlenmiştir [149].

MTA, karıştırıldıktan 24 saat sonra, PDL fibroblast hücre tiplerine yeni karıştırılmış MTA'dan daha olumlu bir etki göstermektedir [150]. Dental materyallerin antiproliferatif etkileri üzerine bir deneyde, Koulaouzidou ve arkadaşları, MTA, çinko oksit-öjenol (ZOE) siman ve cam iyonomeri fibroblastlar üzerinde karşılaştırmıştır. MTA'nın en düşük antiproliferatif aktivite gösterdiğini, buna karşın ZOE'nin en yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu belirlemiştir [151].

Birincil osteoblast ve osteoklast kültürleri üzerinde WMTA, Resilon ve güta-perka'yı karşılaştıran bir çalışma, materyallerin hiçbirinin önemli bir osteoklast oluşumuna yol açmadığını göstermiştir [152]. Başka bir çalışmada, WMTA, Sealapex ve Roth 801'i makrofajlar ve dişeti fibroblastları üzerindeki etkileri incelenmiştir. WMTA, her iki hücre çeşidi içinde canlılık üzerinde hiçbir olumsuz etki göstermemiştir [153].

KH ve GMTA'nın sitotoksitesini karşılaştıran bir çalışma, KH'nin daha fazla sitotoksosite ürettiğini ve hücre metabolik aktivitesini GMTA'dan yaklaşık 3 kat daha fazla azalttığını göstermiştir [154]. Yasuda ve arkadaşları sıçan diş pulpa hücre kültürlerini kullanarak yaptığı bir çalışmada, MTA'nın karıştırıldıktan 72 saat sonra sitotoksositeye sahip olmadığını ve diş pulpa hücrelerini uyarak mineralizasyonu önemli ölçüde artırdığını ve aynı zamanda kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) üretimini de artırdığını göstermiştir. Buna karşılık Dycal, BMP-2 üretimini azaltır ve hücre ölümünü artırırken, adeziv simanın sitotoksosite ve BMP-2 üretimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı

gösterilmiştir [155]. Çeşitli hücre kültürü çalışmaları, MTA varlığında tip I kolajen üretimini ve osteokalsin ekspresyonunu göstermiştir [155-157].

MTA üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarının sonuçları, hücre tipi ve çalışma süresi, taze veya kürlenmiş materyal kullanımı, ortam değiştirme sıklığı, doğrudan temas veya ekstrakt kullanımı, hücre kültürü ortamındaki materyalin konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır [140].

## **2.5 Bu Çalışmada Kullanılan Canlılık Testi Ve Farklılaşma Değerlendirme Yöntemleri**

### **2.5.1 MTS**

Hücrelerin canlılık seviyeleri ve/veya çoğalma oranları, hücre sağlığının iyi göstergeleridir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkilemektedir. Bu ajanlar hücre zarlarının yıkımı, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma, polideoksinükleotid uzamasının inhibisyonu ve enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalarla hücrelerde toksisiteye neden olabilir [158].

Hücre canlılığı ve sitotoksikite testleri, hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre yapışması, ATP üretimi, koenzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır [158].

Bu testler için farklı sınıflandırmalar vardır: boyama testleri, kolorimetrik testler, fluorometrik testler ve luminometrik testler.

1. Boyama testleri: Tripan mavisi, Eozin, Kongo kırmızısı, Eritrosin B testleri
2. Kolorimetrik testler: MTT, MTS, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB, NRU ve kristal moru testleri
3. Florometrik testler: Alamar Mavisi testi and CFDA-AM testi

#### 4. Luminometrik testler: ATP testi ve gerçek zamanlı canlılık testi

MTS testi (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil tiyazol)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum, iç tuz tahlili) bir kolorimetrik tahlildir. Bu tahlil, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile bir tetrazolyum tuzunun renkli bir formazana dönüştürülmesine dayanır. Üretilen formazan miktarı kültürdeki canlı hücre sayısına bağlıdır ve 492 nm'de spektrofotometre ile ölçülebilir [159].

Önceki çalışmalar, MTS testinin kullanım kolaylığı, kesinlik ve toksisitenin hızlı göstergesi açısından iyi bir ölçüm sisteminin tüm özelliklerini birleştirdiğini ileri sürmektedir [159]. MTS testi hızlı, hassas, ekonomik ve spesifik bir *in vitro* sitotoksosite testidir. Kullanımı kolay, hızlı, güvenilir ve ucuz olduğu için sitotoksosite ölçümü için ideal özellikler sağlamaktadır. Bu nedenle, toksikolojik değerlendirmeler için kullanılmaktadır [160, 161].

492 nm'de ölçülen absorbans seviyesi inkübasyon süresinden, hücre tipinden ve hücre sayısından etkilenmektedir. MTS saptama reaktiflerinin kültürdeki hücrelere oranı da ölçülen absorbans seviyesini etkiler. Önceki çalışmalar, inkübasyon süresi ile 5 saate kadar olan kısa inkübasyon süreleri için absorbans arasında doğrusal bir ilişki olduğunu öne sürmüştür. Bu nedenle, bu test için uygun inkübasyon süreleri 1-3 saattir [162, 163].

MTS Test protokolü şu şekildedir:

1.100 ul/kuyucuk bir nihai hacim içeren 96 kuyucuklu kültür kaplarında hücreler ve test bileşikleri biraraya getirilir.

2.İstenilen temas süresi boyunca inkübe edilir.

3.Her kuyucuğa fenazin etil sülfat içeren 20 µl MTS solüsyonu eklenir (son MTS konsantrasyonu 0.33 mg/ml olacaktır).

4.37°C'de 1 ila 3 saat inkübe edilir.

5.490 nm'de absorbans kaydedilir [164].

## 2.5.2 Alizarin red boyama

Mineralizasyon *in vitro* osteoblast diferansiyasyonu için kullanılan bir belirteçtir. Tipik olarak, hücre dışı matrisin mineralizasyonu, von Kossa veya Alizarin Red boyanması ile görselleştirilmektedir. Alizarin red, hücre kültürü çalışmalarında hücreler tarafından sentezlenen kalsiyum depozitlerinin tespitinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir [165].

Kimyasal formülü  $C_{14}H_8O_4$  tür. Molekül ağırlığı: 240,20 gramdır. Kaynama noktası  $430^{\circ}C$ , erime noktası  $289-290^{\circ}C$ 'dir. Adsorpsiyon miktarı ortamın pH ve sıcaklığına bağlıdır. Kırmızı trimetrik iğneler veya prizma kristalleri ile sarımsı renkte görüntü verir. Alizarin red s ise alizarinin sülfolanırılmasıyla elde edilir (alizarin-3-sülfonik asit). Suda çözünür. Alizarin red s'in kapalı formülü  $C_{14}H_7NaO_7S$  ve molekül ağırlığı ise  $342.26 \text{ g/mol}$ 'dür [165].

Alizarin red boyama protokolü şu şekildedir:

1. Boyama reaktifleriyle çalışırken daima koruyucu gözlük ve eldiven kullanılmalıdır.
2. Media kuyulardan tamamen çıkarılır.
3. Yavaşça 1 mL PBS (Fosfatla tamponlanmış salin solüsyonu) eklenir.
4. PBS aspire edilir.
5. 3 mL mutlak etanol eklenir ve 30 dakika sabitlenir.
6. Etanol çıkarılır ve kuyuların tamamen kurumasını beklenir.
7. Kuyu başına 1.0 mL %2 Alizarin Red boyası eklenir ve solüsyon tamamen kaplayana kadar hafifçe hareketlendirilir.
8. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.
9. Alizarin Red kuyulardan çıkarılır.

10. Dikkatli bir şekilde, kuyuları 1 mL deiyonize su ile üç kez durulanır ve kurumaya bırakılır.

### 2.5.3 Alkalen fosfataz

Alkalen fosfataz (ALP), metabolizma, sinyal iletimi, molekül taşınması ve genetik bilginin ifadesine kadar biyolojik sürecin hemen hemen her yönüne aktif olarak katılan biyokimyasal bir enzimdir, ALP, beş sistein, iki çinko atomu ve ona katalizör işlev kazandıran bir magnezyum atomu içeren iki benzer monomerden oluşmaktadır. ALP esas olarak biyolojik fosforilasyon için bir katalizör işlevi görür ve alkali ortamlarda optimal olarak aktif hale gelmektedir. ALP'nin fizyolojik rolü canlı organizma için hayati önem taşıdığından, ALP ister prokaryotlarda ister ökaryotlarda olsun, her yerde bulunabilir [166].

ALP, osteogenez sürecinde tanınan ilk kilit oyuncularından biridir. Uzun bir süre boyunca yapılan çalışmalar enzimin normal ve patolojik kalsifikasyondaki önemini sağlamlaştırmıştır. Bu biyokimyasal ve histolojik tahlilin kolaylığının bir sonucu olarak ALP, mineralize doku hücrelerinin fenotipini veya gelişimsel sürecini değerlendirirken tercih edilen işaret haline gelmiştir [167].

Yapılan çalışmalarda, osteogenezde ALP'nin sert doku hücre farklılaşmasının bir belirteci olduğu gibi, aynı zamanda güçlü ALP ekspresyonunun yeni dokunun mineralizasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmektedir [168, 169].

ALP'nin mineralizasyondaki rolü, osteoblastik farklılaşma ve büyüme plakasının kıkırdak kalsifikasyonu sırasında genlerin aşamalı ekspresyonunun incelenmesiyle açıklanmaktadır. Her iki dokuda, kemikte ve kalsifiye kıkırdakta, ALP gelişimin erken döneminde eksprese edilir ve kısa sürede hücre yüzeyinde ve matriks veziküllerinde gözlenir. Gelişimin ilerleyen aşamalarında, diğer genler (örneğin osteokalsin) yukarı doğru düzenlenirken, ALP ekspresyonu azalır [167].

Alkalen fosfataz çeşitli kök hücrelerin osteojenik ya da odontojenik farklılaşmasının uyarılmasında ve dental dokuların mineralizasyonunda görev alan spesifik bir enzimdir [170].

ALP, fosfat gruplarının salınmasını ve inorganik pirofosfatın çözülmesini kontrol etmektedir [171]. ALP aktivitesi ise, bu enzimlerin aktivitesini ölçen bir test ve odontoblastik ve osteoblastik aktivitenin erken dönem belirteci olarak tanımlanmaktadır [172].

#### **2.3.4 Polimeraz zincir reaksiyonu(PCR)**

PCR, bilimsel, tıbbi ve tanısal topluluklara kantitatif nükleik asit analizi için kullanılan güçlü bir araçtır. PCR ile, karmaşık bir numunede bulunan herhangi bir nükleik asit dizisi, kolaylıkla analiz edilebilecek çok sayıda özdeş kopya oluşturmak için amplifiye edilebilir. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), reaksiyon sırasında oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak reaksiyona giren boyaların veya probaların floresansını ve belirli bir değer elde etmek için gereken amplifikasyon döngülerinin sayısını izleyerek oluşan miktarda DNA molekülü kaydedilir. Tipik olarak amplifikasyon döngüsü başına molekül sayısının iki katına yakın olan belirli bir amplifikasyon verimi varsayıldığında, örnekte başlangıçta mevcut olan amplifiye sekansın DNA moleküllerinin sayısını hesaplamak mümkündür [173]. Günümüzde mevcut olan yüksek verimli tespit kimyaları, hassas enstrümantasyon ve optimize edilmiş tahliller ile, karmaşık bir numunedeki belirli bir dizinin DNA moleküllerinin sayısı, tek bir molekülü tespit etmeye yetecek kadar benzersiz bir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilir. Gerçek zamanlı PCR'nin tipik kullanımları arasında patojen tespiti, gen ekspresyonu analizi, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizi, kromozom sapmalarının analizi ve en son olarak gerçek zamanlı immüno PCR ile protein tespiti yer alır [173].

Gerçek zamanlı PCR veya nicel gerçek zamanlı PCR olarak da adlandırılan nicel PCR (qPCR), hedef DNA dizisinin amplifikasyonunu reaksiyondaki bu DNA türlerinin konsantrasyonunun nicelleştirilmesiyle birleştiren PCR tabanlı bir tekniktir. Bu yöntem,

başlangıç şablon konsantrasyonunun hesaplanmasını sağlar ve bu nedenle DNA kopya sayısı, viral yük ve gen alelleri ayrımının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir analitik araçtır. QPCR, mRNA ifadesini ölçmek için güçlü bir araçtır ve mikrodizi gen ifadesi veri doğrulaması için altın standarttır. QPCR'nin geniş uygulamaları ve geliştirilmiş birçok teknik varyasyon göz önüne alındığında, teknik arka plan, mevcut kimyalar ve veri analizi teknikleri dahil olmak üzere kısa bir qPCR araştırması, hem deneysel tasarım hem de değerlendirme için uygun bir yöntemdir [174].

Osteokalsin (OCN), osteonektin, alkalin fosfataz (ALP), kemik sialoproteini ve dentin sialofosfoprotein, dental papilla kök hücrelerin odontoblast/osteoblast benzeri farklılaşması için mineralizasyon belirteçleri olarak kullanılmaktadır [175] .

Tip I kollajen (Col1A1) , dentin ve mineral oluşumu için kollajen protein ailesinin önemli bir üyesidir [176].

RUNX2 (Runt-related transcription factor2), osteoblast ve odontoblast farklılaşmasını kontrol etmede transkripsiyonel bir faktör ve bilinen ana düzenleyicidir [177]. Osteoblastik veya odontoblastik farklılaşma için gerekli olan genlerin ekspresyonunun RUNX2 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. RUNX2, iki ana dentine özgü protein dentin sialoprotein ve dentin fosfoproteini kodlayan genin transkripsiyonunu aktive etmektedir [178]. Bu nedenle çalışmamızda OCN, ColA1 ve RUNX2 gen ifadeleri ile ilgili PCR analizi yapılmıştır.

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışmada üç farklı trikalsiyum silikat esaslı simanın (ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White) apikal papilla üzerindeki sitotoksik ve odontojenik farklılaşma etkisi incelenmiştir.

#### **3.1 Etik Kurul Onayı**

Araştırmanın etik kurul onayı 21/05/20 tarih ve 6158 numaralı karar ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (Ek A1). SCAP (Apikal Papilla Kök Hücre) elde etmede kullanılacak dişlerin çalışmada kullanılabilmesi için tüm hastaların ebeveynlerine Etik Kurul tarafından izin verilmiş olan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu (Ek A2) imzalatıldı.

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Ana Bilim Dalı'nda ve Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2 Hastaların Dahil Edilme Kriterleri**

Çekim endikasyonu olan ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne başvuran hastalardan aşağıdaki kriterleri sağlayanlar çalışmaya dahil edilmiştir:

1. Apeksi kapanmamış üçüncü molar diş çekim endikasyonu konulan hastalar
2. Sistemik olarak diş çekimi endike olanlar
3. Onam formu ebeveyni tarafından imzalanan hastalar

4. 14-18 yaş aralığında kadın ve erkek hastalar
5. Çalışmaya gönüllü olan hastalar
6. Çekim endikasyonu olan dişi çürüksüz, sağlıklı pulpaya sahip olan üçüncü molar dişler

### 3.3 Hücre Kültürünün Elde Edilmesi

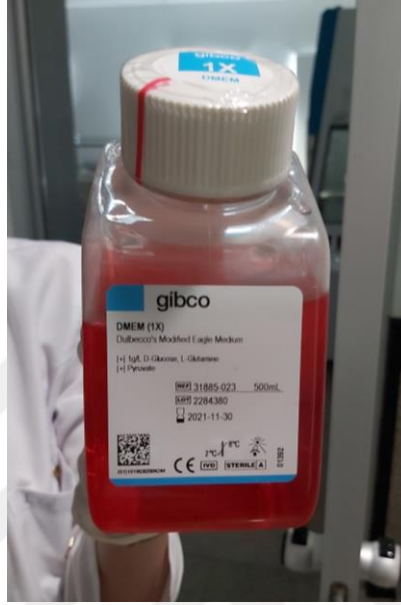
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 4 tane apeksi kapanmamış daimi üçüncü molar dişin çekimi yapıldı. Hasta ebeveynlerine bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatıldı. Çekimi yapılan dişler hemen sonrasında Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi'ne (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS; Sigma, United Kingdom) alındı ve Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarına ulaştırıldı. Laboratuvarda dişler laminar akışlı kabin içinde (Airstream Class II, ESCO, ABD) HBSS dolu bir petri kabına yerleştirildi ve apikal papilla 10 numaralı steril bistüri yardımıyla kesilerek dişten uzaklaştırıldı (Şekil 3.1).



**Şekil 3. 1:** Kabin

Dulbecco'nun modifiye edilmiş temel ortamının (DMEM) (Şekil 3.2) 1gr/lt (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) içine fetal bovine serum (FBS) (%10) ve penisilin-streptomisin-amfoterisin (PSA) karışımını (%1) (Biological Industries, Israel) eklenerek

besiyeri hazırlandı ve çalışmanın tümünde bu besiyeri kullanıldı. Hücreler bu besiyeri içinde %5 CO<sub>2</sub>'li nemli bir ortamda 37 °C'de inkübe edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3. 2: DMEM

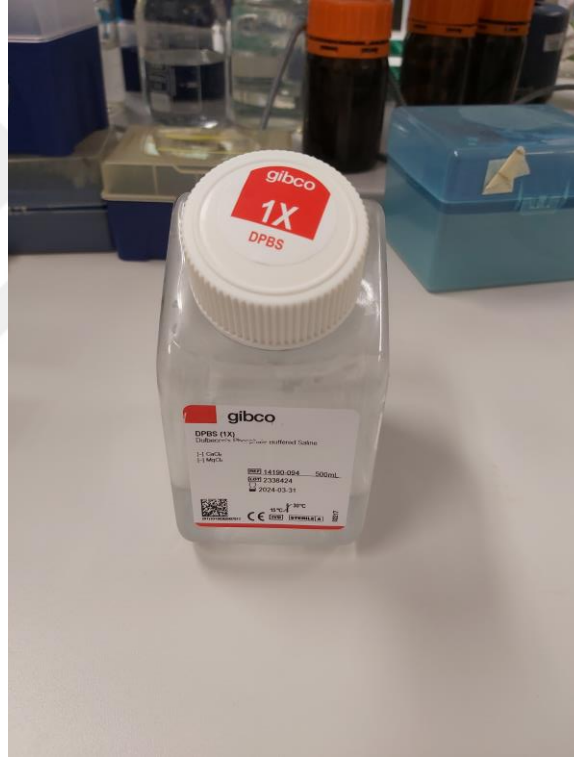


Şekil 3. 3 : İnkübatör

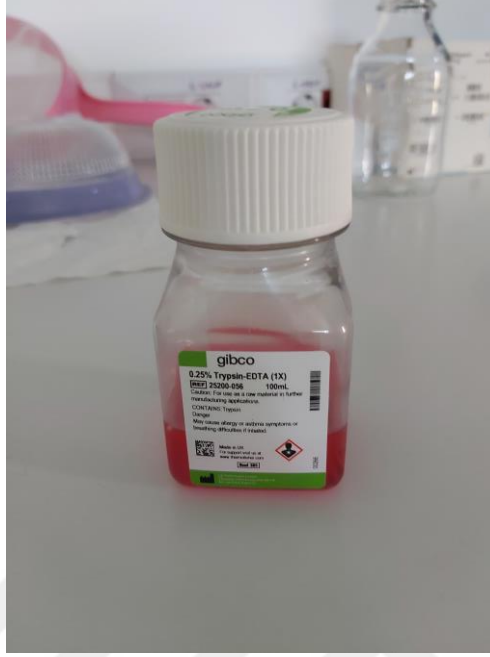
### 3.4 Apikal Papilla Kök Hücrelerin Pasajlanması

Çalışmada kullanılmadan önce hücrelerin birlikte bulunduğu media uzaklaştırıldı. PBS (Fosfat tamponlu salin solüsyonu, Gibco) (Şekil 3.4) ile yıkandı. Tripsin-EDTA

(0.25%) (Şekil 3.5) ilave edilerek 37°C sıcaklıkta 5 dk inkübe edildi. İçerisine yeniden 1:1 DMEM eklenerek falkona aktarıldı. Daha sonra 1300rpm 5dk boyunca santrifüjlendi (Şekil3.6). Pelet 1ml media ile çözüldü ve T150'ye aktarıldı. Böylece 1.Pasaj elde edildi. Hücreler bu şekilde çoğaltıldı. 4.ve 5. pasajlar çalışmada kullanıldı.



Şekil 3. 4 : PBS



Şekil 3. 5: Tripsin EDTA



Şekil 3. 6 : Santrifüj

### 3.5 Akış Sitometrisi Yöntemi ve Kök Hücre Karakterizasyonu

4. Pasajdaki SCAP Hücreleri 15'lik falkon içinde çöktürüldü ve iki kez 1 ml PBS ile yıkandı. 50 µl FC blok 1x ile 5 dk buz üzerinde bekletildi. Şu spesifik yüzey antikorları ile hücreler muamele edildi: CD14 (cat# SC-7328), CD29 (cat# BD556049), CD34 (cat#

SC-51540), CD45 (cat# SC-70686), CD90 (cat# SC-53456), CD105 (cat# SC-71043), CD133 (cat# SC-65278), CD166 (cat# SC-53551) (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), ve CD73 (cat# 550256) (Zymed, San Francisco, CA). Bu bakılmak istenen yüzey spesifik antikorlar 100 µl facsbuffer (PBS 1.0% Bovine Serum Albumin (BSA) 0.1% Sodium Azide) içinde çözülerek hücreler buz üzerinde bir araya getirildi. Daha sonra 1400rpm 5 dk. boyunca santrifüjlendi. Pelet yıkandı facsbuffer ile akış sitometri cihazında (CYTOFLEX S) okutuldu (Şekil3.7).



Şekil 3. 7 : Akış Sitometri Cihazı

### 3.6 MTA Disklerinin Hazırlanması

Çalışmada 3 farklı kalsiyum silikat içerikli siman (Tablo 3.1), ProRoot WMTA (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN, ABD), Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, ABD), Pd MTA White (Produits Dentaires SA, İsviçre) kullanıldı.

**Tablo 3.1** Kullanılan siman çeşitleri ve içerikleri

ÜRÜN ADI	KİMYASAL İÇERİK	ÜRETİCİ FİRMA
<b>ProRoot-WMTA</b>	Toz: Portland siman, bizmut oksit, kalsiyum sülfat dehidrat, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, tetrakalsiyum alüminoferrit Likit: Distile su	Dentsply Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN, ABD
<b>Neo MTA Plus</b>	Toz: Trikalsiyum silikat, Dikalsiyum silikat, Tantalum oksit Likit: Distile su, polimerler	Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL, ABD
<b>Pd MTA White</b>	Toz: Silisyum dioksit, Potasyum oksit, alüminyum trioksit, sodyum oksit, demir trioksit, kükürt trioksit, kalsiyum oksit, bizmut, magnezyum oksit Likit: Distile su	Produits Dentaires SA, İsviçre



**Şekil 3. 8 : MTA Diskleri**

Çalışmada kullanılan tüm malzemeler, aseptik koşullar altında ve üreticilerin talimatlarına uygun olarak laminer akışlı çalışma kabininde otoklavda steril edilmiş karıştırma camı üzerinde, steril spatüllerle karıştırıldı (Şekil 3.8). MTA tabancası ile teflon halkalara (5 mm çap ve 2 mm yükseklik, malzeme başına n = 3) taşındı ve kondanse edildi. Örnekler, 48 saat boyunca nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren bir inkübatörde tamamen sertleşmesi için bırakıldı. Örnekler deneyden önce ultraviyole ışınlama altında 45 dk sterilize edildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3. 9 : UV ile Sterilizasyon**

### **3.7 Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve MTS ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi**

Hazırlanan diskler ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White olmak üzere üç deney grubu, pozitif ve negatif olmak üzere iki kontrol grubuna ayrıldı. Pozitif kontrol grubuna kesin toksik olduğu bilinen dimetilsülfoksit ( $C_2H_6OS$ ) %20 eklenirken, negatif kontrol grubuna hücrelerin doğal yaşam alanı olan media ve hücreler yerleştirildi. SCAP (10.000 hücre/kuyu) olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, Corning, NY) ekildi. Hücrelerin kaplara tutunması için 1 gün beklendi. Daha sonra ProRoot WMTA, Neo MTA Plus ve Pd MTA White diskler ile 1 hafta muamele edilmiş medialar  $22\ \mu m$ 'lik filtreden (GVS Filter Technolog,USA) geçirildikten sonra verildi. Sonraki gün medialar atıldı ve içerisine PBS+glikoz%10+MTS(3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-yl)-5-(3-karboksi-metoksi-fenil)-2-(4-sülfo-fenil)-2H tetrazolyum CellTiter96 Aqueous One Solution, Promega, İngiltere,%10) solüsyonu konuldu (Şekil 3.10). 1 saatlik  $37\ ^\circ C$  inkubasyon sonrasında Elisa Reader (Enzyme Linked Immunosorbent Assay Palte Reader) ile 1,4,7 ve 14. gün dataları  $490\ nm$  de okutuldu (Şekil 3.11).



**Şekil 3. 10 :** Hazırlanmış MTS Solüsyonu



**Şekil 3. 11 :** Elisa Reader

### **3.7 Alkalın Fosfataz Aktivitesi İle Odontojenik Farklılaşmanın İncelenmesi**

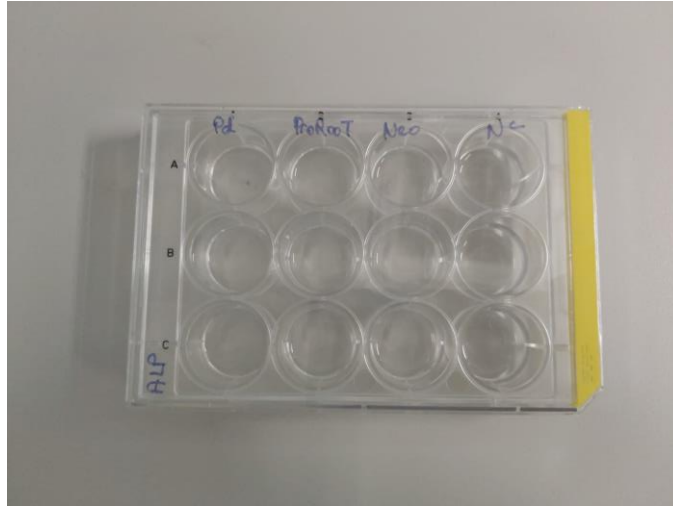
SCAP'lar, 50.000 hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Odontojenik farklılaşma ortamı, DMEM (1gr/l) , 0.1 mmol/L deksametazon (AppliChem, Darmstadt, Almanya), 10 mmol/L b-gliserol fosfat (Sigma-Aldrich, St

Louis, MO) ve 50 mg/mL askorbik asit (Sigma-Aldrich) olarak hazırlandı. Media gün aşırı değiştirildi ve hücreler 14 gün boyunca odontojenik farklılaşma ortamı ile muamele gördü. Pozitif kontrol grubu farklılaşmanın net olarak görülebileceği odontojenik farklılaşma mediasını içerecek şekilde; negatif kontrol grubu ise odontojenik farklılaşma mediası içermeyecek şekilde hazırlandı.

SCAP'ın odontojenik potansiyelini değerlendirmek için Alkalin fosfataz (ALP) aktivitesi incelendi. Odontojenik farklılaşmadan sonra, media çıkarıldı ve hücrelere, PBS içinde lizis için %0,2 (a/h) Triton X-100 (Bio Basic Inc, Markham, Ontario, Kanada) eklendi. 2 saat oda sıcaklığında vortekslendi. 96 kuyucuklu kültür kabına her bir oyuğuna hücre lizatı ilave edildikten sonra 80 µl ALP solüsyonu (BioAssay Systems, Hayward, CA) ilave edildi. 15 dakikalık karanlıkta inkübasyondan sonra Elisa Reader kullanılarak 405 nm'de ölçüm yapıldı.

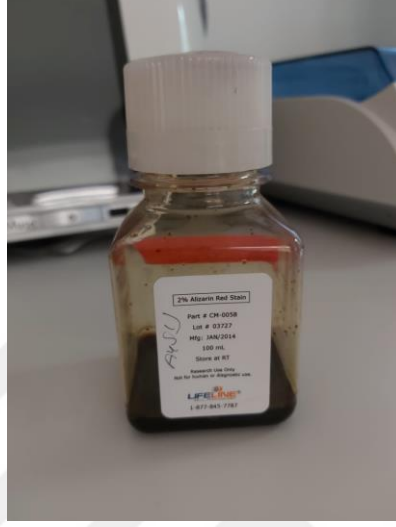
### 3.8 Alizarin Red Boyama ile Kalsifikasyon Odaklarının Görülmesi

Hücreler, 25.000 hücre/kuyu konsantrasyonunda 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi (Şekil3.12). Medialar uzaklaştırıldı. PBS ile yıkandı. 30 dk boyunca 3ml etanol%100 ile fikse edildi. Etanol uzaklaştırılıp kurumaya bırakıldı.



Şekil 3. 12 : Hücrelere boya eklenmeden önce

1 ml %2 alizarin red boyası (Lifeline Cell Technology, California, ABD) (Şekil 3.13) eklendi ve eşit şekilde dağılması için hafifçe sallandı. 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (Şekil 3.14).



Şekil 3. 13 : Alizarin Red Boyası



Şekil 3. 14 : Alizarin Red ile boyanan hücreler

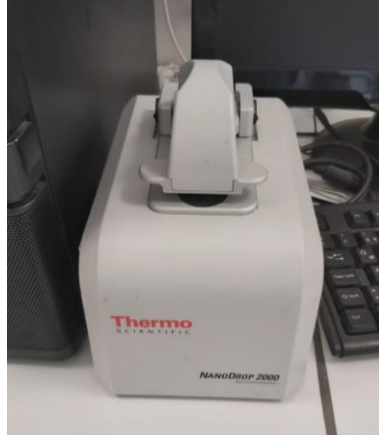
Üç kez distile su ile yıkandıktan sonra hücreler ışık mikroskobu (ZEISS Ax10) ile gözlendi (Şekil 3.15).



**Şekil 3. 15 : Işık mikroskobu**

### **3.9 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR)**

Odontojenik farklılaşmadan sonra, üretici firmanın talimatlarına göre High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak toplam RNA izolasyonu yapıldı. Tamamlayıcı DNA sentezi, High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche, Indianapolis Indianapolis, IN) kullanılarak yapıldı. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) Maxima SYBR Green/ROX spektrofotometresi (Thermo Scientific) kullanılarak farklılaşma sonrası markör genlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi (Şekil 3.16).



**Şekil 3. 16 :** Spektrofotometre

Tamamlayıcı DNA'lar, primerler ve Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix ile karıştırıldı. Verilerin normalleştirilmesi için referans geni olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Genlerin primer dizileri Tablo 3.2'de verilmiştir. Tüm RT-PCR deneyleri, iCycler RT-PCR saptama sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.17).



**Şekil 3. 17 :** Bio-Rad RT-PCR cihazı

**Tablo3. 2** Primer Listesi

<b>MARKER</b>	<b>GEN DİZİLİMİ (5'-3')</b>
<b>OCN (Osteocalcin)</b>	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT TCAGCCAACCTCGTCACAGTC
<b>COL1A1 (Collagen type 1)</b>	CCACGCATGAGCGGACCCTAA ATTGGTGGGATGTCTTCGTCTTGG
<b>RUNX2 (Runt-related transcription factor2)</b>	CCGCACGACAACCGCACCAT CGCTCCGGCCCAAAATCTC

### 3.10 İstatistiksel Analiz

RT-PCR ve ALP aktivite verileri ortalama +/- standart hatalar olarak gösterilmiştir. RT-PCR verilerinin sonuçları, GAPDH'nin haberci RNA seviyesine göre normalleştirildi. Sonuçların istatistiksel analizi, tek yönlü varyans analizi ve ardından GraphPad Prism 5 yazılımı kullanılarak çoklu karşılaştırma Anova Tukey testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanıldı ve  $p < 0,05$  olması durumunda anlamlı farklılığın olduğu kabul edildi.

## **4.BULGULAR**

Bu çalışmada farklı trikalsiyum silikat esaslı simanların apikal papilla kök hücreleri üzerindeki etkisi sitotoksosite ve odontojenik farklılaşma açısından değerlendirildi.

### **4.1 SCAP Karakterizasyonu**

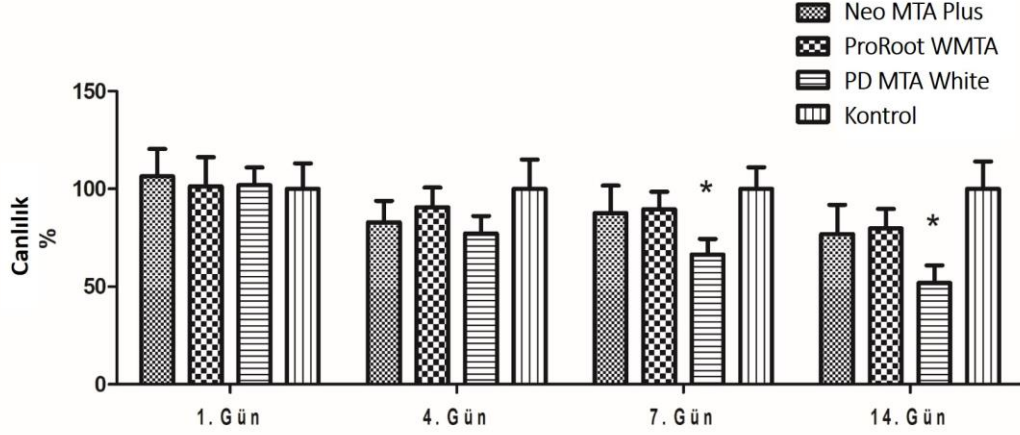
Apikal papilla dokusundan izole edilen ve pasajlanan hücrelerin akış sitometrisi yöntemi ile karakterizasyonu sağlandı.

SCAP, akış sitometrisi ile CD14, CD29, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD44 ve CD166 yüzey antijenleri için karakterize edilmek üzere analiz edildi. Hücreler CD29, CD73, CD44, CD90, CD105 ve CD166 için pozitifken, CD14, CD34 ve CD45 için negatif sonucuna ulaşıldı.

Bu veriler, SCAP'lerin mezenkimal kök hücre belirteçleri için pozitif ve hematopoetik kök hücre belirteçleri için negatif olduğunu gösterdi.

### **4.2 MTS ile SCAP Canlılığının Değerlendirilmesi**

Farklı MTA çeşitlerinin apikal papilla kök hücreleri üzerindeki canlılıklarının ölçülmesi için MTS yöntemi kullanılmıştır. Bu ölçümler 1., 4., 7. ve 14. günlerde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1' deki gibidir.



**Şekil 4. 1 :** MTS testi sonuçları

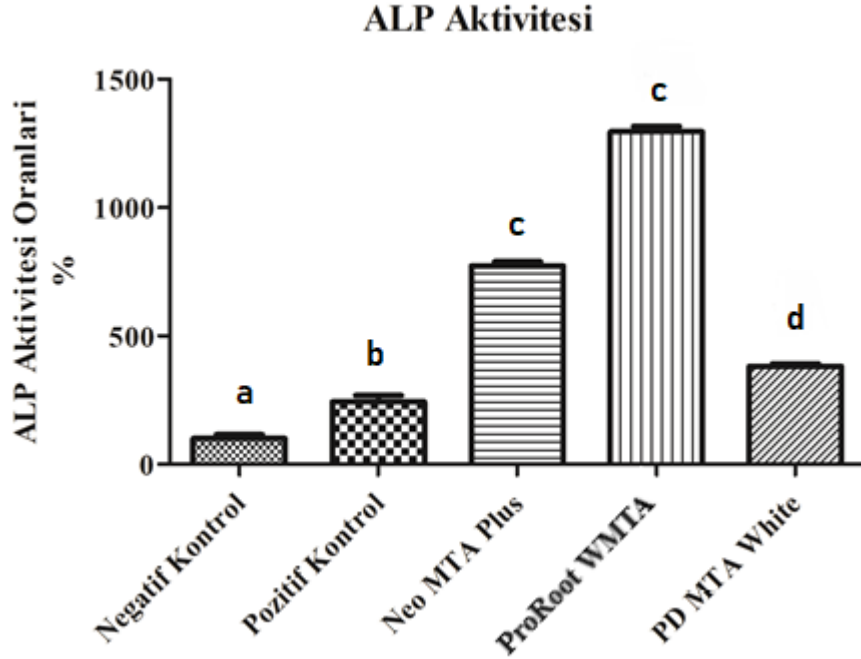
MTS yöntemi ile elde edilen 1., 4., 7. ve 14. güne ait canlılık değerleri ortalamalarının grafiksel görünümü. \*İşareti gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ).

MTS yöntemi ile 1. ve 4.günde elde edilen veriler incelendiğinde; canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.1)

7.ve 14.gün ölçümlerinde ProRoot WMTA, Neo MTA Plus grupları kontrol grubuna göre canlılık değerleri arasında anlamlı farklılık gözlenmezken Pd MTA White grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Alkalin Fosfataz Aktivitesi

Alkalin fosfataz aktivitesi değerlendirilen gruplarda ProRoot WTMA ve Neo MTA Plus grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da en yüksek ALP aktivitesi ProRoot WTMA grubunda görüldü ( $p>0,05$ ). MTA çeşitleri arasında en düşük ALP aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Pd MTA White grubunda olduğu tespit edildi ( $p<0,05$ ). Negatif kontrol grubu ile tüm MTA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ( $p<0,05$ ). Böylece odontojenik diferansiyasyonun erken evresinde görülen alkalin fosfataz aktivitesinin tüm MTA gruplarında aktif olduğu görüldü. (Şekil 4.2).



Şekil 4 . 2 : Alkalin fosfataz aktivitesi oranları

#### 4.4 QRT-PCR Bulguları

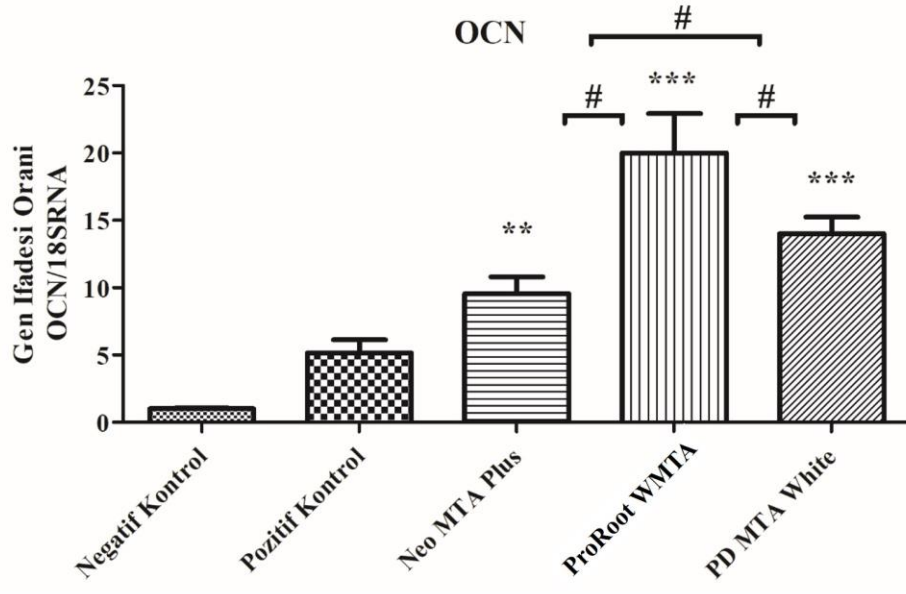
Odontojenik farklılaşmayı değerlendirmek için tüm gruplar QRT- PCR düzeyinde değerlendirildi. Bu değerlendirme için OCN, RUNX2, Col1A1 gen düzeyinde değerlendirmeler yapıldı.

OCN geni düzeyinde yapılan değerlendirmeye göre istatistiksel olarak en yüksek düzey ProRoot WMTA grubunda görüldü ( $p<0,05$ ). Neo MTA Plus grubu diğer MTA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az düzeyde OCN gen ekspresyonu görüldü ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.3).

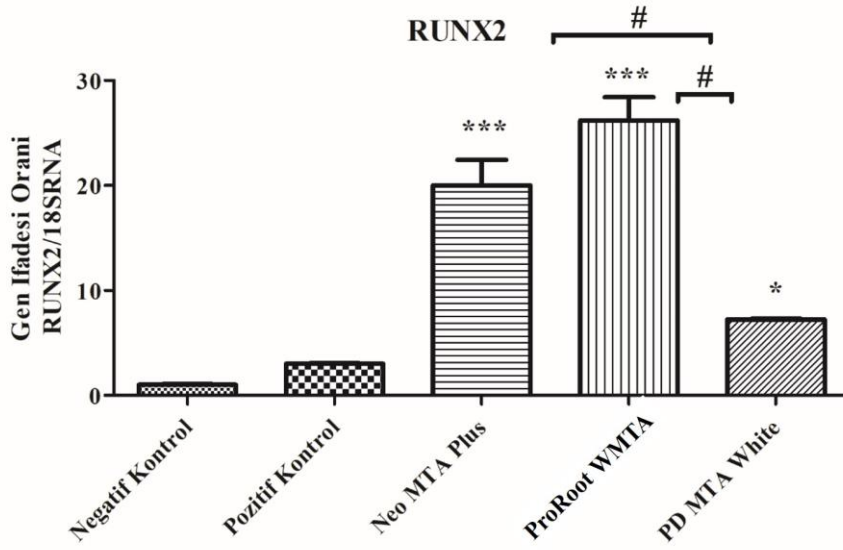
RUNX2 geni düzeyinde yapılan değerlendirmede ise MTA grupları arasında istatistiksel olarak en düşük gen ekspresyonu düzeyi Pd MTA White grubunda görüldü ( $p<0,05$ ). Bu grupta diğer MTA gruplarından daha düşük düzeyde olsa da negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek gen ekspresyonu görüldü ( $p<0,05$ ). ProRoot WMTA ve Neo MTA Plus gruplarında RUNX2 geninin ekspresyonu kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da ( $p>0,05$ ), Pd MTA White grubundan anlamlı ölçüde daha yüksek görüldü ( $p<0,05$ ). (Şekil 4.4)

Odontojenik farklılaşma için Col1A1 gen düzeyinde yapılan QRT-PCR sonrası elde edilen bulgular Şekil4.5'te belirtildiği gibidir. Bu gen ekspresyonu MTA grupları arasında ProRoot WMTA grubunda istatistiksel olarak en yüksek düzeyde görülürken ( $p<0,05$ ), Pd MTA White ve Neo MTA Plus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ( $p>0,05$ ). Rakamsal olarak Pd MTA White grubunda Col1A1 gen ekspresyonu Neo MTA Plus' tan yüksek düzeyde görüldü.

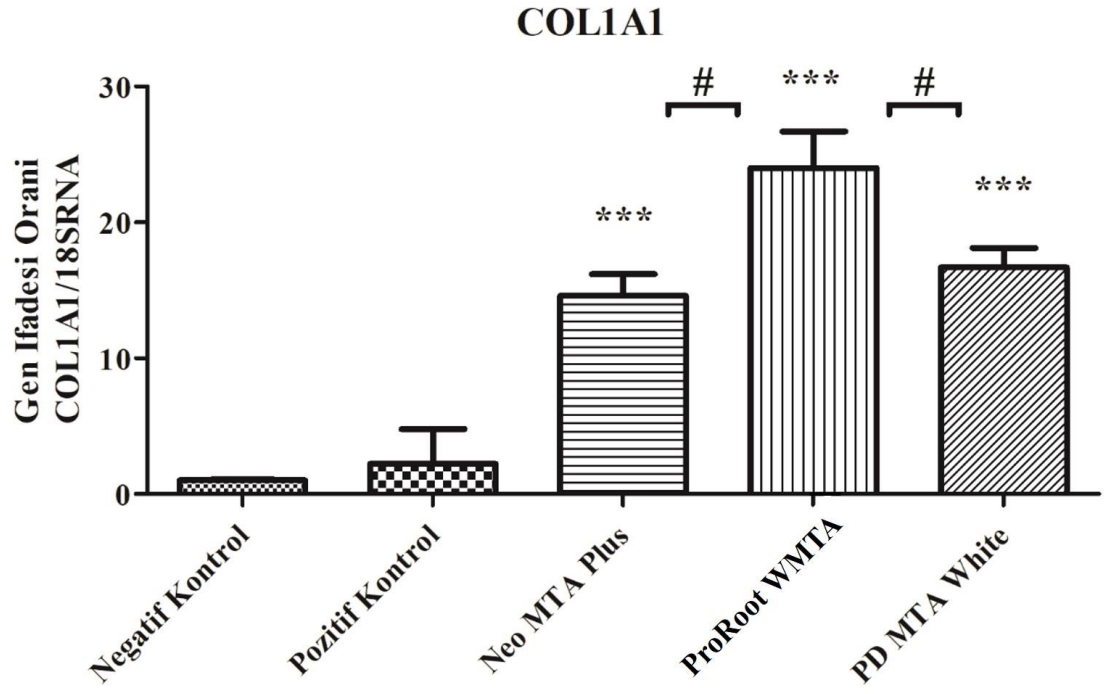
Odontojenik farklılaşma konusunda aktif olması beklenen üç farklı gende de Neo MTA Plus, Pd MTA White ve ProRoot WMTA gruplarında ekspresyon gözlendi. Tüm MTA çeşitleri negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0,05$ ).



Şekil 4 . 3: OCN gen ekspresyonu oranları



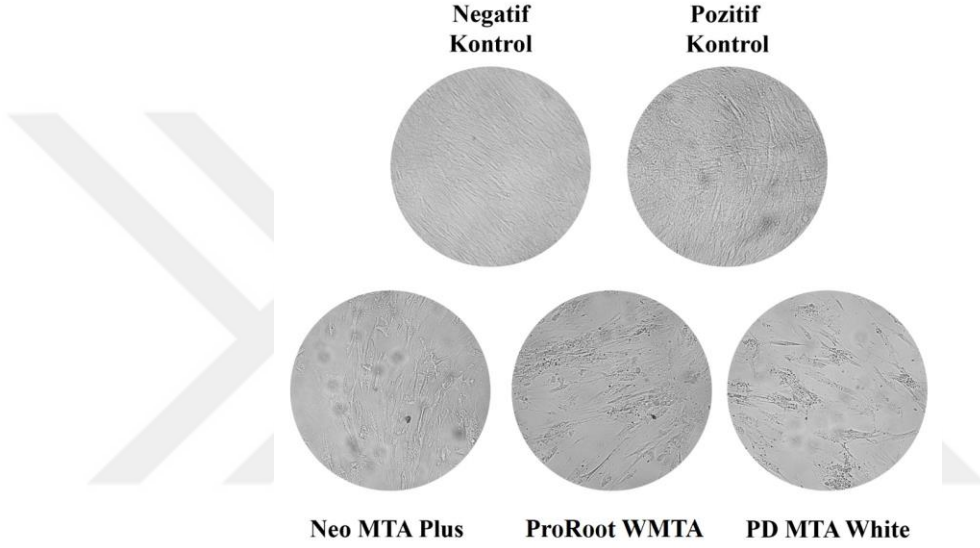
Şekil 4 . 4: RUNX2 gen ekspresyonu oranları



Şekil 4 . 5: COL1A1 gen ekspresyonu oranları

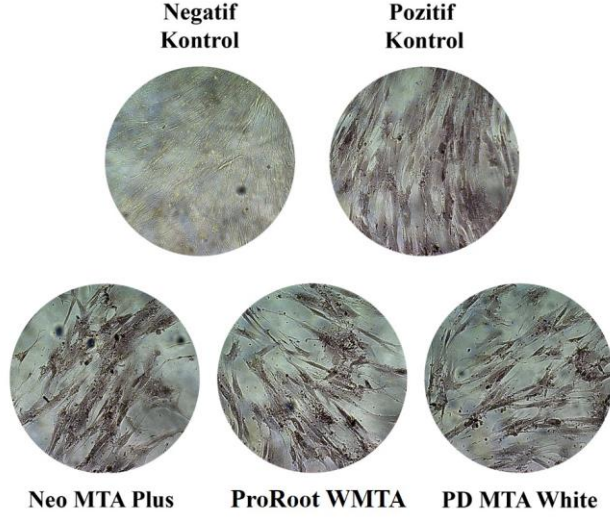
#### 4.5 Alizarin Red Boyama

Odontojenik farklılaşmada kalsiyum birikintilerinin görülebilmesi için alizarin red boyaması yapıldı. Boyama öncesi örnekler ışık mikroskobu ile görüntülendi (Şekil4.6)



**Şekil 4 . 6 :** Boyama öncesi ışık mikroskobu ile hücrelerin görüntüleri

SCAP; ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White içeren odontojenik farklılaşma ortamında kültürlendi. Alizarin Red boyama yapıldı ve SCAP'lerinin oluşturduğu  $Ca^{2+}$  birikintileri ışık mikroskobunda görüntülendi. MTA grupları ve odontojenik ortamla muamele edilmiş SCAP'lerinde  $Ca^{2+}$  tortuları görüldü. Pozitif kontrol grubunda sadece odontojenik farklılaşma ortamı ile tedavi edilen hücreler tarafından  $Ca^{2+}$  tortu oluşumu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubu ise, tek başına SCAP'lerini göstermektedir. Negatif kontrol grubunda  $Ca^{2+}$  oluşumu görülmedi. Çalışmada incelenen tüm MTA gruplarının sert doku oluşumu için uygun ortamlar olduğu doğrulandı (Şekil4.7).



**Şekil 4 . 7:** Boyama sonrası ışık mikroskobu ile hücrelerin görünüşleri

## 5.TARTIŞMA

RET, çürük veya travma nedeniyle hasar görmüş olgunlaşmamış daimi dişlerin kanal boşluğundaki dentin-pulpa kompleksini yeniden oluşturmak için uygulanan tedavi protokolüdür. Bu tedavi yöntemi ile diş kökünün gelişiminin devam etmesi ve dişin vitalitesini tekrar kazanması amaçlanmaktadır [10]. RET'te bu hedefe kök kanalının dezenfeksiyonun, kan pıhtısının kanala indüksiyonu, kanal girişlerinin hermetik kapanması ve koronal restorasyonun yapılması ile ulaşılır. Eğer kanallar etkili bir biçimde temizlenebilir ve sızdırmaz bir restorasyon yapılabilirse, tedavinin prognozu önemli ölçüde olumlu yönde gelişmektedir [179]. Belirtilen şekilde kanal girişlerinin sızdırmaz şekilde kapatılması için MTA kullanılmaktadır. Sızdırmazlığın yanı sıra SCAP üzerindeki etkileri de tedavi üzerinde etkili bir faktördür. Bu çalışmada RET'te kullanılan ve piyasada rutin olarak bulunan üç farklı trikalsiyum silikat esaslı simanın SCAP üzerindeki sitotoksisite ve odontojenik farklılaşmaya etkisi açısından incelemek amaçlanmıştır.

İmmatür dişlerde rejeneratif endodontik tedavinin başarılı olabilmesi için apikal bölgedeki vital dokuların zarar görmemiş olması gerekmektedir [180]. RET ile pulpa dentin kompleksinin yeniden inşa edilebilmesi için gerekli anahtar bileşenler; kök kanal dezenfeksiyonu ve kök hücreler üzerinde toksik olmayan materyallerin kullanımı olarak sıralanmıştır [181]. Bu nedenle kullanılacak solüsyon ve medikamanlar tedavi seyri üzerinde kritik öneme sahiptir. Kullanılan materyallerin kök hücrelere zarar vermemesi, sitotoksik özellikte olmaması gerekmektedir [182].

Hücre kültürleri birincil ve devamlı olarak iki çeşit yol ile elde edilebilir. Birincil hücre kültürü, canlı dokudan örnek hazırlanarak elde edilir. Devamlı hücre kültürü ise, sabit bir fenotipe sahip olan, sınırsız bölünme yeteneği olan kültürlerdir [183]. Apikal papilla kök hücreleri (SCAP), odontoblastlara, adipositlere, osteojenik ve sinir benzeri hücrelere farklılaşma kapasitesi bulunan kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücrelerin bir tipi olan SCAP'lerin rejeneratif tıp ve doku mühendisliğindeki kullanımı artmıştır [184].

Birincil hücre kültüründe; elde edilmesinin ve korunmasının zor olması, elde edilen hücrenin o dokuya ait olduğunun kanıtlanmasının zorluğu, kontaminasyon tehlikesi, etik problemlerin ortaya çıkması gibi dezavantajları vardır. Devamlı hücre kültüründe ise pasajlanmasının kolay oluşu, hücre çoğalmasının hızlı sağlanabilmesi, etik problemlerin olmaması gibi avantajlara sahiptir [185].

Devamlı hücre kültürünün, dental pulpa veya dişeti hücrelerinin *in vivo* sahip olduğu spesifik metabolik potansiyelden yoksun, basit replikasyon sistemleri olduğu iddia edilmektedir [186]. Birincil hücre kültürü, insan *in vivo* doku yanıtını daha güvenilir şekilde vermektedir [187]. Bölgeye özgü metabolik aktiviteye sahip birincil hücre kullanımı ile gerçeğe daha benzer koşulların oluşacağını düşünerek çalışmamızda *in vitro* birincil hücre kültürü tercih edilmiştir.

Kök hücreler hasarlı bir dokunun tekrar işlevini yerine getirebilmesi ve tedavinin sağlanabilmesi için rejeneratif tıp alanında kullanılan en önemli hücrelerdir. Bu hücreler izole edildikleri bölgenin özelliklerini taşımaktadırlar. Spesifik bir bölgedeki dokunun onarımı için o bölgeden izole edilen hücrelerin kullanılması gerekmektedir [188]. Kök hücre çalışmalarında kolay elde edilebilir olması, yüksek proliferasyon kapasitesi sebebiyle mezenkimal kök hücreler sıklıkla kullanılmaktadır [189].

Apikal bölgede bulunan SCAP daha önce keşfedilen [137] diş pulpası kök hücrelerine (DPSC) benzer özellikler gösterse de, histolojik, immünohistokimyasal, hücresel ve moleküler analizlerle değerlendirilen birçok açıdan farklı davranmaktadır. SCAP'nin kök dentin oluşumundan sorumlu primer odontoblastların kaynağı olduğu, buna karşın hDPSCs'nin tamir dentini üreten odontoblastların yerini aldığı bilinmektedir. Bu kanıtlar, gelişmekte olan bir dokudan türetilen SCAP'nin, doku rejenerasyonu için üstün bir hücre kaynağı olabilen erken kök hücrelerin bir popülasyonunu temsil edebileceğini göstermektedir [18].

SCAP'nin DPSC'ye göre popülasyonunu daha hızlı arttırdığı, daha yüksek doku rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu, kök hücreye özgü daha çok pozitif yüzey antijeni

barındırdığı ve antiapoptotik protein ekspresyonunun daha çok olduğu tespit edilmiştir [190].

Komplike kron kırığı olan immatür diş ile ilgili yapılan bir çalışmada pulpa uzaklaştırılmasına rağmen apikal papilla varlığı kaybolmadığı için kök oluşumunun devam ettiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda immatür dişlerde pulpa dokusuna dokunmayıp apikal papilla uzaklaştırıldığında kök ucu oluşumunun devam etmediği gözlemlenirken apikal papillası uzaklaştırılmayan dişlerde kök oluşumu devam etmiştir [18].

Çalışmalarda SCAP pasajlanması için bir hafta beklenmesi yeterli olurken DPSC'ler için daha uzun süre beklenmesi gerektiği bildirilmiştir. SCAP kolonileri hem erken sürede hem de çok sayıda oluşmaktadır [191]. Bu çalışmada yukarıda bahsedilen söz konusu tüm bu sebeplerden dolayı apikal papilla kök hücreleri kullanılmıştır.

Başlıca apikal papilla kök hücre kaynakları arasında çekilmiş yirmi yaş dişleri, ortodontik tedavi veya travma sebebiyle çekilen apeksi açık dişlerdir. Apikal papilla kök hücre çalışmalarında, çekim endikasyonu bulunması ve kolayca elde edilebilmesi sebebiyle sıklıkla yirmi yaş dişleri kullanılmaktadır. Ayrıca en son gelişen diş olması sebebiyle gelişiminin erken döneminde çekildiğinde pulpa dokusu açısından zenginlerdir [192, 193].

Çalışmamızda, çekim endikasyonu sıklığı, kolay elde edilebilir olmaları, pulpa dokusu açısından zengin olmaları, ağız ortamı koşullarından etkilenmemiş olması nedeniyle apeksi açık yirmi yaş dişleri kullanılmıştır. Genç donörlerden elde edilen kök hücrelerin daha iyi proliferasyon ve diferansiyasyon gösterme kabiliyetinden dolayı 14-18 yaş aralığındaki hastalar tercih edilmiştir [193]. Tüm hastaların ebeveynlerine Etik Kurul tarafından izin verilmiş olan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu açıklandıktan sonra imzalatılmıştır.

Hücrelerin canlılığını tespit etmek için çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan bileşikler şunlardır: MTT, MTS, XTT ve WST-1. MTS testi (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil tiyazol)-3-(4-sülfenil) tetrazolyum, iç tuz tahlili) bir kolorimetrik tahlildir. MTS testi hızlı, hassas, ekonomik ve

spesifik bir *in vitro* sitotoksosite testidir. Kullanımı kolay, hızlı, güvenilir ve ucuz olduğu için sitotoksosite ölçümünde ideal özellikler sağlamaktadır. Bu nedenle, toksikolojik değerlendirmeler için kullanılmaktadır [160, 161].

MTA ve biyoseramik bir kök kanal dolgusu olan iRoot SP'nin insan dişi kök hücrelerinin (hTGSC'ler) hücre canlılığı, sert doku biriktirme kapasitesi ve odontojenik farklılaşması üzerindeki etkisini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada 1. ve 3. günler hücre canlılıklarını değerlendirmek için MTS testi kullanılmıştır [194].

MTS yöntemi, MTA, Biodentine ve MM-MTA'nın insan alveolar kemik iliği kök hücrelerinin hücre canlılığının incelendiği bir çalışmada sitotoksositeyi değerlendirmek için kullanılmıştır [195].

MTA Fillapex (MTA bazlı salisilat rezin içerikli kanal patı), iRoot SP (biyoseramik içerikli kanal patı) ve AH Plus Jet'in (epoksi rezin içerikli kanal patı) hTGSC'ler üzerindeki sitotoksik etkisini inceleyen çalışmada MTS yöntemi ile 1., 3., 7., ve 14., günler hücre canlılığı değerlendirilmiştir [196].

MTA ve Biodentine'nin periodontal ligament fibroblastları üzerindeki sitotoksik ve hücre sel adezyonunu değerlendirmek için yapılan bir çalışma da MTS solüsyonu ile muamele edilen hücrelerdeki değişimler 12.saat, 24.saat, 48.saat, 5.gün ve 7.gün mikropate okuyucu ile değerlendirilmiştir [197].

Biyoaktif tekil dağılımlı nanokürelerin uzun dönem antibakteriyel etkisinin endodontik sızdırmazlık açısından etkisini inceleyen bir çalışmada Endomethasone C, AH Plus ve ProRoot WMTA gruplarına 1.,4. ve 7. günlerde MTT testi kullanılmıştır [198].

Chang ve arkadaşları, Bioaggregate, Micromega MTA, ProRoot WMTA ve ara restoratif materyalin (IRM) insan pulpa hücreleri üzerindeki biyoyumluluğunu 1, 7 ve 14. günlerde MTT testi ile değerlendirmiştir. Bioaggregate, Micromega MTA ve ProRoot WMTA'nın eşit biyoyumluluk gösterdiğini; IRM'nin bu malzemelerle karşılaştırıldığında sitotoksik etkisi olduğunu bildirmişlerdir [199].

Luo ve arkadaşları, dört farklı konsantrasyonda Biodentine solüsyonunun (Biodentine 0,02 mg/ml; Biodentine 0,2 mg/ml; Biodentine 2 mg/ml; Biodentine 20 mg/ml) 1., 3., 5. ve 7. günün sonunda DPSC'ler üzerindeki etkilerini MTT testi ile incelemişlerdir. Biodentine 0,2 mg/ml ve Biodentine 2 mg/ml gruplarının DPSC'lerin proliferasyonunu arttırdığını ancak biodentine en yüksek konsantrasyonu 20 mg/ml'nin sitotoksik etki ile hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir [200].

Rodrigues ve arkadaşları, MTA Plus ve MTA Angelus'un insan pulpa kök hücreleri üzerindeki etkilerini MTT testi ile değerlendirmiş ve hiçbir deney grubunun hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca akış sitometrisi ile apoptotik ve nekrotik hücre oranlarını da incelemiş ve her iki deney grubundaki apoptotik hücre oranları birbirine ve pozitif kontrol grubuna benzer bulmuşlardır. MTA Plus ve MTA Angelus'un apoptozu indüklediğini ancak nekrotik hücrelerde küçük bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir [201].

Tanomaru-Filho ve arkadaşları, Neo MTA Plus, MTA Angelus ve tantal oksit içeren trikalsiyum silikat simanın biyouyumluluğunu MTT testi ile araştırdıklarında DPSC'ler üzerinde biyouyumlu etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir [129].

Neo MTA Plus, MTA Angelus ve MTA Repair HP'nin diş pulpası kök hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada 1, 3 ve 7. günlerde MTT testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda her üçünde de yüksek düzeyde hücre çoğalması ve bağlanması olduğunu bildirilmiştir [202].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Neo MTA Plus, Biodentine ve ProRoot WMTA'nın DPSC üzerindeki sitotoksik etkisi inceleyen bir çalışmada 1., 3. ve 7., günlerde MTT testi uygulanmıştır. Üç materyalin de sitotoksik olmadığı, apoptoza neden olmadığı ve biyomateryal olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir [203].

Bir biyoseramik içerikli kök kanal patı olan iRoot Fast Set (iRoot FS)'in, insan SCAP proliferasyonu, göçü ve osteo/odontojenik farklılaşması üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırmak için canlılık testi olarak MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT testi 1.,2.,3. ve 4.gün uygulanmıştır. iRoot FS'in yeterli biyouyumluluğa sahip olduğu ve

apiksifikasyonda apikal bariyer olarak veya rejeneratif endodontik tedavide koronal sızdırmazlık materyali olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır [204].

Ayrıca MTS yöntemi çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Sodyum pentaborat pentahidratın diş ve kemik rejenerasyonunda iyi bir alternatif olacağını düşünerek yapılan bir çalışmada [205]; kalsiyum hidroksit içeren simanlar ile MTA'nın hTGSC'lerin proliferasyon ve farklılaşması üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada [206]; dental pulpa kök hücreleri ile prostat kanserinin proliferasyon ve migrasyon açısından ilişkisini değerlendiren bir çalışmada [207]; MTA'nın farklı bir taşıyıcı (KY-Jelly) ile kullanılmasının sitotoksik etkisini incelemek isteyen bir çalışmada [208] MTS yöntemi kullanılmıştır.

Bu çalışmada ProRoot WMTA, Neo MTA Plus ve Pd MTA White olmak üzere üç farklı MTA çeşidinin SCAP üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için 1., 4., 7. ve 14. gün MTS testi uygulanmıştır. 1. ve 4. günler sitotoksite açısından bir fark gözlenmezken 7. ve 14. günlerde Pd MTA White'nin canlılık oranında diğer gruplara kıyasla düşüş meydana gelmiştir. ProRoot WMTA ve Neo MTA Plus arasındaki bu benzer etki önceki çalışmalarını destekler nitelikte olmasına rağmen Pd MTA White ile ilgili literatürde bir çalışma olmadığı için diğer çalışmalarla karşılaştırılamamıştır. Pd MTA White için elde edilen bu bulgunun içerik kaynaklı olduğunu düşünsek de farklı sitotoksite testleri ile Pd MTA White ile ilgili ileri çalışmalar yapılması gerektiği açıktır.

Rejeneratif tedavide bir materyal için biyouyumluluk kadar sert doku oluşumunu indüklemesi de önemli bir özelliktir. Materyallerin mineralizasyonu uyarma yetenekleri farklı hücrel biyokimyasal belirteçlerin ekspresyonu ile değerlendirilebilmektedir [209].

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmaları üç evreye ayrılır. İlk evre 1-4 gün sürer ve hücre sayısı en üst düzeye ulaşır. Bu erken farklılaşma evresinde alkalın fosfataz (ALP) transkripsiyonu ve protein ekspresyonu meydana gelir [210]. Daha sonra ALP seviyesinin azalması ile birlikte ikinci evre başlar. Bu aşamada matriks içinde mineral toplanmaya başlar ve tip 1 kollajen (Col1A1) ekspresyonu meydana gelir [211]. Son olarak 14-28 gün süren 3. evrede kalsiyum ve fosfat birikirken aynı zamanda

Osteokalsin (OCN), Osteopontin (OPN) ve Runt ile İlişkili Transkripsiyon Faktör 2 (RUNX2) gen ekspresyonu yükselir [211, 212].

RUNX2 osteoblastik değişimde önemli bir role sahiptir. Erken dönem kemik oluşumu sırasında bu genin ekspresyonunda artış gözlenmektedir. Osteojenik farklılaşma belirteci olan bu genin eksikliğinde veya mutasyonunda kemik anomalileri meydana gelmektedir. OCN, osteoblastlar tarafından sentezlenen osteojenik bir belirteçtir [213].

Mezenkimal kök hücrelerinde elde edilen besi yeri ile insan embriyonik kök hücrelerinin kültüre edildiği bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında osteojenik aktivitenin hızlandığı, ALP, OPN, OCN, RUNX2 ekspresyonlarının arttığı ve ortamda kalsiyumun biriktiği gözlenmiştir [214]. Bu hücre dışı matristeki mineralizasyon, kalsiyum ve fosfat birikintileri von Kossa [215] veya Alizarin Red [216] boyaması ile görselleştirilmektedir.

Kalsiyum silikat esaslı materyallerin biyoaktivite çalışmalarında odontojenik, osteojenik enzim ya da genlerin ekspresyonu ve miktarı incelenmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem RT-PCR, ALP enzim aktivite testleri ve Alizarin Red ile boyamadır ve çalışmamızda da bu yöntemler kullanılmıştır.

MTA, Total Fill (biyoseramik içerikli kanal dolgu patı) ve Biodentine'nin insan kemik iliği kök hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, ALP aktivitesinin Elisa yöntemi ile; OPN, OCN, Col1A1 genleri RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Tüm grupların ALP aktivitesini zamana bağlı olarak arttırdığı ve sert doku oluşumunu indükledikleri bildirilmiştir [217].

ProRoot WMTA, Biodentine ve Kalsiyum hidroksit içerikli bir kanal patının sitotoksosite açısından değerlendirmek için MTT testi uygulanmış ve odontojenik farklılaşmalarını karşılaştırmak için ALP aktivitesi incelenmiştir. Kalsiyum hidroksitin ALP gen ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Biodentine'nin MTA'ya oranla daha fazla ALP gen ekspresyonu sağladığı ve daha fazla mineralizasyon meydana geldiği bildirilmiştir [218].

Yapılan bir çalışmada Biodentine, TheraCal LC (rezin içerikli kalsiyum silikat liner) ve MTA Angelus'un DPSC üzerindeki canlılık ve odontojenik farklılaşmaları incelenmiştir. Odontojenik farklılaşmayı RT-PCR yöntemi ile ALP, OCN, Kemik sialoprotein, RUNX2, dentin sialoprotein biyolojik belirteçleri kullanılmıştır. Biodentine'nin ve MTA Angelus'un ALP seviyelerinde belirgin artış gözlenirken TheraCal LC'de belirgin artış gözlenmemiştir. EN yüksek ALP aktivitesi Biodentine'de gözlenmiştir [219].

Root Repair Material Putty (RRMPU,Brasseler), Root Repair Material Paste (RRMPA, Brasseler), Fast-set Putty (FSP, Brasseler), Biodentine, ve ProRoot WMTA osteojenik potansiyelini değerlendirmek amacıyla alkalen fosfataz aktiviteleri ölçülmüştür. Test edilen biyoseramikler, MTA'dan daha yüksek seviyelerde biyoyumluluk ve biyoaktivite göstermiştir; RRMPU ve FSP ile MTA'ya kıyasla daha yüksek bir mineralizasyon kapasitesi gösterdiği hücre kültürlerinde mineralize nodüllerin gözlemlenmesi ve Alizarin Red boyaması ile doğrulanmıştır [220].

Endosequence biyoseramik içerikli kök kanal patının (ESRRM; Brasseler USA, Savannah, GA), sitotoksitesinin ve sert doku oluşumunun ProRoot WMTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) ve Geristore isimli rezin modifiye cam iyonomer siman (GR; Den-Mat LLC, Santa Maria, CA) ile karşılaştırıldığı bir çalışmada bu materyallerin alkalen fosfataz aktivitesi değerlendirilmiştir. ESRRM'nin , ALP aktivitesini azaltırken ProRoot WMTA ve GR'nin ALP aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir [209].

ProRoot WMTA'nın biyoyumluluğunu ve odontoblastik farklılaşmasını inceleyen bir çalışmada 7. ve 14. Gün alkalen fosfataz aktivitesi değerlendirilmiş kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme olduğu tespit edilmiş ve alizarin red boyası ile mineralizasyon nodülü oluşumları gözlenmiştir [199].

ProRoot WMTA, Biodentine ve MM-MTA'nın alveol kemik iliği kök hücreleri üzerindeki biyoyumluluğu ve mineralizasyonunu inceleyen bir çalışmada alkalen fosfataz seviyeleri ve kalsiyum birikintilerinin görülmesi için Alizarin Red boyası kullanılmıştır. Bu üç materyalin de ALP seviyelerinde artışa neden olduğu ölçülmüş ve boyama ile mineralizasyon odakları görülmüştür [195].

Ortho MTA, MTA Angelus, Biodentine ve IRM (Geçici restoratif materyal)'nin hDPSC üzerindeki biyouyumluluk ve odontojenik diferansiyasyon etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada MTT canlılık testi kullanılmış, MTA ve Biodentine gruplarında benzer sitotoksik etki gözlenmiştir. IRM grubunda daha az canlılık gözlenmiştir. Angelus MTA ve Biodentine'de mineralize nodül oluşumu ve ALP seviyelerinde belirgin artış gözlenirken, IRM'de ALP seviyesi azalmıştır. En yüksek ALP seviyesinin Ortho MTA grubunda olduğu bildirilmiştir. Dentin sialoprotein, osteonektin, OPN, OCN gibi biyokimyasal belirteçler üzerinde kalsiyum silikat esaslı simanların olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir [221].

ProRoot WMTA, RetroMTA ve Biodentine'in SCAP üzerindeki odontojenik farklılaşması Alizarin Red boyama ve RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Biodentine grubunda Alizarin Red boyama ile kalsifikasyon odakları gözlenmiştir. ProRoot WMTA ve RetroMTA gruplarında mineralizasyon bulguları boyama ile görülememiştir. Retro MTA grubunda odontoblastik belirteçlerdeki artış en düşük seviyede gözlenmiştir. Bu durumun önceki çalışmalara benzer olduğu bildirilmiştir [222].

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre trikalsiyum silikat esaslı simanlar ALP aktivitesini ve kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını artırma yeteneğine sahiptir [223-225]. Bizim çalışmamızda da incelenen trikalsiyum silikat esaslı simanların ALP aktivitesini arttığı görülmüştür. ProRoot WMTA ve Neo MTA Plus'ın ALP aktivitesinin Pd MTA White'dan daha yüksek olmasının nedeninin, benzer elementlerden (kalsiyum, silikat, fosfat, karbon, oksijen) oluşmaları da, farklı bir genel birleşim (trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum oksit) olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bu çalışmamızda da odontoblastik farklılaşma tüm gruplarda OCN, RUNX2 VE Col1A genlerinin ekspresyonundaki artış ile sonuçlanmıştır. Mineralize kalsiyum odakları alizarin red boyama ile mikroskop altında gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan trikalsiyum silikat esaslı simanların sert doku oluşumunu arttırdığı sonucu önceki çalışmalar ile de paralellik göstermektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Trikalsiyum silikat esaslı olan üç farklı MTA çeşidinin (ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White) apikal papilla kök hücre canlılığı ve odontojenik farklılaşma üzerindeki etkisinin incelendiği bu *in vitro* çalışmanın sınırlılıkları dahilinde aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşmak mümkündür:

- ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd MTA White'in SCAP canlılığı üzerindeki etkileri arasında 1. ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Ancak 7. ve 14 .günlerde Pd MTA White canlılığa etkisi üzerinde diğer MTA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmektedir.
- ProRoot WMTA, Neo MTA Plus, Pd White MTA'nın ALP aktivitesi ve QRT-PCR ile gen ekspresyonları incelenmiştir. Tüm gruplar odontojenik farklılaşmayı pozitif olarak etkilemektedir. Col1A1 gen ekspresyonu en yüksek ProRoot WMTA grubunda görülmüştür. OCN geni üzerinde Pd MTA White'in etkisi yine farklılaşmaya uygun ortam oluşumu sağlamış olsa da ProRoot WMTA ve Neo MTA'dan anlamlı olarak daha düşük ekspresyon oranı ölçülmüştür. En yüksek düzey ise ProRoot WMTA grubundadır. RUNX2 gen ekspresyonu için en yüksek oran ProRoot WMTA ve Neo MTA Plus grubundadır.
- ProRoot WMT, Neo MTA Plus ve Pd MTA White simanlar apikal papilla kök hücreleri üzerinde ALP aktivitesini ve odontojenik farklılaşmasını artırma yeteneklerine sahiptir. Sert doku oluşumu için Ca<sup>2+</sup> birikintileri üç MTA grubunda da izlenmiştir.

Farklı trikalsiyum silikat esaslı simanların, çeşitli ve birbirini destekleyen yöntemlerle hem canlılık üzerinde hem de odontojenik farklılaşmaya etkisinin incelenmesi amacıyla hem *in vivo* hem de *in vitro* ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Chai, Y. and H.C. Slavkin, *Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective*. Microscopy research and technique, 2003. **60**(5): p. 469-479.
2. Miletich, I. and P.T. Sharpe, *Normal and abnormal dental development*. Human molecular genetics, 2003. **12**(suppl\_1): p. R69-R73.
3. Slavkin, H.C. and L.A. Bavetta, *Odontogenic epithelial-mesenchymal interactions in vitro*. Journal of dental research, 1968. **47**(5): p. 779-785.
4. Chala, S., R. Abouqal, and S. Rida, *Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2011. **112**(4): p. e36-e42.
5. Hargreaves, K.M., et al., *Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?* Pediatric dentistry, 2008. **30**(3): p. 253-260.
6. Hargreaves, K.M., A. Diogenes, and F.B. Teixeira, *Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures*. Pediatric dentistry, 2013. **35**(2): p. 129-140.
7. Rafter, M., *Apexification: a review*. Dental Traumatology, 2005. **21**(1): p. 1-8.
8. Andreasen, J.O., B. Farik, and E.C. Munksgaard, *Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture*. Dental Traumatology, 2002. **18**(3): p. 134-137.
9. Huang, G.T., *Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress*. Regenerative medicine, 2009. **4**(5): p. 697-707.
10. Kim, S., et al., *Regenerative endodontics: a comprehensive review*. International endodontic journal, 2018. **51**(12): p. 1367-1388.
11. Diogenes, A., et al., *Regenerative endodontics: a way forward*. The Journal of the American Dental Association, 2016. **147**(5): p. 372-380.
12. Östby, B.N., *The role of the blood clot in endodontic therapy an experimental histologic study*. Acta Odontologica Scandinavica, 1961. **19**(3-4): p. 323-353.
13. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
14. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. nature, 2007. **448**(7151): p. 313-317.
15. Egusa, H., et al., *Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources*. Journal of prosthodontic research, 2012. **56**(3): p. 151-165.
16. Liao, J., et al., *Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic*. Journal of endodontics, 2011. **37**(9): p. 1217-1224.
17. Sonoyama, W., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine*. PloS one, 2006. **1**(1): p. e79.
18. Huang, G.T.-J., et al., *The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering*. Journal of endodontics, 2008. **34**(6): p. 645-651.

19. Ruparel, N.B., et al., *Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype*. Journal of endodontics, 2013. **39**(3): p. 357-363.
20. Xu, L., et al., *The apical region of developing tooth root constitutes a complex and maintains the ability to generate root and periodontium-like tissues*. Journal of periodontal research, 2009. **44**(2): p. 275-282.
21. Lovelace, T.W., et al., *Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure*. Journal of endodontics, 2011. **37**(2): p. 133-138.
22. Agata, H., et al., *Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells*. Differentiation, 2008. **76**(9): p. 981-993.
23. Aranha, A.M., et al., *Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells*. Journal of endodontics, 2010. **36**(10): p. 1633-1637.
24. Iida, K., et al., *Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells*. Archives of oral biology, 2010. **55**(9): p. 648-654.
25. Sakdee, J.B., et al., *Hypoxia-amplified proliferation of human dental pulp cells*. Journal of Endodontics, 2009. **35**(6): p. 818-823.
26. Bakopoulou, A., et al., *Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP)*. Archives of oral biology, 2011. **56**(7): p. 709-721.
27. Jazayeri, H.E., et al., *Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: A review*. Dental Materials, 2020. **36**(2): p. e47-e58.
28. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
29. Gajkowska, A., et al., *Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2006. **44**(1): p. 53-60.
30. Shi, S. and S. Gronthos, *Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp*. Journal of bone and mineral research, 2003. **18**(4): p. 696-704.
31. Liu, J., et al., *In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2005. **41**(7): p. 232-238.
32. Wingard, J.R. and F.M. Weeks, *Stem Cell Collection for Hematopoietic Transplantation: Stem Cell Sources, Mobilization Strategies, and Factors that Influence Yield*, in *Clinical Applications of Cytokines and Growth Factors*. 1999, Springer. p. 341-356.
33. Chan, S.K., M.E. Hill, and W.J. Gullick, *The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2006. **11**(1): p. 3-11.
34. Ramoshebi, L.N., et al., *Tissue engineering: TGF- $\beta$  superfamily members and delivery systems in bone regeneration*. Expert reviews in molecular medicine, 2002. **4**(20): p. 1.
35. Tabata, Y., *Tissue regeneration based on growth factor release*. Tissue engineering, 2003. **9**(4, Supplement 1): p. 5-15.
36. Vasita, R. and D.S. Katti, *Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective*. Expert review of medical devices, 2006. **3**(1): p. 29-47.

37. Stevens, M.M., et al., *In vivo engineering of organs: the bone bioreactor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(32): p. 11450-11455.
38. Murphy, W., et al., *Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis*. Journal of dental research, 2004. **83**(3): p. 204-210.
39. Murray, P.E. and A.J. Smith, *Saving pulps—a biological basis. An overview*. Primary Dental Care, 2002(1): p. 21-26.
40. Smith, A.J., et al., *Reactionary dentinogenesis*. International Journal of Developmental Biology, 2003. **39**(1): p. 273-280.
41. Tziafas, D., *Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair*. International journal of developmental biology, 2003. **39**(1): p. 281-290.
42. Tziafas, D., et al., *Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components*. Archives of Oral Biology, 1995. **40**(10): p. 883-893.
43. Roberts-Clark, D. and A. Smith, *Angiogenic growth factors in human dentine matrix*. Archives of oral biology, 2000. **45**(11): p. 1013-1016.
44. Smith, A.J., J.B. Matthews, and R.C. Hall, *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in dentine matrix: Ligand activation and receptor expression*. European journal of oral sciences, 1998. **106**(S1): p. 179-184.
45. Smith, A., et al., *Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis*. Advances in dental research, 2001. **15**(1): p. 51-54.
46. Nakashima, M. and A.H. Reddi, *The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering*. Nature biotechnology, 2003. **21**(9): p. 1025-1032.
47. Nakashima, M., et al., *Regulatory role of transforming growth factor- $\beta$ , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells*. Developmental biology, 1994. **162**(1): p. 18-28.
48. Saito, T., et al., *Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts*. Journal of endodontics, 2004. **30**(4): p. 205-208.
49. Iohara, K., et al., *Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2*. Journal of dental research, 2004. **83**(8): p. 590-595.
50. Sloan, A. and A. Smith, *Stimulation of the dentine–pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1–3 in vitro*. Archives of oral biology, 1999. **44**(2): p. 149-156.
51. Sloan, A., R. Rutherford, and A. Smith, *Stimulation of the rat dentine–pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro*. Archives of Oral Biology, 2000. **45**(2): p. 173-177.
52. Nakashima, M., *Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and-4*. Journal of Dental Research, 1994. **73**(9): p. 1515-1522.
53. Nakashima, M., *Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and-4 with collagen matrix*. Archives of oral biology, 1994. **39**(12): p. 1085-1089.
54. Lovschall, H., O. Fejerskov, and A. Flyvbjerg, *Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars*. Advances in Dental Research, 2001. **15**(1): p. 108-112.

55. Brien, F., *Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace*. Mater. Today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
56. Zein, N., et al., *Polymer-based instructive scaffolds for endodontic regeneration*. Materials, 2019. **12**(15): p. 2347.
57. Trevino, E.G., et al., *Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips*. Journal of endodontics, 2011. **37**(8): p. 1109-1115.
58. Jadhav, G., N. Shah, and A. Logani, *Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study*. Journal of endodontics, 2012. **38**(12): p. 1581-1587.
59. Chang, B., et al., *Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2017. **111**: p. 1-26.
60. Raddall, G., I. Mello, and B.M. Leung, *Biomaterials and scaffold design strategies for regenerative endodontic therapy*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2019. **7**: p. 317.
61. Chrepa, V., O. Austah, and A. Diogenes, *Evaluation of a commercially available hyaluronic acid hydrogel (Restylane) as injectable scaffold for dental pulp regeneration: an in vitro evaluation*. Journal of endodontics, 2017. **43**(2): p. 257-262.
62. Dianat, O., et al., *Endodontic repair in immature dogs' teeth with apical periodontitis: blood clot vs plasma rich in growth factors scaffold*. Dental Traumatology, 2017. **33**(2): p. 84-90.
63. Bezgin, T., et al., *Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment*. Journal of endodontics, 2015. **41**(1): p. 36-44.
64. Torabinejad, M. and M. Turman, *Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report*. Journal of endodontics, 2011. **37**(2): p. 265-268.
65. Ulusoy, A.T., et al., *Evaluation of blood clot, platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and platelet pellet as scaffolds in regenerative endodontic treatment: a prospective randomized trial*. Journal of endodontics, 2019. **45**(5): p. 560-566.
66. Fernandes, G. and S. Yang, *Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering*. Bone Research, 2016. **4**(1): p. 1-21.
67. Zhang, W., et al., *The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials*. Biomaterials, 2006. **27**(33): p. 5658-5668.
68. Linde, A., *Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification*. The Anatomical Record, 1989. **224**(2): p. 154-166.
69. Demarco, F.F., et al., *Dental pulp tissue engineering*. Braz Dent J, 2011. **22**(1): p. 3-13.
70. Sakai, V., et al., *SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium*. Journal of dental research, 2010. **89**(8): p. 791-796.
71. Sumita, Y., et al., *Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(17): p. 3238-3248.
72. Zhang, L., et al., *Review scaffold design and stem cells for tooth regeneration*. Japanese Dental Science Review, 2013. **49**(1): p. 14-26.
73. Lee, S.-J., M. Monsef, and M. Torabinejad, *Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations*. Journal of endodontics, 1993. **19**(11): p. 541-544.

74. Lee, D. and G. Bogen, *Multifaceted use of ProRoot™ MTA root canal repair material*. Pediatric Dent, 2001. **23**(4): p. 326-30.
75. Apaydin, E.S., S. Shabahang, and M. Torabinejad, *Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material*. Journal of Endodontics, 2004. **30**(1): p. 21-24.
76. Xavier, C.B., et al., *Root-end filling materials: apical microleakage and marginal adaptation*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(7): p. 539-542.
77. Chng, H.K., et al., *Properties of a new root-end filling material*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(9): p. 665-668.
78. Sarkar, N., et al., *Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate*. Journal of endodontics, 2005. **31**(2): p. 97-100.
79. Camilleri, J. and T.R. Pitt Ford, *Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material*. Int Endod J, 2006. **39**(10): p. 747-54.
80. Enkel, B., et al., *Bioactive materials in endodontics*. Expert review of medical devices, 2008. **5**(4): p. 475-494.
81. Moretton, T.R., et al., *Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement*. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2000. **52**(3): p. 528-533.
82. Camilleri, J., et al., *The constitution of mineral trioxide aggregate*. Dental Materials, 2005. **21**(4): p. 297-303.
83. Dammaschke, T., et al., *Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements*. Dental Materials, 2005. **21**(8): p. 731-738.
84. Torabinejad, M., et al., *Physical and chemical properties of a new root-end filling material*. Journal of endodontics, 1995. **21**(7): p. 349-353.
85. Lee, Y.-L., et al., *Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate*. Biomaterials, 2004. **25**(5): p. 787-793.
86. Asgary, S., et al., *Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate*. Journal of endodontics, 2005. **31**(2): p. 101-103.
87. Song, J.-S., et al., *Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **102**(6): p. 809-815.
88. Duarte, M.A.H., et al., *pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **95**(3): p. 345-347.
89. Walker, M.P., A. Diliberto, and C. Lee, *Effect of setting conditions on mineral trioxide aggregate flexural strength*. Journal of endodontics, 2006. **32**(4): p. 334-336.
90. Fridland, M. and R. Rosado, *Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios*. Journal of endodontics, 2003. **29**(12): p. 814-817.
91. Fridland, M. and R. Rosado, *MTA solubility: a long term study*. Journal of endodontics, 2005. **31**(5): p. 376-379.
92. Danesh, G., et al., *A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements*. International endodontic journal, 2006. **39**(3): p. 213-219.

93. Camilleri, J., *Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate*. International endodontic journal, 2007. **40**(6): p. 462-470.
94. Camilleri, J., et al., *Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate*. International endodontic journal, 2004. **37**(10): p. 699-704.
95. Asgary, S., et al., *A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging*. Journal of materials science: materials in medicine, 2006. **17**(2): p. 187-191.
96. Asgary, S., et al., *A comparative study of white mineral trioxide aggregate and white Portland cements using X-ray microanalysis*. Australian Endodontic Journal, 2004. **30**(3): p. 89-92.
97. Watts, J.D., et al., *Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate*. Journal of endodontics, 2007. **33**(8): p. 970-973.
98. Kogan, P., et al., *The effects of various additives on setting properties of MTA*. Journal of endodontics, 2006. **32**(6): p. 569-572.
99. Islam, I., H.K. Chng, and A.U.J. Yap, *Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement*. Journal of endodontics, 2006. **32**(3): p. 193-197.
100. Wiltbank, K.B., S.A. Schwartz, and W.G. Schindler, *Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement*. Journal of endodontics, 2007. **33**(10): p. 1235-1238.
101. Ber, B.S., J.F. Hatton, and G.P. Stewart, *Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time*. Journal of endodontics, 2007. **33**(10): p. 1231-1234.
102. Kim, M., et al., *Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and Endocem MTA cements*. Journal of endodontics, 2014. **40**(10): p. 1649-1653.
103. Siboni, F., et al., *Properties of Neo MTA Plus and MTA Plus cements for endodontics*. International endodontic journal, 2017. **50**: p. e83-e94.
104. Storm, B., et al., *Setting expansion of gray and white mineral trioxide aggregate and Portland cement*. Journal of Endodontics, 2008. **34**(1): p. 80-82.
105. Poggio, C., et al., *Solubility of root-end-filling materials: a comparative study*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(9): p. 1094-1097.
106. Shie, M.-Y., et al., *The effect of a physiologic solution pH on properties of white mineral trioxide aggregate*. Journal of endodontics, 2009. **35**(1): p. 98-101.
107. Özdemir, H.Ö., et al., *Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects*. Dental Traumatology, 2008. **24**(1): p. 70-73.
108. Bortoluzzi, E.A., et al., *The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement*. Journal of endodontics, 2006. **32**(12): p. 1194-1197.
109. Midy, V., M. Dard, and E. Hollande, *Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2001. **12**(3): p. 259-265.
110. ÖRSTAVIK, D., *Weight loss of endodontic sealers, cements and pastes in water*. European Journal of Oral Sciences, 1983. **91**(4): p. 316-319.
111. Kazemi, R.B., K.E. Safavi, and L.S. Spångberg, *Dimensional changes of endodontic sealers*. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, 1993. **76**(6): p. 766-771.

112. Reyes-Carmona, J.F., M.S. Felipe, and W.T. Felipe, *Biom mineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid*. Journal of endodontics, 2009. **35**(5): p. 731-736.
113. Bodanezi, A., et al., *Immediate and delayed solubility of mineral trioxide aggregate and Portland cement*. Journal of Applied Oral Science, 2008. **16**(2): p. 127-131.
114. Sluyk, S., P. Moon, and G. Hartwell, *Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material*. Journal of Endodontics, 1998. **24**(11): p. 768-771.
115. Gancedo-Caravia, L. and E. Garcia-Barbero, *Influence of humidity and setting time on the push-out strength of mineral trioxide aggregate obturations*. Journal of endodontics, 2006. **32**(9): p. 894-896.
116. Holt, D.M., et al., *The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid*. Journal of endodontics, 2007. **33**(7): p. 844-847.
117. Nekoofar, M., et al., *The effect of condensation pressure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate*. International Endodontic Journal, 2007. **40**(6): p. 453-461.
118. Govindaraju, L., P. Neelakantan, and J.L. Gutmann, *Effect of root canal irrigating solutions on the compressive strength of tricalcium silicate cements*. Clinical oral investigations, 2017. **21**(2): p. 567-571.
119. Torabinejad, M. and N. Chivian, *Clinical applications of mineral trioxide aggregate*. Journal of endodontics, 1999. **25**(3): p. 197-205.
120. Loxley, E.C., et al., *The effect of various intracanal oxidizing agents on the push-out strength of various perforation repair materials*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **95**(4): p. 490-494.
121. Parirokh, M. and M. Torabinejad, *Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial properties*. Journal of endodontics, 2010. **36**(1): p. 16-27.
122. Aktemur Türker, S., E. Uzunoğlu, and B. Bilgin, *Comparative evaluation of push-out bond strength of Neo MTA Plus with Biodentine and white ProRoot MTA*. Journal of adhesion science and Technology, 2017. **31**(5): p. 502-508.
123. Hachmeister, D.R., et al., *The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification*. Journal of Endodontics, 2002. **28**(5): p. 386-390.
124. Shah, P.M., et al., *Radiopacity of potential root-end filling materials*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 1996. **81**(4): p. 476-479.
125. Laghios, C., et al., *Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials*. International Endodontic Journal, 2000. **33**(4): p. 311-315.
126. Camilleri, J., *Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures*. Journal of endodontics, 2015. **41**(7): p. 1139-1145.
127. Komabayashi, T. and L.S. Spångberg, *Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer*. Journal of endodontics, 2008. **34**(1): p. 94-98.
128. Lee, Y.-L., et al., *Effects of EDTA on the hydration mechanism of mineral trioxide aggregate*. Journal of dental research, 2007. **86**(6): p. 534-538.

129. Tanomaru-Filho, M., et al., *Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide*. International endodontic journal, 2017. **50**: p. e31-e39.
130. Namazikhah, M., et al., *The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate*. International endodontic journal, 2008. **41**(2): p. 108-116.
131. Matt, G.D., et al., *Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one-or two-step apical barrier technique*. Journal of endodontics, 2004. **30**(12): p. 876-879.
132. Kayahan, M., et al., *Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate*. International Endodontic Journal, 2009. **42**(11): p. 1004-1014.
133. Bodrumlu, E., *Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review*. Australian Endodontic Journal, 2008. **34**(1): p. 30-35.
134. Kettering, J.D. and M. Torabinejad, *Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials*. Journal of endodontics, 1995. **21**(11): p. 537-539.
135. Sanchez, A.F.-Y., M.I. Leco-Berrocal, and J.M. Martínez-González, *Metaanalysis of filler materials in periapical surgery*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008. **13**(3): p. E180-5.
136. Asrari, M. and D. Lobner, *In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials*. Journal of Endodontics, 2003. **29**(11): p. 743-746.
137. Abbasipour, F., et al., *The nociceptive and anti-nociceptive effects of white mineral trioxide aggregate*. International endodontic journal, 2009. **42**(9): p. 794-801.
138. Masuda, Y., et al., *Evaluation of biocompatibility of mineral trioxide aggregate with an improved rabbit ear chamber*. Journal of oral rehabilitation, 2005. **32**(2): p. 145-150.
139. Tunca, Y.M., et al., *The effect of mineral trioxide aggregate on the contractility of the rat thoracic aorta*. Journal of endodontics, 2007. **33**(7): p. 823-826.
140. Torabinejad, M. and M. Parirokh, *Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations*. Journal of endodontics, 2010. **36**(2): p. 190-202.
141. Torabinejad, M., et al., *Cytotoxicity of four root end filling materials*. Journal of endodontics, 1995. **21**(10): p. 489-492.
142. Keiser, K., C.C. Johnson, and D.A. Tipton, *Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts*. Journal of Endodontics, 2000. **26**(5): p. 288-291.
143. Ebtehal, A.-R., H. Perinpanayagam, and D. MacFarland, *Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA*. Journal of endodontics, 2006. **32**(9): p. 872-875.
144. Perez, A., et al., *Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot™ MTA and White MTA*. International Endodontic Journal, 2003. **36**(8): p. 564-570.
145. Oviir, T., et al., *Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts*. Journal of endodontics, 2006. **32**(3): p. 210-213.
146. Camilleri, J., et al., *The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use*. International endodontic journal, 2005. **38**(11): p. 834-842.
147. Hakki, S.S., et al., *Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts*. Journal of Endodontics, 2009. **35**(4): p. 513-519.

148. Sepet, E., et al., *Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro*. Quintessence International, 2009. **40**(8).
149. Fayad, M.I., et al., *The effect of CO2 laser irradiation on PDL cell attachment to resected root surfaces*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2004. **97**(4): p. 518-523.
150. Bonson, S., B. Jeansonne, and T. Lallier, *Root-end filling materials alter fibroblast differentiation*. Journal of dental research, 2004. **83**(5): p. 408-413.
151. Koulaouzidou, E.A., et al., *Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(1): p. 44-46.
152. Coon, D., et al., *The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption*. Journal of endodontics, 2007. **33**(4): p. 432-436.
153. Melegari, K., T. Botero, and G. Holland, *Prostaglandin E2 production and viability of cells cultured in contact with freshly mixed endodontic materials*. International endodontic journal, 2006. **39**(5): p. 357-362.
154. de Souza Costa, C.A., et al., *Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide*. American journal of dentistry, 2008. **21**(4): p. 255-261.
155. Yasuda, Y., et al., *The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study*. Journal of endodontics, 2008. **34**(9): p. 1057-1060.
156. Pelliccioni, G., et al., *Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot™ MTA (mineral trioxide aggregate) cement*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2004. **15**(2): p. 167-173.
157. Tani-Ishii, N., et al., *Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 836-839.
158. Aslantürk, Ö.S., *In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages*. Genotoxicity-A predictable risk to our actual world, 2018. **2**: p. 64-80.
159. Tominaga, H., et al., *A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay*. Analytical Communications, 1999. **36**(2): p. 47-50.
160. Malich, G., B. Markovic, and C. Winder, *The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines*. Toxicology, 1997. **124**(3): p. 179-192.
161. Cory, A.H., et al., *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. Cancer communications, 1991. **3**(7): p. 207-212.
162. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
163. Rotter, B.A., et al., *Rapid colorimetric bioassay for screening of Fusarium mycotoxins*. Natural toxins, 1993. **1**(5): p. 303-307.
164. Riss, T.L., et al., *Cell viability assays*. Assay Guidance Manual [Internet], 2016.
165. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Analytical biochemistry, 2004. **329**(1): p. 77-84.
166. Millán, J.L., *Alkaline phosphatases*. Purinergic signalling, 2006. **2**(2): p. 335-341.
167. Golub, E.E. and K. Boesze-Battaglia, *The role of alkaline phosphatase in mineralization*. Current opinion in Orthopaedics, 2007. **18**(5): p. 444-448.

168. Benoit, D.S., A.R. Durney, and K.S. Anseth, *Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation*. Tissue engineering, 2006. **12**(6): p. 1663-1673.
169. Zhang, X., et al., *Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells in vitro and in vivo*. Calcified tissue international, 2006. **79**(3): p. 169-178.
170. Rahimi, S., et al., *In vitro induction of odontogenic activity of human dental pulp stem cells by white Portland cement enriched with zirconium oxide and zinc oxide components*. Journal of dental research, dental clinics, dental prospects, 2019. **13**(1): p. 3.
171. Kulterer, B., et al., *Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation*. BMC genomics, 2007. **8**(1): p. 1-15.
172. Min, K.-S., et al., *Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells*. Journal of endodontics, 2010. **36**(3): p. 447-452.
173. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular aspects of medicine, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
174. Dymond, J.S., *Explanatory chapter: quantitative PCR*. Methods in enzymology, 2013. **529**: p. 279-289.
175. Papaccio, G., et al., *Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair*. Journal of cellular physiology, 2006. **208**(2): p. 319-325.
176. Butler, W.T., *Dentin matrix proteins and dentinogenesis*. Connective tissue research, 1995. **33**(1-3): p. 59-65.
177. Li, S., et al., *The role of runt-related transcription factor 2 (Runx2) in the late stage of odontoblast differentiation and dentin formation*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **410**(3): p. 698-704.
178. Chen, S., et al., *Spatial expression of Cbfa1/Runx2 isoforms in teeth and characterization of binding sites in the DSPP gene*. Connective tissue research, 2002. **43**(2-3): p. 338-344.
179. Banchs, F. and M. Trope, *Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?* Journal of endodontics, 2004. **30**(4): p. 196-200.
180. Rahhal, J.G., et al., *Root canal dressings for revascularization influence in vitro mineralization of apical papilla cells*. Journal of Applied Oral Science, 2019. **27**.
181. Murray, P.E., F. Garcia-Godoy, and K.M. Hargreaves, *Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action*. Journal of endodontics, 2007. **33**(4): p. 377-390.
182. Thibodeau, B. and M. Trope, *Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature*. Pediatric dentistry, 2007. **29**(1): p. 47-50.
183. Freshney, R.I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 2015: John Wiley & Sons.
184. Tamaki, Y., et al., *In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow*. Odontology, 2013. **101**(2): p. 121-132.
185. Murray, P.E., C. García Godoy, and F. García Godoy, *How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?* Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet), 2007. **12**(3): p. 258-266.

186. Standards, I., *ISO 7405: Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Tests methods for dental materials*. 1997, International Organization for Standardization Geneva. Switzerland.
187. Arenholt-Bindslev, D. and H. Bleeg, *Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts*. International endodontic journal, 1990. **23**(2): p. 84-91.
188. Barrilleaux, B., et al., *Ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells*. Tissue engineering, 2006. **12**(11): p. 3007-3019.
189. Todorović, V., et al., *Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine*. Stomatološki glasnik Srbije, 2008. **55**(3): p. 170-179.
190. Sonoyama, W., et al., *Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study*. Journal of endodontics, 2008. **34**(2): p. 166-171.
191. Abuarqoub, D., A. Awidi, and N. Abuharfeil, *Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate*. Archives of oral biology, 2015. **60**(10): p. 1545-1553.
192. d'Aquino, R., et al., *Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration*. Stem cell reviews, 2008. **4**(1): p. 21-26.
193. Liu, H., S. Gronthos, and S. Shi, *Dental pulp stem cells*. Methods in enzymology, 2006. **419**: p. 99-113.
194. Güven, E., et al., *In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer*. International endodontic journal, 2013. **46**(12): p. 1173-1182.
195. Margunato, S., et al., *In vitro evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization*. Journal of endodontics, 2015. **41**(10): p. 1646-1652.
196. Güven, E.P., et al., *Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements*. Journal of Applied Oral Science, 2013. **21**: p. 351-357.
197. Escobar-García, D.M., et al., *Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials*. BioMed research international, 2016. **2016**.
198. Cheng, X., et al., *Bioactive mono-dispersed nanospheres with long-term antibacterial effects for endodontic sealing*. Journal of Materials Chemistry B, 2017. **5**(6): p. 1195-1204.
199. Chang, S.-W., et al., *Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells*. Journal of endodontics, 2014. **40**(1): p. 113-118.
200. Luo, Z., et al., *Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells*. Journal of Dentistry, 2014. **42**(4): p. 490-497.
201. Rodrigues, E., et al., *Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis*. International endodontic journal, 2017. **50**(8): p. 780-789.
202. Tomás-Catalá, C., et al., *Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells*. International endodontic journal, 2017. **50**: p. e63-e72.

203. Birant, S., et al., *Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells*. Journal of Dental Sciences, 2021. **16**(3): p. 971-979.
204. Liu, Y., et al., *Cell migration and osteo/odontogenesis stimulation of iRoot FS as a potential apical barrier material in apexification*. International endodontic journal, 2020. **53**(4): p. 467-477.
205. Taşlı, P.N., et al., *Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro*. Biological trace element research, 2013. **153**(1): p. 419-427.
206. Guven, E.P., et al., *Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells*. Journal of endodontics, 2011. **37**(5): p. 650-656.
207. Doğan, A., et al., *Dental pulp stem cells (DPSCs) increase prostate cancer cell proliferation and migration under in vitro conditions*. Tissue and Cell, 2017. **49**(6): p. 711-718.
208. Karimjee, C., et al., *Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2006. **102**(4): p. e115-e120.
209. Modareszadeh, M.R., et al., *Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material*. Journal of endodontics, 2012. **38**(8): p. 1101-1105.
210. Aubin, J.E., *Regulation of osteoblast formation and function*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2001. **2**(1): p. 81-94.
211. Quarles, L.D., et al., *Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development*. Journal of Bone and Mineral Research, 1992. **7**(6): p. 683-692.
212. Hoemann, C., H. El-Gabalawy, and M. McKee, *In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization*. Pathologie Biologie, 2009. **57**(4): p. 318-323.
213. Jin, Z., Y. Feng, and H. Liu, *Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells*. Human cell, 2016. **29**(4): p. 162-175.
214. Lee, T.-J., et al., *Mesenchymal stem cell-conditioned medium enhances osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells by mesodermal lineage induction*. Tissue Engineering Part A, 2014. **20**(7-8): p. 1306-1313.
215. Bellows, C., J. Aubin, and J. Heersche, *Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate*. Bone and mineral, 1991. **14**(1): p. 27-40.
216. Satomura, K. and M. Nagayama, *Ultrastructure of mineralized nodules formed in rat bone marrow stromal cell culture in vitro*. Cells Tissues Organs, 1991. **142**(2): p. 97-104.
217. Ali, M.R., et al., *Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells*. European journal of oral sciences, 2019. **127**(3): p. 261-268.
218. Paula, A., et al., *Biodentine™ boosts, WhiteProRoot® MTA increases and Life® suppresses odontoblast activity*. Materials, 2019. **12**(7): p. 1184.

219. Bortoluzzi, E.A., et al., *Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization*. Dental Materials, 2015. **31**(12): p. 1510-1522.
220. Pasqualini, D., et al., *Osteogenic Potential of Fast Set Bioceramic Cements: Molecular and In Vitro Study*. Applied Sciences, 2020. **10**(19): p. 6713.
221. Chang, S.-W., et al., *Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells*. Journal of endodontics, 2014. **40**(8): p. 1194-1200.
222. Wongwatanasanti, N., et al., *Effect of bioceramic materials on proliferation and odontoblast differentiation of human stem cells from the apical papilla*. Journal of endodontics, 2018. **44**(8): p. 1270-1275.
223. Gandolfi, M.G., et al., *Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells*. Journal of endodontics, 2011. **37**(8): p. 1102-1108.
224. Eid, A.A., et al., *Effects of tricalcium silicate cements on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro*. Acta biomaterialia, 2014. **10**(7): p. 3327-3334.
225. Lee, B.-N., et al., *Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells*. Journal of endodontics, 2014. **40**(8): p. 1217-1222.

## 8.EKLER

### EK A1: Etik Kurulu Karar Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/05/2020-6158



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 71306642-050.05.04-  
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Asiye Nur DİNÇER

Destekleyicisi olduğumuz " Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi" başlıklı çalışma ile ilgili ilgede kayıtlı yazımız ve ekleri 06.05.2020 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.

Bilgilerinize.

**e-imzalıdır**  
Prof.Dr. Özcan KARAMAN  
Başkan

Ek: Karar Yazısı (3 sayfa)

Adres: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih / İstanbul  
Telefon: 0 (212) 523 22 88 Faks: 0 (212) 533 23 26  
e-Posta: info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ: www.bezmialem.edu.tr

Bilgi için: Bilgihan BAŞTUĞ (Bapak OĞUZ  
Vekaletiyle)  
Unvanı: Memur

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

06.05.2020

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan Caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Asiye Nur DİNÇER				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Endodonti				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-				
	DESTEKLEYİCİ	-				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
FAZ 4		<input type="checkbox"/>				
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>				
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>				
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>				
İlaç dışı klinik araştırma (Akademik amaçlı münferit çalışma )		<input checked="" type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı		Açıklama
	DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	<input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		<input checked="" type="checkbox"/>	01.12.2019 tarihli, 28.02.2020 imza tarihli
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		<input type="checkbox"/>	
İLAN		<input type="checkbox"/>	
YILLIK BİLDİRİM		<input type="checkbox"/>	
SONUÇ RAPORU		<input type="checkbox"/>	
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		<input type="checkbox"/>	
DİĞER:		<input checked="" type="checkbox"/>	Klinik Araştırma Başvuru Formu (01.12.2019) - Sorumlu araştırmacı ve yardımcı araştırmacılara ait özgeçmiş formları - Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKÜ/İLU' ya uygun yürütüleceğine dair taahhütname - Araştırma ile ilgili yayınlar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5/40	Tarih: 06.05.2020	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmannın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmannın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FOY**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Can Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulama Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
			E	K	E	H	E	H
Prof. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Selahattin TUĞRUL	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL	Tıbbi Farmakoloji	Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. Akın İŞCAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Ali Akçahan GEPDİREMEN	Tıbbi Farmakoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Ümmihan İŞOĞLU	Fizyoloji	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Meltem BAKKAL	Pedodonti	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Alper YENİGÜN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Tülin KUZU	Sivil Üye	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Avukat Mustafa Fırat ALKAYA	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

\* :Toplantıda Bulunma

**Karar:**  Onaylandı  Reddedildi

## **EK A2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu**

### **BEZMİALEM ÜNİVERSİTESİ DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ- ENDODONTİ BÖLÜMÜ**

#### **Araştırmanın Adı**

Trikalsiyum Silikat Esaslı Simanların Apikal Papilla Kök Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

#### **Araştırmanın Amacı**

Yeni sürmüş dişlerin canlılığını kaybedip gelişiminin aksaması durumunda gelişiminin devam edebilmesi için kök kanalı içerisine ilaçlar yerleştirilmektedir. Bu ilaçlar dişlerin temizlenmesini ve tekrar canlı hücrelerin dişe ulaşmasını sağlamaktadır. Temizliği sağlanan diş köklerine farklı yöntemlerle kan hücrelerinin tekrar ulaşması sağlanıp üzeri sertleşebilen malzemelerle (trikalsiyum silikat esaslı simanlarla) kapatılmaktadır. Uzun süre kontrollü takipler ile dişin canlılık testine pozitif cevaplar vermesi beklenir. Bu çalışmada sert doku oluşumunu sağlayan simanların kök hücreler üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada sizin (18 yaş altında olanlar için, sorumluluğunuz altında olan hastanın) çekilmiş dişi kullanılacaktır. Bu dişlerin çekimi sizin rutin tedavinizde planlanmış olup çekim işleminden sonra herhangi bir işleme ihtiyaç olmayacaktır. Araştırmamız Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünün laboratuvarında yapılacaktır.

#### **Araştırmaya Katılması Beklenen Tahmini Gönüllü Sayısı**

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı 3-5 tir.

#### **Araştırmada uygulanacak tedaviler**

Araştırma sırasında size uygulanacak herhangi bir tedavi yoktur.

#### **Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar**

Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen risk veya rahatsızlık bulunmamaktadır.

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlıdır ve istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir. Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanamayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabilir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır. Bu formun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisi söz konusu erişime izin vermiş olacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya kanuni temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı ve Soyadı:

İmza:

Tarih:

Anne ve baba veya kanuni temsilcinin,

Adı ve Soyadı:

İmza:

Tarih: