

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

GRAFEN VE BİODENTİNE’NİN DENTAL PULPA KÖK HÜCRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Periş ÇELİKEL

**Pedodonti Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doku Mühendisliği ve Rejenerasyon.....	3
2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	6
2.2. Biyouyumluluğa İlişkin Temel Kavramlar	9
2.3. Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi	10
2.3.1. İn Vitro Testler.....	10
2.3.1.1. Sitotoksikite Testleri	11
2.3.1.2. Hücre Metabolizmasını ve Fonksiyonunu Ölçen Testler	11
2.3.1.3. Hücre Fonksiyon Ölçümünde Kullanılan Diğer Değerlendirmeler	12
2.3.1.4. Mutageniz Analizleri.....	13
2.3.1.5. xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System, RTCA).....	13
2.3.2. Hayvan Deneyleri	14
2.3.3. Kullanım Testleri (İn vivo testler)	15
2.4. Biodentine™	15
2.5. Grafen	19

2.6. İmmünfloresan Boyama.....	22
2.7. Total Oksidan Seviye (TOS).....	22
2.8. Total Antioksidan Seviye (TAS)	24
2.9. ALP Testi.....	24
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Hücre Kültürü	25
3.1.1. Pulpa Hücrelerinin Hazırlanması.....	25
3.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması	26
3.1.3. Hücre Sayımı	27
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	28
3.2. Örneklerin Hazırlanması.....	28
3.3. MTT Analizi (Sitotoksosite Analizi).....	30
3.4. LDH Analizi	31
3.5. xCELLigence Analiz	32
3.6. İmmünofloresans Boyama	33
3.7. TOS ve Total Antioksidan TAS Seviyelerinin Belirlenmesi.....	34
3.8. ALP Aktivite Testi.....	36
3.9. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. MTT Analizi	38
4.2. LDH Testi	39
4.3. xCELLigence Analizi	40
4.4. İmmünfloresan İnceleme	45
4.5. TAS Analizi	47
4.6. TOS Analizi	48

ALP Testi	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	81
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	81
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	82
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	83



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında kıymetli zamanını ayırarak her türlü konuda büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olup yol gösteren, anlayışı ve hoş görüşüyle her zaman desteğini hissettiğim değerli danışman hocam ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve tezimin ilerlemesinde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Fatih ŞENGÜL'e; tezimin deney aşamalarında bana yardımcı olan ve deney aşamalarında laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu, Dr. Öğr. Üyesi Ufuk OKKAY ve tüm Atatürk Üniversitesi Farmakoloji Anabilim dalı çalışanlarına, asistanlığa beraber başladığım, arkadaştan çok aile gibi olduğum her zaman ve her koşulda yanımda olup bana destek olan kıdem arkadaşlarım Eda KIRTILLI, Fatma SARAÇ ve Talha ÇETİN başta olmak üzere ikinci ailem olarak nitelendirdiğim Pedodonti Anabilim Dalındaki tüm asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline, bu çalışmayı **218S666** proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a;

Hayatım boyunca her konuda ve attığım her adımda bana duydukları güveni hissettiren, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Dt. Periş ÇELİKEL

ÖZET

Grafen ve Biodentine'nin Dental Pulpa Kök Hücresi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Amaç: Biyomalzemelerin yapısına eklenerek onların fiziksel, mekanik ve biyolojik özelliklerini artıran grafen, diş hekimliği alanında biyouyumluluk, mekanik özellik ve antimikrobiyal özellik bakımından daha iyi bir biyomateryal geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu çalışmada Biodentine™ ve grafenin farklı dozlarının insan dental pulpa kök hücrelerindeki (DPSC) hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu insan DPSC'si kullanılmıştır. DPSC'ler e-platelere ekildikten sonra beşer farklı dozda Biodentine™ (2, 4, 8, 16 ve 32 µg/ml) ve grafen (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml) eklenmiştir. Deney gruplarının 24 saat sonunda MTT, LDH, TAS, TOS ve ALP analiz ve immünfloresans boyama sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca 96 saatlik gerçek zamanlı hücre indeks verileri xCELLingence® cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda en güçlü proliferatif etki ve en düşük oksidatif stres Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarında gözlenmiştir. Antioksidan etki Biodentine™'nin bütün dozlarında grafenin ise sadece 12.5 µg/ml grubunda tespit edilmiştir. Biodentine™ ve grafenin bütün dozları için odontojenik farklılaşma gözlenmiştir.

Sonuç: İnsan DPSC'si üzerinde Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarının hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından olumlu etkileri bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Trikalsiyum silikat, grafen, DPSC, hücre proliferasyonu, oksidatif stres, odontojenik farklılaşma

ABSTRACT

The Analysis of the Effect of Graphene and Biodentine on Dental Pulp Stem Cell

Purpose: Graphene, which increases the physical, mechanical and biological properties of biomaterials when it is added to their structure, can be used in the development of a better biomaterial in terms of biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial properties in dentistry. The purpose of this study is to determine the effects of different doses of Biodentine™ and graphene on cell proliferation, oxidative stress and odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells (DPSC).

Materials and Method: American Type Culture Collection human DPSC was used in the study. After DPSCs were plated on e-plates, five different doses of Biodentine™ (2, 4, 8, 16 and 32 µg/ml) and graphene (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/ml) were added. After 24 hours, MTT, LDH, TAS, TOS and ALP analysis and immunofluorescence staining results of the experimental groups were obtained. In addition, 96 hours of real-time cell index data were obtained via the xCELLingence® device. One-way analysis of variance was used to compare the data.

Results: The study revealed that Biodentine™ 2 µg/ml and graphene 12.5 µg/ml groups indicated the strongest proliferative effect and the lowest oxidative stress. The antioxidant effect was detected in all doses of Biodentine™, whereas graphene was only detected in the 12.5 µg/ml group. Odontogenic differentiation was observed for all doses of Biodentine™ and graphene.

Conclusion: Biodentine™ 2 µg/ml and graphene 12.5 µg/ml groups were found to have positive effects on cell proliferation, oxidative stress and odontogenic differentiation on human DPSC.

Keywords: Tricalcium silicate, graphene, DPSC, cell proliferation, oxidative stress, odontogenic differentiation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABTS⁺	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ALP	: Alkalen fosfataz
Ark	: Arkadaşları
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyon
BMP	: Kemik morfogenetik büyüme faktörü
°C	: Santigrat derece
C₂S	: Dikalsiyum silikat
C₃S	: Trikalsiyum silikat
Ca⁺²	: Kalsiyum
CI	: Hücre indeksi
cm²	: Santimetre kare
CO₂	: Karbondioksit
COL-1	: Kollajen 1
dak	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DFSCs	: Diş folikülü kök hücreleri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMP-1	: Dentin matriks protein 1
DPSC	: Dental pulpa kök hücresi
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
Equiv./L	: Equivalent/Litre
FBS	: Fetal sıgır serumu

H₂O₂	: Hidrojen peroksit
LDH	: Laktat dehidrogenaz
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µmol	: Mikromol
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mol	: Madde miktarı birimi
MSX-1	: Kas segmenti homeobox 1
MTA	: Mineral trioksit agregat
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
nm	: Nanometre
nB	: Biyoaktif cam nanopartikülleri eklenmiş Biodentine™
OCN	: Osteokalsin
OD	: Optik yoğunluk
OD-21	: Fare dental pulpa kök hücreleri
8 OHdG	: 8 hidroksi 2 Deoksiguanozin
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDLSC	: Periodontal ligament kök hücreleri
PAX-6	: Eşleştirilmiş box proteini
ROM	: Reaktif oksijen metabolitleri
®	: Tescilli
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

RTCA	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
RUNX	: Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü
SCAP	: Apikal papilla kök hücreleri
SHED	: Süt dişi pulpası kök hücreleri
TAS	: Toplam antioksidan seviyesi
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TM	: Tescilli
TOS	: Toplam oksidan seviyesi



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Doku mühendisliği triadı.....	3
Şekil 2.2. Plastisite özelliklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması	7
Şekil 2.3. xCELLigence® gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin çalışma mekanizması.....	14
Şekil 2.4. Biodentine™	16
Şekil 2.5. Grafenin çizgi gösterimi	20
Şekil 3.1. Beckman Coulter, Allegra X-30R Santrifüj Cihazı.....	26
Şekil 3.2. CO ₂ inkübatörü.....	26
Şekil 3.3. Leica inverted mikroskopta hücrelerin üretim kabı tabanı konfluensinin tespiti	27
Şekil 3.4. Biodentine™	29
Şekil 3.5. Grafen.....	29
Şekil 3.6. Steril Kabin.....	29
Şekil 3.7. MTT solüsyonu	30
Şekil 3.8. 48 kuyucuklu platelerdeki DPSC üzerine eklenmiş MTT solüsyonu	31
Şekil 3.9. LDH kiti	32
Şekil 3.10. xCELLigence cihazı ve birlikte kullanılan bilgisayar	33
Şekil 3.11. TAS kiti	35
Şekil 3.12. TOS kiti	36
Şekil 3.13. ALP kiti	37
Şekil 4.1. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının 24 saatlik MTT analizi sonuçları.....	39
Şekil 4.2. Kontrol ve çalışma gruplarının 24 saat sonundaki LDH değerleri.....	40

Şekil 4.3. 96 saatlik Biodentine™ xCELLigence sonuçları (ilaçlar ve kimyasallar 24 saat sonunda kültür ortamına eklenmiştir).	41
Şekil 4.4. Saatteki hücre indeks değerleri ve pozitif kontrol grubuna kıyasla her bir gruba ait hücre indeks değerleri dağılımı	42
Şekil 4.5. 96 saatlik grafen xCELLigence sonuçları (ilaçlar ve kimyasallar 24 saat sonunda kültür ortamına eklenmiştir).	43
Şekil 4.6. Saatteki hücre indeks değerleri ve pozitif kontrol grubuna kıyasla her bir gruba ait hücre indeks değerleri dağılımı	44
Şekil 4.7. DPSC hücre hattında Biodentine™ (a. 2, b. 4, c. 8, d. 16 ve e. 32 µg/ml dozları), grafen (f. 6.25, g. 12.5, h. 25, i. 50 ve j. 100 µg/ml dozları) ve kontrol gruplarının (k. DMSO içeren ve l. DMSO içermeyen) 8 OHdG ekspresyonunun immunfloresans görüntüleri.	46
Şekil 4.8. Deney gruplarının DPSC hücre hattındaki 8 OHdG immunfloresans boyama görüntülerinin değerlendirme skorları	47
Şekil 4.9. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının 24 saatlik TAS analizi sonuçları	48
Şekil 4.10. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının TOS analizi sonuçları.....	50
Şekil 4.11. Çalışma ve kontrol gruplarının ALP enzim aktivite değerleri.	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Ağız ve maksillofasiyal bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynakları	8
Tablo 2.2. Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları.....	10
Tablo 2.3. Biodentine™ içeriği	17
Tablo 3.1. Hücre hattında immünfloresans boyamaların skorlanması.....	34
Tablo 4.1. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen MTT analizi sonuçları	38
Tablo 4.2. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen LDH analizi sonuçları.....	40
Tablo 4.3. Materyallerin negatif kontrol grubuna kıyasla materyaller eklendikten sonraki 24, 48 ve 72 saatteki xCELLigence hücre indeks sonuçları	44
Tablo 4.4. İmmünfloresans görüntülerin değerlendirme skorları	45
Tablo 4.5. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen TAS analizi sonuçları	48
Tablo 4.6. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen TOS analizi sonuçları	49
Tablo 4.7. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen ALP analizi sonuçları	51

1. GİRİŞ

Pulpanın canlılığını sürdürebilmesi için diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin toksik etkisinin olmaması veya kabul edilebilir düzeyde olması önemlidir.¹ Diş hekimliği uygulamalarında kullanılmak üzere son yıllarda farklı içeriğe sahip birçok güncel materyal klinik kullanıma dahil edilmiş olmasına rağmen biyouyumluluğu, mekanik özellikleri ve antimikrobiyal özellikleri daha iyi biyomateriyal ihtiyacı devam etmektedir.²

Restoratif materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde günümüzde çeşitli test yöntemleri bulunmakta olup bunlardan en yaygın olarak kullanılanın hücre kültürü testleri ve hayvan deneyleridir.³ Hücre kültürü testleri hayvan deneylerine göre daha kolay, hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir özellikte olmaları sebebiyle tercih edilmektedir.⁴

Diş hekimliğinde kullanılan materyaller serbest radikaller oluşturarak oksidatif stresi indükleyebilmektedirler. Aerobik organizmaların oksijen tüketiminden sonra reaktif oksijen metabolitleri (ROM) %1-2 oranında meydana gelmektedir.⁵ Antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesi aşıp serbest radikal üretimi yeterince baskılanmadığında ortaya çıkan serbest biyomoleküller çeşitli mekanizmalar yoluyla hücreye hasar verebilmektedir.⁶ Oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin antioksidan sistemin aleyhine dönmesi olarak bilinen oksidatif stres son zamanlarda toksisitenin muhtemel bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.^{7, 8} Biyolojik sıvılardaki oksidatif stres seviyesinin belirlenmesi amacıyla kolay, hızlı ve çok sayıdaki numune değerlerinin aynı anda analiz edilmesine olanak sağlayan toplam antioksidan seviyesinin (TAS) ve toplam oksidan seviyesinin (TOS) belirlendiği testler mevcuttur.⁹

Çocuk diş hekimliğinde çeşitli amaçlarla kullanılan restoratif dental materyallerin sitotoksik özellikleri ile ilgili olarak ulaşılabilen verilerin sınırlı olduğu görülmektedir.¹⁰ Bu sebeple çalışmamızda vital pulpa tedavilerinde direkt veya indirekt pulpa kuafajı

amacıyla kullanılan Biodentine™ ve kök hücrelerin farklılaşmasını etkilediği ve biyomalzemelerin mekanik özelliklerini geliştirdiği bilinen grafenin insan pulpa kök hücreleri (DPSC) üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu materyallerin DPSC proliferasyonuna olan etkisinin 96 saat boyunca gözlemlenmesi amacıyla xCELLigence® cihazında hücre indeksi belirlenmiştir. Sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla da MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) analizi, laktat dehidrogenaz (LDH) analizi, immunfloresans boyama, TAS ve TOS analizleri kullanılmıştır. Odontojenik farklılaşmasının değerlendirilmesinde ise alkalen fosfataz (ALP) yönteminden yararlanılmıştır.

Çalışmamızda test edilen materyallerle ilgili hipotezler şu şekilde kurulmuştur:

Hipotez 1: Biodentine™'nin insan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından etkisi bulunmamaktadır.

Hipotez 2: Grafenin insan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından etkisi bulunmamaktadır.

Hipotez 3: İnsan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından Biodentine™ ve grafenin etkili konsantrasyonları arasında farklılık bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği ve Rejenerasyon

Doku mühendisliği; hücreler, doku iskeleleri ve sinyal moleküllerinin kombinasyonunu kullanarak hasar görmüş, hastalıklı veya kaybolmuş dokuları yeniden oluşturmayı, dokuların işlevlerini eski haline getirmeyi ve iyileştirmeyi amaçlayan nispeten yeni multidisipliner bir yaklaşımdır (Şekil 2.1).¹¹ Bu yaklaşım doku ve organ nakli ihtiyacını azaltır ve hastanın vücudundan otolog hücrelerin kullanılması sonucunda organ nakli reddi riski azalmış olur.¹²



Şekil 2.1. Doku mühendisliği triadı

Doğal veya sentetik biyomalzemelerden üretilebilen iskeleler, doku oluşumu için üç boyutlu bir destek sağlar, zamanla kademeli olarak bozulur ve yeni oluşturulan hücre dışı matriks (ECM) ile değiştirilir. Doku iskeleleri hücre yapışması, çoğalması, farklılaşması ve göçü gibi biyolojik aktivitelere rehberlik edebilirler.^{13, 14}

Doku mühendisliğinde başarılı bir doku oluşumu için vücutta immün reaksiyona sebep olmayan yeterli sayıda hücrenin dahil edilmesi çok önemli bir unsurdur.¹⁵

Kemik iliği, yağ dokusu, amniyon sıvısı ve diş dokusu gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilen kök hücreler kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri nedeniyle doku mühendisliği için güçlü hücre kaynağı olarak kabul edilirler.¹⁶

Oral dokularda da çeşitli kök hücre kaynakları mevcuttur. DPSC, süt dişleri, apikal papilladaki kök hücreler, alveolar kemikten üretilen kök hücreler ve DPSC'lerin yaygın olarak araştırıldığı diş folikülü kök hücreleri bu kaynaklara örnek olarak gösterilebilir. Basit bir şekilde elde edilebilirler ve klinik uygulamalarda mükemmel potansiyel sergilerler.¹⁷

Yaşam boyunca vücudumuz birçok yaralanma ve zedelenmeye maruz kalır ancak bu yaralanmaların çoğu vücudumuzun rejeneratif yeteneği sayesinde biz fark edene kadar kapanır. İşte bu hususta vücudumuzun rejenerasyon kapasitesi devreye girer. Rejenerasyon; zarar görmüş veya kaybedilmiş bazı hücre, doku, organ veya uzvun yenilenmesi ya da oluşan kayıpların yerine yeniden konmasına verilen addır. Bakterilerden insanlara bütün türler belirli bir ölçüde rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Rejenerasyon yeteneği canlıların gelişmişlik düzeyiyle genellikle ters orantılıdır ve organizmanın gelişmişlik seviyesi arttıkça yenilenme kabiliyetinin azaldığı görülmektedir.¹⁸

Yapılan bilimsel araştırma ve gelişmelerin sonucunda; canlıların, yenilenme mekanizmasını inceleyen bir bilim dalı olan rejeneratif biyoloji bulunmuştur.¹⁸ Bu alandaki çalışmaların sonucunda ortaya çıkan bilgilerin pratiğe geçirilmesiyle, insanların zarar görmüş veya işlevini gerçekleştiremeyen organlarının ve dokularının tedavisine yönelik yeni bir çözüm yolu arayışından yola çıkılarak rejeneratif tıp geliştirilmiştir. Rejeneratif tıp, çeşitli faktörler tarafından hasar gören hücrelerin, dokuların ve organların normal fonksiyonunu değiştirmeyi ya da tamir etmeyi amaçlar. Aynı zamanda doku rejenerasyonunda görev alan mekanizmaların yenilenme yeteneği düşük olan yapılara geçişini sağlayarak yenilenme yeteneğinin kazanılmasını sağlar.^{19, 20} Yaşlanmayla beraber artan organ nakli ihtiyacı bu alandaki araştırmalara hız verilmesine ve gelişmesine yol açmıştır. İnsan doku ve organlarındaki indükte edilebilen farklılaşmamış

kök hücrelerin hasarlı hücrelerin yerini alması ve dokuyu yeniden üretmesi bu çalışmalar için ilham kaynağı olmuştur. Bunun yanında, hasar gören yerlere ev sahipliği yapabilen ve yenilenme sürecine katılabilen dolaşımda progenitor hücreler (örneğin dolaşımdaki endotel hücresi öncüleri) vardır.^{18, 21} Özellikle daimi ve süt dişlerinin pulpasındaki kök hücrelerin keşfi, bu dokunun mükemmel rejeneratif potansiyeli için mekanik bir açıklama sağlamıştır. Dental pulpadaki rejenerasyon yaklaşımı hücre indükleme yeteneği bulunan inorganik içerikli dental malzemelerin, kaybolan hücrelerin yerine konmasını sağlayan ve sert doku üreten hücrelere farklılaşmayı sağlayan ajanların kök pulpası tamamen sağlıklı olan, canlı ve odontoblast tabakası ile sınırlı dentinle çevrili olan dental pulpa üzerine direkt veya indirekt olarak yerleştirilmesini içermektedir. Bu amaçla vital tedaviler esnasında dental pulpa üzerine çeşitli materyaller konulmaktadır.^{22, 23}

Dental pulpanın üzerine konulan inorganik materyallerden biri de kalsiyum hidroksittir. Vital pulpa tedavilerinde alkalen pH özelliği nedeniyle antibakteriyel özellik göstermesi, pulpal hücrelere temasında tolere edilebilir oranda enflamasyon oluşturmaması, tamir dentin üretimini indükleyen sert doku oluşumuna imkan vermesi gibi özellikleri nedeniyle seksen yılı aşkın süredir kullanılan bir dental materyaldir. Olumlu özelliklerinin yanı sıra çabuk çözünmesi, hafif düzeyde pulpada enflamasyon oluşturmaması, dentine bağlanma özelliğinin olmayışı, mekanik direncinin yetersizliği, normal diş mineral hacmini kazandıramaması ve oluşturduğu reperatif dentinin poröz yapılı olmasının bakteri invazyonuna sebep olması gibi olumsuz yanları da mevcuttur.²⁴⁻

²⁶ Son zamanlarda kalsiyum hidroksit materyalinin oluşturduğu doku yanıtının indükleyiciden ziyade reaktif bir yanıt olması sebebiyle rejenerasyon kapasitesi sorgulanmaktadır. Aynı zamanda kalsiyum hidroksitin oluşturduğu dentin yapısının da normal tamir dentinine benzememesi araştırmacıları bu yapıyı meydana getirebilecek yeni bir materyal arayışına sokmuştur.²⁷

Tamir dentini oluşumunu doğal olarak sağlayabilmek ve kök hücreleri harekete geçirebilmek adına biyoaktif materyallere ihtiyaç vardır. Son zamanlarda, TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü beta), dondurulmuş kemik, kemik morfogenetik protein (BMP), Mineral Trioksit Aggregate (MTA) ve Biodentine™ gibi materyaller gerçek doku indükleyici ajan olarak kullanılmaktadır.²⁸⁻³⁰

2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri

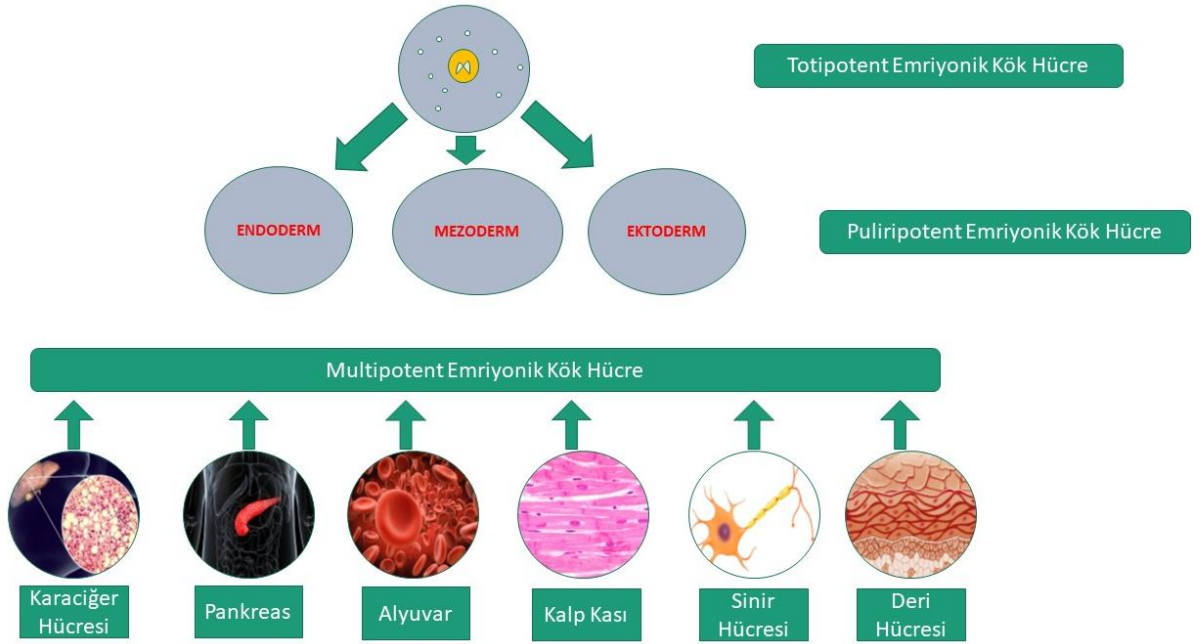
Hasarlı bir organın fonksiyonlarını düzeltmek amacıyla hasarlı dokunun yerine yenisinin koyulması en iyi seçenektir. Buradan yola çıkılarak çeşitli kaynaklardan elde edilebilen, vücudun çeşitli doku ve hücrelerine farklılaşabilen, hasarlı bölgeyi onararak birçok tedavi yöntemine olanak sağlayabilecek kök hücreler rejeneratif tedavilerin temelini oluşturur.²²

Kök hücreler bölünebilme, kendini yenileyebilme ve farklılaşmış hücrelere kaynaklık etme özelliklerine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler temel olarak embriyonal (fetal) ve somatik (erişkin) kök hücreler olarak sınıflandırılırlar.^{31, 32}

Embriyodan köken alan embriyonik kök hücreler, tüm dokuları oluşturabilme yeteneğine sahiptirler.³³ Erişkin kök hücreleri bir organ veya dokuda bulunan farklılaşmış hücrelerin arasındaki farklılaşmamış hücre gruplarıdır. Bu hücreler, çevresindeki doku veya organın özelleşmiş hücre tipine farklılaşabilme ve kendini rejenere etme kabiliyetine sahiptir.³⁴ Erişkin kök hücreleri kemik iliği,³⁵ amniyotik sıvı,³⁶ göbek kordon kanı,³⁷ nazal mukoza,³⁸ santral sinir sistemi,³⁹ periferik kan,⁴⁰ plasenta membranı,⁴⁰ kalp,⁴¹ karaciğer,⁴² akciğer,⁴³ deri epidermisi,⁴⁴ dental pulpa⁴⁵ gibi çeşitli dokulardan elde edilebilmektedir.

Kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere plastisite özellikleri bakımından üç alt grupta sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 2.2.). Totipotent hücreler, tüm hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip sınırsız farklılaşma potansiyeli bulunan hücrelerdir. Fertilize yumurta hücresi embriyonun gelişim sürecinde

organizmayı oluşturan totipotent özellikteki tek hücre tipidir.⁴⁶ Pluriopotent kök hücreler endodermal (sindirim sistemi hücreleri, hepatositler, pankreatik beta hücreleri vb.), mezodermal (kan, kas, kıkırdak, kemik vb.) ve ektodermal (deri, saç, nöron vb.) kökenli tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğini bünyesinde taşıyan embriyonik germ hücreleridir. Yetişkin bireylerin farklılaşmış dokularında bulunan multipotent kök hücreler ise farklılaşmamış hücrelerdir.⁴⁷



Şekil 2.2. Plastisite özelliklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücrelerin, içerisinde bulundukları dokunun sahip olduğu hücrelerin dışındaki diğer tip hücrelere dönüşebileceği de bildirilmiştir. Günümüzde mezenkimal kök hücreler kök hücre kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir. Oral bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynaklarına örnek olarak dental folikül, eksfoliyе süt dişi, erişkin dental pulpası, periodontal ligament ve apikal papilla verilebilir (Tablo 2.1).⁴⁸

Tablo 2.1. Ağız ve maksillofasiyal bölgedeki mezenkimal kök hücre kaynakları

Kök Hücre Kaynağı	Elde Edilen Yeni Kök Hücre
Yetişkin Dental Pulpa	Dental Pulpa Kök Hücresi [Dental Pulp Stem Cell (DPSC)]
Periodontal Ligament	Periodontal Ligament Kök Hücreleri [Periodontal Ligament Stem Cells (PDLSC)]
Eksfoliye Süt Dişleri	Süt Dişi Pulpası Kök Hücreleri [Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED)]
Diş Folikülü	Diş Folikülü Kök Hücreleri [Dental Follicle Stem Cell (DFSCs)]
Apikal Papilla	Apikal Papilla Kök Hücreleri [Stem Cells Apical Papilla (SCAP)]

Sürme sonrası dönemde de yok olmayan DPSC; kendinden-yenilenme ve farklılaşma potansiyeli bulunan, klonlonabilen ve multipotent özellikli mezenkimal kök hücrelerdir.⁴⁵ DPSC, farklı yaştaki hastaların sağlıklı dişlerinden türetilen bir hücre kaynağıdır. Özellikle 20 yaş dişleri, travma, periodontal problemler veya ortodontik tedavi nedeniyle çekilmiş dişler ve çekilmiş veya sürmüş süt dişleri başlıca pulpa kök hücre kaynaklarını meydana getirmektedir.⁴⁹ Dental pulpa kök hücre çalışmalarında sık bulunabilmeleri ve çekim endikasyonlarının olması sebebiyle çoğunlukla 20 yaş dişleri kullanılmaktadır. Ayrıca, ağızda en son gelişimini tamamlayan 20 yaş dişlerinin gelişimi genç erişkinlerde devam ettiği için zengin bir pulpa dokusu kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır.⁵⁰

İmmatür özellikteki multipotent hücrelere sahip süt dişi pulpa kök hücresinin çoğalma kapasitesi ve hücre popülasyonu yetişkin pulpasına kıyasla daha fazladır. Ancak yetişkin pulpa kök hücreleri gibi pulpa dentin kompleksi oluşumunu sağlayamamaktadır.⁵¹

2.2. Biyouyumluluğa İlişkin Temel Kavramlar

Biyoyumluluk bir materyalin canlı dokuya temas etmesiyle oluşan uygun yanıt olarak tanımlanır. Biyoyumlu bir materyal toksik, karsinojenik, alerjik ve mutajenik etki gibi reaksiyonlara neden olmamalıdır.⁵² Toksisite, kimyasal maddelerin biyolojik sistemlerde olumsuz etkiler oluşturmasıdır. Sitotoksisite hücre hasarını, apoptozis ise genlerle kontrol edilen ve enerjiye ihtiyaç duyulan programlı hücre ölümünü belirtmektedir.⁵³

Biyoyumluluk materyalin çeşidine, fonksiyonuna ve uygulandığı yüzeye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bir materyalin yapısından salınan bileşikler ve bu bileşiklerin hücresel seviyede meydana getirdiği etkiler materyalin biyoyumluluğunu belirler.⁵⁴

Diş hekimliğinde yeni bir materyal bulunduğunda bu materyali klinikte kullanmadan önce biyoyumlu olup olmadığına bakmak gerekir. Klinik kullanımdan önce materyalin biyoyumluluğunu saptamak için farklı testler uygulanır. Hücre kültürünün kullanıldığı in vitro testler hızlı ve ucuz olması sebebiyle öncelikle tercih edilir, daha pahalı ve zaman alıcı olması sebebiyle hayvan testleri hücre kültürü uygulamalarından sonra tercih edilip en son ise in vivo (kullanım testleri) testler ile daha detaylı değerlendirmeler yapılır.² Biyoyumlu olmayan materyaller biyolojik sistemlere hasar verecek seviyede reaksiyon oluştururlar. Bu durum toksisite olarak adlandırılır.⁵²

Sitotoksisite testleri, hücre organelleri, hücre bölünmesi, hücre canlılığı ve ölümü, protein veya DNA sentezi hakkında bilgiler elde ederek materyalin biyolojik özelliklerini tanımlamamıza yardımcı olur.²

2.3. Biyoyumluluğun Değerlendirilmesi

Sitotoksikite mekanizmalarının iyi anlaşılması, biyolojik yapıların ve materyallerin meydana gelebilecek hasarlardan korunabilmesi açısından önemlidir. Yeni materyallerin biyoyumluluğunun belirlenmesi amacıyla in vivo testler (kullanım testleri), in vitro testleri ve hayvan deneyleri kullanılmaktadır (Tablo 2.2.).²

Tablo 2.2. Biyoyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları

Uygulama	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
İn vitro Testler	• İşlem yapılması hızlı ve kolaydır. • Maliyeti azdır. • Standardize edilebilir. • Sayıca çok içerikli veri taramaları yapılabilir. • Geniş bir aralıkta değerlendirme yapılır. • Etkileşim mekanizmasında kusursuzluğa sahiptir.	• İn vivo uygulamalar ile ilişkisi tartışılabilir.
Hayvan Testleri	• Karmaşık sistemsel etkileşimlere açıktır. • Sonuçlar, in vitro uygulamalardan daha geniş kapsamdadır. • İn vitro uygulamalardan daha anlamlı sonuçlar elde edilir.	• Materyal kullanımıyla ilişkisi sorgulanabilir. • Maliyeti daha fazladır. • Daha fazla zaman gerektirir. • Etik ve yasal düzeyde tartışmalara açıktır. • Uygulama kontrolü daha zordur. • Tanımlaması ve ölçümü zordur.
Kullanım Testleri (in vivo testler)	• Kullanılan materyalin uygunluğu kontrol altındadır.	• Çok daha pahalı ve zaman alıcıdır. • Etik ve yasal düzlemlerde daha fazla tartışmalara sebep olmaktadır. • Uygulama kontrolü zor olabilir. • Sonuçların yorumlanması zordur.

2.3.1. İn Vitro Testler

Biyoyumluluğun değerlendirilmesi amacıyla bir test tüpünün içerisinde, canlı organizmanın dışında veya hücre kültürünün mevcut olduğu bir kap içerisinde uygulanan testlere in vitro testler denir. Bu testler için iki tip hücre kullanılmaktadır. Doğrudan bir hayvandan alınan ve kültürlenmiş sınırlı bir süre içinde büyüyen hücre tipi primer

hücrelerdir. Süresiz büyümeleri için önceden kültür ortamında farklılaştırılmış olan hücre tipi ise sürekli hücreler olarak bilinmektedir. Materyallerin biyolojik uyumlarının değerlendirilmesi için bu iki hücre tipi de kullanılabilir. ⁵⁵

İn vitro testler; hücre metabolizmasını ve fonksiyonunu ölçen testler, sitotoksikite testleri, mutageniz analizleri ve bariyer kullanılan testler (indirekt testler) olarak sınıflandırılabilir. ⁵⁶

2.3.1.1. Sitotoksikite Testleri

Bir materyalin olası toksikolojik reaksiyonlarının in vitro olarak değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürleri üzerinde yapılan sitotoksikite testleri biyoyumluluğun ilk aşaması olarak kullanılır. Bu testlerde hücrelerin enzim aktiviteleri, büyüme oranları, morfolojik özellikleri, metabolizmaları değerlendirilerek daha karmaşık olan hayvan deneylerine geçmeden önce bir materyal hakkında ön bilgi elde edilir. Membran geçirgenlik testleri sitotoksikite testlerine örnek olarak verilebilir. ⁵²

2.3.1.2. Hücre Metabolizmasını ve Fonksiyonunu Ölçen Testler

Canlı hücrelerin enzim aktivitelerini, hücre sayısındaki net artışı, total protein miktarını veya DNA sentezini ölçen kolorimetrik testlerdir. Enzimatik test olan MTT testi, LDH ve alamar mavisi testleri metabolizmayı değerlendiren test yöntemlerinden olup toksisitenin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan ucuz ve kolay uygulanabilen yaygın testlerdendir. MTT testi bu testler arasında en sık kullanılan test yöntemidir. ⁵⁷

MTT Testi

Suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzu olan MTT testi dental malzemelerin sitotoksikitesinin belirlenmesinde çok sık kullanılır. ⁵⁸ Kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testinde dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülmektedir. Materyalin sitotoksik etkisi sonucu hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesi etkilenmekte ve mitokondrinin aktif olduğu hücreleri belirten mavi renkli formazan oluşumu gözlenmemektedir. Materyalin

sitotoksisite miktarını belirleyen formazan oluşumu değerlendirilirken optik yoğunluğu ölçülmekte veya elektron mikroskopuyla formazan ışığı değerlendirilmektedir.⁵⁹

MTT testi, çok sayıda hücre kültürlerinde canlı hücre oranının belirlenmesinde, kolay, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Aynı zamanda bu test büyüme döngüsünün herhangi bir evresindeki canlı hücre yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir.^{60, 61}

LDH Testi

LDH, tüm hücrelerde depolanan sabit sitoplazmik bir enzimdir. LDH seviyesindeki artış muhtemelen oksidatif hasar nedeniyle hücre zarlarının stabilitesinin zarar gördüğünü gösterir.^{2, 62} Sitolizis veya hücre membran hasarı durumunda kolorimetrik bir sitotoksisite değerlendirme yöntemi olan LDH testi kullanılarak sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrogenazın miktarı ölçülür ve sitotoksisite hakkında bilgi elde edilir.^{2, 63}

Bariyer Kullanılan Testler (İndirekt Testler)

Dış hekimliğinde restoratif işlemler sırasında pulpa ile materyal arasında bulunan dentin dokusu koruyucu bir bariyer olarak görev almaktadır. Dentinin bariyer özelliğini taklit etmek için bu geliştirilen yöntemde, bariyer olarak farklı materyaller kullanılmıştır. Bu yöntemde test edilen materyalin dentin dokusunda çözünme ve dentin tübüllerine girerek difüze olma yeteneği ölçülür. Dentin dokusuna nüfuz edebilen materyaller pulpaya kolayca ulaşabildiklerinden dolayı biyouyumluluğu iyi açıklayan test yöntemlerinin arasında yer alır.^{64, 65}

2.3.1.3. Hücre Fonksiyon Ölçümünde Kullanılan Diğer Değerlendirmeler

Bu yöntemlerdeki amaç kemotaksisi, bağışıklık fonksiyonunu, lenfosit proliferasyonunu ve lenfosit veya makrofajlardan sitokin üretimini ölçmektedir. Aynı zamanda kompleman aktive etme yeteneğini veya hücre döngü değişimini değerlendiren testlerde mevcuttur. Materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmek amacıyla yapılan

hayvan deneylerinin sayısını azaltmak için bu testler umut vericidir ancak in vivo önemi henüz belirlenmemiştir.^{56, 66}

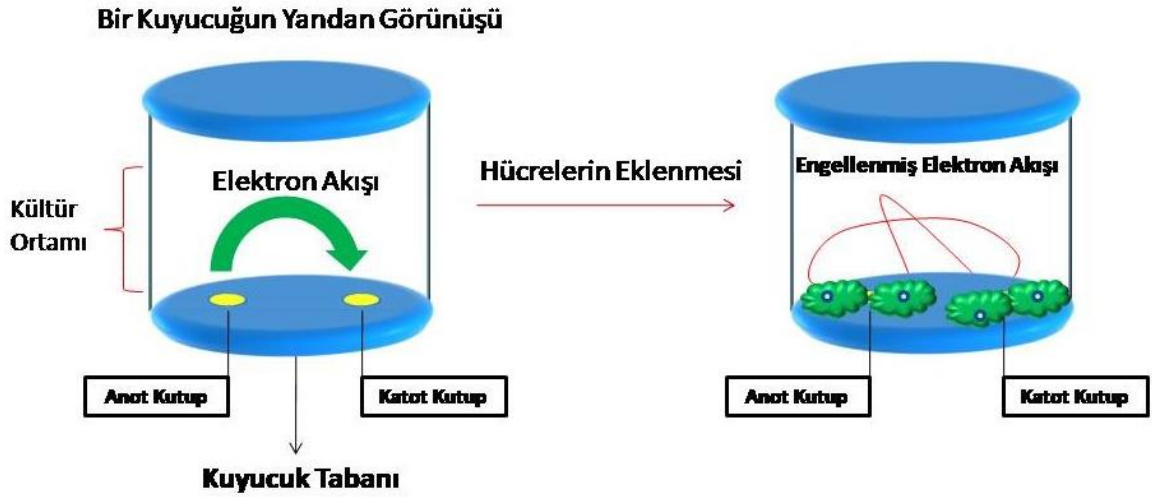
2.3.1.4. Mutagenez Analizleri

Biyomateryallerin hücrenin genetik materyalinde farklılıklar ortaya çıkarmasına genotoksite denir. Hücreler genotoksik hasarı bazı mekanizmalar yardımıyla onarabilirler. Genetik hasarın sonraki nesillere aktarılması programlanmış hücre ölümleriyle engellenebilir. Fakat genetik hasar sonraki nesillere geçerse bu etki mutajenite olarak adlandırılır.² Materyalin hücrenin genetik materyaline olan etkisini değerlendiren analize ise mutagenez analizi denir. Bir materyal çok çeşitli mekanizmalar yardımıyla hücrenin genlerini etkileyebilir. Hücrenin DNA'sına doğrudan çeşitli mutasyonlar ile değiştiren genotoksik mutajenlerdir. Genotoksik kimyasallar ise kendiliğinden mutajen olabilmekte veya bu özelliğe sahip olmak için bu kimyasalların biyotransformasyonları veya aktivasyonları gerekli olmaktadır, bu kimyasallar ise promutajen olarak adlandırılır. Diğer bir mutajen tipi olan epigenetik mutajenler DNA'yı kendileri değiştirmeyip hücrede farklılıklara sebep olarak, hormon gibi davranarak veya bağışıklık sistemini değiştirerek tümör büyümesini desteklemektedir. İn vivo kanserlere neden olma kabiliyetine ise karsinogenez denir.⁵⁶ Mutagenez testlerine örnek olarak Ames testi ve Stiller'in hücre dönüşüm testi verilebilir. En sık kullanılan Ames test metodunda genetik yapısı farklılaştırılmış bakteri türleri kullanılmaktadır. Bu bakteri türleri mutajenik etki karşısında çoğalırlar ve oluşan koloni sayısı da mutajenite için bir göstergedir.^{67, 68}

2.3.1.5. xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System, RTCA)

Hücre kültüründeki hücrelerin ölümü veya çoğalması, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde altın biyosensör mikroelektrotlar kullanılarak, hücrelerin elektrik akımına

gösterdikleri direnç ile sürekli ve eş zamanlı olarak ölçülmektedir (Şekil 2.3.). Bu sistemin hücre davranışı ve sağlığı üzerine herhangi bir zararı olmadığı bildirilmiştir. Hücre sayısındaki artış, direnci değiştirmektedir. Bunun sonunda gerçek zamanlı kantitatif bir analiz yapılabilmektedir. Aynı zamanda bu sistem için hücrenin işaretlenmesine gerek yoktur.^{69, 70}



Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi yardımıyla hücre çoğalması ve ölümü eş zamanlı ve sürekli olarak kaydedilebilmekte ve elde edilen veriler grafikler halinde dijital ortama aktarılabilir. Genel olarak bu sistem, hücre kültürü laboratuvarlarında hücrenin özelliğini belirleme, adezyon, reseptör aracılı sinyal iletimi, proliferasyon-sitotoksite tayini için kullanılmaktadır. xCELLigence® analiz sisteminin geleneksel test yöntemlerine göre avantajları; testlerin daha kısa sürede ve kolay yapılması, eş zamanlı ölçüm yapılabilmesi, daha güvenilir sonuçlar vermesi ve daha az invaziv olmasıdır.^{69, 70}

2.3.2. Hayvan Deneyleri

Hayvan deneyleri bir materyalin insanlardaki toksik etkisini önceden anlamaya yarayan test yöntemidir. Hayvan deneylerinden genellikle fare, sıçan, Gine domuzları gibi hayvanlar kullanılsa da kedi, köpek, keçi, koyun ve maymunda kullanılabilmektedir. Bu deneylerde; hayvanların türü, cinsiyeti, yaşı, hayvanın kullanılacak materyale temas

süresi, maruz bırakılma şekli ve biyolojik yanıtı değerlendirilme yöntemi gibi değişkenleri kontrol altında tutmak zordur ve aynı zamanda etik açıdan tartışılan bir test yöntemidir. Diğer in vitro test yöntemleriyle karşılaştırıldığında maliyeti daha yüksek olup uzun zaman gerektirmesi ve yorumlanması zordur. Aynı zamanda bu testlerin yapılabilmesi için alınması gereken özel hayvan deneyleri sertifikaları gereklidir.^{54, 71}

2.3.3. Kullanım Testleri (İn vivo testler)

Kullanım testleri hayvanlar veya gönüllü insanlar üzerinde yapılır. İnsanlar üzerinde uygulandığında daha çok klinik deneme olarak karşımıza çıkar. Hayvanlara uygulanan klinik testlerinde maymun ve köpek gibi büyük hayvanlar tercih edilir. Bu testlerin materyalin klinik kullanımına benzer bir şekilde uygulanması gereklidir.^{54, 72}

Biyouyumluluk değerlendirmelerinde testin laboratuvar aşamalarındaki (teknik, zaman, yer vb.) hassasiyet ve materyalin klinik kullanımının mümkün olduğunca taklit edilmesi sonucun doğruluğunu etkilemektedir.⁵⁶

Bir malzemenin biyolojik uyumu ve klinik olarak faydalı olup olmayacağı konusunda net bir cevap veren kullanım testleri altın standarttır. Ancak oldukça pahalı ve zaman alıcı olan bu testlerin takibi ve değerlendirilmesi de zordur. Diş hekimliğinde mukozal/gingival dokular, dental pulpa ve periodonsiyum bu testlerin ana hedefleridir. Bu testlere örnek olarak kemik içerisinde bulunan implantların değerlendirilmesi, pulpa irritasyon testi, mukozal/gingival kullanım testleri verilebilir.⁷³

2.4. Biodentine™

Diş hekimliği, pulpa hasarlarından sonra dokunun tamir olabilmesini sağlamak için kalsiyum hidroksit, ve günümüzde kullanılan MTA ve Biodentine™ gibi yeni materyallerle rejeneratif tıpa öncülük etmektedir.⁷⁵ MTA biyouyumluluğu ve hermetik kapama gibi avantajlarının yanı sıra bazı olumsuz özellikleri de bulunmaktadır. Uzun sertleşme süresi, renklendirme potansiyeli, manipülasyonun zor olması ve yüksek fiyat

dezavantajları arasında sayılabilir.^{76, 77} MTA'nın bu dezavantajlarının önüne geçebilmek amacıyla diğer kalsiyum silikat esaslı simanlar üretilmiştir. Kalsiyum silikat esaslı simanlar, MTA'nın kullanıldığı durumlarda uygulanabilirlik ve MTA'ya benzerlik göstermesi sebebiyle son yıllarda önem kazanmıştır. Son yıllarda çok sayıda çeşitli kalsiyum silikatlar üretilmesine rağmen, bu materyallerden biri çeşitli çalışmaların ilgi odağı olmuştur. Bu kalsiyum silikat esaslı materyallerden biri de, 2009 yılında ticari olarak piyasaya sürülen ve dentin alternatifi olarak tasarlanan Biodentine™'dir (Şekil 2.4.).⁷⁵



Şekil 2.4. Biodentine™

Biodentine™, MTA'nın farklı bileşiminden oluşan ince hidrofilik toz olmak üzere karıştırma cihazında karıştırılan yeni bir kapsül yapısındadır.⁷⁸ Hidrofilik toz bileşeni dikalsiyum silikat, trikalsiyum silikat, oksit dolgu maddesi, zirkonyum oksit, kalsiyum karbonat ve demir oksitten oluşmaktadır (Tablo 2.3.). Materyalin esas ve ikincil yapısını trikalsiyum ve dikalsiyum silikat oluştururken kontrast madde olan zirkonyum oksit

materyale radyopaklık verir. Sıvısında ise su, kalsiyum klorür ve hidrolize edilebilir polimer içermektedir. Aynı zamanda ürünü diğer ürünlerden farklı kılan hızlı sertleşme özelliği; sıvısına kalsiyum klorit eklenmesi, sıvısının azaltılması ve parçacık boyutunun arttırılması ile sağlanmıştır. Biodentine™'nin sertleşme süresi 9-12 dak.'dan daha kısa sürmektedir. Bu kısa sertleşme süresi diğer kalsiyum silikat simanlara göre olumlu bir gelişmedir.⁷⁵ Materyalin çözelti halindeyken kalsiyum salması karakterizedir. Aynı zamanda trikalsiyum silikat esaslı materyaller sentetik doku sıvısıyla temasa geçtiğinde hidroksiapatit kaynağı olurlar.⁷⁹

Tablo 2.3. Biodentine™ içeriği

Toz İçerik	Özellik
Trikalsiyum silikat (C ₃ S)	Esas Materyal
Dikalsiyum silikat (C ₂ S)	İkincil Materyal
Kalsiyum karbonat ve oksit	Doldurucu
Zirkonyum oksit	Radyopak materyal
Demir oksit	Renk Pigmenti
Sıvı İçerik	Özellik
Kalsiyum klorit	Hızlandırıcı
Suda çözünebilen polimer	Su azaltıcı madde

Su ile sertleşen simanların ana fiziksel özelliklerinden biri de baskı direncidir. Vital pulpa tedavilerinde tercih edilen Biodentine™ gibi ürünlerin çiğneme kuvvetlerine karşı dayanma kapasitelerinin yeterli olması gerekir.⁸⁰ Biodentine™'nin bükülme dayanımı, elastiklik modülü ve Vickers sertlik gibi fiziksel özellikleri dentine benzemekle birlikte, bu değerler MTA'dan yüksek bulunmuştur.⁸¹

Biodentine™'nin rezin modifiye cam iyonomer (Vitrebond) ve geleneksel cam iyonomer (Fuji IX) siman ile fiziksel özelliklerini karşılaştıran bir çalışmada en yüksek yüzey mikrosertlik değeri Biodentine™'de bulunmuştur.⁸²

Radyoopasite retrograd dolgu veya tamir materyalinde bulunması gereken önemli bir özelliktir, çünkü bu materyaller genel olarak düşük kalınlıklarda kullanılır ve çevre dokulardan kolaylıkla ayırt edilmelidirler. Biodentine™’de bu özelliğin sağlanması için zirkonyum oksit ilave edilmiştir. Zirkonyum oksitin seçilme sebepleri arasında; korozyon direncine sahip olması, biyouyumlu olması ve uygun mekanik özellikler göstermesi sayılabilir.⁸³ ISO standartlarına göre endodontik simanlar için en az radyoopasite değeri 3 mm Al ile aynı belirlenmiştir.⁷⁵

Biodentine™’nin renk stabilitesi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda 6 aya kadar stabilitesini koruduğu ve MTA’ya göre anlamlı derecede daha az renklendiği gözlenmiştir.^{84, 85} Bunun yanı sıra Biodentine™ kullanıldığında ortamdaki kan, NaOCl ve klorheksidin varlığında klinik olarak belirgin bir renklenme oluştuğu tespit edilmiştir.^{86, 87}

Biodentine™ materyalinin pH değerinin yüksek olduğu, mineralizasyonu uyaran silikon ve kalsiyum iyonlarının salınımına sebep olduğu ve ‘mineral infiltrasyon bölgesi’ diye isimlendirilen bir tabakayı (dentin-sement ara yüzü boyunca) oluşturduğu tespit edilmiştir.⁸⁸ Bu ara tabaka daha iyi bir hermetik örtüleme özelliği kazandırmıştır. Biodentine™ materyalinin rezin modifiye cam iyonomer siman ile sızdırmazlık özelliklerini karşılaştıran bir çalışmada iki materyalinde sızdırmazlık özelliklerinin benzer olduğu görülmüştür.⁸⁹

Biodentine™’nin farklı bağlanma sistemleriyle bağlanma dayanımını değerlendiren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, daimi ve süt dişlerinin dentinine Biodentine™ ve cam iyonomer simanın bağlanma dayanımları değerlendirilmiş ve hem süt hem de daimi diş grubunda cam iyonomer siman Biodentine™’den anlamlı derecede daha yüksek makaslama bağlanma dayanımı

göstermiştir. Aynı zamanda süt ve daimi diş gruplarında Biodentine™'nin bağlanma değerleri karşılaştırıldığında ise daimi diş grubunda daha yüksek değerler bulunmuştur.⁹⁰

Biodentine™ rejeneratif endodontide, dentini içeren restorasyonlarda, pulpa kuafajında, eksternal ve internal rezorpsiyonlarda, apeksifikasyon, apeksogenezis tedavilerinde ve endodontik cerrahide retrograd dolgu materyali olarak kullanılmaktadır.⁷⁵

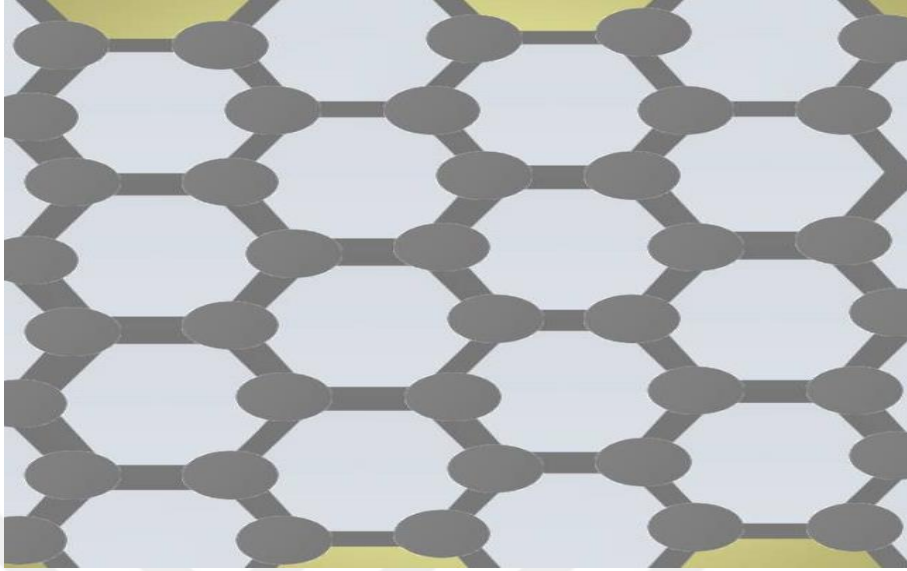
Perforasyon, pulpa kaplaması, retrograd dolgu veya furkasyon tamir materyali olarak kullanılan bir dental materyalin, dental pulpa dokusu ve çevre dokular üzerindeki toksik etkisinin önlenmesi için materyalin biyolojik uygunluğu ve sitotoksitesi göz önünde bulundurulmalıdır.⁸⁸ Bu işlemler sırasında Biodentine™ direkt bağ dokusu ile temasta olduğundan pulpa dokusunun ve periradiküler hücrelerin canlılığını etkileyebilmektedir. Bunun sonucunda nekroza bağlı hücre ölümü veya apoptoz meydana gelebilir.⁹¹

Biodentine™ cam iyonomer siman ve beyaz MTA'nın insan gingival fibroblast hücreleri üzerinde kullanıldığı bir çalışmada materyallerin sitotoksitesi değerlendirilmiş olup Biodentine™ ve beyaz MTA'nın sitotoksitelerinin benzer olduğu gözlenmiş olup her iki materyalin de cam iyonomer simana göre sitotoksite değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.⁹¹

2.5. Grafen

Grafen biyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleriyle dikkat çeken karbon esaslı materyaldir (Şekil 2.5.). Grafenin şeffaf bir materyal olması ve çok iyi bir iletken olması atomlarının birbirine yakın olmasından kaynaklanmaktadır. Grafen yük taşıma kapasitesi oldukça yüksek olan bir materyaldir. Grafende bulunan elektronlar kütleleri yokmuş gibi hızlı hareket ederler. Grafenin ısı ve elektrik iletkenliği oldukça yüksektir. Grafen doğadaki en ince materyal olmasına rağmen mekanik açıdan en güçlü malzemedir.^{92, 93}

Grafen birçok çalışmada umut vadetmektedir ve geleceğin materyali olarak düşünülmektedir.⁹⁴



Şekil 2.5. Grafenin çizgi gösterimi

Doğada bulunan saf haldeki grafen hidrofobiktir.⁹⁵ Organik moleküller arasındaki etkileşimi sağlayan grafen başta ilaç salım sistemi olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.⁹⁶ Işığın %97.7'sini geniş bir dalga boyu aralığında ileten grafen optik özellikleri ve elektriksel yük taşıma özellikleri bakımından çok iyi bir materyaldir.⁹⁷

Grafenin mekanik özellikleri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda grafenin mekanik olarak çelikten 100 kat daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda grafen esneklik açısından diğer materyallerle karşılaştırıldığında %20 daha fazla elastik gerilmeye sahiptir. Yüksek dayanıklılığı nedeniyle grafen, polimerik materyalin mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Grafen yüksek dayanıklılık ve ayarlanabilir mekanik özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde doku iskelelerinde ve tıbbi implantlarda kullanılmaktadır.⁹⁶

Grafen sahip olduğu kimyasal özellikleri sayesinde önemli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Vücut sıvılarına ve suya karşı dayanıklı olan ve neredeyse saydam olan grafen, diğer atomlara karşı geçirgen olmayan bir yapıdadır.⁹⁸

Grafen pozitif bir yüke sahiptir ve negatif yüklü nükleotitlerle etkileşime girme yeteneğine sahiptir.⁹⁶

Grafen, kimyasal, ultraviyole, mikrodalga veya termal yöntemler ile elde edilebilmektedir. Düşük maliyet ve büyük miktarda grafen üretmenin en etkili yollarından biri kimyasal yöntemidir. Bu yöntemde, grafit materyaline oksidasyon işlemi uygulanarak fonksiyonel gruplar kazandırılmakta ve hidrofilik özelliği bulunan grafen oksit sentezlenmektedir. Elde edilen grafen oksit askorbik asit, sodyum bisülfid (NaHSO_3), dimetil hidrazin, sodyum borhidrür (NaBH_4), hidroik asit gibi indirgeyiciler ile reaksiyona girerek hidrofobik olan indirgenmiş grafen oksit elde edilir.⁹⁹ Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksitin toksisitelerin karşılaştırıldığı bir çalışmada indirgenmiş grafen oksitin daha az toksik olduğu bulunmuştur.¹⁰⁰

Grafen içerikli nanomalzemelerin diş hekimliğinde kullanımı sonucunda bu materyallerin osteojenik farklılaşma ve hücrel biyo-mineralizasyonu uyardığı test edilmiş ve kanıtlanmıştır.¹⁰¹ Oral kaviteye grafen eklendiğinde farklılaşan ve çoğalan esas kök hücreler mezenkimal kök hücrelerdir. Bunun üzerine, grafen diğer kök hücreleri oluşturmak, farklılaştırmak ve çoğaltmak için test edilmiştir. Kimyasal buhar biriktirme yöntemi kullanılarak in vitro koşullarda test edilen grafenin çeşitli substratlarla birleştirildiğinde insan mezenkimal kök hücrelerini çoğalttığı ve sitotoksik etkisi olmadan çoğaldığı bulunmuştur.¹⁰² Yapılan bu araştırmalar sayesinde, grafenin tek başına veya diğer dental materyallerle kombine kullanımı için yeni çalışmalara yön verilecek, biyomedikal faydaları ortaya konulacaktır.¹⁰⁰

Grafen ve grafen içerikli nanomateriyallerin antibakteriyel özellikleri, materyallerin fiziksel-kimyasal özelliklerine, maruz kalma süresine, konsantrasyonuna ve testlerde kullanılan bakterilerin özelliklerine bağlıdır.¹⁰³ Grafen nanokompozitlerin genel antibakteriyel etkisi, grafenin lipidlerden fosfolipidleri çıkararak mikroorganizmalara

fiziksel olarak zarar vermesi, hücre zarına nüfuz etmesi ve kesmesi ayrıca mekanik strese neden olan hücreleri sarabilmesi yeteneğinin sonucudur.¹⁰⁴ Gram negatif ve pozitif bakterilere karşı antibakteriyel özelliğe sahip grafenin bu etkisi doza bağlıdır. Yüksek doz grafen oksit gram pozitif ve negatif bakterilerin biyofilmlerinin oluşumunu önlerken, düşük doz grafen oksit ise biyofilm oluşumunu arttırabilir ve istenilen etkiye ters bir reaksiyona sebep olabilir.¹⁰⁵ Diş hekimliğindeki diğer grafen kullanımları da benzer şekilde antibakteriyel etkinin; partikül büyüklüğüne, konsantrasyona, bakteri ve besiyerinin türü, malzeme tipine ve testlerin koşullarına göre farklılık göstermektedir.¹⁰⁰ Ayrıca, grafenin oral kavitedeki antibakteriyel etkisi, alışkanlıklara, konak duyarlılığına ve diyetlere bağlıdır.¹⁰⁶

2.6. İmmünfloresan Boyama

Mikrobiyolojik örneklerde kullanılan immünfloresan yöntemi, bir materyaldeki etken (antijen) veya bu etkene karşı oluşmuş antikor varlığının floresan bileşikler ile işaretli antikorlar kullanılarak araştırıldığı immünohistokimyasal bir tekniktir. Bu teknik, hücre içerisindeki özel biyomolekül hedeflerine floresans boyaları hedeflemek için antikorların antijenlerine özgüllüğünü kullanır ve bu sebeple hedef yapının numune boyunca dağılımının görselleştirilmesini sağlar. Bu teknik öncelikle antikorların yerini belli etmek için floroforları kullanır.¹⁰⁷

İmmünofloresan boyamalarda kullanılan 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8 OHdG) *invivo* oksidatif DNA hasarı biyolojik belirteci olan bir ajandır. Birçok hastalığın etiyolojisindeki önemi araştırılan premutajenik özelliğe sahip 8 OHdG mutasyon ve kanser oluşumuna neden olabilmektedir.¹⁰⁸

2.7. Total Oksidan Seviye (TOS)

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüştürülmesi sırasında oluşan metabolik yan ürünlerdir. Kararsız formda olan serbest radikaller kararlı

duruma geçerken hucrelere saldırarak hasar verirler. Antioksidanlar hucreleri hasarlardan korumak için serbest radikalleri nutralize eder. Zararlı serbest radikallerin nutralizasyonu için antioksidanlarla serbest radikaller dengede olmalıdırlar. Eğer serbest radikal seviyesi yukselirse oksidatif hasar oluşmaya başlar ve bu patolojik durum *oksidatif stres* olarak adlandırılır.^{109, 110}

Oksidatif stres bir hastalık olmayıp, hastalığı tetikleyen veya hızlandıran bir faktördür. Koruyu sağlık önlemleri bakımından önemli bir unsur olan oksidatif stresin herhangi bir semptomu bulunmadığı için ileriki dönemde teşhis ve tanı eksiklığı nedeniyle önemli sağlık problemlerine yol açabilir. Oksidatif stres sebepleri arasında; toksin veya patojene maruziyet, antioksidan tampon mekanizmasında eksiklik, aşırı reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin fazla üretimi, günlük metabolik ürünler, yaşam tarzında düzensizlik ve yoğun egzersiz sayılabilir.^{7, 111}

Serum ve plazmadaki farklı antioksidan konsantrasyonlarının ayrı ayrı ölçülmesi zaman alıcı, maliyetli olması ve karmaşık teknikler gerektirmesi bakımından pratik değildir. TAS ve TOS kitleri ile enzimatik olmayan tüm antioksidan ve oksidan molekülleri kolayca ölçülebilmektedir.¹¹²

Oksidatif stresin toplam değerine TOS denilmektedir.¹¹³ Demir iyonu-şelatör kompleksi TOS kitlerindeki numunede bulunan oksidanlar tarafından demir iyonuna oksitlenir. Reaksiyon ortamında bulunan güçlendirici moleküller oksidasyon reaksiyonunu uzatırlar. Asidik ortamda kromojen ve ferrik iyon renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarını yansıtır. Test kitinin kalibrasyonunda hidrojen peroksit kullanılır. Sonuç, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$) cinsinden ifade edilir.¹¹⁴

2.8. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Biyolojik sıvılardaki antioksidanların, membranları ve diğer hücresel yapıları oksitadif hasara karşı koruma kapasitesinin bir göstergesi olarak kabul edilen seviyeye TAS denir.¹¹⁵ Plazmadaki antioksidanlar birbirleriyle olan etkileşimden dolayı daha fazla etki oluşturlar. Bu yüzden tek başına antioksidan ölçümü yerine daha değerli olan total antioksidan seviyesi değerlendirilmektedir. Çünkü bu ölçüm, serumdaki antioksidanların toplam aktivitesini yansıtmaktadır ve antioksidanların etkinliği hakkında daha doğru bilgiler vermektedir. Antioksidanların net etkisini belirlemede ve etkinlikleri hakkında değerlendirme yapmada TAS kullanılmaktadır.¹¹²

Koyu mavi-yeşil renkli ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikali numunedeki antioksidanlar sayesinde renksiz formuna indirgenir. Numunenin TAS'ının belirlenmesinde spektrofotometre kullanılarak 660 nm'deki absorbans seviyesi değerlendirilir. Test kitinin kalibrasyonunda, stabil bir antioksidan standart solüsyon (E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri) kullanılır.^{112, 116}

2.9. ALP Testi

ALP enzimi kemik üretiminin erken evresinde osteoblastlar tarafından salgılanır. ALP aynı zamanda kalsiyum fosfat minerallerinin hücre dışında birikmesi için de gerekli bir enzimdir. ALP, alkali ortamda moleküllerden (başta nükleik asit ve alkaloidler) fosfat koparılmasını da sağlar. Serumda bulunan ALP' nin başlıca kaynağı karaciğer ve kemiktir.¹¹⁷ Odontojenik farklılaştırmanın bir belirteci olan ALP kemik yapımı sırasında çok yüksek konsantrasyonlarda üretilmekte, genel olarak kemik yapım etkinliği hakkında fikir vermektedir.¹¹⁸

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması TÜBİTAK (218S666) tarafından desteklenmiştir. 30.09.2021 tarihinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 6. toplantısında 64 karar numarası ile etik kurul onayı alınmış olup (EK-3), çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Pulpa Hücrelerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan dental pulpa kök hücreleri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection, ATCC) elde edilmiştir. Kriyo tüplerdeki dondurulmuş olan DPSC hücreleri çalışmada kullanılmak üzere öncelikle hızlıca çözülüp 1200 rpm'de 5 dak. santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-30-R Centrifuge) edilerek süpernatant kısmı atılmıştır (Şekil 3.1.). Ardından dipte pellet halinde kalan hücreler %10 FBS (Fetal sıgır solüsyonu, Gibco, USA), %1 antibiyotik (Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B (Thermo Fisher, Germany), %89 DPSC medyum (Lonza, USA), %1 L-glutamin içeren taze ortam yeniden süspanse edildikten sonra 25 cm²'lik flaska alınmıştır. Son olarak çalışmada kullanılmak üzere hücreler %5 CO₂ ve 37 °C şartlarında inkübatörde (Esco CelCulture CO₂ Incubator, England) depolanmıştır (Şekil 3.2.).



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

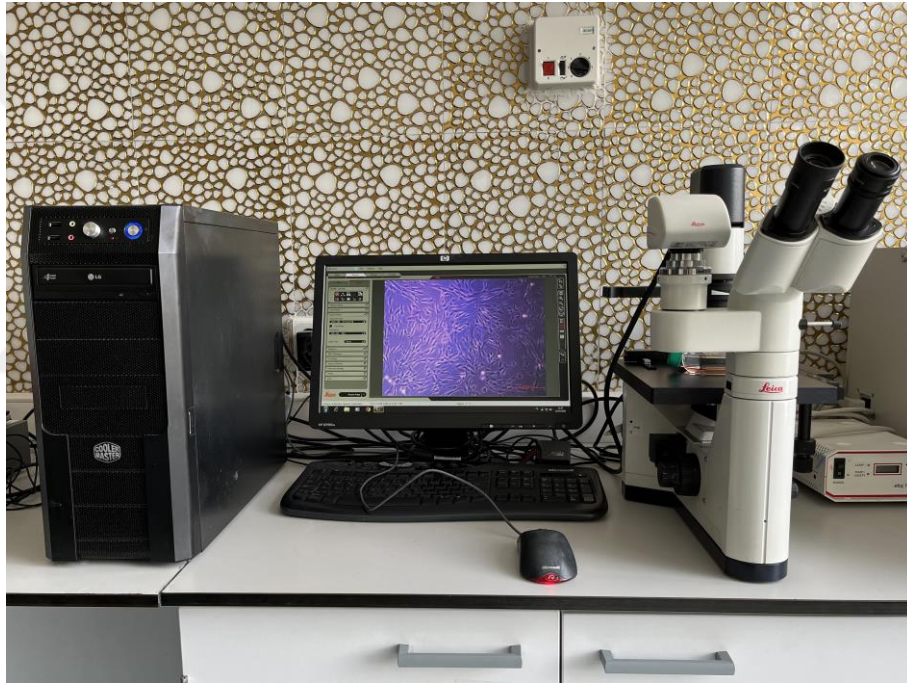


Şekil 3.2. CO₂ inkübatörü

3.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Hücreler flaskın %85-90'lık bir alanını kapladığında PBS (Phosphate - Buffered Saline - Sigma, USA) solüsyonu ile yıkanmıştır. Daha sonra Tripsin-Etilendiamintetraasetikası (EDTA) (%0.25 tripsin- %0.02 EDTA) (Sigma, USA) ile

hücreler zeminden kaldırılmış ve 1200 rpm’de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atılarak hücre süspansiyonu 48 kuyucuklu kültür plakalarına 200 µl/kuyucuk (20.000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde dağıtılarak 37°C’deki %5 CO₂ şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan well-plate’te kuyucukların tabanını tamamen doldurup doldurmadığı inverted mikroskop (Inverted Fluoresant Microscope, Leica, Germany) ile tespit edilmiştir (Şekil 3.3.). Hücreler %80’lik bir yoğunluğa ulaştığında örneklerin hazırlanması aşamasına geçilmiştir.



Şekil 3.3. Leica inverted mikroskopta hücrelerin üretim kabı tabanı konfluensinin tespiti

3.1.3. Hücre Sayımı

Bu işlem için tripan mavisini kullanılmıştır. Tripan mavisinin ölü hücrelerin zarlarından kolaylıkla geçebildiği bilinmektedir. Pasajlama işleminde olduğu gibi öncelikle hücreler tripsin ile yüzeyden ayrılarak içerisine besi ortamı ilavesi yapıp 1200 rpm’de 5 dak. süreyle santrifüj edilmiştir. Aynı şekilde süpernatant uzaklaştırılarak hücrelere 1 ml medyum ilave edilip pipetaj yapılarak homojen dağılımı sağlanmıştır. Elde

edilen hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak 400 µl PBS ilavesiyle seyreltme işlemi yapılmıştır. Hazırlanan hücrelerin üzerine 1 µl tripan mavisi ilave edilerek seyreltme işlemi yapılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp thoma lamına bırakılmıştır. Işık mikroskobu altında canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Çalışmanın bu aşamasında flask içerisinde bulunan hücrelerin tripsinizasyon yapılarak yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra santrifüj yapılan hücrelerin süpernatant kısımları uzaklaştırılıp hücreler taze medyum ile pipetaj yapılarak süspansiyon edilmiştir. 9:1 oranında hücre süspansiyonu: DMSO karışımının kriyo tüplere koyulması ile işlem sonlandırılmıştır. Kriyo tüpler kademeli olarak soğutulmuştur. Öncelikle +4°C’de 20 dak., -20°C’de iki saat, ardından -80°C’de 24 saat bekletilen kriyo tüpteki hücreler işlem sonunda sıvı azot içerisinde -196°C’de depolanmıştır.

3.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan materyaller Biodentine™ (Septodont, Saint-Maurdes-Fosses, France) (Şekil 3.4.) ve grafendir (Şekil 3.5.). Sadece kök hücreleri içeren grup negatif kontrol grubu, kök hücre ve DMSO (dimetil sülfoksit) içeren grup pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Biodentine™ 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/ml dozlarında, grafen ise 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml dozlarında kullanılmıştır. Her doz için 10 kuyucuk kullanılmıştır. Her bir materyalin farklı dozları için MTT, TAS, TOS, xCELLigence analizleri yapılmış ve ayrıca immünfloresan boyama ile hücre sayıları değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Biodentine™



Şekil 3.5. Grafen

Deney günü well-plate'deki tüm besi yerleri taze besi yerleriyle değiştirilmiştir. Materyallerin bütün konsantrasyonları üretici firmaların önerileri doğrultusunda steril bir kabin (Şekil 3.6) içerisinde hazırlanmıştır. Platelardaki hücre medyumları dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 48'lik plate ekilen hücrelerin her kuyucuğuna hazırlanan dozlardan 200 μ l verildi ve bu sayede kullanılacak olan materyallerin hücre ile doğrudan teması sağlanmıştır. Materyallerin sitotoksik ya da proliferasyon etkisini belirlemek amacıyla 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.



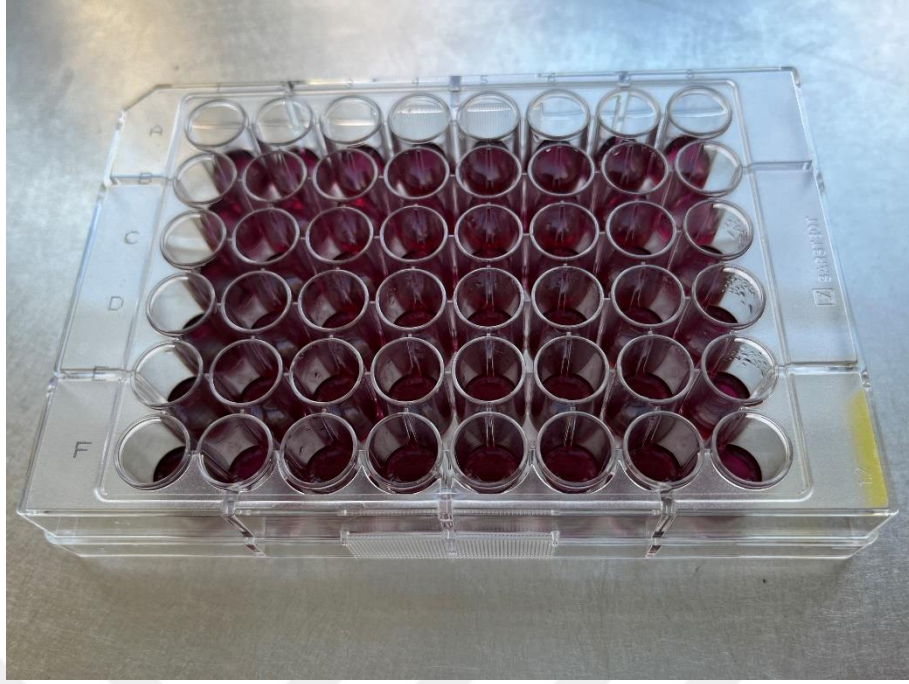
Şekil 3.6. Steril Kabin

3.3. MTT Analizi (Sitotoksisite Analizi)

Biodentine™ ve grafen maddelerinin oluşturduğu sitotoksisite düzeyini ölçme amacıyla MTT testi yapılmıştır. İlk olarak, kuyucuk başına 2×10^4 hücre, 200 µl DPSC medyumunda 48 kuyucuklu plate'lere yerleştirilmiştir. Hücreler tutunduktan sonra, etken maddeler ilave edilmiş ve 24 saat süreyle maruz kalmaları sağlanmıştır. Ardından hücre medyumunu uzaklaştırılıp hazırlanmış olan MTT solüsyonu (5mg/ml) (Şekil 3.7.) kuyucukların her birine 10 µl ilave edilerek kuyucukların hacimleri medyum ile 100 µl'ye tamamlanmıştır (Şekil 3.8.). Ve 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat bekletilerek MTT ile hücrelerin proliferasyonu gözlenmiştir. Formazan kristallerini çözmek için kuyucuklardaki sıvı alınarak 100 µl DMSO ilave edilmiştir. Son olarak, ölçümler MultiScan GO Mikroplaka Spektrofotometresi mikroplaka okuyucusunda 570 nm'de alınmıştır.



Şekil 3.7. MTT solüsyonu



Şekil 3.8. 48 kuyucuklu platelerdeki DPSC üzerine eklenmiş MTT solüsyonu

3.4. LDH Analizi

LDH seviyesinin belirlenmesi amacıyla LDH Elisa kiti (Sunlog Biotech Co., China) kullanılmıştır (Şekil 3.9.). Hücre kültürü plazma medyumları kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Temel olarak LDH laktik asidi katalize ederek piruvat üretir. Alkali solüsyonda piruvat ile 2,4-dinitrofenilhidrazin reaksiyona girerek kırmızı-kahverengi renkli piruvat dinitrofenilhidrozon oluşturur. Oluşan renk yoğunluğu piruvat konsantrasyonuyla orantılıdır. Her kuyucuğa 100 µl standart çalışma solüsyonları ve plazma medyumunu eklenip 37°C’de 90 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kuyucuklardaki sıvı dökülerek her kuyucuğa 100 µl Biotinle işaretlenmiş antikor içeren çalışma solüsyonu ilave edilerek 37°C’ de 60 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek üç kez yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır. Kuyucuklara 100 µl HRP konjugatı eklendi ve 37°C’de 30 dak. inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı dökülerek beş kez yıkama solüsyonuyla yıkanmıştır. 37°C’de 15 dak. süreyle 90 µl substrat reaktifi kuyucuklara eklenerek inkübe edilmiştir.

Sonrasında bütün kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm’de okutularak OD (optik yoğunluk) değeri belirlenmiştir.



Şekil 3.9. LDH kiti

3.5. xCELLigence Analiz

Bu analiz yönteminde E-plaka kuyucuklarına 50 µl besi yeri eklendi. DPSC hücreleri 50 µl içerisinde 104 hücre olacak şekilde ekilmiş ve E-plaka oda sıcaklığında 30 dak. inkübe edilmiştir. Ardından E-plaka inkübatörde bulunan RTCA cihazının (ACEA Biosciences Inc., California) (Şekil 3.10) plaka bölgesine yerleştirilerek hücrelerin logaritmik proliferasyon durumları istenilen zaman aralıklarında gözlenmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılıp sonrasında kuyucuklara kullanılan ilaçların farklı dozlarını içeren 100 µl besi yeri eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise sadece medyum ve medyum+DMSO eklenmiştir. İlaçlar eklendikten sonra 72 saat deney devam edilmiş ve bu sırada hücre indeksi (CI) değerlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir (Toplam 96 saat). Hücrelerin ilaca karşı geliştirdikleri kısa süreli cevabı ölçmek için, hücreler ilacın eklenmesinden sonraki bir saat boyunca her 2 dak.’da

bir, uzun süreli hücresel cevapları gözlemleyebilmek için ise deney süresince her 30 dak.'da bir gözlemlenmiştir.



Şekil 3.10. xCELLigence cihazı ve birlikte kullanılan bilgisayar

3.6. İmmünofloresans Boyama

30 dak. paraformaldehitte hücreler tespit edildikten sonra endojen peroksidazın inaktive edilmesi amacıyla PBS'de 5 dak. yıkanmış ve %3'lük H_2O_2 'de 5 dak. tutulmuştur. PBS' de 5-10 dak. daha yıkanmış ve penetrasyon amacıyla 15 dak. %0.1 Triton-X 100'de tutulduktan sonra tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan protein blok kullanılarak nonspesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla 5 dak. inkubasyona bırakılmıştır. Blok solüsyonunun fazlası doku kesitleri üzerinden döküldükten sonra yıkanmadan primer antikor (8 OHdG Cat No: ab48508 Dilüent Oran: 1/200) ve kontrol grubunda PBS damlatılmıştır. Sekonder işaretleyici olarak immünofloresan antikor kullanılıp (FITC Cat No: ab6785 Dilüent Oranı: 1/1000) karanlık ortamda 45 dak. bekletilerek ve distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra sekonder olarak DNA işaretliyiçi mounting medyumlu DAPI (Kat no, dilüent oranı) damlatılıp gliserin

eklenerek konfokal mikroskobu (Leica,Germany) ile incelendi. İncelenen örneklerden 5 farklı bölge fotoğraf çekilerek immün pozitifliklerine göre derecelendirilmiştir. (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Hücre hattında immünfloresans boyamaların skorlanması

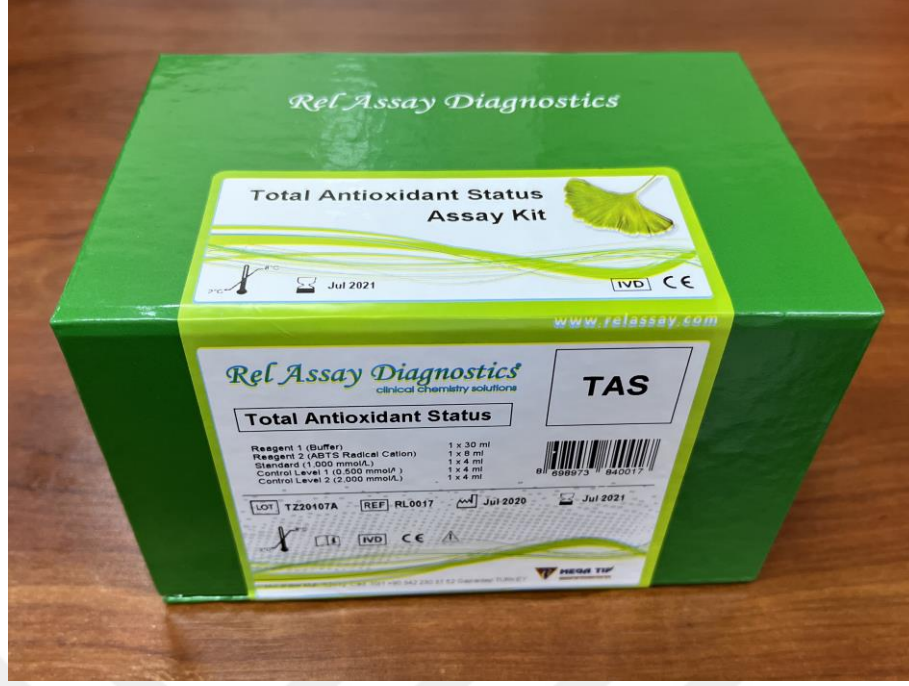
Pozitif hücre sayısı	Skorlanma
1-3	Negatif (-)
3-7	Çok Hafif (+)
8-13	Hafif (++)
14-20	Orta (+++)
21-25	Şiddetli (++++)
25 <	Çok şiddetli (+++++)

3.7. TOS ve Total Antioksidan TAS Seviyelerinin Belirlenmesi

TAS ve TOS seviyelerinin belirlenmesi amacıyla TAS-TOS ticari kitlerinde (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) (Şekil 3.11. ve 3.12.) hücre kültüründe hücrelerin geliştikleri plazma sıvıları kullanılmıştır. TAS ölçümünün prensibi, test edilen numune içeriğindeki antioksidanların mavi yeşil renge sahip ABTS⁺ radikalini renksiz forma getirmesi ile ilişkilidir. Kuyucuklardaki 18 µl'lik örnek solüsyonuna Reaktif 1 solüsyonundan 300 µl eklendikten sonra ilk absorbans (A1) değeri 660 nm'de okunmuştur. Ardından 45 µl'lik Reaktif 2 solüsyonu aynı kuyucuklara eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dak. bekletildikten sonra ikinci absorbans (A2) değeri mmol Trolox Equiv./L cinsinden okunmuştur.

$$Sonuç = \frac{[\Delta Abs H_2O - \Delta Abs Örnek]}{[\Delta Abs H_2O - \Delta Abs Standart]}$$

A2-A1= Örneğin, standardın veya H₂O'nun ΔAbs'si



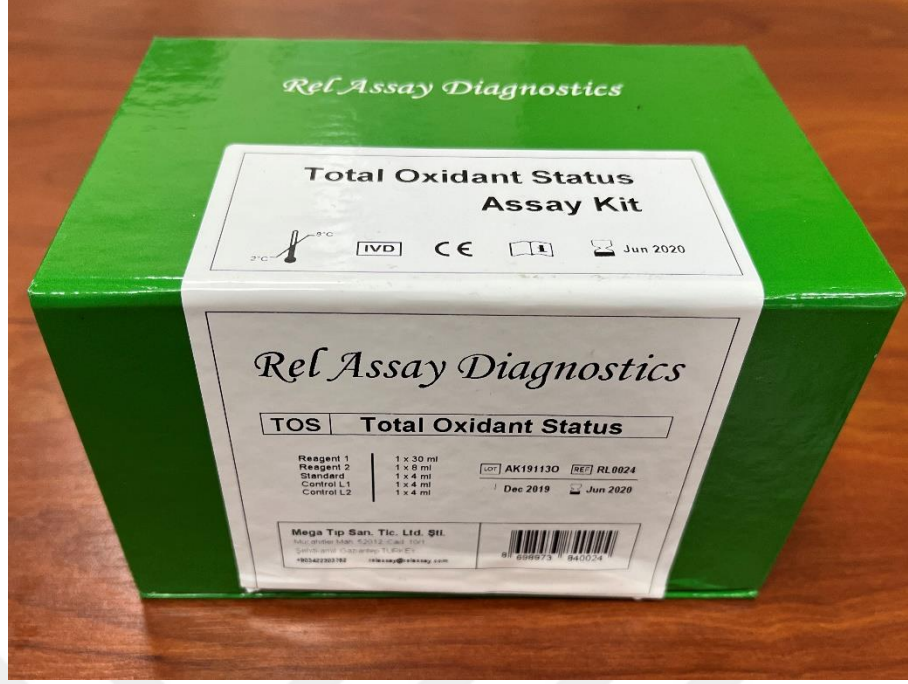
Şekil 3.11. TAS kiti

TOS düzeyi ölçümün prensibi numune içeriğindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonuna kümülatif olarak oksitleyen oksidan mekanizmasından yola çıkarak asidik ortamda ferrik iyonlarının turuncu rengi ile kompleks meydana getirmesi temeline dayanmaktadır. Spektrofotometrik ölçümlerde örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılı olarak absorbans değerleri değişmektedir. Kuyucuklardaki 45 µl'lik plazma örneği solüsyonuna Reaktif 1 solüsyonundan 300 µl eklendikten sonra ilk absorbans değeri 530 nm'de okunmuştur. Ardından 15 µl'lik Reaktif 2 solüsyonu aynı kuyucuklara eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dak. bekletildikten sonra ikinci absorbans değeri mmol Trolox Equiv./L cinsinden okunmuştur.

$$Sonuç = \frac{\Delta Abs \text{ Örnek}}{\Delta Abs \text{ Standart}} \times 10^*$$

A2-A1 = Örneğin veya standardın ΔAbs 'si

* Standartın Konsantrasyonu



Şekil 3.12. TOS kiti

3.8. ALP Aktivite Testi

ALP seviyesinin belirlenmesi amacıyla ALP ELISA kiti (Elabscience, USA) kullanılmıştır (Şekil 3.13.). Hücre kültürü plazma medyumları kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Temel olarak ALP benzen disodyum fosfatı ayrıştırarak serbest fenol ve fosforik asidi üretir. Alkali solüsyonda fenol ile 4-aminopirilin tepkimeye girerek potasyum ferrisiyanür katalizörlüğünde oksitlenerek kırmızı kinon üretir. ALP enzim aktivitesi, OD (optik yoğunluk) değeri ölçülerek dolaylı olarak hesaplanır. 37 °C’de kuyucuklara 100 µl standart ve hücre solüsyonları eklenip 90 dak. inkübe edilmiştir. Kuyucuklarda bulunan sıvı inkübasyon sonunda döküldü ve her kuyucuğa 100 µl Biotinle işaretlenmiş antikor içeren çalışma solüsyonu ilave edilerek 37 °C’de 60 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 100 µl HRP konjugatı eklenip 37 °C’de 30 dak. inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklardaki sıvı boşaltılarak yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır. 90 µl substrat reaktifi kuyucuklara eklenmiş ve 37 °C’de 15 dak. süreyle

inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm’de okutularak OD (optik yoğunluk) değeri belirlenmiştir.



Şekil 3.13. ALP kiti

3.9. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada kullanılan istatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 8.0a for Mac OS X (GraphPad Software, Inc., La Jolia California, ABD) istatistik programında %5 önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir. MTT, TAS, TOS, LDH ve ALP verilerinin analizlerinde tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Analizlerde gruplar arası farklılığı belirlemede ise LSD testi kullanılmıştır.

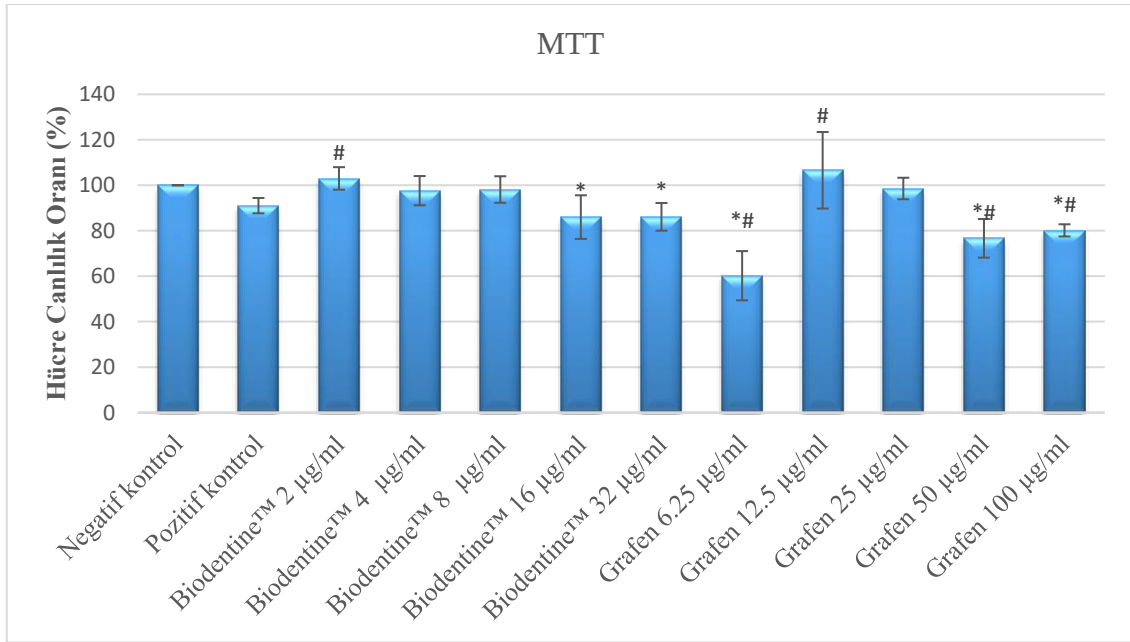
4. BULGULAR

4.1. MTT Analizi

DPSC üzerine farklı dozlarda uygulanan Biodentine™ ve grafenin 24 saat sonunda MTT analiz yöntemi ile sitotoksik etkileri belirlenmiş ve hücre canlılık oranları Tablo 4.1’de verilmiştir (Şekil 4.1). Biodentine™ materyali için artan dozlarla beraber hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Grafen 6.25 µg/ml dozunda en düşük hücre canlılık oranını sergiledikten sonra en yüksek hücre canlılığına 12.5 µg/ml dozunda ulaşmış ve artan diğer dozlarında ise bir azalış sergilemiştir. Biodentine™ 2 µg/ml grubundaki hücre artışı oranı pozitif kontrol grubuna kıyasla anlamlı iken, Biodentine™ 16 ve 32 µg/ml gruplarının negatif kontrol grubuna kıyasla düşük hücre canlılık oranı sergilemeleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur ($p<0.05$). Grafen 12.5 µg/ml grubundaki hücre artış oranı pozitif kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmuştur. Ayrıca grafen 6.25-50-100 µg/ml gruplarındaki hücre canlılık oranlarındaki azalış hem negatif hem de pozitif kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur ($p<0.05$). En fazla hücre canlılık oranı sergileyen Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarındaki hücre artış oranları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0.59$).

Tablo 4.1. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen MTT analizi sonuçları

Grup	Ortalama ± Standart Sapma
Negatif kontrol	100 ± 0
Pozitif kontrol	91 ± 3.4
Biodentine™ 2 µg/ml	103 ± 5
Biodentine™ 4 µg/ml	97.6 ± 6.4
Biodentine™ 8 µg/ml	98.1 ± 5.8
Biodentine™ 16 µg/ml	86 ± 9.6
Biodentine™ 32 µg/ml	86.1 ± 6.1
Grafen 6.25 µg/ml	60.2 ± 10.8
Grafen 12.5 µg/ml	106.6 ± 16.8
Grafen 25 µg/ml	98.6 ± 4.7
Grafen 50 µg/ml	76.7 ± 8.5
Grafen 100 µg/ml	80.2 ± 2.7



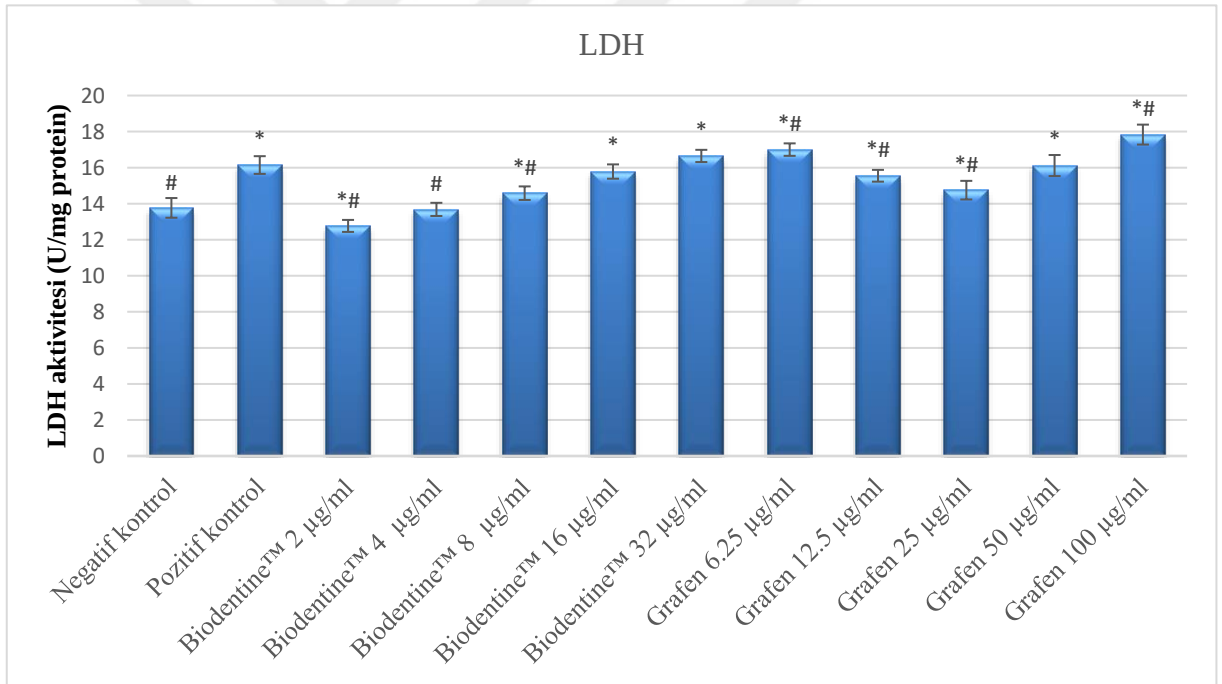
Şekil 4.1. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının 24 saatlik MTT analizi sonuçları
 * $p < 0,05$ negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # $p < 0,05$ pozitif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

4.2. LDH Testi

Biodentine™ ve grafenin DPSC üzerindeki sitotoksitelerinin belirlenmesinde kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemi olan LDH testinin 24 saatlik sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir (Şekil 4.2.). Biodentine™ gruplarının dozları arttıkça ortalama LDH aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Grafen gruplarının tamamı ise negatif kontrol grubundan yüksek ortalama LDH aktivitesine sahiptir. Negatif kontrol grubundan daha düşük LDH aktivitesi sadece Biodentine™ 2 µg/ml grubunda tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Biodentine™ 2 µg/ml, Biodentine™ 4 µg/ml, grafen 12.5 µg/ml ve grafen 25 gruplarının pozitif kontrol grubundan düşük LDH aktivitesi sergilemeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca bu dört grubun ortalama LDH aktivite seviyeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttur ($p < 0.05$).

Tablo 4.2. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen LDH analizi sonuçları

Grup	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Negatif kontrol	13.8 $\pm$ 0.5
Pozitif kontrol	16.1 $\pm$ 0.5
Biodentine™ 2 μ g/ml	12.8 $\pm$ 0.3
Biodentine™ 4 μ g/ml	13.7 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 8 μ g/ml	14.6 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 16 μ g/ml	15.8 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 32 μ g/ml	16.7 $\pm$ 0.3
Grafen 6.25 μ g/ml	17 $\pm$ 0.3
Grafen 12.5 μ g/ml	15.6 $\pm$ 0.3
Grafen 25 μ g/ml	14.8 $\pm$ 0.5
Grafen 50 μ g/ml	16.1 $\pm$ 0.6
Grafen 100 μ g/ml	17.8 $\pm$ 0.6



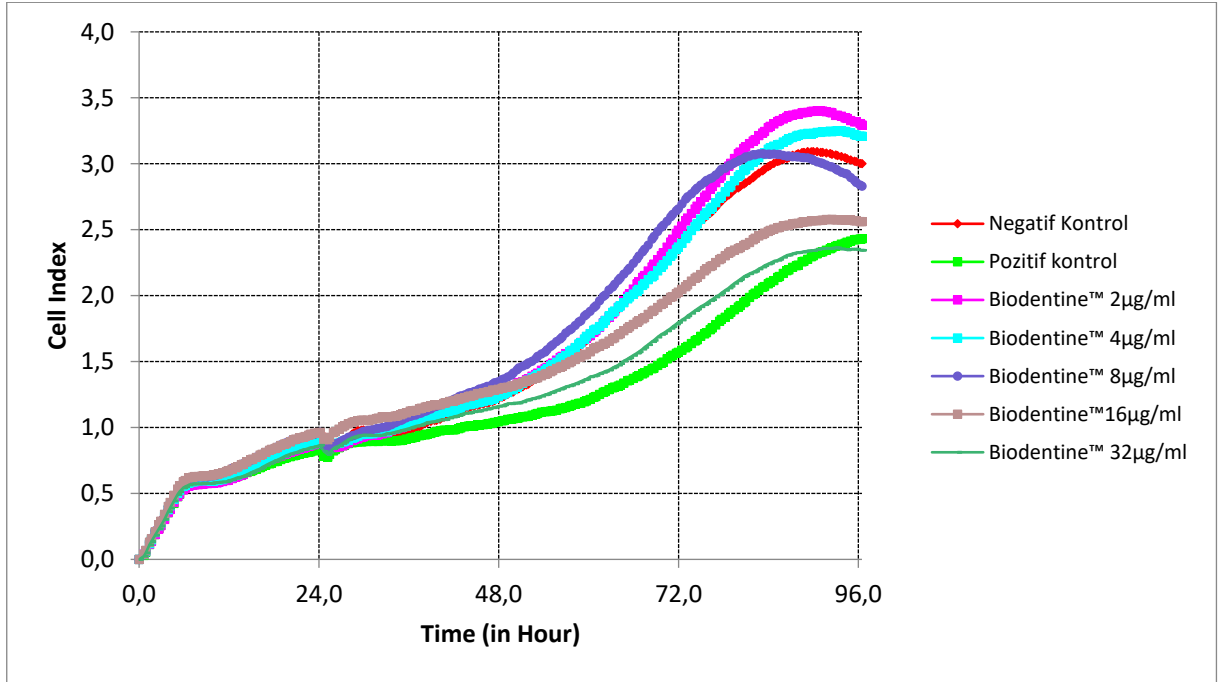
Şekil 4.2. Kontrol ve çalışma gruplarının 24 saat sonundaki LDH değerleri

* p<0.05 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # p<0.05 pozitif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

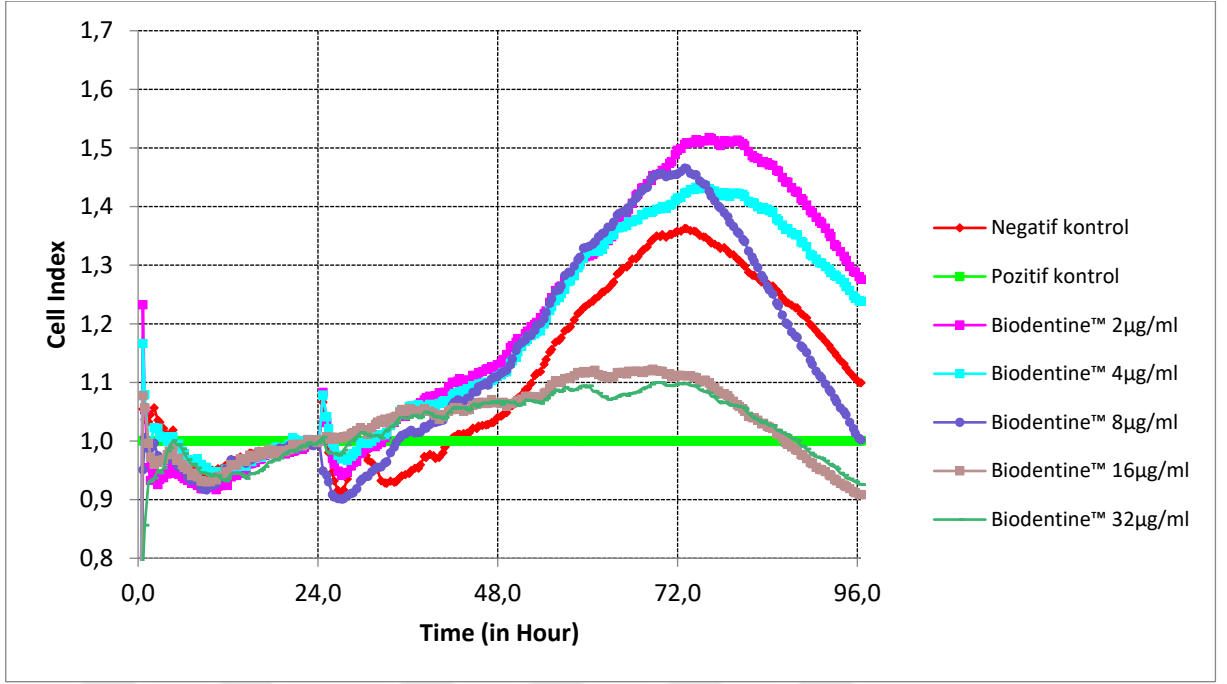
4.3. xCELLigence Analizi

Biodentine™'nin farklı dozlarının DPSC proliferasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi için her bir doz xCELLigence cihazında üç kuyucukta 72 saat boyunca takip edilmiştir. Farklı Biodentine™ dozlarına ait üçer farklı kuyucuktan elde edilen

empedans değerlerinin ortalamaları grafiklerde hücre indeksi olarak verilmiştir. DPSC üzerine 24. saatte Biodentine™'nin farklı dozları eklendikten sonra takip eden 72 saat boyunca hücre indekslerinde gözlenen değişim Şekil 4.3.'de verilmiştir. Hücre indekslerindeki değişimin kontrol grubuna kıyasla değerlendirildiği standardize edilmiş hücre indeks değişimi ise Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. 96 saatlik Biodentine™ xCELLigence sonuçları (ilaçlar ve kimyasallar 24 saat sonunda kültür ortamına eklenmiştir).

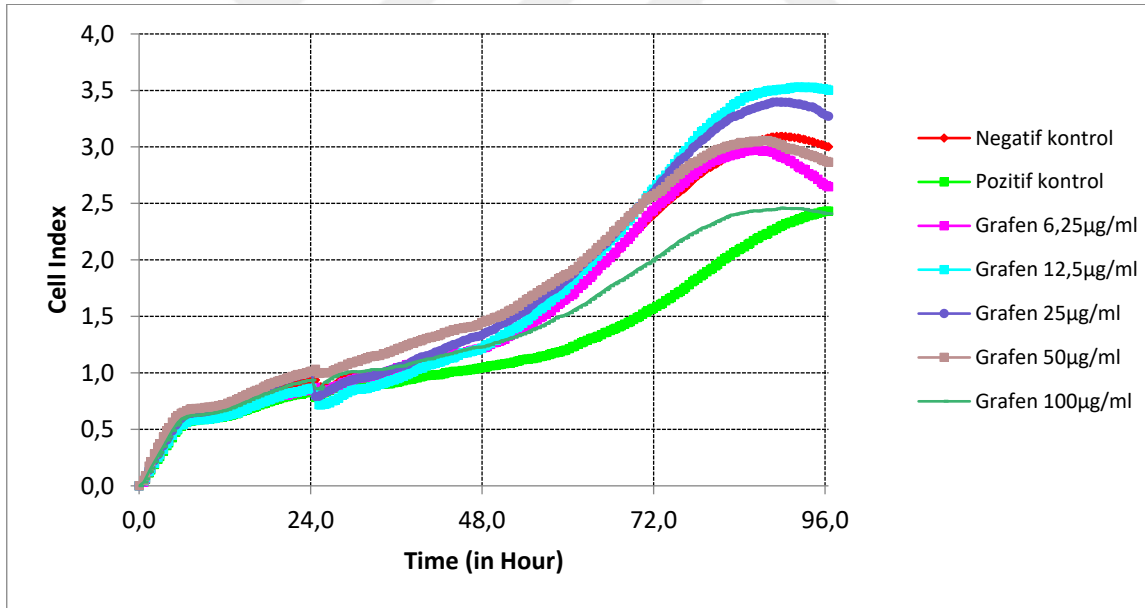


Şekil 4.4. Saatteki hücre indeks değerleri ve pozitif kontrol grubuna kıyasla her bir gruba ait hücre indeks değerleri dağılımı

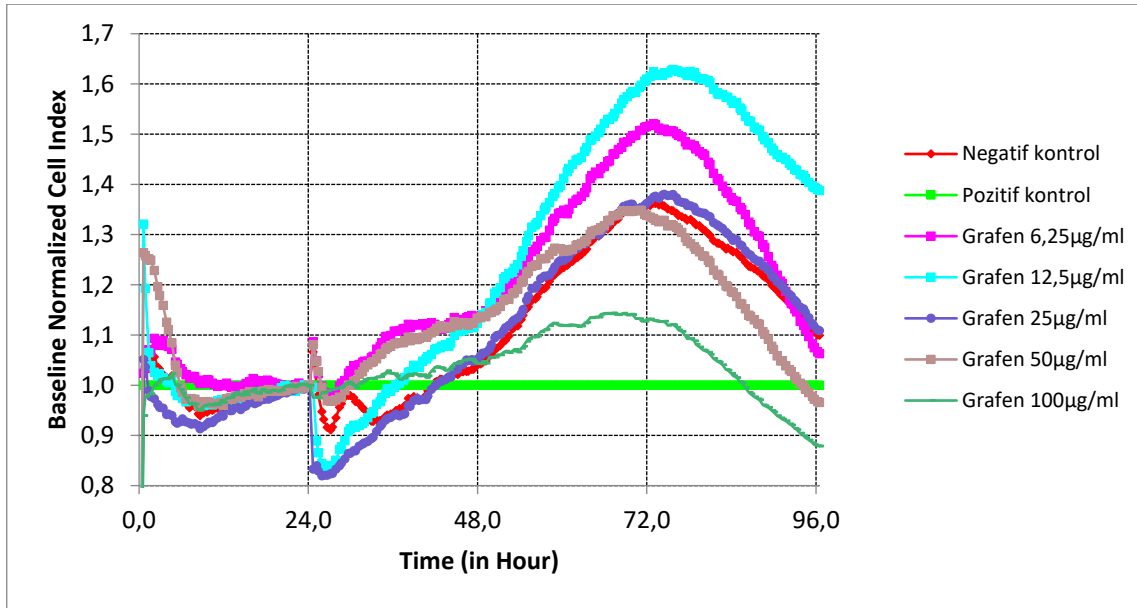
Farklı dozlardaki Biodentine™ DPSC üzerine eklendikten sonraki ilk 48 saat boyunca DPSC hücreleri bir artış sergileyerek 72. saatte en yüksek hücre indeks değerine ulaşmış ve 96. saate doğru bir azalış sergilemiştir. Biodentine™ 2 µg/ml, Biodentine™ 4 µg/ml ve Biodentine™ 8 µg/ml grupları negatif kontrol grubundan yüksek hücre indeks değerleri sergilemişlerdir. Biodentine™ 16 µg/ml ve Biodentine™ 32 µg/ml grupları ise sadece pozitif kontrol grubundan yüksek hücre indeks değerlerine sahiptir. 84. saatten sonra hücre indeks değeri bakımından Biodentine™ 16 µg/ml ve Biodentine™ 32 µg/ml grupları pozitif kontrol grubundan, Biodentine™ 8 µg/ml grubu ise negatif kontrol grubundan daha düşük değerler sergilemiştir. 96. saatte sadece Biodentine™ 2 µg/ml ve Biodentine™ 4 µg/ml grupları kontrol gruplarından yüksek hücre indeks değerine sahiptir.

DPSC üzerine 24. saatte grafenin farklı dozları eklendikten sonra takip eden 72 saat boyunca hücre indekslerinde gözlenen değişim Şekil 4.5.'de, standardize edilmiş hücre indeks değişimi ise Şekil 4.6.'da verilmiştir. DPSC hücrelerine farklı dozlardaki grafen eklendikten sonraki ilk 48 saat boyunca DPSC hücrelerinde bir artış gözlenmiş,

72. saatte en yüksek hücre indeks değerine ulaşılmış ve 96. saate doğru bir azalma gözlemlenmiştir. Deney süresince en yüksek hücre indeks değerleri grafen 12,5 µg/ml grubunda gözlenmiştir. Grafen 6.25 µg/ml grubu kontrol gruplarından daha yüksek hücre indeks değeri sergilemiş ancak 94. saatten sonra negatif kontrol grubunun altında kalmıştır. Grafen 25 µg/ml grubu pozitif kontrol grubuyla benzer bir hücre indeks değeri dağılımına sahiptir. Grafen 50 µg/ml grubunda 72. saatten sonra negatif kontrol grubundan 94. saatten sonra da pozitif kontrol grubundan daha düşük değerler gözlenmiştir. Grafen 100 µg/ml grubu negatif kontrol grubundan daha düşük hücre indeks değerine sahip olup 85. saatten sonra pozitif kontrol grubundan da düşük değerler sergilemiştir.



Şekil 4.5. 96 saatlik grafen xCELLigence sonuçları (ilaçlar ve kimyasallar 24 saat sonunda kültür ortamına eklenmiştir).



Şekil 4.6. Saatteki hücre indeks değerleri ve pozitif kontrol grubuna kıyasla her bir gruba ait hücre indeks değerleri dağılımı

Tablo 4.3. Materyallerin negatif kontrol grubuna kıyasla materyaller eklendikten sonraki 24, 48 ve 72 saatteki xCELLigence hücre indeks sonuçları

Materyal	Relative Hücre İndeksi (CI)		
	24 saat	48 saat	72 saat
Negatif Kontrol	1	1	1
Pozitif kontrol	1.04	1.36	1.1
Biodentine™ 2 µg/ml	1.13	1.5	1.28
Biodentine™ 4 µg/ml	1.11	1.42	1.24
Biodentine™ 8 µg/ml	1.12	1.46	1.01
Biodentine™ 16 µg/ml	1.06	1.11	0.91
Biodentine™ 32 µg/ml	1.06	1.1	0.93
Grafen 6.25 µg/ml	1.14	1.52	1.07
Grafen 12.5 µg/ml	1.13	1.62	1.39
Grafen 25 µg/ml	1.06	1.37	1.11
Grafen 50 µg/ml	1.14	1.34	0.97
Grafen 100 µg/ml	1.04	1.13	0.88

DPSC üzerine uygulanan materyallerin farklı dozlarının negatif kontrol grubuna göre standardize edilmiş 24., 48. ve 72. saatteki hücre indeks değişimleri Tabloda 4.3.'de verilmiştir. 48. saatteki Biodentine™ 2 µg/ml, Biodentine™ 4 µg/ml ve Biodentine™ 8

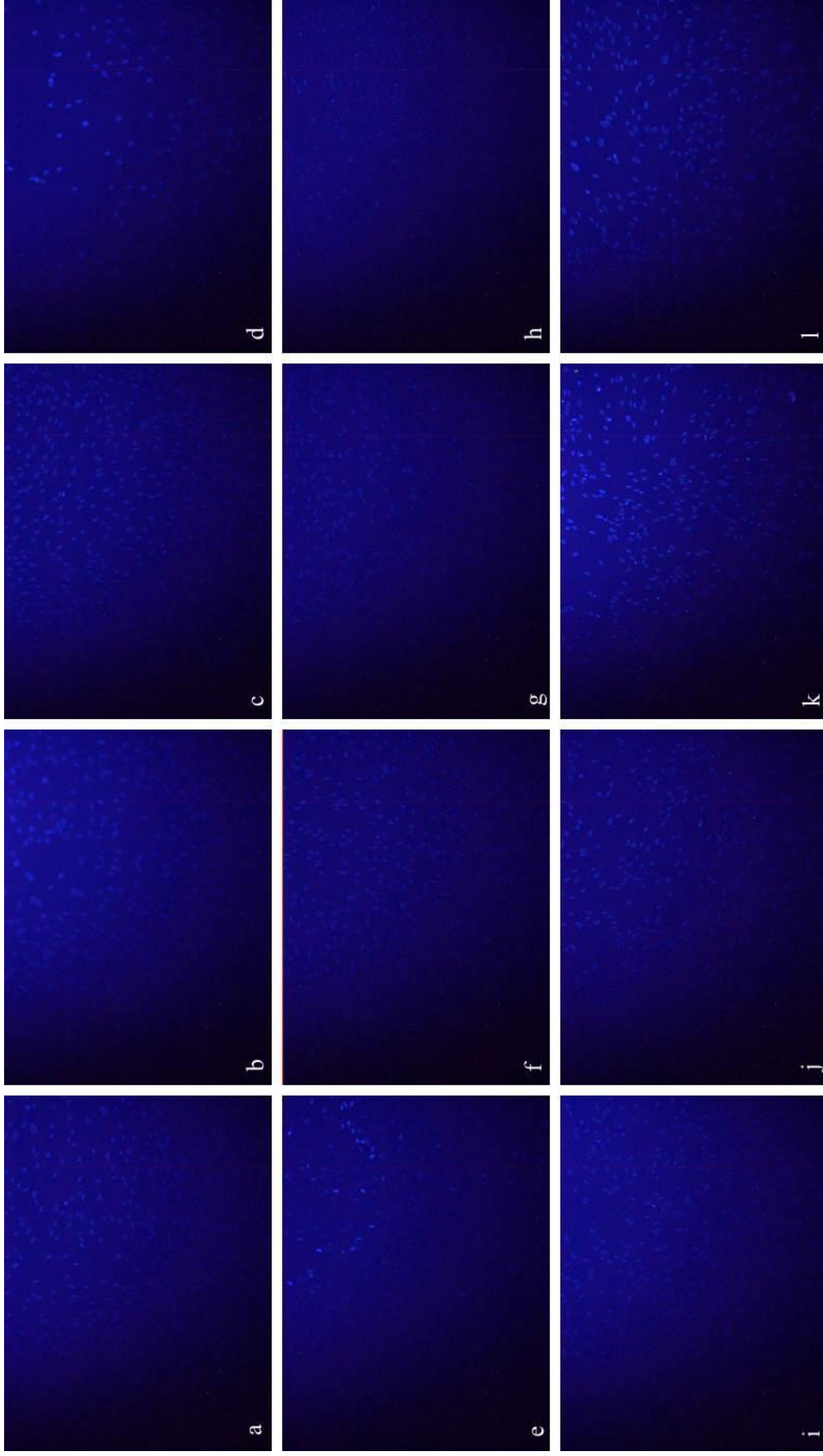
$\mu\text{g/ml}$ grupları ile grafen 6.25 $\mu\text{g/ml}$ ve grafen 12.5 $\mu\text{g/ml}$ grupları yüksek hücre indeks değerlerine sahip oldukları gözlenmektedir. 72. saat sonunda ise Biodentine™ 2 $\mu\text{g/ml}$, Biodentine™ 4 $\mu\text{g/ml}$ ve grafen 12.5 $\mu\text{g/ml}$ grupları diğer gruplardan daha yüksek hücre indeks değerleri sergilemişlerdir.

4.4. İmmunfloresan İnceleme

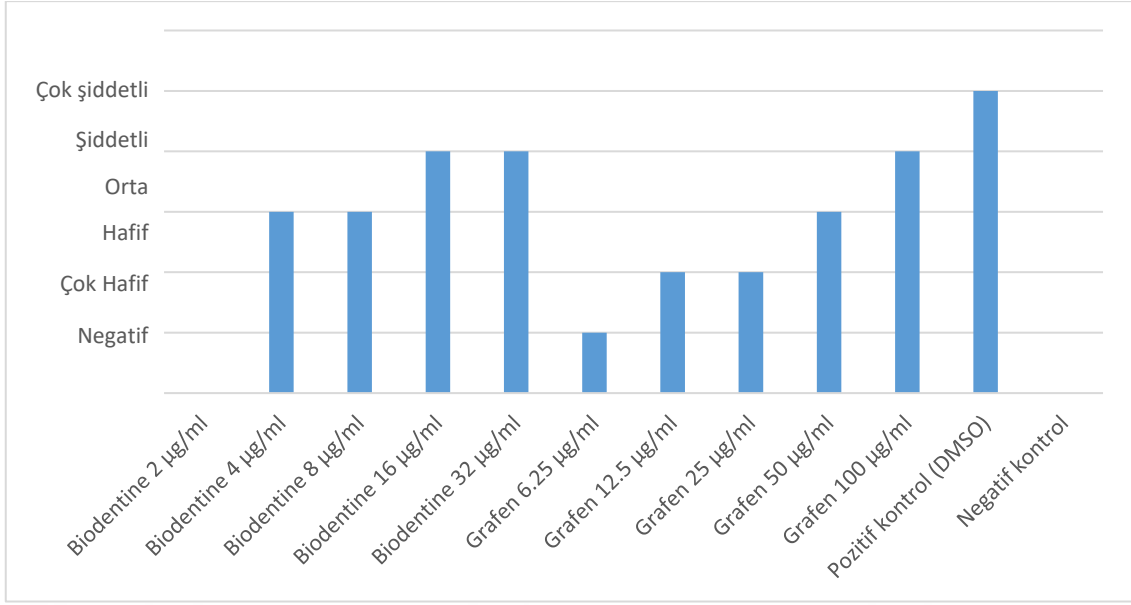
Deney gruplarının DPSC hücre hattındaki 8 OHdG immunfloresans boyama görüntülerinin boyama sonucu immün pozitifliklerine göre değerlendirilmesi Tablo 4.4.'de verilmiştir (Şekil 4.7. ve 4.8.). Oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8 OHdG immunfloresans boyama miktarı en fazla pozitif kontrol grubunda çok şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Uygulanan materyal gruplarının bütün dozlarında pozitif kontrol grubundan daha düşük immünfloresans boyama mevcut olup artan dozlarla birlikte immunfloresans boyama miktarının artarak pozitif kontrol grubuna yaklaştığı gözlenmiştir. En başarılı antioksidatif etkiye sahip grup negatif kontrol grubuna benzer negatif boyama gözlenen Biodentine™ 2 $\mu\text{g/ml}$ olmuştur. Grafen materyalinde de en iyi sonuç çok hafif immün boyama sergileyen 6.25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Tablo 4.4. İmmunfloresans görüntülerin değerlendirme skorları

	Skor	Sonuçlar
Biodentine™ 2 $\mu\text{g/ml}$	0	Negatif (-)
Biodentine™ 4 $\mu\text{g/ml}$	3	Orta (+++)
Biodentine™ 8 $\mu\text{g/ml}$	3	Orta (+++)
Biodentine™ 16 $\mu\text{g/ml}$	4	Çok şiddetli (+++++)
Biodentine™ 32 $\mu\text{g/ml}$	4	Çok şiddetli (+++++)
Grafen 6.25 $\mu\text{g/ml}$	1	Çok Hafif (+)
Grafen 12.5 $\mu\text{g/ml}$	2	Hafif (++)
Grafen 25 $\mu\text{g/ml}$	2	Hafif (++)
Grafen 50 $\mu\text{g/ml}$	3	Orta (+++)
Grafen 100 $\mu\text{g/ml}$	4	Şiddetli (+++++)
Pozitif kontrol	5	Çok şiddetli (+++++)
Negatif Kontrol	0	Negatif (-)



Şekil 4.7. DPSC hücre hattında Biodentine™ (a. 2, b. 4, c. 8, d. 16 ve e. 32 µg/ml dozları), grafen (f. 6.25, g. 12.5, h. 25, i. 50 ve j. 100 µg/ml dozları) ve kontrol gruplarının (k. DMSO içeren ve l. DMSO içermeyen) 8 OHdG ekspresyonunun immunfloresans görüntüleri.



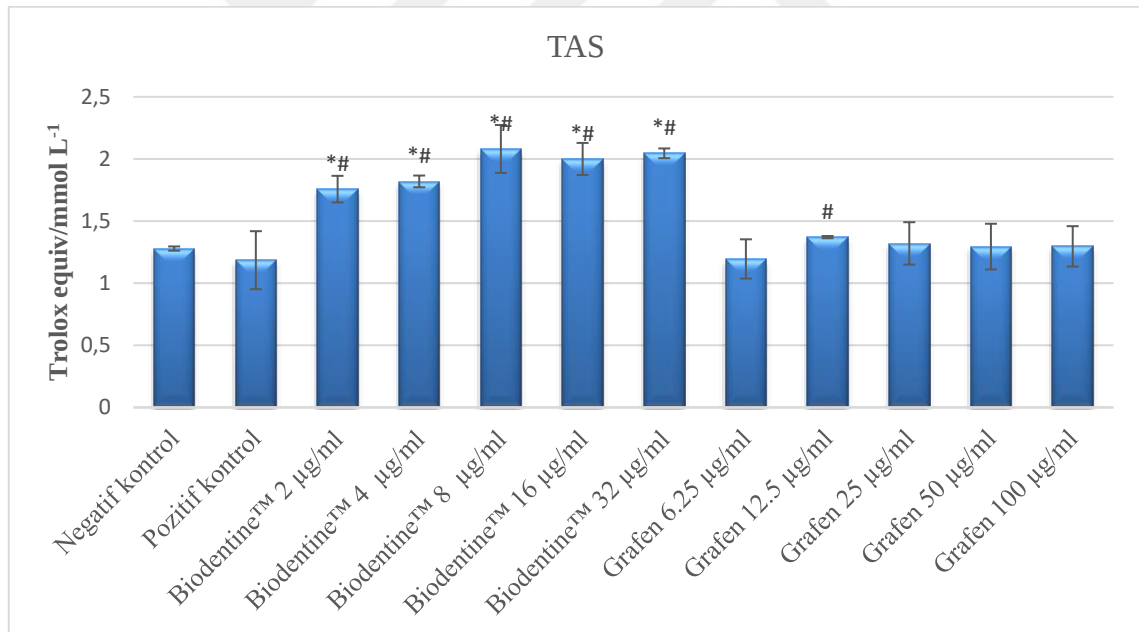
Şekil 4.8. Deney gruplarının DPSC hücre hattındaki 8 OHdG immunfloresans boyama görüntülerinin değerlendirme skorları

4.5. TAS Analizi

DPSC üzerine farklı dozlarda Biodentine™ ve grafen uygulamalarının 24 saat sonundaki antioksidan seviyeleri TAS analiz yöntemi ile belirlenmiş ve Tablo 4.5’de gösterilmiştir (Şekil4.9). Çalışma gruplarımızdaki materyallerin hepsi kontrol gruplarından yüksek antioksidan seviyeye sahip olup sadece grafen 6.25 µg/ml grubu negatif kontrol grubundan düşük ortalama antioksidan seviyeye sahiptir. Biodentine™’nin bütün dozlarının kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek antioksidan seviyeye sahip olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Grafen gruplarında ise sadece grafen 12.5 µg/ml grubunda pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Biodentine™’nin bütün dozlarının grafen grupları içerisinde en yüksek antioksidan seviyesine sahip 12.5 µg/ml grubundan yüksek antioksidan seviyeye sahip olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.5. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen TAS analizi sonuçları

Grup	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Negatif kontrol	1.3 $\pm$ 0
Pozitif kontrol	1.2 $\pm$ 0.2
Biodentine™ 2 μ g/ml	1.8 $\pm$ 0.1
Biodentine™ 4 μ g/ml	1.8 $\pm$ 0
Biodentine™ 8 μ g/ml	2.1 $\pm$ 0.2
Biodentine™ 16 μ g/ml	2 $\pm$ 0.1
Biodentine™ 32 μ g/ml	2 $\pm$ 0
Grafen 6,25 μ g/ml	1.2 $\pm$ 0.2
Grafen 12,5 μ g/ml	1.4 $\pm$ 0
Grafen 25 μ g/ml	1.3 $\pm$ 0.2
Grafen 50 μ g/ml	1.3 $\pm$ 0.2
Grafen 100 μ g/ml	1.3 $\pm$ 0.2



Şekil 4.9. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının 24 saatlik TAS analizi sonuçları

* p<0,05 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # p<0,05 pozitif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

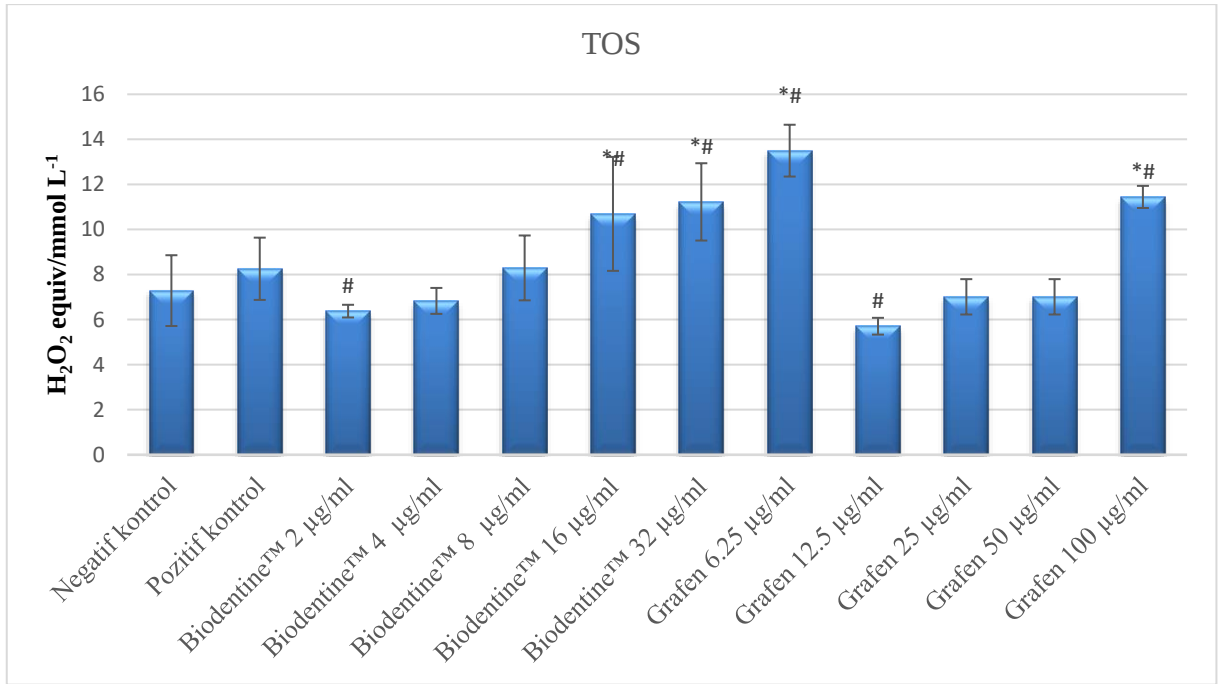
4.6. TOS Analizi

DPSC üzerine farklı dozlarda Biodentine™ ve grafen uygulamalarının oksidan seviyeleri TOS analiz yöntemi ile 24 saat sonunda belirlenmiş ve Tablo 4.6.'da gösterilmiştir (Şekil 4.10.). Biodentine™ gruplarının dozları arttıkça ortalama oksidan

seviyesi miktarında da bir artış gözlenmiştir. Grafenin en yüksek ve en düşük dozlarında en yüksek ortalama oksidan seviyesi izlenmiştir. Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarının pozitif kontrol grubuna göre daha düşük oksidan seviye sergilemesi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Biodentine™ 16 µg/ml, Biodentine™ 32 µg/ml, grafen 6.25 µg/ml ve grafen 100 µg/ml gruplarının kontrol gruplarından yüksek ortalama oksidan seviyesine sahip olmaları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). En düşük oksidan seviyeye sahip Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarının ortalama oksidan seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.34$).

Tablo 4.6. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen TOS analizi sonuçları

Grup	Ortalama ± Standart Sapma
Negatif kontrol	7.3 ± 1.6
Pozitif kontrol	8.3 ± 1.4
Biodentine™ 2 µg/ml	6.4 ± 0.3
Biodentine™ 4 µg/ml	6.8 ± 0.6
Biodentine™ 8 µg/ml	8.3 ± 1.4
Biodentine™ 16 µg/ml	10.7 ± 2.5
Biodentine™ 32 µg/ml	11.2 ± 1.7
Grafen 6.25 µg/ml	13.5 ± 1.1
Grafen 12.5 µg/ml	5.7 ± 0.4
Grafen 25 µg/ml	7 ± 0.8
Grafen 50 µg/ml	7 ± 0.8
Grafen 100 µg/ml	11.4 ± 0.5



Şekil 4.10. Kontrol, Biodentine™ ve grafen gruplarının TOS analizi sonuçları

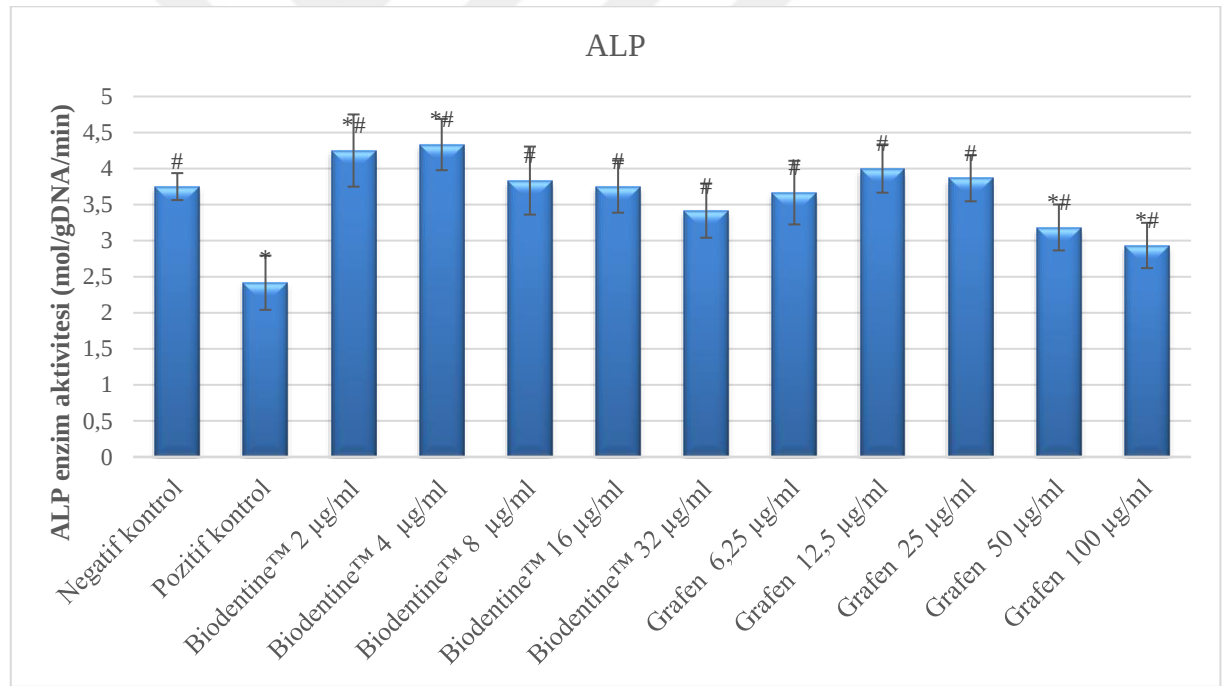
* p<0,05 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # p<0,05 pozitif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

ALP Testi

Biodentine™ ve grafenin farklı dozlarının DPSC üzerindeki odontojenik aktiviteleri, odontojenik farklılaşmanın bir belirteci olan ALP aktivite testi ile belirlenmiş ve sonuçları Tablo 4.7.'de verilmiştir. (Şekil 4.11.). Materyaller incelendiğinde Biodentine™ 4 µg/ml ve grafende ise 12.5 µg/ml dozlarından sonra artan dozla birlikte ALP enzim aktivitesinde bir azalma gözlenmiştir. Çalışma gruplarının tamamında ALP enzim seviyelerinin pozitif kontrol grubundan daha yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmuştur (p<0.05). Biodentine™ 2 µg/ml ve Biodentine™ 4 µg/ml gruplarının her iki kontrol grubundan da yüksek ortalama ALP enzim seviyelerine sahip olması istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). Grafen 50 µg/ml ve grafen 100 µg/ml grupları ise negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak daha düşük ortalama ALP enzim seviyelerine sahiptir (p<0.05). En yüksek ALP enzim aktivitesi sergileyen Biodentine™ 4 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarının ortalama ALP enzim seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=0.16).

Tablo 4.7. DPSC hücrelerinde 24 saat sonra elde edilen ALP analizi sonuçları

Grup	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Negatif kontrol	3.8 $\pm$ 0.2
Pozitif kontrol	2.4 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 2 μ g/ml	4.3 $\pm$ 0.5
Biodentine™ 4 μ g/ml	4.3 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 8 μ g/ml	3.8 $\pm$ 0.5
Biodentine™ 16 μ g/ml	3.8 $\pm$ 0.4
Biodentine™ 32 μ g/ml	3.4 $\pm$ 0.4
Grafen 6.25 μ g/ml	3.7 $\pm$ 0.4
Grafen 12.5 μ g/ml	4 $\pm$ 0.3
Grafen 25 μ g/ml	3.9 $\pm$ 0.3
Grafen 50 μ g/ml	3.2 $\pm$ 0.3
Grafen 100 μ g/ml	2.9 $\pm$ 0.3



Şekil 4.11. Çalışma ve kontrol gruplarının ALP enzim aktivite değerleri.

* p<0.05 negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık, # p<0.05 pozitif kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

5. TARTIŞMA

Diş hekimliğinde pulpanın canlı olarak korunmasına yönelik olan vital pulpa tedavileri dişin uzun süre ağızda kalmasını sağlayan önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Vital pulpa tedavilerinin amacı odontoblast adı verilen özel hücrelerden meydana gelen ve mezenkimal orjinli bir doku olan pulpa dokusunu içeren pulpa- dentin kompleksinin canlılığının korunmasıdır. Bu tez çalışmasında grafenin dental pulpa kök hücreleri üzerindeki rejeneratif kapasitelerinin test edilmesi ve vital pulpa tedavilerinde kullanılan materyallere alternatif olup olamayacağının ortaya konulması amaçlanmıştır. Restoratif dental materyallerin toksik etkilerinin yanı sıra enflamasyonu sınırlandırma ve tersiyer dentinogenezis mekanizmasını indüklemeye yetenekleri ile dokular üzerindeki biyoaktivitelerinin incelenmesi de oldukça önemlidir.¹¹⁹ Çalışmamızda çocukların dental tedavileri arasında büyük öneme sahip vital pulpa tedavilerinde direkt veya indirekt pulpa kuafajı amacıyla kullanılan Biodentine™ ve kök hücrelerin farklılaşmasını etkileyen grafen materyalinin insan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma kapasiteleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Çalışma materyallerinden Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml'lik konsantrasyonlarında insan DPSC'si üzerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Biodentine™ trikalsiyum silikat (Ca_3SiO_5) esaslı inorganik restoratif ticari bir simandır ve 'biyoaktif dentin' olarak tanıtılmaktadır. Materyalin, MTA ve Bioagregat gibi diğer trikalsiyum silikat simanlarına kıyasla daha iyi fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olduğu iddia edilmektedir.⁸¹ Biodentine™, kök perforasyonları, apeksifikasyon, rezorpsiyonlar, retrograd dolgular, pulpa kuafaj prosedürleri ve dentin replasmanı gibi çeşitli klinik uygulamalarda kullanılır. Biodentine™'nin biyoyumluluğu ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmaların verilerine göre genellikle sitotoksik bulunmamıştır.⁷⁵ Son yıllarda, karbon nanotüpler, grafen ve bor nitrid nanotüpler dahil olmak üzere düşük

boyutlu nanomalzemelere olan ilgi, uygun biyouyumlulukları, geniş yüzeye özgü alanları ve yüksek mekanik özellikleri nedeniyle artmıştır.¹²⁰ Grafen konjuge sp^2 karbon atomlarından oluşan tek bir atomik tabakadır. Grafen, karbon atomları arasındaki bağların esnekliği nedeniyle şu ana kadar var olan en ince, en güçlü ve en sert malzeme olabilir.¹²¹ Grafen, biyomalzemelerin fiziksel, mekanik ve biyolojik özelliklerini geliştirmek için kullanılabilir.¹²²⁻¹²⁴ Kolayca işlevselleştirilebildiği için, grafen ayrıca biyomedikal uygulamalarda (örneğin biyosensörler, ilaç ve gen dağıtımı için nano taşıyıcılar ve hücre görüntüleme ve kanser için fototerapi cihazları) kullanılmaya başlanmıştır. Grafen nispeten saf bir biçimde sentezlenebildiğinden ve ayarlanabilir bir yüzey sunduğundan, mezenkimal kök hücreler, nöronal kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler ve diğerleri gibi hücrelerle deneyler için ilginç bir substrat olarak ortaya çıkmıştır.^{105,125-127} Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda bu iki materyali kullanarak hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından insan DPSC'si üzerindeki etkilerini araştırdık.

Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyaller, ağız içinde farklı dokular (dil, periodonsiyum, yanak, mine, pulpa- dentin kompleksi) ile temas halindeyken çeşitli lokal reaksiyonlar oluşturabilmektedir. Restoratif materyaller üzerinde yapılan biyouyumluluk araştırmaları sonucunda dokularda meydana gelebilecek lokal toksik etkiler değerlendirilebilmektedir. Materyallerin canlı dokularla temas halindeyken sistemik veya lokal toksisite (karsinojenik, alerjik ve mutajenik etkiler gibi doku reaksiyonları) göstermemesi olarak tanımlanan biyouyumluluk materyalin fonksiyonuna, tipine ve uygulandığı bölgeye göre farklılık göstermektedir.^{52, 54} Özellikle çocuklardaki dental ve orofasiyal sorunların çözümünü amaçlayan çocuk diş hekimliğinde restoratif amaçla kullanılan, dokularla direkt veya indirekt olarak temas halinde bulunan materyallerin biyouyumlu olması gerekmektedir. Diğer yandan diş hekimliğinde kullanılan restoratif

materyallerin mekanik özellikleri hakkında oldukça fazla literatür bilgisi mevcutken, biyolojik etkileri hakkındaki veriler nispeten sınırlıdır.¹²⁸

Diş hekimliğine ilişkin araştırmalarda dental pulpa, apikal papilla, kemik iliği, periost, tükürük bezi ve yağ dokusu kaynaklı kök hücreler kullanılmakta olup yeni materyallerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla farklılaşma yeteneği bakımından farklı hücre popülasyonu içeren ve dentin tamirinde rol oynayan DPSC'lerden sıklıkla yararlanılmaktadır.^{129, 130} Gronthos ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada üçüncü büyük azı dışından elde edilen DPSC hücrelerinin in vitro ortamda osteoblastik ve kondrositik hücrelere, in vivo ortamda ise odontoblastik hücrelere farklılaştığı belirtilmiştir.⁴⁵ Genel olarak kök hücrelerin rejenerasyon ve farklılaşma yetenekleri bulunmaktadır. DPSC 'nin esas görevi ise hasar görmüş dişlerde rejenerasyon yeteneğini kullanarak bulunduğu dokuyu onarmak ve dokunun devamlılığını sürdürmektir. Ayrıca DPSC'nin elde edilmesinin kolay olması, etik açıdan problem yaratmaması, tekrar kullanılmasının mümkün olması gibi avantajları mevcuttur.^{22, 32} Çalışmamızda da endodontik amaçlı kullanılması planlanan Biodentine™ ve grafenin pulpa dokusu üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla DPSC'ler üzerinde çalışılmıştır.

Günümüzde yeni bir materyalin biyoyumluluğunun belirlenmesi amacıyla in vitro testler, hayvan deneyleri ve in vivo testler (kullanım testleri) yapılmaktadır. Hayvan deneyleri ve in vivo testleri maliyetli olduklarından ve uzun zaman gerektirdiğinden dolayı dental restoratif materyallerin in-vitro koşullardaki biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde genellikle hücre kültürü çalışmaları kullanılmaktadır.^{52, 53}

Sitotoksisite, uygulanan materyalin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrenin yapısında ve fonksiyonunda meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır.³ Bir materyalin sebep olduğu hücre ölümü, materyale maruz kalmadan önceki ve sonraki

hücre sayısı ölçülerek değerlendirilmektedir.⁵² Sitotoksosite testleri hücre canlılığı, ölümü, organelleri, bölünmesi, membranı ve protein veya DNA sentezi, hakkında detaylı bilgiler verir.^{2, 131} Bu testler dört ana başlık altında toplanabilir: Canlılığı değerlendiren testler (nötral kırmızı testi, tripan mavisi testi, floresan metodu), hücre çoğalmasını değerlendiren testler (bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik, 3H-timidin test), metabolik sitotoksosite değerlendirme testleri (MTT testi, alamar mavisi testi, LDH testi) ve yaşamı değerlendiren testler (düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyinin belirlenmesi).^{2, 132} Bu çalışmada da dental materyallerin sitotoksitesinin belirlenmesinde MTT testi, LDH analizi ve xCELLigence® sistemi kullanılmıştır. Kullanılan materyallerin sitotoksosite sonuçlarının belirlenmesinde MTT testi ve LDH analizi sonuçları birbirlerini desteklemeleri amacıyla yapılmıştır. xCELLigence® sistemi ise gerçek zamanlı hücre indeksini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır.

MTT gibi geleneksel yöntemlerde hücre çoğalması ve hücre ölümleri belirlenirken, hücrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak biyokimyasal ölçümler yapılmaktadır. Günümüzde hücre kültüründe meydana gelen hücre çoğalmaları ve ölümleri, eş zamanlı ve devamlı bir şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin (empedans) belirlenmesiyle xCELLigence® gibi sistemlerden yararlanılarak ölçülebilmektedir.¹³³ MTT ve LDH analizlerinin 24-48 ve 72 saatlik sonuçlarını kesitsel olarak almak yerine hücre canlılığını gerçek zamanlı olarak takip eden bir test yöntemi olan xCELLigence® analizi kullanımı tercih edildiği için MTT ve LDH analizlerinin sadece 24 saatlik test sonuçları elde edilmiştir.

Mosmann tarafından ilk kez 1983 yılında uygulanan MTT testi, sitotoksitenin değerlendirilmesi için diş hekimliğinde sık kullanılan pratik bir metottur.¹³⁴⁻¹³⁶ Mitokondri fonksiyonu hasar görmemiş canlı hücrelerin boyanma esasına dayanan MTT testinin temelinde mitokondriyal dehidrogenaz enziminin canlı hücrelerde sarı renkli suda

çözünebilir bir maddeyi, koyu mavi renkli formazan kristallerine dönüştürme söz konusudur.^{62, 137} Basit ve kolay ulaşılabilir bir test yöntemi olan MTT analizinde oluşan formazan kristallerinin miktarı, canlı hücre miktarıyla doğrudan orantılıdır.^{138, 139} Bu çalışmada da hücre çoğalması ve sitotoksitenin değerlendirilmesi konusunda hassas ve kullanışlı bir yöntem olan MTT testi kullanılarak Biodentine™ ve grafenin DPSC üzerindeki biyouyumluluğu değerlendirilmiştir.¹⁴⁰

Zanini ve ark.¹⁴¹ ölümsüzleştirilmiş fare dental pulpa kök hücreleri (OD-21) üzerine 1mg/ml konsantrasyonundaki Biodentine™ eklendikten sonraki 2. günde MTT testi ile değerlendirilen hücre canlılığında bir düşüş olduğunu, 3. ve 5. günlerde ise bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar 2. gündeki düşüşün sebebinin pH artışının fazla olmasına ve ortama salınan Ca^{+2} iyonlarının toksik etkiye neden olmasına bağlamışlardır. Araştırmacıların sonuçlarından farklı olarak bu çalışmadaki xCELLigence analizine göre hücre indeksinde ilk 48 saatte bir artış, 72. saate doğru ise bir azalış gözlenmesinde çalışmamızda kullanılan Biodentine™'nin daha düşük konsantrasyonda olması ve OD-21 yerine insan DPSC'sinin kullanılmış olması etkili olmuş olabilir.

Perard ve ark.¹⁴² Biodentine™ ve MTA'nın sitotoksitelerini değerlendirmiş ve bu iki materyalin de biyouyumluluklarının kabul edilebilir düzeyde olduğundan söz etmişlerdir. Saberi ve ark.¹⁴³ Biodentine™, kalsiyumla zenginleştirilmiş karışım, oktakalsiyum fosfat ve MTA materyallerinden 1mg insert membran yöntemi ile insan gingival fibroblast hücrelerine eklemişlerdir. Bu materyallerin hücre canlılığına olan etkilerini MTT analizi ile 1., 2. ve 7. günlerde değerlendirmişlerdir. 24. ve 48. saatteki ölçümlerde tüm materyaller kontrol grubuyla benzer bulunmuş, sadece 7. günde Biodentine™ ve MTA grupları kontrol grubundan daha düşük sitotoksite sergilemişlerdir. Çalışmamızda 24 saat sonundaki MTT analizi sonucunda Biodentine™

2 µg/ml ve grafen 12,5 µg/ml grupları kontrol grubundan daha düşük sitotoksosite sergilemişlerdir. 72 saat sonraki xCELLigence analizi sonuçlarında da benzer şekilde düşük sitotoksosite değerleri tespit edilmiştir. Saberi ve ark.'nın erken dönemde sitotoksik etki elde etmiş olmalarında kullandıkları Biodentine™'nin konsantrasyonunun yüksek olmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Luo ve ark.¹⁴⁴ MTT analizi yöntemiyle DPSC üzerine eklenen Biodentine™'nin 0.02, 0.2, 2 ve 20 mg/ml'lik dozlarının hücre çoğalması üzerine etkilerini 1, 3, 5 ve 7. günlerde incelemişlerdir. Negatif kontrol grubuna kıyasla tüm ölçüm zamanlarında Biodentine™'nin 0.2 ve 2 mg/ml'lik grupları daha yüksek, 20 mg/ml'lik grubu ise daha düşük hücre çoğalması sergilemiştir. Biodentine™'nin 0,02 mg/ml'lik grubu ise kontrol grubuna kıyasla 1.günde anlamlı bir artış, daha sonraki günlerde ise benzer hücre artışı sergilemiştir. Çalışmamızın 24 saatlik MTT ve LDH analizleri sonucu incelendiğinde Biodentine™ materyali için artan dozlarla beraber hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Çalışmamızda Biodentine™ 16 ve 32 µg/ml grupları negatif kontrol grubuna kıyasla düşük hücre canlılık oranı sergilemiştir. Luo ve ark. Biodentine™'nin 0.02 mg/ml'lik dozu için 1. günde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit ederken, Biodentine™'nin çalışmamızdaki eşdeğer dozları olan 16 ve 32 µg/ml gruplarında ise düşük hücre canlılık oranları gözlenmiştir. Çalışmamızdaki xCELLigence analizi sonucunda hücre indeksinde ilk 48 saatte bir artışı takiben 72. saate doğru gözlenen azalış ise araştırmacıların Biodentine™ 0.02 mg/ml'lik sonuçları ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada Biodentine™'nin daha yüksek dozları da çalışmaya dahil edilmiş olsaydı daha yüksek hücre proliferasyon oranlarının elde edilebileceği düşünülmektedir.

Nikfarjam ve ark.¹⁴⁵ üç farklı (düşük, orta ve yüksek) konsantrasyonda hazırlanan Biodentine™ elüsyonlarının 3. büyük azı dişlerinden izole edilen primer pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki etkisini MTT ve sitozolik LDH aktivite testi ile değerlendirmişlerdir.

Biodentine™'nin bütün elüsyonları LDH aktivite testi sonucunda negatif kontrol grubuna benzer bulunmuştur. 24 saat sonraki MTT testi sonucunda ise kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı Biodentine™'nin düşük konsantrasyonunda artmış, yüksek konsantrasyonda ise azalmıştır. 48 ve 72 saat sonraki MTT testi sonuçlarında ise sadece düşük konsantrasyondaki Biodentine™ hücre canlılığını arttırmıştır. Bizim çalışmamızın 24 saatlik sonuçlarına göre Biodentine™'nin artan dozuyla birlikte hücrenin morfolojik bütünlüğünü belirten LDH aktivitesinin arttığı, hücre canlılığını belirten MTT sonuçlarının ise azaldığı görülmüştür. xCELLigence analizi sonuçlarımıza göre ise 72 saat boyunca Biodentine™'nin düşük dozlarında kontrol grubuna kıyasla yüksek hücre indeksi skorları elde edilmiş ancak, Biodentine™'nin yüksek dozlarında 72. saate doğru kontrol grubuna kıyasla düşük skorlar gözlenmiştir. Nikfarjam ve ark.'nın¹⁴⁵ sonuçlarına benzer şekilde bizim çalışmamızda da Biodentine™'nin artan dozlarında sitotoksik etkiler tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki grafen 12.5 µg/ml grubunun Biodentine™ 2 µg/ml grubuna benzer şekilde 24 saat sonundaki MTT ve LDH sonuçları doğrultusunda pozitif kontrol grubundan daha az sitotoksikite sergilediği belirlenmiştir.

Serbest radikal (hidrojen peroksit, süper oksit veya hidroksil radikali) olarak da bilinen ROM'ların çok miktarda olmasının hücre ve dokulara zarar verme olasılığı bulunmaktadır. Antioksidanlar aracılığıyla ROM oluşumu engellenmekte, uzaklaştırılmakta veya ortadan kaldırılarak oksidatif strese bağlı doku hasarı en aza indirilmektedir. Ancak hücrenin prooksidan kapasitesi antioksidan kapasitesini aştığında oksidatif stres meydana gelmektedir.^{5, 135} Oksidatif stres son yıllarda toksisitenin bir mekanizması olarak kabul gördüğünden sitotoksikite değerlendirme testleri arasındaki yerini almıştır.⁸ Bu tez çalışmasında Biodentine™ ve grafenin DPSC üzerinde oluşturduğu oksidatif stresin belirlenmesi amacıyla TAS ve TOS analizleri yapılmıştır.

Aksu ve Gürbüz¹⁴⁶ çalışmalarında insan DPSC'si üzerine eklenen Biodentine™, ProRoot MTA, Pulpine Mineral, Endo Repair ve çinko oksit öjenol materyallerinin TAS ve TOS verilerini 24 ve 72 saatlik zaman aralıklarında değerlendirmişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla materyallerin TAS sonuçlarında anlamlı artışlar gözlenmiştir. 24 saatlik TOS değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla sadece Biodentine™'de azalış, diğer materyallerde ise bir artış gözlenmiştir. Ancak 24. ve 72 saatteki TOS değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde çalışmamızın 24 saatlik TAS sonuçlarında da grafen 6.25 µg/ml grubu hariç bütün grupların antioksidan seviyesinde artış gözlenmiştir. Biodentine™ ve grafen konsantrasyonlarındaki azalmayla birlikte oksidatif stresin belirlendiği TOS değerleri (grafen 6.25 µg/ml TOS değeri hariç) ve immunfloresans boyamada bir azalış belirlenmiştir. Çalışmamızda Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml grupları kontrol grubuna kıyasla daha az oksidatif stres oluşturdukları için oksidatif stres bakımından daha başarılı bulunmuşlardır. Aksu ve Gürbüz'ün çalışmasında¹⁴⁶ insert membran yöntemi kullanılması sonucu DPSC'ler daha yüksek konsantrasyondaki Biodentine™'e maruz kaldığından, çalışmamızda onların sonuçlarının aksine daha düşük oksidatif stres olduğu düşünülmektedir.

Pulpa kuafajı materyali olarak kullanılan Biodentine™'nin odontoblastik tabakanın kısmi hasarında pulpa iyileşmesini olumlu etkilediğini belirten birçok çalışma mevcuttur. Fakat bu konuyla ilgili DPSC üzerinde yapılan yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.^{141, 147-149} Daltoe ve ark.¹⁵⁰ Biodentine™ ve MTA'nın 1:100'lük dilüsyonlarının, pulpa hücrelerinin ALP ekspresyonu üzerindeki etkisini 24 ve 48 saatte incelemişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla MTA ve Biodentine™'nin ALP değerleri üzerindeki etkisi 24. saatte benzer bulunmuş, 48. saatte ise gen ekspresyonunun indüklediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın 24 saatlik sonuçlarında da Biodentine™ ve grafenin bütün dozları pozitif kontrol grubundan yüksek ALP ekspresyonu sergilemiştir.

Karkehabadi ve ark.¹⁵¹ çalışmalarında çekilmiş insan dişinin apikal papillasından elde edilen kök hücreler üzerine eklenen Emdogain, Biodentine™ ve Emdogain+Biodentine™ kombinasyonunun kök hücrelerinin çoğalmasını (MTT analizi) ve ALP aktivitesini (ALP boyama kiti kullanarak) 24. ve 72. saatte değerlendirmişlerdir. 24. ve 72. saatteki MTT ölçümleri sonucu Emdogain dışındaki gruplarda kontrol grubundan düşük hücre çoğalması tespit edilmiştir. Deney gruplarının her iki ölçüm zamanındaki ALP aktivitesinde de kontrol grubuna kıyasla bir artış tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise grafen ve Biodentine™ için MTT sonuçlarından bağımsız olarak yüksek ALP enzim aktivitesi gözlenmiştir. MTT sonuçlarındaki farklılığın Karkehabadi ve ark.'nın yüksek konsantrasyonda Biodentine™ kullanımlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek antioksidan özellik sergileyen Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml grupları DPSC üzerinde proliferatif etki sergilemiştir. Benzer şekilde yüksek oksidatif stres oluşturan Biodentine™ 16 ve 32 µg/ml ile grafen 100 µg/ml gruplarında sitotoksik etkiler tespit edilmiştir. Bu bulgular oksidatif stresin bir toksisite mekanizması olduğunu öneren Mercan'ın⁸ sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Corral Nunez ve ark.¹⁵² 3. büyük azı dişlerinden izole edilen DPSC'ler üzerinde Biodentine™, %2 biyoaktif cam nanopartikülleri eklenmiş Biodentine™ (nB), %5 nB ve cam iyonomer simanın ALP aktivitesini 7. ve 14. günde değerlendirmişlerdir. 7. günde %2 nB ve %5 nB grupları, 14. günde ise cam iyonomer dışındaki bütün gruplar kontrol grubundan daha yüksek ALP aktivite değeri sergilemişlerdir. Bizim çalışmamızda da grafen ve Biodentine™'nin 24 saat'lik ALP enzim aktivitesinin pozitif kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda odontojenik farklılaşma bakımından Biodentine™'nin yanı sıra grafenin de etkili olduğu düşünülmektedir.

Literatürde grafenin osteojenik farklılaşmayı indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur.^{102, 124, 153} Xie ve ark.¹⁵⁴ yaptıkları bir çalışmada grafenin DPSC üzerinde odontojenik farklılaşmayı MSX-1, PAX-6 ve DMP-1, osteojenik farklılaşmayı da RUNX, COL-1 ve OCN biyomarkerları üzerinden 14 ve 28 gün sonunda değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında grafenin DPSC üzerinde odontojenikten ziyade osteojenik farklılaşmayı indüklediğini bulmuşlardır. Araştırmacılardan farklı olarak çalışmamızda grafenin gibi Biodentine™'nin de bütün dozlarının DPSC üzerinde odontojenik farklılaşmayı belirten ALP enzim aktivitesi üzerinde indükleyici etkisi olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın araştırmacıların çalışmalarında petri kabının altını grafen ile kaplamaları sebebiyle DPSC'lerin daha yüksek miktardaki grafene maruz kalmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda osteojenik aktiviteyi belirlemeye yönelik bir biyobelirteç bulunmadığı için osteojenik aktivite üzerindeki farklılıkları hakkında bir yorum yapmamız uygun olmayacaktır.

MTT ve xCELLigence testleri sonucunda Biodentine™ 2 µg/ml ve Biodentine™ 4 µg/ml grubunun insan DPSC'si üzerine sitotoksisteyi azaltıp hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Sitotoksitenin diğer belirteci olan LDH testine göre de Biodentine™ 2,4 ve 8 µg/ml grupları pozitif kontrol grubuna kıyasla hücre zarının bütünlüğü daha az gördüğü için daha az sitotoksik etki gözlenmiştir. TAS, TOS ve immunofloresans boyama sonucunda Biodentine™ 2 µg/ml ve Biodentine™ 4 µg/ml grupları insan DPSC'si üzerinde daha düşük oksidatif strese neden olduğu ve antioksidan etkiyi arttırdıkları tespit edilmiştir. ALP enzim aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda Biodentine™'nin bütün konsantrasyonlarının pozitif kontrol grubuna kıyasla daha fazla odontojenik farklılaşmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında “Biodentine™'nin insan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve

odontojenik farklılaşma bakımından etkisi bulunmamaktadır.” şeklinde kurulan hipotez 1 reddedilmiştir.

MTT, LDH ve xCELLigence testleri sonucunda grafenin insan DPSC’si üzerinde olumlu ve olumsuz sitotoksik etkileri olduğu gözlenmiştir. Oksidatif stres belirteçleri olan TAS ve TOS sonuçları doğrultusunda sadece grafen 12.5 µg/ml grubu pozitif kontrol grubundan farklı bulunmuştur. İmmunfloresans boyama yöntemi sonucunda ise bütün grafen grupları pozitif kontrol grubundan daha düşük oksidatif etki sergilemiştir. ALP enzim aktivitesinin değerlendirilmesi sonucunda grafenin bütün konsantrasyonlarının pozitif kontrol grubuna kıyasla daha fazla odontojenik farklılaşmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda “Grafenin insan DPSC’si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından etkisi bulunmamaktadır.” şeklinde kurulan hipotez 2 reddedilmiştir.

Sitotoksikite (MTT, LDH ve xCELLigence), oksidatif stres (TAS, TOS ve immunfloresans boyama) ve odontojenik farklılaşmanın (ALP) belirlenmesi için yapılan testlerde Biodentine™ ve grafen grupları içerisinde en etkili bulunan gruplar Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml konsantrasyonlarının MTT, TOS ve ALP analizlerinin sonuçları bakımından istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Ancak Biodentine™ 2 µg/ml LDH ve TAS analizleri sonucunda daha etkin bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda “İnsan DPSC’si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından Biodentine™ ve grafenin etkili konsantrasyonları arasında farklılık bulunmamaktadır.” şeklinde kurulan hipotez 3 reddedilmiştir.

Doğada var olan en ince, en güçlü ve en sert materyal olduğu ve odontojenik farklılaşmayı indüklediği bilinen grafen DPSC üzerinde Biodentine™’e alternatif olarak

benzer sonuçlar sergilemiştir. Endodontik ajanların veya simanların yapısına mekanik, fiziksel ve biyolojik etkilerini arttırılmasına yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda Biodentine™ ve grafen belirli konsantrasyonlarda proliferatif etki göstermiş olsalarda en güçlü proliferatif etki Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarında, en fazla toksik etki ise grafen 100 µg/ml ve Biodentine™ 16 µg/ml gruplarında gözlenmiştir.
2. Biodentine™'nin bütün dozları, grafen grupları içerisinde ise sadece grafen 12.5 µg/ml yüksek antioksidan etki sergilemiştir.
3. Biodentine™'nin ve grafen grupları içerisinde sadece Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml grupları düşük oksidatif stres oluşturmuşlardır.
4. İmmunfloresan boyama sonucunda Biodentine™ ve grafenin artan dozlarıyla birlikte oksidatif stres seviyesinin arttığı gözlenmiştir.
5. Toksisite mekanizmasında oksidatif stresin olumsuz etkisinin bulunduğu görüşü desteklenmiştir.
6. Çalışmamızda kullanılan Biodentine™ ve grafenin bütün dozları odontojenik farklılaşmaya neden olmuştur.
7. Biodentine™ 2 µg/ml ve grafen 12.5 µg/ml gruplarının insan DPSC'si üzerinde hücre proliferasyonu, oksidatif stres ve odontojenik farklılaşma bakımından olumlu etkileri bulunmuştur.
8. 24 saatlik LDH ve TAS analizleri bakımından Biodentine™ 2 µg/ml grubu grafen 12.5 µg/ml grubundan daha başarılı sonuçlar sergilemiştir.
9. DPSC ile biyouyumlu olan grafen materyali, endodontik ajanların veya simanların yapısına mekanik özelliklerini arttırmak için eklenebilir. Fakat bu hedeflerin gerçekleştirilebilmesi için daha uzun süreli ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.
10. Biodentine™ ve grafenin birlikte DPSC üzerinde kullanıldığı daha uzun süreli ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106: 696-706.
2. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *J Dent Fac Ataturk Univ*, 2011, 2011: 141-149.
3. Murray PE, Garc a Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007, 12: 258-266.
4. Uzun  , Bayındır F. Dental materyallerin biyouyumluluk test yöntemleri. *G  Diş Hek Fak Derg*, 2011, 28: 115-122.
5. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: Changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *J Lab Clin Med*, 1994, 124: 263-273.
6. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 2003, 17: 1195-1214.
7. Tabakoğlu E, Durgut R. Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg*, 2013, 3: 69-75.
8. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin  nemi. *Van Vet J*, 2004, 15: 91-96.
9. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993, 84: 407-412.
10. Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent*, 1987, 57: 1-8.
11. Yazar H, Karaca  R. Diş Hekimliğinde Doku M hendisliği. *ADO Klin Bilim Derg*, 2018, 9: 1601-1608.

12. Çakar N. Embriyodan Erişkin Kök Hücreler. *Bilim ve Teknik*, 2010, 511.
13. Lutolf M, Hubbell J. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 47-55.
14. Assanah F, Khan Y. Cell responses to physical forces, and how they inform the design of tissue-engineered constructs for bone repair: a review. *J Mater Sci*, 2018, 53: 5618-5640.
15. Heath CA. Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 17-19.
16. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 2001, 414: 118-121.
17. Anthony A. RL, Antonios G.M, Robert N. Dental Tissue Engineering. İçinde: Nelson M PCY (editör). *Principles of Regenerative Medicine* Elsevier, 2019: 907-918.
18. Bedir S, Kocabaş F. Rejeneratif biyoloji. <http://www.acikbilim.com/2015/07/dosyalar/rejeneratif-biyoloji.html>. 03 Mart 2022.
19. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*, 2009, 21: 3307-3329.
20. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine, *Regener*. 2008: 1-5.
21. Mason C, Manzotti E. Regen: the industry responsible for cell-based therapies. *Regen Med*, 2009, 4: 783-785.
22. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, 2012, 29: 115-120.
23. Akgün Ö, Polat GG, Altun C. Rejeneratif pulpa tedavilerinde doku mühendisliği uygulamaları. *ADO Klin Bilim Derg*, 2008, 2: 238-244.

24. Oğlakçioğlu S, Pamir T. Çürüğün tüm katmanları ile uzaklaştırılmasını takiben direkt ve indirekt pulpa kuafajı tedavisi: Ön çalışma. *Ege Üniv Diş Hekim Fak Derg*, 2020, 41: 91-98.
25. Ausschill TM, Arweiler NB, Hellwig E, Zamani-Alaei A, Sculean A. Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 2003, 113: 946-952.
26. Oğlakçı B, Arhun N, Tuncer D. Restoratif Diş Tedavisinde Pulpa Kaplamaları. *J Dent Fac Ataturk Univ*, 2016, 26.
27. Bayırlı G, Tanalp J. Kalsiyum Hidroksit Uygulamaları-Calcium Hydroxide Applications. *JIUFD*, 25: 162-168.
28. Önay EO. Endodontide Biyoseramik İçerikli Tamir Materyallerine Güncel Bir Bakış. *ADO Klin Bilim Derg*, 8: 1533-1542.
29. Dörterler OC, Ayhan F. Rejeneratif Endodontik Tedavide Biyomalzeme Seçimi ve Doku Mühendisliği Uygulamaları. *EJOSAT*: 31-42.
30. Hu C-C, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod*, 1998, 24: 744-751.
31. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 452-455.
32. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*, 2008, 12: 113-118.
33. Maria O, Khosravi R, Mezey E, Tran S. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis*, 2007, 13: 11-16.
34. Aktaş Y, Aydoğdu S, Diker E. New horizons in cardiovascular treatment: Cellular cardiomyoplasty and stem cell transplantation. *Anatol J Cardiol*, 2003, 3: 340-347.

35. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
36. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*, 2003, 18: 1489-1493.
37. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *PNAS*, 1989, 86: 3828-3832.
38. Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Anat Rec*, 2005, 233: 496-515.
39. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay R. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 1996, 10: 3129-3140.
40. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *PNAS*, 2003, 100: 2426-2431.
41. Laugwitz K-L, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin L-Z, Cai C-L, Lu MM, Reth M. Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 2005, 433: 647-653.
42. Lemire J, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol*, 1991, 139: 535.
43. Wu M, Wei Y-Q. Development of respiratory stem cells and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 607-613.

44. Niemann C, Watt FM. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol*, 2002, 12: 185-192.
45. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 2000, 97: 13625-13630.
46. Blau HM, Brazelton T, Weimann J. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001, 105: 829-841.
47. Gardner R. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat*, 2002, 200: 277-282.
48. Estrela C, Alencar AHGd, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 2011, 22: 91-98.
49. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998, 353: 821-830.
50. d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*, 2008, 4: 21-26.
51. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*, 2003, 100: 5807-5812.
52. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, 1996, 12: 186-193.
53. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*. 1. Baskı. Verlag Berlin Heidelberg, Springer, 2009: 1-10.
54. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*, 2001, 86: 203-209.
55. Ryu W-S. *Molecular virology of human pathogenic viruses*. Baskı. Academic Press, 2016: 3-20.

56. Mitchell JC, Ferracane JL. Biocompatibility and tissue reaction to biomaterials. In: Sakaguchi RL, Powers JM (eds). *Craig's restorative dental materials-e-book*, 13. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2012: 109-128.
57. Yıldırım ZS, Bakır EP, Bakır Ş, Aydın MS. Dişhekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri. *Selcuk Dent J*, 2017, 4: 162-169.
58. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 2006, 160: 171-177.
59. Jenkins N. *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. Baskı. Springer, 1999: 239-252.
60. Niu Q-x, Zhao C-y, Jing Z-a. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 2001, 251: 11-19.
61. Kılıç K, Kesim B, Sümer Z, Polat Z, Öztürk A. Tam seramik materyallerinin biyouyumluluğunun MTT testi ile incelenmesi. *Sağlık Bilim Derg*, 2010, 19: 125-132.
62. Issa Y, Watts D, Brunton P, Waters C, Duxbury A. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater*, 2004, 20: 12-20.
63. Erkekoğlu P, Baydar T. Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacet Univ J Fac Pharm*, 41: 45-63.
64. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res*, 1977, 56: 1285-1290.
65. Schmalz G, Schweikl H, Eibl M. Growth kinetics of fibroblasts on bovine dentin. *J Endod*, 1994, 20: 453-456.

66. Haeffner-Cavaillon N, Kazatchkine M. Methods for assessing monocytic cytokine production as an index of biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9: 112-115.
67. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *PNAS*, 1973, 70: 2281-2285.
68. Styles J. Mammalian cell transformation in vitro. Six tests for carcinogenicity. *Br J Cancer*, 1978, 37: 931.
69. Çetin İl, Topçul MR. Evaluation of the cytotoxic effect of Ly2109761 on HeLa cells using the xCELLigence RTCA system. *Oncol Lett*, 2019, 17: 683-687.
70. Scrace S, O'Neill E, Hammond EM, Pires IM. Use of the xCELLigence system for real-time analysis of changes in cellular motility and adhesion in physiological conditions. İçinde: *Adhesion Protein Protocols*, Springer, 2013: 295-306.
71. Schweikl H, Hiller K-A, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhäuser S, Wiecek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*, 2005, 26: 1713-1719.
72. Powers JM. Craig's restorative dental materials. *Mechanical properties*, 2006: 51-96.
73. Browne R. Animal tests for biocompatibility of dental materials—relevance, advantages and limitations. *J Dent*, 1994, 22: S21-S24.
74. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2008, 106: 609-614.
75. Malkondu Ö, Kazandağ MK, Kazazoğlu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*, 2014, 2014.

76. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*, 2010, 36: 400-413.
77. Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater*, 2005, 21: 731-738.
78. Priyalakshmi S, Ranjan M. Review on Biodentine-a bioactive dentin substitute. *J Dent Med Sci*, 2014, 13: 51-57.
79. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*, 2013, 29: e20-e28.
80. Kayahan MB, Nekoofar MH, McCann A, Sunay H, Kaptan RF, Meraji N, Dummer PM. Effect of acid etching procedures on the compressive strength of 4 calcium silicate-based endodontic cements. *J Endod*, 2013, 39: 1646-1648.
81. Rajasekharan S, Martens L, Cauwels R, Verbeeck R. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent*, 2014, 15: 147-158.
82. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent*, 2013, 41: 600-610.
83. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 1999, 20: 1-25.
84. Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B. Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *J Endod*, 2015, 41: 1862-1866.

85. Vallés M, Roig M, Duran-Sindreu F, Martínez S, Mercadé M. Color stability of teeth restored with Biodentine: a 6-month in vitro study. *J Endod*, 2015, 41: 1157-1160.
86. Keskin C, Demiryurek EO, Ozyurek T. Color stabilities of calcium silicate-based materials in contact with different irrigation solutions. *J Endod*, 2015, 41: 409-411.
87. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod*, 2015, 41: 1139-1145.
88. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: review of literature with a comparative analysis. *JCDR*, 2017, 11: ZG01.
89. Koubi S, Elmerini H, Koubi G, Tassery H, Camps J. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent*, 2012, 2012.
90. Raju VG, Venumbaka NR, Mungara J, Vijayakumar P, Rajendran S, Elangovan A. Comparative evaluation of shear bond strength and microleakage of tricalcium silicate-based restorative material and radioopaque posterior glass ionomer restorative cement in primary and permanent teeth: an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 2014, 32: 304.
91. Zhou H-m, Shen Y, Wang Z-j, Li L, Zheng Y-f, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*, 2013, 39: 478-483.
92. Geim AK. Graphene: status and prospects. *Science*, 2009, 324: 1530-1534.
93. Xie H, Cao T, Rodríguez-Lozano FJ, Luong-Van EK, Rosa V. Graphene for the development of the next-generation of biocomposites for dental and medical applications. *Dent Mater*, 2017, 33: 765-774.
94. Zou L, Wang L, Wu Y, Ma C, Yu S, Liu X. Trends analysis of graphene research and development. *J. Data Inf. Sci*, 2018, 3: 82.

95. Taherian F, Marcon V, van der Vegt NF, Leroy F. What is the contact angle of water on graphene? *Langmuir*, 2013, 29: 1457-1465.
96. Goenka S, Sant V, Sant S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J Control Release*, 2014, 173: 75-88.
97. Nair RR, Blake P, Grigorenko AN, Novoselov KS, Booth TJ, Stauber T, Peres NM, Geim AK. Fine structure constant defines visual transparency of graphene. *Science*, 2008, 320: 1308-1308.
98. Chwalibóg ES, Jaworski S, Grodzik M, Wierzbicki M, Prasek M. Biological properties of graphene. *Nano-Biotechnology PL*, 2012.
99. Park S, Ruoff RS. Chemical methods for the production of graphenes. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4: 217-224.
100. Guazzo R, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Ferroni L, Ludovichetti FS, Piattelli A, Antoniac I, Bressan E, Zavan B. Graphene-based nanomaterials for tissue engineering in the dental field. *Nanomaterials*, 2018, 8: 349.
101. Shin SR, Li Y-C, Jang HL, Khoshakhlagh P, Akbari M, Nasajpour A, Zhang YS, Tamayol A, Khademhosseini A. Graphene-based materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 105: 255-274.
102. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Ee P-LR, Ahn J-H, Hong BH, Pastorin G. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS nano*, 2011, 5: 4670-4678.
103. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS nano*, 2011, 5: 6971-6980.

104. Pham VT, Truong VK, Quinn MD, Notley SM, Guo Y, Baulin VA, Al Kobaisi M, Crawford RJ, Ivanova EP. Graphene induces formation of pores that kill spherical and rod-shaped bacteria. *ACS nano*, 2015, 9: 8458-8467.
105. Song C, Yang C-M, Sun X-F, Xia P-F, Qin J, Guo B-B, Wang S-G. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25: 2853-2860.
106. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 2013, 69: 137-143.
107. Mandrell R, Griffiss J, Macher B. Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes. *J Exp Med*, 1988, 168: 107-126.
108. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog*, 2009, 27: 120-139.
109. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Clin Exp Invest*, 2015, 6: 331-336.
110. Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 188-194.
111. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. *Hacet Univ J Fac Pharm*, 2011: 137-150.
112. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 2004, 37: 112-119.

113. Dzięgielewska-Gęsiak S, Wysocka E, Michalak S, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Muc-Wierzoń M. Role of lipid peroxidation products, plasma total antioxidant status, and Cu-, Zn-superoxide dismutase activity as biomarkers of oxidative stress in elderly prediabetics. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014.
114. Relassay diagnostics. <https://www.relassay.com/product-detail-total-oxidant-status-assay-kit.html>. 25 Şubat 2022.
115. MacKinnon KL, Molnar Z, Lowe D, Watson ID, Shearer E. Measures of total free radical activity in critically ill patients. *Clin Biochem*, 1999, 32: 263-268.
116. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 2004, 37: 277-285.
117. Binder T, Goodson J, Socransky S. Gingival fluid levels of acid and alkaline phosphatase. *J Periodontal Res*, 1987, 22: 14-19.
118. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem*, 1982, 28: 2007-2016.
119. Aggarwal S, Rego A, Kshirsagar S, Rai V, Gupta P, Borkar A. A comparative evaluation of the influence of Sol-Gel derived nanoparticle bioglass particulate vs calcium hydroxide as a direct pulp capping agent—A histological analysis. *Int Endod J*, 2015, 27.
120. Gao C, Feng P, Peng S, Shuai C. Carbon nanotube, graphene and boron nitride nanotube reinforced bioactive ceramics for bone repair. *Acta Biomater*, 2017, 61: 1-20.
121. Zhang L, Zhang X, Chen Y, Su J, Liu W, Zhang T, Qi F, Wang Y. Interfacial stress transfer in a graphene nanosheet toughened hydroxyapatite composite. *Appl Phys Lett*, 2014, 105: 161908.

122. Chen G-Y, Pang D-P, Hwang S-M, Tuan H-Y, Hu Y-C. A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials*, 2012, 33: 418-427.
123. Dimiev AM, Tour JM. Mechanism of graphene oxide formation. *ACS nano*, 2014, 8: 3060-3068.
124. Dubey N, Bentini R, Islam I, Cao T, Castro Neto AH, Rosa V. Graphene: a versatile carbon-based material for bone tissue engineering. *Stem Cells Int*, 2015, 2015.
125. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem*, 2010, 2: 1015-1024.
126. Kostarelos K, Novoselov KS. Exploring the interface of graphene and biology. *Science*, 2014, 344: 261-263.
127. Depan D, Girase B, Shah J, Misra R. Structure–process–property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater*, 2011, 7: 3432-3445.
128. Demirci T, Gürbüz T, Şengül F. Dental rezin kompozitlerin sitotoksitesisi: Bir in vitro. *J Dent Fac Ataturk Univ*, 2014, 24: 10-15.
129. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci*, 2015, 23: 467-471.
130. Topsakal KG, Korkmaz YN. Diş hekimliğinde kullanılan kök hücre tipleri: Literatür derlemesi. *Selcuk Dent J*, 2019, 6: 73-81.

131. Nicholson JW, Connor JA. Biological interactions with materials. İçinde: Nicholson JW (editör). *The Chemistry of Medical and Dental Materials (RSC Materials Monographs)*, Royal Society of Chemistry, 2002: 186-226.
132. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 5. Baskı. Hoboken, John Wiley & Sons, 2005: 1-216.
133. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. İçinde: *Mammalian cell viability*, Springer, 2011: 33-43.
134. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont*, 2000, 13.
135. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996, 239: 70-76.
136. Mossman T. A rapid colourimetric assay for cellular proliferation and survival. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-61.
137. Samiei M, Ghasemi N, Asl-Aminabadi N, Divband B, Golparvar-Dashti Y, Shirazi S. Zeolite-silver-zinc nanoparticles: Biocompatibility and their effect on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *J Clin Exp Dent*, 2017, 9: e356.
138. Rodríguez-Lozano F, García-Bernal D, Oñate-Sánchez R, Ortolani-Seltenerich P, Forner L, Moraleda J. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J*, 2017, 50: 67-76.
139. Ghasemi N, Rahimi S, Lotfi M, Solaimanirad J, Shahi S, Shafaie H, Milani AS, Shakuie S, Zand V, Abdollahi M. Effect of mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture cement and mineral trioxide aggregate with disodium hydrogen phosphate on BMP-2 production. *Iran Endod J*, 2014, 9: 220.

140. Attik G, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosogeat B. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG 63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *Int Endod J*, 2014, 47: 1133-1141.
141. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod*, 2012, 38: 1220-1226.
142. Pérard M, Le Clerc J, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24: 1527-1534.
143. Saberi EA, Farhadmollashahi N, Ghotbi F, Karkeabadi H, Havaei R. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2016, 10: 75.
144. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He W-x. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*, 2014, 42: 490-497.
145. Nikfarjam F, Beyer K, König A, Hofmann M, Butting M, Valesky E, Kippenberger S, Kaufmann R, Heidemann D, Bernd A. Influence of biodentine®-a dentine substitute-on collagen type I synthesis in pulp fibroblasts in vitro. *PLoS One*, 2016, 11: e0167633.
146. Aksu S, Gürbüz T. Farklı pulpa kaplama materyallerinin toplam oksidan ve antioksidan kapasitelerinin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde değerlendirilmesi. *Selcuk Dent J*, 2020, 7: 192-199.

147. Koubi G, Colon P, Franquin J-C, Hartmann A, Richard G, Faure M-O, Lambert G. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth—a prospective study. *Clin Oral Investig*, 2013, 17: 243-249.
148. Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V, Lymperi S, Panopoulos P, Anastasiadou E, Kontakiotis EG. Interaction of dental pulp stem cells with Biodentine and MTA after exposure to different environments. *J Appl Oral Sci*, 2016, 24: 481-486.
149. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 2011, 37: 1240-1246.
150. Daltoé MO, Paula-Silva FWG, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Silva LAB. Expression of mineralization markers during pulp response to biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2016, 42: 596-603.
151. Karkehabadi H, Ahmadyani E, Najafi R, Khoshbin E. Effect of biodentine coated with emdogain on proliferation and differentiation of human stem cells from the apical papilla. *Mol Biol Rep*, 2022: 1-8.
152. Corral Nunez C, Altamirano Gaete D, Maureira M, Martin J, Covarrubias C. Nanoparticles of Bioactive Glass Enhance Biodentine Bioactivity on Dental Pulp Stem Cells. *Materials*, 2021, 14: 2684.
153. Lu J, He YS, Cheng C, Wang Y, Qiu L, Li D, Zou D. Self-supporting graphene hydrogel film as an experimental platform to evaluate the potential of graphene for bone regeneration. *Adv Funct Mater*, 2013, 23: 3494-3502.
154. Xie H, Chua M, Islam I, Bentini R, Cao T, Viana-Gomes JC, Neto AHC, Rosa V. CVD-grown monolayer graphene induces osteogenic but not odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater*, 2017, 33: e13-e21.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Periş Çelikel
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Medeni Hali:
Uyruğu:
Adres:
Tel:
Faks:
E-mail:
Eğitim
Lise:
Lisans:
Uzmanlık:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Uzmanlık Tezi olarak Danışmanın Prof. Dr. Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU danışmanlığında sunulan “**Grafen ve Biodentine’nin Dental Pulpa Kök Hücresi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	15
Genel Bilgiler	3	30
Materyal ve Metod	4	35
Bulgular	9	10
Tartışma	5	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 28 / 03/ 2022

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

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

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

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/473
Konu : Etik Kurul Kararı

30.09.2021

Sayın: Prof. Dr. Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU
Diş Hekimliği Fakültesi
Pedodonti Hemşireliği Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz "Grafen ve Biodentine'nin Dental Pulpa Kök Hücresi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı

Sorumlu Araştırmacı :
1. Prof. Dr. Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU

Yardımcı Araştırmacı :
1. Arş.Gör.Dt.Periş ÇELİKEL



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof.Dr.Sera ŞİMŞEK DERELİOĞLU
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Grafen ve Biodentine'nin Dental Pulpa Kök Hücresi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 06 Karar No: 64	Tarih:30.09.2021
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin TÜBİTAK tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	