KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYOT LAZER, OZONLU SU VE ÇEŞİTLİ İRRİGASYON AJANLARININ SÜT DİŞİ KÖK HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HAMİT TUNÇ

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SERAP ÇETİNER

2019-LEFKOŞA

TEZ SINAV TUTANAĞI

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ SAVUNMASI SINAV TUTANAĞI

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı: Hamit **Anabilim Dalı:** PEDODONTİ
Soyadı: TUNÇ **Program Adı:** PEDODONTİ
Numarası: 20144831 **Statüsü:** Y.Lisans ☐ Doktora ☒

II. TEZ BİLGİLERİ

Danışmanı: Prof. Dr. Serap ÇETİNER
Tez Başlığı: DİYOT LAZER, OZONLU SU VE ÇEŞİTLİ İRRİGASYON AJANLARININ SÜT DİŞİ KÖK HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

III. TOPLANTI BİLGİLERİ

İlgi: Enstitü Yönetim Kurulu'nun 3 / 9 / 2019 tarih ve 146/ 15 sayılı toplantısında oluşturulan jüri

Sınav tarihi: 25 / 10 / 2019 **Yeri:** YDÜ Kütüphane Sınav Salonu
Saati: 10:00

IV. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

☑ Kişisel raporların tartışılması sonucunda başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE,**
☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda tezin **DÜZELTİLMESİNE *,**
☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunmayan tezin **REDDEDİLMESİNE **,**

OY BİRLİĞİ ☑ **OY ÇOKLUĞU** ☐ ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Ünvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Serap Çetiner	
Üye	Prof. Dr. H. Seda Vatansever	
Üye	Doç. Dr. Tuğba Bezgin	
Üye	Doç. Dr. Eda Becer	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Aylin İslam	

***Öğrenciye tezindeki düzeltme ve tamamlamaları yapması için ay ek süre verilmesi önerilmektedir.**
****Reddedilmesi halinde jüri üyeleri kişisel raporları sınav tutanağına eklenecektir.**

Ekler: 1. Tez Savunma Sınav Duyurusu
2. Katılım Listesi

Telefon: (392) 680 20 00/125 **E-Posta:** info@neu.edu.tr

EP

BEYAN

“Diyot Lazer, Ozonlu Su ve Çeşitli İrrigasyon Ajanlarının Süt Dişi Kök Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hamit TUNÇ

TEŞEKKÜR

Doktora kariyerime başlamamda en büyük destekçim olan ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi, tecrübe ve fedakârlıklarıyla bana büyük destek veren akademik nosyonu açısından kendime örnek aldığım danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Serap ÇETİNER' e;

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan desteklerini esirgemeyen bizi kırmayıp katkılarını sunan ve bize zaman ayıran sayın Prof. Dr. Seda Vatansever ve sayın Doç.Dr. Eda Becer' e;

Tez izleme komitesinde ve tez jürisinde bulunmayı kabul ederek beni onurlandıran ve tezime katkıda bulunan sayın Doç. Dr. Tuğba Bezgin' e;

Tez çalışmamın her aşamasında benimle birlikte olan, her türlü zorlukta ve sıkıntıda benden desteklerini esirgemeyen bana yol gösterip ablalık yapan, kök hücre ve hücre kültürü çalışmasını keyif olarak zevkle yapmamı ve öğrenmemi sağlayan sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin İslam Yazgın' a;

Pedodonti anabilim dalında çalışmamı keyifli hale getiren, her türlü zorlukta benden yardımlarını esirgemeyip hep yanımda olan mutluluğumu paylaştığım bölüm arkadaşlarım ablam Yrd. Doç. Dr. Damla Akşit Bıçak' a, Yrd. Doç. Dr. Özkem Azmi Öge'ye, Dt. Nilsü Sakallı' ya, Dt. Ayşe Ekinci' ye, Dt. Yelda Koç' a, Dt. Alaa Al-Mashharawi' ye ve Dt. Dila Özyılkan' a;

Bende yeri ayrı olan; çalışma ve oda arkadaşım, her şeyden önce kardeşimden ayrı görmediğim, her anımda yanımda olup desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Dt. Serenad Çırakoğlu ve değerli eşi Serkan Çırakoğlu' na;

Doktoraya başladığım günden beri klinikte benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen hasta bakarken olmazsa olmazım güler yüzlü klinik asistanımız canım ablam Dilek Tüfekçi' ye;

Hayatıma girdiği günden beri bana her konuda destek olup yanımda olan, zorlu tez dönemimin her anında mutluluğumu paylaşıp stresime ve üzüntüme ortak olan, varlığıyla mutluluğu bana yaşatan en büyük şansım, değerlim, yol arkadaşım, biricik

prensesim Dt. Erensu Uzar ile manevi olarak desteklerini her zaman hissettiren Zafer Uzar ve Hülya Uzar' a;

Hiç kuşkusuz beni ben yapan, sahip olduğumdan dolayı gurur duyduğum, her zaman bana yol gösterip ne olursa olsun yanımda olan, bu mesleği seçmeme sebep olan, idolüm ve hayranı olduğum canım babam Dt. Yaşar Tunç' a; her türlü kahrımı ve nazımı çekip benim bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan ailemizin sultanı neşe kaynağımız biricik annem Nevin Tunç' a; canımdan ötem, küçük sultanım, dert ortağım, mutlu olduğumda benden daha çok mutlu olan ve beni dünyanın en şanslı abisi yapan biricik kardeşim Gökçe Tunç' a;

Dünya görüşü olarak örnek aldığım, "Biz cahil dediğimiz zaman, mektepte okumamış olanları kastetmiyoruz. Kastettiğimiz ilim ve hakikati bilmektir. Yoksa okumuş olanlardan en büyük cahiller çıktığı gibi, hiç okumak bilmeyenlerden de hakikati gören gerçek alimler çıkabilir" sözünü düstur edindiğim, olmasaydı olmazdık düşüncesiyle nefes aldığım her an aklımdan çıkmayacak olan, dünyaya bir kere daha benzerinin gelmeyeceğine inandığım ulu önder Gazi Mustafa Kemal Atatürk' e teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ SINAV TUTANAĞI ..... **ii**

BEYAN ..... **iii**

TEŞEKKÜR ..... **iv**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

TABLOLAR ..... **xiv**

ŞEKİLLER ..... **xv**

ÖZET ..... **xvii**

ABSTRACT ..... **xviii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **5**

2.1.Rejeneratif Endodontinin Gelişim Süreci 5

2.2.Kök Hücreler 10

2.2.1.Diferansiyasyon Yeteneklerine Göre Kök Hücreler 10

2.2.2.Elde Edildikleri Döneme Göre Kök Hücreler 12

2.2.3.Dental Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler 15

2.3.Rejeneratif Endodontik Tedavilerde Uygulanan Klinik Prosedürler 20

2.3.1.Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonu 21

2.3.2.Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonuyla İlgili Alternatif Yaklaşımlar . 25

2.4.İn-Vitro Toksisite Testleri 41

2.5.Apoptozis 44

2.6.Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar 47

3. GEREÇ VE YÖNTEM **50**

3.1.Tez Çalışmasında Test Edilmek Üzere Belirlenen Hipotezler 50
3.2.Kök Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültivasyonu 51
3.3.SHEDs'lerin Pasajlanması 54
3.4.Deney Gruplarının Belirlenmesi 56
3.4.1.Sitotoksisite Analizi İçin Deney Gruplarının Belirlenmesi 56
3.4.2.İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi İçin Deney Gruplarının Belirlenmesi 57
3.5.SHEDs'lerin Thoma Lamı Kullanılarak Sayılması 57
3.6.Deneyde Kullanılan İrrigasyon Solüsyonlarının Hazırlanması 58
3.7.Deneyde Kullanılan Diyot Lazer Parametreleri 58
3.8.Sitotoksisitenin Belirlenmesi İçin Kullanılan MTT Analizi 59
3.9.Hücre Ölümünün Tespiti İçin Kullanılan İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi 60
3.10.İstatistiksel Analiz 63
4. BULGULAR 64
4.1.Tüm Zaman Periyotlarında Kontrol Grubundan Elde Edilen MTT Analizi Bulguları 64
4.2.Tüm Zaman Periyotlarında EDTA Solüsyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları 65
4.3.Tüm Zaman Periyotlarında NaOCl Solüsyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları 67
4.4.Tüm Zaman Periyotlarında Ozonlanmış Su Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları 69
4.5.Tüm Zaman Periyotlarında Diyot Lazer İrradyasyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları 71
4.6.Tüm Zaman Periyotlarında Elde Edilen MTT Analizi Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırılması 73

4.7.Deney Gruplarından Elde Edilen İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi Bulguları 76

5. TARTIŞMA 81

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 97

7. KAYNAKLAR 100

EK 1. ETİK KURUL RAPORU 132

8. ÖZGEÇMİŞ 133

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ SAVUNMASI SINAV TUTANAĞI

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı: Hamit **Anabilim Dalı:** PEDODONTİ
Soyadı: TUNÇ **Program Adı:** PEDODONTİ
Numarası: 20144831 **Statüsü:** Y.Lisans ☐ Doktora ☒

II. TEZ BİLGİLERİ

Danışmanı: Prof. Dr. Serap ÇETİNER
Tez Başlığı: DİYOT LAZER, OZONLU SU VE ÇEŞİTLİ İRRİGASYON AJANLARININ SÜT DİŞİ KÖK HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

III. TOPLANTI BİLGİLERİ

İlgi: Enstitü Yönetim Kurulu'nun 3 / 9 / 2019 tarih ve 146/ 15 sayılı toplantısında oluşturulan jüri

Sınav tarihi: 25 / 10 / 2019 **Yeri:** YDÜ Kütüphane Sınav Salonu
Saati: 10:00

IV. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

☑ Kişisel raporların tartışılması sonucunda başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE,**
☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda tezin **DÜZELTİLMESİNE *,**
☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunmayan tezin **REDDEDİLMESİNE **,**

OY BİRLİĞİ ☑ **OY ÇOKLUĞU** ☐ ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Ünvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Serap Çetiner	
Üye	Prof. Dr. H. Seda Vatansever	
Üye	Doç. Dr. Tuğba Bezgin	
Üye	Doç. Dr. Eda Becer	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Aylin İslam	

***Öğrenciye tezindeki düzeltme ve tamamlamaları yapması için ay ek süre verilmesi önerilmektedir.**
****Reddedilmesi halinde jüri üyeleri kişisel raporları sınav tutanağına eklenecektir.**

Ekler: 1. Tez Savunma Sınav Duyurusu
2. Katılım Listesi

Telefon: (392) 680 20 00/125 **E-Posta:** info@neu.edu.tr

EP

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
°C	Derece santigrat
µg	mikrogram
µg/ml	mikrogram/mililtre
µl	mikrolitre
µm	mikrometre
ABMSCs	Alveoler kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreler
AEB	Amerikan endodontistler birliği
ALP	Alkalen fosfataz
Ar	Argon
ASCs	Yetişkin kök hücreler
ATP	Adenozin trifosfat
BMMSCs	Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler
Ca	Kalsiyum
$Ca(OH)_2$	Kalsyum hidroksit
CHX	Klorheksidin
cm	santimetre
cm^2	santimetrekare
Co	Kobalt
CO_2	Karbon dioksit

Cu	Bakır
DFPCs	Dental folikül progenitör hücreleri
dk	dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPSCs	Diş pulpası kök hücreleri
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme Lnked Immunosorbent Assay
Er,Cr:YSGG	Erbiyum, Kromium: Yttrium Skandium Galium Garnet
Er: YAG	Erbium: Yttriyum-aliminyum-garnet
ESCs	Embriyonik kök hücreler
Fe	Demir
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g/mol	Mol başına düşen kütle gram/mol
GMSCs	Gingival mezenkimal kök hücreler
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Ho:YAG	Holmiyum:Yttrium Aliminyum Garnet
$HOCI^-$	Hipokloröz asit
HSCs	Hematopoetik kök hücreler
Hz	Hertz
J	Joule
j/cm^2	Joule/santmetrekare (Enerji yoğunluğu)
LDH	Laktat dehidrojenaz
LIF	Lösemi inhibe edici faktör

LLLT	Düşük Seviyeli Lazer Terapisi
MAPC	Multipotent yetişkin progenitör hücre
mJ	Milijoule
ml	Mililitre
mm	milimetre
Mn	Manganez
MSCs	Mezenkimal kök hücreler
MTA	Mineral trioksit agregat
MTS	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
Nd: YAG	Neodiyum: Yttriyum-aliminyum-garnet
nm	Nanometre
O_3	Ozon
OCL^-	Hipoklorit iyonu
OH^-	Hidroksil
PDL	Periodontal ligament
PDLSCs	Periodontal ligament kök hücreleri
PRF	Trombosit açısından zengin fibrin
PRP	Trombosit açısından zengin plazma
RET	Rejeneratif endodontik tedavi
s	saniye

SCAPs	Apikal kök hücreleri
SH	Sülfhidril
SHEDs	Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler
TGPCs	Diş germi progenitör hücreleri
TUNEL	TdT-dUTP nick-end-labelling
W	Watt
w/cm^2	Watt/santimetrekare (Güç yoğunluğu)
WST	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum
XTT	2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

TABLOLAR

Tablo 4.1.1. Tüm zaman periyotlarındaki kontrol gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri…...64

Tablo 4.2.1. Tüm zaman periyotlarındaki EDTA gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri…...65

Tablo 4.3.1. Tüm zaman periyotlarındaki NaOCl gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri…...68

Tablo 4.4.1. Tüm zaman periyotlarındaki Ozonlanmış Su gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri…...70

Tablo 4.5.1. Tüm zaman periyotlarındaki Diyot Lazer gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri…...72

Tablo 4.7.1. Deney gruplarının TUNEL pozitif hücre yüzdelerinin tanımlayıcı istatistikleri……..80

Tablo 4.7.2. Deney gruplarının TUNEL pozitif hücre yüzdelerinin Dunn’s post-hoc testinin *p* değerleri……...80

ŞEKİLLER

Şekil 2.2.3.1: Dental doku kökenli mezenkimal kök hücre kaynakları……15

Resim 3.2.1. Laminar flow ultraviyole kabin……..51

Resim 3.2.2. Laminar flow kabinde filtreleme işlemi……52

Resim 3.2.3. Su banyosu…….52

Resim 3.2.4. Santrifüj cihazı……...53

Resim 3.2.5. Flask tabanına yapışıp prolifere olan kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm……...53

Resim 3.3.1. %80 yoğunluğa ulaşan kök hücreler Magnifikasyon:500 µm…….54

Resim 3.3.2. Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm…….55

Resim 3.3.3. %80 yoğunluğa ulaşan Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm…55

Resim 3.3.4. 96 kuyulu ekim kabının tabanına yapışan Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm……..56

Resim 3.6.1. Medikal ozon jeneratörü…….58

Resim 3.9.1: Pozitif Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……62

Şekil 4.2.1. . SHEDs'lerde EDTA solüsyonlarının 5, 10 ve 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık……..67

Şekil 4.3.1. SHEDs'lerde NaOCl solüsyonlarının 5, 10 ve 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık……..69

Şekil 4.6.1. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 5 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık…….74

Şekil 4.6.2. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 10 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık…….75

Şekil 4.6.3. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık……76

Resim 4.7.1: Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……77

Resim 4.7.2: EDTA (%17) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……77

Resim 4.7.3: NaOCl (%1) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……78

Resim 4.7.4: Ozonlanmış Su (10 µg/ml) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……78

Resim 4.7.5: Diyot Lazer (1.5 j/cm^2) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm……79

ÖZET

TUNÇ, H. Diyot lazer, ozonlu su ve çeşitli irrigasyon ajanlarının süt dişi kök hücrelerindeki apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Tez Danışmanı Prof.Dr. Serap ÇETİNER Lefkoşa, 2019.

Amaç: Tez çalışmamızın amacı; EDTA, NaOCl, ozonlu su ve diyot lazer irradyasyonunun eksfoliye süt dişlerinden elde edilmiş kök hücreler üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesidir. **Gereç ve Yöntem:** Deney gruplarındaki kök hücreler EDTA (%5, %8.5, %17), NaOCl (%1, %2.5, %5), ozonlu su (5, 10, 20 µg/ml) ve GaAlAs diyot lazere (0.5, 1, 1.5 j/cm^2) maruz bırakılmıştır. Kontrol grubundaki hücreler ise DMEM, %15 fetal sığır serumu, %1 glutamin, %1 penisilin-streptomisin, %1 gentamisin ve amfoterisin B içeren standart kültür vasatında inkübe edilmiştir. Tüm deney guplarındaki hücreler deneysel prosedürlerden sonra 5, 10 ve 15 dakikalık periyotlar olacak şekilde 37°C' de inkübe edilmiştir. Hücresel canlılık ve proliferasyon MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Apoptotik hücrelerin tespit edilmesi için terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) yöntemi kullanılmıştır. Apoptotik analiz için 10 µg/ml ozonlu su; 1.5 j/ cm^2 enerji yoğunluklu diyot lazer; 17% EDTA ve 1% NaOCl grubu seçilmiştir. **Bulgular:** EDTA ve NaOCl gruplarının MTT analiz sonuçları kontrol, ozonlu su ve diyot lazer gruplarıyla kıyaslandığında tüm zaman periyotlarında EDTA ve NaOCl gruplarında hücresel canlılığın anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Apoptotik analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise ozonlu su ve diyot lazeer gruplarında EDTA ve NaOCl gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşü TUNEL-pozitif hücre tespit edilmiştir. **Sonuçlar:** Çalışmamızın sonuçları, diyot lazer ve ozonlanmış suyun kök kanal dezenfeksiyonunda kullanımının, rejenerasyonun sağlanması açısından uygun bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: İrrigantlar, Diyot lazer irradyasyonu, Kök hücre, Apoptosis, Sitotoksisite

ABSTRACT

TUNC H. Evaluation of apoptotic effects of diode laser irradiation, ozonated water and various irrigant solutions on stem cells from exfoliated deciduous teeth. Near East University Institute of Health Science Department of Pediatric Dentistry, PhD Thesis, Supervisor Prof.Dr. Serap CETINER Nicosia, 2019.

Aim: This study aimed to evaluate cytotoxicity and apoptosis of Gallium-Aluminum-Arsenide (GaAlAs) diode laser irradiation, sodium hypochlorite (NaOCl), ozonated water and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). **Materials and Methods:** Cells were exposed to EDTA (5%, 8.5%, 17%), NaOCl (1%, 2.5%, 5%) ozonated water (5, 10, 20 µg/ml) and GaAlAs diode laser irradiation (energy densities of 0.5, 1, 1.5 j/cm^2). Culture medium included D-MEM, supplemented with 15% foetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 1% gentamycin, amphotericin-B and served as control group. The cells in all experimental groups were incubated at 37 °C for 5, 10 and 15 min after experimental procedures. Cell viability and proliferation were analysed with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. For detection of apoptotic cells, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling (TUNEL) method was performed. 17% EDTA; 1% NaOCl; 10 µg/ml ozonated water; 1.5 j/ cm^2 diode laser irradiation groups were selected for TUNEL assay. **Results:** The percentage of cell viability in all EDTA and NaOCl groups showed a significant reduction compared to the control, diode laser irradiation and ozonated water groups at 5th, 10th and 15th minutes respectively. The lowest percentage of TUNEL-positive cells was significantly observed in ozonated water and diode laser irradiation compared to EDTA and NaOCl respectively. **Conclusions:** Ozonated water and diode laser irradiation may be used for regeneration during disinfection step of endodontic treatments.

Keywords: Irrigants, Diode laser irradiation, Stem cell, Apoptosis, Cytotoxicity

1. GİRİŞ

Dental pulpa genellikle karyojenik ve periodontal kaynaklı bakteriler tarafından meydana getirilen enfeksiyonlar, dental travma ve tedavi sırasında uygulanan prosedürler sebebiyle hasar görmektedir (Gong ve ark., 2016). Enfekte ve nekrotik pulpanın rutin klinik tedavi protokolü; kök ve kron pulpasının ekstripe edilmesi ve ekstripe edilen pulpanın yerine biyouyumlu inorganik bir materyal konularak kanal dolgusunun yapılmasını içeren kök kanal tedavisidir (Gong ve ark., 2016). Geleneksel kök kanal tedavisi ile başarılı sonuçlar alınsa da;

1. Endodontik tedavi uygulanan dişlerde kullanılan kanal dolgu materyali sebebiyle meydana gelen renklenmeler ve periapikal mikrosızıntı sonucu tekrarlayan enfeksiyonlar (Ioannidis ve ark., 2013; Eramo ve ark., 2017),
2. Restoratif tedavi protokollerinin bir sonucu olarak dişte meydana gelen aşırı madde kaybı ve koronal sızıntı gibi komplikasyonlar (Eramo ve ark., 2017; Corsentino ve ark., 2018),
3. Pulpası ekstripe edilmiş dişlerin çevresel değişimleri algılama yeteneklerini kaybetmesi sonucu sekonder çürüklerin ilerlemesinin hastalar tarafından farkedilemez hale gelmesi(Ajay Sharma ve ark., 2015),

gibi zorluklar tedavinin uzun dönem başarısını etkilemektedir.

Enfeksiyon kontrolü ve ağrının giderilmesinde tatmin edici klinik başarıya karşın, kök kanal tedavisi gibi klasik tedavi yöntemleri sadece kök kanal boşluğunun orijinal işlevini geri getirmeden kapatılmasını amaçlamaktadır (Mao ve ark., 2012). Ancak, kök kanal tedavisi uygulanan dişlerde duyusal fonksiyon kaybı ve doğal savunma mekanizmalarının eksikliği nedeniyle diş kırıkları ve tekrarlayan enfeksiyon gibi çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (Mao ve ark., 2012). Buna ek olarak kök gelişimi sırasında, pulpada meydana gelen patolojik değişiklikler, kök gelişiminin durması ile sonuçlanarak dentinin yerleşimini engelleyebilir (Farhad ve ark., 2016). Bu bağlamda, kökün gelişim aşaması tedavi planlamasında dikkate alınması gereken önemli bir faktördür (Farhad ve ark., 2016). Açık apeksli ve nekrotik pulpalı

olgunlaşmamış dişlerde ise, rejeneratif endodontik tedaviler (RET) kök gelişimini ve apikal kapanmayı desteklemektedir (Galler, 2016).

Pulpal rejenerasyon fikri, Ostby' nin (1961) yaptığı bir çalışmada pulpal boşlukta kan pıhtılaşmasını takiben bu boşluğa doğru dokunun içe büyümesini göstermesiyle gündeme gelmiştir. Banchs ve Trope (2004) ise, minimal enstrümantasyonu, bol irrigasyonu ve antimikrobiyal intrakanal ilacın yerleştirilmesini ve ardından kök kanalında kanamanın stimule edilmesini içeren modifiye bir klinik protokol geliştirmişlerdir. Son dönemlerde ise rejeneratif endodontik tedaviyle, dental pulpa boşluğunun enfeksiyonunun kontrol altına alınması ve daha sonra kök dentininin kalınlaşması ile kök apeksinin normal olgunlaşmasına neden olacak vital doku büyümesinin desteklenmesi amaçlanmıştır (Nosrat ve ark., 2013). Bu yeni tedavi stratejisinin optimal hedefi, kök gelişimini destekleyecek olan sağlıklı pulpa-dentin kompleksinin hasar görmüş pulpa dokusuyla yer değiştirmesini sağlamaktır (Miralles ve ark., 2018). Rejeneratif tedaviler, bakteriden yoksun olan kök kanal boşluğunun içinde uygun bir iskele ve kök hücrelerin varlığında, pulpa dokusunun rejenerasyonunun mümkün olabileceği teorisine dayanmaktadır (Hargreaves ve ark., 2008). Rejenerasyonun kesintisiz ve koordineli bir şekilde gerçekleşmesi için, kök kanal mikro-ortamı uygun şekilde hazırlanmalı ve dezenfekte edilmelidir (Kim, 2016). Bu bağlamda, rejeneratif tedaviler kök kanal sisteminin mekanik enstrümantasyondan daha çok kimyasal olarak debrislerden temizlenmesine dayanan uygulamalardır (Miralles ve ark., 2018). Çünkü mekanik enstrümantasyonun yapılması zaten açık olan apikal foramenin uygun olmayan sızdırmazlık özelliği göstermesine ve az gelişmiş kök yapısı nedeniyle, dişin kırıklara karşı savunmasız kalmasına sebep olmaktadır (Asgary ve ark., 2016).

Rejeneratif endodontik tedavide en önemli basamak olan kök kanal sisteminin kimyasal dezenfeksiyonu için, üçlü ve ikili antibiyotik patlar, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), çeşitli konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit (NaOCl), klorheksidin (CHX) ve NaOCl ile CHX kombinasyonları kullanılmaktadır (Mollashahi ve ark., 2016; Yang ve ark., 2016). Ancak NaOCl' nin apikalden göç eden mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu ve dentinden salgılanan büyüme faktörlerini inhibe edici etkileri nedeniyle rejeneratif tedavilerde antibakteriyel irrigasyon ajanlarıyla ilgili tartışmalar devam etmektedir (Martin ve ark., 2014). Buna ek olarak NaOCl ile

irrigasyondan sonra CHX kullanımının sitotoksik bir çökelti meydana getirdiği bilinmektedir (Trevino ve ark., 2011). Almeida ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir çalışmada, EDTA' nın, farklı konsantrasyonlarda NaOCl' nin doku çözme kapasitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. EDTA' nın NaOCl' nin pulpa dokusunu çözme kabiliyeti üzerindeki olumsuz etkisi klinik olarak önem taşımaktadır ve kök kanal tedavisi sırasında birlikte kullanılmaması gerekmektedir (Almeida ve ark., 2015).

Endodontik irrigasyon ajanlarının etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olmaları, ayrıca periapikal ve oral mukozal doku üzerinde ise sitotoksik etki göstermemeleri gerekmektedir. Bununla birlikte, kullanılan irrigasyon ajanlarının özellikle ısrarcı apikal periodontitis vakalarında bir anti-enflamatuvar etki göstermeleri klinik başarıyı arttıracaktır (Huth ve ark., 2009). EDTA ve NaOCl' nin birlikte kullanımının yarattığı klinik dezavantajlardan dolayı alternatif irrigasyon protokolleri için çalışmalar devam etmektedir (Azarpazhooh ve ark., 2008).

Bu arayışların bir sonucu olarak diş hekimliğinde ozon ve lazer kullanımına olan ilgi, ağız boşluğu ile ilişkili enfeksiyöz hastalıklar sayesinde gündeme gelmiştir (Sing ve ark., 2014; Borges ve ark., 2017). Son çalışmalar su formunda ozonun; örneğin diş çürüğü, periodontal uygulamalar, endodontik tedavi ve prostodontik rehabilitasyon gibi geleneksel tedavilere destek olarak kullanıldığında büyük avantajlar sağlayacağını belirtmektedir (Kaul ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2014). Güçlü bakterisidal, fungisidal ve virisidal özellikleri, özellikle endodontik uygulamalar için ozonu daha cazip bir hale getirmektedir (Kumar ve ark., 2014). Buna ek olarak anti-enflamatuvar etkisi de endodontik enfeksiyonların tedavisinde önemli bir avantajdır (Kumar ve ark., 2014).

Dental lazerlerin en büyük avantajı ise dezenfeksiyonun başarısını büyük ölçüde etkileyen anormal kanal morfolojilerinden kaynaklanan zorlukların önüne geçmesidir (Borges ve ark., 2017). Buna ek olarak rutin irrigasyon protokollerine oranla dental lazer uygulamalarının daha yüksek dentin penetrasyonu kabiliyetinin olması bu yöntemi kanal içi dezenfeksiyon için daha cazip hale getirmektedir (Borges ve ark., 2017).

Araştırmamızda esas olarak hedeflenen, rejenerasyonun sağlıklı bir şekilde sağlanabilmesi için gerekli olan kanal içi kimyasal dezenfeksiyonda sıklıkla kullanılan

EDTA ve NaOCl' nin olumsuz etkilerine karşı ozonlanmış su ve düşük seviyeli diyot lazer uygulamasının, eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHEDs) üzerindeki hücresel canlılığa etkisini araştırmaktır. Bu şekilde rejeneratif endodontik tedavilerde klinik başarıyı arttırmak için ozonlanmış su ve diyot lazer alternatif bir dezenfeksiyon protokolü olarak tercih edilebilir. Çünkü kullanılan dezenfeksiyon yönteminin antimikrobiyal etkisinin yanında proliferasyonu istenilen hücreler üzerine sitotoksik ve apoptotik etkisi klinik başarı şansını azaltmakta ve beklenen rejenerasyonun sağlanması zorlaşmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Rejeneratif Endodontinin Gelişim Süreci

Diş dokularının rejenerasyonu için ilk yaklaşımlar, Ostby' ın “endodontik tedavide kan pıhtısının rolünü” değerlendirdiği 1960' lara kadar uzanmaktadır (Ostby, 1961). Ostby (1961), pulpa rejenerasyonu üzerine yaptığı bir çalışmada, kök kanalının 1/3 apikal kısmında kalan kan pıhtısının üzerini koloroperka patı ile kapatıp hastalarını üç buçuk yıla kadar düzenli aralıklarla takip etmiştir. Yaptığı takiplerde kan pıhtısının kademeli olarak granülasyon dokusu ve fibröz bağ dokusu ile yer değiştirdiğini, ancak doku oluşumunun eksik kaldığını ve tüm kök kanalını doldurmadığını buna ek olarak da dentin duvarlarının rezorptif aktiviteye yenik düştüğünü gözlemlemiştir. Bu çalışma ile istenilen rejenerasyon gözlemlenemediğinden, yirmi yıldan uzun bir süredir pulpa rejenerasyonu için araştırıcılar; dezenfeksiyon, kök kanal hazırlığı ve doldurma için gelişmiş sistemlere odaklanmıştır (Galler, 2016). 1966 yılında kanal içi dezenfeksiyon için ilk defa kombine antibiyotik pat kullanılmıştır (Rule ve Winter, 1966). Rule ve Winter yaptıkları çalışmada (1966) seanslar arasında uyguladıkları antibiyotik pat ile kanal içi dezenfeksiyonu sağlamış fakat kanal eğesinin apikalden taşması sonucu istemsiz bir şekilde kanamanın indüklenmesine sebep olmuşlardır (Rule ve Winter, 1966). Bu protokolün sonucunda ise kombine antibiyotik patlar sayesinde sağlanan dezenfeksiyonu takiben kanamanın indüklenmesiyle tüm vakalarda semptomlar azalmış ve kökün gelişiminin devam ettiği görülmüştür (Rule ve Winter, 1966). 1971 yılında yapılan başka bir çalışmada ise antibakteriyel pat ile dezenfeksiyonun ardından, apikal kanama bilinçli bir şekilde indüklenmiştir (Ostby ve Hjortdal 1971). 3 yıla kadar yapılan kontrollerde çeşitli sebeplerden dolayı çekilmiş veya apikal rezeksiyon uygulanmış dişlerde yapılan histolojik değerlendirmelerde bazı dişlerde fibröz bağ dokusu gözlenirken bazı dişlerde ise hücreli sement bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda revaskülarizasyon protokolünde dezenfeksiyonun ne kadar önemli olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır (Ostby ve Hjortdal 1971).

Skoglund ve arkadaşlarının (1978) bir köpek modelinde kök kanalında vasküler ağ gelişimi üzerine yaptıkları bir çalışmada; reimplante ve ototransplante edilen dişlerde, vasküler ağın tüm kök kanalını doldurduğunu ve sadece 3 hafta sonra koronal alana ulaştığını belirtmişlerdir. Dahası, pulpa nekrotik olsa bile, kalan pulpa dokusunun, hücrelerin kök kanalını yeniden oluşturması için bir öncü olarak önemli bir işlevi yerine getirdiğini göstermişlerdir. Ototransplantasyondan önce pulpa dokusunun kök kanalından tamamen uzaklaştırılmasının ise revaskülarizasyonu olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Dental travma alanında yapılan bu çalışma ile birlikte kök kanalında revaskülarizasyonun, kök gelişiminin tamamlanması için gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Günümüzde uygulanan rejeneratif endodontik tedaviler için klinik başarı konusunda çarpıcı yenilikler ise 1970 ve 1990 yılları arasında yapılan çalışmalardan köken alınarak geliştirilmiştir (Skoglund ve ark., 1978; Galler, 2016).

Iwaya ve arkadaşları (2001), nekrotik pulpaya sahip immatür bir dişe, uyguladıkları tedavi protokolünde herhangi bir enstrümantasyon yapılmadan, %5'lik NaOCl ve %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kimyasal dezenfeksiyon yapmış ve kanal içi antibakteriyel medikamen olarak da siprofloksasin ve metranidazol içeren antibiyotik pat yerleştirmiştirlerdir. Bu tedavi protokolü ile "revaskülarizasyon" terimi literatüre kazandırılmıştır. Buna ek olarak ilk kez tespit edilebilir derecede kök gelişiminin meydana geldiği gösterilmiş ve yapılan rutin kontrollerde ilk tedaviden 30 ay sonra dişe yapılan vitalite testlerine de pozitif yanıt alınmıştır (Iwaya ve ark., 2001).

İmmatür dişlerde rejeneratif endodontik tedavinin daha ileri girişimlerine yol açan ilk ve en önemli vaka raporu Banchs ve Trope (2004) tarafından yayınlanmıştır.

Branch ve Trope (2004) yaptıkları klinik çalışmada, immatür nekrotik pulpaya sahip premolar dişe enstrümantasyon yapmadan %5.25 konsantrasyonda NaOCl ile kimyasal dezenfeksiyon sağladıktan sonra kök kanalına antibakteriyel medikamen olarak metronidazol, siprofloksasin ve minosiklin içeren antibiyotik pat uygulayıp 28 gün boyunca bekletmişlerdir. 28 günün sonunda antibiyotik pat kanaldan serum fizyolojik ile irrigasyon yapılarak uzaklaştırılıp kanal eğesi apikalden taşırılarak kanama indüklenmiştir. Daha sonra kanama kontrolü sağlanarak oluşan kan pıhtısının üzeri mineral trioksit agregat (MTA) ile kapatılarak kavite geçici olarak restore

edilmiştir. Geçici restorasyon 14 gün sonra kaldırılarak daimi restorasyon yapılmıştır. Yapılan klinik ve radyografik kontrollerde hastada herhangi bir semptomun olmadığı kök gelişiminin devam ettiği tespit edilmiştir. İki yılın sonunda ise diş vitalite testlerine pozitif yanıt vermeye başlamıştır (Branch ve Trope, 2004).

İlk olarak 2012 yılında, immatür dişlere uygulanan tedaviler sonrası dişlerin sağ kalım oranının değerlendirildiği bir çalışmada rejeneratif protokollerin uygulandığı dişlerde %100, MTA kullanılarak apeksifikasyon uygulanan dişlerde %95 ve $Ca(OH)_2$ ile apeksifikasyon uygulanmış dişlerde ise bu oranın %77' ye düştüğü belirtilmiştir (Jeeruphan ve ark. 2012). Rejeneratif tedavi yöntemleri sayesinde immatür dişlerin ağızda kalma sürelerinin de olumlu yönde etkilendiği ilk olarak yapılan bu çalışma ile gösterilmiştir (Jeeruphan ve ark. 2012).

RET'lerle ilgili en güncel ve kabul gören tedavi protokolü ise Amerikan Endodontistler Birliği (AEB) (2018) tarafından yayınlanmıştır. Yapılan bu en güncel tedavi protokolüne göre; AEB, rejeneratif endodontik tedavilerin nekrotik ve immatür pulpaya sahip olan dişlere, koronal restorasyonu için post/kor yapısına ihtiyacı olmayan dişlere ve protokolü tamamlamak için gerekli olan medikamentler ile antibiyotiklere karşı alerjisi olmayan ve uyumlu hastalara uygulanması konusunda fikir birliğine varmıştır.

RET'ler için klinik uygulamalar aşağıdaki basamakları içermektedir (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018):

İlk Randevu:

- Lokal anestezinin ardından dişin lastik örtü ile izolasyonu sağlanıp, giriş kavitesi prepare edilmelidir.
- Kök kanalları, dezenfeksiyon için kullanılan solüsyonların periapikal boşluğa taşmasını engelleyecek bir irrigasyon tekniği kullanılarak (ör., Kapalı uçlu ve yandan perfore (açılan) iğne veya EndoVac ™) ilk olarak 20 ml NaOCl (20 ml / kanal, 5 dakika) ile daha sonra salin veya EDTA (20 ml / kanal, 5 dakika) ile irrige edilir. Apikal dokulardaki kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi en aza indirmek için irrigasyon iğnesinin ucu kök ucundan yaklaşık 1 mm

yukarıda olacak şekilde yerleştirilerek düşük NaOCl konsantrasyonu (% 1.5 veya daha az) tercih edilerek irrigasyon yapılmalıdır.

- Kanallar paper point kullanılarak kurutulur.
- Kök kanallarına $Ca(OH)_2$ veya üçlü ya da ikili antibiyotik pat yerleştirilir. Eğer üçlü antibiyotik pat yerleştirilecekse;

  1) Dişte meydana gelebilecek renklenmeyi engellemek için pulpal duvarlara dentin bonding ajan uygulaması önerilmektedir

  2) Karışım 1:1:1 oranında siprofloksasin:metronidazol:minosiklin içerecek şekilde 1-5 mg/ml konsantrasyonda olmalıdır. İkili antibiyotik pat kullanılacaksa minosiklin olmadan siprofloksasin ve metronidazol kullanılarak hazırlanmalıdır. Bir başka alternatif olarak da üçlü antibiyotik pata minosiklin yerine klindamisin, amoksisilin veya sefaklordan biri tercih edilmelidir. Hazırlanan kanal içi medikamenler kanal içine şırınga ile yerleştirilebilir.
- Son olarak ise kavite Cavit™, IRM™, cam iyonomer veya başka bir geçici dolgu materyali ile geçici olarak restore edilmelidir. Bir sonraki randevu 1-4 hafta sonrasına verilmelidir.

İkinci Randevu:

- İlk tedavi yanıtının değerlendirilmesinin ardından eğer kalıcı enfeksiyon belirtileri varsa, antimikrobiyal veya alternatif medikamenler ile ek tedavi düşünülmelidir.
- %3'lük vazokonstrüktör içermeyen mepivakain ile anestezi yapıldıktan sonra dişe lastik örtü yerleştirilerek izolasyon sağlanmalıdır.
- %17 EDTA ile (20 ml/kanal, 5 dakika) irrigasyon yapılmalıdır.
- Kök kanalları paper point ile kurutulmalıdır.
- Bir kanal eğesi apikalden taşırılarak kök kanalında kanama sağlanmalıdır. (Hedeflenen kök kanallarının mine-sement birleşimine kadar kanla dolmasıdır.) Kan pıhtılaşmasına alternatif olarak trombosit açısından zengin plazma (PRP), trombosit açısından zengin fibrin (PRF) veya otolog fibrin matriks (AFM) kullanılabilir.
- Kanal ağızlarına 3-4 mm restoratif materyal yerleştirmeye izin verecek şekilde kanama durdurulmalıdır. Gerekirse kan pıhtısı üzerine CollaPlug™, Collacote™, CollaTape™ gibi bir rezorbe olabilen matriks ve son olarak da

MTA yerleştirilmelidir. MTA renklenmeye sebep olabileceğinden yerine biyoseramikler veya trikalsiyum silikat simanlar kullanılabilir.

Kontroller (6. 12. ve 24. aylar):

Klinik ve Radyografik Değerlendirmeler;

- Ağrı, yumuşak dokuda şişlik veya fistül yolu bulunmamalıdır. (sıklıkla birinci ve ikinci randevular arasında görülür).
- Apikal radyolusensinin azalması beklenmektedir. (genellikle tedaviden 6-12 ay sonra gözlemlenir)
- Kök duvarların kalınlığında ve kök uzunluğunda artış gözlenmelidir. (genellikle kök uzunluğundaki belirgin artış genellikle 12-24 ay sonra görülür)
- Vitalite testlerine pozitif yanıt alınmalıdır.
- Konik ışınlı kompüterize tomografi ile değerlendirme ilk ve diğer kontrollerde önerilmektedir (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018).

AAE tarafından RET' lerin başarı derecesinin yorumlanabilmesi için birtakım hedefler belirlenmiştir.

- Birincil hedef: Semptomların ortadan kaldırılması ve kemik iyileşmesinin sağlanmasıdır.
- İkincil hedef: Kök duvarlarının kalınlığında ve/veya kök uzunluğunda artışın tespit edilmesidir.
- Üçüncül hedef: Vitalite testine pozitif cevap alınmasıdır (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018).

Bütün bu gelişmelere ve düzenlemelere rağmen rejeneratif endodonti alanında doku mühendisliği teknolojileri de uygulamaya sokularak rejeneratif endodontik tedavinin sonuçlarını daha da iyileştirmek ve normale en yakın fonksiyonel bir pulpa-dentin kompleksi oluşturmak amaçlanmaktadır (Ferroni ve ark., 2015). Pulpa-dentin kompleksinin başarılı rejenerasyonu, doku mühendisliğinin; kök hücreler, büyüme faktörleri ve yapı iskeleleri olmak üzere üç temel bileşenine ihtiyaç duymaktadır (Beffa ve ark., 2017).

2.2.Kök Hücreler

Kök hücreler, çoğalma yeteneği olan, kendini yenilemeyi başarabilen ve uygun koşullar altında özel hücrelere farklılaşabilen, özelleşmemiş hücrelerdir (Dulak ve ark., 2015). Buna ek olarak kök hücreler nakledildikleri dokuları işlevsel olarak prolifere etme kabiliyetine sahiptir (Gronthos ve ark., 2000). Kök hücreler birtakım temel özelliklere sahiptirler (Ilic ve Polak 2011; Avcılar ve ark., 2018):

- Kendini Yenileme: Kök hücrelerin sahip oldukları sınırsız kendini yenileme kabiliyetleri en yüksek seviyeye erken embriyonik dönemde ulaşmaktadır. Kök hücreler bölünebilme yeteneklerini sonraki jenerasyonlara aktarılabilirken farklılaşma yeteneklerinde azalma meydana gelmektedir.
- Özelleşmemiş Hücreler: Belirli bir dokuya özgü fonksiyonları farklılaşmadıkları sürece yerine getirme yeteneğine sahip değildirler.
- Farklılaşabilme: Kök hücreler kemik, kas, sinir, kan gibi birçok dokuya farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir.

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine ve elde edildikleri döneme göre ayrı sınıflamalar kullanılarak kategorize edilmektedir (Kolios ve Moodley, 2013).

2.2.1.Diferansiyasyon Yeteneklerine Göre Kök Hücreler

2.2.1.1.Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler tüm doku ve organların geliştiği; ektoderm, endoderm ve mezoderm katmanlarından ortaya çıkan bütün vücut hücrelerine farklılaşabilen hücrelerdir. Ancak totipotent hücrelerin aksine tek başlarına bir organizmayı oluşturacak potensiyele sahip değildirler. Embriyonik kök hücreler (ESCs) olarak da adlandırılan pluripotent kök hücreler ilk olarak blastokistin iç hücre tabakasından köken almaktadır (De Miguel ve ark., 2010).

2.2.1.2.Totipotent Kök Hücreler

Totipotent veya omnipotent hücreler en farklılaşmamış hücrelerdir ve erken gelişim evresinde bulunurlar. Döllenmiş bir yumurta hücresi ve ilk iki bölünmeden sonra oluşan hücreler, embriyonik ve ekstra-embriyonik dokulara farklılaşarak, embriyo ve plasenta oluştururlar. Bir organizmayı oluşturabilecek güce sahip olan bu kök hücrelere “totipotent kök hücreler” adı verilmektedir (Rossant, 2001).

2.2.1.3.İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Takahashi ve Yamanaka (2006) yaptıkları çalışma ile somatik hücrelerin yeniden programlanarak bu hücrelerden pluripotent kök hücrelerin elde edilebileceğini göstermişlerdir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, somatik hücrelerin Klf-4, c-Myc, Sox2, Oct ¾ gibi genlerle mutasyona uğratılması sonucu pluripotent özellik kazanmasıyla elde edilen hücrelerdir. Buna ek olarak Takahashi ve Yamanaka'nın (2006) çalışmasını takip eden süre içerisinde Yu ve arkadaşları (2007) Oct4, Sox2, Nanog ve Lin28 gen kombinasyonunun da indüklenmiş pluripotent kök hücre eldesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

2.2.1.4.Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler birçok dokuda bulunan ve tek bir germ katmanına ait hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Kolios ve Moodley, 2013). Kemik iliği, yağ dokusu, kemik, göbek kordonu kanı ve periferik kan dahil olmak üzere çeşitli dokulardan elde edilebilirler (Augello ve ark., 2010). Bu hücreler, adipoz, kemik, kıkırdak ve kas dokusu gibi mezoderm kökenli dokulara farklılaşabilirler (Kolios ve Moodley, 2013).

2.2.1.5.Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler, özgül bir doku içinde kendi kendini yenileyebilir ve 2 veya daha fazla farklı hücre grubu oluşturabilirler (Kolios ve Moodley, 2013). Hematopoetik kök hücreler, hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabildikleri için oligopotent kök hücrelerin tipik bir örneğidir(Kim ve ark., 2005).

2.2.1.6.Unipotent Kök Hücreler

Unipotent kök hücreler, gelişmiş bir organizmada tek bir spesifik hücre tipine farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir (Fortier, 2005). Örneğin kas dokusundaki unipotent kök hücreler yalnızca kas dokusuna farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Bentzinger ve ark., 2012). Unipotent kök hücreler, doku rejenerasyonlarında etkili olabilirler fakat büyük çapta doku harabiyetinin rejenerasyonunda pluripotent kök hücrelere ihtiyaç duyulmaktadır (Fortier, 2005).

2.2.2.Elde Edildikleri Döneme Göre Kök Hücreler

2.2.2.1.Embriyonik Kök Hücreler

ESCs, döllenmeden 5 ila 6 gün sonra implantasyon öncesi embriyonun bir aşaması olan, blastokistin iç hücre kütlesinden elde edilen pluripotent karakterde kök hücrelerdir (Kolios ve Moodley, 2013). Bu hücreler; endoderm, mezoderm ve ektoderm dokusuna farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler (Yao ve ark., 2006). Blastokist, 2 hücre katmanına, yani embriyoyu oluşturan iç hücre tabakasına ve plasentayı oluşturacak trofoblastlar olarak adlandırılan dış hücre tabakasına sahiptir (Bongso A, 2006). İç hücre tabakasından köken alan hücreler trofoblastlardan ayrılırlar ve çok spesifik koşullar altında embriyonel kök hücre hatlarını oluştururlar (Bongso A, 2006). ESCs Nanog ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörlerinin varlığı ile tanımlanmaktadır (Hambiliki ve ark., 2012). Bu faktörler, kök hücrelerin, kendini yenileme yeteneğini kaybetmeden farklılaşmamış bir halde kalmasını sağlarlar (Wang ve ark., 2012). Genetik anormallikleri olmayan farklılaşmamış bir halde kültürlenmiş ESCs; ESCs hattı olarak dondurulup-çözdürülerek çalışmalar ve tedaviler için kullanılabilmektedirler (Kolios ve Moodley, 2013). Bu bağlamda ESCs' nin kültüre edilecekleri ortam, hücrelerin farklılaşmadan kalabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Embriyonik fibroblast hücrelerinin besi ortamı ya da anti-differentiation cytokine leukemia inhibitory factor (LIF) içeren ortamların kullanılması önerilmektedir (Thoma ve ark., 2012; Heydarkhan-Hagvall ve ark., 2012). ESCs' den bu yollarla; kemik, kan, kalp ve deri gibi birtakım hücre tipleri laboratuvar şartlarında elde edilmiştir (Zabierowski ve Herlyn, 2010; Hematti, 2011; Dias ve ark., 2011; Xu ve ark., 2011). ESCs bu özelliklerinden dolayı birtakım hastalıkların tedavisi için ümit verici olsa da blastokistlerin kullanılması ile ilgili etik problemler olduğundan bu hücreler yerine yetişkin kök hücreler aynı amaçlar için tercih edilmektedir (Conrad ve Huss, 2005).

2.2.2.2.Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler (ASCs); doğum sonrası hemen hemen tüm doku ve organlarda mevcut olan, multipotent veya unipotent karakterde olan farklılaşmamış hücrelerdir (Dulak ve ark., 2015). ASCs kemik iliği, plesenta ve göbek kordun kanına ek olarak birçok dokudan izole edilebilmektedir. ASCs'lerin elde edildikleri dokulardan bazıları şu şekilde sıralanabilir:

- Kalp
- Böbrek
- Beyin
- Deri
- Göz
- Gastro-intestinal sistem
- Karaciğer
- Pankreas
- Meme
- Ovaryum
- Prostat ve testis
- Dental dokular (Blau ve ark., 2001; Rai ve ark., 2013; Pisciotta ve ark., 2015).

ASCs dokularda bulundukları mikroçevre içerisinde yüksek telomeraz aktivitesi göstermelerine rağmen, ESCs kadar yüksek bir farklılaşma potansiyeline sahip değildirler ve buna bağlı olarak progenitör hücre oluşturma kapastesileri daha düşüktür. ASCs, bulundukları dokulardaki değişikliklerden etkilenerek prolifere olabilirler veya dokuya özgü hücre çeşitlerine farklılaşabilirler (Fuchs ve ark., 2004).

ASCs' nin sayıları dokularda sınırlıdır ve doku harabiyeti veya hastalık sonucunda tahrip olmuş hücrelerin yerine geçerek dokuda homeostazın ve rejenerasyonun sağlanmasında etkilidirler. Fakat ASCs' ler, ESCs' ye oranla kültür ortamlarında uzun süre özelliklerini koruyarak prolifere olamazlar (Şimşek, 2012). En geniş ASCs kaynakları mezenkimal kök hücreler (MSCs) ve hematopoetik kök hücreler (HSCs) dir (Ateş, 2016).

2.2.2.2.1.Hematopoetik Kök Hücreler

Kan, oksijen taşıyan kırmızı kan hücreleri, immünolojik beyaz kan hücreleri ve hemostaza aracılık eden trombositler gibi çeşitli yapı ve hücreler içerir. HSCs, kendini yenileyebilme ve buna ek olarak kırmızı kan hücreleri, immünolojik beyaz kan hücreleri ve trombosit gibi kan hücrelerine farklılaşma kabiliyeti olan yetişkin kök hücreler olarak tanımlanır (Nakajima-Takagi ve ark., 2014). Son zamanlarda en göze çarpan hematopoetik hücre kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğindeki HSCs'nin üç çeşit

kök hücre topluluğunu içerdiği düşünülmektedir (Pittenger ve ark., 1999;Dieterlen-Lièvre ve ark., 2002; Reyes ve ark., 2002; Ateş, 2016).

1. Hemanjioblastlar: Hematopoetik ile endotel kök hücrelerin öncüleri
2. Mezenkimal kök hücreler: Stroma, kas hücreleri, osteoblast, kondrosit ve adipositler gelişebilir.
3. Multipotent yetişkin progenitör hücreler (MAPC): Ektoderm, mezoderm ve endodermal hücrelerine farklılaşabilirler. Bu hücre dizilerinin birbirine farklılaşabilme özelliği ile birlikte birçok farklı tipte hücre meydana gelebilir.

2.2.2.2.2.Mezenkimal Kök Hücreler

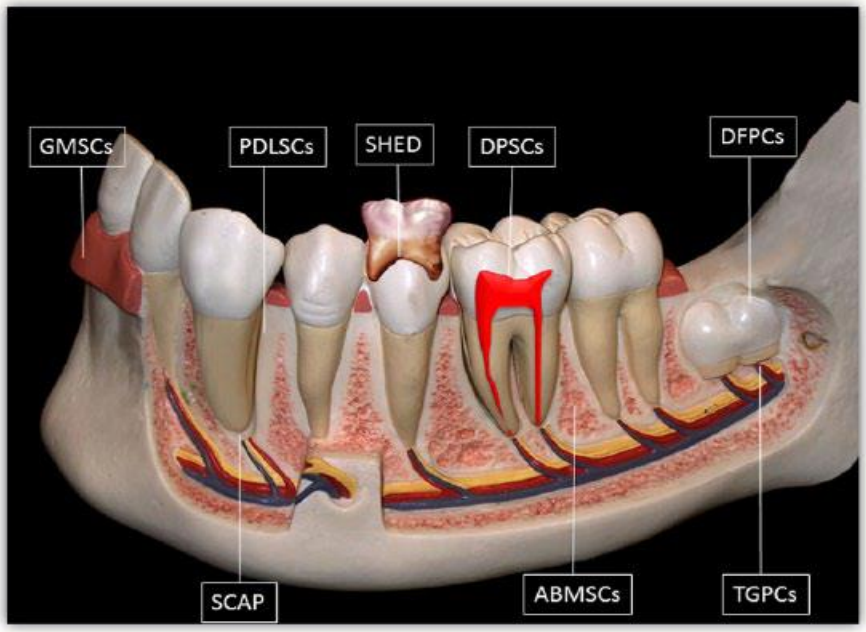
MSCs kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu ve plesenta gibi birçok biyolojik yapıdan elde edilebilen kök hücrelerdir (Naji ve ark. 2019). MSCs uygun uyaranlarla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olmak üzere üç temel hücre çeşidine farklılaşabilen; CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e (α5- integrin) gibi belirteçlerle karakterize fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir (Pittenger ve ark., 1999; Pansky ve ark., 2007). Buna ek olarak MSCs hem mezoderm kökenli olan hem de mezoderm kökenli olmayan hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir (Krause ve ark., 2001). MSCs' lerin laboratuvar çalışmalarında ve hücresel tedavi yöntemlerinde ilgi odağı haline gelmesinin başlıca sebepleri şu şekilde sıralanabilir (Kim ve Cho, 2013):

- İn-vitro kültür ortamında kök hücre özelliklerini koruyarak kolaylıkla prolifere olabilirler.
- MSCs' lerin osteoblast, kondrosit ve adiposite diferansiyasyonlarının yanında kalp, karaciğer, pankreas, sinir sistemi gibi birçok farklı doku hücresine de diferansiyasyon kapasiteleri vardır.
- Hasarlı dokulara göç etme kabiliyetinin yanı sıra göç ettikleri dokuların rejenerasyonuna ve birtakım faktörler salgılama yoluyla doku/hücre tamirine katkı sağlarlar.
- Dokularda reddedilme ihtimalinin çok düşük olması, revaskülarizasyon etkisi ile anjiyogeneze katkı sağlaması ve anti-enflamatuvar etki göstermeleri tedavi amaçlı kullanımlarını daha cazip hale getirmektedir (Naji ve ark. 2019).

2.2.3.Dental Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Diğer kök hücre kaynaklarına oranla dental dokular, etik problemlere yol açmamasından ve bu dokulardan kök hücre elde etmenin kompleks bir yöntem gerektirmemesinden dolayı son yıllarda popüler hale gelmiştir (Yalvaç ve ark., 2009; Har ve Park 2015). Diş dokusundan elde edilen MSCs' lerin sekiz ana populasyonu bulunmaktadır (Estrela ve ark., 2011; Hass ve ark., 2011):

- Diş pulpası kök hücreleri (DPSCs)
- Düşme zamanı gelmiş (eksfoliye) süt dişi pulpası kök hücreleri (SHEDs)
- Apikal papilla kök hücreleri (SCAPs)
- Dental folikül progenitör hücreleri (DFPCs)
- Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs)
- Gingival mezenkimal kök hücreler (GMSCs)
- Alveoler kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ABMSCs)
- Diş germi progenitör hücreleri (TGPCs)



Şekil 2.2.3.2: Dental doku kökenli mezenkimal kök hücre kaynakları

2.2.3.1.Diş Pulpası Kök Hücreleri

DPSCs, mezenkimal kök hücre yapısında olan yüksek proliferasyon, çoğalma ve farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent özellikli mezenkimal kök hücrelerdir (Gronthos ve ark., 2000). Ayrıca insanda ilk olarak tanımlanan yetişkin dental kaynaklı

kök hücreler DPSCs'lerdir. Çekim endikasyonu konmuş dişlerden ve sıklıkla da yirmi yaş dişlerinden veya ortodontik tedavi amacıyla çekilen dişlerden elde edilirler. Yirmi yaş dişleri, gelişimlerini en son tamamlayan dişler olduğu için, bu gelişim sürecinin erken dönemindeki pulpadan elde edilen DPSCs' lerin proliferasyon, çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri daha yüksektir (Graziano ve ark., 2008). DPSCs karakterizasyonu için;

- osteojenik farklılaşmanın erken evresinde osteopontin,
- geç mineralize doku farklılaşmasında kemik sialoprotein,
- odontoblast farklılaşmasında dentin sialoprotein ve dentin matriks proteini 1,
- kalsifiye ve mineralize doku farklılaşmasında alkalen fosfataz,
- CD14, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166 gibi belirteçler kullanılmaktadır (Gronthos ve ark., 2002; Hadaegh ve ark., 2014).

Bu belirleyicilere ek olarak STRO-1 ve telomeraz aktiviteleri, DPSCs' nin farklılaşma mevcudiyetini göstermektedir (Har ve Park 2015). Düşük telomeraz aktivitesi, DPSCs' nin farklılaştığını gösterir. Öte yandan, telomeraz aktivitesi yüksek olduğunda, DPSCs farklılaşmamıştır (Odorico ve ark., 2001).

DPSCs diş pulpası içinde normal şartlarda inaktif olmasına rağmen, pulpal dokuda bir yaralanma olduğunda aktif hale gelir. Ayrıca, diğer dental dokulardan türetilen MSCs' ler ile benzer şekilde, DPSCs birçok farklılaşma ve kendini yenileme süreçlerinden geçmektedir (Hadaegh ve ark., 2014;Har ve Park 2015). İn-vitro koşullarda DPSCs; adipositler, osteoblastlar, odontoblastlar, kondrositler, miyositler, kardiyomiyositler, aktif nöronlar, melanositler ve hepatosit benzeri hücrelere farklılaşabilmektedir (Demarco ve ark., 2011).

2.2.3.2. Düşme Zamanı Gelmiş (eksfoliye) Süt Dişi Pulpası Kök Hücreleri

Alttan sürmekte olan daimi diş sebebiyle düşme zamanı gelmiş (eksfoliye) ve çekim endikasyonu konmuş süt dişlerinden elde edilir. DPSCs ve kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler (BMMSCs) ile kıyaslandığında daha yüksek proliferasyon kabiliyetinin olduğu ve daha olgunlaşmamış multipotent hücreleri içerdiği, fakat kompleks pulpa-dentin yapısı oluşturmak için DPSCs' den daha yetersiz olduğu bildirilmiştir (Miura ve ark., 2003; Shi ve ark., 2005). SHEDs osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmalarının yanı sıra dokularda fonksiyonel

revaskülarizasyonun sağlanmasında da rol oynamaktadır (Har ve Park, 2015; Nakajima ve ark., 2018). SHEDs karakterizasyonu için kullanılan belirteçler;

- CD14, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166,
- embriyonik kök hücre belirteçleri olan Oct4 ile Nanog,
- nöral kök hücre belirteci olan nestin,
- evreye özgü embriyonik belirteçler olan SSEA- ve SSEA-4 şeklinde sıralanabilir (Har ve Park, 2015).

2.2.3.3. Apikal Papilla Kök Hücreleri

Apikal papilla, kök gelişimi gelişimi devam eden dişlerde bulunur. Dental papilla diş oluşumuna katkıda bulunur ve SCAPs, olgunlaşmamış daimi dişlerin apikal papillasından izole edilen mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerdir (Sonoyama ve ark., 2006). DPSCs ve SHEDs gibi SCAPs; STRO-1 ve CD146 belirteçleri için pozitifken CD34 ve CD45 belirteçleri içinse negatiftir (Zhai ve ark., 2018). SCAPs klonal hücre populasyonu, apikal papilla dokusunu sindirmek ve tek bir hücre süspansiyonu hazırlamak için tip I kollajenaz ve nötr proteaz kullanılarak kültürleme yoluyla elde edilebilir (Zhai ve ark, 2018). Hücreler, odontoblast benzeri hücrelere, adiposit hücrelerine ve nöron benzeri hücrelere dönüştürülmek üzere in-vitro olarak indüklenebilir (Zhai ve ark., 2018). Ayrıca, SCAPs DPSCs' lere oranla daha yüksek proliferatif kapasite ve mineralizasyon potansiyeline sahip olduğundan, doku rejenerasyonu için daha uygun olduğu düşünülmektedir (Bakopoulou ve ark., 2011). SCAPs, kök dentini yapımı devam ederken primer odontoblastların kaynağı olarak görülmektedir. Buna karşın DPSCs ise, reperatif dentinin oluşturulması için ihtiyaç duyulan odontoblastların kaynağıdır. PDLSCs'ler ile kıyaslandığında, SCAPs 3. pasajda PDLSCs'ye oranla daha yüksek bir proliferasyon kapasitesine sahipir (Han ve ark., 2010). İn vivo olarak, SCAPs' lerin dentin-pulpa benzeri kompleksler ve kemik benzeri doku üretebildikleri gösterilmiştir (Bakopoulou ve ark., 2011). Buna ek olarak, yapılan bir hayvan çalışmasının sonuçları; SCAPs ile PDLSCs' lerin birlikte kullanımının in-vivo olarak kökte meydana gelen defekti rejenere ederek kök-periodontal ligament kompleksi oluşturabileceğini göstermiştir (Sonoyama ve ark., 2006).

2.2.3.4. Dental Folikül Progenitör Hücreleri

Diş folikülü ekto-mezenkimden türeyen gevşek bir bağ dokusu kapsülüdür ve gelişmekte olan diş germini çevreler. Diş folikülü periodontal ligament hücrelerine ve osteoblastlara farklılaşabilen progenitör hücreleri içermektedir (Luan ve ark., 2006). DFPCs genel olarak üçüncü molar dişlerin keselerinden elde edilen hücrelerdir. Plastik yüzeylere tutunabilmeleri, DPSCs' lerin kültürleme sırasında insan dental foliküllerinden izole edilmesini kolaylaştırmaktadır (Morsczeck ve ark., 2005). DFPCs'lerin karakterizasyonu için Stro-1, CD105 ve CD90 ile Nestin ve Notch-1 gibi diğer mezenkimal kök hücrelerin belirteçleri kullanılmaktadır. Ayrıca, DFPCs' ler, BMMSCs' lere ve PDLSC'lere benzer multipotensi sergiler (Zhai ve ark., 2018). DFPCs, heterojenliğinden dolayı periodontal ligament (PDL) hücrelerine, osteoblastlara ve sementoblastlara farklılaşabilir. Yapılan bir çalışmada farelere transplante edilen DFPCs'lerin kollajen salgılayan PDL fibroblastlarına farklılaşarak, sement/PDL benzeri doku üretmek için bitişik kemik ve sementum yüzeyindeki fiberlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir (Handa ve ark., 2002). Ek olarak, DFPCs'lerin 15 pasajdan sonra bile morfolojik, proliferatif, immün ve mineralizasyon özellikleri devam etmektedir (Chalisserry ve ark., 2017). Bu özellikleri de, DFPCs' leri rejeneratif tedavilerde kullanımları için daha cazip hale getirmektedir (Guo ve ark., 2012).

2.2.3.5.Periodontal Ligament Kök Hücreleri

Periodontal ligament, dişler ile alveolar fossanın iç duvarı arasında yer alır ve fibröz bağ dokusu ile çevrilidir. Çoklu hücre tiplerinin varlığı, periodontal ligamentin, homeostazın muhafaza edilmesinden ve periodontal doku oluşturulmasından sorumlu olan kök hücreleri içerdiğini gösterir (Zhai ve ark., 2018). PDLSCs ilk olarak 2004 yılında mezenkimal kök hücre ile ilişkili belirteçler kullanarak keşfedilmiştir (Seo ve ark., 2004). PDLSC'ler, in-vitro olarak osteoblast benzeri hücreler, adipositler ve kollajen oluşturan hücrelere farklılaşabilirler (Chamila Prageeth Pandula ve ark., 2014). Bu hücreler, mezenkimal kök hücre belirteçleri STRO-1 ve CD146 / MUC18'i ile embriyonik kök hücre belirteçlerini eksprese eder (Chamila Prageeth Pandula ve ark., 2014). Buna ek olarak, PDLSCs' ler artmış seviyelerde tendon-spesifik transkripsiyon faktörleri eksprese ederler ve bu durum PDLSCs' lerin benzersiz postnatal mezenkimal kök hücre populasyonuna ait olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca,

PDLSC'lerin immün sistemi baskılanmış farelere transplantasyonunun, yoğun Tip I-kolajen doku içeren sement/PDL dokusu oluşturduğu görülmüştür (Seo ve ark., 2004). Bu kolajen-pozitif dokular, sharpey liflerinin fizyolojik bağlanımını taklit ettiğinden, PDLSC'ler osteoblast benzeri hücreleri, sement/PDL dokusu ve sharpey liflerinin oluşumunu indükleyebilirler (Ding ve ark., 2010). Mandibular molar dişlerin periodontal alanında cerrahi işlemler sırasında oluşturulan defektlerin tamirinde PDLSCs' ler kemotaksis yoluyla periodontal ligament boşluğuna göç ederek bu defektlerin rejenerasyonunda rol oynamaktadır. Bu durum PDLSC'lerin periodontal doku rejenerasyonunda kullanılabileceğinin bir kanıtı olarak görülmektedir (Park ve ark., 2012). PDLSCs' ler sadece kök yüzeyinde değil, aynı zamanda alveoler kemik yüzeyinde de farklılaşma ve çoğalma yeteneğine sahiptir (Wang ve ark., 2011).

2.2.3.6.Gingival Mezenkimal Kök Hücreler

Gingival doku, kimyasallar ve bakteriler gibi farklı uyaranlara karşı bir engel olarak hareket ederek önemli bir rol oynar ve skar oluşumu yerine yaralanmadan sonra MSCs' lerin dişeti dokularında bulunduğunu düşündüren eşsiz bir iyileşme süreci sergiler (Hakkinen ve ark., 2000). İlk olarak Zhang ve arkadaşları (2009) dişeti dokularında kök hücre doğasını gösteren bir progenitör/stromal hücre populasyonu izole etmişlerdir. GMSCs' lerin karakterizasyonu için CD yüzey antijenleri ile birlikte Oct-4, Sox-2, Nanog, Nestin, SSEA-4 ve Stro-1 gibi belirleyiciler kullanılmaktadır (Tang ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011). GMSC'ler, bütün kök hücrelerin temel özelliklerinden olan kendi kendini yenileme ve çok değişkenli farklılaşma özelliklerine ek olarak, benzersiz immünomodülatör fonksiyonlara sahiptir (Zhang ve ark., 2009). GMSCs'ler uzun süreli kültürlerde stabil fenotip ve telomeraz aktivitesi gösterirler ve tümörojenik değildirler (Tomar ve ark., 2010). GMSCs'ler, in-vitro olarak mineral, yağ ve kıkırdak benzeri matris oluşturma kapasitesiyle çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahiptirler (Chalisserry ve ark., 2017). GMSC'ler, mitojen stimülasyonuna yanıt olarak T hücresi proliferasyonu üzerinde güçlü bir inhibitör etki sağlama yeteneğine sahiptir. GMSC'ler kısmen interferon indükleyicisinin (IFF- γ) aracılığıyla anti-enflamatuvar etkilerini gösterir (Zhang ve ark.,2009). GMSC'lerin, klinik olarak rezeke edilmiş diş eti dokularından bir yan ürün olarak elde edilmeleri diğer dental kaynaklı MSCs' lere oranla daha kolay olduğundan; bu özellikleri GMSCs' leri daha çekici alternatifler haline getirmektedir (Zhang ve ark., 2009).

2.2.3.7.Alveoler Kemik Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

ABMSCs başarılı izolasyonu ve kültürü ilk olarak Matsubara ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş hücreler, plastisite ve koloni oluşturma özelliklerinin yanı sıra iğ şeklinde fibroblast benzeri morfolojiye sahiptirler (Matsubara ve ark., 2005). ABMSCs, CD73, CD90, CD105 ve STRO-1 yüzey belirleyicilerini eksprese ederken, hematopoetik belirleyiciler olan CD14, CD34 ve CD45 eksprese etmezler (Park ve ark., 2012;Mason ve ark., 2014). ABMSCs yüksek alkalin fosfataz (ALP) ekspresyonu ile osteoblastik farklılılaşmaya uğrayabilirler (Matsubara ve ark., 2005). Buna ek olarak diğer kök hücre populasyonlarına benzer şekilde kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri vardır (Pekovits ve ark., 2013).

2.2.3.7. Diş Germi Progenitör Hücreleri

TGPCs, çan döneminde üçüncü molar diş germinin diş mezenkiminde tanımlanan bir kök hücre populasyonudur (Ikeda ve ark., 2008). TGPCs populasyonları, iğsi şekildeki morfolojilerini ve yüksek çoğalma oranlarını koruyarak, yaklaşık 60 pasaja kadar genişletilebilir ve muhafaza edilebilirler (Chalisserry ve ark., 2017). TGPCs’ lerin karakterizasyonu için, MSCs ilişkili belirleyiciler olan STRO-1, CD' ler ve mezenkimal fenotip gösteren pluripotansif ilişkili genler (nanog, okt4, sox2, klf4 ve c myc) kullanılır (Güven ve ark., 2013). Ayrıca TGPCs, adipositler, osteoblastlar/odontoblastlar, kondrositler ve nöronlara farklılaşma kabiliyeti de dahil olmak üzere, diğer dental MSCs' lere benzer şekilde birçok doku hücresine farklılaşma kapasitesine sahiptirler (Chalisserry ve ark., 2017).

2.3.Rejeneratif Endodontik Tedavilerde Uygulanan Klinik Prosedürler

RET'in klinik protokolü, yayınlanan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir ve bu farklı tedavi protokolleri farklı sonuçlara neden olabilmektedir (Kontakiotis ve ark. 2015). Bu nedenle literatürde RET'lerin sonucunu değerlendirmek imkansız hale gelmektedir. İntrakanal kan pıhtısının varlığı veya yokluğu ile RET'te kullanılan irrigasyon solüsyonlarının konsantrasyonları ve intrakanal ilaç türünden bağımsız olarak, farklı tedavi protokollerinin kanal duvarlarının kalınlaşmasını ve kök gelişiminin devam etmesi konusunda kesin bir başarı sağlamamasına rağmen klinik semptomların ve apikal periodontitisin ortadan kaldırılmasını sağlayabilmiştir (Diogenes ve ark., 2013).

AAE, klinisyenlerin nekrotik pulpa ve apikal periodontitis gözlenen olgunlaşmamış daimi dişleri tedavi etmelerine rehber olabilmek amacıyla "Rejeneratif Prosedür için Klinik Protokol" yayınlamıştır. Bununla birlikte, AAE ayrıca bu hususların olası bir bilgi kaynağı olarak görülmesi ve bu alanın hızlı gelişen doğası göz önüne alındığında; klinisyenlerin, başka yerlerde de erişilebilir kaynaklar olduğunda yeni bulguların aktif olarak gözden geçirmesi gerektiğini vurgulamaktadır (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018). Artan kök kanalı duvarı kalınlığı ve / veya artan kök uzunluğu, AAE tarafından istenen bir RET sonucu olarak gösterilse de; avrupa endodondistler birliği, kök kalınlığının ve uzunluğunun artmasının bir dizi başarı kriterinden yalnızca biri olarak kabul etmektedir (Galler ve ark., 2016). RET için hem klinik hem de araştırma perspektifinden standart bir klinik protokol ve kesin sonuç kriterleri gerekmektedir (Galler ve ark., 2016).

Rejeneratif endodontik tedavilerle pulpası nekroze olan immatür daimi dişlerin kök kanalının dezenfeksiyonunun sağlanması ve apikalden kanamanın indüklenmesiyle; apikal lezyonların iyileştirilmesinin yanı sıra kök gelişiminin devam etmesi ve pulpa benzeri doku sayesinde dişe canlılığının geri kazandırılması amaçlanmaktadır (Diogenes ve ark., 2013). Rejeneratif endodontinin doğuşundan günümüze kadar gelen süreç içerisinde yapılan vaka raporu çalışmalarının büyük çoğunluğunda kök gelişiminin devam ettiği ve apikaldeki lezyonun gerilediği bildirilmiştir (Fang ve ark., 2018). Rejeneratif endodontik uygulamalarda başarılı sonuçların alınabilmesi;

- kök kanal sisteminin dezenfeksiyonu,
- pulpa benzeri dokunun oluşabilmesi için apikal kanamanın indüklenmesiyle kök hücrelerin prolifere olmasını sağlayacak olan yapı iskelesinin oluşturulması,

gibi faktörlere bağlıdır (Banchs ve Trope, 2004).

2.3.1.Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonu

Klinisyenler genellikle RET'lerde enfekte olmuş kök kanallarından mekanik yöntemlerle debrislerin uzaklaştırılmasına karşı çıkmaktadır. Bu prosedürlerde, geleneksel endodontik tedaviye benzer şekilde, mikrobiyal kontrol çok önemlidir. Aşırı hassas ve az gelişmiş kök duvarları olan dişler, mekanik enstrümantasyon için

bir kontrendikasyon oluşturur. Bunun sonucu olarak, kimyasal debridman RET'lerde dezenfeksiyonun ana şekli olmaya devam etmektedir (Diogenes ve ark., 2014). Bu amaçla kullanılan irrigasyon solüsyonları;

- Geniş bir antimikrobiyal spektruma ve yüksek etkinliğe sahip olmalı,
- Proteinleri ve nekrotik dokuyu çözebilmeli,
- Aletlerle erişilemeyen alanlara ulaşmak için düşük yüzey gerilimine sahip olmalı (dentin tübülleri),
- Rezidüel bakteriler, tedavi sonrası hastalığın tekrarlama nedenlerinden biri olabileceğinden, kullanılan irrigasyon solüsyonu uzun süreli antibakteriyel etki sunmalı,
- Kök kanallarından debrisleri uzaklaştırabilmeli,
- Antijenik, toksik ve kanserojen olmamalıdır (Kandaswamy ve Venkateshbabu, 2010; Vianna ve ark., 2006).

Bu amaçla RET’lerde NaOCl, CHX ve EDTA gibi irrigasyon solüsyonları kullanılmaktadır (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018).

2.3.1.1.Sodyum Hipoklorit

NaOCl, RET'ler dahil olmak üzere endodontik prosedürlerde kimyasal debridman için en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonudur (Diogenes ve ark., 2013). Diş hekimliği klinik uygulamalarında %0.5 ile %6 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır (Williamson ve ark., 2009). Mükemmel antibakteriyel etki, doku çözme kapasitesi ve endodontik aletler için etkili lubrikasyon gibi istenen özelliklere sahiptir (Vianna ve ark., 2006). Antibakteriyel etki ve doku çözme kapasitesi, tipik olarak asgari veya hiç mekanik preparasyon içermeyen, RET'lerde immatür dişlerin dezenfeksiyonu için çok önemlidir (Vianna ve ark., 2006). NaOCl’nin yapısındaki klorin (güçlü bir oksidan), temel bakteriyel enzimlerin sülfidril (SH) gruplarının geri dönüşümsüz oksidasyonuna yol açarak bu bakteriyel enzimleri inhibe eder ve antimikrobiyal etki gösterir. NaOCl, su ve tuz oluşturan amino asitleri nötralize eder ve bu reaksiyon nötralizasyon reaksiyonu olarak adlandırılır. Hidroksil iyonlarının çıkışı ile pH'da bir azalma meydana gelmektedir (Heling ve ark., 2001). Hipokloröz asit, NaOCl çözeltisinde bulunan bir bileşik olup; organik doku ile temas ettiğinde bir çözücü olarak hareket eder ve protein amino grubuyla kombine edilen

kloru serbest bırakarak hücre metabolizmasına müdahale eden kloraminleri oluşturur. Hipokloröz asit ($HOCI^-$) ve hipoklorit iyonları (OCl^-), amino asit gruplarının komponentlerine ayrılmasına ve hidrolize yol açar. NaOCl'nin yüksek pH'sına (hidroksil iyonları etkisi) dayanan antimikrobiyal etkinliği, kalsiyum hidroksitin etki mekanizması ile benzerlik göstermektedir (Estrela ve ark., 2002). Yüksek pH'lı NaOCl; sitoplazmik membran bütünlüğünde geri dönüşümsüz bir enzimatik inhibisyon, hücre metabolizmasında biyosentetik değişiklikler ve lipidin peroksidasyonunda gözlenen fosfolipidlerin komponentlerine ayrılmasına öncülük etmektedir (Radcliffe ve ark., 2004). Kloraminleri oluşturan amino asitin kloraminasyonu, hücresel metabolizmaya müdahale ederek birtakım reaksiyonlara sebep olur. Bu reaksiyonlardan biri olan oksidasyon, hidrojeni klor ile değiştirerek geri dönüşümsüz bakteriyel enzimatik inhibisyonu teşvik eder (Radcliffe ve ark., 2004). Bu enzim inaktivasyonu, klorun amino grupları ile reaksiyonu ve bakterinin sülfidril enzim gruplarının (sistein) geri dönüşümsüz oksidasyonu içinde gözlemlenebilir (Mohammadi, 2008). Bu nedenle, NaOCl, hidroksil iyonları ve kloraminasyon içeriğinden kaynaklanan geri dönüşümsüz inaktivasyonu destekleyen bakteriyel esansiyel enzimatik bölgeler üzerine etki ederek antimikrobiyal aktivite gösterir. Sodyum hipoklorit lipitleri parçaladığında; yağlı asitleri, sabun ve gliserol ile sonuçlanan, organik dokunun çözünmesi olarak da adlandırılan sabunlaştırma reaksiyonuna sebep olur (Mohammadi, 2008). Bu antibakteriyel etkinin kök kanallarında görülebilmesi için %1, %2.5 ve %5 gibi çok çeşitli konsantrasyonlarda NaOCl solüsyonları kullanılmaktadır. Bu konsantrasyonlarla ilgili yapılan çalışmalar ise her üç konsantrasyonda da NaOCl'in istenen düzeyde antibakteriyel etkinlik gösterdiğinin kanıtı niteliğindedir (Siqueira ve ark., 2000).

2.3.1.2.Klorheksidin

CHX, 1940'ların sonlarında Birleşik Krallık'ta geliştirilmiştir ve kök kanal dezenfeksiyonu ile endodontik enstrümantasyon sırasında NaOCl'nin yerini alacak umut verici bir irrigasyon ajanı olarak önerilmiştir (Davies ve ark., 1954). CHX antibakteriyel özellikleri sebebiyle, farklı ağız hastalıklarında yardımcı bir tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır. CHX ayrıca mükemmel antiseptik özelliklere sahiptir ve periodontal hastalığı olan bireylerde dental biyofilmin kimyasal kontrolünde kullanılmaktadır. CHX' in bir endodontik irrigant olarak ana kısıtlaması, pulpa

dokusunu çözememesidir (Okino ve ark., 2004; Rôças ve Siqueira, 2011). CHX' in bu olumsuz özelliğine rağmen, CHX ile irrige edilen dentin, antibakteriyel olarak daha kararlı bir yapı kazanır. CHX tarafından salınan pozitif yüklü iyonların emilimi, dentin yüzeyinde bakteriyel kolonizasyonu önler ve bu etki CHX uygulamasından sonra da devam eder (Athanassiadis ve ark., 2007). CHX, lipopolisakkaritler ve fosfolipitler ile bakterinin hücre zarında etkileşime giren hidrofobik ve lipofilik bir moleküldür (Gomes ve ark., 2001). CHX'in yararlı etkileri, pozitif yükünün bakteri hücre duvarları üzerinde negatif yüklü fosfat ile etkileşimi ve bakteri hücrelerinin ozmotik dengesini değiştirme kabiliyetine bağlıdır. Bu durum hücre duvarı geçirgenliğini artırır ve CHX'in hücrelere girmesine izin verir. Yüksek konsantrasyonlarda (≥2%), CHX sitoplazmik içeriklerin çökelmesine neden olduğu için bir bakterisittir; daha düşük bir konsantrasyonda (% 0.2) ise fosfor ve potasyumun hücre yapılarından sızmasına neden olarak bakteriyostatik etki gösterir (Athanassiadis ve ark., 2007). NaOCl' ye ek olarak CHX, PDL ve gingival fibroblastları olumsuz etkileyen başka bir endodontik irrigantdır (Chang ve ark., 2001; Tsourounakis ve ark., 2013). CHX'e bağlı anafilaktik reaksiyon olasılığı dikkat edilmesi gereken önemli komplikasyonlardan bir tanesidir (Torricelli ve Wüthrich, 1996). Buna ek olarak ciltte, CHX' e maruz kaldıktan sonra Quincke ödemi ve ürtiker gibi akut alerjik reaksiyonlar görüldüğü bildirilmiştir (Snellman ve Rantanen, 1999).

2.3.1.3.EDTA

EDTA, son irrigant olarak NaOCl'den sonra genellikle jel ve solüsyon gibi çeşitli formlarda ve iki ve üç değerlikli metal iyonlarının bağlarını ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir şelasyon amino asitidir (Haapasalo ve ark., 2014). EDTA dört karboksilat ve iki amin grubu ile metallere bağlanır ve özellikle manganez (Mn), bakır (Cu), demir (Fe), kalsiyum (Ca) ve kobalt (Co) ile güçlü kompleksler oluşturur. EDTA normal şartlarda, bir poli aminokarboksilik asit olup; renksiz, suda çözünür bir katıdır. Diş hekimliği uygulamalarında kullanılmasının asıl nedeni ise, Ca^{+2} ve Fe^{+3} gibi metal iyonlarının ayrışmasını sağlayan bir altı dişli ligand ve şelasyon ajanı olmasıdır (Mortazavi ve ark., 2012). Dentinde bulunan Ca^{+2} iyonlarını da şelasyon yoluyla ortadan kaldırarak demineralizasyona neden olur ve sonuç olarak kök kanallarının dentin geçirgenliğini arttırır (Serper ve Çalt, 2002). EDTA, %5 ile %17 arasında değişen konsantrasyonlarda ve diğer irrigantlarla birlikte kullanılır (Haapasalo ve ark.,

2014). Şelasyon ajanlarının etkinliği genellikle; kök kanal uzunluğu, malzemenin penetrasyon derinliği, dentin sertliği, uygulama süresi, pH ve konsantrasyon gibi birçok faktöre bağlıdır (Serper ve Çalt, 2002). Smear tabakasının çıkarılması için önerilen süre yaklaşık iki dakikadır, ancak kalın tabakalar veya rejeneratif endodontik uygulamalar (kanal başına 5 dakika) daha uzun irrigasyon süreleri gerektirebilir (Hülsmann ve ark., 2003). Smear tabakası; nekrotik ve enfekte olmuş kök kanalının enstrümentasyonu sırasında mikropları ve mikrobiyal antijenleri içerdiği için kök kanallarından uzaklaştırılmalıdır (Haapasalo ve ark., 2014). EDTA' nın dentin ile 5 dk teması sonucunda ise, 20-30 µm derinlikle sınırlı olacak şekilde dekalsifiyona sebep olabildiği bildirilmiştir (Mohammadi ve ark., 2013). EDTA sadece dentin ve smear tabakasının (hidroksiapatit) inorganik kısmını etkiler ve smear tabakasının tamamen uzaklaştırılması, yalnızca NaOCI ile birlikte son irrigant olarak EDTA' nın kullanılmasıyla elde edilebilir (Haapasalo ve ark., 2012).

2.3.2.Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonuyla İlgili Alternatif Yaklaşımlar

Pulpal periapikal lezyonların patogenezinde mikroorganizmaların önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır (Mohammadi ve ark., 2017). Enfekte kanaldaki mikroorganizmaların miktarındaki azalma, çeşitli enstrümantasyon teknikleri, irrigasyon solüsyonları ve intrakanal antimikrobiyal ilaçların kullanımını gerektirir (Mohammadi ve ark., 2017). Kanalın mekanik olarak hazırlanması, özellikle kompleks anatomisi olan olgularda ve özellikle endodontik rejeneratif uygulamalarda, bakterisiz bir kanalı indükleyemez (Peters ve ark., 2001). Tersine, ex vivo ve klinik dökümanlar kanalın mekanik olarak hazırlanmasının kanal duvarlarını dayanıksız hale getirdiğini ve bu mekanik prosedürle bakterilerin tamamen uzaklaştırılmasının tek başına mümkün olmadığını göstermiştir (Peters ve ark., 2001).

Bu nedenle, mikroorganizmaları öldürmek ve artık dokuları çıkarmak için dezenfeksiyon/irrigasyon zorunludur (Mohammadi ve ark., 2017). Kanal içi dezenfeksiyon için dental lazer sistemleri ve ozonlanmış su gibi geleneksel uygulamalara oranla daha doku dostu sistemler alternatif olarak önerilmektedir (Estrela ve ark., 2007; Bahrololoomi ve ark., 2017).

2.3.2.1.Ozon

1839'da, Christian F. Schonbein, ilk olarak bir elektrik kokusu ile keskin bir gazın ortaya çıktığını fark etti. Daha sonra, 1857'de Wener Von Siemens bir ozon jeneratörü tasarladı. Oksijen/ozon tedavisi, insanlar üzerinde uzun bir araştırma geçmişi ile klinik ve terapötik uygulamalarda kullanılmaktadır. İlk tıbbi uygulama ise 1870'de Lender' in test tüplerinde kanı saflaştırmaya başlamıştır. Bu uygulamadan sonra ise Avrupa ve Amerika'da ozonun kullanıldığı tıbbi uygulamalar yaygınlaşmıştır. Fisch, 1930'da İsviçre'de diş hekimliğinde düzenli olarak ozon kullandı (Sanini, 2011).

Ozon (O_3), üç oksijen atomu ve 47.98 g/mol molekül ağırlığı olan üç atomlu bir moleküldür. Termodinamik olarak, bu molekül, belirli sıcaklık ve basınç koşullarında kısa bir yarı ömür ile saf oksijene ayrışan oldukça kararsız bir bileşiktir (Bocci, 2006). Ozon, yoğunluk olarak oksijenden 1.6 kat daha yoğun ve buna ek olarak suda oksijenden 10 kat daha fazla çözünür (570 mg/L). Ozon radikal bir molekül olmamasına rağmen, florin ve sülfattan sonra en güçlü üçüncü oksitleyicidir (Bocci, 2006). Ozon doğal olarak moleküler oksijenin (O_2) aktif oksijen atomlarına foto-ayrışma yoluyla ayrılmasıyla üretilir ve daha sonra oksijen molekülleri ile reaksiyona girer. Bu geçici radikal anyon hızla protonlanır, hidrojen trioksit (HO_3) üretir ve bu da daha güçlü bir oksidan olan hidroksil radikaline (OH^-) ayrışır (Mohammadi ve ark., 2013).

Klinik ortamda, bir oksijen/ozon jeneratörü oksijeni elektriksel deşarj alanıyla yıldırım stimüle ederek ozona dönüştürür. Ozon gazı ise yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir ve bu özelliğinden dolayı bakterilere, virüslere, mantarlara ve protozoalara karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanıldığında sodyum hipokloritin antibakteriyel etkinliğinin ana bileşeni klorinden 1,5 kat daha etkilidir ve aynı zamanda özellikle rejeneratif endodontik uygulamalarda pulpa benzeri doku rejenerasyonun sağlanabilmesi için önemli olan kan akışının ve immün sistemi de uyarabilme kabiliyetine sahiptir (Mohammadi ve ark., 2013).

Ozon, aşağıdaki formlarda oral dokulara uygulanmaktadır:

- Ozonlanmış su,
- Ozonlanmış zeytinyağı,

– Oksijen/ozon gazı.

Ozonlanmış su ve zeytinyağı uygulandıkları tedavilerde, oksijen / ozon yakalama ve bırakma kapasitesine sahip olan ideal bir dağıtım sistemi olarak görev almaktadır. Bu uygulama şekilleri, bireysel olarak veya dental hastalığı tedavi etmek için kombinasyon şeklinde kullanılır (Seidler ve ark., 2008).

Ozonlanmış Su

Ozonlanmış su bakteri, mantar, protozoa ve virüslere karşı güçlü bir antimikrobiyal madde olarak bilinir (Kim ve ark., 1999). Ozonun sulu fazdaki avantajları; etki gücü, kullanım kolaylığı, mutajenik olmaması, hızlı antimikrobiyal etki göstermesi ve tıp ile diş hekimliğinde kullanılan aletler için dezenfeksiyon çözeltisi olarak kullanılmaya uygun olmasıdır (Nagayoshi ve ark., 2004). Buna ek olarak ozonlanmış su, gram pozitif ve negatif oral mikroorganizmalar ve Candida Albicans'ın yaşayabilirliğini azaltarak oral enfeksiyonların kontrol altına alınmasında kullanılmaktadır (Restaino ve ark., 1995). Yapılan çalışmalar ozonlanmış suyun bütün bu antibakteriyel özelliklerine ek olarak doku iyileşmesinde etkili olduğunu ve hücreler üzerinde proliferatif etki yarattığını göstermektedir (Huth ve ark., 2006).

Tıpta Ozon Uygulamaları

Ozon gaz formunda uygulandığında, alerjik solunum yolu hastalıkları olan hastalarda hem akciğer fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemekte hem de enflamatuvar hava yolu yanıtlarında artışa sebep olmaktadır (Holz ve ark., 2002). Gaz formunda O_3'ün güvenli kullanımı için özel uygulama teknikleri geliştirilmiştir. Başka bir deyişle, gaz ozonunun taşınmasında ve yönetilmesindeki zorluk nedeniyle, etkinliğini arttırmak için bazı yöntemler ve cihazlar tanıtılmıştır (Mohammadi ve ark., 2013). Örneğin, derideki yaraların tedavisi gibi lokal uygulamalarda, pratik ve kullanışlı bir yöntem olarak transkütanöz O_3 gazı uygulaması önerilmektedir; kapalı bir sistem sayesinde düşük (subatmosferik) basınçta, ortam havasına ozon kaçışı olmadan uygulama sağlanmaktadır (Elvis ve Ekta, 2011). Ozonlanmış su özellikle dental uygulamalarda, bir sprey olarak veya sıkıştırılmış formda uygulanır (Mohammadi ve ark., 2013). Ozon, esas olarak bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve sistemik olarak uygulanan rektal insüflasyonun dışında, oto-hemoterapi

gibi sistemik bir tedavi seçeneği olarak da kabul görmektedir. Bu şekilde hücre metabolizmasını aktive ederek iyileşmeyi hızlandırır. Ayrıca ozon, lokomotor sistemdeki ağrıların tedavisinde kas içi veya eklem içine enjeksiyonlar şeklinde destekleyici olarak uygulanmaktadır (Bocci, 2006).

Diş Hekimliğinde Ozon Uygulamaları

Ozon, diş hekimliğinde gaz veya sıvı formda uygulanan çeşitli tedavi yöntemlerinde tedaviye yardımcı olarak kullanılmaktadır. Ozon bu şekilde, geleneksel tedavilere ek olarak kullanıldığında büyük avantajlar sağlamaktadır (Virtej ve ark., 2007). Ozonun karyojenik bakterilere karşı ciddi bir antibakteriyel etkisi vardır ve bu da çürük oluşumuna sebep olan asidojenik bakterilerin yok edilmesine neden olur (Das, 2011). Ozon, çürük oluşumu sırasında asidojenik bakteriler tarafından üretilen pirüvik asiti, remineralizasyonu destekleyen asetik aside dekarboksilatlayabilir (Das, 2011). Yüksek çürük riski olan hastalarda ozon ile yapılan tedavi, çürük ilerlemesini önemli ölçüde azalttığından koruyucu diş hekimliği klinik uygulamalarında yerini almıştır (Zaura ve ark., 2007). Kavitasyon göstermeyen çürük lezyonları, kavitasyonlu çürük lezyonlarından daha fazla remineralize olma kapasitesine sahiptir (Zaura ve ark., 2007). Çalışmalar, ozon uygulamasının, kavitasyon göstermeyen çürük lezyonlarını klinik olarak tersine çevirebileceğini göstermiştir (Holmes ve ark., 2003; Baysan ve ark., 2004). Buna ek olarak, ozon tedavisinin, noninvaziv olmasının, geleneksel diş hekimliğine kıyasla hastada anksiyete durumunu tetiklemediği de belirtilmektedir (Dahnhardt ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda ozonlanmış suyun insan oral epitel hücreleri, gingival fibroblast hücreleri ve periodontal hücreler üzerinde yüksek biyo-uyumluluk kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Ebensberger ve ark., 2002; Huth ve ark., 2006). Ozonun ağız boşluğunda epitelyal yara iyileşmesi üzerindeki etkisi Filippi (1997) tarafından gözlenmiştir. Ağız mukozasındaki iyileşme hızını arttırmak için günlük olarak ozonlanmış suyun kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu etki, post-operatif ikinci günde dahi görülebilmektedir. Ayrıca yapılan bu çalışmanın sonuçları ozon tedavisi uygulanan hastaların, kontrol grubuna kıyasla, daha hızlı ve sistemik ilaç ihtiyacı olmaksızın oral lezyonlarının iyileştiğini desteklemektedir (Flippi, 1997). Diş çekildikten sonra ozon uygulaması çekim sonrası gözlenen komplikasyonları

azaltmaktadır (Sivalingam ve ark., 2016). Peri-implantitisin önlenmesi için yeterli ve düzenli bir plak kontrol rejimi sağlanmalıdır. Ozon, güçlü antimikrobiyal özelliği sayesinde peri-implantitise neden olan mikroorganizmaları öldürür. Ayrıca, ozon doku kanlanmasının artmasına bağlı olarak pozitif bir yara iyileşme etkisi gösterir (İşler ve ark., 2018). Ozonun kemik metabolizması ve kemiğin onarım süreci üzerinde olumlu bir etkisi vardır. Kronik mandibular osteomyelitli hastaların medikal ozona maruz kalmalarının nonspesifik direnç ve T-hücresel bağışıklığın daha tam ve hızlı normalleşmesini sağladığı, böylece klinik tedaviyi hızlandırarak komplikasyonların insidansını azalttığı görülmüştür (Agapov ve ark., 2001). Avulse dişlerin izotonik olmayan ozonlanmış su ile iki dakika yıkanması sadece mekanik temizlik sağlamakla kalmaz, aynı zamanda replantasyondan önce diş yüzeyinde kalan periodontal hücreler üzerinde hiçbir olumsuz etkisi olmaksızın kök yüzeyinin dezenfeksiyonunu sağlar (Ebensberger ve ark., 2002). Cardoso ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (2008) ise, C.albicans, E. faecalis ve kök kanallarından endotoksinlerin giderilmesinde ozonlanmış suyun etkinliği değerlendirilmiştir. Bulgular, ozonlanmış suyun hem C.albicans hem de E.faecalis'e karşı uygulandıktan hemen sonra etkili olduğunu ortaya koymuştur (Cardoso ve ark., 2008). Huth ve arkadaşları (2006), planktonik ortamda ve tek-tür biyofilmlerde kültürlenen E.faecalis, C.albicans, Peptostreptococcus micros ve Pseudomonas aeruginosa'ya karşı ozonlanmış suyun ve gaz formunda ozonun etkinliğini değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, gaz formda ozonun ve ozonlanmış suyun, test edilen mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu ve endodontik dezenfeksiyon için kullanılabileceğini göstermiştir (Huth ve ark., 2006).

2.3.2.2.Lazerler

1955’te Gordon ve arkadaşları, elektromanyetik spektrumda mikrodalgaların uyarılmasını ilk gösterenlerdi. 1958 yılında, Schawlow ve Townes, görünür ya da optik kısımlarda ve foton veya kızılötesi formunda radyant enerjinin yayılmasını uyarmanın mümkün olduğunu ortaya çıkarmıştır ki bu durumda hızla lazerin gelişmesine yol açmıştır. Bu çalışmalar ışığında, bir flaş lambasından gelen yoğun ışık darbeleriyle bir yakut çubuğun uyarılması esasına dayanarak çalışan ilk lazer 1960 yılında Maiman tarafından geliştirilmiştir. 1960'lı yılların başlarına gelindiğinde, diş sert ve yumuşak dokularla ilgili temel lazer parametreleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yıllarda lazer sistemlerde aktif madde olarak rutin kullanılan tek materyal sentetik yakut

olduğundan, mine ve dentin ile doku etkileşimini araştırmak için yakut lazer kullanılmıştır (Mohammadi, 2009). Yakut lazerin diş hekimliğinde potansiyel kullanımlarını araştıran ilk araştırmacılar ile Goldman ve arkadaşlarıydı (1964). Yakut lazer ile yapılan ilk deneylerden sonra, klinisyenler argon (Ar), karbon dioksit (CO_2), Neodiyum: Yttriyum-aliminyum-garnet (Nd: YAG) ve Erbium: Yttriyum-aliminyum-garnet (Er: YAG) lazerleri de içeren diğer lazer tiplerini de kullanmaya başlamışlardır (Sulewski, 2000). Endodontide ilk lazer kullanımı, yüksek güçlü kızılötesi karbon dioksit (CO_2) lazer ile apikal foramenin in-vitro kapatılmasını çalışan Weichman ve Johnson tarafından bildirilmiştir (Weichman ve Johnson, 1971).

LAZER, "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (Uyarılmış Işımanın Yayımı ile Işığın Güçlendirilmesi) kısaltmasıdır (Mohammadi, 2009). Lazer ışığı, tek bir foton dalga boyundan meydana gelmektedir (Aoki ve ark., 2004). Lazer ışınının oluşması, uyarılmış bir atomun uyarılarak foton yayması esasına dayanmaktadır. Bir fotonun bir atom tarafından yayılması, bir sonraki fotonun salınmasını ve benzerlerini uyarır. Bu uyarılmış ışıma, doğada başka hiçbir yerde bulunmayan uyumlu (eşzamanlı dalgalar), monokromatik (tek dalga boyu) ve ışığın toplanmış formunu (paralel ışınlar) üretir (Mohammadi, 2009). Lazerin uygulandığı dokudaki etkisi uygulanma süresine, dalga boyuna, gücüne, enerjisine, tipine ve moduna bağlıdır (Goldman, 1964). Dalga boyu, dalga üzerinde aynı fazdaki iki nokta arasındaki uzaklık olarak tanımlanır (Coluzzi, 2004). Lazerler ise ışık enerjisini yoğunlaştırabilir ve dokuları doğal ışıktan çok daha düşük bir enerji seviyesinde güçlü bir şekilde etkileyebilir (Mohammadi, 2009). Yayılan foton, fotonun saçıldığı elektronun o andaki enerjisinin durumuna bağlı olarak belirli bir dalga boyuna sahiptir. Aynı durumdaki elektronlu iki özdeş atom, aynı dalga boylu fotonları serbest bırakır. Buna bağlı olarak lazerin özellikleri de dalga boyuna bağlıdır. Işık dalga boylarına göre mor ötesi, görünür ışık ve kızıl ötesi şeklinde kategorize edilebilir. Elektromanyetik spektrumun ultraviyole bölümünden yayılan bu dalga boyları ise, endodontik tedavinin dezenfeksiyon aşamasında ümit verici görünmektedir (Clayman ve Kuo, 1997).

Lazer uygulamalarında enerji birimi olarak 'Joule' (J) ve 'milijoule' (mJ) (1 J=1000 mJ) kullanılmaktadır (Goldman ve ark., 1964, Coluzzi 2004). Fotonların

taşıdıkları enerji miktarı dalga boyuyla ters orantılı olacak şekilde; dalga boyu kısaldıkça artmaktadır (Monroe, 2002). Lazerin gücü 'Watt' (W) ile ifade edilmektedir. Watt birim zamanda yapılan işi ifade etmektedir. Frekans; lazer ışığının uygulandığı bölgeye ulaşırken saniyede meydana gelen atımın sayısıdır ('pulse per second' (pps) veya 'Hertz' (Hz)) (Coluzzi 2008).

Lazer uygularken göz önünde bulundurulması gereken en önemli noktalardan birisi, uygulama sırasında kullanılacak parametrelerin uygulanacak bölgeye ve uygulama amacına uygun seçilmesidir (Coluzzi, 2004; Convissar, 2004). Işık yoğunluğu veya ışık konsantrasyonu olarak da adlandırılan güç yoğunluğu; birim alanda bulunan foton konsantrasyonudur ve w/cm^2 olarak ifade edilir (Convissar, 2004). Lazer atımının süresi uygulanan dokuda ısıyı aşırı derecede yükseltmemek amacı ile kesintili (pulse) ve daha düşük enerji seviyelerinde sürekli (continuous) olarak uygulanabilir. Örneğin sert doku lazerlerinin atım süreleri mikro saniyeler ile ifade edilir. Sert dokuya göre daha az enerji uygulanan yumuşak dokularda ise uygulama şekli sürekli ve bununla birlikte süresi ise daha uzun olabilmektedir (Dederich, 1993). Atım süresi kısa olan lazerlerde güç yerine her atım için birim alandaki enerji miktarı şeklinde ifade edilen enerj yoğunluğunu (j/cm^2) kullanmak daha doğrudur (Özcan ve Sevimay, 2016). Dental uygulamalarda mine, sement ve dentin gibi dişetine oranla daha sert dokularda lazerin farklı enerji seviyelerinde kullanılması gerekmektedir. Farklı hücreler ve dokular yapıları nedeniyle lazer ışığınının hedeflenen bölgede farklı oranlarda yayılmasına sebep olduğundan lazerin atım ve uygulanma süresinin yanı sıra dalga boyunun ve gücünün de tedaviye uygun seçilmesi doku veya hücresel yanıtın doğru olabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Coluzzi, 2004; Convissar, 2004).

Lazer Doku Etkileşimi

Lazer doku etkileşiminin mekanizmasını anlamak için fotonların dokuya nasıl nüfuz ettiğine ve fiziksel davranışlarının nasıl olduğuna hakim olmak gerekmektedir. Fotonlar doku yüzeyine çarptığında, kırılma indeksi değişimi nedeniyle fotonların bir kısmı (% 4 ile 10 oranında) yansır. Yüzeye nüfuz eden fotonlar daha yüksek kırılma kapasitesine sahip olan bir ortama girdiğinden kırılırlar. Buna ek olarak kırılan fotonlar

anizotropi faktörü olarak ifade edilen olasılık fonksiyonuna göre dokularda dağılabilir veya yönlerini değiştirir (Cammarata ve Wautelety, 1999).

Fototermal Etki: Lazer kullanımının temel prensibi klinisyenin tedavi amacına ulaşmak için en düşük ortalama enerjiyi veya gücü kullanmasıdır. Hedef dokunun lazer enerjisi ile birincil etkileşimi fototermaldir; yani ışın, emilir ve hedef dokunun sıcaklığını yükseltir (Mohammadi, 2009).

- 42–45°C: Hiperterminin başlangıcı, üç boyutlu yapıda meydana gelen değişiklikler ve kollajenin büzüşmesi.
- 50°C: Enzimatik aktivitenin azaltılması.
- 60°C: Proteinlerin denatürasyonu, kollajenlerin pıhtılaşması, zar geçirgenliğinin artması.
- 100°C: Dokunun tamamen kuruması ve vaküollerin oluşumu.
- >100°C: Buharlaşma ve doku karbonizasyonunun başlangıcı.
- 300–1000°C: Dokunun termoablasyonu, fotoablasyon ve bozulma (Thomsen, 1991).

Dokuların sıcaklığının 100ºC'nin üzerine çıkması hücresel proteinlerin yıkılmasına ve hücre içinde bulunan suyun buharlaşmasına sebep olur ve bu durum vaporizasyon olarak adlandırılmaktadır. Hücre içindeki suyun buharlaşması sonucu hücre içinde meydana gelen küçük patlamalar dokuların ablasyonuna sebep olmaktadır (Coluzzi ve Goldstein, 2004). Doku lazer enerjisini emmeye devam ederse; karbonizasyon ve onu takiben dokularda ciddi hasarlar meydana gelmektedir. Subablatif sıcaklıklarda, diğer doku etkileri gözlenecektir. Doku, foto biomodülasyon etkilerinin meydana gelebilmesi için normal vücut ısısı olan 37°C'yi birkaç derece geçecek şekilde ısıtılabilir. Bu etki için minimum ısıya ihtiyaç vardır, bu nedenle bu tip lazer uygulamalarına "düşük seviyeli lazer terapisi" denir (Gao ve Xing, 2009). 50°C'de ise, çoğu bakteri inaktive olarak dezenfekte edilmiş bir ortam elde edilebilir (Asnaashari ve ark., 2016). Koagülasyon ve protein denatürasyonu yaklaşık olarak 60°C'de gerçekleşir ve hemostazın sağlanması ve denatüre granülasyon dokusunun yumuşak dokudan uzaklaştırılması için sıcaklığı sağlayabilen bir lazer kullanılabilir. Benzer şekilde, yaklaşık 80ºC yumuşak doku kesilerinin "kapatılması" için etkili bir sıcaklıktır (Steiner, 1994). Tüm lazerler hem hedef hem de hedef olmayan doku

üzerinde termal bir etkiye sahip olduğundan, uygulayıcı, uygulama sırasında istenmeyen sıcaklığın kontrol edilmesini sağlamak için bu etkiyi dikkate almalıdır (Thomsen, 1991).

Fotokimyasal Etki: Lazerin uygulandığı dokular üzerinde termal etki olmadan meydana getirdiği değişikliklerden biri de fotokimyasal etkisidir. Bu kimyasal etki lazer ışığının içerdiği fotonların sahip olduğu yüksek enerji sayesinde moleküllerin bağlarının çözünmesi ile gözlenir. Bu çözünme birtakım kimyasal reaksiyonların başlamasına sebep olur. Lazer ışığı uygulandığı hücreye nüfuz ederek mitokondrinin fonksiyonunda, hücrenin ürettiği adenozin trifosfat (ATP) miktarında ve hücresel solunumda artışa sebep olur. Sonuç olarak da protein sentezi ile DNA ve RNA formasyonu artar (Vogel ve Venugopalan, 2003).

Fotomekanik Etki: Lazerin yüksek enerjiye sahip olması uygulandığı dokuda ani bir sıcaklık artışına sebep olmaktadır. Bu yüksek enerjinin uygulandığı doku üzerinde dalgalar şeklinde yayılması, dokunun parçalanmasına ve basıncın yükselmesine sebep olur (Visuri ve ark., 1996). Lazer ışınına maruz kalan dokuda optik özellikler değişerek doğrusal olmayan değişiklikler meydana gelir. Lazer uygulanan dokuda meydana gelen ısı artışı, dokuyu buharlaştıracak sıcaklığı geçerse bu ısı enerjisi doku tarafından abzorbe edilir. Bu reaksiyonda dokuda patlamalar şeklinde buharlaşma olmasına sebep olur. Bu durum dokunun daha derin kısımlarına ilerlerse buna foto parçalayıcı etki denir ve sonuç olarak dokuda çukurlar oluşmasına sebep olur (Vogel ve Venugopalan, 2003).

Lazerlerin Sınıflandırılması

Lazerler; bulundurdukları aktif maddeler, ışığın hareketleri, dalga boyu ve enerjisi gibi birtakım özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Coluzzi, 2005; Özcan ve Sevimay, 2016).

1. LAZERİN AKTİF MADDESİNE GÖRE SINIFLANDIRMA
   - Katı Lazerler: Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, Ruby, Alexandrite, Er,Cr:YSGG
   - Gaz Lazerler: CO2, Ar/Krypton, Excimer (Excited Dimer), Ultraviolet (UV), He-Ne

- Sıvı Lazerler: Boya (çeşitli) (VIS)
- Elektronik Lazerler: Yarı iletkenler, Diyot Lazerler (infrared-IR)

2. LAZER IŞIĞININ DALGA BOYUNA GÖRE SINIFLANDIRMA
   - Mor ötesi (ultraviolet-UV) spektrum (140-400 nm)
   - Görünür (visual-VIS) spektrum (400-700 nm)
   - Kızıl ötesi (IR) spektrum (700 nm ve üstü)
3. LAZER IŞIĞININ ENERJİSİNE GÖRE SINIFLANDIRMA
   - Soft lazer
   - Mid lazer
   - Hard lazer
4. LAZER IŞIĞININ HAREKETİNE GÖRE SINIFLANDIRMA
   - Kesintisiz ışık verenler (continuous)
   - Atımlı (kesintili) ışık verenler (pulse)
   - Dalgalı akım olarak ışık verenler (choop) (Coluzzi, 2005; Özcan ve Sevimay, 2016).

Lazerlerin Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları

Diş hekimliğinde ortodonti branşında diş hareketinin hızlandırılması ve buna bağlı ağrıların azaltılmasında, dişin açığa çıkarılması, braketlerin sebep olduğu dişeti ve yumuşak dokudaki düzensizliklerin yeniden şekillendirilmesinde kullanılırken, pedodontide ve endodontide ise vital pulpa tedavilerinde, çürüğün teşhisinde, kavite preparasyonu ve kanal dezenfeksiyonunda kullanılır (Martens, 2011;Alsayed Hasan ve ark., 2017). Lazerler periodontoloji alanında gingivektomi ve gingivoplasti gibi dişeti cerrahilerinde, kemik şekillendirmesinde, implant üstünün açılmasında, aftöz ülserler gibi oral lezyonların ve periodontal cep tedavisinde kullanılmaktadır (Behdin ve ark., 2015). Seramik kronların ve simanların dişten uzaklaştırılması, kron boyunun uzatılması, diş yüzeyinin pürüzlendirilmesi, diş preparasyonunda sonra oluşabilecek kanamaların kontrol altına alınması ise lazerlerin protetik diş tedavisinde kullanım alanlarıdır (Gurney ve ark., 2016).

Lazerin kullanıldığı oral cerrahi işlemler arasında ise yumuşak dokuda bulunan patolojilerin uzaklaştırılması ve biyopsisi, alveoler kretlerin ve torusların düzeltilmesi,

iyileşmenin hızlandırılması için biyostimülasyon ve kanamanın durdurulması sayılabilir (Asnaahari ve ark., 2014).

2.3.2.2.1.Diş Hekimliğinde Kullanılan Lazerler

Argon Lazerler

Argon lazerler, yüksek akımlı elektrik salınımı ile enerjisi arttırılan aktif bir argon gazı kaynağına sahip lazerlerdir. Işığı görünür spektrumda olacak şekilde, sürekli ve kesikli dalga atım modlarında fiber optik ile iletebilen tek cerrahi lazer cihazıdır. Argon lazerlerin diş hekimliğinde kullanılan, mavi renkte 488 nm ve mavi yeşil renkte 514 nm olacak şekilde iki dalgaboyu bulunmaktadır (Coluzzi, 2004).

488-nm olan dalga boyu, kompozit restoratif materyallerde rezinin polimerizasyonuna neden olan en yaygın kullanılan fotobaşlatıcı olan kamforokinonu aktive etmek için gereken dalga boyudır. Uygulama yapılan yüzeye temas olmayacak şekilde kullanıldığında, bu mavi ışık hüzmesinin sapması aşırı miktarda foton üreterek polimerizasyon için yeterli enerjiyi sağlamaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar, lazerle polimerize edilen rezinin sıradan mavi filtreli ışıkla polimerize edilen rezine kıyasla kuvvetlere karşı direncinin arttığını buna ek olarak da sertleşme süresinin kısaldığını göstermektedir. Argon lazerler ayrıca ışıkla aktive edilen beyazlatıcı jeller ve ölçü malzemeleri gibi başka laboratuvar ve klinik malzemeleri için de kullanılmaktadır (Powell ve ark., 1995).

514 nm dalga boyunda, hemoglobin, hemosiderin ve melanin içeren dokularda optimum emilime sahiptir. Bunun bir sonucu olarak da dokular üzerinde hemostatik etki göstermektedir. Bu etkinin uygulanan dokuda görülebilmesi için küçük çaplı esnek fiberglas uca sahip argon lazer hedef dokuyla temas edecek şekilde kullanılmalıdır (Finkbeiner, 1995).

Fiberglas uygulama ucu üzerinde biriken cerrahi yan ürünler temizlenmelidir, aksi halde uç üzerinde kalan bu birikintiler lazer enerjisini emer ve verimliliği etkiler. Akut enflamatuvar periodontal hastalık ve hemanjiyom gibi yüksek derecede vaskülarize lezyonlar, argon lazer tedavisi için idealdir (Kutsch, 1995).

Argon lazerin oluşturduğu dalga boyundaki ışık sert doku ve suda absorbsiyon yeteneğine sahip değildir. Bu özelliğinden dolayı argon lazerler yumuşak doku

cerrahisinde sert dokulara minimal etki gösterdiğinden ya da hiç etki göstermediğinden dolayı güvenli bir şekilde kullanılabilmektedir. Argon lazerin her iki dalga boyu da çürük teşhisinde kullanılmaktadır. Argon lazer ışığı dişe tutulduğunda, hastalıklı, çürük alan koyu turuncu-kırmızı renkte görünür ve çevredeki sağlıklı yapılardan kolayca ayırt edilebilir (Coluzzi, 2004).

Neodmiyum: Yttrium Aliminyum Garnet (Nd:YAG) Lazerler

Nd:YAG lazerler, neodmiyum iyonları ile güçlendirilmiş, yttrium ve aliminyum gibi toprak elementleri ile kombine edilmiş bir kristal olan garnet içeren katı aktif bir ortama sahiptir. Bu aktif ortam, diyot lazerin yarı iletken olan silikon devre levhasından çok farklıdır ve ışığı pompalama mekanizması bir flaş lambasıdır (Coluzzi, 2004).

Nd:YAG lazerin diş hekimliği için üretilen mevcut modelleri, elektromanyetik spektrumun görünmez yakın kızıl ötesi kısmında bulunan 1064 nm'lik bir dalga boyuna sahiptir. (Raffetto ve Gutierrez, 2001). Bu lazerler sadece mikro-saniyeyle ifade edilen kısa atım süreleri ile serbest çalışan kesintili atım modunda çalışmaktadır ve doku ile temas edebilen küçük, esnek fiberlere sahiptir. Lazer enerjisi melanin tarafından yüksek oranda emilir, ancak argon lazerlerin aksine hemoglobin tarafından daha az emilir ve yaklaşık % 90'ı su yoluyla iletilir. Nd:YAG lazerler, nispeten uzun doku soğuma süresi ile serbest çalışan, kesintili atım ve yüksek tepe güçlerini kullanarak çalıştığından diş yumuşak dokularının kesilmesi, sulkuler debridmanının uzaklaştırılması ve kanamanın kontrol altına alınması gibi yaygın klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Coluzzi, 2004). Serbest çalışan kesintili atım modu ayrıca klinisyenin ince ve hassas dokuyu, çevredeki ısı birikimini önleyerek daha güvenli bir şekilde tedavi etmesini sağlar. Ancak, Nd: YAG lazerin dişe komşu alanda yapılan yumuşak doku cerrahisinin güvenli ve hassas olmasını sağlayan dalgalarının diş yapısı ile çok az etkileşimi vardır. Pigmente yüzeyli çürük lezyonlar, sağlıklı mineye herhangi bir zarar verilmeden uzaklaştırılabilir (White ve ark., 1993).

Buna ek olarak; oral ülserlerin tedavisi, dişin çürüğe karşı daha dirençli hale getirilmesi, dentin hassasiyetinin giderilmesi, periodontal tedavi, mine veya dentinin pürüzlendirilmesi, kavite ve kök kanalı sterilizasyonu ile pulpa kuafajında kullanılırlar. Nd: YAG optik fiberin bu işlermlerden sonra temizlenmesi

gerekmektedir; aksi halde, lazer ışığı etkinliğini hızla kaybedecektir (Özcan ve Sevimay, 2016).

Karbondioksit (CO_2) Lazerler

CO_2 lazerler, aktif ortamı elektriksel deşarj akımı ile salınan CO_2 molekülleri ve gaz halinde bir karışım içeren sızdırmaz bir tüpe sahip lazerlerdir. Dalga boyları 10600 nm olan CO_2 lazerler, akımları kesintili ve kesintisiz modda uygulayabilme kabiliyetine sahiptirler (Coluzzi, 2004).

CO_2'in sahip olduğu dalga boyu, su tarafından iyi emilir. Yumuşak dokuyu kolayca kesebilir veya kanama kontrolü sağlayabilir bunula birlikte dokuya penetrasyon derinliği çok değildir. Ek olarak, yoğun fibröz dokunun buharlaştırılmasında etkilidir. Hızlı doku etkileşimi kapasitesine sahiptir. CO_2 lazerin sahip olduğu dalga boyu genel medikal cerrahide etkin olarak kullanılan dalga boylarından biridir (Wider-Smith ve ark., 1995; Özcan ve Sevimay, 2016).

CO_2 lazerlerde, oluşturulan ışının taşınması için geleneksel optik fiberler kullanılmaz. Buna ek olarak CO_2 lazerler kanamasız ve uygulama ucu hedef dokuya temas ettirilmeden işlem yapılmasına olanak sağladığı için son derece kontrollüdür. Ancak dokunma hissinin olmaması cerrah için bir dezavantaj oluşturmaktadır (Coluzzi, 2004; Özcan ve Sevimay, 2016).

10600 nm dalga boyuna sahip CO_2 lazerler, kullanılan dental lazerler arasında hidroksiapatitde, en yüksek emilim gücüne sahip lazerlerdir. Bu nedenle, yumuşak doku cerrahisi sırasında bu yumuşak dokuya komşu diş yüzeyi, gelen lazer ışınından korunmalıdır. Bu koruma sulkusa yerleştirilen bir metal ekipman ile sağlanabilir. CO_2 lazer cihazlarının sürekli dalga emisyonu ve iletim sistemi teknolojisi, sert doku uygulamalarını sınırlar çünkü uzun atım süreleri ve düşük pik kuvvetleri nedeniyle diş yapısında karbonizasyon ve çatlama meydana gelebilir (Pogrel ve ark., 1993).

Holmiyum:Yttrium Aliminyum Garnet (Ho:YAG) Lazerler

Ho:YAG lazerler, dalga boyu 2100 nm ve Nd:YAG ile CO_2 lazerlerin karışımı olan, holmiyum ve tulyum iyonlarıyla güçlendirilmiş aliminyum garnet kristal içeren lazerlerdir (Kautzky ve ark., 1997). Ho:YAG lazerlerin CO_2 lazerlere benzer yumuşak doku kaldırma özellikleri vardır. Buna ek olarak CO_2 lazerlere oranla daha iyi;

Nd:YAG lazerlere oranla ise daha düşük hemostatik etkiye sahiptirler. Bu düşük etkinin sebebi Ho:YAG lazerlerin hemoglobin tarafından absorbsiyonunun daha az olmasıdır. Dokulara hızlı bir şekilde ve yüzeyel etki göstermesi anestezi gereksinimini ortadan kaldırır. Ho:YAG lazerler, diş hekimliğinde diş çevresindeki yumuşak dokuların aşındırılması ve insizyonu, kavite sterilizasyonu ve periodontal tedaviler için kullanılmaktadır (Özcan ve Sevimay, 2016).

Erbiyum: Yttrium Aliminyum Garnet (Er:YAG) Lazerler

CO_2 ve Nd:YAG tip lazerlerin sert dokuları ancak yüksek enerji seviyelerinde buharlaştırabilmesi ve bu yüksek enerji seviyesinin oluşturduğu yan etkilerden dolayı Er:YAG lazerler geliştirilmiştir. Er:YAG lazerler 2940 nm dalga boyunda ışın üreten, erbiyumla takviye edilmiş, katı bir yttrium alüminyum garnet kristalinden oluşan aktif bir ortama sahiptir (Özcan ve Sevimay, 2016). Er:YAG lazerler fiber optikle birlikte reflektörlü boş hortum dağıtım sistemi ile serbet çalışmaya izin veren atım moduna sahiptirler. Bu lazer sistemleri ile yapılacak kavite preparasyonları ve yüzey pürüzlendirme gibi işlemler su soğutması ile yapıldığından işlem sırasında meydana gelen ısı değişimi 3°C'nin altına düşmüştür ve preparasyon kabiliyeti normal döner aletlerle kıyaslanabilecek derecededir (Martínez-Insua ve ark., 2000). Buna ek olarak bu lazer sistemleri kök kanal dezenfeksiyonu ve yumuşak dokular üzerinde etkili olmasına rağmen hemostatik etkileri sınırlıdır (Stabholz ve ark., 2003). Hasta konforu açısından avantajları arasında ise; işlem sırasında ağrıyı oluşturmadığı için anestezi gereksinimini ortadan kaldırması, huzursuzluk ve ağrıya sebep olan vibrasyon ile ses oluşturmaması sayılabilir (Özcan ve Sevimay, 2016).

Erbiyum, Kromium: Yttrium Skandium Galium Garnet (Er,Cr: YSGG) Lazerler

Er,Cr:YSGG lazerlerin aktif ortamı, erbium ile kromium eklenmiş yttriyum skandiyum galyum garnet katı kristalken bu ortam 2780 nm dalga boyunda ışın üretmektedir. Yalnızca fiber optik bir sisteme sahiptirler ve bu lazerler kullanılarak yapılacak işlemler için su ve hava soğutmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Er,Cr:YSGG lazerlerin ürettiği enerji dişin kristal yapısında bulunan su ve hidroksiapatit yapıdaki hidroksil grubuyla birleşerek etkisini göstermektedir. Mineral içeriklerdeki suyun vaporizasyonu hacim artışına sebep olur ve sonuç olarak da su moleküllerinin artan

kinetik enerjisine bağlı olarak çevre dokularda mikro ablasyonlar meydana getirir ve bu sisteme hidrokinetik sistem adı verilir (Coluzzi, 2004).

Er,Cr:YSGG lazerlerin kavite preparasyonu kabiliyetleri, döner aletlere oranla sert dokuları kesme hızları daha yavaş olduğundan sınırlıdır. Fakat Er,Cr:YSGG lazerler, mine ve dentin gibi yüzeylerde herhangi bir çatlak ve smear tabaka oluşturmadan pürüzlendirme sağlayarak bonding sistemlerin başarısını arttırmaktadır. Bu lazerlerle yapılan işlemlerde pulpada herhangi bir hassasiyet oluşmadığından çoğunlukla lokal anestezi gereksinimi yoktur (Özcan ve Sevimay, 2016). Er,Cr:YSGG lazerler yumuşak dokulara ise düşük derecede etkinlik gösterirler bu yüzden yumuşak doku uygulamalarında derin dokulara zarar vermezler. Bu zayıf etki derinliğinden dolayı hemostatik etkileri oldukça zayıftır. (Wallace ve ark., 2004).

Er,Cr:YSGG lazerlerin diş hekimliğinde kullanıldığı uygulama alanları arasında; çürük uzaklaştırılması ve kavite preparasyonu, kök kanalı ve kavite dezenfeksiyonu, dentin hipersensitivitesinin azaltılması ve pulpa kuafajı sayılabilir (Eversole ve ark., 1997).

Diyot Lazerler

Diyot lazerlerin semikondüktör içeriği galliyum-aliminyum-arsenid ve diyot kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu kombinasyon, elektrik akımı ile aktif hale getirdiğinde 790 ile 980 nm aralığında olacak şekilde kızıl ötesi enerji yaymaktadır. Diş hekimliğinde ise 810 nm ile 980 nm arası diyot lazerler kullanılmaktadır. Bu kızıl ötesi enerji ile lazer ışınlarının oluşturdukları ısı uygulandıkları yumuşak dokularda ablasyon meydana getirmektedir. Bu olayın sonucu olarak da lazer uygulanan dokuda ısıya bağlı hasar ve karbonizasyon gözlenmektedir. Fakat karbonizasyon, dokunun soğutulmasıyla engellenebilmektedir. 980 nm dalga boyuna sahip diyot lazerler bu sahip oldukları enerji ile pulpa dokusu gibi su yönünden zengin olan dokularda absorbsiyon özelliği yüksek olduğundan pulpa tedavilerinde güvenli bir şekilde kullanılabilirler. Diyot lazerlerin sert doku etkisinin düşük olması; sahip oldukları şiddetli güç çıkışıyla açıklanabilir (Saltzman ve ark., 2005). Çeşitli diyot lazer tipleriyle yapılan çalışmalar, diyot lazerin pulpa üzerinde yara iyileşmesini hızlandırdığı ve histopatolojik olarak pulpadaki termal zararın azaldığını göstermektedir (Utsunomiya, 1998).

Diyot lazerler karasteristik özellikleri bakımından Nd:YAG lazerler ile benzerlik göstermektedirler. Buna ek olarak diyot lazerler Nd:YAG lazerler ile kıyaslandığında daha düşük termal yan etkilere ve doku penetrasyonu özelliğine sahiptir. Diyot lazerlerin yaydıkları ışınların bir kısmı henüz uygulama ucundayken ısıya dönüşüp, sıcak uç denilen duruma sebep olmaktadır. Bu ısınan uç nedeniyle de uygulanan dokuda koagülasyon meydana gelip buharlaşma olmaktadır. Diyot lazerin güç seviyeleri arttırılıp soğuma sürelerinin uzatılmasıyla dokuları kesme özelliği arttırılarak termal zararlı etkileri de azaltılmıştır (Sulieman, 2005).

Düşük Seviyeli Lazer Terapisi (LLLT)

Düşük seviye lazer tedavisi (LLLT), doku onarımını desteklemek, enflamasyonu azaltmak veya analjeziyi indüklemek için kullanılan ışık uygulamasıdır (genellikle düşük güçte bir diyot ile uygulanır). LLLT, birçok hücre tipinin çoğalmasını uyaran tedaviler arasında göze çarpmaktadır (Staffoli ve ark., 2017). LLLT kullanılmasının asıl amacı, vücut hücrelerine doğrudan biyostimülatif ışık enerjisi sağlamaktır. Absorbe edilmiş lazer enerjisi, moleküllerin ve hücre atomlarının uyarılmasına neden olur. LLLT'nin, in vivo ve in vitro olarak fotobiyomodülasyonun etkilerini teşvik etmek ve uyarmaktan, hücre gelişimini ve öncü hücrelerin rejenerasyonunu uyarmak ile anti-enflamatuvar etkiyi arttırmaya kadar birçok durumdan sorumlu olduğu rapor edilmiştir. LLLT vücut hücrelerine doğrudan biyostimülatif ışık enerjisi sağlamaktır. Absorbe edilen lazer enerjisi, doku sıcaklığını önemli ölçüde arttırmadan, moleküllerin ve hücre atomlarının uyarılmasına neden olmaktadır (Ebrahimi ve ark., 2012).

LLLT, enflamasyonu azaltmak, ağrıyı hafifletmek veya yara iyileşmesini desteklemek amacıyla konakçı hücreleri doğrudan stimüle etmek için tek başına ışık veya ışık hareketini kullanır. LLLT kullanılan başlıca dental uygulamalar arasında,

- Çene kemiklerindeki ağrı bölgesinde analjezik etki sağlanması,
- Çene kemiği bölgesinde iyileşmeyen kemik ve yumuşak doku lezyonlarının tedavisinde iyileşmenin hızlandırılması ve desteklenmesi,
- Rekurrent aftoz stomatit lezyonları
- Pulpal biyostimulasyon (pulpotomi sonrası sekonder dentin yapımı),

- TME hasarı ya da artritik hastalıklar ve hasarlanmış nöral dokuların rejenerasyonunun sağlanması sayılabilir (Carrol ve ark., 2014; Özcan ve Sevimay 2016).

2.4.İn-Vitro Toksisite Testleri

Bir hücreye olan etkisi hücrenin ölümüyle sonuçlanan maddeler için sitotoksik terimi kullanılmaktadır. Bu tür şüphesi bulunan maddelerin hücre üzerinde ölümcül etkisinin bulunup bulunmadığının araştırıldığı çalışmalara ise sitotoksisite araştırmaları denilmektedir (Riss ve Moravec, 2004). Bir maddenin sitotoksik etkisi o maddenin dozuna ve o maddeyle etkileşim süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Hücrelerin proliferasyonunu olumsuz yönde etkileyen, apoptoz ve nekroz gibi dönüşümlere sebep olan maddeler o hücre için sitotoksik madde olarak kabul edilmektedirler (Galluzzi ve ark., 2009). Sitotoksisite testleri metodolojik olarak fiziksel, kimyasal veya biyolojik materyaller ile hücrenin etkileşimi sonrasında canlılık oranlarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Niles ve ark., 2007). Sitotoksisite testindeki en önemli noktalardan biri deney sonunda canlı ve ölü hücre miktarının hatasız bir şekilde belirlenmesidir (Adan ve ark., 2016). Sitotoksisitenin tespit edilmesi için enzimatik, kolorimetrik ve lüminesans testler kullanılmaktadır (Fan ve Wood, 2007).

Enzimatik metodlarda hücreden sızan enzimler ölü veya canlı hücrelerin sayısının belirmesinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin bozulmadan özelliğini koruyan laktat dehidrojenaz (LDH), hücresel canlılığın belirlemensi için sıklıkla kullanılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017). Canlı olan tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzim olan laktat dehidrogenaz hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğunda hücre içi ortamdan dış ortama sızar. Bu durumdan yola çıkarak in-vitro kültür ortamlarında hücresel canlılık oranını ölçmek için vasata sızan LDH enziminden yararlanılmaktadır (Lappalainen ve ark., 1994). LDH testi ile ölçülen enzimatik aktivitenin zamana bağlı olarak doğal yıkımlanmaya uğrayabilmesi, pH ve vasat kompozisyonundan etkilenebilmesi, hassasiyetini düşüren dezavantajlarından bazılarıdır (Galluzzi ve ark., 2009). Bir diğer enzimatik yöntem olarak ise diaforaz ezimiyle birlikte resazurin boyası kullanılmaktadır. Canlılığın tespiti için, enzim ve boya hücreler üzerine eklenerek on dakika inkübe edlir. On dakikalık süre içerisinde

eklenen diaforaz enziminin aracılık ettiği reaksiyon sonucunda, ortamda bulunan resazurin boyası nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) tarafından indirgenerek floresans yapıda bulunan resofurine dönüşür. Hücresel canlılık, resofurinin oluşturduğu floresans sinyallerinin bir florometre cihazı ile ölçülmesyle tespit edilmektedir (Riss ve Moravec, 2006).

Kolorimetrik metodlar,

- 3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT),
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS),
- 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid (XTT),
- 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST),

gibi tetrazolyum tuzlarının hücre kültürüne uygulanmasıyla meydana gelen renk değişikliği esasına dayananarak ölü ve canlı hücrelerin analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Feoktistova ve ark., 2016).

Lüminesans metodlar için floresans özellikleri olan maddeler; biyolüminesans metodlar için ise lusiferaz adı verilen enzim grupları ve substratlar kullanılarak ölü ve canlı hücre değerlendirmesi yapılmaktadır. Buna ek olarak daha gelişmiş biyolüminesans metod sistemlerinde toksisitesi değerlendirilen madddenin hücreye verdiği zarar yalnızca test yapılırken değil etkileşim süresince de incelenebilmektedir (Duellman ve ark., 2015).

MTS, XTT ve WST Sitotoksisite Testleri:

Sitotoksisite testleri için kullanılan XTT, MTS ve WST gibi tetrazolyum tuzları negatif yüklü olmaları nedeniyle hücre zarını geçme yeteneğine sahip değildirler. Bu bileşikler kullanılarak yapılacak toksisite testlerinde ise; bileşiklerin hücre zarını geçebilmeleri için fenazin etil sülfat ve fenazin metil sülfat gibi elektron alıcı moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Kullanılan bu aracı bileşikler hücre zarından veya hücre zarını geçip sitoplazmaya girerek elektron alıp tekrar vasata geçerek tetrazolyum tuzlarını indirgerler. Bu reaksiyon sonucunda ise tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi ile oluşan formazan kristalleri vasat veya suda çözünebilir hale gelirler (Riss ve ark.,

2016). Oluşan formazal kristallerinde hücresel canlılık oranına göre meydana gelen renk değişimleri ise spektrofotometre cihazı yardımıyla ölçülür (Riss ve Moravec, 2004).

MTT Sitoksisite Testi:

Hücrelerin canlılık açısından metabolik aktivitelerinin değerlendirilmesi için genellikle tercih edilen kolorimetrik metodlar; mitokondriyal enzimlerin aktivitesine bağlı olacak şekilde meydana gelen renk değişikliğiyle hücresel canlılığın tespit edildiği yöntemlerdir (Keiser ve ark., 2000). Kolorimetrik toksisite analiz metodlarında kullanılan tetrazolyum tuzları heterosiklik organik yapıda bulunan maddelerdir. Bu tuzlar elektron alarak negatif yüklendiklerinde formazan yapısına dönüşerek renk değiştirirler. Tetrazolyum tuzlarında bulunan bağlar canlı ve aktif mitokondrilerde bulunan enzimler vasıtasıyla kırılır ve renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimi yalnızca canlı hücrelerde meydana gelir (Rajabzadeh ve ark., 2019). Buna karşın canlılığını kaybetmiş hücreler bu tuzlarda bulunan bağları kıramadığından eklenen kültürde renk değişikliği meydana gelmemektedir (Riss ve Moravec, 2004). Biyolojik alanda, yalnızca canlı hücrelerin renk değişikliği meydana getirmesi nedeniyle ölü ve canlı hücrelerin tespitinde, sitotoksisite testlerinde tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır (van Meerloo ve ark., 2011). Pozitif yüklü olması ve hücre membranından geçerek hücre içine girip mitokondriyal aktivite üzerinden hücresel canlılığı tespit ettiği için sitotoksite testlerinde sıklıkla MTT bileşikleri kullanılmaktadır. Bu yöntem ile hücresel canlılıkta büyük bir öneme sahip olan mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesi ölçülmektedir (Güven ve ark., 2011). Hücre ile reaksiyona girmeden önce normal şartlarda sarı renkte olan suda çözülebilen tetrazolyum tuzları hücrede mitokondride bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile reaksiyona girdikten sonra suda çözünmeyen tetrazolyum formazan kristallerine dönüşerek hücresel canlılığa göre değişecek şekilde çeşitli tonlarda mor renk almaktadır (Keiser ve ark., 2000). Diğer hücresel ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renk ile boyanırken ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmaz. Elde edilen bu renkler mikro plaka okuyan spektrofotometre ile absorbans dalga boyu değeri 540 nm olacak şekilde ölçülmektedir (Galluzzi ve ark., 2009).

2.5.Apoptozis

Nekroz, pasif şekilde devam eden ve kontrolsüz meydana gelen hücre ölümü olarak tanımlanırken, apoptoz; nekrozun aksine fizyolojik ya da mekanik veya kimyasal bir takım uyaranlar vasıtasıyla meydana gelen aktif ve kontrollü morfolojik değişikliklerle karakterize olan hücre ölümüdür (Kerr ve ark., 1972). İmmun cevabın fizyolojik sınırlar içerisinde ilerlemesi için çok hücreli canlılarda bulunan organların ve dokuların içerdiği hücre sayılarının normal sınırlar içerisinde kalması gerekmektedir. Hücre sayısındaki bu denge yeni oluşan ve ölen hücreler arasındaki oran ile sağlanmaktadır (Elliott ve Ravichandran, 2010). Çok hücreli canlılar olan memelilerde bu hayati öneme sahip dengenin sağlanmasında en büyük etki, programlı hücre ölümü olan apoptozdur (Horvitz, 2003). Hücrenin intihar etmesi olarak da tanımlanan apoptoz, hücrenin kendisi tarafından meydana getirilen aktif reaksiyonların başlamasıyla gözlenmektedir. Bu sürece giren hücrede hem morfolojik hem de hücre içi biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Meydana gelen morfolojik değişimler sonucu apoptotik sürece giren hücre komşu hücrelerden uzaklaşarak, daha yuvarlak bir şekil alır ve çekirdek ayrılması meydana gelerek kromatin yoğunlaşır. Hücre içi sitoplazmada bulunan organellerde değişiklikler meydana gelirken hücre zarında kabarcıklar oluşur. Bu olayı takip eden süreçte hücre daha küçük yuvarlak şekil alarak kopar ve apoptotik cisimler meydana gelir. Bu evreden sonra morfolojik olarak değişen ve apoptotik cisim haline gelen hücreler, makrofajlar tarafından tespit edilerek fagosite edilirler (Güvenç ve Güvenç, 2017).

Apoptotik sürece giren hücrelerde meydana gelen bu morfolojik değişimlere sebep olan birtakım moleküler reaksiyonlar tanımlanmıştır. Bu etkilerin büyük bir kısmı, hücre içinde bulunan özel substratların proteolitik parçalanmasıyla başlatılır. Bütün bu reaksiyonların sonucu olarak apoptotik süreçteki hücrenin yok edilmesi için yapısal ve sinyal moleküllerinde birtakım değişiklikler meydana gelir. Apoptotik sürecin erken evresinde hücresel membranın iç kısmında bulunan spesifik yüzey fosfolipitlerinden olan fosfatidilserin dış yüzeye çıkar. Bu durum laboratuvar çalışmalarında apoptozun erken döneminde gözlenen bir belirteç olarak kabul edilse de in-vivo şartlarda da ölmekte olan hücrelerin fagositoz için makrofajlar tarafından bulunmasını sağlayan bir sinyaldir (Andersen ve Rathmell, 2015).

Apoptotizisin Tespit Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Hematoksilen-Eozin Boyaması

Bu boyama metodu ile boyanmış olan örnekler ışık mikroskobu altında incelenebilmektedir. Hemotoksilen-eozin boyaması doku örneklerinde kullanılabildiği gibi hücre kültürü boyamalarında da kullanılmaktadır. Bu boyama yönteminin içerdiği hematoksilen, kromatini boyayabilme kabiliyetine sahiptir. Bu özelliğinden dolayı apoptotik sürece giren hücreleri nukleusta meydana gelen morfolojik değişikliklere göre değerlendirmeye olanak sağlar. Morfolojik olarak meydana gelen değişiklikler:

- Hücrede ve sitoplazmada boyut olarak meydana gelen küçülmeler
- Kromatinin küçülüp yoğunlaşmış görünmesi
- Hücre çekirdeğinde küçülmeler veya parçalanmalar, şeklinde sıralabilir (Güleş ve Eren, 2008).

Floresan Boyama Metodu

Bu boyama metotu DAPI, Hoechst ve propidyum iyodür gibi floresan boyalar kullanılarak yapılan bir boyama metodudur. Bu boyama metodunda kullanılan boyalar DNA' ya olan afinitelerinden dolayı hücre çekirdeğini ve kromatini görülebilir hale getirmektedir. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında Hoechst ve propidyum iyodür boyalarının kombine kullanımı ile canlı ve ölü hücrelerin tespit edilmesi sağlanır. Horchst boyası tüm hücreleri (canlı veya ölü) boyarken propidyum iyodür boyası ile yalnızca ölü hücreler boyanarak ayırt edilmektedir. Apoptotik hücreler bu boyama ile hematoksilen-eozin boyama yönteminde olduğu gibi kromatinin yoğunlaşmasına ve hücre çekirdeğindeki kırıklara bakılarak tayin edilmektedir (Arıcan ve ark., 2014).

Agaröz Jel Elektroforezi

Ultraviyole ışık altında DNA parçaları, agaröz jellerin floresan bir boya (ethidiyum bromid) ile boyanması sonucunda görüntülenebilmektedir. Floresan boyanın DNA zincirlerinin arasına girmesiyle DNA parçaları agaroz jelde görünür hale gelir. Apoptoza uğrayan hücrelerde ise kromatinlerde meydana gelen parçalanma 300 veya 360 nm dalga boyuna sahip ışıkta agaröz jel üzerinde tipik olarak merdiven benzeri görüntü verir (Güleş ve Eren, 2008).

Anneksin V yöntemi

Fizyolojk olarak normal yaşamsal faaliyetlere sahip olan hücrelerin hücre zarlarının sitoplazamaya bakan kısımlarında fosfatidilserin yer almaktadır. Hücrenin fizyolojik olarak normal olan faaliyetleri apoptoz yönünde değişiklik gösterirse hücre zarının sitoplazma kısmında bulunan fosfatidilserin lipidleri bu iç kısımdan hücre dışına sızmaya başlar. Fakat bu durum hücrenin henüz apoptotik sürecin erken evresinde bulunduğunu göstermektedir. Hücre dışına sızan fosfatidilserine duyarlı olan Anneksin V proteini FITC gibi floresan özelliği olan bir madde ile işaretlenip, bu lipide bağlanarak erken apoptotik süreçte olan hücrelerin ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu Anneksin V-FITC yapısının hücrelere bağlanma miktarının ölçümü ise flow sitometri cihazı ile analiz edilmektedir (Crowley ve ark. 2016).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Bakteriyel, viral veya paraziter enfeksiyonların serolojik teşhiş yöntemlerinden biri olan ELISA testi apoptozun tespit edilmesinde de kullanılmaktadır. Apoptozda ilk gözlenen reaksiyon DNA parçalanması ve nükleozomların sitoplazmaya salınmasıdır. Nükleozom, temel kromatin birimidir ve histonlarla DNA'nın birleşmesi sonucu oluşur. ELISA testi ile apoptozun tespit edilmesi ise, nükleozomların bir çift monoklonal antikor tarafından spesifik olarak tanınmasına dayanmaktadır (Salgame ve ark., 1997).

Western Blotting

Wester blottting, kaspaz, bcl-2 ve sitokrom c gibi apoptoza özgü proteinlerin, bu proteinlere özel antikorlar ile işaretlenmesi esasına dayanan bir metotdur. Bu yöntem ile hücrede biriken apoptoza özgü proteinlerin eksprese edilip edilmedikleri, miktarları veya kırılıp kırılmadıkları tespit edilebilmektedir (Elmore, 2007).

TUNEL Yöntemi

“TdT-dUTP nick-end-labelling” kelimelerinin kısaltılması olan TUNEL yöntemi, apoptotik süreçte olan ve yapıda meydana gelen DNA kırıklarının in situ olarak ve hücre kültüründe tespit edilmesine olanak sağlar. Apoptotik reaksiyonlar sonucu DNA’da meydana gelen bu kırıklar terminal deoksinükleotidil transferaz

(TdT) kullanılarak oldukça hassas bir şekilde işaretlenebilmektedir (Güleş ve Eren, 2008).

Bütün bu bilgiler ışığında araştırmamızda; " Eksfoliye olmuş insan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHEDs) üzerinde; düşük seviyeli diyot lazer uygulaması ve ozonlanmış su ile EDTA ve NaOCl' nin sitotoksik ve apoptotik etkileri arasında fark vardır" hipotezini test etmek amaçlanmaktadır.

2.6.Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar

Karkehabadi ve arkadaşları (2018) yaptıkları bir çalışmada irrigasyon için kullanılan NaOCl, EDTA, MTAD, CHX ve QMix solüsyonlarının periodontal ligament kök hücresi üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. 1, 5 ve 15 dakikalık süre sonunda elde edilen verilere göre periodontal ligament kök hücreleri üzerinde MTAD diğer irrigasyon solüsyonları ile karşılaştırıldığında en düşük toksik etkiye sahipken toksisitesi en yüksek olan solüsyon ise EDTA olarak bildirilmiştir.

Teixeira ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2018) %2.5 NaOCl, 17% EDTAve 1% perasetik asitin fibroblastlar üzerindeki toksik etkileri karşılaştırılmıştır. 1, 2 ve 4 saatlik zaman periyotları için her bir solüsyon %0.01, %0.05 ve%0.1 oranında dilue edilerek fibroblastların kültür ortamına eklenmiştir. Fibroblastlar için hücresel canlılık incelendiğinde, % 2.5 NaOCl'nin tüm zaman aralıklarında % 0.05 ve % 0.1'lik dilüsyonlarının sitotoksik olduğu; %17'lik EDTA'nın ise 2 ve 4 saatlik süre sonunda % 0.1'lik dilüsyonunun sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. %1 perasetik asitin % 0.1'lik dilüsyonu ise 2 ve 4 saatlik süre sonunda sitotoksik etki göstermiştir. Sonuç olarak ise %1 perasetik asit, % 2.5 NaOCl ve % 17 EDTA'ya oranla daha az sitotoksik etki göstermiştir.

Viola ve arkadaşları (2018) perasetik asit ile NaOCl'in sitotoksik ve hücresel savunma mekanizması üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlardır. Fibroblastlar 10 dakikalık süre boyunca %1 perasetik asit ve %2.5 NaOCl ile kültive edilmişlerdir. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre perasetik asit grubunda, NaOCl grubuna kıyasla daha düşük hücre canlılığı ve daha yüksek nekrotik hücre yüzdesine tespit edilmiştir. Her iki solüsyonda da hücre metabolizmasında azalma, hücre iskeletinde ve

dış morfolojide bozulmalar nedeniyle nekrotik hücre ölümü tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu değişiklikler NaOCl ile karşılaştırıldığında düşük perasetik asit dozlarında dahi gözlenmiştir.

Alkahtani ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada QMix ile NaOCl'in kemik iliği mezenkimal kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ve hücresel morfolojide meydana getirdikleri değişiklikleri 2, 4 ve 24 saatlik sürelerde karşılaştırmışlardır. Her üç zaman periyodunda, QMix, toksisite testlerinin sonuçlarına göre kontrol grubundan ve NaOCl'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bir hücre yaşayabilirliği yüzdesi göstermiştir. Hücresel morfoloji analizinin sonuçlarına göre ise, QMix çözeltisine maruz kalan hücrelerde, hücre duvarının çok az büzülmesi ve parçalanmasıyla, minimal morfolojik değişiklikler gözlenmiştir.

Widbiller ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları başka bir çalışmada ise CHX'in apikal kök hücreleri üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. Apikal papilla kök hücreleri CHX'in %2 ile %10^{-7} arasında değişen dilüsyonları ile inkube edilerek 60 dakika boyunca kök hücrelerin canlılığı analiz edilmiştir. İki dakika sonra apikal papilla kök hücreleri üzerinde CHX'in bütün dilusyonları için herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir. % 10^{-2}'nin altındaki dilüsyonlarda ise, 60 dakikalık gözlem boyunca önemli bir sitotoksik etki görülmemiştir, ancak daha yüksek dilüsyonlar konsantrasyona bağlı bir şekilde apikal papilla kök hücreleri üzerinde toksik etki göstermişlerdir. Beş dakika sonra, % 0.1 -% 2 aralığında değişen dliüsyonlarda kloheksidinin meydana getirdiği hücre hasarı %50'ye ulaşmış ve zaman içinde giderek artmıştır.

Ebensberger ve arkadaşlarının (2002) periodontal kök hücreler üzerine yaptığı bir çalışmada 2.5–3.5 µg/ml konsantrasyonda izotonik olmayan su formunda ozonun hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin bulunmadığını ve salinla kıyalandığında daha yüksek prolferatif etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Huth ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada oral epitel hücreler üzerinde gaz ve su formunda ozon, CHX, NaOCl ve hidrojen peroksitin toksik etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre gaz formunda ozon, CHX ve NaOCl ile eşdeğer düzeyde toksik etki göstermesine rağmen su formunda ozon uygulamasında toksik etkinin aksine proliferatif etki gözlendiği rapor edilmiştir.

Nogales ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada 2, 5 ve 8 µg/ml konsantrasyonda ozonlanmış suyun fibroblastlar üzerindeki toksik etkilerini 0, 24, 48 ve 72 saatlik süre boyunca araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ozonlanmış suyun hiçbir konsantrasyonda toksik olmadığı buna ek olarak özellikle 48 ve 72 saatlik zaman periyotları sonunda 5 ve 8 µg/ml konsantrasyonda ozonlanmış suyun anlamlı derecede artmış proliferasyona sebep olduğu bildirilmiştir.

Akdeniz ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bir çalışmada gingival fibroblast hücreleri üzerinde bisfosfonatların toksik etkisinin 60 µg/µl konsantrasyonda ozon uygulamasıyla azaltılacağı ve ozonun hücreler üzerinde iyileştirici ve proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Ginani ve arkadaşlarının (2018) düşük seviyeli lazer terapisinin dental pulpa kaynaklı kök hücreler üzerine proliferatf ve toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada 0.5 ve 1 j/cm^2 enerji yoğunluklarını kullanmışlardır. İlk lazer uygulamasını takiben 0, 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda her iki enerji yoğunluğunda da herhangi bir toksik etki etki gözlenmezken buna ek olarak bu enerji yoğunluklarındaki lazer uygulamasının kök hücreler üzerinde proliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak 1 j/cm^2 enerji yoğunluğundaki lazer uygulamasının 48 ve 72 saatlik süreler sonunda 0.5 j/cm^2 enerji yoğunluğundaki lazer uygulamasından ve kontrol grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek prolifertif etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rizzi ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada pre-odonblastik hücre hatları üzerine çeşitli enerji yoğunluklarında (0.65-32.47 j/cm^2) kızıl ötesi diyot lazer uygulamasının 0, 5, 15, 30 ve 60 dakikalık süreler sonundaki toksik ve proliferatif etkilerini değerlendirmişlerdir. Yapılan bu çalışmanın sonuçları bütün enerji yoğunluklarının hücreler üzerinde herhangi bir toksisiteye sebep olmadan proliferatif etkiye sahip olduklarını göstermiştir.

Barboza ve arkadaşlarının (2014) mezenşimal kök hücreler üzerine 0.5 ve 1 j/cm^2 enerji yoğunluklu lazer uygulamasının toksik ve proliferatif etkilerini değerlendikleri çalışmada, uygulanan enerji yoğunluklarının hücreler üzerinde herhangi bir morfolojik değişikliğe sebep olmadan özellikle 48 ve 72 saat sonunda yüksek proliferatif etkileri olduğunu bildirmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

"Diyot Lazer, Ozonlu Su ve Çeşitli İrrigasyon Ajanlarının Süt Dişi Kök Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi" isimli tez çalışması YDÜ Deneysel Araştırma Merkezi Hücre Kültürü ve YDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasına başlanmadan önce gerekli etik kurul onayı "Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Etik Kurulu" ndan alınmıştır (Bkz. EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi, onay tarihi: 22.02.2018 ve onay belgesi no: 2018/55-526) .

Yapılan tez çalışmasında endodontik tedavilerde kök kanalı dezenfeksiyonunda kullanılan EDTA ve NaOCl'e alternatif olarak önerilen ozonlanmış su ve diyot lazer uygulamasının düşme zamanı gelmiş süt dişlerinden elde edilmiş kök hücrelerin canlılığına olan etkisi MTT analizi ve immünohistokimyasal apoptoz analizi olan TUNEL testi yöntemiyle araştırılmıştır. Tez çalışmasında daha önce YDU/2015/34-243 numaralı etik kurul onayı ile yapılmış olan doktora tezinde kullanılan karakterize edilmiş ve dondurulmuş düşme zamanı gelmiş süt dişi kök hücreleri kullanılmıştır.

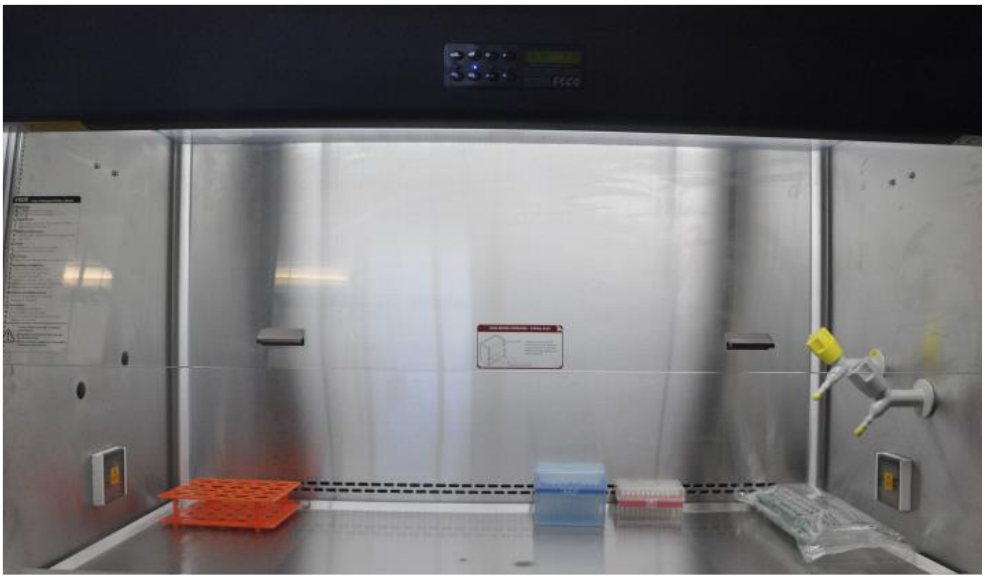
3.1.Tez Çalışmasında Test Edilmek Üzere Belirlenen Hipotezler

Kullanılan irrigasyon solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonunun SHEDs üzerindeki biyolojik cevabının belirlenmesi için çalışmamızda 2 adet hipotez belirlenmiştir:

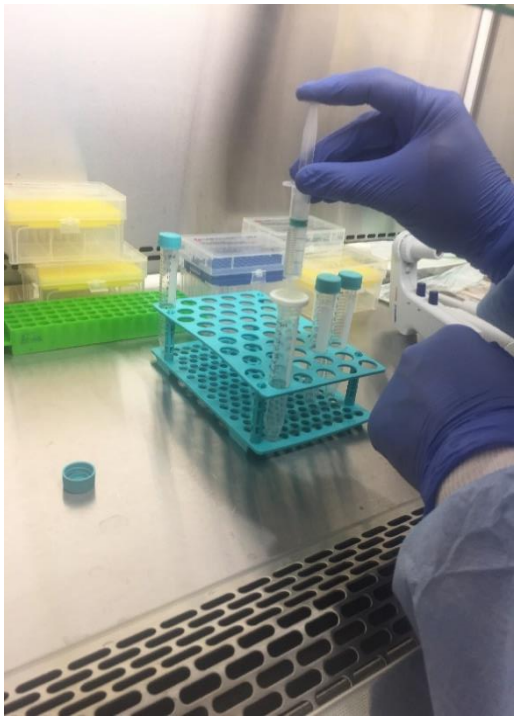
1. İn vitro koşullarda SHEDs üzerinde EDTA, NaOCl, ozonlanmış su ve düşük seviyeli diyot lazer irradyasyonunun toksik etkileri arasında fark vardır.
2. Klinik uygulamarda kullanılan EDTA ve NaOCl dozlarıyla, ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonunun hücresel canlılığa en fazla zarar veren dozlarının apoptotik etkileri arasında fark vardır.

3.2.Kök Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültivasyonu

Tez çalışmasında karakterize edilmiş ve -80°C' de dondurulmuş SHEDs'ler kullanılmıştır. Hücrelere su banyosunda çözdürme işlemi yapılmadan önce laminar flow kabinde kültür vasatı hazırlanmıştır. 50 ml kültür vasatı için; 25 ml Dulbecco's modified Eagle's Medium (D-MEM) (Biochrom, Berlin, Germany), 500 µl penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), 500 µl L-glutamin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), 200 µl amfoterisin-B (Gibco, New York, USA), 1 ml gentamisin (Gibco, New York, USA), 7.5 ml fetal sığır serumu (FBS, EURX, South America, Brazil) 50 ml'lik hacme sahip falkon tüplerde (Thermo Fisher Scientific, Canada) karıştırıldıktan sonra toplam 50 ml oluncaya kadar DMEM eklenmiştir. Oluşan bu vasat karışımı 0.22 µm şırınga filtresinden (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) geçirilerek başka bir 50 ml'lik falkon tüpe alınmtıştır. Dört vial donmuş pasaj 2 (P2) SHEDs 37°C ısısı olan su banyosunda (Huber CC-208B with Pilot ONE, Germany) çözdürülmüştür.



Resim 3.2.1. Laminar flow ultraviyole kabin



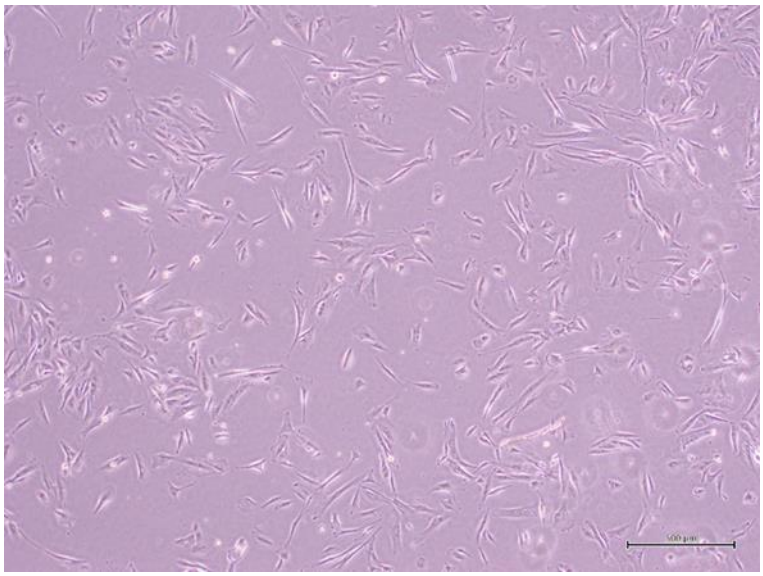
Resim 3.2.2. Laminar flow kabinde filtreleme işlemi

Resim 3.2.3. Su banyosu

Her bir erimiş vial ayrı ayrı olacak şekilde, 4 tane 3 ml kültür vasatı eklenmiş 15 ml'lik falkona alınarak 5 dakika boyunca 37°C' de 1000 RPM devirde santrifüj edilmiştir (Sigma 3-18 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany).

Resim 3.2.4. Santrifüj cihazı

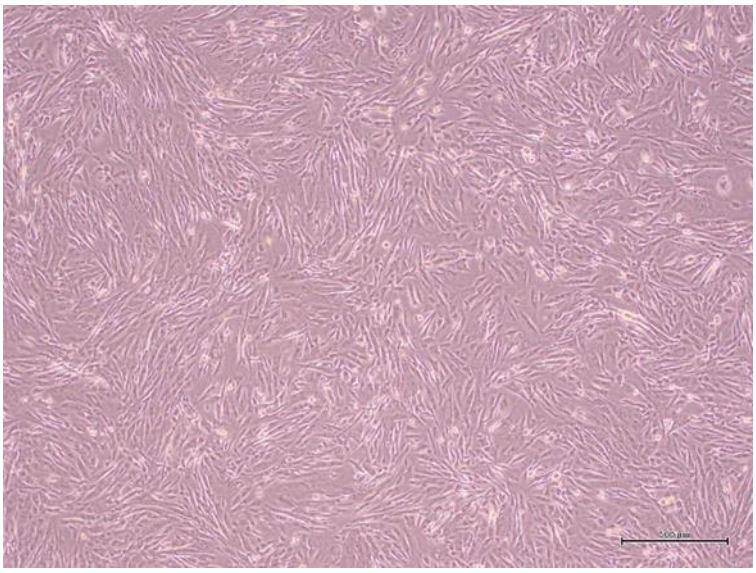
Santrifüj işleminin ardından her bir vialin eklendiği falkon için dibe çöken hücrelerin üzerindeki süpernatant atılıp falkona tekrar 3 ml kültür vasatı eklenerek çalkalama işlemiyle 4 adet 3 ml homojen hücre süspansiyonları elde edilmiştir. Daha sonra 2 ml kültür vasatı bulunan flasklara hücre süspansiyonları eklenerek kültivasyon işlemi tamamlanmıştır. Hücrelerin kültive edildiği 4 flask 37°C'de 5% CO_2 yoğunluklu hava olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan flasklardaki kültür vasatı 2 günde bir 5ml vasatla yenilenmiştir. Kök hücrelerin çoğalmaları her vasat değişimi sırasında inverted mikroskop (Olympus IX53 Inverted MICROSCOPE; Tokyo, Japonya) ile incelenip, kök hücrelerin flask tabanındaki yoğunluğu %80'e ulaşınca pasajlama prosedürüne başlanmıştır.



Resim 3.2.5. Flask tabanına yapışıp prolifere olan kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm

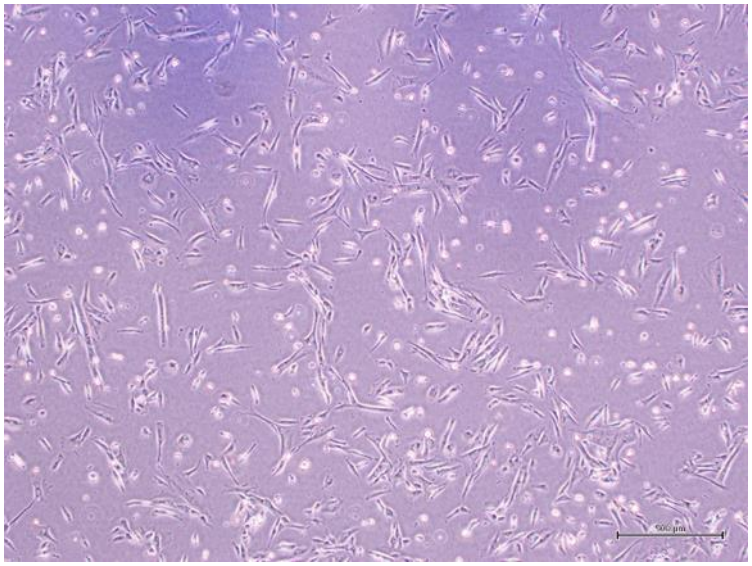
3.3.SHEDs'lerin Pasajlanması

Kültivasyonu takiben %80 yoğunluğa ulaşan kök hücreler; proliferasyon kapasitelerinde herhangi bir inhibisyon gözlenmemesi için pasajlanmışlardır.

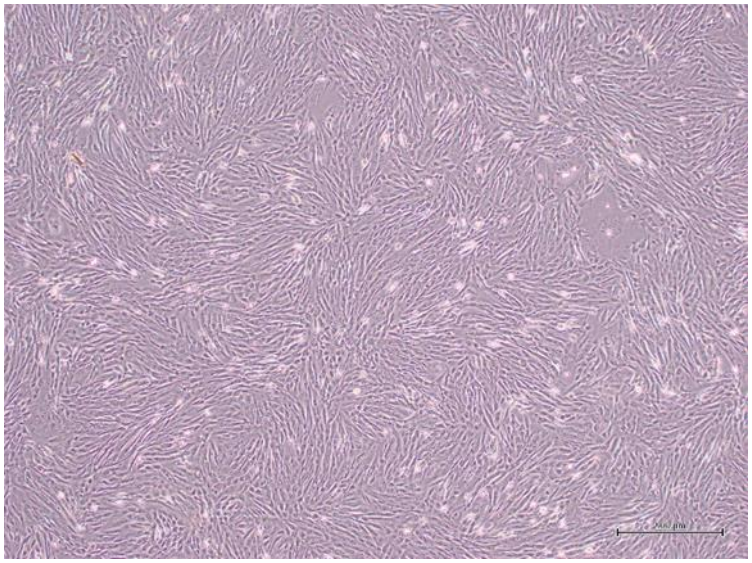


Resim 3.3.1. %80 yoğunluğa ulaşan kök hücreler Magnifikasyon:500 µm

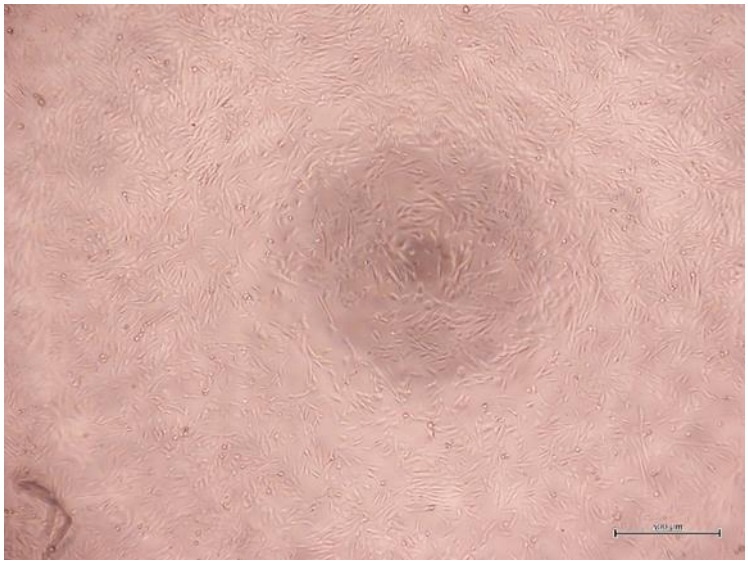
Pasajlama işlemi için %80 yoğunluğa ulaşmış hücre içeren flasklardaki kültür vasatı atılarak her bir flaska 2.5 ml Tripsin-EDTA ilave edilmiş ve flasklar 37°C'de 5% CO_2 yoğunluklu hava ortamında 10 dk inkübe edilmiştir. Tripsinize edilen kök hücrelerin üzerine 2.5 ml kültür vasatı eklenerek oluşan çözelti, pipetaj yapılarak 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Bu işlemi takiben falkon tüpler santrifüj cihazında (Sigma 3-18 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany) 5 dakika süreyle 1000 RPM devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda oluşan hücre çökeltileri üzerindeki supernatant atılıp 2 ml kültür vasatı eklenerek oluşturulan homojen hücre çözeltileri 3 ml kültür vasatı eklenmiş 25 cm^3'lük flasklara aktarılarak pasajlama işlemi tamamlanmıştır. Tez çalışmamızda Pasaj 3 kök hücreler kullanılmıştır.



Resim 3.3.2. Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm



Resim 3.3.3. %80 yoğunluğa ulaşan Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm



Resim 3.3.4. 96 kuyulu ekim kabının tabanına yapışan Pasaj 3 kök hücreler Magnifikasyon: 500 µm

3.4.Deney Gruplarının Belirlenmesi

3.4.1.Sitotoksisite Analizi İçin Deney Gruplarının Belirlenmesi

Sitotoksisite analizi için EDTA, NaOCl, Ozonlanmış su ve diyot lazer uygulamasının yapıldığı 12 deney grubu ve bir adet kontrol grubu oluşturulmuştur:

Grup 1: %5 EDTA

Grup 2: %8.5 EDTA

Grup 3: %17 EDTA

Grup 4: %1 NaOCl

Grup 5: %2.5 NaOCl

Grup 6: %5.25 NaOCl

Grup 7: 5 µg/ml Ozonlanmış Su

Grup 8:10 µg/ml Ozonlanmış Su

Grup 9:15 µg/ml Ozonlanmış Su

Grup 10: 0.5 j/cm² diyot lazer irradyasyonu

Grup 11: 1 j/cm² diyot lazer irradyasyonu

Grup 12: 1.5 j/cm² diyot lazer irradyasyonu

Grup 13: Kontrol Grubu

Hücresel canlılığın tespit edilebilmesi için MTT analizi, her grup için 5., 10. ve 15. dakikalarda tekrarlanmıştır. Bu amaçla her bir zaman periyodu için ayrı 96 kuyulu ekim kabı kullanılmıştır. Ekim yapılacak 96 kuyulu ekim kapları deney protokolüne başlanmadan önce her bir kuyuya hücre ekimi yapılarak 24 saat boyunca 37°C'de 5% CO_2 yoğunluklu hava ortamında inkübe edilmiştir. Deney gruplarında hücre ekilen her kuyuya, 100 µl kültür vasatı ve 100 µl ilgili test solüsyonu toplamda 200 µl'lik karışım olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu ve diyot lazer gruplarına ise 200 µl kültür vasatı eklenmiştir.

3.4.2.İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi İçin Deney Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmanın bu basamağında, MTT deney gruplarımızda EDTA ve NaOCl için klinik protokol dozları, ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyon grupları içinse MTT analizi sonuçlarında toksisitesi en yüksek çıkan deney grupları seçilerek SHEDs'lerde oluşacak ölüm tipini tespit etmek amacıyla immünohistokimyasal apoptoz testi uygulanmıştır.

Grup I: %17 EDTA

Grup II: %1 NaOCl

Grup III: 10 µg/ml Ozonlanmış Su

Grup IV: 1.5 j/cm^{2}Diyot Lazer İrradyasyonu

Grup V: Negatif Kontrol Grubu

Grup VI: Pozitif Kontrol Grubu

3.5.SHEDs'lerin Thoma Lamı Kullanılarak Sayılması

Kültive edilmiş kök hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama prosedüründeki gibi tripsinize edildikten sonra flask tabanından kaldırılarak santrifüj işlemi uygulanmıştır. Falkon tüp dibine çöken hücrelerin üzerlerindeki supernatant atılarak 2 ml kültür vasatı ilave edilmiştir. Dibe çöken hücreler bu kültür vasatı ile homojen hale gelene kadar pipetaj işlemi ile karıştırılmıştır. Homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 10 µl hücre süspansiyonu alınarak thoma lamında (Superior Marienfeld, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany) hücre sayım alanına konulmuş ve inverted mikroskop (Olympus IX53 Inverted MICROSCOPE; Tokyo,

Japonya) ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 96 kuyulu ekim kabında her kuyuya 200 µl'de $5x10^3$ sayıda hücre olacak şekilde hücre süspansiyonları eklenmiştir.

3.6.Deneyde Kullanılan İrrigasyon Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan EDTA ve NaOCl solüsyonları kültür vasatıyla 1:1, 1:2, 1:4 oranında dilüe edilerek EDTA için %17, %8 ve %5; NaOCl için ise %5, %2.5 ve %1 olarak hazırlanmıştır. Tez çalımamızın ozonlanmış su gruplarında yer alan deney örrnekleri için; iki kez distile edilmiş steril suyun medikal ozon jeneratörüyle (Humazon ProMedic Medikal Ozon Jeneratörü, Humares, Bruchsal, Germany) 5 dakika süresince ozonlanmasıyla 5 µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda ozonlanmış su hazırlanmıştır. Hazırlanan ozonlanmış sular +4°C' de muhafaza edilerek laminar flow kabine ulaştırılmış ve solüsyonlar kültür vasatıyla 1:1 oranında dilüe edildikten sonra 0.22 µm şırınga filtresiyle filtre edilerek 96 kuyulu ekim kaplarına eklenmiştir.

Resim 3.6.1. Medikal ozon jeneratörü

3.7.Deneyde Kullanılan Diyot Lazer Parametreleri

Tez çalışmamız için 980 nanometre dalga boyuna sahip Galliyum Aliminyum Arsenit (GaAlAs) (Medency Primo dental laser, Vicenza, İtalya) dental diyot lazer

kullanılmıştır. Uygulanan lazer parametreleri aşağıdaki formül kullanılarak j/cm^2 birimiyle ifade edilen enerji yoğunluğuna dönüştürülmüştür.

$$\frac{\text{uygulama süresi (s)x watt}}{\text{uygulanan lazer başlığının alanı}} = \text{j/cm}^2$$

Çalışmamızda diyot lazer 0.5 j/cm^2, 1 j/cm^2, 1.5 j/cm^2 olmak üzere 3 farklı enerji yoğunluğunda ve uygulama alanı ucu 0.28 cm^2 olarak kullanılmıştır. 3 farklı enerji yoğunluğunun elde edilebilmesi için diyot lazerin güç modu sırasıyla 0.014, 0.028 ve 0.042 W' a ayarlanmıştır. Uygulanan bütün enerji yoğunluklarında devamlı atım (continuous mode) moduyla 10 saniye irradyasyon uygulanmıştır. Uygulama sırasında lazer başlığı 96 kuyulu ekim kabında ilgili kuyuların 0.5 cm üzerinde tutulmuştur.

3.8.Sitotoksisitenin Belirlenmesi İçin Kullanılan MTT Analizi

Hücresel canlılık testi yapılmadan 24 saat önce her bir zaman periyodu toplam 3 adet 96 kuyulu ekim kabına her bir kuyuda 200 µl kültür vasatında 5x10^3 sayıda hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekimden 24 saat sonra sırasıyla 5 dakikalık aralıklarla önce 15, sonra 10 ve daha sonra 5 dakika süreyle inkübe edilecek olan ekim kaplarına deneyde kullanılan irrigasyon solüsyonları ve 3 farklı enerji yoğunluğunda diyot lazer irradyasyonu uygulanmıştır. Deney protokolünün ardından her bir zaman periyoduna uygun olacak şekilde 96 kuyulu ekim kapları 37°C'de 5% CO_2 yoğunluklu hava ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücresel canlılığı ve proliferasyonun tespit edilmesi amacıyla, deney grupları ve kontrol grubu için 5, 10 ve 15 dakikalık süreler sonunda 3- [4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT) indirgenmesi ile mitokondiyal aktivitenin değerlendirilmesi için MTT analiz yöntemi kullanılmıştır:

- Analiz için; MTT sölüsyonu, salinle tamponlanmış fosfat çözeltisinde 5 mg/ml MTT tozu (thiazolyl blue tetrazolium bromide, 98%, Fisher Scientific, USA) olacak şekilde aliminyum folyo ile kaplanmış falkon tüpte el ile çalkanarak hazırlanmıştır.
- Her kuyuda bulunan kültür vasatları ve deney solüsyonları pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan MTT solüsyonu 96 kuyulu ekim kabındaki her kuyuya 1:9 oranında 10 µl MTT solüsyonu, 90µl kültür vasatı olacak

şekilde eklenmiştir. Bu işlemi takiben her bir zaman periyodu için olan 96 kuyulu ekim kapları aliminyum folyo ile kapatılarak 37 ° C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon süresi bitiminde her kuyudaki MTT solüsyonu pipetajla uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyuya 50 µl dimetil sülfoksit (D2650; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) eklenerek formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır.
- Çalışmada kullanılan 3 adet 96 kuyulu ekim kapları absorbans değeri 540 nm dalga boyunda mikro plaka okuyucu spektrofotometre (Versa Max Tunable
- Microplate Reader, Molecular Devices, San Jose, USA) ile analiz edilmiştir.
- Elde edilen optik yoğunluk değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hücresel canlılık yüzdesine çevrilmiştir:

$$\frac{\text{deney grubu optik yoğunluk ortalaması}}{\text{kontrol grubu optik yoğunluk ortalaması}} \times 100 = \%\ \text{Hücresel Canlılık}$$

Uygulanan formüle göre hücresel canlılığı %50' nin altına düşüren doz inhbitör doz olarak esas alınmıştır.

3.9.Hücre Ölümünün Tespiti İçin Kullanılan İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi

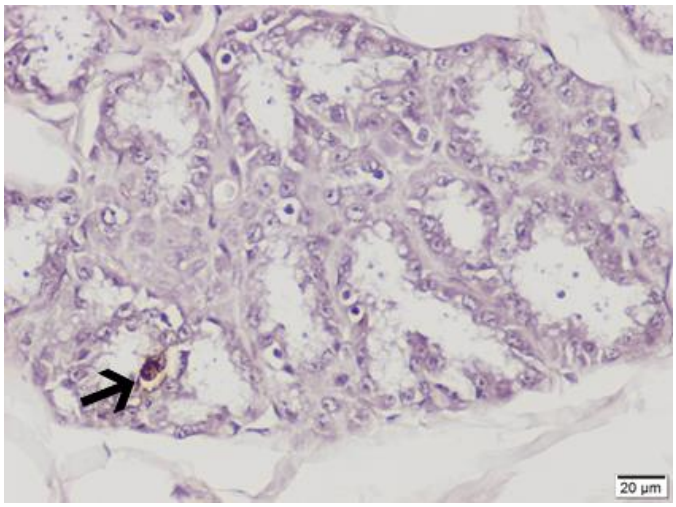
Apoptotik hücrelerin tespiti için uygulanan TUNEL yöntemi, üreticinin talimatlarına uygun olacak şekilde "ApopTag Plus Peroxidase in situ apoptozis saptama kiti" (S7101; Merck Millipore, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Apoptotik analiz için klinik endodontk rehberlerde önerilen uygulama dozu olan %17 EDTA, %1 NaOCl ve diğer ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu gruplarına göre hücresel canlılıkta daha fazla azalmaya sebep olan 10 µg/ml ozonlanmış su ve 1.5 j/cm^2 enerji yoğunluklu diyot lazer irradyasyonu ve zaman periyodu olarak da 15 dakika seçilmiştir. İrrigasyon solüsyonları ve diyot lazer uygulanmadan 24 saat önce kök hücreler 24 gözlü ekim kabına ekilmiştir. Ekim işleminden önce her bir göze önceden otoklavda steril edilmiş 12 mm yuvarlak lameller presel yardımıyla yerleştirilip 15 dakika süre ile 500 µl fetal sığır serumu eklenerek bekletilmiştir. 15 dakikanın sonunda fetal sığır serumu pipetaj yapılarak gözlerden uzaklaştırılmıştır. Bu işlem süresince kullanılacak flasktaki SHEDs'ler 2.5 ml Tripsin-EDTA eklenerek 10 dk 37°C'de 5%

CO_2 yoğunluklu hava ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından flask tabanından kalkan hücrelere 2.5 ml kültür vasatı eklenerek toplanıp 15 ml'lik falkon tüpe alınmıştır. Falkon tüp 5 dakika 1000 RPM'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından hücrelerin üzerindeki süpernatant atılarak falkon tüpe 2 ml kültür vasatı eklenip hücre çökeltisi homojen hücre süspansiyonu oluncaya kadar vasat ile pipetaj yöntemi kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra bu hücre süspansiyonundan 10 µl pipetaj ile alınarak thoma lamı sayımını takiben 24 gözlü ekim kabında her bir gözde $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim işleminden 24 saat sonra, irrigasyon solüsyonu olarak %17 EDTA, %1 NaOCl ve 10 µg/ml ozonlanmış su her bir solüsyondan ilgili göze 250 µl deney solüsyonu 250 µl kültür vasatı 1:1 dilüe edilerek eklenmiştir. 1.5 j/cm^2 diyot lazer irradyasyonu uygulanacak gözlere ise 500 µl kültür vasatı eklenmiştir. Deney protokolü; test ajanları ilgili gözlere uygulandıktan sonra SHEDs'ler 15 dakika 37°C'de 5% CO_2 yoğunluklu hava ortamında inkübe edilerek tamamlanmıştır. 15 dakikalık inkübasyonun sonunda hücrelerin üzerindeki test solüsyonları ve kültür vasatı pipetaj ile uzaklaştırılarak her bir göz 1 ml salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, Ph:7.3, Medicago) ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardından fiksasyon ve TUNEL analizi aşamasına geçilmiştir:

- Hücreler salinle tamponlanmış fosfat çözeltisinde çözülerek elde edilmiş %4 paraformaldehit solüsyonunda 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir.
- Fiksasyon işleminin sonunda hücrelerin üzerindeki paraformaldehit solüsyonu uzaklaştırılarak hücreler 3 kez 5'er dakika toplamda 15 dakika boyunca salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi ile yıkanmıştır.
- Yıkama işleminin ardından hücrelere, hücre zarlarının permeabilizasyonunu sağlamak amacıyla buz üstünde 15 dakika boyunca salinle tamponlanmış fosfat çözeltisinde dilue edilmiş Triton-X 100 (T8532; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) uygulanmıştır.
- Permeabilizasyon işleminden sonra hücreler 2 kez daha 5 dakika süreyle salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi ile yıkanmıştır.
- Hücreler, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için oda sıcaklığında 30 dakika boyunca metanolde çözünmüş %3 hidrojen peroksit içinde inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez daha 5 dakika süreyle salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi ile yıkanmıştır.
- Bu aşamalardan sonra, hücreler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında dengeleme tamponu ile onun ardından ise TdT-enzimi ile 1 saat süreyle 37 ° C'de nemli ve bu enzim ışığa duyarlı olduğu için 24 gözlü ekim kabına aliminyum folyo sarılarak karanlık hale getirilen bir ortamda inkübe edilmiştir.
- Daha sonra bu reaksiyonların, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca durdurma/yıkama tampon çözeltisi ilave edilerek durdurulmasının ardından hücreler tekrar 3 kez 5'er dakika salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi ile yıkanıp oda sıcaklığında 30 dakika boyunca anti-digoksigenin peroksidaz ile inkübe edilmiştir.
- Her deney basamağı ardından yapılan salinle tamponlanmış fosfat çözeltisi yıkamaları ile kullanılan kit komponentlerinin etkilerinin devam etmesi ve birbiri ile karışması engellenmiştir.
- İmmüno-etiketlemeyi görselleştirmek için yapılan boyama, optik mikroskop (Olympus IX53, Tokyo, Japonya) altında diaminobenzidin (DAB) çözeltisi (ScyTek, West Logan, Amerika Birleşik Devletleri) ve Mayer's hematoksilen eozin (Sigma Aldrich, St. Louis, ABD) ile yapılmıştır.

Uygulanan metotun apoptotik hücreleri boyayabildiğinin doğrulanması için kullanılan apoptoz kitinin içinde yer alan pozitif kontrol grubu boyanarak mikroskop görüntüsü alınmıştır (Resim 3.9.1.).



Resim 3.9.1: Pozitif Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm

TUNEL-pozitif apoptotik hücreler, kontrol ve her bir deney grubunun immünohistokimyasal boyama örneğinde rastgele seçilen 5 alan ile sayılmıştır. Her alanda kahverengi boyanmış apoptotik hücrelerin yüzdesi, aşağıdaki denklem ile belirlenmiştir:

$$\frac{\text{Herbir alandaki TUNEL metoduyla boyanmış hücre sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 = \%\text{TUNEL-pozitif Hücre}$$

3.10.İstatistiksel Analiz

TUNEL testinde elde edilen veriler, Dunn’s post-hoc testi ile tamamlanan Kruskal Wallis analizi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Her irrigasyon solüsyonu ve diyot lazer irradyasyonu grubu için gruplar arası ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri arasındaki fark, One-Way ANOVA analizi ardından Tukey's post hoc testi ile çoklu karşılaştırmalar yapılarak analiz edilmiştir. Anlamlılık seviyesi % 5 olarak belirlenmiştir ($p<0.05$) ve elde edilen tüm veriler ‘Graphpad Prism 6.0’ istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

EDTA, NaOCl, ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonunun süt dişlerinden elde edilmiş kök hücrelerin canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yaptığımız tez çalışmamızda, uygulama yapılan bütün gruplarda ve kontrol grubunda bütün zaman periyotlarında hücresel canlılıkta meydana gelen değişimler MTT analizi yöntemiyle ölçülüp optik yoğunluk değerlerinin ve TUNEL yöntemiyle tespit edilen TUNEL pozitif hücrelerin yüzdelerinin ortalamaları tüm deney gruplarını birbiri ile kıyaslamak amacıyla standart sapmaları belirlenerek karşılaştırılmıştır.

4.1.Tüm Zaman Periyotlarında Kontrol Grubundan Elde Edilen MTT Analizi Bulguları

Tüm zaman periyodlarında kontrol gruplarından MTT analizi ile elde edilen verilerin karşılaştırıldığı One-Way ANOVA testini takiben yapılan Tukey's post-hocçoklu karşılaştırma testinin sonuçlarına göre grupların 5, 10 ve 15 dakikalık inkübasyonlar sonucu göstermiş olduğu optik yoğunluk değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Ancak en yüksek optik yoğunluk değeri 2,026±0,02833 ile 5. dakikadaki kontrol grubunda elde edilirken en düşük optik yoğunluk değeri 1,708±0,004484 ile 15. dakika kontrol grubunda elde edilmiştir. 10. dakika kontrol grubunda ise optik yoğunluk değeri 1,839±0,05244 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1.1.).

Tablo 4.1.1. Tüm zaman periyotlarındaki kontrol gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri.

		p		
	Grup 13	5 dk *vs* 10 dk	5 dk *vs* 15 dk	10 dk *vs* 15 dk
5 dk	2,026±0,028	>0,9999	>0,9999	-
10 dk	1,839±0,052	>0,9999	-	>0,9999

15 dk	1,708±0,004	-	>0,9999	>0,9999

4.2.Tüm Zaman Periyotlarında EDTA Solüsyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları

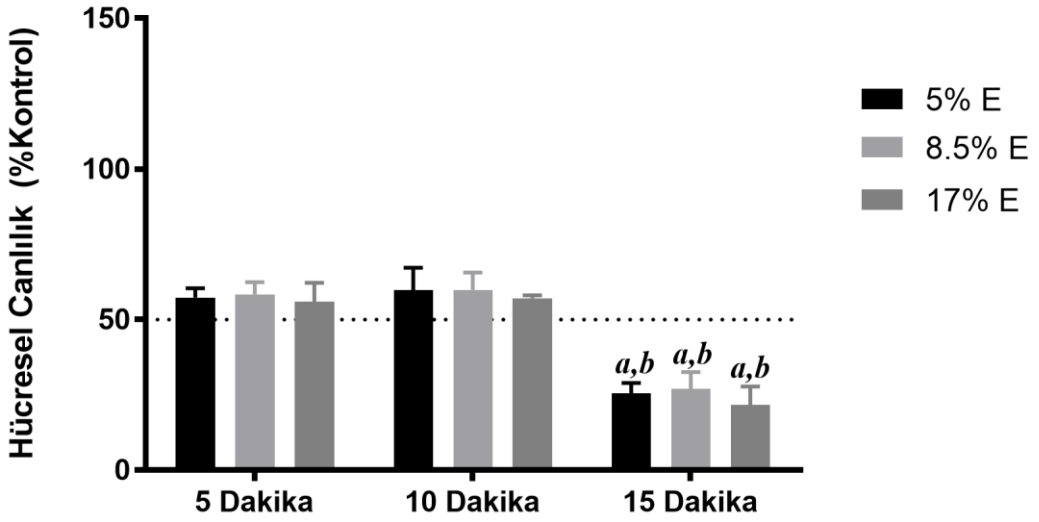
EDTA'nın %5 (Grup 1), %8.5 (Grup 2) ve %17 (Grup 3)' lik konsantrasyonlarının uygulandığı gruplardaki ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdesi değerleri arasındaki fark bütün zaman periyotları, kendi içinde ve diğer zaman periyotları ile One-Way ANOVA testini takiben yapılan Tukey's post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonucunda 1.161±0.06405 değeri ile en yüksek ortalama optik yoğunluk değerine Grup 1 sahipken bu grubu Grup 2 1.182±0.08289' luk ortalama optik yoğunluk değeri ile takip etmektedir. Grup 3 ise 1.132±0.1296 değeri ile en düşük ortalama optik yoğunluk değerini göstermiştir. 5 dakikalık inkübasyon periyodu göz önünde bulundurularak dozlara göre ortalama optik yoğunluk değerleri arasında mevcut olan farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). Grup 1, 2 ve 3 ün elde edilen ortalama optik yoğunluk değerleri uygulanan formülle % hücresel canlılığa dönüştürüldüğünde ise Grup 1'in %57.32±3.163, Grup2'nin %58.38±4.088 ve Grup 3'ün de %55.88±6.395'lik hücresel canlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Ortalama hücresel canlılık yüzdesi değerlerinin arasındaki fark da ortalama optik yoğunluk değerlerinde olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$) (Tablo 4.2.1.).

Tablo 4.2.1. Tüm zaman periyotlarındaki EDTA gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri.

				p		
	Grup 1	**Grup 2**	**Grup 3**	G 1 *vs* G 2	G 1 *vs* G 3	G 2 *vs* G 3
5 dk	1.161±0.064	1.182±0.082	1.132±0.129	>0,999	>0,999	>0,999
10 dk	1,099±0,137	1,101±0,107	1,051±0,017	>0,999	>0,999	>0,999
15 dk	0,4372±0,057	0,4619±0,095	0,3703±0,104	>0,999	>0,999	>0,999

Gruplar arası değerler 10 dakikalık inkübasyon süresi içinde karşılaştırıldığında en yüksek değer 1,101±0,1074 ortalama optik yoğunluk değeri ile Grup 2' ye ait iken bu grubu 1,099±0,1371 ortalama optik yoğunluk değeri ile Grup 1 takip etmiştir. En düşük değerin gözlendiği Grup 3' teki ortalama optik yoğunluk değeri ise 1,051±0,01714 olarak tespit edilmiştir. Grup 1,2 ve 3'ün ortalama optik yoğunluk değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). Ortalama optik yoğunluk değerlerine paralel olarak hücresel canlılık yüzdesi değerleri Grup 1'de %59,76±7,454; Grup 2'de %59,86±5,834 ve Grup 3'de ise %57,15±0,9334 olarak tespit edilmiştir. Bu ortalama hücresel canlılık yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). İnkübasyon sürelerine göre kıyaslama yapıldığında ise 10 dakikalık inkübasyon süresinin sonunda Grup 1, 2 ve 3 ten elde edilen ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdesi değerlerinin, 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki değerlerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak iki inkübasyon periyodu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

Tüm EDTA solüsyonu gruplarında 15 dakikalık inkübasyon periyodu esas alındığında SHEDs'lerde hücresel canlılığın %50'nin altına düştüğü tespit edilmiştir. En yüksek ortalama hücresel canlılık yüzdesi %25,59±3,363 ile Grup 2'de gözlenirken en düşük ortalama hücresel canlılık yüzdesi ise %21,67±6,101 Grup 3'te gözlenmiştir. Grup 1'deki ortalama hücresel yüzdesi ise %27,03±5,581 olarak tespit edilmiştir. Her 3 grup arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). Ortalama optik yoğunluk değerleri incelendiğinde Grup 1, 2 ve 3'te sırasıyla 0,4372±0,05741, 0,4619±0,09543 ve 0,3703±0,1042 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdesi değerlerinin, 5 dakikalık ve 10 dakikalık inkübasyon süreleri sonundaki değerlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p<0.0001$). (Şekil 4.2.1.)



Şekil 4.2.1. SHEDs'lerde EDTA solüsyonlarının 5, 10 ve 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık.

**Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Bütün EDTA grupların hücresel canlılık yüzdeleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. [a]*p<0.05* 5 dakikalık zaman periyoduna; [b]*p<0.05 10* dakikalık zaman periyoduna göre anlamlılık seviyesi olarak belirlendi.

4.3.Tüm Zaman Periyotlarında NaOCl Solüsyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları

NaOCl solüsyonunun %1 (Grup 4), %2.5 (Grup 5) ve %5 (Grup 6) olmak üzere bütün gruplarının tüm inkübasyon periyotlarındaki ve periyotlar arasındaki ortalama optik yoğunluk değeri ve hücresel canlılık yüzdesi ortalamalarının farkı,One-Way ANOVA testini takiben yapılan Tukey's post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. 5 dakikalık inkübasyon periyodunun sonunda Grup 4, 5 ve 6'daki ortalama optik yoğunluk değerleri sırasıyla 1,264±0,08525; 1,26±0,0955 ve 1,119±0,1235 olarak elde edilmiştir. Ortalama optik yoğunluk değerleri hücresel canlılık yüzdesi ortalamasına çevrildiğinde ise Grup 4'ün %62,4±4,205, Grup 5'in %62,22±4,714 ve Grup 6'nın ise %55,25±6,095'lik bir hücresel canlılık yüzdesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3.1.). Bütün bu değerler arasındaki fark ise

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; *p*>0.05).

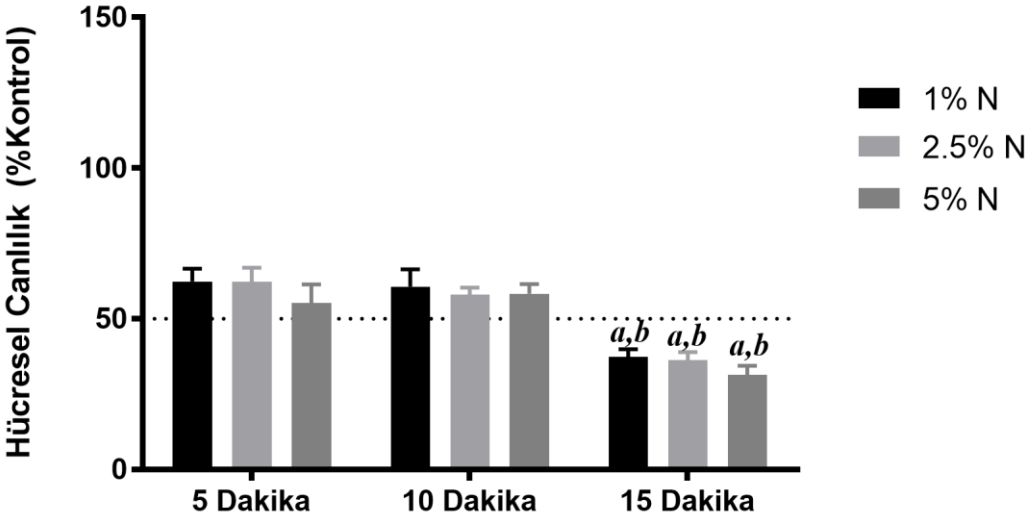
Tablo 4.3.1. Tüm zaman periyotlarındaki NaOCl gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri.

				p		
	Grup 4	**Grup 5**	**Grup 6**	G 4 *vs* G 5	G 4 *vs* G 6	G 5 *vs* *G* 6
5 dk	1,264±0,085	1,26±0,095	1,119±0,123	>0,9999	0,9995	0,9998
10 dk	1,115±0,107	1,067±0,042	1,072±0,060	>0,9999	>0,9999	>0,9999
15 dk	0,6506±0,061	0,6196±0,046	0,5898±0,039	>0,9999	>0,9999	>0,9999

NaOCl gruplarının 10 dakikalık inkübasyon periyodu bitiminde sahip oldukları ortalama optik yoğunluk değerleri Grup 4, Grup 5 ve Grup 6' da sırasıyla, 1,115±0,107, 1,067±0,0423 ve 1,072±0,0601 olarak elde edilmiştir. Ortalama hücresel canlılık yüzdesi %60,62±5,819'luk ortalama yüzdeyle en yüksek Grup 4'de gözlenmiştir. Grup 5 ve Grup 6 sırasıyla %58±2,301 ve %58,27±3,269 ortalama hücresel canlılık yüzdeleriyle birbirine yakın sonuçlar vermiştir. 10 dakikalık inkübasyon periyodu kendi içinde değerlendirildiğinde NaOCl gruplarının ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; *p*>0.05). 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdeleri, 5 dakikalık inkübasyon süresindeki değerlere oranla azalmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; *p*>0.05).

15 dakikalık inkübasyon süresinin sonunda bütün NaOCl gruplarındaki ortalama hücresel canlılık yüzdesi %50'nin altına düşmüştür. 15 dakika inkübasyon sonucu elde edilen ortalama hücresel canlılık yüzdeleri Grup 4 için %37,42±2,453; Grup 5 için %36,27±2,714; Grup 6 için ise %35,97±1,916 olarak tespit edilmiştir. Elde

edilen ortalama optik yoğunluk değerleri ise Grup 4'te 0,6506±0,06138, Grup 5'te 0,6196±0,04638 iken Grup 6'da 0,5898±0,03941 şeklindedir. 15 dakikalık inkübasyon periyodu kendi içinde değerlendirildiğinde NaOCl gruplarının ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). NaOCl grupları inkübasyon sürelerine göre kıyaslamaya dahil edildiğinde ise; 15 dakikalık inkübasyon süresi sonundaki ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdesinin değerleri 5 ve 10 dakikalık inkübasyon süreleri sonundaki değerlerden istatiksel olarak anlamlı düzeyde düşük çıkmıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p<0.0001$) (Şekil 4.3.1.).



Şekil 4.3.1. SHEDs'lerde NaOCl solüsyonlarının 5, 10 ve 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık.

**Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Bütün NaOCl grupların hücresel canlılık yüzdeleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. $^{a}p<0.05$ 5 dakikalık zaman periyoduna; $^{b}p<0.05$ *10* dakikalık zaman periyoduna göre anlamlılık seviyesi olarak belirlendi.

4.4.Tüm Zaman Periyotlarında Ozonlanmış Su Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları

Ozonlanmış suyun 5 µg/ml (Grup 7), 10 µg/ml (Grup 8) ve 20 µg/ml (Grup 9) konsantrasyonlardaki solüsyonlarının tüm inkübasyon periyotları sonundaki ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri One-Way ANOVA testini

takiben yapılan Tukey's post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki ortalama hücresel canlılık yüzdesi değerleri Grup 7 için %97,88±1,78; Grup 8 için %98,63±3,835 ve Grup 9 için ise %101,3±2,686 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu hücresel canlılık yüzdesi verilerine paralel olarak ortalama optik yoğunluk değerleri de Grup 7, 8 ve 9 için sırasıyla 1,983±0,03611, 1,998±0,07761 ve 2,052±0,05447 bulunmuştur (Tablo 4.4.1.). Her 3 grup için 5 dakikalık inkübasyon periyodunda elde edilen ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

Tablo 4.4.1. Tüm zaman periyotlarındaki Ozonlanmış Su gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri.

				p		
	Grup 7	**Grup 8**	**Grup 9**	G 7 *vs* G 8	G 7 *vs* G 9	G 8 *vs* *G* 9
5 dk	1,983±0,036	1,998±0,077	2,052±0,054	>0,9999	>0,9999	>0,9999
10 dk	1,932±0,039	1,901±0,036	1,907±0,038	>0,9999	>0,9999	>0,9999
15 dk	1,775±0,037	1,72±0,025	1,725±0,067	>0,9999	>0,9999	>0,9999

10 dakikalık inkübasyon periyodunda da Grup 7, 8 ve 9' da gözlenen ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdesi değerleri ozonlanmış suyun tüm konsantrasyonlarının SHEDs'ler üzerindeki toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Ortalama optik yoğunluk değerleri bakımından değerlendirildiğinde Grup 7, 8 ve 9'da sırasıyla; 1,932±0,03995, 1,901±0,03679 ve 1,907±0,03826 olarak tespit edilmiştir. Bu ortalama optik yoğunluk değerleri hücresel canlılık yüzdesine çevrildiğinde ise bu üç grup için yine sırasıyla %105,1±2,174, %103,4±2 ve %103,7±2,079 olarak bulunmuştur. Bu her iki parametre istatistiksel olarak analiz edildiğinde ise ozonlanmış su gruplarından 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde edilmiş bu değerler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). İnkübasyon süreleri esas alınarak yapılan

istatistiksel karşılaştırmada ise 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda ortalama optik yoğunluk ve hücresel canlılık yüzdeleri, 5 dakikalık inkübasyon süresindeki değerlere oranla artış göstermesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

15 dakikalık inkübasyon süresi sonunda ortalama hücresel canlılık yüzdesi Grup 7, 8 ve 9 sırasıyla %103,9±2,214, %100,7±1,524 ve %101±3,953 olarak tespit edilmiştir. Ortalama optik yoğunluk değerlerine bakıldığında ise en yüksek ortalama 1,775±0,03782 ile Grup 7'de; en düşük ortalama 1,72±0,02599 ile Grup 8'de gözlenirken bu değer Grup 9'da 1,725±0,0675 olarak tespit edilmiştir. 15 dakika inkübasyon süresi esas alınarak yapılan karşılaştırmada gruplar arası değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). İnkübasyon periyotları arasındaki ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında ise bütün gruplar için en yüksek değerler 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. İnkübasyon sürelerine göre ortalama optik yoğunluk değeri ve hücresel canlılık yüzdesinde gözlenen farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

4.5.Tüm Zaman Periyotlarında Diyot Lazer İrradyasyonu Gruplarından Elde Edilen MTT Analizi Bulguları

Diyot lazer irradyasyonu uygulanan grupların bütün inkübasyon periyotları sonundaki ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri One-Way ANOVA testini takiben yapılan Tukey post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki ortalama optik yoğunluk değerleri Grup 10, 11 ve 12 için sırasıyla 1,953±0,03291, 1,943±0,06127 ve 2,047±0,147 olarak bulunmuştur. Ortalama hücresel canlılık yüzdesi değerlendirildiğinde ise Grup 10, 11 ve 12 için sırasıyla %96,39±1,625, %95,91±3,028 ve %101,1±7,257 bulunmuştur (Tablo 4.5.1.). 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonucunda elde edilen bu ortalama optik yoğunluk değerleri ve hücresel canlılık yüzdeleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

Tablo 4.5.1. Tüm zaman periyotlarındaki Diyot Lazer gruplarının optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, standart sapması ve Tukey post-hoc testinin *p* değerleri.

				p		
	Grup 10	**Grup 11**	**Grup 12**	G 10 *vs* G 11	G 10 *vs* G 12	G 11 *vs* *G* 12
5 dk	1,953±0,032	1,943±0,061	2,047±0,147	>0,9999	>0,9999	>0,9999
10 dk	1,869±0,060	1,852±0,049	1,81±0,027	>0,9999	>0,9999	>0,9999
15 dk	1,727±0,051	1,734±0,074	1,707±0,045	>0,9999	>0,9999	>0,9999

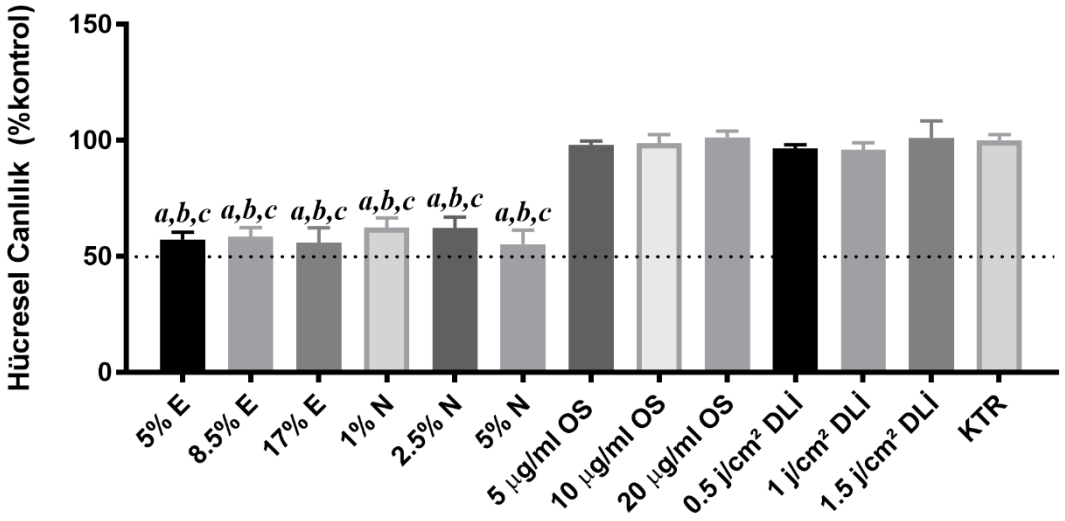
10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde değerler analiz edildiğinde ortalama optik yoğunluk değeri en yüksek 1,869±0,06058 değeri ile Grup 10' da tespit edilmiştir. Grup 11'in 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda sahip olduğu ortalama optik yoğunluk değeri ise 1,852±0,04983 olarak tespit edilmiştir. En düşük ortalama optik yoğunluk değeri Grup 12'de 1,81±0,02778 değeri ile tespit edilmiştir. Ortalama hücresel canlılık yüzdesi Grup 10, 11 ve 12 için sırasıyla %101,7±3,297, %100,7±2,709 ve %100,1±0,6034 olarak bulunmuştur. 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde edilen ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). 5 ve 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde edilen veriler birbiri ile karşılaştırıldığında ise Grup 10 ve 11 için değerler artış gösterirken Grup 12'de azalmıştır. Fakat bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

Grup 10, 11 ve 12'nin 15 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki ortalama optik yoğunluk değerleri sırasıyla 1,727±0,05167, 1,734±0,07465 ve 1,707±0,04522 olarak tepit edilmiştir. Bu değerlerin formüle uygun şekilde dönüştürülmesiyle elde edilen ortalama hücresel canlılık yüzdesi değerleri Grup 10, 11 ve 12 için sırasıyla %101,1±3,025, 101,5±4,373 ve %99,91±2,646 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bütün bu veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$). 5, 10

ve 15 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki değerler ele alındığında Grup 12 için en yüksek değerler 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde edilirken; Grup 10 için 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda, Grup 11 için ise 15 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda elde edilmiştir. 5, 10 ve 15 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki değerler arasındaki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p>0.05$).

4.6.Tüm Zaman Periyotlarında Elde Edilen MTT Analizi Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırılması

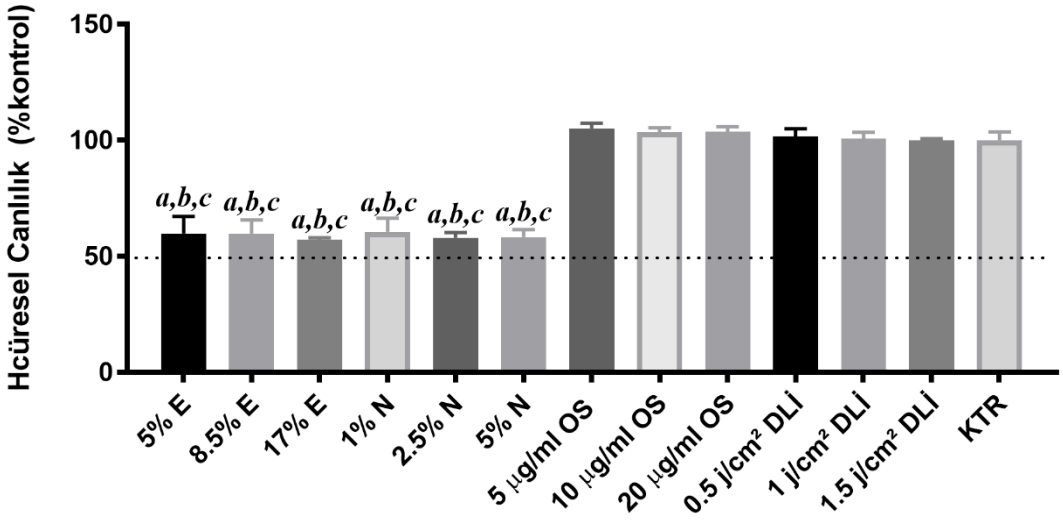
5 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda tüm EDTA ve NaOCl gruplarındaki ortalama optik yoğunluk ve hücre canlılık yüzdesi değerleri; kontrol, ozonlanmış su ve diyot lazer grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (bütün karşılaştırmalar için p değerleri; $p<0.0001$). Grup 6 ise %55.25 ± 6.095'lik ortalama hücresel canlılık yüzdesi ve 1,119±0,1235'lik ortalama optik yoğunluk değeri ile bütün deney grupları arasındaki en düşük değere sahip grup olmuştur. Grup 9 %101,3±2,686 ortalama hücresel canlılık yüzdesi ve 2,052±0,05447 ortalama optik yoğunluk değeri ile bütün gruplar arasında en yüksek değere sahip grup olarak tespit edilmiştir. Fakat bu değerin EDTA ve NaOCl gruplarından elde edilen değerler ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit edilirken; kontrol grubu, diğer ozonlanmış su ve diyot lazer grupları ile arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (EDTA ve NaOCl grupları ile Grup 9 karşılaştırması için pdeğerleri, $p<0.0001$; kontrol grubu, diğer ozonlanmış su ve diyot lazer grupları ile Grup 9 karşılaştırması için p değerleri, $p> 0.05$). 5 dakikalık inkübasyon periyodu sonundaki değerler göz önünde bulundurulduğunda; kontrol, ozonlanmış su ve diyot lazer grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p> 0.05$) (Şekil 4.6.1.).



Şekil 4.6.1. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 5 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık.

**Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Bütün grupların hücresel canlılık yüzdeleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. $^{a}p<0.05$ kontrol grubuna; $^{b}p<0.05$ ozonlanmış su gruplarına göre; $^{c}p<0.05$ diyot lazer irradyasyonu gruplarına göre anlamlılık seviyesi olarak belirlendi.

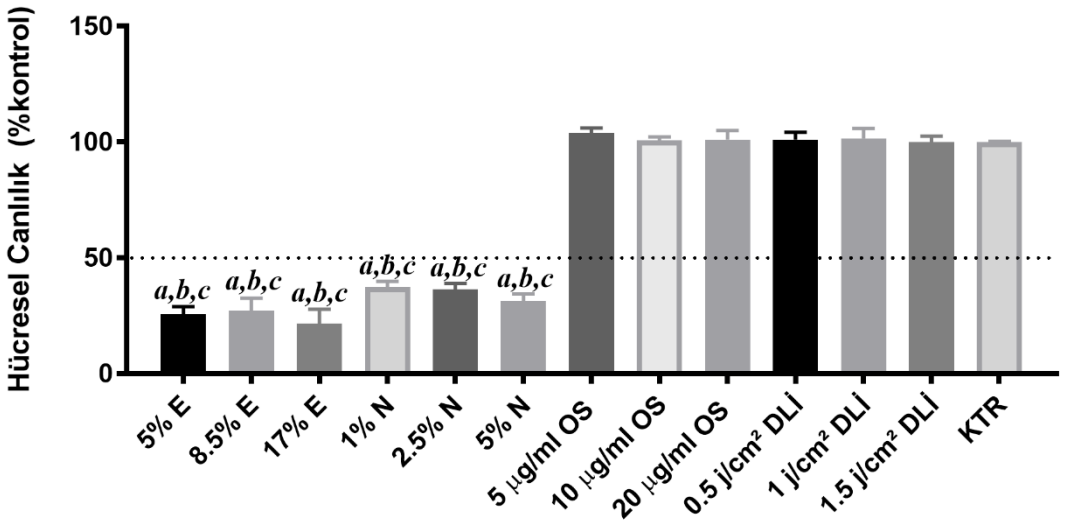
10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda da, tüm EDTA ve NaOCl gruplarında, kontrol, ozonlanmış su ve diyot lazer gruplarına göre ortalama optik yoğunluk değeri ve ortalama hücresel canlılık yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p<0.0001$). 5 dakikalık inkübasyon periyodundan farklı olarak, Grup 3 (%17 EDTA), 10 dakikalık inkübasyon periyodunda sırasıyla %57,15±0,9334 ve 1,051±0,01714 değerleri ile en düşük ortalama hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değerine sahip grup olarak tespit edilmiştir. 10 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda 5 dakikalık süre sonundaki gibi sırasıyla %103,7±2,079 ve 1,907±0,03826 değerleri ile en yüksek ortalama hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri, Grup 9'da (20 µg/ml ozonlanmış su) tespit edilmiştir. Bu değerler diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ise sadece tüm EDTA ve NaOCl gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p<0.0001$) (Şekil 4.6.2.).



Şekil 4.6.2. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 10 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık.

**Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Bütün grupların hücresel canlılık yüzdeleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. $^{a}p<0.05$ kontrol grubuna; $^{b}p<0.05$ ozonlanmış su gruplarına göre; $^{c}p<0.05$ diyot lazer irradyasyonu gruplarına göre anlamlılık seviyesi olarak belirlendi.

15 dakikalık periyot sonunda, Grup 3, %21.67±6.101 ve 0,3703±0,1042 değerleri ile SHEDs'lerde sırasıyla en düşük ortalama hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değerlerini göstermiştir. Bu elde edilen veriler kontrol, ozonlanmış su ve diyot lazer grupları ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p<0.0001$). Grup 7'de (5 µg/ml ozonlanmış su) %103.9 ± 2.214 ve 1,775±0,03782 ile sırasıyla en yüksek hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değerleri tespit edilmiştir. Grup 7'de elde edilen bu değerler ile diğer ozonlanmış su, diyot lazer grupları ve kontrol grubundan elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p> 0.05$). 15 dakikalık periyot sonunda elde edilen tüm EDTA ve NaOCl gruplarının değerleri diğer zaman periyotlarında elde edilen EDTA ve NaOCl grupları ile diğer deney gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p<0\ 0001$) (Şekil 4.6.3.).

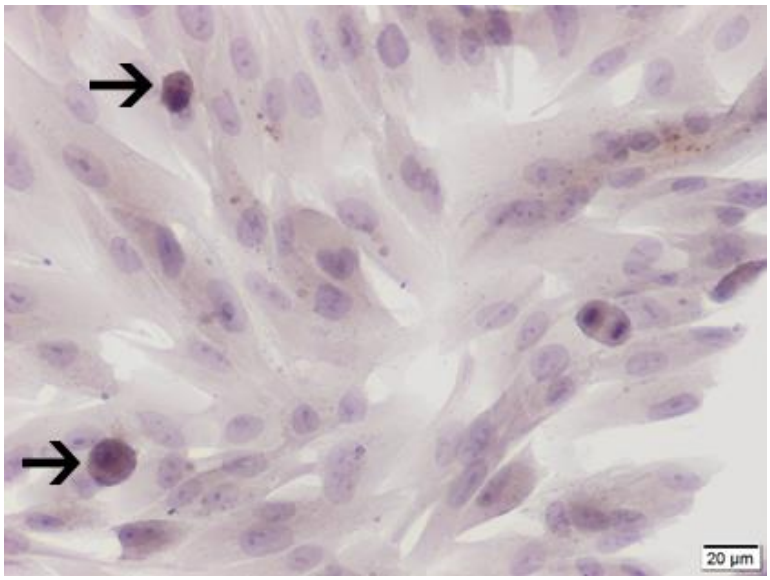


Şekil 4.6.3. SHEDs'lerde deney solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonun 15 dakika uygulanması sonucu % hücresel canlılık.

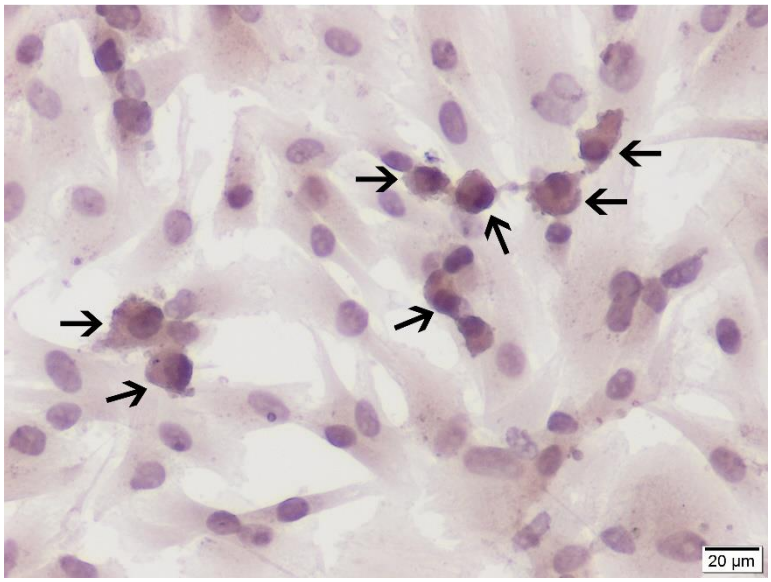
**Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Bütün grupların hücresel canlılık yüzdeleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. $^{a}p<0.05$ kontrol grubuna; $^{b}p<0.05$ ozonlanmış su gruplarına göre; $^{c}p<0.05$ diyot lazer irradyasyonu gruplarına göre anlamlılık seviyesi olarak belirlendi.

4.7.Deney Gruplarından Elde Edilen İmmünohistokimyasal Apoptoz Analizi Bulguları

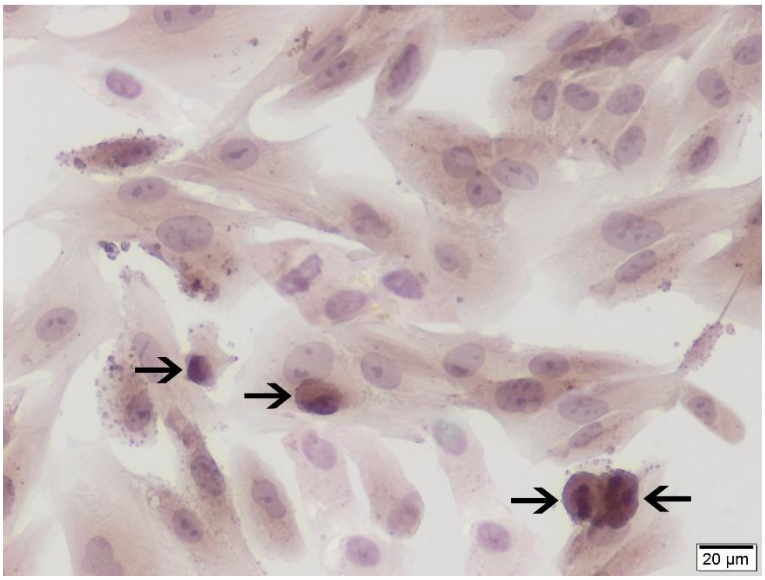
Kontrol grubu, irrigasyon solüsyonları (%17 EDTA, %1 NaOCl, 10 µg/ml Ozonlanmış su) ve 1.5 j/cm^2 diyot lazer irradyasyonu uygulandıktan sonra, tüm gruplarda TUNEL pozitif hücreler tespit edilmiştir (Resim 4.7.1.; Resim 4.7.2.; Resim 4.7.3.; Resim 4.7.4.; Resim 4.7.5.).



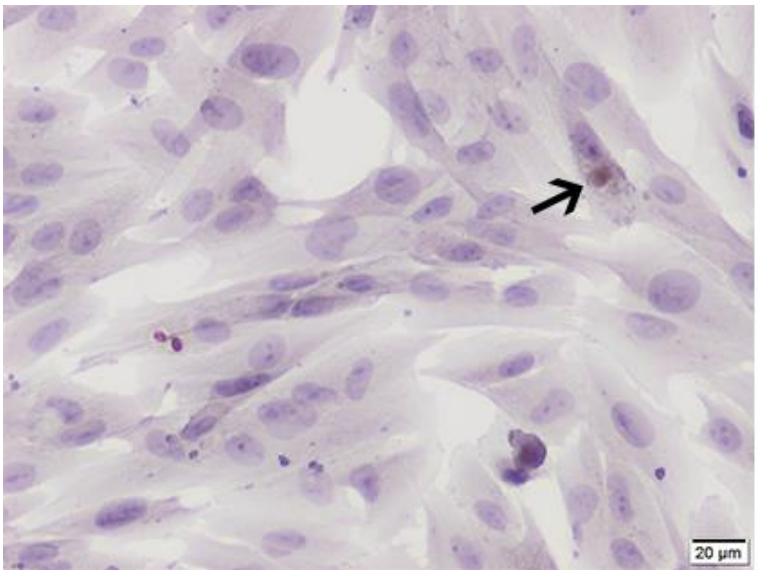
Resim 4.7.1: Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm



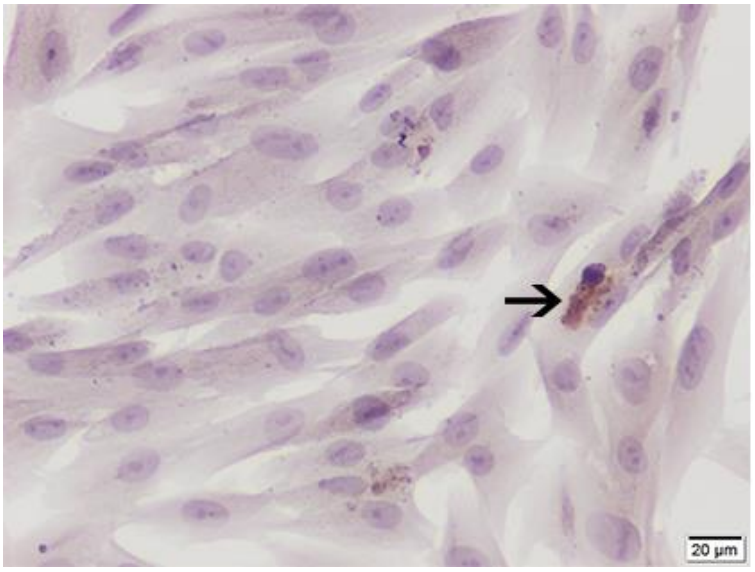
Resim 4.7.2: EDTA (%17) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm



Resim 4.7.3: NaOCl (%1) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm



Resim 4.7.4: Ozonlanmış Su (10 µg/ml) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm



Resim 4.7.5: Diyot Lazer (1.5 j/cm^2) Grubu İmmünohistokimyasal TUNEL Boyaması Magnifikasyon: 20 µm

TUNEL pozitif hücrelerin yüzdeleri en yüksek değer olan % 39,89 ± 11,54 ile Grup I'de (% 17 EDTA) tespit edilmiştir. Bu gruptan sonra en yüksek değer ise %31.15±10.64 ile Grup II'de (%1 NaOCl) tespit edilmiştir. Grup I ve II'de tespit edilen bu TUNEL pozitif hücrelerin yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (bütün karşılaştırmalar için p değeri; $p > 0.05$). Grup V (Negatif kontrol grubu) %3.33 ± 7.45 ile en düşük TUNEL pozitif hücre oranına sahipken bu grubu %10.67 ± 2.93'lik yüzde ile Grup III (10 µg/ml Ozonlanmış su) ve %13.24 ± 7.61 ile Grup IV (1.5 j/cm^2 Lazer) izlemiştir. Grup I'den elde edilen değer Grup III, IV ve V'den elde edilen değerler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Grup III ve IV için p değeri, $p<0.001$; Grup V için p değeri, $p<0.0001$). Grup I'de olduğu gibi Grup II'den elde TUNEL pozitif hücre yüzdesi de Grup III, IV ve V'den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Grup III ve IV için p değeri, $p<0.05$; Grup V için p değeri, $p<0.001$). (Tablo 4.7.1., Tablo 4.7.2.)

Tablo 4.7.1. Deney gruplarının TUNEL pozitif hücre yüzdelerinin tanımlayıcı istatistikleri

Deney Grupları	% TUNEL Pozitif Hücre ± Standart Sapma
Grup I (%17 EDTA)	% 39,89 ± 11,54
Grup II (%1 NaOCl)	%31.15±10.64
Grup III (10 µg/ml Ozonlanmış su)	%10.67 ± 2.93
Grup IV (1.5 j/cm^2 Lazer)	%13.24 ± 7.61
Grup V (Kontrol)	%3.33 ± 7.45

Tablo 4.7.2. Deney gruplarının TUNEL pozitif hücre yüzdelerinin Dunn's post-hoc testinin *p* değerleri

Deney Grupları	p^*
Grup I vs Grup II	0,5081
Grup I vs Grup III	**0,0003***
Grup I vs Grup IV	**0,0007***
Grup I vs Grup V	**<0,0001***
Grup II vs Grup III	**0,0094***
Grup II vs Grup IV	**0,0264***
Grup II vs Grup V	**0,0004***
Grup III vs Grup IV	0,9890
Grup III vs Grup V	0,6634
Grup IV vs Grup V	0,3876

5. TARTIŞMA

Mikroorganizmalar, pulpal ve periapikal hastalık oluşumunda önemli bir etiyolojik role sahiptirler (Cardoso ve ark.,, 2008). Mikroorganizmaların yok edilmesi ve kök kanal sisteminde optimum dezenfeksiyonun sağlanması hem geleneksel endodontik tedavinin hem de rejeneratif endodontinin en önemli hedeflerinden birisidir (Diogenes ve ark., 2013). Bununla birlikte bazı komplikasyonlar, özellikle iyi mekanik enstrümantasyon yapmanın zor olabileceği karmaşık morfolojik kök kanal yapılarına sahip süt ve genç daimi dişlerde endodontik tedavinin başarısını olumsuz yönde etkileyebilir (Wang ve ark. 2013). Ayrıca, tek başına mekanik aletler, kompleks pulpa morfolojisinin anastomozlarını, lateral kanallarını, dentinal tübüllerini etkili bir şekilde dezenfekte edemez (Mohammadi ve Shalavi, 2012). Bu nedenle, irrigasyon solüsyonları endodontik tedavinin etkinliğinde anahtar rol oynamaktadır. Kök kanallarında irrigasyon solüsyonlarının klinik kullanımı, kök kanallarının lubrikasyonu ve dezenfeksiyonu, organik ve inorganik dokuların çözülmesi ve kök kanalından debrislerin çıkarılmasını sağlar (Escobar ve ark., 2010). Bu özelliklerin yanı sıra, irrigasyon solüsyonu seçerken; smear tabakası temizleme etkinliği, enfekte bölgeye difüzyon, biyouyumluluk, toksisite, uzun vadeli antimikrobiyal ve antifungal etkiler gibi bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (Serper ve ark., 2001). Oral kaynaklı kök hücreler, dentin-pulpa kompleksinin fizyolojik rejenerasyonu için gereken doku gelişiminde tedavi edici kaynaklar olarak görev almaktadır (Schmalz ve Snith, 2014). Dentin-pulpa benzeri doku elde edilmesi rejeneratif endodontik tedavilerin en öncelikli amacı olduğundan rejeneratif endodontik tedavide kullanılan irrigasyon ajanları sadece maksimal antibakteriyel etki sağlamakla kalmayıp aynı zamanda periapikal dokulara taşması durumunda da minimal toksik etki göstermelidir (Escobar ve ark., 2010; Beffa ve ark., 2017).

NaOCl; geniş spektrumlu antibakteriyel aktivitesi, organik ve nekrotik doku çözünme kapasitesi ve dirençli Enterococcus, Candida ve Actinomyces türlerine etki edebilmesi nedeniyle endodontik işlemlerde % 0.5 ile %5.25 arasında değişen konsantrasyonlarda en yaygın olarak kullanılan irrigasyon çözeltisidir (Pinheiro ve

ark., 2018). Her ne kadar NaOCl konsantrasyonunun arttırılması daha iyi bir şekilde doku çözmesine ve daha yüksek antibakteriyel etkinliğe yol açsa da, çevre dokuların toksisitesinde artışa sebep olmaktadır (Serper ve ark., 2001). Smear tabakasının tamamen uzaklaştırılması, ancak NaOCl ile EDTA birlikte kullanıldığında başarılabilir. Çünkü EDTA, dentin ve smear tabakasının inorganik kısmını etkiler (Haapasalo ve ark., 2014). Bununla birlikte, EDTA, hücreyi öldürmeden bakteriyel hücre zarını zayıflattığından, çok az antimikrobiyal aktivite gösterir veya hiç göstermez (Stojicic ve ark., 2012). NaOCI ve EDTA'nın dezavantajlarının üstesinden gelmek için çeşitli alternatifler araştırılmaktadır (Escobar ve ark., 2010; Botton ve ark., 2016). Son yıllarda ozon gazı, ozonlanmış su ve farklı lazer uygulamalarının diş hekimliğinde endodontik dezenfeksiyon yöntemi olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır (Buldur ve Kapdan, 2017; Pirnat ve ark., 2011). Ozonlanmış su; bakterileri, virüsleri, mantarları ve protozoaları etkileyen, alternatif bir antimikrobiyal irrigasyon ajanı olarak önerilmektedir. Ozonlanmış su; mutajen olmaması, hızlı antimikrobiyal etki göstermesi ve kolay uygulanması gibi birçok avantaja sahiptir (Estrela ve ark., 2007).

Endodontik tedaviler sırasında dezenfeksiyon amacıyla kullanılması önerilen lazerler ile ilgili yapılan çalışmalar umut vericidir (Beer ve ark., 2012; Saydjari ve ark., 2016). Kök kanal tedavisinin başarı oranı, lazer ışınlamasının antibakteriyel etkinliği ile arttırılabilir (Bahrololoomi ve ark., 2017). Lazerlerin antibakteriyel etkileri iki temel mekanizma ile açıklanabilir. Birinci mekanizmaya göre, lazer ışığı kök dentini (substrat) tarafından güçlü bir şekilde emilir ve substrata bağlı mikroorganizmaların ölümüyle sonuçlanan bir ısı artışı meydana gelir. İkinci mekanizma ise, bakterilerin doğrudan lazer ışığını emmesini ve hasar görmesiyle açıklanmaktadır (Pirnat ve ark., 2011).

NaOCl ve EDTA’ nın yüksek toksisite potansiyeli ve yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda tez çalışmamızda; EDTA ve NaOCl’e alternatif irrigasyon ajanları olarak kullanılabileceği önerilen ozonlanmış su ve diyot lazerin sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Hayvan modelleri, birçok açıdan genel olarak kabul edilen sınırlamalara rağmen, çoğu kişi tarafından toksisite analizleri için en uygun fizyolojik sistemler

olarak kabul edilmektedir ve bu durum dünya genelinde toksikolojik değerlendirme için düzenlenen kılavuzların çoğunda belirtilmektedir (Sjoberg, 2017). Ancak, in-vivo çalışmalar ile ilgili etik, maliyet ve zaman endişelerinin yanı sıra, hayvan deneylerinde elde edilen sonuçların insanlara uyarlanması konusundaki belirsizlik, bu modellerin dezavantajı olarak gösterilmektedir (Knight, 2008; Arrowsmith ve Miller, 2013). Fizyolojik olarak uygun kültür ortamında hedef dokudan elde edilen yeterli miktarda hücre üzerinde yapılan in-vitro sitotoksisite testleri hedef organlardaki yan etkilerin tanımlanması ve hayvan deneyleriyle karşılaştırıldığında, organizmadaki olası yan etki sonuçlarının çok daha kısa sürede alınması ve karakterizasyonlarının belirlenmesi gibi avantajlara sahiptir (Soldatow ve ark., 2013). İn vitro sitotoksisite çalışmalarında kullanılan kök hücreler, sınırsız ve tutarlı bir hücre kaynağı sunan ve herhangi bir hücre tipine farklılaşma potansiyeline de sahip olan hücrelerdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Çalışmamızda tüm bu avantajlar ve etik nedenler de göz önünde bulundurularak, model olarak hücre kültürü tercih edilmiştir.

Oral doku ve periapikal bölgeden; apikal papilla kök hücreleri, dental folikül kök hücreleri, periodontal ligament kök hücreleri, gingival mezenkimal kök hücreleri, dental pulpa kök hücreleri ve düşme zamanı gelmiş süt dişi pulpası kök hücreleri gibi çok çeşitli erişkin kök hücre populasyonları izole edilebilmektedir (Diogenes ve ark. 2013). Bu kök hücreler tıp alanında birçok branşda bütünlüğü bozulmuş ve çalışamaz hale gelmiş doku ve organların rejenerasyonunun sağlanması için umut veren tedavi kaynakları olarak görülmektedir (Nuti ve ark., 2016). Yapılan in-vitro ve hayvan deneyi çalışmaları da, özellikle DPSCs ve SHEDs'lerin nöral, otoimmun, endokrin, kas, kardiyak ve vasküler ile iskelet sistemi dejenerasyonu gibi çok geniş bir yelpazeye yayılan hastalıklar için tedavi edici potansiyellerinin bulunduğunu desteklemektedir (Kanafi ve ark., 2014; Xing ve ark., 2015; Chalisserry ve ark., 2017).

DPSCs'ler, Gronthos ve arkadaşları tarafından izole edilen yüksek proliferasyon, çoğalma ve farklılaşma yeteneğine sahip olan oral doku kaynaklı yetişkin mezenkimal kök hücre kaynaklarıdır (Gronthos ve ark.,, 2000). BMMSCs'ler ile kıyaslandığında DPSCs'ler proliferatif kapasitesi daha yüksek olan klonojenik hücre populasyonlarıdır (Gronthos ve ark., 2000). SHEDs'ler ise ilk olarak Miura ve arkadaşları tarafından izole edilen çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen yüksek proliferatif kapasiteye sahip klonojenik hücre populasyonlarıdır (Miura ve ark., 2003).

SHEDs ve DPSCs kullanılarak yapılan in-vitro deneyler bu iki hücre populasyonlarının biyolojik olarak farklılıklara sahip olduğunu göstermektedir (Nakamura ve ark., 2009). Yapılan DNA mikrodizi analizleri; fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör büyüme faktörü B (TGF ß), kollajenler (Kollajen I, III, VII ve XIII) ve proteoglikanlar (glipikan ve versikan) gibi birkaç sitokin sayesinde pluripotens, hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks ile ilişkili birkaç genin SHEDs'lerde DPSCs'lere oranla daha yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir (Howard ve ark., 2010; Novais ve ark., 2019). Bu raporlar, SHEDs'lerin daha uzun kültivasyon süreleri boyunca korunurken, DPSC'lerin ise plastisitelerini bir süre sonra kaybettiklerini kanıtlamıştır (Kerkis ve Caplan, 2012). Yapılan güncel bir çalışmada ise, in-vitro kültivasyon sırasında SHEDs ve DPSCs'ler arasında; SHEDs'lerde DPSCs'lere kıyasla artmış CD73 ekspresyonu ile birlikte daha yüksek proliferasyon oranı ve osteojenik farklılaşma olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada, SHEDs'in daha yüksek seviyelerde alkalin fosfataz, osteokalsin, ß III-tübülin, tirozin hidroksilaz, mikrotübül-ilişkili protein 2 ve DPSCs'lerden daha fazla nestin ürettiği bildirilmiştir (Rosa ve ark., 2016). Tüm bu bulgular, SHEDs ve DPSCs'ler arasında farklılıklar yönünde öngörülen kanıtları desteklemektedir. Buna ek olarak SHEDs'lerin izolasyonu, her çocuğun süt dişlerinin fizyolojik olarak düştüğü düşünüldüğünde az ya da hiç travmaya neden olmayan basit ve uygun bir işlemdir. Bu nedenle ileride hastalıkları ya da yaralanmaları tedavi etmek ve in-vitro çalışmalarda kullanmak için kök hücre elde edilmesi ve depolanması konusunda SHEDs'lerin izolasyonu mükemmel bir fırsattır (Arora ve ark., 2009). Sahip olduğu birçok avantajın yanı sıra yüsek proliferatif kapasitesi ve diğer oral kök hücre kaynaklarına oranla izole edilebilme kolaylığı nedeniyle çalışmamızda planlanan hücre kültürü modelinde kök hücre populasyonu olarak SHEDs'ler tercih edilmiştir.

Hücre kültürü metodunun sıklıkla tercih edildiği çalışmalardan olan in-vitro sitotoksisite çalışmaları; test edilmek istenen materyalin, hedef dokudan elde edilmiş hücre kültüründeki hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisinin kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemlerdendir (Uzun ve Bayındır, 2011). Yöntemin avantajları arasında;

1. Yalnızca hücresel boyutta meydana gelen ve spesifik reaksiyonların değerlendirilebilmesi,
2. Klinik çalışmalara ve hayvan deneylerine oranla kullanılacak materyalin etkisinin çok daha hassas bir şekilde değerlendirilmesine imkan vermesi,
3. Fazla sayıda materyalin diğer çalışma tiplerine kıyasla çok daha kısa sürede değerlendirilmesine olanak sağlaması,
4. Uygulanan metotların standardize edilebilir olmasının elde sonuçların yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılmasını kolaylaştırması,
5. Klinik çalışmalara ve hayvan deneylerine oranla daha geniş bir uygulama alanına sahip olması,
6. Hücre kültürü kullanılarak yapılan toksisite testleri hassas sonuçlar verdiğinden, toksik materyallerin klinik ve hayvan çalışmalarına geçilmeden kullanımlarına son verilmesine olanak sağlamaları,
7. Bu metotlar kullanılarak yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak yorumlanabilmesi (kantitatif olması) ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi, sayılmaktadır (Uzun ve Bayındır, 2011; Rajabzadeh ve ark., 2019).

Yapılan çalışmaların sonuçları, laboratuvar ortamında hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite testlerinin in-vivo çalışmalar ile uyumlu ve benzer sonuçlar verdiğini bildirmektedir (Cenni ve ark., 1999; Rajabzadeh ve ark., 2019). Bu bulgular, kullanılacak materyalin canlı üzerinde zararlı etkilerinin olup olmadığını tespit etmek için hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite testlerinin oldukça güçlü ve geçerli metotlar olduğunu göstermektedir (Rajabzadeh ve ark., 2019). Bu amaçla hücre kültürü kullanılarak yapılan toksisite testleri hücreden sızan enzimlere ve mitokondriyal metabolizmaya ait reaksiyonlara duyarlıdır (Güven ve ark., 2011). Enzimlere duyarlı olan toksisite testlerinden biri olan LDH testi toksik materyal maruz kalması sonucunda hücreden sızan enzimlere duyarlı bir test olup; pahalı bir yöntem olması, enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak bozulması, kültür vasatının pH'sı ve içeriğinden etkilenmesi gibi birtakım dezavantajlara sahiptir (Galluzzi ve ark., 2009). Mitokondriyal aktiviteye bağlı hücresel ölümü değerlendiren MTT testleri ise mitokondriyal dehidrogenaz enzimine duyarlı olan testlerdir (Pelin ve ark., 2019). MTT kullanılarak yapılan hücre kültürü toksisite testi diğer yöntemlere oranla daha

hızlı, kolay, hassas ve tekrarlanabilir olduğundan sık tercih edilen bir yöntemdir (Adan ve ark., 2016). Buna ek olarak MTT testi, araştırmacının toksik materyalin biyouyumluluğu konusunda fikir sahibi olmasını sağlamasının yanı sıra elde edilen sonuçlar sayesinde, proliferatif etki gösteren materyallerin sonuçlarının da karşılaştırılabilir şekilde elde edilmesini sağlamaktadır (Stockert ve ark., 2018). Bu bağlamda, farklı irrigasyon solüsyonları ve diyot lazer irradyasyonunun hücresel toksisitesini belirlemek ve çalışmada test edilen materyallerin hücre proliferasyonuna etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmamızda MTT analizi tercih edilmiştir.

Yapılan birçok laboratuvar ve hayvan çalışmaları; biyouyumluluğu araştırılan materyallerin toksik etkisini hücreleri apoptotik sürece sokarak gösterdiğini desteklemektedir (Elmore, 2007; Viola ve ark., 2018). Hücrenin yaşamsal faaliyetlerini sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmesindeki en önemli faktör bulunduğu çevre şartlarıdır (van Meerloo ve ark., 2011). Mekanik stresler ve kimyasallar, hücre ölümüne neden olan başlıca stres kaynaklarındandır. Normal şartlarda hücreler bu streslere ve onların sonucunda meydana gelen hasarlara karşı birtakım sinyal mekanizmalarıyla cevap veren savunma sistemlerine sahiptirler. Ancak bu sinyal yolaklarında meydana gelen hasar kalıcı olabilir. Hücrenin bu stres kaynaklarına karşı ne zaman ölüm kararı vereceği ve bu kararı tetikleyen sinyallerin neler oldukları stres kaynaklarının toksik etki mekanizmasının bilinmesinde büyük bir öneme sahiptir (Andersen ve Rathmell, 2015). Çünkü apoptoz, komşu hücrelere zarar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden veya kalıcı hasar bırakmadan yalnızca hedeflenen hücrelerin yok edilmesidir. Apoptozun bu karakteristik özellikleri ışığında uygulanan irrigasyon ajanı veya dezenfeksiyon yönteminin enfeksiyondan sorumlu mikroorganizmaların ölümüne sebep olması beklenirken, rejenerasyonu sağlayacak hücreleri de apoptoza uğratmaması, tedavinin klinik başarısını olumlu yönde etkileyecektir (Iohara ve ark., 2014).

Stres kaynakları kısa süreli olduklarında apoptozis ya da diğer hücresel ölüm şekli olan nekroza sebep olurken, devam edip kronik hale geldiklerinde ise hücresel morfolojide meydana gelen değişikliklerle kendini belli eden otofaji olarak adlandırılan hücrenin kendi kendini sindirmesine sebep olurlar. Dış stresler sonucu gerçekleşen ölümün genellikle nekrotik tipte oluştuğu belirtilse de, Green ve Llambi (2015) meydana gelen ölüm şekillerinin, etkenin dozuna, maruz kalma süresine ve

etkilenen hücrelerin tipine göre apoptotik veya otofajik hücre ölümü de olabileceğini göstermişlerdir.

Hücrenin maruz kaldığı kimyasallar veya mekanik stresler, 8-hidroksi-2´-deoksiguanozinin oluşumu yoluyla oksidatif hücre hasarı ve yıkıcı DNA modifikasyonlarına neden olur ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyebilir (Kalyuzhny, 2011). Çalışmamızda apoptotik hücrelerin diğer hücrelerden ayırımını yapabilmek amacıyla 8-hidroksi-2´-deoksiguanozin'e duyarlı immünohistokimyasal apoptoz belirleme yöntemi olan TUNEL testi kullanılmıştır.

Tez çalışmamızda kullanılan irrigasyon solüsyonlarının konsantrasyon aralıkları ve uygulama süreleri (5, 10 ve 15 dakika) Amerikan Endodontistler Birliği'nin klinik kılavuzları (https://www.aae.org, Erişim tarihi: 25.09.2018) izlenerek; diyot lazer irradyasyonunun enerji yoğunlukları ise Huth ve arkadaşlarının çalışması (2009) esas alınarak belirlenmiştir.

Endodontide irrigasyon ajanı olarak kullanılan NaOCl, hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermesi, periapikal bölgeye ulaşırsa bu bölgede akut yaralanmaya sebep olması gibi birtakım dezavantajlara sahiptir. Kök kanal tedavisi sırasında NaOCl'nin çevre dokulara taşması durumu "hipoklorit kazası" olarak adlandırılmaktadır; Bu durum akut semptomlara ve potansiyel olarak ciddi kalıcı hasarlara neden olmaktadır (Farook ve ark., 2014). Canlı dokularla teması halinde NaOCl, çevre dokuları oksitleyerek hızlı hemoliz ve ülserasyona, nötrofil göçünün önlenmesine ve endotelyal ve fibroblast hücrelerinin yok olmasına neden olur. Bu yüksek toksisite potansiyeli, NaOCl kullanımının çeşitli komplikasyonlara ve kazalara yol açmasına sebep olmaktadır (Guivarc'h ve ark., 2017). Apikal foramenden istem dışı taşacak şekilde yapılan sodyum hipoklorit enjeksiyonu genellikle geniş apikal foramene sahip dişlerde ya da kök kanal hazırlığı veya resorpsiyona uğramış köklerde apikal daralma ortadan kalktığı için daha sık ortaya çıkmaktadır. Ek olarak, irrigasyon sırasında aşırı basınç veya irrigasyon iğnesinin ucunun kök kanalında sıkışması, NaoCl' nin apikal dokularla temas etmesine neden olarak yumuşak doku ve kemikte kimyasal yanıklara ve bunun sonucu olarak da doku nekrozuna yol açacaktır (Bither R. ve Bither S., 2013). Yüksek doku çözme kapasitesinden dolayı NaOCl'nin dokulara taşması halinde oluşan hemoliz, çoğunlukla anında veya sonradan hematoma neden

olur (Behrents ve ark., 2012; Guivarc'h ve ark., 2017). Guivarc'h ve arkadaşları (2017) NaOCl'nin apikal dokulara taşması nedeniyle oluşan komplikasyonlarla ilgili yayınlanan 52 vaka raporunu incelemişler; 46 vakada hastaya anestezi uygulanmasına rağmen ağrı, 17'sinde kanama ve 49'unda ise ödem bulgusu olduğunu bildirmişlerdir. NaOCl'nin apikal dokulara taşmasının fasiyal siniri etkileyerek nörolojik bozukluklara ve mimik kaslarında paresteziye sebep olduğu da bir başka çalışmada bildirilmiştir (Pelka ve Petschelt, 2008). Bütün bu dezavantajlarına ek olarak NaOCl organik doku çözme özelliği nedeniyle, dentin tübüllerine kısıtlı derecede penetre olabilme kapasitesine sahiptir. Yapılan çalışmalar endodontik enfeksiyonlardan sorumlu olarak kök kanalından en çok izole edilen bakteri olan E.faecalis'in dentinde 1000 µm' ye varan derinliklere penetre olma kabiliyeti olduğunu göstermektedir (Vatkar ve ark., 2016; Kirsch ve ark., 2017). NaOCl ise kök kanal tedavisi sırasında prepare edilen kanallarda 39 ila 62 µm derinliğe kadar dentinde penetre olma kabiliyetine sahiptir (Giardino ve ark., 2017). Bu nedenle dentin tübüllerinin açılması ve inorganik smear tabakanın uzaklaştırılabilmesi için NaOCl EDTA ile kombine kullanılmaktadır (Haapasalo ve ark., 2014). Ancak yapılan çalışmalar EDTA'nın, 5 dakika içinde 20-30 µm derinliğe kadar olacak şekilde smear tabakayı uzaklaştırdığı; buna ek olarak dentin üzerindeki şelasyon etkisinin, kök kanallarının apikal üçlü kısmında neredeyse yok denebilecek kadar az olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, EDTA'nın tıkalı dentin tübüllerini klinik olarak fayda sağlayacak derecede açamadığı ve çok dar kanallarda biriken çözelti miktarının duvarların demineralizasyonunu etkilemeyecek kadar küçük olduğu sonucuna varılmıştır (Violich ve Chandler, 2010). Yapılan bir başka çalışmada EDTA kullanılarak yapılan şelasyon işlemi çok yavaş olduğundan, mekanik temizleme sırasında EDTA çözeltisinin kullanılmasının smear tabakayı uzaklaştırıp dentin tübüllerindeki bakteriyel kontaminasyonun elimine edilmesinde yeterli etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Violich ve Chandler, 2010). Direk antibakteriyel etkisi düşünüldüğünde ise; EDTA, bakterinin hücre zarının dış kısmında bulunan katyonlarla şelasyon yoluyla reaksiyona girerek hücreyi öldürmeden bakterinin hücre zarını zayıflatmaktadır (Stojicic ve ark., 2012). Bu özelliğinden dolayı EDTA'nın antimikrobiyal aktivitesi az veya hiç yoktur (Stojicic ve ark., 2012). Konuyla ilgili yapılan bir çalışma, % 17 EDTA çözeltisinin, 60 dakikalık temas süresinden sonra bile E. faecalise karşı hiçbir bakterisidal aktivite göstermediğini

bildirmektedir (Arias-Moliz ve ark., 2008). Ayrıca NaOCl ile EDTA'nın kombine kullanımı NaOCl'nin açığa çıkardığı aktif klorin miktarında azalmaya sebep olarak NaOCl'nin antibakteriyel etkinliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Almeida ve ark., 2015). Buna ek olarak EDTA ve NaOCl özellikle fizyolojik kök rezorpsiyon sürecine giren süt dişleri ile geniş apikal açıklığa sahip olan genç daimi dişlerin kök kanallarının dezenfeksiyonunda apikal bölgeye taşma riski daha yüksek olduğundan güvenli olarak kullanılması konusunda büyük riskler taşımaktadır (Escobar ve ark., 2010; Botton ve ark., 2016). Tüm bu dezavantajlar nedeniyle endodontik tedavilerde kullanılacak ideal irrigasyon ajanları arayışları güncelliğini korumaktadır.

Son yıllarda ozonlanmış su endodontik enfeksiyonu olan dişlerin kök kanallarında irrigasyon ajanı olarak önerilmektedir (Nagayoshi ve ark., 2004; Hems ve ark., 2005). Konu ile ilgili yapılmış çalışmalar; ozonlanmış suyun, immünolojk herhangi bir yan etki oluşturmadan NaOCl kadar antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu ve kök kanallarında irrigasyon için kullanımının NaOCl' çok daha güvenli olduğunu göstermektedir (Estrela ve ark., 2007; Cardoso ve ark., 2008). Pinheiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2018), ozonlanmış suyun aşırı kurvatürlü kök kanallarında bulunan E.faecalis üzerinde % 98.02'lik bir mikrobiyal azalma sağladığı gösterilerek ozonun kök kanallarının dezenfeksiyonu için ümit verici bir ajan olduğu bildirilmiştir. Göztaş ve arkadaşları da (2014) genotoksik etkisinin olmaması, hızlı antimikrobiyal etkisi ve kullanım kolaylığı gibi avantajları nedeniyle ozonlanmış suyun irrigasyon ajanı olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Ozonun etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması, bu çalışmaların sonuçları ile klinik uygulamalar arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir. Oksijenin bir varyasyonu olarak ozonun en büyük özelliklerinden biri oksidatif gücüdür (Leewananthawet ve ark., 2019). Oksidatif gücünün neden olduğu oksidatif stres, tekli oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonları gibi serbest radikallere dönüşen reaktif oksijen türlerinden (ROS) sorumludur. Serbest radikallerin üretilmesi nedeniyle, ozon dikkate değer bir antimikrobiyal etkiye sahiptir (Xu ve ark., 2019). Tekli oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonları, bakteriyel hücre çeperi ve zarının çoklu doymamış yağ asidini okside ederek bakteriyel zarın bozulmasına ve aynı zamanda dokulara oksijen sağlayarak bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ile doku iyileşmesine neden olur (Nogales ve ark., 2016). Ozonun NaOCl ile benzer antimkrobiyal etkinliğe sahip

olması çeşitli çalışmalarla gösterilmesine karşın, smear tabakayı uzaklaştırma etkinliği konusunda yeterli veri yoktur. Araştırmacılar kanal içi dezenfeksiyonda antimikrobiyal etkinlikle birlikte smear tabakanın uzaklaştırılabilmesi amacıyla lazer sistemleri de denemektedirler (Lindström ve ark., 2017; Beer ve ark., 2012).

Son çalışmalar, ozonlanmış suyun diş hekimliğinde genel antimikrobiyal etkisinin araştırılmasına odaklanmıştır ve ozonlanmış suyun, Enterococcus faecalis, Candida albicans ve Pseudomonas aeruginosa gibi gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı önemli ölçüde etkili olduğunu göstermiştir (Zan ve ark., 2016). Huth ve arkadaşları (2009) ozonlanmış suyun antibakteriyel etkisinin %2.25 NaOCl ile benzer olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada, E.faecalis ile enfekte olan kök kanallarına ozonlanmış su uygulanmıştır. Ozonlanmış suyun uygulamadan 6 saat sonra bile antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bulunmuştur (Göztş ve ark, 2014). Tez çalışmamızda da, Huth ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında kullanılan bakterisidal etkisi olan ozonlanmış su dozlarının sitotoksisitesi, SHED'ler üzerinde test edilmiştir. Tüm inkübasyon periyodları ele alındığında çalışmamızda ozonlanmış su SHEDs'ler üzerinde toksik veya herhangi bir yan etki göstermemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar ozonlanmış suyun sitotoksisitesini araştıran Nogales ve arkadaşlarının (2016) çalışmasındaki bulgularıyla paralellik göstermiştir. Al-Saadi ve arkadaşlarının (2015) sığır osteoblastları üzerinde ozonlanmış suyun toksisitesini araştırdığı çalışmalarında da; tez çalışmamızla uyumlu bir şekilde 24 saatlik süre sonunda ozonlamış suyun herhangi bir toksik etkisini bulunmadığı gösterilmiştir. Nitekim Huth ve arkadaşları (2006), ozonlanmış suyun antiaging aktivitesinin uyarıcı ve yüksek oksitleyici gücünün etkisiyle hücre içi metabolizmayı uyardığını göstermişlerdir. Tez çalışmamızda, ozonun su formunun tercih edilmesinin sebebi ise gaz formunda ozonun respiratuvar sistemde meydana getirebileceği komplikasyonlardır (Bocci ve ark., 2006).

Test edilen diğer irigasyon ajanları olan NaOCl ve EDTA, tüm zaman aralıklarında SHED'lerde ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu gruplarından istatistiksel olarak önemli ölçüde daha fazla sitotoksisite göstermiştir. Bu elde etmiş olduğumuz bulgularımız Karkehabadi ve arkadaşlarının (2018) EDTA ve NaOCl solüsyonlarının %17 ve %5' lik konsantrasyonlarının periodontal ligament hücreleri üzerindeki sitotoksisitesini değerlendirdikleri çalışmanın bulgularıyla benzerlik

göstermektedir. NaOCl, kök kanallarındaki yüksek antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle tercih ediliyor olsa da, toksisite ve yetersiz dentinal tübül penetrasyonu gibi birtakım dezavantajlara sahiptir (Afkhami ve ark., 2017). Klinik uygulamalarda, EDTA, NaOCl'nin dentinal tübül penetrasyonunu arttırmak için şelasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu kombinasyon, antimikrobiyal kapasite, doku çözme gücü, pH seviyesi ve kök kanalı mikro-ortamında serbest klor salgılaması gibi NaOCl'nin amaçlanan özelliklerinin bozulmasına neden olur (Vouzara ve ark., 2016). Botton ve arkadaşları (2015) CHX, sitrik asit, EDTA ve NaOCl irrigasyon çözeltilerinin toksisitesini zaman içerisinde (24 saat ve 72 saat) test etmiş ve 72 saatte hücre yaşayabilirliğinde en düşük toksisite seviyesinin % 2 CHX ve% 17 EDTA kombinasyonu ile elde edildiğini belirtmiştir. Nitekim bizim de çalışmamızda, EDTA gruplarında, test edilen tüm konsantrasyonların tüm zaman aralıklarında önemli ölçüde toksik olduğu tespit edilerek Botton ve arkaşlarının (2015) görüşleri desteklenmiştir.

Antimikrobiyal özellikleri nedeniyle son yıllarda endodontik tedavilerin özellikle kök kanal sterilizasyonu aşamasında birçok araştırmacı bakteri biyofilmini ortadan kaldırmak için diyot lazer, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, Ho:YAG lazer gibi çeşitli lazer sistemlerini araştırmaktadırlar. Sahar-Helfit ve arkadaşları (2015), yaptıkları çalışmada Er,Cr:YSGG lazerin, büyük apikal foramene sahip kök kanallarında canlı mikrobiyal populasyonu azalttığını ancak tüm bakterileri yok etmediğini belirtmişlerdir. Özkan ve arkadaşlarının (2014) Er,Cr:YSGG lazerin daimi premolar dişlerde C.Albicans üzerine antibakteriyel etkinliğini değerlendirdikleri çalışmanın sonuçları ise Er,Cr:YSGG lazerin antibakteriyel etkinliğinin NaOCl’den az ancak smear tabakasını kaldırma etkinliğinin fazla olduğunu göstermektedir. Lindström ve arkadaşlarının (2017) Nd:YAG lazerin apikal periodontitisli hastaların kök kanalındaki bakteriyel azalmaya etkisini araştırdıkları randomize kontrollü klinik çalışmada; kullanılan Nd:YAG lazerin antibakteriyel etkinlik açısından kontrol grubuyla herhangi bir farkının olmadığını belirtmişlerdir. Gouw-Soares ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2000) Ho:YAG lazerin, 300 µm’lik kesitlerde E.faecalis’in ortalama %90,31'ini ortadan kaldırdığı bildirirken; Gutknecht ve arkadaşları (2004) ise, diyot lazerin 3W güç ile devamlı atım modunda kullanılmasının kök dentininde 500 mikron derinliğe kadar aynı oranda bakteriyel azalmayı sağladığını gözlemlemiştir.

Schoop ve arkadaşlarının (2004), lazerin yoğunluğu arttıkça etkinliği artar hipoteziyle yola çıkarak yapmış olduğu çalışmada ise diyot lazerin 1.5 W'lık bir güçle diş yüzeyinde değişiklikler meydana getirebildiği ve bu değişikliklerin lazerin bakterisit etkisini artırdığını gözlemlemiştir.

Beer ve arkadaşları (2012), diyot lazerin kök kanalında % 98.8 oranında bakteriyel bir azalma sağladığı, buna ek olarak giriş kavitesinin de lazerle ışınlanmasının önemli ölçüde daha da iyi sonuçlar verdiğini belirterek; diyot lazeri, "modern endodonti için son teknoloji ekipman" olarak tanımlamışlardır.

Pirnat ve arkadaşları (2011), diyot lazerin P.gingivalis, E.coli ve E.faecalis üzerindeki doğrudan etkisini incelemişlerdir. Araştırıcılar çalışma sonuçlarına göre diyot lazer sisteminin E.coli ve E.faecalis gibi pigmente olmayan bakteriler üzerinde doğrudan bir bakterisit etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Kızılötesi lazer ışığının bu bakterisit etkisi için iki olası teoriyi öne sürmüşlerdir. İlk teori; bakterinin bulunduğu substrat tarafından bu ışının absorbe edilmesi, ikincisi teori ise bakterinin doğrudan bu ışını absorbe etmesini, ifade etmektedir. Neelakantan ve arkadaşları da (2015) diyot lazerin E. fecalis biyofilmlerini azaltmada ultrasonik aktivasyon ve konvansiyonel şırınga ile irrgasyondan daha etkili olduğunu bildirmiştir.

Diyot lazerlerin dezenfeksiyon amacıyla üretilen uzun, ince ve esnek kuartz fiberden oluşan endodontik uçları kanal içinde kullanımlarını diğer lazer türleriyle kıyaslandığında oldukça kolaylaştırmaktadır (Beer ve ark., 2012). Diyot lazerlerin penetrasyon derinliği 0.5 ile 3 mm arası olduğundan, hem antibakteriyel etkinliği fazla hem de diğer yumuşak doku lazerlerine oranla termal yan etkisi azdır (Milliard ve ark., 1993). Buna ek olarak yapılan çalışmalar; 980 nm dalga boyundaki diyot lazerin, kanal içindeki bakterilerin sayısında etkili bir şekilde azalmaya neden olduğunu ve bu etkinin geleneksel irrigasyon yöntemlerine oranla daha uzun süre etkinliğini koruduğu için kabul edilebilir olduğunu bildirmektedir (Gutknecht ve ark., 2004; Romeo ve ark., 2015). Yine Ortega-Concepción ve arkadaşları da (2017) GaAlAs diyot lazerin çevre sert dokulara zarar vermemesi ve kullanım kolaylığı gibi avantajları olduğunu vurgulamışlardır. Lazer ışınlarının enerji yoğunlukları hücrelerdeki bir diğer önemli parametredir. Hücrelerin biyostimülasyonunun, 10 j/cm^2 ile 0.001 j/cm^2 aralığındaki enerji yoğunluklarında meydana gelebileceği öne sürülmüştür (Byrnes ve ark., 2005).

Bu bilgilerin aksine, Karu (1995), enerji yoğunluğunun artmasının fotoreseptörlere zarar verdiğini ve bu işlemin lazer ışınlarının hücreler üzerindeki biyolojik uyarıcı etkilerinin azalmasıyla sonuçlandığını göstermiştir. Bu nedenlerden dolayı, tez çalışmamızda lazer irradyasyonu için düşük enerji yoğunlukları (0.5, 1 ve 1.5 j/cm^2) kullanılmıştır. Diyot lazer irradyasyonunun SHEDs'ler üzerindeki toksik etkileri MTT testiyle analiz edildiğinde, tez çalışmamızın sonuçlarında Zaccara ve arkadaşlarının (2015) yapmış oldukları çalışmalarında olduğu gibi, bütün zaman dilimlerindeki tüm enerji yoğunlukları için hücre canlılığında herhangi bir azalma saptanmamıştır. Bununla birlikte, lazer irradyasyonu, her bir doz uygulandığında doza bağımlı ve kümülatif bir biyolojik etki göstermektedir (Huang ve ark., 2009). 15 dakika sonundaki değerler göz önünde bulundurulduğunda bu dozlarda diyot lazer irradyasyonunun SHEDs'ler üzerinde biyostümulatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ginani ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada da, 0.5 j/cm^2 ve 1 j/cm^2 enerji yoğunluğuna sahip diyot lazer irradyasyonunun, daha uzun zaman periyotlarında (24, 48 ve 72 saat) SHEDs'lerin proliferasyon oranını arttırdığı bulgulanmıştır. Tez çalışmamızın sonuçları diyot lazer irradyasyonunun 5 10 ve 15 dakikalık zaman periyotları sonunda toksik etkilerinin bulunmadığını göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular Ginani ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında elde ettikleri bulgulara uyacak şekilde uzun zaman aralıklarında diyot lazer irradyasyonunun proliferatif etki gösterebileceğini desteklemektedir. Düşük seviyeli lazer irradyasyonunun etkilerinin potansiyel mekanizmaları, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP), arttırılmış S faz oranı ve sitokrom c oksidaz (CCO) aktivitesini de içeren mitokondriyal biyogenez ile açıklanabilir (Yin ve ark., 2017; Wang ve ark., 2018). Buna ek olarak, düşük seviyeli lazer irradyasyonunun hücre sinyal yolaklarını da etkileyerek hücre çoğalmasını ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivasyonunu indükler (Ogita ve ark., 2015). Lazer ışınlarının fotonları, esas olarak mitokondrinin solunum zincirinde emilir, bu nedenle mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) uyarır (Mvula ve ark., 2010). Mvula ve arkadaşları (2010), lazer irradyasyonunun elektron taşıma zincirindeki elektronların aktivitesini uyardığını ve ATP aktivitesinde artışa yol açtığını belirtmiştir. Tez çalışmamızda da, kullanıdığımız enerji yoğunluğundaki diyot lazer irradyasyonunun SHED'lerin yaşam döngüsü üzerinde kontrol grubuyla benzer sonuçlara sebep olması, bu potansiyel mekanizma ile açıklanabilir. Elde edilen bu

sonuçlar kök hücrelerde mitokondriyal aktiviteyi arttırarak hücre proliferasyonuna daha uzun vadede katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

Rejeneratif endodontik tedavilerdeki amaca uygun olarak antibakteriyel etkinlik gösterilebileceği yapılan çalışmalarla ileri sürülen GaAlAs diyot lazer bu avantajının doğruluğunu test etmek amacıyla tez çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tez çalışmamızda kullanılan 980 nm dental diyot lazerin ürettiği lazer ışınları hücrelerde ve dokularda birtakım fotobiyolojik ve fotokimyasal reaksiyonlar meydana getirmektedir (Eduardo ve ark., 2008). Bu reaksiyonlar, fotonların hücrelere girmesi ve ardından mitokondri veya hücre zarında bulunan kromoforlar tarafından emilmesi ile açıklanır ve böylece lazer ışınları, hücrelerin ve dokuların fonksiyonlarının normalleştirilmesini sağlar. Lazer dalga boyları, kromoforlarla güçlü şekilde reaksiyona girer. Bu fotonik enerji, iyileşmenin sağlanmasında ve ağrının giderilmesinde kullanılmak üzere hücre tarafından üretilen bir adenozin trifosfat (ATP) formu olarak kimyasal enerjiye dönüştürülür (Schindl ve ark., 2000). Çalışmamızda 980 nm dalga boyunda kullandığımız diyot lazer SHEDs'ler üzerinde test ettiğimiz tüm ölçüm zamanlarında toksik bir etki yaratmamıştır. Rizzi ve arkadaşlarının (2016) keratinositler ve yine aynı araştırıcıların 2018 yılında fare pre-odontoblastik hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmalarda kullandıkları 980 nm dalga boyunun hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermeyen sonuçları bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Ancak, Moore ve arkadaşları (2005) 810 nm dalga boyunda tez çalışmamızda kullandığımız enerji yoğunluğuna oranla daha yüksek enerji yoğunluğuyla (10 j/cm^2) uygulanan lazer irradyasyonunun uzun vadede hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır. Araştırıcıların sonuçlarının bizim çalışma sonuçlarımızla örtüşmeme nedeni kullandıkları yüksek enerji yoğunluğuyla açıklanabilir. Nitekim, Hawkins ve arkadaşlarının (2006) yaptığı 632.8 nm dalga boyunda yüksek ve düşük enerji yoğunluklarının (2.5, 5 ve 16 j/cm^2) uzun zaman periyodundaki (2 gün) etkilerini değerlendirdiği çalışmada düşük enerji yoğunluklu lazer irradyasyonunun hücreler üzerinde toksik etkisinin bulunmadığını gösteren bulguları bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızın MTT analizi sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde tüm ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar kullandığımız enerji yoğunluğundaki diyot lazer uygulamaları ve ozonlanmış su konstrasyonlarının endodontik tdavilerde NaOCl ve EDTA uygulamalarına alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak kullandığımız dozlardaki ozonlanmış suyun antibakteriyel etkinliği çeşitli çalışmalarla gösterilmesine karşın, yaptığımız kaynak taramasında diyot lazerin antibakteriyel etkinliğiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Konuyla ilgili yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) doku homeostazı ve hastalıklarda rol oynayan doğal bir süreçtir. Ayrıca, apoptotik yollar tedavilerin hedeflerini oluşturmak için büyük önem taşımaktadır. Ancak endodontik tedavilerde kullanılan irrigasyon ajanlarının apoptotik mekanizması konusunda yapılan in vitro hücre kültürü ve hayvan çalışmaları yetersiz olduğundan tez çalışmamızda kullandığımız ajanların apoptotik mekanizmalarını değerlendirmek de diğer bir hedefimiz olmuştur. Bu amaçla çalışmamızda DNA parçalanmalarını tespit ederek apoptotik hücreleri gösteren TUNEL immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılmıştır. Llena ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bir çalışmada, apoptozun aslında pulpaya; reperatif dentin oluşturması ve enflamatuvar yanıta karşı kendini koruması için alan sağladığı belirtilmektedir. Ancak yüksek sitotoksik uyaranlar hücrelerin fizyolojik döngüsünü etkileyip programlanmış hücre ölümü olan apoptozise uğramasına neden olmaktadır. Bu süreç sonunda ise hücreler koruma mekanizmasını canlı tutamayıp rejenerasyonu sağlama kabiliyetlerini yitirmektedirler. Başarılı pulpal rejenerasyona anjiyogenez ve vaskülogenezin yanı sıra nörogenezin de eşlik etmesi temeldir (Nakashima ve ark., 2009). SHEDs’ler normal şartlarda üstün anjiyogenik ve nörojenik potansiyele sahiptir ve VEGF, NGF, BDNF, NPY, GM-CSF ve GDNF dahil birçok anjiyogenik ve nörotrofik faktörü süprese edebilmektedir (Bronckaers ve ark., 2013; Gervois ve ark., 2015). SHEDs'lerden gelen bu trofik faktörler, anjiyogenez ve nöral rejenerasyonu teşvik etmenin yanı sıra proliferasyonu ve göçü uyarır, apoptozu azaltır ve immünosupresyonu arttırır (Iohara ve ark., 2014). Tez çalışmamızda, SHEDs'lerde yüksek sitotoksik etkiye sahip olan NaOCl ve EDTA solüsyonlarının, 15 dakikalık inkübasyon periyodu sonunda sırasıyla %31.15±10.64 ve %39.89±11.54 oranlarında

yüksek TUNEL pozitif hücre yüzdelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın TUNEL analizinde elde ettiğimiz yüksek değerlere NaOCl ve EDTA'nın yüksek toksisitesinin neden olduğu düşünülmüştür. Sonuçlarımız NaOCl ve EDTA solüsyonlarının, olgunlaşmamış nekrotik pulpaya sahip dişlerin rejenerasyon tedavilerinde uygun ajanlar olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar Ballal ve arkadaşlarının (2013) hamster fibroblast hücre hatları üzerinde EDTA' nın apoptotik etkilerini araştırdığı çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Viola ve arkadaşlarının yaptığı (2018) çalışmanın sonuçları ise NaOCl'in fibroblastlar üzerinde yüksek toksisitesi nedeniyle hücre ölümüne neden olduğunu, bu hücre ölümünün az miktarda apoptoz, daha yüksek oranlarda ise nekrotik hücre ölümüyle sonuçlandığını göstermektedir.

TUNEL testinin sonuçlarına göre, ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonunun uygulandığı hücrelerin çekirdeklerinin DAB ile boyanmasından sonra, hücre morfolojisinde; nükleer parçalanma veya pyknotik çekirdek gibi morfolojik farklılıklar bulunmamıştır. Tüm gruplarda SHEDs'ler tipik fibroblast benzeri şekil morfolojilerini korumuştur ve ozonlanmış su (%10.67 ± 2.93) ve diyot lazer irradyasyonu (%13.24 ± 7.61) gruplarında EDTA ve NaOCl gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük oranda TUNEL pozitif hücre yüzdesi tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan tüm irrigasyon ajanlarının SHEDs'ler üzerindeki apoptotik etkilerinin araştırıldığı TUNEL analizi sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, MTT analizlerinde sitotoksisitesi düşük bulunan ajanlar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az apoptotik etki göstermiştir. Diyot lazer irradyasyonu grubundan elde edilen TUNEL analizi sonuçlarımız ise Ginani ve arkadaşlarının (2018) diyot lazerin apoptotik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Akdeniz ve arkadaşlarının (2018) ozonlanmış suyun gingival fibroblastlar üzerinde apoptotik etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada ozonlanmış suyun hücreler üzerinde düşük apoptotik etkiler meydana getirdiği sonuçları bizim çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İn-vitro kültür ortamında, SHEDs'lere EDTA, NaOCl, ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu uygulanarak; dental kaynaklı kök hücrelere uygulanan bu irrigasyon solüsyonları ve diyot lazerin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin tespit edilmesinin amaçlanıp; araştırıldığı tez çalışmamızın sınırları dahilinde;

Sitotoksisite analizlerinin sonuçlarına göre:

- Diyot lazer irradyasyonu ve ozonlanmış su gruplarının tümü, SHEDs'ler üzerinde tüm zaman periyotlarında herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmamıştır.
- 5 dakikalık periyot sonunda; deney grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm EDTA ve NaOCl gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri tespit edilirken tüm ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu grupları ile konrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm gruplar arasında en düşük hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri %5 NaOCl grubunda tespit edilmiştir. En yüksek hücresel canlılık ve optik yoğunluk değeri ise 20 µg/ml ozonlanmış su grubunda tespit edilmiştir.
- 10 dakikalık periyot sonunda; 5 dakikalık periyot sonundaki sonuçlara benzer şekilde tüm EDTA ve NaOCl gruplarında; tüm ozonlanmış su, diyot lazer irradyasyonu ile kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri tespit edilirken, tüm ozonlanmış su ve diyot lazer irradyasyonu grupları ile konrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm gruplar arasında en düşük hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri %17 EDTA grubunda tespit edilmiştir. En yüksek hücresel canlılık ve optik yoğunluk değeri ise 5 dakikalık periyot sonunda olduğu gibi yine 20 µg/ml ozonlanmış su grubunda tespit edilmiştir.

- 15 dakikalık periyot sonunda; tüm EDTA ve NaOCl gruplarında hücresel canlılık yüzdesi %50' nin altına düşmüştür. Bu değerler tüm ozonlanmış su, diyot lazer irradyasyonu ile kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Tüm gruplar arasında en düşük hücresel canlılık yüzdesi ve optik yoğunluk değeri 10 dakikalık periyot sonunda olduğu gibi %17 EDTA grubunda tespit edilmiştir. En yüksek hücresel canlılık ve optik yoğunluk değeri ise 5 µg/ml ozonlanmış su grubunda tespit edilmiştir.
- EDTA ve NaOCl solüsyonları tüm zaman periyotları göz önünde bulundurulduğuna 15 dakikalık periyot sonunda 5 ve 10 dakikalık periyotlar sonundaki değerleriyle karşılaştırıldığında SHEDs'ler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek sitotoksik etkiler göstermiştir.
- Ozonlanmış su ve diyot lazer gruplarında 5, 10 ve 15 dakika sonunda SHEDs'ler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Her iki grup içinde; 5, 10 ve 15 dakikalık periyot sonundaki değerler birbirleriyle ve kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark bulunmamıştır.

Apoptoz analizlerinin sonuçlarına göre:

- İmmunohistokimyasal TUNEL boyaması sonuçlarına göre 15 dakikalık süre sonunda diyot lazer irradyasyonu ve ozonlanmış su gruplarında, EDTA ve NaOCl gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük TUNEL pozitif hücre yüzdesi elde edilmiştir.
- En yüksek TUNEL pozitif hücre yüzdesine sahip grup %17' lik EDTA olarak tespit edilirken bu grubu sırasıyla %1'lik NaOCl, 1.5 j/cm^2 diyot lazer irradyasyonu ve en düşük TUNEL pozitif hücre değeri ile 10 µg/ml ozonlanmış su grubu takip etmiştir.

Çalışmamızın sitotoksisite ve apoptoz analizi sonuçları değerlendirildiğinde, kullandığımız ozonlanmış su ve diyot lazerin süt dişlerinden izole edilen kök hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi gözlenmemiş ve buna bağlı olarak apoptotik etkileri de düşük bulunmuştur. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, diyot lazer ve ozonlanmış suyun kök kanal dezenfeksiyonunda kullanımının, endodontik

tedavilerde rejenerasyonun sağlanması açısından uygun bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir. Ancak in vitro koşullarda elde ettiğimiz bu sonuçların in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiği inancındayız.

Sonuç olarak; ideal bir rejeneratif endodontik tedavinin gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak dezenfeksiyon yöntemleri, mikroorganizma populasyonunu tamamen elimine edip smear tabakası ile debrisi uzaklaştırırken ilgili dokuların rejenerasyonunu da sağlamalıdır. Fakat günümüzde, bütün bunları yerine getirebilen tek bir ajan veya sistem bulunmamaktadır. Bu özelliklere sahip irrigasyon solüsyonlarının ve dezenfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların devam etmesi ve yapılacak olan çalışmaların mutlaka in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol, 2016;17(14):1213-1221.

Afkhami F, Akbari S, NChiniforush N. Entrococcus faecalis Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study, J. Endod. 2017;43(2):279-282.

Agapov VS, Shulakov VV, Fomchenkov NA. Ozone therapy of chronic mandibular osteomyelitis. Stomatologiia (Mosk.), 2001;80:14-17.

Akdeniz SS, Beyler E, Korkmaz Y, Yurtcu E, Ates U, Araz K, Sahin FI, Torun OY. The effects of ozone application on genotoxic damage and wound healing in bisphosphonate-applied human gingival fibroblast cells. Clin Oral Investig. 2018;22(2):867-873.

Alkahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S.Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. BMC Oral Health. 2014;29:14:27.

Almeida LHS, Leonardo NGS, Gomes APN, Souza EM, Pappen FG. Influence of EDTA and dentine in tissue dissolution ability of sodium hypochlorite. Australian Endodontic Journal, 2015;41:7-11.

Al-Saadi H, Potapova I, Rochford ET, Moriarty TF, Messmer P. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing Staphylococcus aureus in vitro: a potential irrigant for infected wounds. Int Wound J, 2016;13(5):936-42.

AlSayed Hasan MMA, Sultan K, Hamadah O. Low-level laser therapy effectiveness in accelerating orthodontic tooth movement: A randomized controlled clinical trial. The Angle Orthodontist, 2017;87(4):499-504.

Andersen JL, Rathmell JC. Cell Death Pathways in Toxicological Response. In: Abou-Donia MB, eds. Mammalian Toxicology. John Wiley & Sons Ltd; 2015, 75-83.

Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. Journal of Periodontology, 2004;2000(36):59-97.

Arıcan GO, Khalilia W, Serbes U, Akman G, Cetin I, Arıcan E., Effects of hypobaric conditions on apoptosis signalling pathways in HeLa cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 2014;15(12):5043–5047.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. (2008). Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against Enterococcus faecalis. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 2008;106:e84-e89.

Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2009;33:289–394.

Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 20 11-2012. Nature Reviews Drug Discovery, 2013;12:569.

Asgary S, Fazlyab M, Nosrat A. Regenerative Endodontic Treatment versus Apical Plug in Immature Teeth: Three-Year Follow-Up. Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2016;40(5):356-360.

Asnaashari M, Godiny M, Azari-Marhabi S, Tabatabaei FS, Barati M. Comparison of the Antibacterial Effect of 810 nm Diode Laser and Photodynamic Therapy in Reducing the Microbial Flora of Root Canal in Endodontic Retreatment in Patients With Periradicular Lesions. Journal of Lasers in Medical Sciences, 2016;7(2):99-104.

Asnaashari M, Zadsirjan S. Application of laser in oral surgery. Journal of Lasers in Medical Sciences, 2014;5(3):97-107.

Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2016;1(1):19-28.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Australian Dental Journal, 2007;52:S64-82.

Augello A, Kurth TB, De BC. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. European Cells & Materials, 2010;20:121–133.

Avcılar H, Saraymen B, Özturan OÖ, Köker MY. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. Asthma Allergy Immunology, 2018;16:1-10.

Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. Journal of Dentistry, 2008;36:104–116.

Bahrololoomi Z, Fekrazad R, Zamaninejad S. Antibacterial Effect of Diode Laser in Pulpectomy of Primary Teeth. Journal of Lasers in Medical sciences, 2017;8(4):197-200.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftsoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Archives of oral biology, 2011;56(7):709–721.

Ballal NV, Rao BN, Mala K, Bhat KS, Rao BS. Assessment of genotoxic effect of maleic acid and EDTA: a comparative in vitro experimental study. Clin Oral Investig, 2013;17(5):1319-27.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? Journal of Endodontics, 2004;30:196–200.

Barboza CAG, Ginani F, Soares DM, Henriques ÁCG, Freitas RA. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. Einstein, 2014;12(1),75–81.

Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. American Journal of Dentistry, 2004;17:56-60.

Beer F, Buchmair A, Wernisch J, Georgopoulos A, Moritz A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals-an in vitro study. Lasers in Medical Science, 2012;27(2):361–364, 2012.

Beffa MM, Egea JJS, Cuenca AD. Regenerative Endodontic Procedures: A Perspective from Stem Cell Niche Biology. Journal of Endodontics, 2017;43:52–62.

Behdin S, Monje A, Lin GH, Edwards B, Othman A, Wang HL. Effectiveness of Laser Application for Periodontal Surgical Therapy: Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Periodontology, 2015;86(12):1352-63.

Behrents KT, Speer ML, Noujeim M. Sodium hypochlorite accident with evaluation by cone beam computed tomography. International Endodontic Journal, 2012;45:492–8.

Bentzinger CF, Wang YX, Von MJ, Rudnicki MA. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. Bioessays, 2010;5(3):231-41.

Bither R, Bither S. Accidental extrusion of sodium hypochlorite during endodontic treatment: a case report. Journal of Dentistry And Oral Hygiene, 2013;5:21–4.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. (2001). The evolving concept of a stem cell: Entity or function. Cell, 2001;105:829-841.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Archives of Medical Research, 2006;37(4):425-35.

Bongso A. Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells. Methods in Molecular Biology, 2006;331:13–22.

Borges CC, Estrela C, Lopes FC, Dibb RGP, Pecora JD, Estrela CRDA, Neto MDS. Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with Enterococcus faecalis. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2017;176:1–8.

Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB, Sagrillo MR, Praetzel JR. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. Int Endod J, 2016;49(8):746-54.

Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, Martens W, Lambrichts I. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. PLoS One, 2013;8:e71104.

Buldur B, Kapdan A. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of the EndoVac System and Conventional Needle Irrigation in Primary Molar Root Canals. J Clin Pediatr Dent, 2017;41(4):284-288.

Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, Heckert R, Gerst H, Anders JJ. Light Promotes Regeneration and Functional Recovery and Alters the Immune Response After Spinal Cord Injury, Lasers in Surgery and Medicine, 2005;36:171–185.

Cammarata F, Wautelety M. Medical lasers and laser-tissue interactions. Physics Education, 1999;34:156–61.

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on Candida albicans, Enterococcus faecalis, and endotoxins in root canals. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 2008;105(3):e85-91.

Carroll JD, Milwardb MR, Cooperb PR, Hadisc M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. Dental Materials, 2014;30:465–475.

Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola CR, Savarino L, Stea S, Montanaro L, Pizzoferrato A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. Toxicology In Vitro, 1999;13:801-810.

Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. Journal of Tissue Engineering, 2017;8:1–17.

Chamila Prageeth Pandula PK, Samaranayake LP, Jin LJ, Zhang C. Periodontal ligament stem cells: an update and perspectives. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2014;5(2):81-90.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 2001;92:446–50.

Clayman L, Kuo P. Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry. New York: Thieme, 1997;1-9.

Coluzzi DJ, Goldstein AJ. (2004). Lasers in dentistry. An overview. Dentistry Today, 2004;23(4):120-2, 124-7.

Coluzzi DJ. (2005). Lasers in dentistry. Compendium of Continuing Education in Dentistry, 2005;26(6A):429-435, quiz 436.

Coluzzi DJ. An overview of lasers in dentistry. Alpha Omegan, 2008;101:125-126.

Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. Dental Clinics of North America, 2004;48:751–770.

Conrad C, Huss R. Adult Stem Cell Lines in Renegerative Medicine and Reconstructive Surgery. Journal of Surgical Research, 2005;124:201-208.

Convissar RA. The biologic rationale for the use of lasers in dentistry. Dental Clinics of North America, 2004;48(4):771-94.

Corsentino G, Pedullà E, Castelli L, Liguori M, Spicciarelli V, Martignoni M, Ferrari M, Grandini S. Influence of Access Cavity Preparation and Remaining Tooth Substance on Fracture Strength of Endodontically Treated Teeth. Journal of Endodontics, 2018;44(9):1416-1421.

Crowley LC, Marfell BJ1, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc. 2016;(11).

Dahnhardt JE, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone, a prospective controlled clinical study. American Journal of Dentistry, 2006;19:267-270.

Das S. Application of Ozone Therapy in Dentistry. Indian Journal of Dental Advancements, 2011;3(2):538-542.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4’ chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1954;9:192-196.

De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. Stem Cell Reviews, 2010;6:633–649.

Dederich DN. Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue? Journal of the American Dental Association, 1993;124(2):57-61.

Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. Brazilian Dental Journal, 2011;22:3–13.

Dias J, Gumenyuk M, Kang H, Vodyanik M, Yu J, Thomson JA, Slukvin II. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. Stem Cells and Development, 2011;20:1639-1647.

Dieterlen-Lièvre F, Pardanaud L, Bollerot K, Jaffredo T. Hemangioblasts and hemopoietic stem cells during ontogeny. Comptes Rendus Biologies, 2002;325:1013-20.

Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, An Y, Zhang C, Wang S. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. Stem Cells, 2010;28(10):1829–1838.

Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An Update On Clinical Regenerative Endodontics. Endodontic Topics, 2013;28:2-23.

Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational Science in Disinfection for Regenerative Endodontics. Journal of Endodontics, 2014;40:52–57.

Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J. Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. ASSAY and Drug Development Technologies, 2015;13(8):456-465.

Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine*. Acta Biochimica Polonica, 2015;62(3):329-337.

Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. Dent Traumatol, 2002;18(5):262-6.

Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn AR, et al. The influence of low-intensity laser therapy on bone healing. J Dent (Tehran) 2012; 9(4):238-48.

Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation: A Preliminary Study, Lasers in Surgery and Medicine, 2008;40:433–438.

Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. The Journal of Cell Biology, 2010;189(7):1059-1070.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicology Pathology, 2007;35(4):495–516.

Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 2011;2(1):66-70.

Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. International Endodontic Journal, 2017;51(4):405-419.

Escobar N, Rodrigez M, Ferrer-Luque C. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, 2010;15(1):e90-94.

Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Brazilian Dental Journal, 2011;22:91–98.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13: 113-117.

Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. International Endodontic Journal, 2007;40:85-93.

Eversole LR, Rizoiu I, Kimmel AI. Pulpal response to cavity preparation by an erbium, chromium:YSGG laser-powered hydrokinetic system. Journal of the American Dental Association, 1997;128(8):1099- 1106.

Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for highthroughput screening. ASSAY and Drug Development Technologies, 2007;5(1):127-136.

Fang Y, Wang X, Zhu J, Su C, Yang Y, Meng L. Influence of Apical Diameter on the Outcome of Regenerative Endodontic Treatment in Teeth with Pulp Necrosis: A Review. Journal of Endodontics, 2018;44(3):414-431.

Farhad AR, Shokraneh A, Shekarchizade N. Regeneration or replacement ? A case report and review of literature. Dental Traumatology, 2016;32:71–79.

Farook SA, Shah V, Lenouvel D, Sheikh O, Sadiq Z, Cascarini L. Guidelines for management of sodium hypochlorite extrusion injuries. British Dental Journal, 2014;217:679–84.

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. Cold Spring Harbor Protocols, 2016.

Ferroni L, Gardin C, Sivolella S, Brunello G, Berengo M, Piattelli A, Bressan E, Zavan B. A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue. International Journal of Molecular Science, 2015;16(3):4666–4681.

Filippi A. The influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 1997;56:104-108.

Finkbeiner RL. (1995). The results of 1328 periodontal pockets treated with the argon laser. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 1995;13:273–81.

Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. Veterinary Surgery, 2005;34:415-23.

Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. Cell, 2004;116:769-778.

Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, Lambrechts P. European Society of Endodontology position statement: revitalization procedures. International Endodontic Journal 2016;49:717-23.

Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. International Endodontic Journal, 2016;49:926–36.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG. ve diğerleri. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death and Differentiation, 2009;16:1093-1107

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. Journal of Biomedical Science, 2009;16:4.

Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brône B, Lambrichts I, Martens W. Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. Stem Cells Dev, 2015;24:296-311.

Giardino L, Cavani F, Generali L. Sodium hypochlorite solution penetration into human dentine: a histochemical evaluation. International Endodontic Journal, 2017; 50(5):492-498.

Ginani F, Soares DM, Oliveira Rocha HA, Souza LB, CGalvao Barboza CA. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Lasers Med. Sci. 2018;33:95-102.

Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. Nature, 1964;203(4943):417.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. International Endodontic Journal, 2001;34: 424-428.

Gong T, Heng BC, Lo ECM, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. Stem Cells International, 2016; 13.

Gordon JP, Zeigler HJ, Townes CH. The maser-new type of amplifier, frequency standard and spectrometer. Physiological Reviews, 1995;99:1264.

Gouw-Soares S, Gutknecht N, Conrads G, Lampert F, Matson E, Eduardo CP. The bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. J. Clin. Laser Med. Surg. 2000;18:81-87.

Göztaş Z, Onat H, Tosun G, Şener Y, Hadımlı HH. Antimicrobial effect of ozonated water, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in primary molar root canals. Eur J Dent 2014;8:469-74.

Granevik Lindström M, Wolf E, Fransson H. The Antibacterial Effect of Nd:YAG Laser Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Controlled Trial. J Endod. 2017;43(6):857-863.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Review and Reports, 2008;4:21-26.

Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015;1:7(12).

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Gehron Robey P, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. Journal of Dental Research, 2002;81:531–535.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2000;97:13625-13630.

Guivarc’h M, Ordioni U, Ahmed HMA, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. Journal of Endodontics, 2017;43(1):16-24.

Guo W, Chen L, Gong K, Ding B, Duan Y, Jin Y. Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. Tissue Engineering Part A, 2012;18(5-6):459–470.

Gurney ML, Sharples SD, Phillips WB, Lee DJ. Using an Er,Cr:YSGG laser to remove lithium disilicate restorations: A pilot study. The Journal of Prosthetic Dentistry, 2016;115(1):90-4.

Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, 2004;22(1):9–13.

Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008;2:73-78.

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi yeni potansiyel tedavi stratejileri. Arch Turk Soc Cardiol. 2008;36(2):120-130.

Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Sunay H, Şahın F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. Journal of Applied Oral Science :Revista FOB, 2013;21(4):351–357.

Güven EP, Yalvaç ME, Şahin F, Yazıcı MM, Rizvanov AA, Bayırlı G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. Journal of Endodontics, 2011;37:650-656.

Güvenç D, Güvenç T. Toksikolojik Yanıtta Apoptotik Hücre Ölümü. Animal Health, Production and Hygiene, 2017;6(2):499 - 504

Haapasalo M, Qian W, Shen Y. Irrigation: beyond the smear layer. Endodontic Topics, 2012;27:35–53.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. British Dental Journal, 2014;216:299-303.

Hadaegh Y, Niknam M, Attar A, Maharlooei MK, Tavangar MS, Aarabi AM, Monabati A. Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth. Indian Journal of Dental Research, 2014;25(1):14-21.

Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. Periodontology, 2000;24:127–152.

Hambiliki F, Strom S, Zhang P, Stavreus- Evers A. Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2012;29:1021–1028.

Han C, Yang Z, Zhou W, Jin F, Song Y, Wang Y, Huo N, Chen L, Qian H, Hou R, Duan Y, Jin Y. Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. Stem cells and development, 2010;19(9):1405–1415.

Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, Sampath Narayanan A. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. Bone, 2002;31(5):606–611.

Har A, Park JC. Dental Stem Cells and Their Applications. Chinese Journal of Dental Research, 2015;18(4):207–212.

Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? Journal of Endodontics, 2008;34:S51-S56.

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Communication & Signaling, 2011;9(12).

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. Photomed Laser Surg. 2006;24:705–714.

Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and dichloroisocyanurate solutions in vitro. J Endod. 2001;27: 278-280.

Hematti P. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. Methods in Molecular Biology, 2011;690:163-174.

Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2005;38:22–9.

Heydarkhan-Hagvall S, Gluck JM, Delman C, Jung M, Ehsani N, Full S, Shemin RJ. The effect of vitronectin on the differentiation of embryonic stem cells in a 3D culture system. Biomaterials, 2012;33:2032–2040.

Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, doubleblind, randomised, controlled 18 month trial. Gerodontology, 2003;20:106-114.

Holz O, Mucke M, Paasch K, Bohme S, Timm P, Richter K, Magnussen H, Jorres RA. Repeated ozone exposures enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. Clinical & Experimental Allergy, 2002;32(5):681-9.

Horvitz HR. Nobel lecture: Worms, life and death. Bioscience Reports, 2003;23(5):239-303.

Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. J Endod, 2010;36(12):1963-6.

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, MHamblin MR. Biphasic dose response in low-level light therapy, Dose Response, 2009;7:358-383.

Huth KC, Jacob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. European Journal of Oral Sciences, 2006;114:435-440.

Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, AlKhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. International Endodontic Journal, 2009;42:3–13.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indicaülsmanntions for their use. International Endodontic Journal, 2003;36:810–830.

Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Go MJ, Adachi H, Yokota Y, Kirita T, Ohgushi H. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. Differentiation; Research in Biological Diversity, 2008;76(5):495–505.

Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: Introduction. British Medical Bulletin, 2011;98:117-26.

Ioannidis K, Beltes P, Lambrianidis T, Kapagiannidis D, Karagiannis V. Validation and spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by root canal sealers. Clinical Oral İnvestigation, 2013;17:1525-1533.

Iohara K, Murakami M, Nakata K, Nakashima M. Age-dependent decline in dental pulp regeneration after pulpectomy in dogs. Exp Gerontol, 2014;52:39-45.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. Dental Traumatology, 2001;17:185–7.

İşler SC, Ünsal B, Soysal F, Özcan G, Peker E, Karaca IR. The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis. Journal of Periodontal & Implant Science, 2018;48(3):136-151.

Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. Journal of Endodontics, 2012;38:1330-1336.

Kalyuzhny AE. Combination of TUNEL Assay with Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of DNA Fragmentation and Oxidative Cell Damage. In: Didenko VV, eds. DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 682, Springer Science+Business Media; 2011, 15-27.

Kanafi M, Majumdar D, Bhonde R, Gupta P, Datta I. Midbrain cues dictate differentiation of human dental pulp stem cells towards functional dopaminergic neurons. J Cell Physiol. 2014;229(10):1369-77.

Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. Journal Conservative Dentistry, 2010;13(4):256-64.

Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S.Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. Iranian Endodontic Journal. 2018;13(3):390-394.

Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells, Proc. SPIE. 1995;2630:60–64.

Kaul R, Shilpa PS. Multifaceted Ozone and its Application in Dentistry. Universal Research Journal of Dental Sciences, 2014;4(3):139-144.

Kautzky M, Susani M, Steurer M, Schenk P. Soft-tissue effects of the holmium:YAG laser: an ultrastructural study on oral mucosa. Lasers in Surgery and Medicine, 1997;20(3):265-71.

Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. Journal of Endodontics, 2000;26:288-291.

Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. Tissue Eng Part B Rev. 2012;18(2):129-38.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 1972;26(4):239.

Kim CF, Jackson E., Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell, 2005;121:823–835.

Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. J Food Protect 1999; 62:1071-87.

Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. Korean Journal of Internal Medicine, 2013;28:387-402.

Kim SG. Infection and Pulp Regeneration. Dentistry Journal, 2016;4(4).

Kirsch J, Basche S, Neunzehn J, Dede M, Dannemann M, Hannig C, Weber MT. Is it really penetration? Locomotion of devitalized Enterococcus faecalis cells within dentinal tubules of bovine teeth. Arch Oral Biol, 2017;83:289-296.

Knight A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. Reviews on Recent Clinical Trials, 2008;3:89-96.

Kolios G, Moodley Y, (Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. Respiration, 2013;85:3–10.

Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. Journal of Endodontics 2015;41:146-54.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell, 2001;105:369-77.

Kumar A, Bhagawati S, Tyagi P, Kumar P. Current interpretations and scientific rationale of the ozone usage in dentistry: A systematic review of literature. European Journal of General Dentistry, 2014;3(3):75-80.

Kutsch VK. Dental caries illumination with the argon laser. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 1993;11:558–9.

Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. Pharmaceutical Research, 1994;11(8):1127-1131.

Leewananthawet A, Arakawa S, Okano T, Daitoku Kinoshita R, Ashida H, Izumi Y, Suzuki T. Ozone ultrafine bubble water induces the cellular signaling involved in oxidative stress responses in human periodontal ligament fibroblasts. Sci Technol Adv Mater, 2019; 20(1):589-598.

Llena C, Collado-Gonzalez M, Tomas-Catala CJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Rodriguez-Luzano FJ, Forner L. Human Dental Pulp Stem Cells Exhibit Different Biological Behaviours in Response to Commercial Bleaching Products, Materials, 2018;11(7):E1098.

Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. Stem Cells and Development, 2006;15(4):595–608.

Maiman TH. Simulated optical radiation in ruby. Nature, 1960;187:493.

Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, Fu SY, Yang R, Zhou X. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation, Dental Clinics of North America, 2012;56(3):639–649.

Martens LC. Laser physics and a review of laser applications in dentistry for children. European Archives of Paediatric Dentistry, 2011;12 (2):61-67.

Martin DE, Almeida JFAD, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, Diogenes A. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. Journal of Endodontics, 2014;40(1):51-5.

Martínez-Insua A, Da Silva Dominguez L, Rivera FG, Santana-Penín UA. Differences in bonding to acid-etched or Er:YAG-laser-treated enamel and dentin surfaces. The Journal of Prosthetic Dentistry, 2000;84(3):280-8.

Mason S, Tarle SA, Osibin W, Kinfu Y, Kaigler D. Standardization and safety of alveolar bone-derived stem cell isolation. Journal of Dental Research, 2014;93(1):55–61.

Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. Journal of Bone and Mineral Research, 2005;20(3):399–409.

Milliard MJ, Mathews L, Aronoff BL, Hults D. Soft tissue studies with 805 nm Diode laser radiation: Thermal effects with contact tips and comparison with 1064 nm Nd:YAG laser radiation. Lasers in Surgery and Medicine, 1993;13:528-536.

Miralles PM, González JM, Ezpeleta OA, Sánchez MCJ, Ortega EV, Egea JJS. Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontic procedures: a review. International Endodontic Journal, 2018;51:981–988.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated decidous teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003;100:5807-5812.

Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Kinoshita JI. The Journal of Contemporary Dental Practice, 2017;18(5):415-420.

Mohammadi Z, Shalavi S, Jafarzadeh H. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics. European Journal of Dentistry, 2013;7(1):S135–S142.

Mohammadi Z, Shalavi S, Soltani MK, Asgary S. A review of the properties and applications of ozone in endodontics: An update. Iranian Endodontic Journal, 2013;8:40–43.

Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. International Dental Journal, 2009;59, 35-46.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. International Dental Journal, 2008;58:329-341.

Mollashahi NF, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. Iranian Endodontic Journal, 2016;11(4):293-7.

Monroe C. Quantum information processing with atoms and photons. Nature, 2002;416:238-246.

Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. Lasers Surg. Med. 2005;36:8–12.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biology, 2005;24(2):155–165.

Mortazavi V, Khademi A, Khosravi K, Fathi M, Ebrahimi-Chaharom M, Shahnaseri S, Khalighinejad N, Badrian H. Effect of MTAD on the shear bond strength of self-etch adhesives to dentin. Dent Res J (Isfahan). 2012;9(1):24-30.

Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells, Lasers Med. Sci. 2010;25:33–39.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. J Endod. 2004;30:778–81.

Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. Cell Mol Life Sci., 2019;76(17):3323-3348.

Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, Hiraki T, Tsuka Y, Abe T, Kaku M, Nikawa H, Takata T, Tanne K, Tanimoto K. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. Biochemical and biophysical research communications, 2018;497(3):876-882.

Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Iwama A. Manipulation of Hematopoietic StemCells for Regenerative Medicine. The Anatomical Record, 2014;297:111–120.

Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. Journal of Endodontics, 2009;35:1536–1542.

Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. Cytokine Growth Factor Rev, 2009;20:435-440.

Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. Int Endod J. 2015;48(6):602-10.

Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Analytical Biochemistry, 2007;336(2):197-206.

Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MF, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Ozone therapy as an adjuvant for endondontic protocols: Microbiological – Ex vivo study and citotoxicity analyses. J Appl Oral Sci 2016;24:607-13.

Nosrat A, Li KL, Vir K, M Hicks, L, Fouad AF. Is Pulp Regeneration Necessary for Root Maturation? Journal of Endodontics, 2013;39:1291–1295.

Novais A, Lesieur J, Sadoine J, Slimani L, Baroukh B, Saubaméa B, Schmitt A, Vital S, Poliard A, Hélary C, Rochefort GY, Chaussain C, Gorin C. Priming Dental Pulp Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Mineralization Within Tissue-Engineered Constructs Implanted in Craniofacial Bone Defects. Stem Cells Transl Med, 2019;8(8):844-857.

Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. Stem Cell Rev Rep. 2016;12(5):511-523.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells, 2001;19:193–204.

Ogita M, Tsuchida S, Aoki A, Satoh M, Kado S, Sawabe M, Nanbara H, Kobayashi H, Takeuchi Y, Mizutani K, Sasaki Y, Nomura F, Izumi Y. Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis Lasers Med. Sci. 2015;30:1855–1866.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana A, Figueiredo C. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. International Endodontic Journal, 2004;37:38–41.

Ortega-Concepción D, Cano-Durán JA, Peña-Cardelles JF, Paredes-Rodríguez VM1, González-Serrano J, López-Quiles J. The application of diode laser in the treatment of oral soft tissues lesions. A literature review. J Clin Exp Dent, 2017;1:9(7):e925-e928.

Ostby B.N. The Role of the Blood Clot in Endodontic Therapy an Experimental Histologic Study. Acta Odontologica Scandinavica, 1961;19:323-353.

Ostby BN, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. European Journal of Oral Sciences, 1971;79:333-349.

Özcan A, Sevimay M. Diş Hekimliğinde Lazerler. Türkiye Klinileri Journal of Dental Sciences, 2016;22(2):122-9.

Özkan L, Çetiner S, Şanlidag T. Effect of Er,Cr:YSGG laser irradiation with radial firing tips on Candida albicans in experimentally infected root canals. Biomed Res Int, 2014;2014:938245.

Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. Clinical Laboratory, 2007;53:81-4.

Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, Flanagan CL, Hollister SJ, Giannobile WV. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. Biomaterials, 2012;33(1):137–145.

Park JC, Kim JC, Kim YT, Choi SH, Cho KS, Im GI, Kim BS, Kim CS. Acquisition of human alveolar bone-derived stromal cells using minimally irrigated implant osteotomy: in vitro and in vivo evaluations. Journal of Clinical Periodontology, 2012;39(5):495–505.

Pekovits K, Kröpfl JM, Stelzer I, Payer M, Hutter H, Dohr G. Human mesenchymal progenitor cells derived from alveolar bone and human bone marrow stromal cells: a comparative study. Histochemistry and Cell Biology, 2013;140(6):611–621.

Pelin M, Kilcoyne J, Florio C, Hess P, Tubaro A, Sosa S. Azaspiracids Increase Mitochondrial Dehydrogenases Activity in Hepatocytes: Involvement of Potassium and Chloride Ions. Mar Drugs, 2019;8:17(5).

Pelka M, Petschelt A. Permanent mimic musculature and nerve damage caused by sodium hypochlorite: a case report. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 2008;106:80–3.

Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. Journal of Endodontics, 2001;27(1):1-6.

Pinheiro SL, da Silva CC, da Silva LA, Cicotti MP, Bueno CE, Fontana CE, Pagrion LR, Dalmora NP, Daque TT, UF de Campos F. Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. Eur J Dent 2018;12:94-9.

Pirnat S, Lukac M, Ihan A. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. Lasers in Medical Science, 2011;26(6):755–761.

Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. BMC Developmental Biology, 2015;14:15:14.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999;284:143-7.

Pogrel MA, Muff DF, Marshall GW. Structural changes in dental enamel induced by high energy continuous wave carbon dioxide laser. Lasers in Surgery and Medicine, 1993;13:89–96.

Powell GL, Ellis R, Blankenau RJ, Schouten JR. Evaluation of argon laser and conventional light-cured composites. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 1995;13:315–7.

Radcliffe CE, Potouridou L Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms Actinomyces israelii, A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2004;37:438-446.

Raffetto N, Gutierrez T. Lasers in periodontal therapy, a five-year retrospective. The Canadian Journal of Dental Hygiene, 2001;16:17–20.

Rai S, Kaur M, Kaur S. Applications of stem cells in interdisciplinary dentistry and beyond: An overview. Annal of Medical & Health Science Research, 2013;3:245–54.

Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. Stem Cell Investig. 2019;6:19.

Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB, Palnikar P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Appl Environ Microbiol. 1995;61:3471-5.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. Journal of Clinical Investigation, 2002;109:337-46.

Riss TL, Moravec RA. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In: Celis JE, eds. Cell Biology. Elseiver Academic Press; 2006, 25-31.

Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. ASSAY and Drug Development Technologies, 2004;2(1):51- 62.

Rizzi M, Migliario M, Rocchetti V, Tonello S, Renò F. Pre-odontoblast proliferation induced by near-infrared laser stimulation. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2016;20:794-800.

Rizzi M, Migliario M, Tonello S, Rocchetti V, Renò F. Photobiomodulation induces in vitro re-epithelialization via nitric oxide production. Lasers in Medical Science, 2018;33:1003–1008.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. Journal of Endodontics, 2011;37:143–50.

Romeo U, Palaia G, Nardo A, Tenore G, Telesca V, Kornblit R, Del Vecchio A, Frioni A, Valenti P, Berlutti F. Effectiveness of KTP laser versus 980 nm diode laser to kill Enterococcus faecalis in biofilms developed in experimentally infected root canals. Aust Endod J. 2015;41:17–23.

Rosa V, Dubey N, Islam I, Min KS, Nör JE. Pluripotency of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for tissue engineering. Stem Cells Int. 2016;2016:5957806.

Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. Stem Cells, 2001;19:477–482.

Rule DC, Winter GB. Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. British Dental Journal, 1996;120:586-590.

Sahar–Helfit S, Stabholz A, Moshonov J, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Effect of Er:YAG laser activated irrigation solution on Enterococcus faecalis bioflm in an ex vivo root canal model. Photomed. Laser Surg. 2013;31:334–341.

Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. Nucleic Acids Research, 1997;25(3): 680–681.

Saltzman B, Sigal M, Clokie C, Rukavina J, Titley K, Kulkarni GV. Assessment of a novel alternative to conventional formocresol zinc oxide eugenol pulpotomy for the treatment of pulpally involved human primary teeth: diode laser- mineral trioxide aggregate pulpotomy. International Journal of Paediatric Dentistry, 2005;15:437-447.

Sanini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 2011;2(2):151-3.

Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N. Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals—A Literature Overview. BioMed Research International, 2016.

Schawlow AL, Townes CH. Infrared and optical red maser. Physiological Reviews, 1958;112:1940.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low intensity laser therapy: A review, J. Invest. Med. 2000;48:312–326.

Schmalz G, Snith AJ. Pulp development, repair and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. Journal of. Endodontics, 2014;40:2-5.

Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelik N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. Lasers in Surgery and Medicine, 2004;35(2):111–116.

Seidler V, Linetskiy I, Hubalkova H, Stankova H, Smucler R, Mazanek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. Prague Medical Report, 2008;109(1):5-13.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet, 2004;364(9429):149–155

Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozçelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. J. Oral Sci. 2001;43:233–238.

Serper A, Çalt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. Journal of Endodontics, 2002;28:501-2.

Sharma LA, Sharma A, Dias GJ. Advances in regeneration of dental pulp – a literature review. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2015;6:85–98.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthodontics & Craniofacial Research, 2005;8:191-199.

Singh P, Agarwal B, Pardhe ND, Varshney A, Hasan B, Mathur N. Application of Ozone in Various Specialities of Dentistry. Journal of Research and Advancement in Dentistry, 2014;3(3S):44-47.

Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. J Endod. 2000;26:331-334.

Sivalingam VP, Panneerselvam E, Raja KV, Gopi G. Does topi-cal ozone therapy improve patient comfort after surgicalremoval of impacted mandibular third molar? A randomizedcontrolled trial. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2016;75:e1–e9.

Sjoberg EA. Logical fallacies in animal model research. Behav Brain Funct. 2017;13(1):3.

Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 1978;45:17–28.

Snellman E, Rantanen T. Severe anaphylaxis after a chlorhexidine bath. J Am Acad Dermatol. 1999;40:771-772.

Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. Toxicology Research, 2013;2(1):23-39.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cellmediated functional tooth regeneration in swine. Public Library of Science one, 2006;1(1):e79.

Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, Stabholz A. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. Compendium of Continuing Education in Dentistry, 2003;24(12):935-48.

Staffoli S, Romeo U, Amorim RNS, Migliau G, Palaia G, Resende L, Polimeni A. The effects of low level laser irradiation on proliferation of human dental pulp: a narrative review. Clin Ter. 2017;168(5):e320-e326.

Steiner R. Thermal and non-thermal laser-dissection. Endoscopic Surgery and Allied Technologies, 1994;2:214–20.

Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. Acta Histochem, 2018;120(3):159-167.

Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. International Endodontic Journal, 2012;45:363–371.

Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. Dental Clinics of North America, 2000;44:717-752.

Sulieman M. An Overview of the Use of Lasers in General Dental Practice:1. Laser Physics and Tissue Interactions. Dent Update, 2005;32:228-236.

Şimşek Ö. Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2012;7(3):231-236.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006;126:663–676.

Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. Journal of Cellular Physiology, 2011;226(3):832–842.

Teixeira PA, Coelho MS, Kato AS, Fontana CE, Bueno CE, Pedro-Rocha DG.Cytotoxicity assessment of 1% peracetic acid, 2.5% sodium hypochlorite and 17% EDTA on FG11 and FG15 human fibroblasts. Acta Odontol Latinoam. 2018;31(1):11-15.

Thoma EC, Maurus K, Wagner TU, Schartl M. Parallel differentiation of embryonic stem cells into different cell types by a single gene-based differentiation system. Cellular Reprogramming, 2012;14:106–111.

Thomsen S. (1991). Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. Photochemistry and Photobiology, 1991;53:825–35.

Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksisite Testleri. Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 2017;6 (1):112-118.

Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, Mishra GC, Wani MR. Human gingiva- derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010;393(3):377–383.

Torricelli R, Wüthrich B. Life-threatening anaphylactic shock due to skin application of chlorhexidine. Clinical and Experimental Allergy, 1996;26:112.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Hargreaves ND, Hargreaves KM, Diogenes A. Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. Journal of Endodontics, 2011;37(8):1109-1115.

Tsourounakis I, Palaiologou-Gallis AA, Stoute D, Maney P, Lallier T. Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. Journal of Periodontology, 2013;84:1211–20.

Utsunomiya T. A histopathological study of effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference of lectins and collagens. Journal of Endodontics, 1998;24:187-193.

Uzun İH, Bayındır F. Dental Materyallerin Biyouyumluluk Test Yöntemleri. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2011;28(2):115-22.

van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol, 2011;731:237-45.

Vatkar NA, Hegde V, Sathe S. Vitality of Enterococcus faecalis inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. J Conserv Dent. 2016;19(5):445–449.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. International Endodonti Journal, 2006;39:484-492.

Viola KS, Rodrigues EM, Tanomaru-Filho M, Carlos IZ, Ramos SG, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G.Cytotoxicity of peracetic acid: evaluation of effects on metabolism, structure and cell death. Int Endod J. 2018;51(4):e264-e277.

Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics – a review. International Endodontic Journal, 2010;43:2–15.

Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR. (2007). Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. Journal of Endodontics, 2007;33:926-929.

Visuri SR, Walsh JT Jr, Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. Lasers in Surgery and Medicine, 1996;18(3):294-300.

Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. Chemical Reviews, 2003;103(2):577-644.

Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylene diamine tetraacetic acid and chlorhexidine, International Endodontic Journal, 2016;49(8):764-773.

Wallace RJ, Whitters CJ, Mc Geough JA, Muir A. Experimental evaluation of laser cutting of bone. Journal of Materials Processing Technology, 2004;149:557-560.

Wang F, Yu M, Yan X, Wen Y, Zeng Q, Yue W, Yang P, Pei X. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. Stem Cells and Development, 2011;20(12):2093–2102.

Wang H, Zhong Q, Yang T, Qi Y, Fu M, Yang X, Qiao L, Ling Q, Liu S, Zhao Y. Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. Mol Med Rep. 2018;17(5): 6551-9.

Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, Yang Q, Wang C, Duan Y, Jin Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. Tissue Engineering Part A, 2011;17(7-8):1015–1026.

Wang RL, Chang HH, Kuo CI, Chen SK, Guo MK, Huang GF, Lin CPA. A study on the root canal morphology of primary molars by high-resolution computed tomography. J. Dental Sci. 2013;8:321–327.

Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action, Biochim. Biophys. Acta. 2017;1861(2):441–449.

Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. Cell Stem Cell, 2012;10:440–454.

Weichman JA, Johnson FM. Laser use in endodontics. A preliminary investigation. Oral Surgery, 1971;31:416-420.

White JM, Goodis HE, Sectos JC, Eakle WS, Hulscher BE, Rose CL. Effects of pulsed Nd:YAG laser energy on human teeth: a three-year follow-up study. The Journal of the American Dental Association, 1993;124:45–50.

Widbiller M, Althumairy RI, Diogenes A. Direct and Indirect Effect of Chlorhexidine on Survival of Stem Cells from the Apical Papilla and Its Neutralization. Journal of Endodontics, 2019;45(2):156–160.

Wider-Smith P, Arrastia AM, Liaw LH, Berns M. Incision properties and thermal effects of three CO2 lasers in soft tissue. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology, 1995;128:583–8.

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of Enterococcus faecalis. Journal of Endodontics, 2009;35(1):95-7.

Xing J, Lian M, Shen Q, Feng G, Huang D, Lu X, Gu Z, Li L, Zhang J, Huang S, You Q, Wu X, Zhang D, Feng X. AGS3 is involved in TNF-alpha medicated osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. Differentiation, 2015;89(5):128–136.

Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, O'Sullivan C, Laflamme MA, Zhu WZ, Van Biber B, Hegerova L, Yang J, Delavan-Boorsma K, Davies A, Lebkowski J, Gold JD. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Regenerative Medicine, 2011;6:53-66.

Xu M, Wang L, Wang M, Wang H, Zhang H, Chen Y, Wang X, Gong J, Zhang JJ, Adcock IM, Chung KF, Li F. Mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome in acute ozone-induced murine model of airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. Free Radic Res, 2019; 53(7):780-790.

Yalvaç ME, Rizvanov AA, Kılıç E, Şahin F, Mukhamedyarov MA, Islamov RR, Palotas A. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. Current Pharmaceutical Design, 2009;15:3908-3916.

Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp regeneration: Current Approaches and Future Challenges. Frontiers in Physiology, 2016;7(58).

Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2006;103:6907–6912.

Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells, Stem Cells and Development, 2017;26(10):762-775.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget JA, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007;318:1917-20.

Zabierowski SE, Herlyn M. Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. Methods in Molecular Biology, 2010;584:301-316.

Zaccara IM, Ginani F, Mato-Filho HG, Gomes-Henriques AC, Barboza Galvao C.A., Effect of low-laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells, Lasers Med. Sci. (2015).

Zan R, Alacam T, Hubbezuoglu I, Sumer Z, Alıcı O. Antibacterial Efficacy of Super-Oxidized Water on Enterecoccus faecalis Biofilms in Root Canal, Jundishapur. Microbiol. 2016;9(9):e30000.

Zaura E, Buijs MJ, Ten Cate JM. Effects of ozone and sodium hypochlorite on caries-like lesions in dentin. Caries Research, 2007;41:489-492.

Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. Frontiers of medicine, 2018.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation related tissue destruction in experimental colitis. Journal of Immunology, 2009;183:7787–7798.

EK 1. ETİK KURUL RAPORU

EK: 621-2018

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME ETİK KURULU

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 22.02.2018
Toplantı No : 2018/55
Proje No : 526

Yakın Doğu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serap Çetiner'in sorumlu araştırmacısı olduğu, YDU/2018/55-526 proje numaralı ve **"Diyot Lazer, Ozonlu Su ve Çeşitli İrrigasyon Ajanlarının Süt Dişi Kök Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi"** başlıklı proje önerisi kurulumuzca değerlendirilmiş olup, etik olarak uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur (BAŞKAN)
2. Prof. Dr. Nerin Bahçeciler Önder (ÜYE)
3. Prof. Dr. Tamer Yılmaz (ÜYE)
4. Prof. Dr. Şahan Saygı (ÜYE)
5. Prof. Dr. Şanda Çalı (ÜYE)
6. Prof. Dr. Nedim Çakır (ÜYE)
7. Prof. Dr. Kaan Erler (ÜYE) KATILMADI
8. Doç. Dr. Ümran Dal Yılmaz (ÜYE)
9. Doç. Dr. Nilüfer Galip Çelik (ÜYE)
10. Yrd. Doç.Dr. Emil Mammadov (ÜYE)

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hamit	Soyadı	TUNÇ
Doğum Yeri	ISPARTA	Doğum Tarihi	14/06/1990
Uyruğu	T.C	Tel	+905374220308
E-mail	htunc15@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Yakın Doğu Ünverstesi Diş Hekimliği Fakültesi	2014
Lise	Burdur Anadolu Lisesi	2008

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS (YÖKDİL)	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
73,75	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74,76163	75,48499	66,61974
(Diğer) Puanı	-	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
GraphPad	Çok iyi
Microsoft Office	Çok iyi

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma Görevlisi	Yakın Doğu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2014-2019

YAYINLAR

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Tunç H., İslam A., Çetiner S. Long-term effect of low-level diode laser irradiation on proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth after cryopreservation protocol. Laser Physics, 2019;29(10):105602.

A2. Tunç H., Islam A., Kabadayı H., Vatansever H.S., Yilmaz H.G. Evaluation of low-level diode laser irradiation and various irrigant solutions on the biological response of stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Photochem Photobiol B. 2019;191:156-163.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

B1. Tunc H., Özkan L., Yilmaz T., Cetiner S. Taste Hyposensitivity in Northern Cypriot Children and Adolescents. FDI World Dental Congress, 2017, Madrid, Spain.

B2. Öge Ö.A., Özkan L., Korun S., Islam A., Tunç H., S.Çetiner. Prevalence of dental developmental anomalies: a radiographic study. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, 2015, Glasgow, UK.

B3. İslam A., Korun S., Tunç H., Çetiner S. Bleaching of traumatized discolored anterior tooth using walking bleach technique. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, 2015, Glasgow, UK.

B4. Küçük F, Tunç H, Öge Ö.A. The first paediatric dental age and reasons of children in Northern Cyprus. 14th EAPD Congress, Palazzo dei Congressi Lugano, 2018, Switzerland.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

C1. Özkan L., Korun S., İslam A., Öge Ö.A., Tunç H., Çetiner S. Kıbrıslı Türk Hastalarda Hipodonti Görülme Sıklığı ve Paterni. 22. Türk Pedodonti Derneği Kongresi, 2015, Girne, KKTC.

C2. Güldüren K., Tunç H., Öz U., Çetiner S. Sürmemiş sağ üst kanin dişte koronal radyolusent lezyon: olgu sunumu. 24. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, 2017, Antalya.

C3. Genç Çırakoğlu S., Tunç H., Küçük F. Kuzey kıbrıs türk cumhuriyeti'ndeki daimi birinci büyük azı dişlerinin ektopik erüpsiyon prevalansı. 24. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, 2017, Antalya.