

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYABET HASTALARINDA MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT/ $1\alpha,25$ -  
DİHİDROKSİVİTAMİN D3 KOMBİNASYONU İLE DENTAL PULPA  
KÖK HÜCRELERİNDE ODONTOJENİK FARKLILAŞMANIN  
ARAŞTIRILMASI**

Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK

Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA  
2021



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYABET HASTALARINDA MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT/ $1\alpha,25$ -  
DİHİDROKSİVİTAMİN D3 KOMBİNASYONU İLE DENTAL PULPA  
KÖK HÜCRELERİNDE ODONTOJENİK FARKLILAŞMANIN  
ARAŞTIRILMASI

Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK

Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Serap DÖKMECİ

ANKARA  
2021

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Diyabet Hastalarında Mineral Trioksit Agregat/ $1\alpha,25$ -Dihidroksivitamin D3  
Kombinasyonu ile Dental Pulpa Kök Hücrelerinde Odontojenik Farklılaşmanın  
Araştırılması**

**Öğrenci: Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK**

**Danışman: Prof. Dr. Serap DÖKMECİ**

**İkinci Danışman: -**

Bu tez çalışması 28.01.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Serap DÖKMECİ*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. Sema HAKKI*  
*(Selçuk Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. Abdullah Cevdet AKMAN*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. Didem DAYANGAÇ ERDEN*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

09 Şubat 2021

*Prof. Dr. Diclehan Orhan*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

17/02/2021

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI  
Emel Uzunoğlu Özyürek

<sup>i</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

*Emel UZUNOğLU ÖZYÜREK*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, özellikle bu yüksek lisans tezinin ortaya çıkmasındaki katkı ve emekleri için tez danışmanım ve değerli Hocam, Prof. Dr. Serap Dökmeci'ye,

Yüksek Lisans eğitimime başlamama ve öğrencilik yıllarıma geri dönmeme katkıda bulunan ve her konuda bana destek olan Hocam, Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu'na, Tez savunma sınavımda değerli katkılarını sunan jüri üyeleri Prof. Dr. Sema Hakkı, Prof. Dr. Didem Dayangaç Erden ve Prof. Dr. Abdullah Cevdet Akman'a

Hücre kültürü çalışmalarım ve tüm deneylerimde katkıları olan, sorularımı bıkmadan usanmadan yanıtlayan, her günümde benimle laboratuvarında olan, dış dünyadan dış dünyasına dalan arkadaşım Uzman Biyolog Gizem Önal'a,

Deneylerim sırasında desteklerini esirgemeyen, Laboratuvar hayatını güzelleştiren, sonuçlarımı yorumlamada katkıları olan arkadaşlarım Uzman Biyolog Tayfun Hilmi Akbaba, Uzman Biyolog Evrim Aksu Mengeş, Uzman Biyolog Dr. Gülsüm Kayman Kürekçi, Uzman Biyolog Hasan Basri Kılıç ve Uzman Biyolog Duygu Sevim'e,

Fikirleri ile bana yol gösteren Uzman Biyolog Dr. Şerife Buket Bozkurt'a,

Tezimdaki örneklerin çekimini gerçekleştiren ve tezime önemli katkıda bulunan arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Karaca'ya,

Tez dönemimde ve öncesinde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yolumun kesiştiği tüm akademik ve idari kadro çalışanlarına,

Yüksek Lisans eğitimimde ve de her dönemimde beni hep destekleyen ikinci ailem dediğim Endodonti Anabilim Dalı akademik ve idari kadrosuna,

Başarılarımla gururlanan, hayatımı anlamlandıran Canım Annem Gülten Uzunoğlu'na, aileme ve Canım Eşim Murat Özyürek'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Uzunoğlu Özyürek, E., Diyabet Hastalarında Mineral Trioksit Agregat/1 $\alpha$ ,25-Dihidroksivitamin D3 Kombinasyonu ile Dental Pulpa Kök Hücrelerinde Odontojenik Farklılaşmanın Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021.** Diyabet hastalarında yapılan dental tedavilerin uzun dönemde başarısızlıkla sonuçlandığı ve bu hastalarda daha fazla diş çekimi görüldüğü bilinmektedir. Mineralizasyon mekanizmasında önemli rolü olduğu bilinen ve diyabet hastalarında sıklıkla eksikliği bildirilen Vitamin D3'un rutin diş hekimliği tedavilerinde kullanılan mineral trioksit agregat (MTA) ile kombinasyonunun diyabet hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücreleri üzerindeki odonto/osteojenik farklılaştırma potansiyelini araştırmak hedeflenmiştir. Sigara içmeyen, insülin dışında ilaç kullanmayan üç Tip 1 diyabet hastasının ve üç kontrolün dental pulparından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin özgüllüğü CD34, CD45, Nanog Oct-4, CD73, CD90 ve CD106 belirteçleri kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilmiştir. Hücreler dört farklı besi yerine maruz bırakılmıştır: normal besi yeri (NB): DMEM, %10 FBS, antibiyotik ve antimikotik, Farklılaştırma besi yeri (FB): NB'ye  $\beta$ -gliserofosfat ve askorbik asit, FB+MTA: FB'ye 0,02mg/mL MTA ve FB+MTA+VitD3: FB+MTA besi yerine 10nM VitD3 ilavesini içermektedir. 14. günün sonunda hücrelerin odonto/osteojenik farklılaşma miktarları alizarin kırmızısı testi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*DSPP*, *DMP1*, *COL1 $\alpha$ 1*, *OCN*) ve immünfloresan (anti BSP II, anti DMP1, anti COL1 $\alpha$ 1) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin mezenkimal kök hücre karakteristiği CD73, CD90 ve CD106 ifadelerinin yüksek bulunması ile gösterilmiştir. Alizarin kırmızısı boyaması, odonto/osteojenik belirteçlerin ifadesi ve immünfloresan deneyleri kontrollerde daha fazla farklılaşma olduğunu göstermiştir ( $p<0,05$ ). Kontrollerde sadece MTA farklılaşmanın indüklenmesi için yeterli etkinin oluşmasını sağlarken, diyabet hastalarında bu etkinin oluşmasının sağlanması için besi yerine VitD3 ilave edilmelidir ( $p<0,05$ ). Çalışmanın sınırlamaları dahilinde diyabet hastalarının dental tedavilerinde MTA'nın VitD3 ile kombinasyonunun daha ileri deneyler ile çalışılması ve sistemik hastalıklar göz önünde bulundurularak dental tedavi prosedürlerinin oluşturulması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** 1 $\alpha$ ,25-Dihidroksivitamin D3, dental pulpa kök hücreleri, diyabet, mineral tiroksit agregat, odonto/osteojenik farklılaşma

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TSA-2019-17274).



## ABSTRACT

**Uzunoğlu Özyürek, E., Investigation of Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells of Diabetic Patients with Combination of Mineral Trioxide Aggregate/1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3, Hacettepe University, Graduate School Health Sciences Medical Biology Program Master Thesis, Ankara, 2021.** Dental treatments in diabetic patients have been reported to fail in the long term and these patients have more tooth extraction. It is aimed to investigate the odonto/osteogenic differentiation potential of the combination of Vitamin D3, which is known to play an important role in the mineralization mechanism and is frequently deficient in diabetic patients, with the mineral trioxide aggregate (MTA) used in routine dental treatments, on dental pulp stem cells of diabetic patients. The specificity of mesenchymal stem cells isolated from dental pulps of three non-smoking patients with Type 1 diabetes who did not use drugs other than insulin and three non-smoking controls was evaluated by real-time polymerase chain reaction using CD34, CD45, Nanog Oct-4, CD73, CD90 and CD106 markers. Cells were exposed to four different media: normal medium (NM): DMEM, 10% FBS, antibiotic and antimycotic, differentiation medium (DM): NM plus  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid, DM + MTA: DM plus 0.02mg/mL MTA and DM+ MTA + VitD3: FB plus MTA plus 10nM VitD3. At the end of the 14<sup>th</sup> day, the odonto/osteogenic differentiation amounts of the cells were evaluated by the alizarin red test, real-time polymerase chain reaction (*DSPP*, *DMP1*, *COL1 $\alpha$ 1*, *OCN*) and immunofluorescence (anti-BSP II, anti-DMP1, anti-COL1 $\alpha$ 1) methods. The mesenchymal stem cell characteristics of the cells were demonstrated by the presence of higher expressions of CD73, CD90 and CD106. Alizarin red staining, expression of odonto/osteogenic markers and immunofluorescence experiments showed that there was more differentiation in controls ( $p < 0.05$ ). In controls, while only MTA provides sufficient effect to induce differentiation, in diabetic patients VitD3 should be added to the medium in order to ensure this effect ( $p < 0.05$ ). Within the limitations of this study, it is recommended to study the combination of MTA with VitD3 in dental treatment of diabetic patients with further experiments and to establish dental treatment procedures considering systemic diseases.

**Key words:** 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3, dental pulp root cells, diabetes mellitus, mineral trioxide aggregate, odonto/osteogenic differentiation

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TSA-2019-17274).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Diyabet Hastalığı	4
2.1.1. Ağız-Diş Sağlığı ve Diyabet Hastalığı	5
2.2. Rejeneratif Diş Tedavileri	7
2.2.1. Dental Kaynaklı Kök Hücreler	10
2.2.2. Mineral Trioksit Agregat	16
2.3. D Vitamini	19
2.3.1. Diyabet Hastalığı ve Vitamin D3	20
2.3.2. Diş Mineralizasyonu ve Vitamin D3	21
2.4. Amaç	22
<b>3. YÖNTEM ve GEREÇ</b>	24
3.1. Belirlenen Bireylerden Dental Pulpanın Elde Edilmesi	24
3.2. Dental Pulpa Hücrelerinin Besi Yerinde Çoğaltılması	25
3.3. DeneYlerde Kullanılacak Primerlerin PZR ile Standardizasyonu	26
3.3.1. RNA İzolasyonu	26
3.3.2. cDNA Sentezi	27
3.3.3. Primerlerin Hazırlanması ve PZR	27
3.3.4. Agaroz Jelin Hazırlanması	29

3.4.	Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaştırılması	30
3.4.1.	Deksametazon İlavesi	30
3.4.2.	MTA Hazırlama Yöntemi	31
3.4.3.	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve MTA Konsantrasyonu	32
3.5.	Kalsiyum Odaklarının Tespiti	32
3.6.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi	34
3.7.	İmmü Floresan boyama	35
3.8.	Verilerin Analizi	36
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>37</b>
4.1.	Dental Pulpa Dokusunun Elde Edildiği Bireyler	37
4.2.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	38
4.3.	Farklılaştırma Besi Yerinin Oluşturulması	41
4.3.1.	Deksametazon İlavesinin Etkisi	42
4.3.2.	MTA Hazırlama Yönteminin Belirlenmesi	43
4.3.3.	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve MTA Konsantrasyonlarının Optimizasyonu	45
4.4.	Odonto/Osteojenik Farklılaşmanın İncelenmesi	48
4.4.1.	Kalsiyum Odaklarının Alizarin Kırmızısı ile Gösterilmesi	48
4.4.2.	Odonto/Osteojenik Farklılaşma Belirteçlerinin İfadesinin Analizleri	50
4.5.	Vitamin D Reseptörünün İfadesinin Analizi	57
4.6.	Farklılaşma Belirteçlerinin İmmü Floresan Analizi	59
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	<b>75</b>
6.1.	Sonuçlar	75
6.2.	Öneriler	76
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>EKLER</b>	
EK-1:	Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2:	Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3:	Tez Çalışması Dijital Makbuz	

EK-4: Tezde Yer Alan Grafiklerdeki Alizarin Kırmızısı Absorbansının ve RNA İfadesinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

EK-5: *OCN*, *COL1 $\alpha$ 1*, *DMP 1*, *DSPP* Genlerine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri

EK-6: Çalışmada yer alan genlerin gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda elde edilen ortalama Ct değerleri

EK-7: Çalışmaya dişi dahil edilen bir hastanın kan değerleri ve panoramik filmi

## **9.ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER ve KISALTMALAR

-	Eksi
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
+	Artı
<b>1<math>\alpha</math>,25(OH)<sub>2</sub>D3</b>	1 $\alpha$ ,25-dihidroksivitamin D3
<b>25(OH)D3</b>	25-hidroksivitamin D3
<b>7-DHC</b>	7-Dehidrokolesterol
<b>AA</b>	Askorbik asit
<b>AB</b>	Antibiyotik
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ALP</b>	Alkalen fosfataz
<b>AmfB</b>	Amfoterisin B
<b>APKH</b>	Apikal papilla kök hücreleri
<b>BGLAP (OCN)</b>	Kemik gamma karboksiglutamik asit proteini (Osteoklasin)
<b>BMP</b>	Kemik morfojenetik protein
<b>bp</b>	Baz çifti ( <i>base pair</i> )
<b>BSP</b>	Kemik sialo-protein (Bone sialoprotein)
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>CaSR</b>	Kalsiyum-algılayıcı reseptör
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	Komplementer deoksiribo nükleik asit
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetrekare
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>COL1<math>\alpha</math>1</b>	Alfa-1 Tip 1 Kolajen
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DBY</b>	Deney besi yerleri
<b>DFH</b>	Deri fibroblast hücresi
<b>DFKH</b>	Dental Folikül Kök Hücreleri
<b>DGPH</b>	Diş germi progenitör hücreleri
<b>dk</b>	Dakika
<b>dL</b>	Desilitre
<b>DM</b>	Diyabet hastalığı, diabetes mellitus
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMP1-DMAPP</b>	Dentin matriks proteini 1, Dentin matriks asidikfosfoprotein
<b>dNTP</b>	Dinükleotittrifosfatlar
<b>DPKH</b>	Dental pulpa kök hücreleri
<b>DSPP</b>	Dentin sialo-fosfoprotein
<b>ECM</b>	Hücre dışı matriks
<b>ERK</b>	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (Extracellular signal-regulated kinases)
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FB</b>	Farklılaştırma besi yeri
<b>FBS</b>	Fetal sığır serumu

<b>G</b>	Guanin
<b>GZ-PZR</b>	Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Hb</b>	Hemoglobin
<b>IDF</b>	Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>ISCT</b>	<i>International Society of Cellular Therapy</i>
<b>K</b>	Kontrol
<b>KH</b>	Kök hücre
<b>Klf4</b>	Kruppel-like factor 4
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum diklorür
<b>MKH</b>	Mezenkimal kök hücreler
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mRNA</b>	Mesajcı ribonükleik asit
<b>MTA</b>	Mineral trioksit agregat
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
<b>NB</b>	Normal besi yeri
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NT5E</b>	5'-Nucleotidase Ecto
<b>OCN</b>	Osteokalsin
<b>Oct 4 (POU5F1)</b>	Oktamer-Bağlayıcı Protein 4
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>P</b>	Fosfor
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>PDLKH</b>	Periodontal Ligament Kök Hücreleri
<b>PenStrep</b>	Penisilin-Streptomisin
<b>pH</b>	<i>Power of Hydrogen</i>
<b>PTPRC</b>	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RANKL</b>	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>rpm</b>	Dakikada devir hızı
<b>RT</b>	Ters (reverse) transkriptaz
<b>SDKH</b>	Süt dişi kök hücreleri
<b>sn</b>	Saniye
<b>Sox2</b>	SRY-Box transkripsiyon faktörü 2
<b>T1DM</b>	Tip 1 diyabet hastalığı

<b>T2DM</b>	Tip 2 diyabet hastalığı
<b>TAE</b>	Tris Asetik Asit
<b>TGF</b>	Transforme edici büyüme faktörü
<b>Thy-1</b>	<i>THYmocyte differentiation antigen 1</i>
<b>U</b>	Ünite
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VDR</b>	Vitamin D Reseptörü
<b>VCAM</b>	Vasküler hücre adezyon molekülü
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VitD2</b>	Ergokalsiferol
<b>VitD3</b>	Kolekalsiferol
<b><math>\beta</math>-GP</b>	$\beta$ -gliserofosfat
<b><math>\beta</math></b>	beta
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	Mikrometre

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Diş kaynaklı kök hücreler (5): (DPKH: dental pulpa kök hücreleri, SDKH: süt diş pulpası kök hücreleri, PDLKH: periodontal ligament kök hücreleri, APKH: apikal papilla kök hücreleri, DFKH: dental folikül kök hücreleri, DGPH: diş germi progenitör hücreleri).	13
3.1. Çekilmiş dişlerin üzerindeki artık dokuların uzaklaştırılmasını takiben steril aletler ile sert dokunun kesilmesi ve pulpa dokusunun elde edilmesi.	25
3.2. Dental pulpa kök hücrelerinin 7. ve 14. günlerdeki ışık mikroskobu görüntüsü.	26
3.3. Dekametazon ilavesi deneyi için planlanan 12 kuyucuklu plakanın şematik çizimi.	31
3.4. Farklı yöntemlerle hazırlanan MTA karışımı.	32
3.5. Kontrollerden (K) ve DM hastalarından edilen dental pulpa kök hücrelerinin farklı farklılaştırma besi yerlerine maruz kaldığını gösteren 24 kuyucuklu plakanın şematik çizimi.	33
3.6. Kuyucuklara kontrollerden (K) ya da DM hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin ekimi.	34
4.1. Işık mikroskobu altında deri fibroblast hücreleri (A) ve dental pulpa kök hücrelerinin (B) görünümü.	39
4.2. CD106 genine ait cDNA amplifikasyonunun agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü.	39
4.3. Dental pulpa dokusundan izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliği taşıdığını göstermek için kullanılan genlerin cDNA amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü.	40
4.4. Kontrollerden (A) ve hastalardan (B) elde edilen dental pulpa kök hücreleri ile yapılan gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda oluşan göreceli kat değişimleri.	.41
4.5. Kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin farklılaştırma ajanları ilave edilmeyen normal besi yerine (A: NB), deksametazon ilave edilmeyen farklılaştırma besi yerine (B: FB/-DEX), deksametazon ilave edilen farklılaştırma besi yerine (C: FB/+DEX) maruz kalması sonucu alizarin kırmızısı boyaması görüntüsü.	42
4.6. Dekametazonun Farklılaşmaya Etkisi.	.43
4.7. MTA'nın Farklılaşmaya Etkisi I.	44
4.8. MTA'nın Farklılaşmaya Etkisi II.	.45



<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>4.9.</b> MTT testi sonucu.	47
<b>4.10.</b> Kontrol (A, B, C, D: 1-3) ve Tip 1 diyabet hastalarından (A, B, C, D: 4-6) elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin 14. gündeki alizarin kırmızısı muamelesi sonrasındaki görüntüleri.	48
<b>4.11.</b> MTA ve 1A,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> kombinasyonu ile farklılaştırılan kontrol hücrelerindeki kalsiyum odakları.	49
<b>4.12.</b> Alizarin kırmızısının 405nm'de spektrofotometrik olarak kuantifiye edilmesi sonucu elde edilen absorpsiyon değerleri.	49
<b>4.13.</b> Kontrollerde (K) ve Tip 1 diyabet hastalarındaki (DM) OCN ve COL1α1 genlerindeki ifade değişimi.	51
<b>4.14.</b> Kontrollerde (K) ve Tip 1 diyabet hastalarındaki (DM) DMP1 ve DSPP genlerindeki ifade değişimi.	52
<b>4.15.</b> Kontrollerden (K) ve Tip 1 diyabet hastalarından (DM) elde edilen hücrelerdeki OCN ve COL1α1 ifadesi üzerinde besi yerlerinin etkisi.	54
<b>4.16.</b> Kontrollerden (K) ve Tip 1 diyabet hastalarından (DM) elde edilen hücrelerdeki DMP1 ve DSPP ifadesi üzerinde besi yerlerinin etkisi.	55
<b>4.17.</b> VDR genine ait cDNA amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü.	57
<b>4.18.</b> Kontrol ve Tip 1 diyabet gruplarındaki VDR geni ifadesindeki göreceli kat değişimi.	58
<b>4.19.</b> BSP II proteininin immünofloresan boyama ile görüntülenmesi.	60
<b>4.20.</b> COL1α1 proteininin immünofloresan boyama ile görüntülenmesi.	61
<b>4.21.</b> DMP1 proteininin immünofloresan boyama ile görüntülenmesi.	62
<b>4.22.</b> BSP II proteininin immünofloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları.	63
<b>4.23.</b> COL1α1 proteininin immünofloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları.	64
<b>4.24.</b> DMP1 proteininin immünofloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları.	64

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b> Deney için kullanılan primerlerin dizileri ve uzunlukları.	28
<b>4.1.</b> Pulpa dokularının elde edildiği hastaların demografik verileri.	37
<b>4.2.</b> Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar tayini sonuçları.	38
<b>4.3.</b> MTT testinde kullanılan besi yerleri.	46
<b>4.4.</b> Çalışmada kullanılan besi yerleri ve içerikleri.	48

## 1. GİRİŞ

Ağız ve diş sağlığı, yaşam kalitesini doğrudan etkileyen önemli faktörlerdendir. Ağız-diş sağlığı ve genel sağlık arasında iki yönlü bir etkileşim olduğu bilinmektedir. Ağız içi boşluğunda komplikasyonlara neden olan pek çok sistemik hastalık, bireyin yaşam kalitesini genel ve ağız-diş sağlıklarını olumsuz yönde etkileyerek azaltmaktadır (1). Bu hastalıklardan biri olup insülin hormon salınımının ve/veya etkisinin mutlak ya da göreceli azlığı ile ortaya çıkan diyabet, akut (diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperozmalar koma gibi) ve kronik (makrovasküler ve mikrovasküler) komplikasyonları ile yaşam kalitesini düşürmekte, hastalanma ve erken ölüm oranlarının artmasına neden olmaktadır. Tip 1 diyabet kalıtsal olup pankreastaki  $\beta$ - hücrelerinin işlevini kaybetmesi ve sonunda vücutta hiç insülin kalmamasıyla ortaya çıkan diyabet olup, Tip 2 diyabet toplumda daha yaygın olan, insülin salınım bozukluğu ile insülin direncinin bir arada izlendiği diyabet grubudur (2). Diyabet hastalarında yüksek kan şekereinden dolayı damarların oksijen taşıma ve atıkları uzaklaştırma kapasitesi azalır. Bu dokuların beslenmesini olumsuz yönde etkiler ve sonuç olarak dokular enfeksiyona daha yatkın hale gelir. Bu duruma ek olarak glikoz oranı daha yüksek olan ortamlar bazı bakterilerin üremesini kolaylaştırır. Bahsedilen nedenlerden dolayı enfeksiyona karşı direnci azalan diyabet hastalarının tükürüğünün daha fazla glikoz içermesi onları diş ve dişeti hastalıkları için daha riskli hale getirir (3). Kontrol altında olmayan diyabet hastalarında diş çürüklerine daha sık rastlanır. Bilindiği gibi enfeksiyonun varlığı da kan şekerini yükselten bir durumdur (4). Bu nedenle diş ve diş eti enfeksiyonları engellenemediğinde diyabet hastalarında enfeksiyonu lokalize etmek daha güç hale gelir. Ketoasidoz ve sepsise kadar giden durumlarla karşılaşılabilir. Ağız ve diş sağlığının korunması için diyabet hastasının metabolik kontrolünün çok iyi olması, düzenli aralıklarla ağız-diş sağlığı kontrollerini yaptırması gereklidir. Ancak diyabetin dental tedavilerin başarısını olumsuz etkilediği de bildirilmiştir (3).

Rejeneratif dental tedaviler dişin canlılığını koruyarak fonksiyonda kalmasını sağlayan tedaviler olup, diş kaynaklı kök hücreler bu tedavilerde önemli rol oynamaktadırlar (5). Derin çürüklerin uzaklaştırılması sırasında pulpa odasının açığa

çıkması durumunda uygulanan direkt pulpa kaplaması tedavilerinin başarısı için tedavide kullanılan trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum aluminat ve tetrakalsiyum aluminoferrit içeren Mineral Trioksit Agregat'ın (MTA) (6) dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşarak tamir dentini yapımını uyarması gerektiği bilinmektedir (7). Glisemik düzeyleri kontrol altında olmayan diyabet hastalarında dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin odontojenik farklılaşma kapasitesinin olumsuz etkilendiği gösterilmiştir (8). Diyabetteki yüksek seviyedeki glikoz varlığı MTA'nın rejenerasyon kapasitesini olumsuz yönde etkileyerek dentin köprüsü oluşumunu engellemektedir (9). Diyabet varlığının MTA'nın tamir kapasitesi üzerindeki etkilerine dair yapılan hayvan çalışmalarında araştırmacılar birbirinden farklı sonuçlar bildirmişlerdir (9-11). Ancak çiğneme ve konuşmada görev alan dişlerin mümkün olduğunca korunması ve mevcut enfeksiyonun önlenmesi diyabet hastalarının hem yaşam kalitesini hem de genel sağlık durumunu olumlu etkileyecektir.

Diyabet hastalarında Vitamin D eksikliği görüldüğü de bilinmektedir (12). Vitamin D'nin aktif formu olan  $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D3 ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), kemik metabolizmasının düzenlenmesinde ve sert dokuların mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır (13, 14).  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tek başına hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz (ERK) (15) aktivasyonunu modüle ederek insan dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasına yol açtığı gösterilmiştir (16). İnsan dental pulpa kök hücrelerinin MTA kaynaklı odontojenik farklılaşmasının da ERK aktivasyonu ile olduğu belirtilmiştir (17).

Literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda MTA/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kombinasyonunun diyabet hastalarından elde edilecek olan dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını etkili bir şekilde indükleyeceği öngörülmüştür. Bu amaçla diyabet hastalarından elde edilmiş olan dental pulpa kök hücrelerinin MTA ve MTA/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kombinasyonuna maruz kalmaları sonucundaki farklılaşma kapasiteleri 18 yaş üstü bilinen herhangi bir sağlık problemi olmayan, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, son 2 haftada antibiyotik kullanmayan

sağlıklı bireylerden elde edilmiş olan dental pulpa kök hücrelerinin proliferasyon ve odontojenik farklılaşma kapasiteleri;

- Kök hücrelerin MTA ve MTA/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kombinasyonu ile odontojenik olarak farklılaştırılması,
- Alizarin kırmızısı ile odontojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan kalsiyum odaklarının boyanması,
- Odontojenik olarak farklılaşan hücrelerin immünfloresan yöntemi ile karakterize edilmesi,
- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile kök hücre ve odonto/osteojenik gen belirteçlerinin ifadesi ile değerlendirilmiştir.

İfade değişimlerdeki anlamlı farklar bize rejeneratif tedavilerde kullanılan MTA'nın Vitamin D ile kombine edildiğinde dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşma kapasitesini nasıl etkilediğini *in vitro* olarak göstererek sistemik bir hastalık varlığında daha spesifik tedavi yaklaşımlarının başarı şansı hakkında ön veri sağlamıştır. Aynı zamanda diyabet hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücrelerine uygulanan rejeneratif tedavi materyallerinin başarısı, diğer metabolik/sistemik hastalık tanısı alan bireylerdeki uygulanabilirlik için bir model oluşturmuş ve diyabet hastalarının hem sistemik hem de ağız sağlığı göz önünde bulundurularak uygun, yararlı ve ekonomik diş tedavilerinin oluşturulması için fikir edinilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diyabet Hastalığı

İnsülinin mutlak ya da göreceli eksikliği veya insüline direnç ile gelişen hiperglisemi ile kendini belli eden karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarındaki bozukluklar ile seyreden kompleks hastalığa diyabet hastalığı (*diabetes mellitus*, DM) denir (4). Vücutta üç temel besin maddesinden (protein, yağ, karbonhidrat) sentezlenmesine rağmen en fazla karbonhidratlardan elde edilen glikoz, canlı hücreler için temel enerji kaynağıdır. Normal fizyolojik işlevler için glikoz metabolizması kritik bir öneme sahiptir ve insülin yardımı olmadan çoğu hücre glikozu kullanamaz. İnsülin; karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını düzenler, normal kan glikoz seviyelerini hücresel glikoz alımını hızlandırarak korur ve mitojenik etkileriyle hücre bölünmesini ve büyümeyi teşvik eder (18). DM, pankreastaki *Langerhans* adacıklarındaki  $\beta$ -hücreleri tarafından salgılanan insülin hormonunun mutlak veya göreceli yetersizliği, etkisizliği ya da hormonun moleküler yapısındaki bozukluklar sonucunda ortaya çıkan etiyolojisi, genetik ve klinik tablosu ile heterojen özellik gösteren bir sendromdur. Sık ve yaygın bir şekilde gözlenen diyabet, sanayileşmenin başında olan ülkeler için epidemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir, ayrıca gelişmiş pek çok Batı toplumundaki önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak dikkat çekmektedir (2).

Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) (19) güncel verilerine göre dünyada 11 kişiden 1'i diyabet olup (425 milyon), global sağlık harcamalarının %12'si diyabet hastalarının tedavisi için kullanılmaktadır. IDF verilerine göre bilinmeyen diyabet olguları da %50 civarındadır.

Hastalığın etyolojisi göz önünde bulundurularak Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association) tarafından oluşturulan sınıflamaya göre diyabet hastalığını, Tip 1 DM (tam insülin eksikliği/ T1DM), Tip 2 DM (insülin direnci ya da insülin duyarlılığında azalma/T2DM), gestasyonel DM (gebeliğin 2. ya da 3.

döneminde ortaya çıkan DM) ve diğer spesifik tipler olmak üzere dört ana başlık altında toplamak mümkündür (20).

Diyabet en yaygın olarak Tip 1 ya da Tip 2 diyabet şeklinde izlenir. Pankreastaki  $\beta$ -hücrelerinin yıkımına bağlı olarak T1DM'de insülin salınımı azalır. T1DM'li hastalarda insülin salgısı azalmakta ve bununla birlikte oluşan hiperglisemi glukagon salınımı ile baskılanamamaktadır. Sonuç olarak, T1DM hastalarında bir takım metabolik bozukluklar ortaya çıkar (21). Dünyada en sık rastlanan diyabet tipi olan T2DM, insülin salınımının göreceli azlığı ya da insülin etkisizliği ile kendini gösterir ve diyabet olgularının %90'ını oluşturur (19). Çevresel, davranışsal, genetik, kültürel ve sosyoekonomik etkenlerin epidemiyeye ilave edilmesi özellikle T2DM prevalansında artmaya neden olmuştur (22). T2DM kısa sürede gelişen metabolik komplikasyonlara ve kronik seyretmesi ile ortaya çıkan makrovasküler (koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı, serebrovasküler hastalık) ve mikrovasküler komplikasyonlara (nefropati, retinopati) neden olmaktadır (3, 23). T2DM'de şikayetler genellikle 45 yaş civarında başlar, çoğunlukla tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar oluşmuştur (2).

### **2.1.1. Ağız-Diş Sağlığı ve Diyabet Hastalığı**

DM sistemik inflamasyon, insülin direnci ve periodontal yıkım ile kendini gösteren bir hastalık olup, DM hastaları da diş hekimlerinin en sık karşılaştığı 3. hasta grubudur. IDF verilerine göre Türkiye'de 2017 yılında 20-79 yaş arası bireylerde diyabet prevalansı %12,79 olup bu oranın 2045'te %16,49 olması beklenmektedir (19). DM ilişkili en yaygın ağız sağlığı problemleri; periodontal hastalık, diş çürüğü, tükürük bezi disfonksiyonu, mantar enfeksiyonları, oral liken planus ve likenoid reaksiyonlar (inflamatuvar cilt hastalığı), enfeksiyon ve gecikmiş yara iyileşmesi, tat bozukluğu, yanan ağız sendromu, premalign lezyonlar ve malignitedir (24). Kandaki glikoz seviyesinin yanı sıra tükürükteki glikoz seviyesinin de yüksek olması diyabet hastalarında ağız ve diş sağlığını olumsuz olarak etkileyen ve diş çürüklerinin daha sık görülmesine yol açan bir durumdur (25, 26).

Diş çürüğü diyetle alınan karbonhidratların (sükroz, glukoz, laktoz, fruktoz) ağızdaki karyojenik bakteriler (çürük yapıcı) tarafından fermante edilmesi sonucu ortaya çıkan asidin dişin sert dokuları olan mine, dentin ve sementte zamanla oluşturduğu yıkımdır (27). Dişlerin ve kemiklerin mineral yapısını oluşturduğu bilinen hidroksiapatit kristalleri asit ataklarında kolayca çözülür. Diyabet hastalarında yüksek kan şekerinden dolayı damarların oksijen taşıma ve atıkları uzaklaştırma kapasitesi azalır. Bu dokuların beslenmesini olumsuz yönde etkiler ve sonuç olarak dokular enfeksiyona daha yatkın hale gelir. Bu duruma ek olarak glikoz oranı daha yüksek olan ortamlar bazı bakterilerin üremesini kolaylaştırır (28). Yapılan bir araştırmaya göre, özellikle *mutans streptokok* gibi karyojenik bakterilerin seviyelerinin diyabet hastalarında daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (29). Sonuç olarak DM'li hastalarda diş çürüğüne daha sık rastlanır.

Periodontitis prevalansının ve şiddetinin değerlendirildiği çalışmalarda DM'li hastalarda diyabeti olmayan kişilere göre daha yüksek periodontitis prevalansı olduğu gösterilmiştir. Zayıf glisemik kontrollü diyabet hastalarında periodontitis görülme riski yaklaşık üç kat artar (30). Literatürde 1960'lı yıllardan bu yana DM ve periodontal hastalık arasında bir ilişki olduğu ve periodontal hastalığın diyabetin altıncı komplikasyonu olarak kabul edildiği bildirilmiştir (31, 32). Diğer taraftan mevcut diş eti enfeksiyonunun da kan şekerini yükselttiği bilinmektedir (33). Diyabet hastalarında diş ve diş eti enfeksiyonları engellenemediğinde enfeksiyon odağını tespit etmek zorlaşır. Ketoasidoz ve sepsise kadar giden ciddi tablolarla karşılaşılabilir. Hastanın ağızında kötü koku ve ağrının yanı sıra diş kaybı nedeniyle çiğneme problemleri ve buna bağlı gastrointestinal şikayetler de ortaya çıkabilir. Yapılan çalışmalarda diyabet hastalarının ağız ve diş sağlığı problemlerinden dolayı beslenmelerinden memnun olmadıkları ve diyabet hastalarında ağız ve diş sağlığının yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilediği ifade edilmiştir (34, 35).

Epidemiyolojik çalışmalar diyabet hastalarında pulpal ve periapikal hastalıkların prevalansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir (36), diğer taraftan diyabet hastalarında ilgili dişin kök kanal tedavisini takiben daha yüksek bir oranla çekime gittiği bulunmuştur (37). Diyabetik pulpada kan akımının azaldığı (38) ve



kalsifikasyonların arttığı gözlenmiştir (39). Histolojik araştırmalarda kan damarlarının bazal membranında kalınlaşma, intraselüler maddede kolajen seviyesinde azalma, kronik inflamasyon bulguları ve anjiyopati gösterilmiştir (40). Diğer taraftan yüksek glukoz seviyelerinin dental kaynaklı kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını inhibe ettiği de bildirilmiştir (8). İnsan dental pulpa kök hücrelerinin proliferasyonunu ve odontoblastlara benzer hücrelere farklılaşmasını indüklediği pek çok kez gösterilen mineral trioksit agregat (MTA) (6) rejeneratif dental tedavilerde en sık kullanılan materyallerdendir. MTA ile doğrudan temas eden dental pulpa kök hücrelerinde odontojenik farklılaşma ile kalsiyum odaklarının oluştuğunu, alkalen fosfotaz (*ALP*) aktivitesinin ve dentinsialofosfoprotein (*DSPP*), kemik sialoprotein (*BSP*) ve osteokalsin (*OCN*) transkriptlerinin arttığı gösterilmiştir (41, 42); ancak diyabetin simüle edildiği fare modellerinde oluşturulan pulpa ekspozunun MTA ile tamirinin başarısı hakkında farklı sonuçlar bildirilmiştir (9, 10, 43-45). Diyabetik farelerde pulpa hasarını takiben ile yapılan pulpa kaplamasında sağlıklı kontrol farelerine göre tamirin geciktiği (6) ve dentin köprüsünün oluşmadığı belirtilmiştir (9). Diyabetik pulpada inflamatuvar enzim ve mediyatörlerin, oksidatif stres parametrelerinin sağlıklı pulpaya göre daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu histolojik çalışmalarla gösterilmiştir (46, 47). Diyabetik pulpada vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve kemik mofogenetik proteinleri (BMP-2) seviyelerinde anlamlı değişiklikler oluştuğu ve VEGF'nin pulpanın mikro-dolaşımında önemli rol oynadığı bulunmuştur (48). Bu bilgiler ışığında, diyabet hastalığının dental tedaviler üzerinde etkileri olduğu açıkça görülmektedir.

## 2.2. Rejeneratif Diş Tedavileri

Ağız hastalıkları pek çok ülke için büyük bir sağlık yükü oluşturmakta ve 2017 yılında yaklaşık 3,5 milyar insanın başta diş çürükleri olmak üzere dental travma, diş eti hastalıkları gibi farklı ağız hastalıklarından etkilendiği ön görülmektedir (49). Ağız hastalıklarından etkilenen insanlarda ağrı, rahatsızlık, yüzde asimetri, çiğneme fonksiyonunda kayıp, estetik kaygılar gibi farklı belirtiler ortaya çıkmaktadır. Ağız hastalıklarının tedavisi pahalı olup, genellikle ülkelerin çoğunda tedaviler sigorta

kapsamında değildir. Yüksek gelirli çoğu ülkede diş hekimliği harcamaları toplam sağlık harcamalarının %5'ini ve sigorta dışı harcamaların da %20'sini oluşturmaktadır. Düşük ve orta gelirli ülkelerin çoğu ise ağız sağlığını korumada ve iyileştirmede yetersiz kalmaktadır. En sık görülen ağız hastalığı olan diş çürüğü, diş yüzeyindeki şekerli gıda artıklarının bakteriler tarafından fermente edilmesiyle ortaya çıkan asidik ürünlerin mine ve dentini demineralize etmesi ile ortaya çıkmaktadır.

Dentin dişin en hacimli kısmını oluşturur ve yaklaşık olarak %70'i inorganik madde, %20'si organik maddeler ve %10'u sudan oluşmaktadır (50). Organik kısmını kolajen ve kolajen olmayan proteinler oluştururken; inorganik kısmını hidroksiapatit kristalleri  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  oluşturur. Dentin primer, sekonder ve tersiyer dentin olarak sınıflandırılabilir. Primer dentin diş fonksiyona gelene dek oluşur, sekonder dentin kökün tamamlanmasından sonra oluşmaya başlar ve pulpa sağlığını korudukça yapımı ömür boyu devam eder. Tersiyer dentin, reaksiyoner ve reperatif olarak ikiye ayrılır, harici bir uyarana, çürük veya aşınmaya yanıt olarak oluşur. Reaksiyoner alt tip önceden var olan odontoblastlar tarafından oluşturulurken, reperatif dentin farklılaşmamış dental pulpa kök hücreleri tarafından oluşturulur (50). Dişin biyolojik olarak onarılması veya yeniden oluşturulmasına yönelik diş hekimliği alanını tanımlamak için de rejeneratif diş hekimliği '*regenerative dentistry*' (51, 52) terimi kullanılmaktadır. Rejeneratif diş hekimliği çalışmalarının hedefi; çeşitli diş dokularının rejenerasyonu, konjenital anomalilerin tedavisi ve kraniyofasiyal rejenerasyon gibi alanlardır. Temel biyoloji ve diş hekimliği bilimini birleştirerek, diş hekimliği pratiğine doku rejenerasyonunu bir tedavi seçeneği olarak sunacak olan dental pulpa kök hücre çalışmaları, özellikle dentin, pulpa, sement, periodontal ligament gibi diş dokularının oluşturulması ve bu sayede hasarlı dokunun rejenerasyonunu hedef almaktadır. Dental pulpa, fibroblast, odontoblastlar ve hücre dışı matriks (ECM) ile temas eden farklılaşmamış mezankimal hücreler de olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşur (53). Odontoblastlar ve farklılaşmamış kök hücreler dentin oluşumundan ve ECM proteinlerinin salgılanmasından sorumludur. Derin çürük varlığında tekrar dentin oluşumu indüklenerek pulpa dokusunun korunması ve dişin canlılığının sürdürülmesi gerekmektedir. Diş hekimliği pratiğinde; pulpal enfeksiyon veya hasar durumunda

pulpa dokusu uzaklaştırılmakta ve kök kanal boşluğu ve kaybedilen diş dokusu çeşitli dolgu maddeleri ile restore edilmeye çalışılmaktadır. Dental pulpa kök hücrelerinin dentin-pulpa kompleksi oluşturabilme potansiyeli bu kapsamda endodontik ve restoratif prosedürlere alternatif olarak rejenerasyonun mümkün olabileceğini düşündürmektedir (54, 55). Benzer şekilde periodontal ligament-sement kompleksinin oluşturulabilme potansiyeli de diş çevre dokularının rejenerasyonunu sağlayacaktır (56).

Dental pulpa kök hücreleri çürüklerin uzaklaştırılması sonrasında vital pulpa tedavilerinde dentin oluşumunda rol oynarken, apikal papilla hücreleri de travmatik yaralanmalar sonrasında yapılan rejeneratif tedavilerde mineralizasyonda rol oynamaktadır (57, 58). Dental pulpa kök hücrelerinin ALP (ECM mineralizasyonu başlatmak için gereklidir, yüksek  $Ca^{+2}$  ve P iyonu varlığında inhibe olur), Tip 1 kolajen- $\alpha 1$  (COL1 $\alpha 1$ ), osteopontin (OPN) ve OCN gibi osteoblastik belirteçleri eksprese edebildikleri ve mineralize matris üreten osteoblast-benzeri hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (59). Apikal papilla kök ucunda bulunur ve kökün gelişiminden sorumludur. Apikal papilladaki kök hücrelerin, dental pulpa kök hücrelerine göre daha üstün proliferasyon ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri olduğu bildirilmiştir (60, 61). Rejeneratif endodontik tedavi sırasında öncelikle kök kanalı sodyum hipoklorit, etilen diamin tetraasetik asit, kalsiyum hidroksit, üçlü antibiyotik patı gibi farklı kimyasallar ile dezenfekte edilir (62), devamında kanal ağzında görülebilen bir kanama odağının oluşturulması hedeflenir. Böylece enfekte periapikal alanda canlılığını koruyabilen apikal papilla hücrelerinin ya da enfekte periapikal alanda da olduğu gösterilen farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerin kök kanalına ilerlemesi sağlanır (63). Kanama odağının üzerine de 3-4 mm kalınlığında MTA ya da alternatif trikasiyum silikat materyaller konması önerilir. Kompozit dolgular ile daimî restorasyonu tamamlanan dişin kontrol randevularında kök ucundaki iyileşme ve kökün gelişimi takip edilir. Klinik çalışmalar rejeneratif tedavilerin, periapikal bölgedeki iyileşmeyi büyük çoğunlukla sağladığını bildirmişlerdir (64, 65); ancak kök gelişiminin devamı hakkında çelişkili sonuçlar mevcuttur. Kök gelişiminin %100 arttığını (66) bildiren çalışma olduğu gibi sadece

%20'lik (64) bir artış olduğunu bildiren çalışma da vardır. Çalışmalar, kök kanalında kalan mikroorganizmaların (67) ya da tedavi sırasında oluşturulan pıhtının doku rejenerasyonun ilerlemesini destekleyecek stabiliteye sahip olmamasının (68) kök gelişimine engel olabileceğini göstermişlerdir. Histolojik incelemeler oluşan dokunun dentinden ziyade kemik/segment benzeri yapıda olduğunu bildirmektedir (69). Diğer yandan vital pulpa tedavilerinde başarı oranı ve dentin benzeri sert doku oluşumu daha yüksektir (70). Vital ve devital endodontik tedaviler arasındaki bu farklılıklar kök hücre farklılıklardan kaynaklanabilmektedir.

### 2.2.1. Dental Kaynaklı Kök Hücreler

Canlı vücudunda kendini yenileyen, uzun süre bölünebilen, aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücrelere "kök hücre" denmektedir (71, 72). Kök hücreler, bütün çok hücreli organizmalarda bulunan ve doku rejenerasyonunun sağlanmasında önemli rolü olan özel yapılardır. En temel özellikleri; kendilerini yenileyebilme ve özelleşmiş hücrelere farklılaşırken bile kök hücre yapısını sürdürebilmeleridir (5).

Kök hücreleri laboratuvar çalışmalarında tanımlamak için kullanılan kriterler:

- 1) **Hücre yüzey belirteçleri:** Farklılaşma kümeleri ya da *Clusters of Differentiation* (CD) belirteçleri çoğunlukla kök hücrelerine özgün olarak bulunur.
- 2) **Belirli Enzimlerin Aktiviteleri:** ALP ve telomeraz gibi bazı enzimler kök hücrelerde normal hücrelerden daha fazla miktarlarda sentezlenmektedir.
- 3) **Gelişimsel süreçte önemli olan transkripsiyon faktörleri:** Kök hücreler devamlı çoğalabilme potansiyellerini koruyabilmek amacıyla bazı transkripsiyon faktörlerini daha fazla eksprese ederler.
- 4) **Farklılaşma Potansiyeli:** Kök hücrelerin *in vitro* ortamda uyarılarak farklı hücre tiplerine dönüşebildiklerinin tespit edilmesi gerekmektedir (73-75).

Kök hücreler; vücudun ana hücreleridir, uterustaki embriyonun gelişiminden erişkin çağa gelene kadar bir canlının oluşumundan sorumludurlar. Aynı zamanda vücudun sağlıklı tutulması ve yara iyileşmesinden de sorumludurlar. Farklı tip kök

hücreler, farklı görevlere sahiptirler. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (76):

**Totipotent kök hücreler**, yumurta ve sperm hücresinin kaynaşmasıyla ortaya çıkar. Döllenen yumurta hücresinin ilk birkaç bölünmesiyle oluşan hücreler totipotent hücrelerdir. Embriyonik hücre tiplerine dönüşebilirler.

**Pluripotent kök hücreler**, totipotent hücrelerin devamı şeklindedir. Mezodermal, ektodermal ve endodermal germ tabakalarından türeyen hücre tiplerine farklılaşabilirler.

**Multipotent kök hücreler**, sadece alındıkları doku tipiyle ilişkili belli sayıda hücrelere dönüşebilirler.

**Oligopotent kök hücreler**, lenfoid ve myeloid kök hücreler gibi az sayıda hücre grubuna dönüşebilirler.

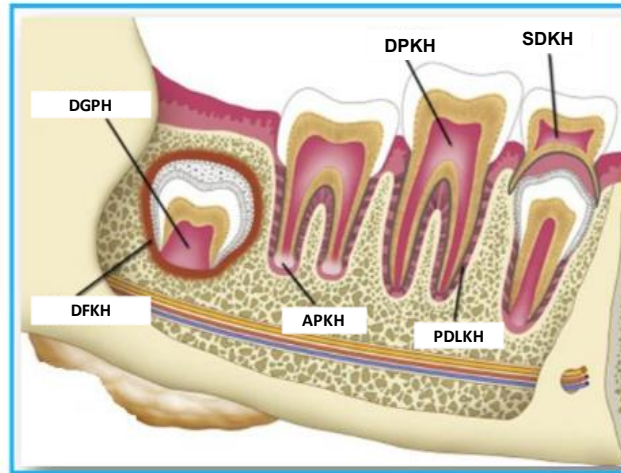
**Unipotent kök hücreler**, sadece tek hücre tipini kendileri oluşturabilirler.

Elde edildikleri gelişim dönemine göre ise kök hücreler embriyonik ve erişkin kök hücreler olarak sınıflandırılabilir. Embriyonik kök hücrelerdeki teratom (germ tümörü) oluşma riski, immünolojik sorunlar ve etik tartışmalar nedeniyle araştırmacılar son dönemde yetişkin kök hücreleri üzerinde yoğunlaşmaktadır (77). Doğum sonrası dönemde izole edilen yetişkin kök hücreleri, multipotent özellikte olup, buldukları doku ve/veya organın tamirini ve devamlılığını sağlarlar. Bir organ veya dokuda farklılaşmış hücrelerin arasında farklılaşmamış olarak bulunurlar. Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliklerini korurlar. Erişkin kök hücrelerin esas görevleri buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (78, 79). Erişkin kök hücre çalışmalarında mezenkimal kök hücreler (MKH) öne çıkmıştır. ISCT (*International Society of Cellular Therapy*) tarafından MKH *in vitro* kültür koşullarında tanımlanmasına yönelik üç ölçüt belirlenmiştir (80, 81):

- Plastik yüzeye yapışması: Standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır.

- Spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu: MKH popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD73 (ekto-5'-nükleotidaz), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir; CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$ , HLA sınıf II gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir.
- Multipotent farklılaşma potansiyeli: *In vitro* doku kültür ortamında osteoblast, nöron, adiposit ve kondroblastlara farklılaşmaktadır.

MKH vücutta, kordon kanı ve periferik kan (82), plasenta (83), kemik iliği (84), retina (85), karaciğer, pankreas (86), yağ dokusu (87) gibi pek çok dokudan elde edilebildiği gibi dental kaynaklardan da elde edilebilirler (5). Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile diş dokularından elde edilen MKH'lar benzer olarak osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücre soyuna diferansiye olabilmektedirler (5). Ancak dental dokulardan izole edilen kök hücreler, odontojenik hücreye diferansiye olmak üzere özelleşmiş doku oluşturma kapasitesine sahip tek hücrelerdir (88, 89) ve bu hücrelerin izolasyonunda kemik iliği dokusunun izolasyonu sırasında ve sonrasında yaşanan güçlükler görülmemektedir. Dental kök hücreler ektoderm ve mezodermin ortak oluşturduğu nöral-krest dokusundan köken almaktadır (90). Embriyonik dönemde diş tabakasının gelişimi ektodermden kaynaklanmaktadır. Ektodermal yapı diş germelerini oluştururken, nöral-krest hücreleri dental papil ve diş folikülüne farklılaşmaktadır (90, 91). Periodontal ligament, dental folikül, apikal papilla, süt dişi ve dental pulpa kök hücre izolasyonunun yapılabildiği dental dokulardır (Şekil 2.1.) (5).



**Şekil 2.1.** Diş kaynaklı kök hücreler (5): (DPKH: dental pulpa kök hücreleri, SDKH: süt diş pulpası kök hücreleri, PDLKH: periodontal ligament kök hücreleri, APKH: apikal papilla kök hücreleri, DFKH: dental folikül kök hücreleri, DGPH: diş germi progenitör hücreleri).

Dental dokulardan elde edilen kök hücreler, diş dokularında meydana gelen hasarların tamirinden sorumludur; örneğin diş çürüğü oluşumu sonrası büyüme faktörlerinin salınımı ile dental pulpa kök hücreleri aktifleşerek tamir dokusu oluşumunda, dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunda görev yapmaktadır. Dentin/pulpa dokusu ve sement/periost dokusunun, insan dental pulpa kök hücreleri ve periodontal ligament kök hücreleriyle rejenere olabileceği bildirilmektedir (92-94).

### Dental Pulpa Kök Hücreleri

Son yıllarda çeşitli kök hücre araştırmalarında kullanılan ve üzerinde önemle durulan diş pulpası önemli bir mezankimal kök hücre kaynağıdır (5). Genel olarak fibroblast benzeri görünümde olan diş pulpası kök hücrelerinin dokuların yeniden yapılandırılması için biyomateryallerle birlikte gerçekleştirilen uygulamalarda etkin şekilde kullanımlarının mümkün olması, kullanımının embriyonik kök hücreler gibi etik bir sorun taşımaması, oldukça kolay bir şekilde elde edilmesi, yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olması, yaşam sürelerinin uzun olması ve güvenli olarak dondurularak saklanabilmelerinin (kriyoprezervasyonlarının) mümkün olması gibi nitelikleri, tedavi amaçlı uygulamalar göz önüne alındığında bu hücrelerin neredeyse tüm gerekli özellikleri taşıdığını göstermektedir (95).

Uzun süre sıvı azotta muhafaza edildikten sonra çözdürülerek kullanılan ve sağlıklı bireylerin dişlerinden elde edilen diş pulpası kök hücrelerinin (DPKH) yüksek canlılık oranları, bu hücrelerin uygun durumlarda saklanabileceğini ortaya koymuş ve bu özellikleri diş bankalarının oluşmasına yol açmıştır (96). İnsan DPKH'nin düz kas ve iskelet hücrelerine, endotel hücrelerine, kıkırdak hücrelerine, odontoblastlara, osteoblastlara, sinir ve yağ hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (5). Araştırmacılar, dental pulpa hücrelerinin *in vitro* ortamda çoğaltılabildiğini, osteojenik belirteçlerden ALP, COL1 $\alpha$ 1, BSP, OCN, OPN, TGF- $\beta$  ve BMP'yi ifade edebildiklerini bildirmişlerdir (59, 97). Mezenkimal ve mezenkimal olmayan dokuların hücrelerine farklılaşabilen dental pulpa kök hücreleri, bu özellikleriyle kalsifiye dokuların (dentin, kemik, kıkırdak) onarılmasında, bağışıklık sisteminin, bağ doku hasarının, kas ve nörodejeneratif hastalıklarının tedavisine yönelik gerçekleştirilen klinik çalışmalarda son dönemlerde sıklıkla tercih edilen mezenkimal kök hücre kayakları olmuşlardır (5). Bununla birlikte kök hücrelerin farklılaşma potansiyelinin yaşlanma ve diyabet gibi bazı sistemik hastalıklar ile olumsuz yönde etkilenebileceği öne sürülmüştür (8, 44, 98); fakat bu konudaki veriler sınırlıdır ve değişken sonuçlar mevcuttur.

Daimî dişlerin dışında DPKH'lar süt dişlerinden de elde edilebilirler. İlk defa 2003 yılında, kendiliğinden düşen kesici bir süt dişinden izole edilerek incelenen süt dişi kök hücrelerinin (SDKH) *multipotent* kök hücreler olduğu belirtilmiştir (99). Yapılan çalışmalarda SDKH'nin proliferasyon yeteneğinin DPKH'den fazla olduğu ve daha fazla mineralizasyon sağladığı belirtilmiştir; ancak dentin-pulpa kompleksinin oluşmasında DPKH'nin daha etkili rol oynadığı bildirilmiştir (88, 92, 99). Araştırmalar diğer kök hücre tiplerine nazaran SDKH'in; daha fazla vücut hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir. Farklılaşma sonucu oluşan bu hücrelerin konjektif kalp yetmezliğinin, alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olduğu belirtilmiştir (99-102).



### **Apikal Papilla Kök Hücreleri**

Odontoblastlara ve adipositlere farklılaşabildiği gösterilen, gelişen insan dişlerinin kök ucundan izole edilen kök hücreler apikal papilla kök hücreleri (APKH) olarak tanımlanmıştır (94). Periodontal ligament kök hücrelerinden ve DPKH daha yüksek proliferasyona sahip olduğu gösterilen APKH (89, 94) diş gelişiminin oldukça erken evrelerinde gömülü dişler, süpernumere dişler veya keser dişlerden elde edilirler (103). Diş pulpası ile apikal papilla arasındaki fark, apikal papillanın radiküler pulpanın öncüsü olmasıdır. APKH'lerin kök dentininin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların kaynağı olduğu, DPKH'lerin ise reperatif dentin üretmekten sorumlu olan odontoblastların kaynağı olduğu düşünülmektedir (57).

### **Dental Folikül Kök Hücreleri**

Dental folikül, gelişmekte olan 3. Molar dişlerin çekiminden sonra kolaylıkla izole edilebilen ve mine organı ve dental papillanın etrafını çevreleyen ektomezenşimal diş germi dokusudur (52). Farelerin alt 1. Molar dişinin dental folikülünden elde edilen kök hücrelerin (DFKH) osteoblastlara, sementoblastlara, adipositlere ve nöronlara farklılaşma kapasiteleri olduğu gösterilmiştir (104, 105). İmmortalize DFKH'nin immün sistemi baskılanmış farelere *in vivo* olarak implante edilmesiyle periodontal ligamentin oluştuğu bildirilmiştir (106). DFKH, koloni oluşturabilen, fibroblast benzeri, plastik adherent hücreler olduğu ve kök hücre belirteçlerinden *Notch-1* ve *Nestin*'i eksprese ettiği belirtilmiştir (107).

### **Periodontal Ligament Kök Hücreleri**

Periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinin iç duvarı arasında bulunan ve dişi çeneler içinde destekleyen yumuşak bağ dokusudur (5). İlk olarak 2004 yılında izole edilen periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH) de multipotent, postnatal kök hücrelerdir (56). Sementoblast benzeri hücrelere, adipositlere ve fibroblastlara farklılaşabilen PDLKH çekilen dişlerin kök yüzeyinin küretajıyla elde edilirler (108). Osteojenik farklılaşma kapasiteleri *in vitro* koşullarda yüksek bulunmasa da koloni oluşturabilen PDLKH *in vivo* çalışmalarda doku rejenerasyonu ve periodontal tamir sağlayabildikleri bildirilmiştir (52, 56).

## Diş Germi Progenitör Hücreleri

Kurunu tamamlanmış ancak henüz sürmemiş, germ halindeki dişlerden alınan diş germi progenitör hücreleri (DGPH), gelişimi tamamlanmış dişlerden elde edilen hücrelere göre, çoğalmaya daha meyilli bulunmuştur. Kök gelişimi tamamlanmamış dişlerden alınan hücrelerin, kollateral dolaşıma sahip olması ve kök hücrelerin dolaşımdan zengin bölgelerde daha fazla bulunmasından dolayı apeksi açık dişten elde edilen kök hücrelerinin rejenerasyona yatkınlığını açıklamaktadır (109). DGPH, mezenkimal kök hücre belirteçlerinden *STRO-1* ve CD'leri eksprese ettikleri ve mezenkimal fenotipi işaret eden pluripotensi-ilişkili genlerin ekspresyonunu (*Nanog*, *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4* ve *c-Myc*) gösterdikleri belirtilmiştir (110, 111). Diğer dental kaynaklı kök hücreler gibi adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara, odontoblastlara ve nöronlara farklılaşma kapasitesi mevcuttur (5).

### 2.2.2. Mineral Trioksit Agregat

Dentin mineralizasyonu dinamik bir süreçtir, proteinler ile inorganik fraksiyon arasındaki etkileşimler dışında protein-protein etkileşimlerini de içerir. Dentin oluşumu dental pulpa kök hücrelerinin olgun odontoblastlara farklılaşmasını, bu odontoblastlar tarafından ECM ve proteinlerin salgılanmasını ve bu ECM'ye kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ve diğer minerallerin birikmesini gerektirir (112, 113). Odontoblastlar mineralizasyonda kilit rol oynayan  $Ca^{+2}$  iyonlarının mineralizasyon bölgesine taşınmasında önemli bir rol oynar (114). Dental pulpa kök hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaşmasında büyüme faktörlerinin yanında  $Ca^{+2}$  iyonları aracılığıyla pulpadaki fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından sentezlenen fibronektinin de etkili rol oynadığı bildirilmiştir (115). Diş tedavileri sırasında hücre dışı  $Ca^{+2}$  kaynağı olarak farklı materyaller kullanılmaktadır. Bunlardan MTA hem vital pulpa tedavilerinde hem de immatür dişlerin tedavilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan oldukça biyoyumlu bir materyaldir. MTA'nın diş sert dokularına benzer kimyasal içeriğinden ve su ile karıştırılması sonucunda ortaya çıkan kalsiyum dioksitten dolayı biyoyumlu olduğu düşünülmektedir (116). Vital pulpa tedavileri ve immatür dişlerin rejeneratif tedavileri dışında MTA apeksifikasyon, apikal rezeksiyon, Cvek ampütasyonu, kök

kırıkları, kök ucu rezeksiyonlarında retrograd dolgu, Dens invajinatus gibi yapısal anomalilerin parsiyel pulpatomi, daimî dişlerin kök kanal tedavisi, persiste süt dişlerinin kök kanal tedavisi, kök ve bifurkasyon perforasyonları tedavisi ve endodontik tedavili dişlerin kanal içi beyazlatma işlemlerinde bariyer materyali olarak kullanılmaktadır (117, 118).

Lee ve ark. (119) yaptıkları araştırma ile diş hekimliği literatürüne ilk defa 1993 yılında Loma Linda Üniversitesi'nde giren MTA, 1998'de Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmasıyla beraber diş hekimliği tedavilerinde ABD'de ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (120, 121). Ağırlıkça %50-75 oranlarında kalsiyum oksit (trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat, kalsiyum sülfat ve kalsiyum alüminat) ve %15-25 silikon dioksit içeren bir tozdur. Gri ve beyaz olmak üzere 2 formu vardır. İlk olarak gri MTA üretilmiştir; ancak ön dişlerde istenmeyen renklenmelere neden olmasından dolayı devamında beyaz MTA üretilmiştir. Tetrakalsiyum aluminoferritin, gri renkli olan MTA'dan farklı olarak beyaz renkli MTA'da yer almadığı gösterilmiştir (122). MTA'nın hücrelerin proliferasyonuna, hücrelerden sitokin salınımına, hücrelerin farklılaşmasına yol açtığı dolayısıyla biyomineralizasyonda rol oynadığı belirtilmiştir (123). MTA ile doğrudan temas eden DPKH'da ALP aktivitesinin ve DSPP, BSP, COL1 $\alpha$ 1 ve OCN transkriptlerinin arttığı belirtilmiştir (41, 42). MTA su ile karıştırıldığında, MTA'dan salınan Ca<sup>+2</sup> iyonları silika bir matriks içinde kalsiyum hidroksit oluşturacak şekilde çökelirler (124). Bu matriks çevre dokulara Ca<sup>+2</sup> ve hidroksit iyonlarının salındığı bir kaynak olarak rol alır (125). Ayrıca, MTA'nın su yerine %5 kalsiyum klorür ve %2,5 disodyum fosfat ile karıştırılması, insan dental pulpa kök hücrelerinden DSPP ve COL1 $\alpha$ 1 gen ifadesini arttırmıştır. Bu da MTA tarafından indüklenen kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında hücre dışındaki Ca<sup>+2</sup> ve P iyonlarının kombine etkisi olduğunu da göstermektedir (7). MTA'nın sertleştikten sonra bile bazik pH'sını koruduğu bildirilmiş (125) ve sertleşme sonrasında MTA çevresindeki Ca<sup>+2</sup> iyon konsantrasyonunun 1 mg/dL olduğu gösterilmiştir (126). İnsan dental pulpa kök hücrelerinden oluşturulan kültür ortamına MTA ilave edildikten iki saat sonra Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun yaklaşık 0,3mM yükseldiği ve BMP-2'nin mRNA seviyesindeki ekspresyonun ve protein

üretimini belirgin miktarda arttığı bildirilmiştir; bu da BMP-2'nin MTA tarafından stimüle edilen oste/odontoblastik farklılaşmada önemli rol oynadığını göstermektedir. Yüksek pH ve  $Ca^{+2}$  iyonu mineralizasyonda rol oynayan iki anahtardır (127). Fizyolojik  $Ca^{+2}$  seviyelerinde hafif bir değişim, kemik hücrelerinin kaderinde ve onların metabolik fonksiyonlarında, farklı  $Ca^{+2}$  sensörleri ve yüksek  $Ca^{+2}$  ile indüklenen RANKL ekspresyonunu içeren ERK1/2 gibi *downstream* sinyal yolları aracılığıyla belirgin bir etkiye sahiptir. Ekstraselüler kalsiyum-algılayıcı reseptör [*calcium-sensing receptor* (CaSR)] yedi transmembran domaini olan G protein kenetli hücre yüzey reseptörüdür (128). MTA'nın CaSR aktivasyonu ile endoplazmik retikulumdan hücre içine  $Ca^{+2}$  iyon salınımına yol açtığı gösterilmiştir (129). Yüksek  $Ca^{+2}$  matriks mineralizasyonunu artırır ve olgunlaşan kondrositlerden terminal farklılaşma belirteçleri (OPN, osteonektin, OCN) lehine erken kondrosit belirteçlerinin (proteoglikan, aggrecan) ekspresyonunu engeller. CaSR, hatalı sinyal ile yüksek seviyelerde açığa çıkan  $Ca^{+2}$  cevabını bloke eder, bu da CaSR'nin kondrosit matriks üretimini ve mineralizasyonu düzenlediğini gösterir (130). MTA, hücre dışındaki  $Ca^{+2}$  miktarını ve pH'yı etkileyerek CaSR *downstream* sinyalini aktive eder. Sonuçta hücre içindeki  $Ca^{+2}$  mobilizasyonu, fosfolipaz C gama yolağı yoluyla, NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) aktivasyonunu indükler, bu da osteojenik farklılaşmada transkripsiyonel değişikliklere yol açar. Nükleer Faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonunun da MTA'nın dentin köprüsü oluşturmasında rol oynadığı gösterilmiştir. NF- $\kappa$ B; sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar gibi farklı hücre dışı sinyal faktörlerine yanıt olarak çeşitli hücrelerde aktive olan çok yönlü bir transkripsiyon faktörüdür (131). NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasının aktive olduğu belirtilmiştir. Çalışmalar MTA'nın dental pulpa kök hücrelerinde NF- $\kappa$ B yolunu aktive ettiğini ve siklooksijenaz-2 mRNA regülasyonu ile diş pulpasındaki prostaglandin E2 salınımını sağladığını, böylece inflamatuvar proteinleri dolayısıyla inflamasyonu azalttığını ve dentin köprüsünün oluşmasında önemli rol oynadığını göstermiştir (132). MTA'nın IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, OCN, ALP, BSP, OPN ve BMP-2 gibi birçok sitokin ifade artışına neden olduğu çeşitli hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (117, 122). Dental

pulpa kök hücrelerinin proliferasyonunu, odontoblastik farklılaşmasını ve mineralizasyonunu arttırmak adına MTA'ya büyüme faktörlerinin (FGF-2, PRP) (133, 134), hormonların (osteostatin) (135), probiyotiklerin (136) ve vitaminlerin (137) ilave edildiği de bildirilmiştir. MTA'ya ilave edilen vitaminlerden biri de kemik mineralizasyonunda önemli rol oynayan D vitamini (137).

### 2.3. D Vitamini

Morina karaciğeri yağının ve cildin UV ışığına maruz kalmasının raşitizmi tedavi edici özellikleri 1800'lerin sonlarından 1900'lerin başlarına dek süren epidemiyi sonlandıracak D vitamininin keşfine 1919 ve 1924 yılları arasında yol açmıştır (138). 1940'larda raşitizm gibi kemik mineral bozukluklarının tedavisinde D Vitamini farmakolojik bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yağda çözünebilir bir hormon olan D Vitamini ergokalsiferol (VitD2) ve kolekalsiferol (VitD3) olmak üzere 2 ana formda bulunur. D vitamininin gerçek öncülleri olarak kabul edilen ergosterol ve 7-Dehidrokolesterol (7-DHC) UV ışınların etkisiyle sırasıyla VitD2'yi ve VitD3'ü oluştururlar.

Çok işlevli bir hormon olan D vitamini bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden iyon metabolizmasına kadar pek çok temel fonksiyonu etkilemektedir (139, 140). Asıl görevi, iskelet sisteminde  $Ca^{+2}$ -fosfat dengesini düzenlemek ve kemik mineralizasyonu olan yağda çözünen ve yağda depolanan D vitamininin hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü, kardiyovasküler sistem ve immün sistem fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi iskelet sistemi dışında da görevleri bulunmaktadır (141-145). Gıdalarla günlük D vitamini ihtiyacının sadece %30'u karşılanmakta olup, epidermiste mevcut olan dehidrokolesterolün güneş ışığıyla fotokimyasal tepkimeye girmesi sonucu geri kalan gereksinim giderilmektedir (144). Dokularda meydana gelen bu biyosentez sırasında epidermiste olan dehidrokolesterol 7-DHC'ye dönüşmekte; devamında karaciğerde 7-DHC, 25-hidroksi vitamin D3'e [25(OH)D3] ve böbreklerde de vitaminin aktif formu olan  $1\alpha,25$ -dihidroksi vitamin D3'e [ $1\alpha,25(OH)_2D3$ ] dönüşmektedir (144-146). D vitamini reseptörlerine (VDR) bağlanarak plazma mineral dengesinin ve kemik gelişiminin düzenlenmesinde rol

oynayan serumdaki 25(OH)D3 ince bağırsaklardan  $Ca^{+2}$  ve P'nin, böbreklerden de  $Ca^{+2}$ 'nin geri emilimini artırır (144). Bağırsak epitel hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda bulunan VDR neredeyse tüm çekirdekli hücrelerde bulunur (147). Çoklu genlerin transkripsiyonun düzenlemesini sağlayan VDR nükleer hormon reseptör üst ailesinin bir parçasıdır (148).

### 2.3.1. Diyabet Hastalığı ve Vitamin D3

İnsülin salınımı ve faaliyeti üzerindeki etkisi nedeniyle D vitamini glikoz metabolizmasını da düzenlemektedir. Vitamin D'nin hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu regüle ederek insülin üretimini, insülin duyarlılığını ve glikoz toleransını iyileştirebileceği gösterilmiştir. Güçlü antiproliferatif, proiferansiyatif, proapoptotik ve immünomodülatör etki göstermektedir (149). Dünya çapında küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilmekte olan D vitamini yetersizliği ve eksikliği insanların yaklaşık %30-%50'sinde gözlenmektedir (150). Az güneş alan ve D vitamini yetersizliğinin belirgin olduğu bölgelerde, diyabet ve hipertansiyon gibi sistemik hastalıkların da sıklığının arttığı bildirilmiştir (151, 152). DM'nin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmekte olan D vitamini eksikliğinin DM için bir risk faktörü olabileceğine dair veriler artmaktadır (147). Yakın dönemde yapılan güncel çalışmalara göre, değişen D vitamini ve  $Ca^{+2}$  dengesinin, T2DM'nin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. T2DM'de serumdaki  $1\alpha,25(OH)_2D3$  konsantrasyonu ile insülin duyarlılığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (153).

Pankreastaki  $\beta$ -hücreleri, VDR, vitamin D aktive edici enzimleri ve vitamin D sinyalizasyonu ile ilgili diğer proteinleri eksprese etmektedir (147). D vitamininin  $\beta$ -hücrelerindeki koruyucu etkisi ile DM mekanizması ile direkt ilişki sağladığı, aynı zamanda immün yanıt üzerindeki etkisi ile indirekt ilişki sağladığı düşünülmektedir. İnsülin salgılayan  $\beta$ -hücrelerinde ve insülin hormonunun hedef organları olan karaciğer, iskelet kası, yağ dokusunda ve ayrıca immün sistemin tüm hücrelerinde  $1\alpha,25(OH)_2D3$  için reseptörler bulunmaktadır (147). Genel olarak erken yaşlarda düzenli D vitamini desteği ile azalan T1DM prevalansı bildirilmiştir, ayrıca diyabetle ilişkili otoantikor gelişimi ve D vitamini arasında doza bağımlı pozitif bir korelasyon

vardır. Diğer bir deyişle erken yaşlarda D vitamini eksikliğinin ilerleyen yaşlarda T1DM için daha yüksek risk oluşturduğu bildirilmiştir (147, 154).

Vitamin D immünoisitlerin fonksiyonlarını koruyarak; sitokinlerin, makrofajların ve doğal öldürücülerin oluşumunu inhibe eder. İmmün sistem ve inflamatuvar olayları düzenleyerek diyabetin patogeneğinde de rol oynar (144, 155). Farklı şekillerde oluşturulan diyabetik hayvan modellerinde D vitamini eksikliği, T1DM ve T2DM için predispozisyon yaratırken, yüksek dozlarda D vitamini veya  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  diyabet hastalığını önlemektedir (147). Vitamin D ilavesi, vitamin D yetersiz hayvanlardan elde edilen pankreatik adacıklarda insülin salınımını olumlu yönde etkilerken (156),  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sitokinlerin indüklediği fonksiyonel bozukluklara ve hücre ölümüne karşı  $\beta$ -hücrelerini korumaktadır (156, 157). Erken dönemde ve uzun süreli vitamin D3 kullanımının diyabet riskini azalttığına ilişkin veriler bulunmaktadır (154, 156). Diğer yandan T1DM ve T2DM hastalarında VDR geni polimorfizmlerinin olduğu ve bu gendeki polimorfizmlerin özellikle etnik farklılıklar da göz önünde tutulduğunda diyabet riskini arttırdığı bildirilmiştir (158, 159).

### 2.3.2. Diş Mineralizasyonu ve Vitamin D3

Kemik ve diş gelişiminde önemli bir rolü olan D vitamini, farklı mekanizmalar yoluyla mine ve dentin mineralizasyonunu etkiler. Mine mineralizasyonunu lokal olarak düzenlerken, dentin mineralizasyonunu ise sistemik yolla etkileyebilmektedir (160). Kemiğin mineralizasyonu için serumda belirli konsantrasyonda  $\text{Ca}^{+2}$  ve P gereksinim vardır. D vitamini bu minerallerin organizmadaki düzenlemesinde görevlidir (161). Vitamin D eksikliği düşük kemik mineral yoğunluğuna, osteoporoz ve osteopeniye neden olur. Alveolar kemik yoğunluğu, osteoporoz ve diş kaybı arasında bağlantı vardır. Yaşlılardaki  $\text{Ca}^{+2}$  ve vitamin D takviyesi kemik kaybını önleyerek dişlerin alveolar kemiğe tutunmasını sağlar. Vitamin D eksikliğinde mine ve dentin mineralizasyonunda problemler olduğu bilinmektedir (162, 163). Klinik çalışmalar, D vitamini eksikliğinde diş gelişiminde gecikme, dentin hipokalsifikasyonu ile mine hipomineralizasyonu oluşabileceğini bildirmiştir (13, 164). Yüksek dozda D vitamininin alındığı zamanlarda ise hipersementoz, pulpa taşları ve hiperkalsifikasyonların

görülebileceği belirtilmiştir (165). Dişlerin sürmesinde, köklerin rezorbe olmasında, kemik yapım-yıkımı olaylarında D3 vitamininin osteotropik bir hormon gibi davrandığı rapor edilmiştir (166). Akut ve kronik dişeti iltihabının önlenmesinde de Vitamin D'nin rolü vardır. Vitamin D'nin antimikrobiyal ve anti-endotoksin aktivitesine sahip katelisidin ve defansin gibi peptitlerin üretimini indüklemesinden dolayı diş çürüğünü önleyici etkisi de mevcuttur (167). Vitamin D'nin tek başına kullanımının ya da farklı kimyasallarla kombinasyonunun dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasında da etkili olduğu gösterilmiştir (16, 168-170).

#### 2.4. Amaç

Dental tedavilerin uygulanmasında rutin protokoller izlenir ve bu protokoller hastanın yaşından, cinsiyetinden, sistemik sağlık durumundan bağımsız olup vakanın özelindedir. Ancak sistemik hastalıkların göz önünde bulundurularak oluşturulan tedavi protokolleri tedavinin uzun dönem başarısına katkıda bulunabilir. Ayrıca sistemik hastalıkların rejeneratif endodontik tedavileri ne boyutta etkilediklerine dair doğrudan yürütülen klinik çalışmaların yerine hastalık modelinin oluşturulduğu hayvan çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları ile verilere ulaşılmaya çalışılmıştır. Ancak hastalık modelinin oluşturulduğu hayvan çalışmalarında da farklı sonuçlar elde edilmektedir (9, 10, 43-45). Ağız ve diş sağlığının korunması için sistemik hastalıkları olan bireylerde farklı kombinasyonların ve klinik uygulamaların yapılabileceği düşüncesi ve literatürde yer alan mevcut bilgiler doğrultusunda MTA/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> birlikteliğinin diyabet hastalarından elde edilecek olan dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını etkili bir şekilde indükleyeceği hipotezi öngörülmüştür. Bu nedenle mevcut tezin amacı diyabet hastalarından elde edilecek olan dental pulpa kök hücrelerinin MTA ve MTA/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kombinasyonuna maruz kalmaları sonucundaki farklılaşma kapasitelerini ve 18 yaş üstü bilinen herhangi bir sağlık problemi olmayan, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, son 2 haftada antibiyotik kullanmayan sağlıklı bireylerden elde edilecek olan dental pulpa kök hücrelerinin proliferasyon ve odontojenik farklılaşma kapasitelerini;



- Kök hücrelerin MTA ve MTA/1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3 kombinasyonu ile odontojenik olarak farklılaştırılması,
- Alizarin kırmızı boyaması ile odontojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan kalsiyum odaklarının boyanması,
- Odontojenik olarak farklılaşan hücrelerin immün floresan yöntemi ile karakterize edilmesi,
- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile kök hücre ve odontojenik gen belirteçlerinin ifadesi ile değerlendirmektir. Böylece metabolik/sistemik bir hastalık varlığında insan dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşma kapasitesinin, rejeneratif tedavilerde kullanılan/kullanılma ihtimali olan materyallere maruz kalmasıyla nasıl etkilendiğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi ve diyabet hastalarında uygulanacak rejeneratif dental tedavilerin olası başarı şansı hakkında fikir elde edilmesi hedeflenmektedir. Elde edilen veriler ile rejeneratif dental tedavi sırasında kullanılacak alternatif seçenekler oluşturularak diyabet hastaların dişlerinin korunması ve enfeksiyonun önlenmesi için çalışılacaktır.

### 3. YÖNTEM ve GEREÇ

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından GO 18/611-06 protokol numarası ile değerlendirilmiş ve 21.06.2018 tarihli rapor ile Tıbbi Etik açıdan uygun bulunmuştur (Ek-1). Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından TSA-2019-17274 numaralı proje ile desteklenmiştir.

#### 3.1. Belirlenen Bireylerden Dental Pulpanın Elde Edilmesi

Diyabet hastalığı dışında herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, kullandıkları ilaç grubu aynı olan, sigara içmeyen, son 2 haftada antibiyotik kullanmayan 18 yaş üstü 3 hastanın ve bilinen herhangi bir sağlık problemi olmayan, ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, son 2 haftada antibiyotik kullanmayan 18 yaş üstü 3 kontrolün Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Bölümünde yapılan muayeneleri sonucunda çekimi uygun görülen ve Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Bölümü'nde çekilen gömülü yirmi yaş dişleri hastaların yazılı onamını takiben dental pulpa izolasyonu için kullanıldı.

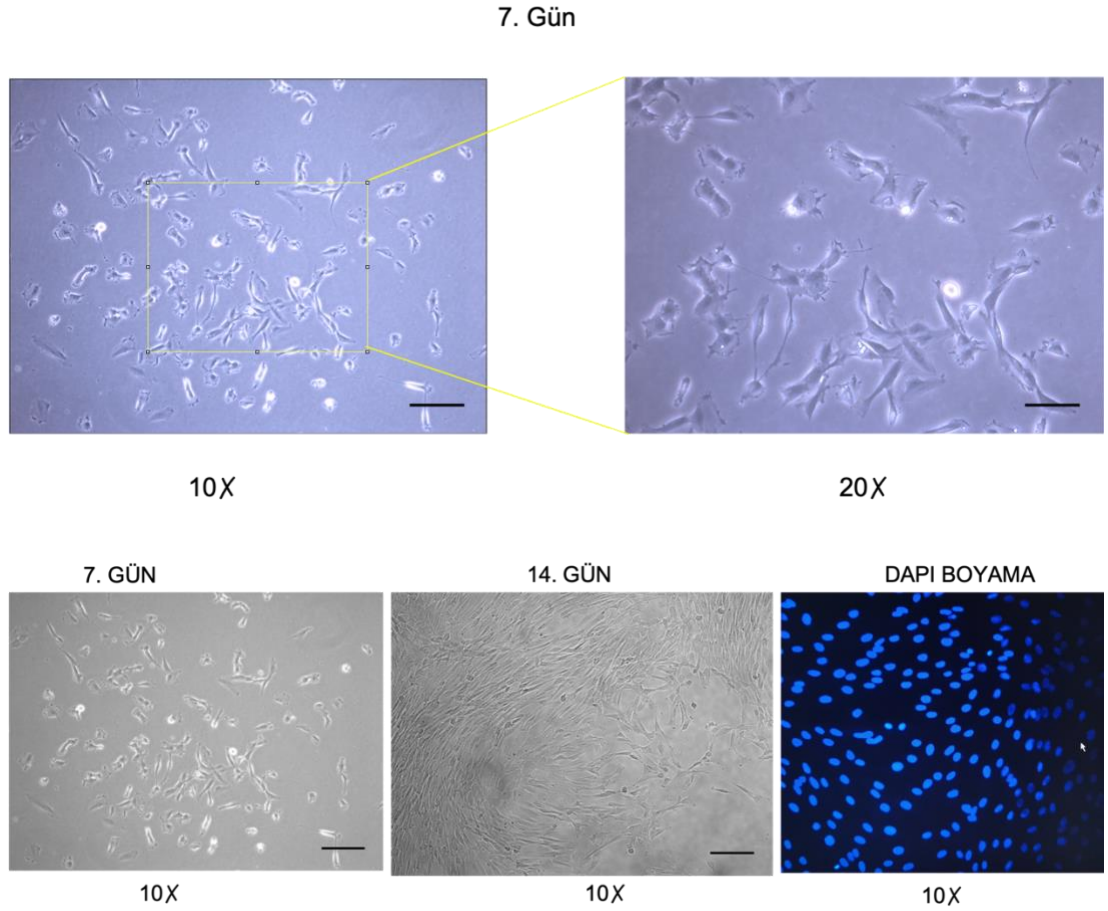
Çekilen dişler %70'lik alkol emdirilmiş gazlı bezler ile silindikten sonra kron ve kök kısmındaki doku artıkları uzaklaştırıldı (Şekil 3.1.). Steril aletler ile sabitlenen diş mine-sement sınırı boyunca soğuk su soğutması altında çalışan elmas diskler ile ikiye ayrıldı (Şekil 3.1.) ve steril ekskavatör yardımıyla dental pulpa dokusu pulpa boşluğundan uzaklaştırılarak +4°C'deki %5 Penisilin-Streptomisin (PenStrep) ve %5 Amfoterisin B (AmfB) içeren düşük glikozu DMEM (Cegrogen Biotech, katalog no: E0500-120) içerisinde 10-15 dk içinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki hücre kültürü laboratuvarına taşındı.



**Şekil 3.1.** Çekilmiş dişlerin üzerindeki artık dokuların uzaklaştırılmasını takiben steril aletler ile sert dokunun kesilmesi ve pulpa dokusunun elde edilmesi.

### 3.2. Dental Pulpa Hücrelerinin Besi Yerinde Çoğaltılması

Hücre kültürü laboratuvarına 1,5 mL'ik steril eppendorf içinde getirilen pulpa dokusu 35 mm'lik şeffaf petriye transfer edilerek 2 mL fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Devamında pulpa dokusu buz kalıbı üstünde bisturi ile küçük parçalara ayrılarak mekanik parçalama yapıldı. Düşük glikoz içeren DMEM+ AmfB + PenStrep + Kolajenaz tip 1 (3mg/mL, Chemicon, EMD Millipore Corp., Temecula, CA, ABD) + dispaz II (1mg/mL, Pluristem, EMD Millipore Corp., Billerica, MA, ABD) içeren besi yerinde hücreler 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra resüspanse edildi ve 40 µm'lik gözenekleri olan filtreden (Cell Strainer, BD) geçirildi. 10 dk 1200rpm'de santrifüj edildikten sonra enzimatik besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler daha önceden 37°C'de su banyosunda ısıtılmış düşük glikoz içeren DMEM (Cegrogen Biotech) + %1 AmfB+100 U/mL Pen/Strep+ %15 fetal sığır serumu (FBS, Pan Biotech, katalog no: P30-3306) içeren besi yerinde T25 flaslara ekilerek uygun saklama koşullarındaki (37°C'de, %5CO<sub>2</sub>) etüve kaldırıldı (171, 172). İki-üç günde bir besi yeri değişimi yapıldı. Hücrelerin 7. ve 14. günlerdeki durumu 10'luk ve 20'lik büyütmede çekilen ışık mikroskobu fotoğraflarında Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Kültür kabının yüzeyi %70 oranında kaplandıktan sonra hücrelere pasajlama işlemleri yapıldı. Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere farklı pasajlardaki hücreler -196°C'de sıvı azotta stoklandı. Çalışmalarda 3-7 arası pasajlar kullanıldı.



**Şekil 3.2.** Dental pulpa kök hücrelerinin 7. ve 14. günlerdeki ışık mikroskobu görüntüsü (Büyütme: 10x ve 20x).

### 3.3. Deneylerde Kullanılacak Primerlerin PZR ile Standardizasyonu

#### 3.3.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerin 3. pasajından trizol ile total RNA izolasyonu yapıldı. Sırasıyla hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. 1mL Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen, katalog no: 15596018) ilavesini takiben hücreler 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerine 250 µL kloroform eklendi ve hücre/trizol/kloroform içeren eppendorf karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra örnekler, önceden +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde (U-320 R, Boeco, Almanya) 12000rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eppendorfun üstünde kalan şeffaf faz yeni bir eppendorfa alındı ve üzerine 1 mL isopropanol eklendi. 10 sn vorteks yapıldıktan sonra eppendorflar 1 saat boyunca -80°C'de bekletildi. Bir saatin sonunda 10 dk oda

koşullarında bekletilen eppendorflar tekrar 4°C'de 12000rpm'de 10 dk santrifüj edildi. İşlem sonunda eppendorfun dibindeki pelete dikkat edilerek süpernatant elimine edildi. Pelet devamında %75 EtOH ile yıkandı ve dikkatlice kurutuldu. 15-30 µl RNase içermeyen su ile muamele edildi ve 2-3 dk 65°C'de bekletildi. cDNA sentezi işlemi öncesinde nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) cihazı ile izole edilen RNA'nın saflık ve miktar tayini yapıldı. Örnekler -80°C'de saklandı.

### 3.3.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lar ile başlangıç RNA miktarı 1000ng olacak şekilde kullanıcı talimatlarına göre ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) ile cDNA stoğu hazırlandı. PZR tüplerine ilk olarak RNaz içermeyen su, 1000ng RNA ve 0,5 µg Oligodt eklenerek total hacim 5 µl olarak hazırlandı ve PZR tüpleri sırasıyla 5 dk 70°C'de, 5dk buzda bekletildi. Devamında PZR tüpüne 5X buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix, ImProm-II RT, Rnasin Ribonükleaz inhibitörü eklenerek total hacim 20 µl olarak tamamlandı. PZR tüpleri içerisindeki karışım sırasıyla, PZR cihazında (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, ThermoFisher, ABD)

- 5 dk 25°C,
- 60 dk 42°C,
- 15 dk 70°C ve
- son olarak 4°C'de inkübe edildi. Yaklaşık 120 dk sonunda elde ettiğimiz cDNA PZR deneyinde kullanana dek -20°C'de saklandı.

### 3.3.3. Primerlerin Hazırlanması ve PZR

Bir önceki basamakta hazırlanan cDNA PZR deneylerinde 1:5 oranında sulandırılarak kullanıldı. Uygun primer tasarımları Ensembl ve Blast yazılımları kullanılarak yapıldı. Mezenkimal kök hücre belirteçlerinin optimizasyonu sırasında ticari dental pulpa kök hücre hattından izole edilen RNA (PT-5025; Lonza, Basel, İsviçre) cDNA sentezi için kullanıldı. Dental pulpa kök hücre-fibroblast ayrımının yapılmasında ise ticari olarak temin edilmiş deri fibroblastlarından elde edilen RNA cDNA sentezi için kullanıldı. Odonto/osteojenik farklılaşma belirteçlerinin

standardizasyonunda ise doğrudan pulpa dokusundan ve pulpa odasının duvarlarından izole edilen odontoblast hücrelerinin RNA'sı kullanıldı (173, 174). Her primer (Oligomer Biyoteknoloji A.Ş.), üretici firmanın talimatları doğrultusunda nükleaz içermeyen ultra saf distile su ile sulandırılarak hazır hale getirildi. GZ-PZR için kullanılacak primerlerin çalışıp çalışmadığının ve optimum çalışma sıcaklığının tespiti için Tablo 3.1.'de yer alan primerlerle 58°C-63°C arasındaki sıcaklıkların denendiği PZR deneyleri yapıldı. İzole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakteristiğini göstermek için *Oct-4*, *Nanog*, *CD73*, *CD90*, *CD106*, *CD34* ve *CD45* belirteçleri, farklılaşma deneylerine maruz kalan hücrelerin odonto/osteojenik farklılaşmasının analizinde *DMP1*, *DSPP*, *COL1 $\alpha$ 1* ve *OCN* belirteçleri kullanıldı. Hastalardan ve kontrollerden elde edilen kök hücrelerdeki D vitamini reseptörünün ifadesinin değerlendirilmesinde VDR belirteci kullanıldı. Tüm GZ-PZR deneylerinde  *$\beta$ -aktin housekeeping* gen olarak kullanıldı.

**Tablo 3.1.** Deney için kullanılan primerlerin dizileri ve uzunlukları.

Primerler	Forward	Reverse	Baz Uzunluğu
Oct 4- POU5F1	GTGGAGAGCAACTCCGATG	TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC	86bp
Nanog	ACCAGTCCCAAAGGCAAACA	GAGGCCTTCTGCGTCACAC	302bp
CD73-NT5E	GCCTGGGAGCTTACGATTTTG	TAGTGCCCTGGTACTGGTCCG	196bp
CD90-Thy-1	GAAGACCCAGTCCAGATCCA	TATTCTCATGGCGGCAGTCC	167bp
CD34	CCTGAAAAAGCTGGGGATCCTA	CTGAAGAGTGGTCAGGGTT CC	201bp
CD45-PTPRC	TTCCCCACTGATGCCTACCT	AACTTTTCAACCCCTGGTGG C	345bp
CD106- VCAM	GGCAGAGTACGCAAACACTT	GGCTGTAGCTCCCCGTTAG	175bp
DMP1- DMAPP	TTGTGAACTACGGAGGGTAGA GGT	AAGGGTGGTGTGGTGCCT GA	171 bp

DSPP	TAGCATGGGCCATTCCAGTT	ACTGGCATTTAACTCATCCT GTACT	119 bp
BGLAP (OCN)	CTCACACTCCTCGCCCTATTG	GCTTGGACACAAAGGCTGC AC	109 bp
COL1 $\alpha$ 1	GCGAAGGCAACAGTCGCT	CTTGGTGGTTTTGTATTCGA TGAC	101 bp
VDR	AGACCTACGACCCACCTAC	AGGTGAGGTCTCTGAATCC TG	345 bp
$\beta$ -aktin	ACAGAGCCTCGCCTTTGCC	GATATCATCATCCATGGTGA GCTGG	70bp

PZR karışımının toplamı 25  $\mu$ l olacak şekilde içeriğine Taq Buffer, 2,5 $\mu$ M dNTP, MgCl<sub>2</sub>, *forward* primer, *reverse* primer, Taq DNA polimeraz (ThermoFisher Scientific, 500U, 5 U/ $\mu$ l), nükleaz içermeyen su ve cDNA ilave edildi. Tüm genler için buz içerisinde 25  $\mu$ l olarak hazırlanan karışım PZR cihazında (SimpliAmp, Thermal Cycler, Applied Biosystems) 58°C-63°C arasındaki farklı sıcaklıklara ayarlanmış kuyucuklara yerleştirildikten sonra, PZR şartları cihaza girildi: 94°C'de 4 dk 1 kez (denatürasyon basamağı için); 94°C'de 30 sn + 58-63°C'de 30 sn + 72°C'de 30 sn 35 kez (amplifikasyon basamağı için); 72°C'de 4 dk 1 kez (son uzama basamağı için) ve 4°C'de bekleme (örnekler jele yüklenene kadar cihazda +4°C'de ya da buzdolabında -20°C'de tutuldu) işlemlerinden oluşan ısı döngüleri uygulandı.

### 3.3.4. Agaroz Jelin Hazırlanması

Cam beher içinde karıştırılan 2 gram toz halindeki Agaroz ve 100 mL Tris Asetik Asit (TAE) tamponunda mikrodalga fırında çözüldü. Bahsi geçen sürenin sonunda şeffaf, partikül içermeyen bir karışımın oluşmasından sonra beher içine 10  $\mu$ l etidyum bromür koyulup karıştırıldı ve 5 dk boyunca karışım soğumaya bırakıldı. Soğumayı takiben, karışım tarakların bulunduğu jel tankı içine döküldü. Karışım polimerize olduktan sonra taraklar yükleme kuyularını açığa çıkarmak için uzaklaştırıldı. Jel, 1X TAE karışımı içeren jel tankına yerleştirildi. 10  $\mu$ l PZR ürünü ile 2  $\mu$ l 6X DNA Loading Dye (katalog no: R0611, Thermo Scientific, ABD) karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar

pipetler yardımıyla kuyucuklara yüklendi ve 2 µl GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Katalog no: SM0373, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Jel tankı, güç kaynağının artı ve eksi kutuplarına bağlandıktan sonra, örneklerin 120 Watt 30-35 dk boyunca, elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jel elektroforez işleminden elde edilen DNA bantları Biometra UV transilüminatör cihazı ve BioDoc yazılımı ile görüntülendi. Alınan sonuçlar doğrultusunda GZ-PZR hazırlığına geçildi.

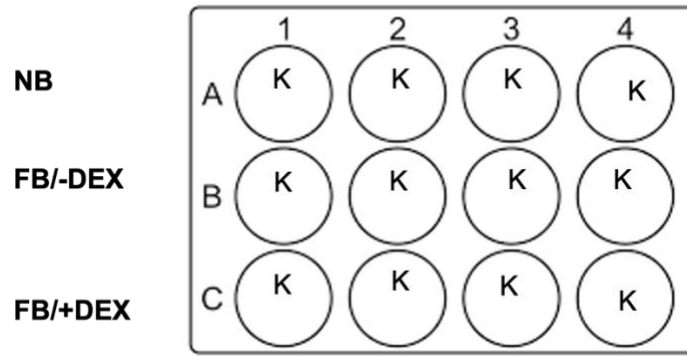
### **3.4. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Odontojenik Farklılaştırılması**

Besi yeri optimizasyon analizlerinde sadece kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücreleri kullanıldı. Odontojenik farklılaştırma öncesinde optimize edilmesi gereken deksametazon ilavesi, MTA uygulama yöntemi ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konsantrasyonu olmak üzere üç değişken mevcuttu.

#### **3.4.1. Deksametazon İlavesi**

Odonto/osteojenik farklılaştırmayı indükleyen ajanlardan  $\beta$ -gliserofosfat ( $\beta$ -GP) mineral oluşumunda fosfat kaynağı olarak görev alır ve hücre dışındaki kinaz fosforilasyonu ile odonto/osteojenik gen ekspresyonunu indükler. Askorbik asit (AA) kolajen Tip 1 salgısını arttırır. Deksametazon ise mitojen aktive protein kinazı aktive ederek Runx2'yi regüle eder. Farklılaştırma deneylerine başlamadan önce literatürde bazı çalışmalarda deksametazonun kullanılmadığı görülmüştür (175-177). Bu nedenle sağlıklı bireylerden elde edilen dental pulpa kök hücreleri 100nM deksametazon içeren ve içermeyen farklılaştırma besi yerine (FB: düşük glikoz içeren DMEM + %1 Amf B+100 U/mL PenStrep+ %10 FBS + 10mM  $\beta$ -GP+ 50 µg/mL AA) maruz bırakılmıştır. 14. günün sonunda yapılan alizarin kırmızısı boyamasının kantitasyonu ile FB'ye deksametazon ilave edilip edilmemesine karar verildi. İlgili deney düzeneği Şekil 3.3.'te gösterildi.





**Şekil 3.3.** Deksametazon ilavesi deneyi için planlanan 12 kuyucuklu plakanın şematik çizimi.

### 3.4.2. MTA Hazırlama Yöntemi

Farklılaştırma deneylerine başlamadan önce bir sonraki aşamada belirlenmesi gereken durumlar mineral trioksit agregatın (Angelus MTA, Angelus, Londrina, PR, Brezilya) besine nasıl ilave edileceği idi. Bu amaçla MTA literatürde yer alan 2 farklı yöntemle hazırlanmıştır:

**Yöntem 1:** MTA 2 mg/mL olacak şekilde %5 FBS içeren düşük glikoz DMEM'e eklendi. 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra besiyeri 0,22 µm (Minisart Syringe Filter, Sartorius) filtreler kullanılarak filtre edildi (176).

**Yöntem 2:** MTA 1:3 oranında su ile karıştırılarak steril 5 mm çapında 2 mm yüksekliğindeki teflon diskler üzerine yerleştirildi (Şekil 3.4.) ve bu diskler 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra UV ışına maruz bırakıldı (178). Sertleşen diskler besiyerine aktarılıp tekrar 24 saat etüvde bekletildi. Daha sonra bu besiyeri de 0,22 µm (Minisart Syringe Filter, Sartorius) filtreler kullanılarak filtre edildi. ISO 10993-5 (1,5 cm<sup>2</sup>/mL) standardına göre diskin kapladığı alan ve gerekli besiyeri miktarı hesaplandı. Yaklaşık 471 µl besiyerine 1 disk olacak şekilde besiyeri hazırlandı.



**Şekil 3.4.** Farklı yöntemlerle hazırlanan MTA karışımı.

Her iki yöntemle hazırlanan stoklar ile dental pulpa kök hücreleri 14 gün süreyle farklılaştırmaya maruz bırakıldı. 14. günde alizarin kırmızısı boyaması yapılarak hücre içi kalsiyum sentezi ve/veya birikimi belirlendi.

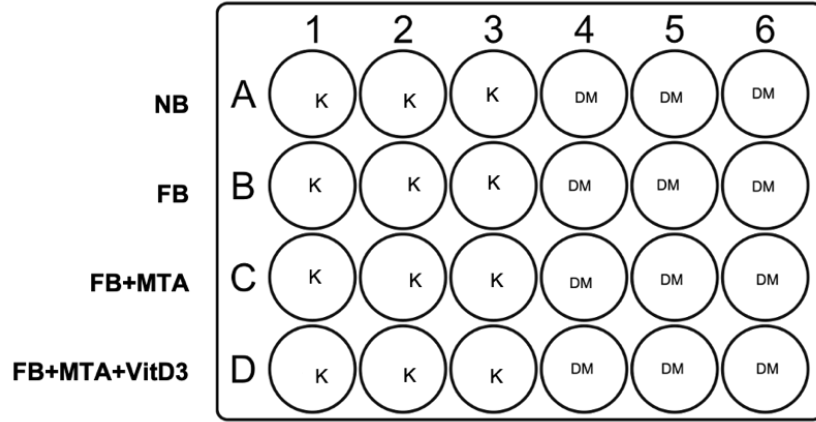
### 3.4.3. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve MTA Konsantrasyonu

Besi yerine ilave edilecek MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Sigma D1530) konsantrasyonlarının optimize edilmesi için literatürde kullanılan farklı  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM ve 100nM) (16) ve MTA konsantrasyonları (0,02 mg/mL ve 0,002 mg/mL) (176) test edildi. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakaya ekilen  $10^4$  hücre 24 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  içeren besi yerine maruz bırakıldı ve deney süresince plaka  $37^\circ\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'de inkübe edildi. Deney sürelerinin sonunda MTT testi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, Cell Proliferation Kit I, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) yapıldı ve plakada çökelen formazan kristalleri spektrofotometrik olarak 570 nm'de analiz edildi.

### 3.5. Kalsiyum Odaklarının Tespiti

Odontojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan kalsiyum odaklarının tespiti için deneyler 3 tekrar olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilen  $5 \times 10^4$  hücre ile gerçekleştirildi. Farklılaştırma işlemi önceki aşamaların sonucunda belirlenen kombinasyonlar ile hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması ile başlatıldı ve besi yerleri 2-

3 günde bir değiştirildi. Şekil 3.5.'te bu deney için hazırlanan 24 kuyucuklu bir plakanın şematik görüntüsü yer almaktadır.

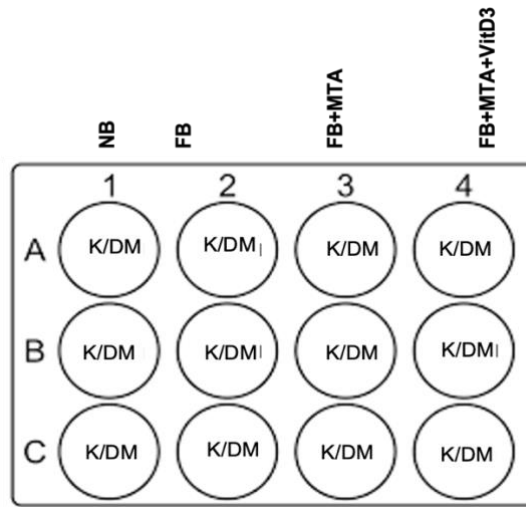


**Şekil 3.5.** Kontrollerden (K) ve DM hastalarından edilen dental pulpa kök hücrelerinin farklı farklılaştırma besi yerlerine maruz kaldığını gösteren 24 kuyucuklu plakanın şematik çizimi.

Farklılaşmanın 14. gününü takiben hücre içi kalsiyum sentezini ve/veya birikimini saptamak için kullanılacak Alizarin Kırmızısı S boyaması için toz halindeki 2 gr Alizarin Kırmızı S (ab146374, lot: GR3267144-4, Abcam), 100 mL distile su ile karıştırıldı. Karışıma %0,5'lik amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) eklenerek pH'sı 4,2-4,3'e ayarlandı. Boyama işleminden önce fikse edilen hücrelerin boyayı daha iyi içine alması için sırasıyla %96, %80, %70'lik alkolden geçirildi. Taze hazırlanan Alizarin Kırmızı S fikse edilen hücrelerin üzerinde 40 dk süreyle karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra alkol basamağı düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru sırasıyla tekrarlandı ve en son olarak boyanan hücreler distile su ile 2 kere yıkanarak ışık mikroskobu altında incelendi. Devamında örnekler asetik asit ile literatürdeki adımlar takip edilerek muamele edildi (179). Hücreler 30 dk boyunca %10 asetik asitle bekletildikten sonra süspansiyon 1,5 mL eppendorflara aktarıldı. Eppendorflar 30 sn vortekslendikten sonra 10 dk 85°C'de ve akabinde 5 dk buzda bekletildi. Devamında önceden +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde (U-320 R, Boeco, Almanya) 12000rpm'de 15 dk santrifüj edilen eppendorflardan süpernatant yeni eppendorflara aktarıldı. Tekrar pH karışıma %0,5'lik amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) eklenerek 4,2-4,3'e ayarlandı. Daha sonra süspansiyon ve oluşturulan standartlar 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Alizarin kırmızısı spektrofotometrik olarak 405 nm'de kantite edildi.

### 3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Şekil 3.6.'da şematik çizimi görülen 12 kuyucuklu plakalardan elde edilen hücrelerden farklılaştırmanın 14. gününde izole edilen RNA'larından Bölüm 3.3.2.'de belirtildiği gibi cDNA'lar sentezlendi. Başlangıçta her bir kuyucuğa  $10^5$  hücre ekildi ve hücreler, %80 yoğunluğa ulaştığında Bölüm 3.4.1.'de elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan besi yeri kombinasyonları ile hücreler 2-3 günde bir değiştirilen besi yerleri ile farklılaştırmaya maruz bırakıldı.



**Şekil 3.6.** Kuyucuklara kontrollerden (K) ya da DM hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücreleri ekilmiştir. Toplamda 6 adet 12 kuyucuklu plaka hazırlanmıştır.

Sentezlenen primerin cDNA üzerindeki ilgili bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını göstermek için Bölüm 3.3.'te anlatılan PZR ve jel elektroforez işlemleri yapıldı. GZ-PZR ise primerin etkisiyle çoğalan cDNA'nın miktarı ile ilgili veri sağlaması ve kantitasyon imkânı olması nedeniyle gerçekleştirildi. Reaksiyon sırasında kullanılan SYBR green boyası, yeni oluşan DNA moleküllerine bağlanarak floresan ışımaya yapar. Bu ışımaya, GZ-PZR cihazı tarafından algılanarak ışımının şiddetine rakamsal değer verilir, böylece sentez edilen DNA'nın miktarı ölçülür.

GZ-PZR için Sigma Sybr® Green JumpStart™ Taq Ready Mix™ kiti kullanıldı ve karışım enzimi, 25 mM MgCl<sub>2</sub>'yi, forward primeri, reverse primeri, distile suyu ve cDNA'yı kapsayacak şekilde hazırlandı. Karışımlar, cDNA içermeyen negatif kontroller

ve standartlar 96 kuyucuklu şeffaf plakalara (Multiplate™ PCR plates 96-well clear, Bio-Rad, katalog no: MLP9601) yerleştirildi ve şeffaf filmler (Microseal® 'B' seal Seals, Bio-rad, katalog no: MSB1001) ile üzeri dikkatli bir şekilde kapatıldı. Plakalar iQ™5 Bio-Rad cihazına yerleştirilmeden önce 2 dk süreyle 1000 rpm'de santrifüj edildi. Cihaza yerleştirilmeden önce GZ-PZR şartları cihaza aşağıdaki şekilde girildi:

- 95°C' de 2 dk 1 kez (denatürasyon basamağı için)
  - 95°C' de 10 sn +58-60°C'de 20 sn 40 kez (amplifikasyon basamağı için)
  - 95°C' de 10 sn ve 55°C' de 20 sn 1 kez işlemlerinden oluşan ısı döngüleri uygulandı.
- Örnekler jele yüklenene dek -20°C'de saklandı.

Farklılaşan hücrelerin ve farklılaşma ajanlarını içermeyen besi yerinde çoğaltılan hücrelerin cDNA'ları *COL1α1*, *DMP-1*, *DSPP*, *OCN* genlerinin ekspresyonları için kullanılırken, kök hücre karakteristiğini göstermek için sadece farklılaşma ajanlarını içermeyen besi yerinde çoğaltılan hücrelerin cDNA'ları kullanıldı. Bu hücreler ile *Nanog*, *Oct-4*, *CD34*, *CD45*, *CD73*, *CD90*, *CD106* genlerinin ifadeleri değerlendirildi. Her iki durumda da β-aktin normalizasyonda *housekeeping* gen olarak kullanıldı ve elde edilen değerler  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak analiz edildi. İşlemler 3 tekrar halinde gerçekleştirildi.

### 3.7. İmmüno Floresan boyama

Bölüm 3.5'te açıklandığı gibi hazırlanan 24 kuyucuklu 3 plakaya hücrelerin ekiminden önce steril yuvarlak uygun boyutlu lameller yerleştirildi ve hücreler bu lamellerin üzerine ekildi. Odonto/osteojenik indüklemeyi takiben dental pulpa kök hücreleri 14. günde, %4 paraformaldehit ile 15 dk boyunca fikse edildi, devamında hücreler 2 kez 0,5 mL PBS ile yıkandı. Fiksasyon sonrası hücreler 60 dk süreyle %10 keçi serumunda bloke edildi. Daha sonra tavşan poliklonal primer antikolar ile [Anti-BSP II (1:100, Abcam, ab52128), Anti-DMP-1 (1: 100 Abcam, ab103203), Anti-kolajen 1 ile (1:100, Abcam, ab34710)] hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi (180). Tekrar PBS ile yıkanan hücreler devamında 37 °C'de 1 saat boyunca spesifik ikincil antikor (goat anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488; ab150077, 1:1000) ile inkübe edildi. Nükleer boyanma için, hücreler oda sıcaklığında 1 dk DAPI (1:4000) ile

muamele edildi. *ProLong<sup>TM</sup> Gold anti-fade reagent with DAPI* (Invitrogen, Thermo Fisher) ajan ile lama yapıştırılan lameller 24 saat sonra floresan mikroskobunda (Axioplan 2, Carl Zeiss) görüntüledi. Görüntüler ayrıca Image J yazılımı (1.53a, Wayne Rasband, Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD) kullanılarak floresan yoğunluğu açısından kantite edildi.

### **3.8. Verilerin Analizi**

Deneylemler sonucunda elde edilen veriler (MTT değlerleri, alizarin kırmızısı absorban değlerleri,  $2^{-(\Delta\Delta ct)}$  değlerleri, göreceli floresan kantitasyon değlerleri) normal dağılım açısından Shapiro-Wilk testi ile değlendirildi. Veriler normal dağılım göstermeleri durumunda iki yönlü varyans analizi ya da tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi ile 0,05 anlamlılık düzeyinde değlendirildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin analizi Kruskal-Wallis ve Dunn post-hoc testleri ile yapıldı. İstatistiksel analizlerin yapılmasında GraphPad Prism versiyon 9.0.0 deneme sürümü paketi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Dental Pulpa Dokusunun Elde Edildiği Bireyler

Tablo 4.1.'de çalışmada kullanılan dental pulpa dokularının elde edildiği hastaların demografik bilgileri yer almaktadır.

**Tablo 4.1.** Pulpa dokularının elde edildiği hastaların demografik verileri.\*

Bireyler	Cinsiyet	Yaş	Kullanılan İlaçlar
K	K	32	X
K	K	28	X
K	E	26	X
DM	K	23	İnsülin (5 yıl)
DM	K	25	İnsülin (2 yıl)
DM	K	23	İnsülin (3 yıl)

\*K: Kontrol, DM: Diyabet hastalığı, K: Kadın, E: Erkek, AB: antibiyotik

Çalışmaya sigara içmeyen ve son 2 hafta içinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullanmayan bireyler dahil edilmiştir. Dental pulpa kök hücreleri çekimi Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Bölümünde yapılan muayeneleri sonucunda uygun görülen gömülü/yarı gömülü 3. büyük azı dişlerinden elde edilmiştir. Kontrollerin 2'si kadın 1'i erkek olup yaş ortalaması 28,66 iken, diyabet hastalarının hepsi kadın ve Tip 1 diyabet olup yaş ortalaması 23,66 idi. Kontrollerin bilinen hiçbir sistemik hastalığı olmayıp, diğer bireylerin sadece Tip 1 diyabet oldukları, insülin kullandıkları ve HbA<sub>1c</sub> değerlerinin %7'nin altında olduğu tespit edilmiştir (EK-7). Çalışmanın örnek toplama döneminde çalışmanın dahil edilme kriterlerine uygun Tip 2 diyabet hastalarının dişlerinden pulpa dokusu izole edilememiştir. Bu nedenle deneylerde sadece Tip 1 diyabet hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücreleri kullanılmıştır. Bulgular bölümünde tablo ve şekillerde yer alan DM kısaltması Tip 1 diyabet hastalarını simgelemektedir.

#### 4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

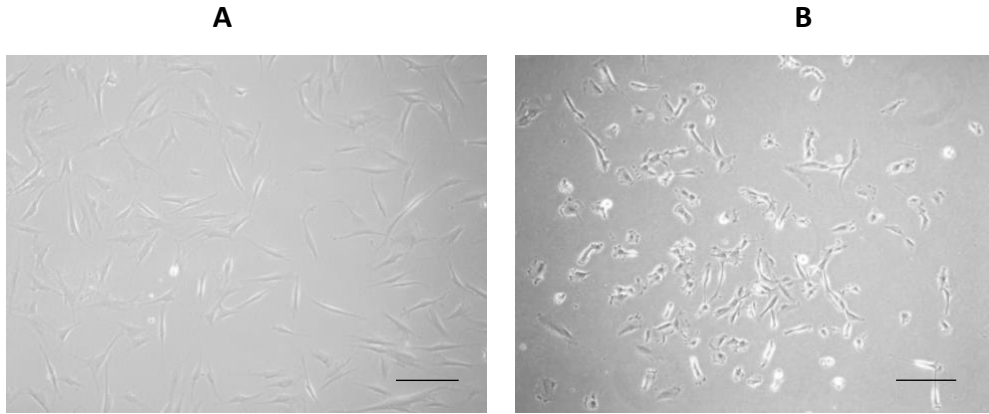
Dış çekimlerini takiben hücre kültürü laboratuvarında enzimatik olarak ayrıştırılan dental pulpa dokusu uygun şartlarda inkübe edilerek pasajlanmıştır. Pulpa dokusunda, fibroblastlar, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve diğer hücre tipleri (makrofajlar, lenfositler vb.) bulunmaktadır. Dental pulpa kök hücreleri fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücreler olduğu (Şekil 4. 1.) için hücre kültürü ortamında ayırt edilmeleri zordur. Bu nedenle, izole edilen hücrelerde fibroblast kontaminasyonunun olmadığını göstermek için mezenkimal kök hücreler tarafından gen ifadesi bildirilen, ancak fibroblastlar tarafından ifadesinin olmadığı belirtilen CD106 geni (181) için primerler sentezlenmiştir. Fibroblast kontaminasyonunun olmadığını göstermek için deri fibroblast hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.2.). Kök hücrelerin izole edildiğini göstermek için ise ticari olarak elde edilen dental pulpa kök hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm hücrelerden, elde edilen RNA'nın nanodrop cihazında ölçülen saflık ve miktarları Tablo 4.2.'de yer almaktadır. İzole edilen RNA'nın saflık ve miktarının cDNA sentezi için uygun olduğu belirlendikten sonra sentezlenen cDNA'lar ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.2.** Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar tayini sonuçları.

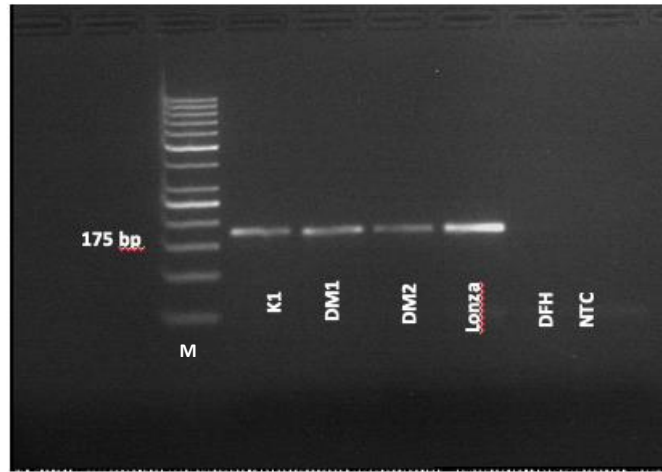
Örnek Adı	260/280	260/230	ng/ $\mu$ l
DM1	1,80	1,90	466,3
DM2	1,98	1,87	1084,0
DM3	1,92	2,20	637,2
K1	2,07	1,66	979,9
K2	2,05	2,17	690,6
K3	1,94	2,04	2216,7
Lonza- Ticari dental pulpa kök hücre hattı	1,85	1,75	736,6
DFH	1,93	1,88	857,7

DFH: Deri Fibroblast Hücreleri; DM: Tip 1 Diyabet, K: Kontrol





**Şekil 4.1.** Işık mikroskobu altında deri fibroblast hücreleri (A) ve dental pulpa kök hücrelerinin (B) görünümü (Büyütme: 10x).

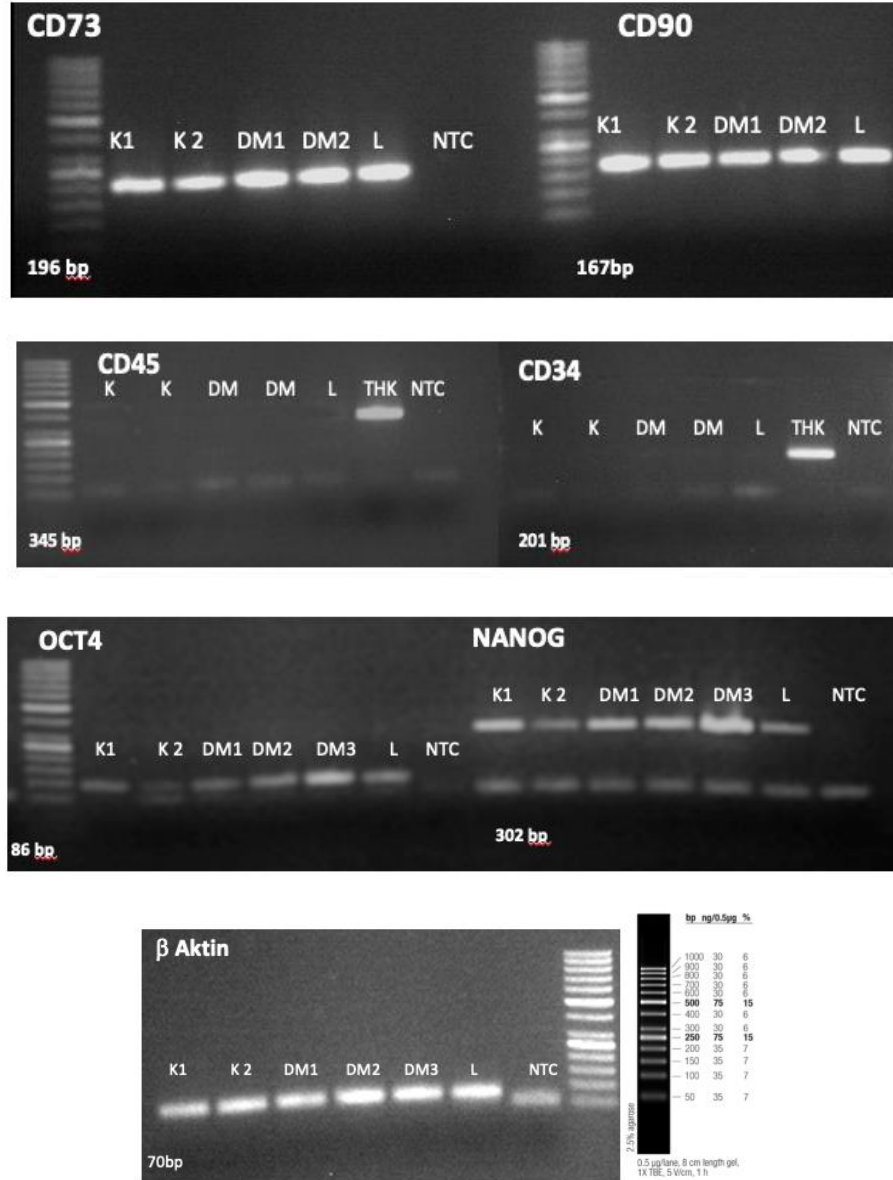


**Şekil 4.2.** CD106 genine ait cDNA amplifikasyonunun agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü, M: Marker (DNAmark 50bp PLUS), K: Kontrol, DM: Tip 1 Diyabet, DFH: Deri Fibroblast Hücresi, NTC: örnek içermeyen kontrol.

Kontrolde, hastalardan ve de ticari dental pulpadan izole edilen hücrelerin CD106 ifadesine sahip olduğu ancak deri fibroblastında ve negatif kontrolde ifade olmadığı Şekil 4.2.'de görülmektedir. Bu veri de örneklerde fibroblast kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.

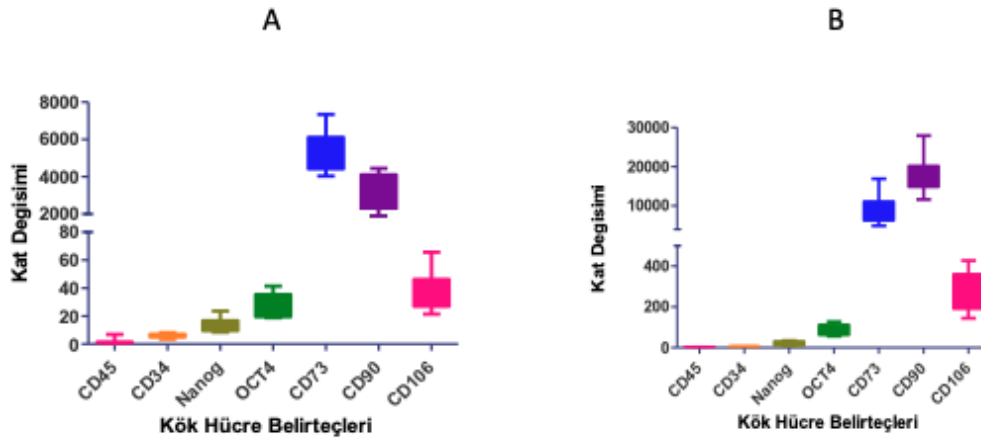
Akış sitometri çalışmalarında mezenkimal kök hücre popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD73 (ekto-5'-nükleotidaz), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin) antijenleri için pozitif olduğu; CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$ , HLA sınıf II gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranlarının da %2'yi geçmediği pek çok kez gösterilmiştir (80, 81). Bu bilgilerin ışığında mezenkimal kök hücrelerin izole edildiğini gösterebilmek için pozitif antijenlerden CD73 ve CD90 için, hematopoietik

antijenlerden CD34 ve CD45 için primerler sentezlenmiştir. Ayrıca kök hücreler tarafından ifade edilen transkripsiyon faktörlerinden *Oct-4* ve *Nanog* için de primerler sentezlenmiştir. Bu primerler ile yapılan cDNA amplifikasyonunun agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3.'de yer almaktadır.  $\beta$ -aktin *housekeeping* gen olarak kullanılmıştır. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.



**Şekil 4.3.** Dental pulpa dokusundan izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliği taşıdığını göstermek için kullanılan genlerin cDNA amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüleri (K: Kontrol, DM: Tip 1 Diyabet hastaları, L: Lonza ticari dental pulpa hücreleri, THK: Ticari Hematopoietik Kök Hücre, NTC: örnek içermeyen kontrol).

Kök hücre belirteçlerinin ifadeleri GZ-PZR deneyleri ile de analiz edilmiştir. Normalizasyonda *housekeeping* gen olarak  $\beta$ -aktin kullanılmış ve CD45'in *cycle threshold (Ct)* değerleri bir olarak kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır. Genlerin,  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  metoduna göre hesaplanan kat değişimleri Şekil 4.4.'de yer almaktadır.



**Şekil 4.4.** Kontrollerden (A) ve hastalardan (B) elde edilen dental pulpa kök hücreleri ile yapılan GZ-PZR deneyleri sonucunda oluşan göreceli kat değişimleri (n=9).

İzole edilen hücrelerde mezenkimal kök hücre antijeni olan CD73 ve CD90 ifadesinin oldukça yüksek olduğu ve hematopoetik antijenlerden CD34 ve CD45'te jelde bant görüntüsü izlenmediği ve GZ-PZR'deki kat değişiminin oldukça az olduğu görülmüştür (Şekil 4.3., Şekil 4.4., EK-4.). Bu bulgular sonucunda pulpa dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında farklılaştırma deneylerinde kullanılacak besi yerinin optimizasyonu bulguları yer almaktadır.

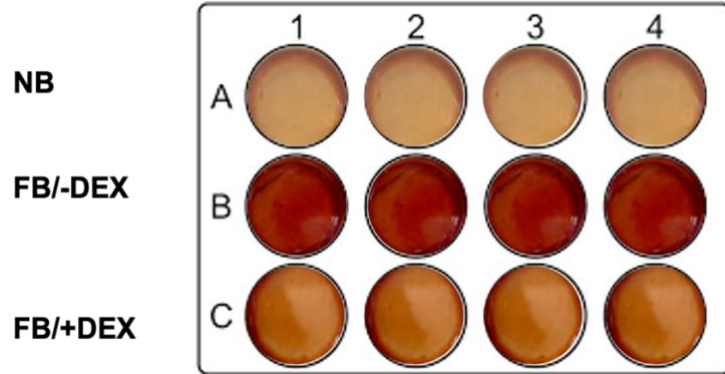
### 4.3. Farklılaştırma Besi Yerinin Oluşturulması

Farklılaştırma besi yerinin optimizasyon deneylerinde kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücreleri kullanılmıştır. Farklılaştırma için standart bir besi yeri olmamakla beraber odonto/osteojenik farklılaştırmayı indükleyen besi yerinde yaygın olarak  $\beta$ -gliserofosfat ( $\beta$ -GP), askorbik asit ve deksametazon kullanılmaktadır.  $\beta$ -GP mineral oluşumunda fosfat kaynağı olarak görev alır, askorbik asit Tip 1 kolajen

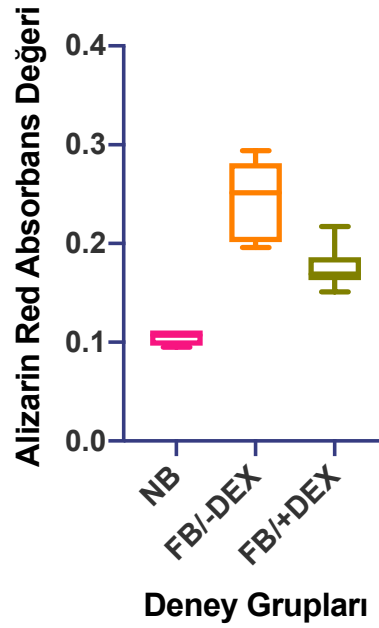
salgısını arttırır. Deksametazon ise mitojen aktive protein kinazı aktive ederek Runx2'yi regüle eder; ancak farklılaştırma deneylerine başlamadan önce literatürde bazı çalışmalarda deksametazonun kullanılmadığı görülmüştür (175-177). Bu nedenle ilk olarak odonto/osteojenik farklılaşma deneylerinde kullanılan 100 nM (182) deksametazon FB'ye (Farklılaştırma besi yeri: düşük glikoz içeren DMEM + %1 AmfB+100 U/mL PenStrep+ %10 FBS + 10mM  $\beta$ GP+ 50 $\mu$ g/mL AA) eklenmeden ve eklenerek hücreler 14 gün boyunca farklılaştırılmaya maruz bırakılmıştır.

#### 4.3.1. Deksametazon İlavésinin Etkisi

Planlanan deney süresinin sonunda hücreler odonto/osteojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan kalsiyum odaklarını kırmızı/turuncu renkte boyayan alizarin kırmızısı ile boyanmış ve sonrasında spektrofotometrik olarak kantite edilmiştir. Şekil 4.5.'te boyanma sonucunda kuyucukların görüntüsü ve Şekil 4.6.'da alizarin kırmızısı boyamasının spektrofotometrik sonuçları yer almaktadır. İstatistiksel karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi yapılmıştır ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.5.** Kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin farklılaştırma ajanları ilave edilmeyen normal besi yerine (A: NB), deksametazon ilave edilmeyen farklılaştırma besi yerine (B: FB/-DEX), deksametazon ilave edilen farklılaştırma besi yerine (C: FB/+DEX) maruz kalması sonucu alizarin kırmızısı boyaması görüntüsü.



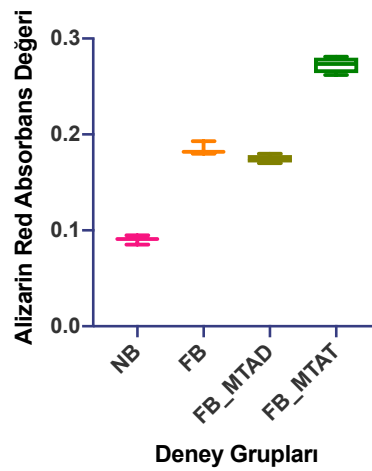
**Şekil 4.6.** Dekametazonun Farklılaşmaya Etkisi: Farklılaştırma ajanları ilave edilmeyen normal besi yerine (NB), deksametazon ilave edilmeyen farklılaştırma besi yerine (FB/-DEX), deksametazon ilave edilen farklılaştırma besi yerine (FB/+DEX) maruz kalan hücrelerin spektrofotometrik analizi. FB/-DEX anlamlı olarak diğer gruplara göre daha fazla kalsiyum odağı oluşmasına neden olmuştur. (İstatistiksel karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı  $p < 0,05$ ,  $n = 9$ , OD: 405 nm).

Kalsiyum birikimini gösteren alizarin kırmızısı boyasının spektrofotometrik kantitasyonu besi yerine deksametazon eklenmediği zaman alizarin kırmızısı boyaması sonucunda daha yüksek absorbans değerleri elde edildiği tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ), bu nedenle farklılaştırma besi yerine deksametazon ilave edilmemesine karar verilmiştir.

#### 4.3.2. MTA Hazırlama Yönteminin Belirlenmesi

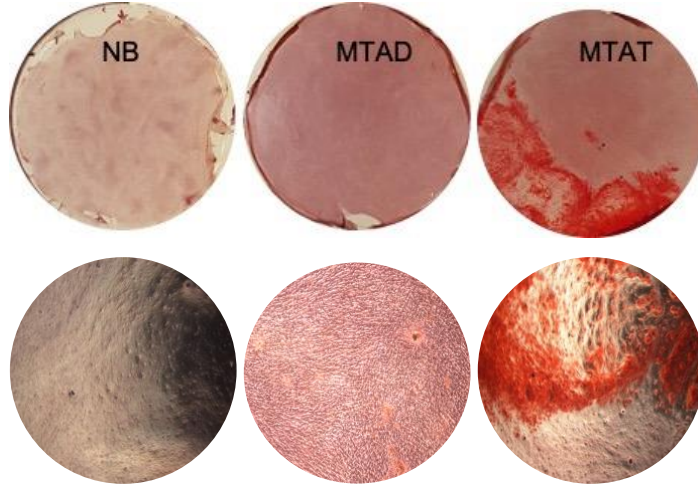
MTA'nın hazırlanmasında iki farklı yöntem test edilmiştir. Bunlardan ilkinde MTA doğrudan besi yerinde çözüldükten sonra filtre edilen besi yeri kullanılmıştır. İkincisinde ise üretici talimatları doğrultusunda su ile karıştırılan MTA teflon disklerle konulmuş, bu şekilde sertleşen MTA diskleri daha sonra besi yerine konmuş ve literatürde önerilen bekleme süresinin sonunda diskler uzaklaştırılarak besi yeri yine filtre edilmiştir. Farklılaştırma ajanları içermeyen normal besi yerine, farklılaştırma

ajanları (10mM  $\beta$ GP+ 50 $\mu$ g/mL AA) içeren toz halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine ve farklılaştırma ajanları (10mM  $\beta$ GP+ 50 $\mu$ g/mL AA) içeren disk halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine 14 gün süreyle maruz kalan hücreler yine farklılaşmanın bir göstergesi olan kalsiyum odaklarını kırmızı/turuncu renkte boyayan 4,2-4,3 pH'daki alizarin kırmızısı ile boyanmıştır. Şekil 4.7. ve EK-4.'te kantite edilen alizarin kırmızısı boyamasının sonuçları yer almaktadır. İstatistiksel karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi kullanılmıştır ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4. 7.** MTA'nın Farklılaşmaya Etkisi I: Farklılaştırma ajanları ilave edilmeyen normal besi yerine (NB), sadece farklılaştırma ajanlarını (10mM  $\beta$ GP+ 50 $\mu$ g/mL AA) içeren besi yerine (FB), farklılaştırma ajanları içeren disk halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine (FB\_MTAD) ve farklılaştırma ajanları içeren toz halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine (FB\_MTAT) maruz kalan hücrelerin spektrofotometrik analizi. FB\_MTAT anlamlı olarak diğer gruplara göre daha fazla kalsiyum odağı oluşmasına neden olmuştur. (İstatistiksel karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı  $p<0,05$ ,  $n=9$ , OD: 405 nm).

Şekil 4.8.'de alizarin kırmızısına maruz kalan dental pulpa kök hücrelerinin kuyu ve ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır. Farklılaştırmanın göstergesi olan kalsiyum odakları alizarin red boyaması sonucunda kırmızı/turuncu renkte gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.8.** MTA'nın Farklılaşmaya Etkisi II: Farklılaştırma ajanları ilave edilmeyen normal besi yerine (NB), farklılaştırma ajanları içeren disk halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine (FB\_MTAD) ve farklılaştırma ajanları içeren toz halindeki MTA'dan elde edilen besi yerine (FB\_MTAT) maruz kalan hücrelerin alizarin red boyaması sonrasında kuyu ve ışık mikroskobu görüntüsü (Büyütme: 4x).

Her iki yöntemle hazırlanan MTA, NB'ye maruz kalan hücrelere göre anlamlı farklılıklar oluştursalar da toz şeklinde doğrudan besi yerine ilave edilen MTA'nın (FB\_MTAT) farklılaştırma üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Bu nedenle MTA'nın besi yerine toz halinde ilave edilmesine karar verilmiştir. 0,02 mg/mL ve 0,002 mg/mL konsantrasyonlarında MTA eklenen besi yerine 10 nM veya 100 nM  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  ilave edilerek bir sonraki iş paketi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.3. $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ve MTA Konsantrasyonlarının Optimizasyonu

$1\alpha,25(OH)_2D_3$  ve MTA'nın yüksek konsantrasyonlarının sitotoksik olduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonlarının optimizasyonu için literatürde dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde sıklıkla kullanılan testlerden biri olan MTT testi kullanılmıştır. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyal sitotoksik değil ise hücrede dehidrogenaz aktive olur ve mavi/mor renkli formazan çökeltisi oluşur. Formazan oluşumu, optik yoğunluğun spektrofotometre ile ölçülmesi veya elektron mikroskobuyla test örneğinin çevresindeki formazan ışığın belirlenmesi yöntemleriyle saptanmaktadır.

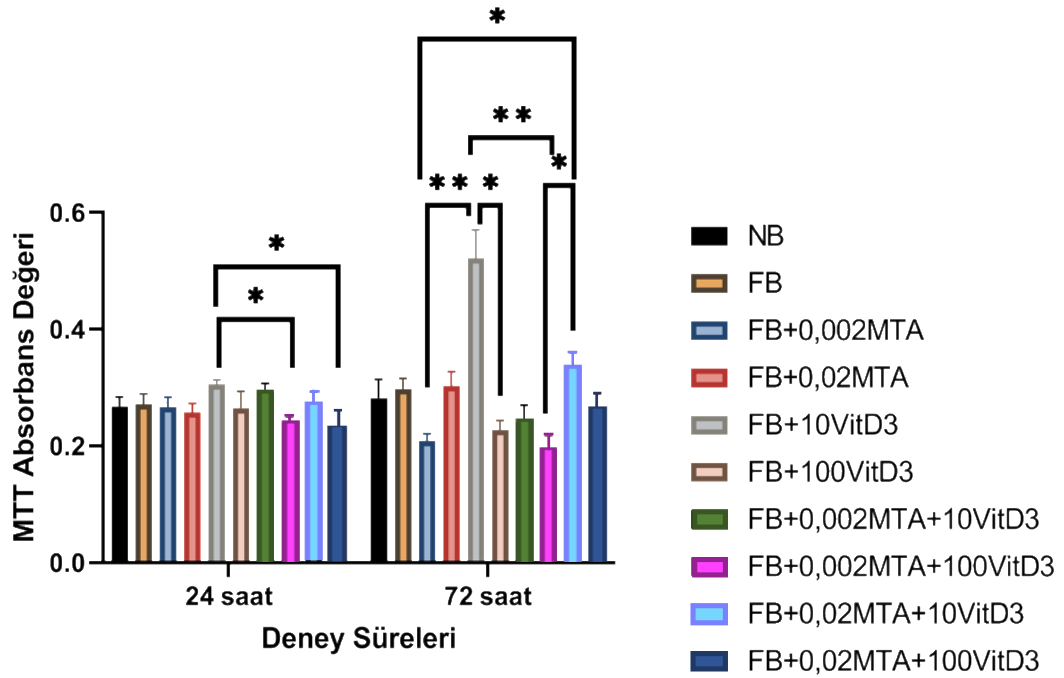
Proliferasyonun saptanması ve oluşabilecek farklılıkların tespit edilmesi için hücreler 24 ve 72 saat süreyle Tablo 4.3.'teki besi yerlerine maruz bırakılmıştır.

**Tablo 4.3.** MTT testinde kullanılan besi yerleri.

Besi yeri	İçeriği
<b>Normal Besi yeri (NB)</b>	DMEM düşük glikoz, %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 AmfB
<b>Farklılaştırma Besi yeri (FB)</b>	NB, 10mM $\beta$ -GP, 50 $\mu$ g/mL AA
<b>FB_MTA</b>	FB, 0,002mg/mL MTA
	FB, 0,02mg/mL MTA
<b>FB_1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D3</b>	FB, 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3
	FB, 100 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3
<b>FB_MTA_1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D3</b>	FB, 0,002mg/mL MTA, 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3
	FB, 0,002mg/mL MTA, 100 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3
	FB, 0,02mg/mL MTA, 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3
	FB, 0,02mg/mL MTA, 100 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3

MTT test sonuçları Şekil 4.9.'da yer almaktadır. Değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Dunn testleri kullanılmıştır ( $p < 0,05$ ).





**Şekil 4.9.** MTT testi sonucu: İlgili gruplar renk kodları ile belirtilmiştir. Değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Dunn testleri kullanılmıştır ( $p < 0,05$ ). 24. ve 72. saatin sonunda anlamlı farklılık belirlenen gruplar \* ile gösterilmiştir ( $n=6$ , \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). 72. saatin sonunda gruplar arasında daha çok farklılık ortaya çıktığı görülmüştür. (**NB**: DMEM düşük glikoz, %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 AmfB; **FB**: NB+ 10mM  $\beta$ -GP+ 50  $\mu$ g/mL AA).

Grupların 72. saatteki değerleri incelendiğinde 10 nM konsantrasyonda FB'ye eklenen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün 72 saat sonunda proliferasyon düzeyinde 100 nM konsantrasyonda FB'ye eklenen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e göre anlamlı şekilde artmaya neden olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). 10 nM konsantrasyondaki  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ile kombine edilen 0,02 mg/mL ve 0,002 mg/mL MTA değerlendirildiğinde, proliferasyonda artışa yol açan konsantrasyonun 0,02 mg/mL MTA olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu optimizasyon deneyleri sonucunda farklılaştırma sırasında kullanımına karar verilen besi yerleri ve içerikleri Tablo 4.4.'te yer almaktadır.

**Tablo 4.4.** Çalışmada kullanılan besi yerleri ve içerikleri.

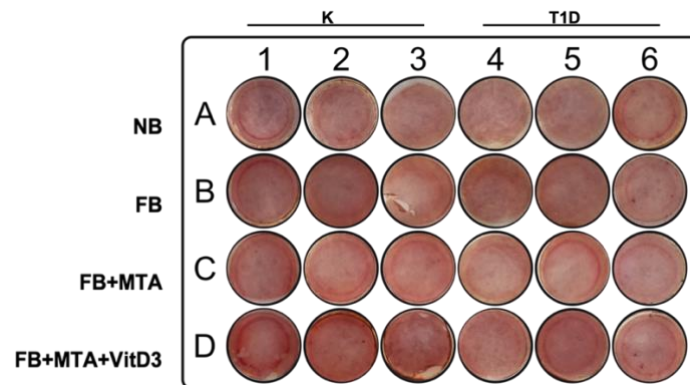
Besi yeri	İçeriği
<b>Normal Besi yeri (NB)</b>	DMEM düşük glikoz, %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 AmfB
<b>Farklılaştırma Besi yeri (FB)</b>	NB, 10mM $\beta$ -GP, 50 $\mu$ g/mL AA.
<b>FB +MTA</b>	FB, 0,02mg/mL MTA
<b>FB +MTA+VitD3</b>	FB +MTA, 10nM $1\alpha,25(OH)_2D3$

Bu aşamadan sonra yer alan besi yerlerinde bu konsantrasyonlardaki ajanlar kullanılmıştır ve besi yerleri Tablo 4.4.'teki gibi kısaltılmıştır.

#### 4.4. Odonto/Osteojenik Farklılaşmanın İncelenmesi

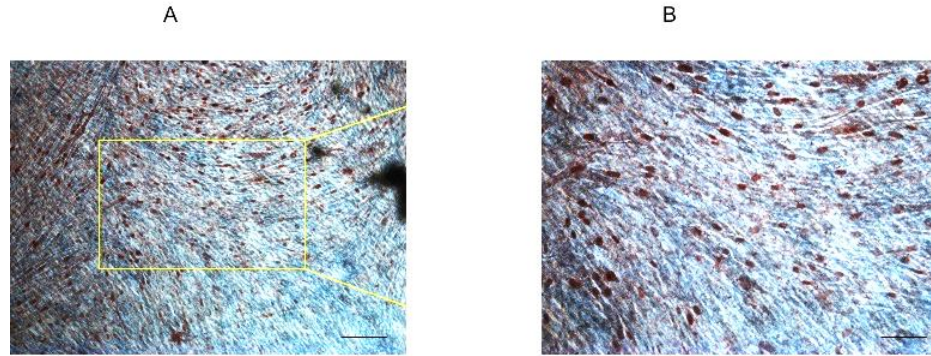
##### 4.4.1. Kalsiyum Odaklarının Alizarin Kırmızısı ile Gösterilmesi

Besi yeri optimizasyonu sırasında kullandığımız alizarin red boyası oldukça asidik olup yeni oluşan kalsiyum odaklarına (bazik özellikte) bağlanarak turuncu/kırmızı renkli boyanmalar oluşturur. Kırmızı odakların miktarı ile farklılaşma arasında pozitif korelasyon mevcuttur. Bölüm 3.5.'te kullanılan ve 3 tekrarı olan deney düzeneğinin alizarin kırmızısı ile muamelesi sonucunda kuyuların görüntüsü Şekil 4.10.'da yer almaktadır.



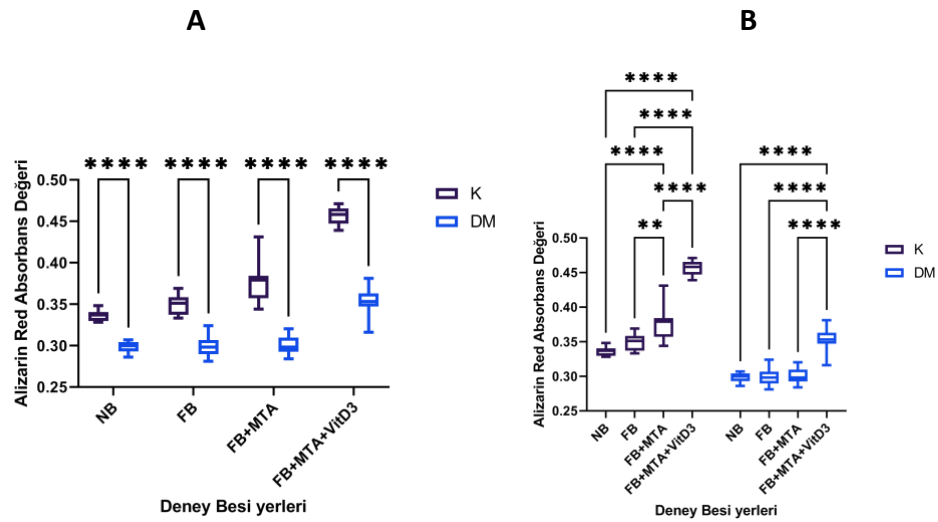
**Şekil 4.10.** Kontrol (A, B, C, D: 1-3) ve Tip 1 diyabet hastalarından (A, B, C, D: 4-6) elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin 14. gündeki alizarin kırmızısı muamelesi sonrasındaki görüntüleri.

FB+MTA+VitD3 besi yerine maruz kalarak farklılaştırılan kontrol hücrelerindeki kalsiyum odaklarının ışık mikroskobu görüntüsü Şekil 4.11.'de yer almaktadır.



**Şekil 4.11.** MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kombinasyonu ile farklılaştırılan kontrol hücrelerindeki kalsiyum odakları (Büyütme: A: 4x, B:10x).

Alizarin boyamasının kantite edilmesiyle elde edilen veriler normal dağılım gösterdiği için iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. İkili karşılaştırmalarda Bonferroni post-hoc testi kullanılmıştır ( $p < 0,05$ ). Sonuçlar Şekil 4.12.'de yer almaktadır.



**Şekil 4.12.** Alizarin kırmızısının 405nm'de spektrofotometrik olarak kuantifiye edilmesi sonucu elde edilen absorbans değerleri. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testle yapılmıştır. Anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir (n=27, \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). K: Kontrol, DM: Hasta grubu.

Şekil 4.12.'deki karşılaştırmalara baktığımızda;

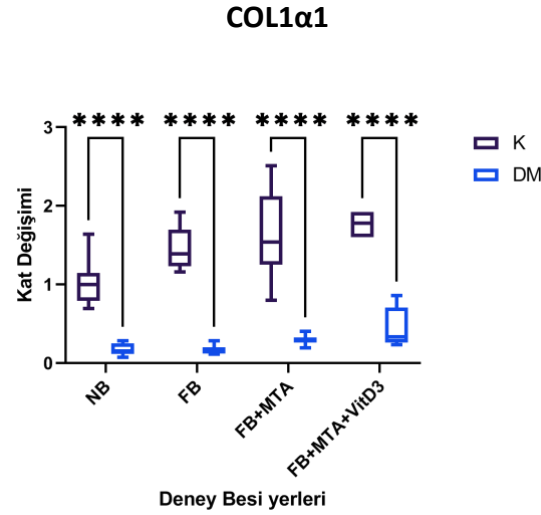
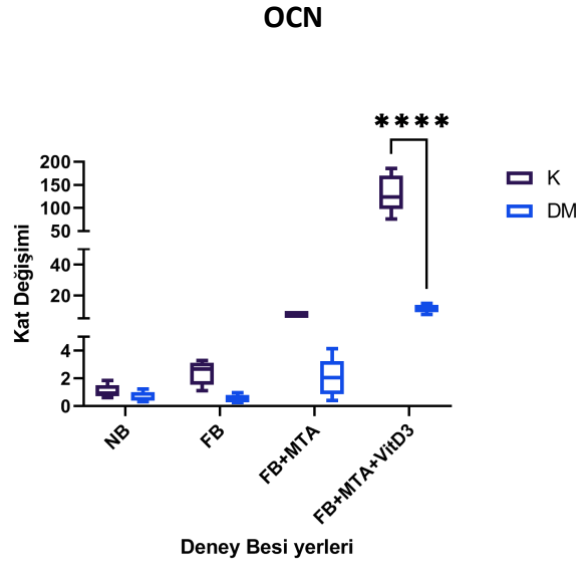
- A) Kontrol ile DM gruplarının karşılaştırılması: Tüm koşullarda kontrollerden elde edilen hücrelerin daha yüksek absorbans gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.12. A;  $p < 0,0001$ ).
- B) Farklı besi yerlerinin karşılaştırılması: Kontrol hücrelerinde FB+MTA+VitD3 kombinasyonu diğer besi yerlerden daha fazla kalsiyum birikimine neden oldu ( $p < 0,0001$ ). FB+MTA besi yeri ise NB ve FB besi yerlerden daha fazla kalsiyum birikimine neden oldu ( $p < 0,001$ ). DM hücrelerinde FB+MTA+VitD3 kombinasyonu tüm besi yerlerinden daha fazla kalsiyum birikimine neden oldu ( $p < 0,0001$ ).

Alizarin kırmızısı boyamasından elde edilen veriler değerlendirildiğinde kontrol hücrelerinde farklılaşma besi yerine yalnızca MTA ilavesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde kalsiyum birikimini sağlayabildiği görülmüştür. Ancak, DM hücrelerinde farklılaşmanın oluşturulabilmesi için yalnızca MTA'nın yeterli olmadığı ve besi yerine VitD3 ilavesinin de gerekli olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.4.2. Odonto/Osteojenik Farklılaşma Belirteçlerinin İfadesinin Analizleri**

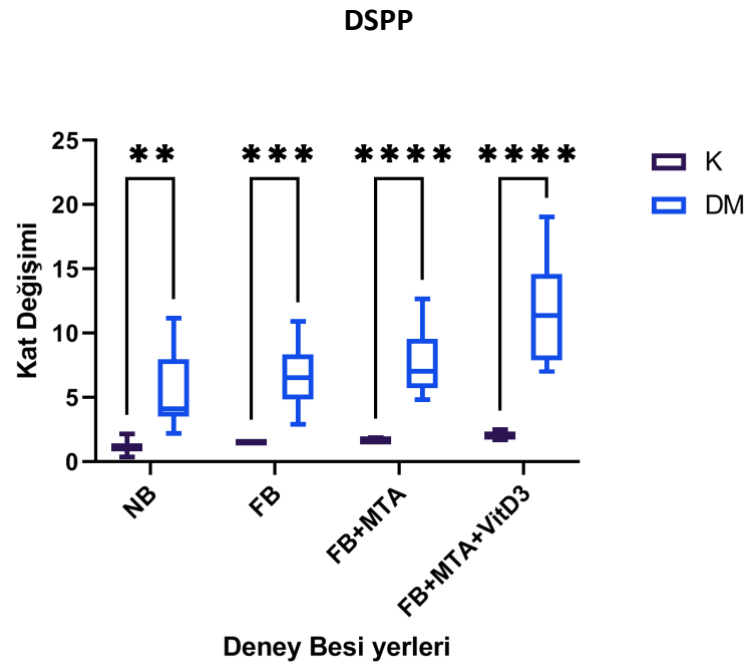
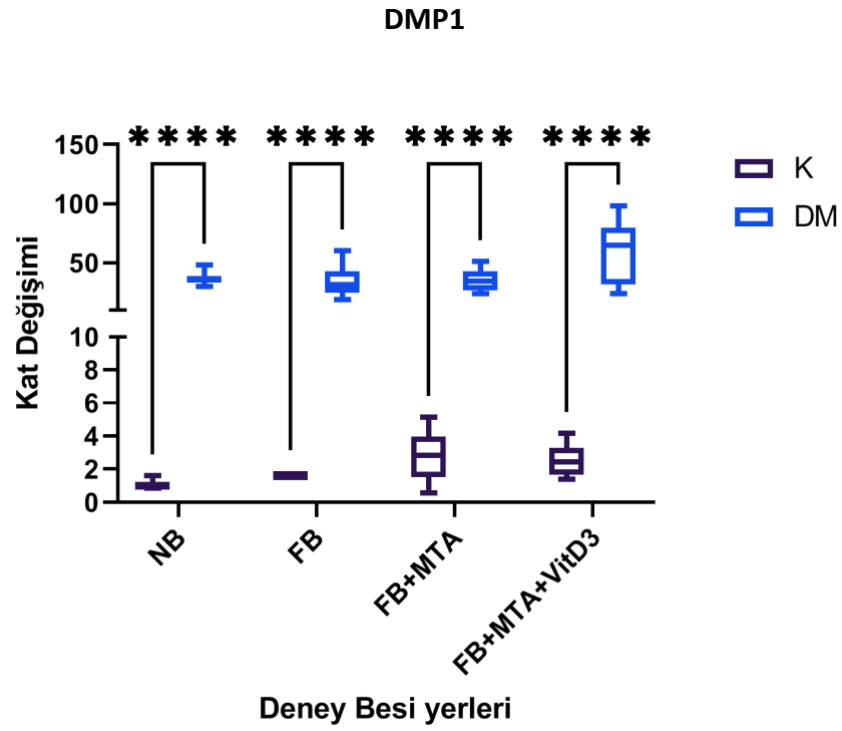
Odonto/osteojenik farklılaşma potansiyeli literatürde farklı yöntemlerle incelenmektedir. Hücre dışındaki kalsiyum birikiminin, alizarin kırmızısı ve Von Kossa ile değerlendirilmesi (179), *ALP*, *OCN*, *OPN*, *COL1 $\alpha$ 1*, *BSPII*, *Runx-2*, *DSPP*, *DMP1* gibi özelleşmiş odonto/osteogenez belirteçlerinin ifadesinin ölçülmesi (183) bu yöntemler arasındadır. Tez çalışmasında literatürdeki diğer çalışmalar gibi 14. gün sonunda (41, 184) hücre dışındaki kalsiyum birikimi alizarin kırmızısı ile kantite edilmiş, *OCN*, *COL1 $\alpha$ 1*, *DSPP*, *DMP1* ifadeleri de göreceli olarak değerlendirilmiştir.

Farklılaşma belirteçlerinin ifade analizinde ilk olarak kontrol ve hasta grupları karşılaştırılmıştır ve sonuçlar K\_NB kontrol grubuna göre normalize edilmiştir.  $2^{-(\Delta\Delta ct)}$  metoduna göre elde edilen verilerin karşılaştırmalarında iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testi kullanılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen kat değişimleri Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve EK-4.'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.13.** Kontrollerde (K) ve Tip 1 diyabet hastalarındaki (DM) OCN ve COL1 $\alpha$ 1 genlerindeki ifade değişimi. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testle yapılmıştır. Anlamli farklılıklar \* ile gösterilmiştir (n=9, \*\*\*\*p<0,0001).

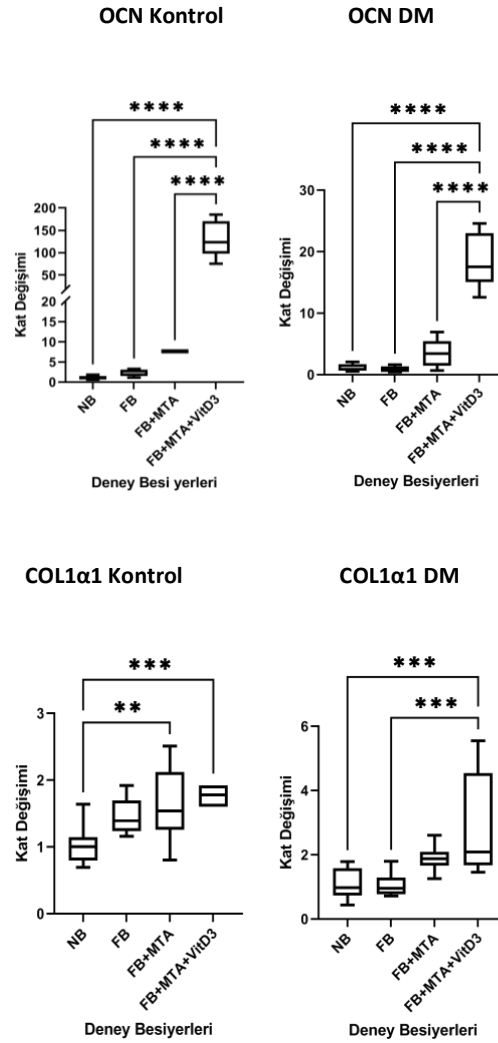
İkili karşılaştırmaların sonuçlarına göre OCN'de sadece FB+MTA+VitD3 besi yerine maruz kalan kontrol ve DM arasında anlamlı kat değişimi gözlenmiştir (p<0,0001). COL1 $\alpha$ 1'e baktığımızda ise tüm ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Kontrollerden elde edilen hücreler tüm besi yerlerinde DM'den elde edilen hücrelere göre anlamlı seviyede yüksek COL1 $\alpha$ 1 ifadesi göstermiştir (p<0,05).



**Şekil 4.14.** Kontrollerde (K) ve Tip 1 diyabet hastalarındaki (DM) DMP1 ve DSPP genlerindeki ifade değişimi. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testle yapılmıştır. Anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir (n=9, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001\*\*\*\*p<0,0001).

İkili karşılaştırmaların sonuçlarına baktığımızda hem DMP1 hem de DSPP için tüm ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Daha önceki 2 belirteçten farklı olarak bu kez kontrollerden elde edilen hücreler tüm besi yerlerinde DM'den elde edilen hücrelere göre anlamlı seviyede daha düşük kat değişimi göstermiştir ( $p < 0,01$ ).

Çalışma kapsamında değerlendirilen genlerden COL1 $\alpha$ 1 osteoblast farklılaşmasının erken dönem belirteci iken, OCN olgun osteoblastların bir belirteci olarak kabul edilir (185, 186). DSPP ise odontoblast farklılaşmasının bir belirteci olup hücre dışı matrikste erken dönem mineralizasyonda yer alır (6). DMP1 ise odontogenez sürecinin hem erken hem de ileri safhalarında gereklidir. Tezin verilerine göre 14. günün sonunda mineralizasyonun erken döneminde yer alan genlerin ifadesi DM'de elde edilen hücrelerde yüksek bulunurken, mineralizasyonun ileri evrelerinde rol oynayan genlerin ifadesi kontrollerde daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler farklılaşma sürecinin DM'den etkilendiğini göstermektedir, bu sebeple besi yerine ilave edilen ajanların bu süreci nasıl etkilediğini değerlendirmek için bir sonraki aşamada yer alan besi yeri karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırmalarda Bonferroni post-hoc testi kullanılmıştır ( $p < 0,05$ ). Kat değişimlerinin analizinde tüm belirteçler  $\beta$ -aktine göre normalize edilmiştir. Kontrol ve DM gruplarında besi yeri değişimi etkileri karşılaştırılırken sonuçlar NB deney grubuna normalize edilmiştir. Şekil 4.15. (sayfa 54) ve Şekil 4.16. (sayfa 55) bu karşılaştırmaların sonuçlarını göstermektedir. Kat değişimlerinin ortalama ve standart sapma değerleri tablo halinde EK-4'te yer almaktadır. Gerçek zamanlı PZR deneylerinde standart eğrilerden elde edilen eğim değerleri -3,5 ile -3,0 aralığında olup, amplifikasyon etkinlikleri %95 ile %113 arasında değişmektedir. EK-5.'te OCN, COL1 $\alpha$ 1, DMP, DSPP genlerine ait gerçek zamanlı-PZR amplifikasyon, standart ve erime eğrilerinin görselleri yer almaktadır.



**Şekil 4.15.** Kontrollerden (K) ve Tip 1 diyabet hastalarından (DM) elde edilen hücrelerdeki OCN ve COL1α1 ifadesi üzerinde besi yerlerinin etkisi. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testle yapılmıştır. Anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir (n=9, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001).

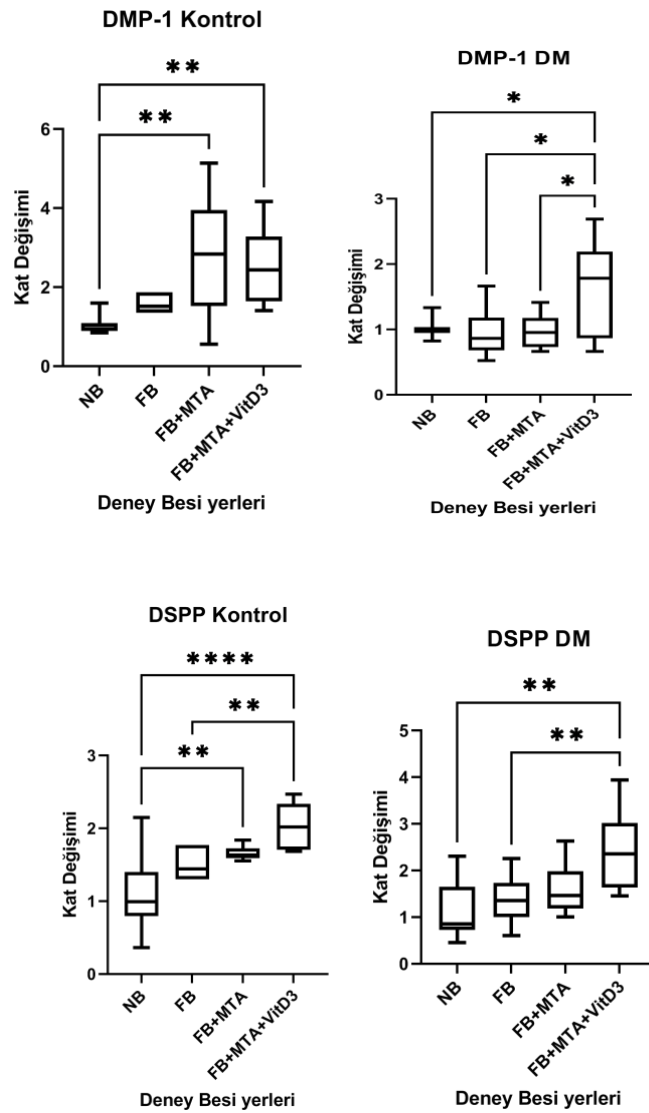
Farklı besi yeri maruziyetlerine göre kontrollerden ve DM'den elde edilen hücrelerde OCN ifadesi değerlendirildiğinde, FB+MTA+VitD3 besi yerinin her iki grupta da istatistiksel olarak diğer besi yerlerine göre daha fazla OCN ifadesine neden olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Diğer besi yerleri arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir (p>0,05).

COL1α1 gen ifadesi analizinde, kontrollerden elde edilen hücreler farklı besiyeri maruziyetlerine göre değerlendirildiğinde FB+MTA+VitD3 ve FB+MTA besi yerleri anlamlı olarak NB'den daha fazla COL1α1 gen ifadesine neden olmuşlardır



( $p < 0,05$ ). DM'den elde edilen hücrelerin bu bes yerleri ile muamelesi sonucunda ortaya çıkan verilerin ikili karşılaştırmalarında ise FB+MTA+VitD3, NB ve FB'den farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Diğer besi yeri koşulları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ).

Farklılaşma besi yerine MTA ilavesi kontrollerde *OCN* ve *COL1 $\alpha$ 1* ifadelerinde artışa neden olurken, DM'de bu artışın gözlenmesi için besi yerine MTA'nın yanında VitD3 'ün de ilave edilmesinin gerektiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.16.** Kontrollerden (K) ve Tip 1 diyabet hastalarından (DM) elde edilen hücrelerdeki DMP1 ve DSPP ifadesi üzerinde besi yerlerinin etkisi. Karşılaştırmalar iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testle yapılmıştır. Anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir (n=9, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

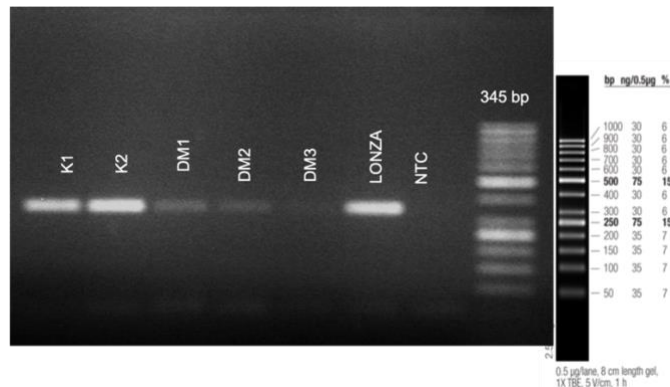
Şekil 4.16.'da sonuçları gösterilen DMP-1 ifadesi değerlendirildiğinde kontrollerden elde edilen hücrelerde FB+MTA, FB+MTA+VitD3 besi yerleri NB'den daha fazla kat artışına neden olmuştur ( $p<0,05$ ); ancak diğer besi yerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). DM'den elde edilen hücrelerde ise FB+MTA+VitD3 kombinasyonunun istatistiksel olarak diğer besi yerlerine göre daha fazla DMP-1 ifadesine neden olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).

DSPP geni ifadesi için bu karşılaştırmalar yapıldığında, kontrollerden elde edilen hücreler bu bağlamda değerlendirildiklerinde FB+MTA+VitD3; FB ve NB besi yerlerinden anlamlı olarak daha fazla DSPP gen ifadesine neden olmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca FB+MTA ve NB arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). DM'den elde edilen hücrelerin bu besi yerleri ile muamelesi sonucunda ortaya çıkan verilerin ikili karşılaştırmalarında yine FB+MTA+VitD3; FB ve NB besi yerlerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Diğer besi yerlerinin karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

Odonto/osteojenik farklılaşma belirteçlerinin ifadesinin analiz edildiği bu iş paketinde ilk olarak kontrol ve Tip 1 diyabet hastaları karşılaştırılmış ve Tip 1 diyabet hastalarındaki mineralizasyonun kontrollere göre daha erken evrede bulunduğu belirtilmiştir. Mineralizasyonun farklı evrelerindeki hücrelerde MTA ve VitD3 etkisini değerlendirmek için yapılan ikinci karşılaştırmalar, kontrollerde MTA ilavesinin istatistiksel olarak tek başına normal besi yeri ile fark oluşturmaya katkıda bulunduğunu, ancak diyabet hastalarında bu farkın MTA ve VitD3 kombinasyonu ile oluştuğunu göstermiştir.

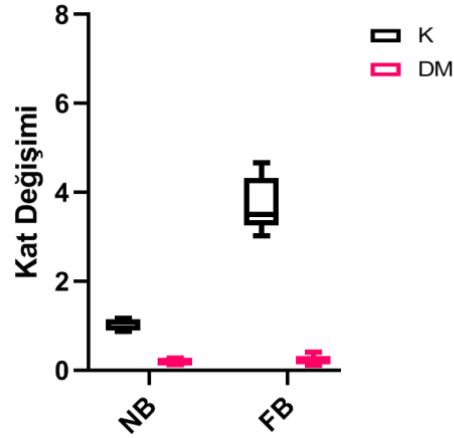
#### 4.5. Vitamin D Reseptörünün İfadesinin Analizi

Çalışmanın GZ-PZR ve alizarin kırmızısı deneyleri sonucunda Tip 1 diyabet hastalarından elde edilen hücrelerdeki farklılaşmanın besi yerine  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilave edildiğinde indüklendiği görülmüştür, ancak bu indüklenmenin kontrollerdeki kadar belirgin olmadığı da tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda VitD3'ün DM hücrelerinde Vitamin D reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınmadığından ve hücrelerde metabolize olamadığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Literatürde DM hastalarında vitamin D reseptörü polimorfizmlerinin bildirildiği çalışmalar (158, 159) da bu hipotezi destekler niteliktedir. VDR genindeki polimorfizimlerin gen ifadesinde veya fonksiyonunda değişime yol açtığı bildirilmiştir (187). Bu bağlamda kontrol ve DM hücrelerinde VDR geninin ifadesi analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.17.** VDR genine ait cDNA amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü  
K: Kontrol, DM: Tip 1 Diyabet, NTC: örnek içermeyen kontrol.

Normal besi yerine maruz bırakılan hücrelerden elde edilen cDNA ile 3 tekrar halinde gerçekleştirilen konvansiyonel PZR deneylerinde DM hücrelerinden elde edilen cDNA ile yapılan deneylerde kontrollere göre daha silik bir bantlar oluştuğu gözlenmiştir. Normal besi yerine ve FB besi yerine 14 gün süreyle maruz kalan hücreler ile yapılan GZ-PZR deneylerinin bulguları Şekil 4.18.'de (sayfa 58) yer almaktadır. İkili karşılaştırmalarda t-testi kullanılmıştır.



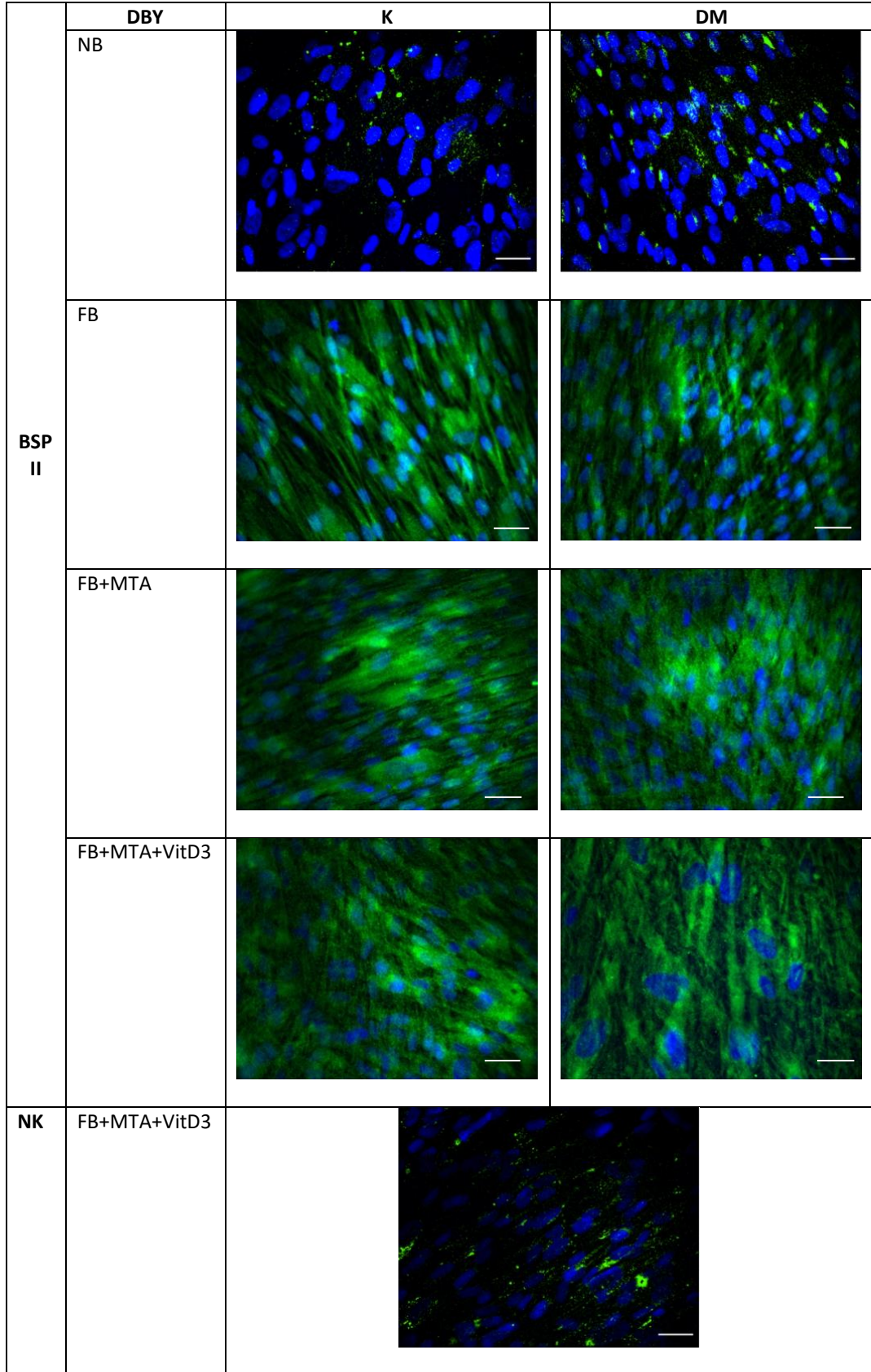
**Şekil 4.18.** Kontrol ve Tip 1 diyabet gruplarındaki VDR geni ifadesindeki göreceli kat değişimi. (n=6, ikili karşılaştırmalar t testi ile yapılmıştır. Kontrollerde her durumda VDR ifadesi daha yüksek bulunmuştur, p<0,05).

Bir önceki iş paketlerinde DM'den elde edilen hücrelerdeki farklılaşmanın besi yerine  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilave edildiğinde kontrollerdeki kadar belirgin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak DM hücrelerinde kontrol hücrelerine göre VDR geninin de daha az ifade olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla DM hücrelerindeki VDR gen ifadesinin göreceli olarak düşük olmasından dolayı bu hücrelerde VitD3'ün metabolize edilemediği ve odonto/osteojenik farklılaşma sürecinde aksaklıklar oluşabileceği düşünülmüştür.

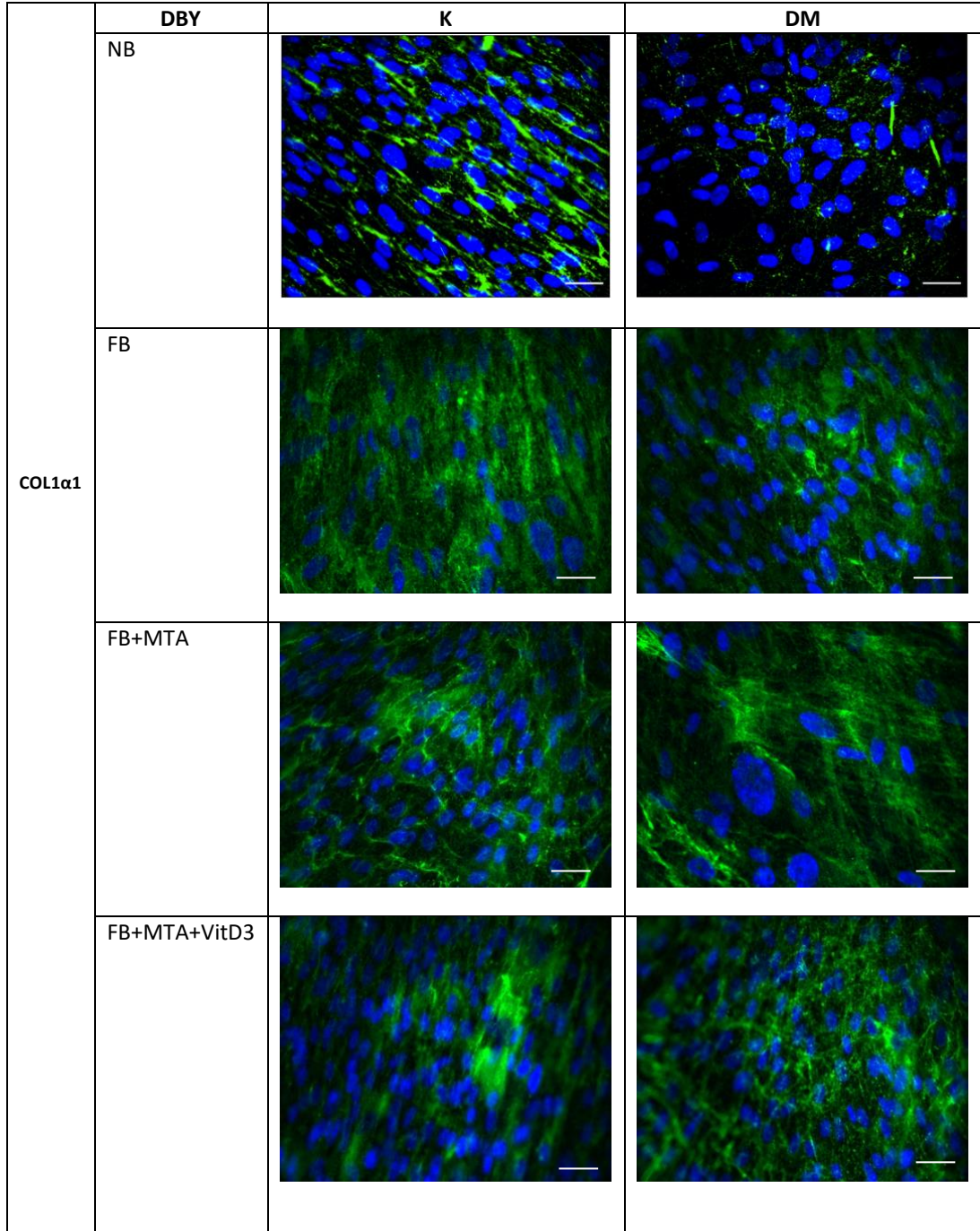
#### 4.6. Farklılaşma Belirteçlerinin İmmüfloresan Analizi

Farklılaşmanın erken ve geç evrelerinin analizi için, bu evrelere özgü biyobelirteçlerden BSP II, DMP1 ve COL1 $\alpha$ 1 proteinlerinin immüfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. COL1 $\alpha$ 1 osteoblast farklılaşmasının erken dönem belirteci iken, DMP1 ise odontogenez sürecinin hem erken hem de ileri safhalarında gereklidir. BSP II ifadesi ise matriks birikimini ve mineralizasyonu gösteren diğer bir gen ürünüdür ve yeni sentezlenmiş kemik matriksinde ifadesi oldukça yüksektir (176).

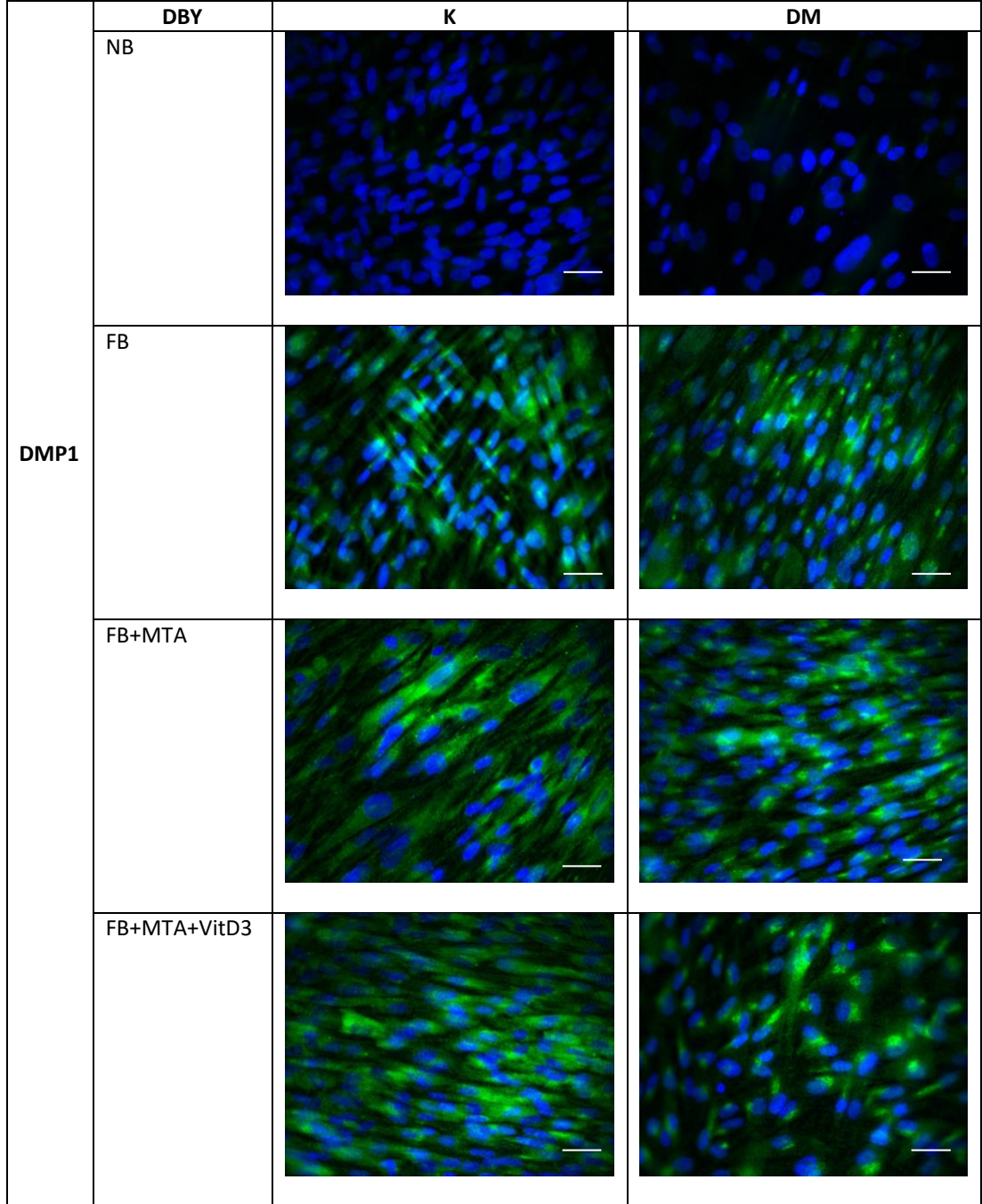
Şekil 4.19., Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.'de deney gruplarının temsili floresan mikroskop görüntüleri yer almaktadır. Spesifik boyanmanın olduğunu göstermek için herhangi bir primer antikorun uygulanmadığı sadece sekonder boyamanın yapıldığı negatif kontrolün floresan mikroskop görüntüsü de Şekil 4.19.'da yer almaktadır. Görüntüler yağlı emülsiyon kullanılarak 63'lük objektifle elde edilmiştir.



**Şekil 4.19.** BSP II proteininin immünofloresan boyama ile görüntülenmesi ve negatif kontrol (NK) (Büyütme: 63x, Ölçek: 20  $\mu$ m) DBY: deney besi yerleri.



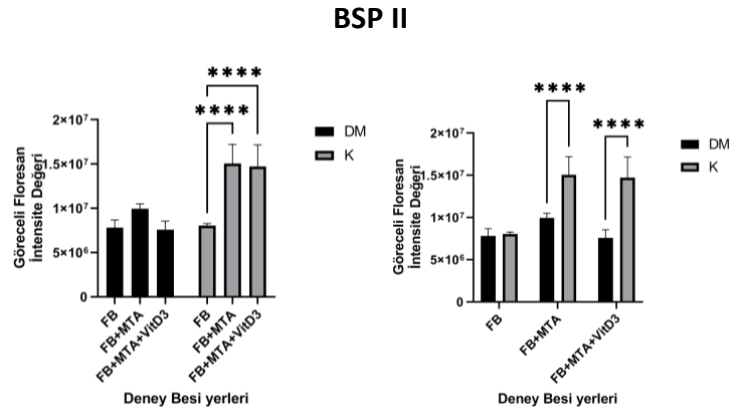
**Şekil 4.20.** COL1 $\alpha$ 1 proteininin immünfloresan boyama ile görüntülenmesi (Büyütme: 63x, Ölçek: 20  $\mu$ m) DBY: deney besi yerleri.



**Şekil 4.21.** DMP 1 proteininin immünofloresan boyama ile görüntülenmesi (Büyütme: 63x, Ölçek: 20 µm) DBY: deney besi yerleri.



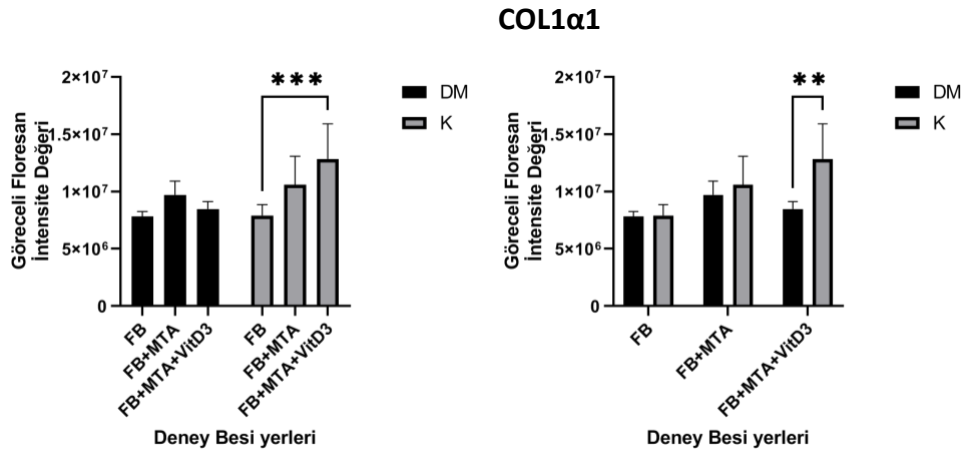
Image J programı kullanılarak elde edilen floresan yoğunluğu değerleri iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testler kullanılarak karşılaştırılmıştır (n=6). Şekil 4.22., Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'te sırasıyla BSP II, COL1α1 ve DMP1 boyamalarının kantitasyonları ile elde edilen verileri gösteren grafikler yer almaktadır.



**Şekil 4.22.** BSP II proteininin immünfloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları (n=6, Veriler iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testler kullanılarak karşılaştırılmıştır, anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir, \*\*\*\*p<0,0001).

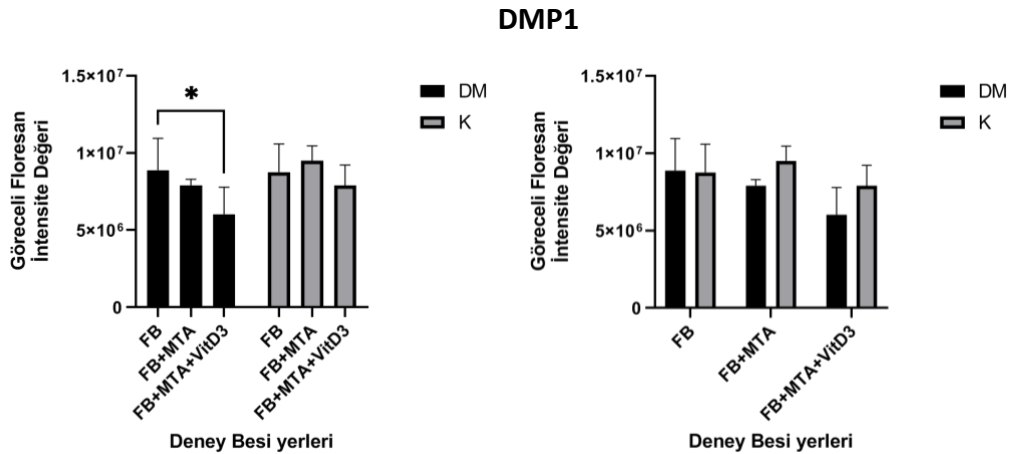
Kontrollerden elde edilen hücreler BSP II kantitasyonu açısından değerlendirildiğinde FB+MTA+VitD3 ve FB+MTA kombinasyonları ile FB'den daha yüksek floresan yoğunluğu ölçülmüştür (p<0,05). DM'den elde edilen hücreler değerlendirildiğinde besi yerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0,05).

FB+MTA+VitD3 ve FB+MTA kombinasyonları kontrollerden elde edilen hücrelerde BSP II floresan yoğunluğu DM'den elde edilen hücrelere göre anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05).



**Şekil 4.23.** COL1α1 proteininin immünfloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları (n=6, Veriler iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testler kullanılarak karşılaştırılmıştır, anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Kontrollerden elde edilen hücreler COL1α1 kantitasyonu açısından değerlendirildiğinde FB+MTA+VitD3 kombinasyonunun floresan yoğunluğunu FB'ye göre anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur (p<0,05). DM'den elde edilen hücreler değerlendirildiğinde besi yerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0,05). FB+MTA+VitD3 kombinasyonu kontrollerden elde edilen hücrelerde COL1α1 floresan yoğunluğunu DM'den elde edilen hücrelere göre anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05).



**Şekil 4.24.** DMP1 proteininin immünfloresan boyama görüntülerinin kantitasyon sonuçları. (n=6, Veriler iki yönlü varyans analizi ve Bonferroni post-hoc testler kullanılarak karşılaştırılmıştır, anlamlı farklılıklar \* ile gösterilmiştir, \*p<0,05).

Kontrollerden elde edilen hücreler değerlendirildiğinde besi yerleri arasında DMP1'in floresan yoğunluğunun kantitasyonu açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). DM'den elde edilen hücreler DMP1 kantitasyonu açısından değerlendirildiğinde ise FB+MTA+VitD3 kombinasyonu FB'den farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İkili karşılaştırmalarda anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

İmmünofloresan kantitasyon sonuçlarına göre kontrol bireylerinde BSP II, COL1 $\alpha$ 1, DMP1 floresan yoğunluğu DM bireylerinden daha yüksek bulunmuştur. Farklılaştırma ajanları besi yerine ilave edilmediğinde odonto/osteojenik farklılaşmayı göstermek için kullanılan biyobelirteçlerin diğer besi yeri gruplarından farklı olarak kantite edilememiştir.

## 5. TARTIŞMA

Ağız dış sağlığı sistemik sağlıkla da ilişkili olup, ağız-dış tedavilerinin uzun dönem başarısında sistemik hastalıkların da etkili olduğu bildirilmiştir (37). İnsülinin mutlak veya göreceli eksikliği ya da insüline direnç ile oluşan hiperglisemi ile kendini belli eden diyabet hastalığı da ağız-dış tedavilerinin başarısını etkileyen hastalıklarından biridir (3). Glisemik kontrolü bozuk olan hastalarda endodontik tedaviye rağmen periapikal lezyonların iyileşmediği (188) ve lezyon boyutunun büyümeye devam ettiği bildirilmiştir (40). DM varlığında pulpadaki kan akımının azaldığı (38) ve kalsifikasyonların arttığı gözlenmiştir (39). Sistemik hastalıkların rejeneratif endodontik tedavileri ne boyutta etkilediklerine dair doğrudan yürütülen klinik çalışmalar sınırlı olup, yerine hastalık modelinin oluşturulduğu hayvan çalışmaları veya hücre kültürü çalışmaları ile verilere ulaşmaya çalışılmıştır. Ancak hastalık modelinin oluşturulduğu hayvan çalışmalarından farklı sonuçlar elde edilmiştir (9, 10, 43-45). 2009'da Tip 2 diyabet hastalarından izole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin mezenkimal kök hücre karakteristiği gösterdiği akış sitometresi ile gösterilmiştir (189). Aynı zamanda osteojenik farklılaşma sonucunda mineralizasyon nodülleri oluşturduğu alizarin kırmızısı ile gösterilmiştir; ancak çalışmada kontrol grubu olmadığı için bir kıyaslama yapılamamıştır. Diyabetik hastalardan dental pulpa (8, 48, 190), gingival ve periodontal kök hücreleri (191) izole eden çalışmalar sınırlıdır. BMP-2 muamele edilen diyabet hastalarından elde edilen dental pulpa kök hücrelerinde DSPP ifadesi olduğu ve mineralize nodüller oluşturduğu gösterilmiştir (8). Ancak bu çalışmada da diyabetin hangi tip olduğu ve hangi ölçütlere göre hastaların diyabet açısından kontrol altında olup olmadıklarına ayrıntılı olarak yer verilmemiştir. Bu nedenle mevcut tezde daha standart koşullar altında hasta tercihi yapılarak dental pulpa kök hücresi elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmaya dahil olan tüm hastalar Tip 1 diyabet olup tüm hastaların insülin dışında ilaç kullanmadığı belirlenmiştir.

Tüm hastaların ve de kontrollerin dental pulparı 20 yaş dişlerinden elde edilmiştir. Bu dişler çoğunlukla çekim endikasyonu konan dişler olmaları ve geniş pulpa odaları olmaları nedeniyle dental pulpa izolasyonu açısından oldukça sık

kullanılan dişlerdir (192). Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonunda enzimatik ayrıştırma metodu tercih edilmiştir. Enzimatik ayrıştırma ile elde edilen hücrelerin doğrudan pulpa dokusu eksplantından mekanik yöntemle ayrıştırmaya kıyasla daha yüksek mineralizasyon kapasitesine sahip olduğu bildirildiği (193) için bu yöntem tercih edilmiştir.

Dental pulpa kök hücreleri mezenkimal kök hücre karakterinde olup CD73, CD90, CD105 pozitif ve CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 negatif oldukları pek çok kez akış sitometrisi ve PZR yöntemleriyle gösterilmiştir (171, 194-196). Tez çalışmasında bu amaçla gerçek-zamanlı PZR tercih edilmiş ve hastalar ile kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücrelerindeki CD73 ve CD90 kat değişiminin CD34 ve CD45'ten oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Diğer taraftan jel elektroforezi sonucunda CD34 ve CD45 amplifikasyonlarının gerçekleşmediği de saptanmıştır. Bu bulgular mezenkimal kök hücre izolasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca izole edilen hücrelerde fibroblast kontaminasyonunun olmadığını göstermek için mezenkimal kök hücreler tarafından gen ifadesi bildirilen, ancak fibroblastlar tarafından ifadesinin olmadığı belirtilen CD106 geninin ifadesi de değerlendirilmiştir (181). Kontrollerden ve hastalardan izole edilen hücrelerde CD106 ifadesinin arttığı da gerçek zamanlı PZR ile gösterilmiştir.

Hücrelerin karakterizasyon işleminden sonra farklılaştırma besi yerlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Odonto/osteojenik farklılaşmada kullanılan besi yerinin literatürde ilk olarak Bellows ve ark. (197) tarafından kullanıldığı ve deksametazon, askorbik asit ve  $\beta$ -gliserofosfat içerdiği bilinmektedir. Askorbik asitin kemik benzeri nodüllerin oluşması, deksametazonun nodüllerin miktarlarının artması ve  $\beta$ -gliserofosfatın da nodüllerin mineralizasyonu için gerektiği bilinmektedir (198); ancak odonto/osteojenik besi yeri optimizasyonunun primer hücre kültürleri çalışmalarında optimize edilmesinin yararlı olacağı belirtilmiştir. Bu kapsamda besi yerindeki etkinliği en çok araştırılan ajanlardan biri de glukokortikoid olan deksametazondur. Yüksek konsantrasyondaki deksametazonun kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (199). Sıçanlardan elde edilen dental folikül kök hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada osteojenik farklılaşmada rol

oynadığı gösterilen BMP7'nin ekspresyonunun deksametazon tarafından doza bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (200). Kullanılan dozlar  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M olup özellikle  $10^{-8}$  M (201) ve  $10^{-7}$  M (182) hücre kültürü çalışmalarında çoğunlukla tercih edilen iki konsantrasyondur (202). Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada  $10^{-7}$  M deksametazon, 50 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserofosfat içeren osteojenik besi yerine ilave edildiğinde osteogenezisin yanı sıra adipogenezisi de indüklediği rapor edilmiştir (203). Literatürde sadece askorbik asit ve β-gliserofosfatın kullanıldığı farklı çalışmalar da mevcuttur (175-177, 184, 204-211). Bu nedenlerle farklılaştırma işlemlerine başlamadan önce 50 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserofosfat içeren odonto/osteojenik besi yerine  $10^{-7}$  M deksametazon ilave edilen ve edilmeyen 2 farklı besi yeri ile kontrollerden elde edilen dental pulpa kök hücreleri 14 gün süreyle farklılaştırılmışlar ve sonrasında kalsiyum birikimini gösteren alizarin red boyaması yapılmıştır. İstatistiksel olarak daha yüksek absorpsiyon elde edilen deksametazon ilavesi olmayan besi yeri çalışmanın standart farklılaştırma besi yeri olarak belirlenmiştir. Bu sonuç 50 µg/ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserofosfat içeren osteojenik besi yerine maruz kalan murin osteoprekürsor (MC3T3-E1 hücreleri) hücrelerinin; 50 µg/ml askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat ve 100 nM deksametazon içeren besi yerine 14 gün süreyle maruz kalan hücrelerden alizarin red boyama ile daha fazla mineral nodül oluştuğunu gösteren çalışma ile tutarlılık göstermektedir (212).

Besi yeri optimizasyonunun ikinci aşamasında MTA'nın uygulanma şekline karar verilmiştir. Klinikte MTA distile su ile karıştırılıp doğrudan dental pulpa üzerine konmaktadır. Literatürde MTA'nın etkinliğini değerlendirmede farklı metotlar kullanılmaktadır. Bunlardan ilkinde teflon diskler hazırlanıp MTA üretici firma talimatları doğrultusunda karıştırılır (1g toz 300µl su) ve teflon disklere yerleştirilir (134, 207). Devamında sertleşen MTA diskleri ISO 10993-5 standardı göz önünde bulundurularak besi yerine aktarılır ve 24 saat boyunca etüvde bekletilir (178, 213). Daha sonra besi yeri filtre edilir ve farklılaştırma deneylerinde kullanılır. Bir diğer yöntem ise MTA tozunun doğrudan besi yerine ilave edilerek etüvde bekletilmesi ve belirlenen sürenin sonunda filtre edilerek kullanılmasıdır (17, 176, 214). Zhao ve ark.

(17) bu metodun klinik uygulamayı daha uygun bir şekilde taklit ettiğini belirtmişlerdir. Farklılaştırma deneyleri öncesinde iki farklı yöntemle hazırlanan MTA dilüe edilmeden askorbik asit ve  $\beta$ -gliserofosfat ile kombine edilerek kontrollerden elde edilen hücrelerin farklılaştırılmasında 14 gün süreyle kullanılmıştır. 14. gün sonunda yapılan alizarin red boyamasında 2mg/mL olacak şekilde doğrudan besi yerinde çözünme yöntemiyle hazırlanan MTA'nın anlamlı olarak mineralizasyon birikimini daha fazla indüklediği görülmüştür. Bu nedenle MTA'nın hazırlanmasında bu yöntem tercih edilmiştir.

MTA'nın besi yerinde farklılaştırma ajanları olmaksızın tek başına kullanımının odonto/osteojenik farklılaşmayı indüklediği bildirilmiştir (134, 215); ancak MTA'nın etkinliğini arttırmak için besi yerine farklı ajanlar da ilave edilmektedir. Büyüme faktörleri (FGF-2, PRP) (133, 134), hormonlar (osteostatin) (135), probiyotikler (136), propolis (209) ve vitaminler (137) bunlardan bazılarıdır. Tez çalışmasında kullanılan VitD3'ün MTA ile kombine edildiği sınırlı sayıda çalışma vardır (137, 216). Köpeklerde pulpa kaplaması yapılırken MTA'ya deksametazon ve deksametazon ile birlikte VitD3 ilave edilmiştir. Daha sonra pulpa kaplaması yapılan dişlerden 7., 21. ve 60. günlerde pulpa ekstre edilerek DSPP ve matriks hücre dışı fosfoglikoprotein (*MEPE*) ifadesi PZR ile değerlendirilmiştir. 21. günde en yüksek DSPP ifadesi MTA'nın deksametazon ve VitD3 ile kombine edildiği grupta bildirilmiştir. VitD3 *in vitro* koşullarda odonto/osteojenik farklılaşmayı indüklemek için besi yerine ilave edilen ajanlardan biri olup asıl görevinin iskelet sisteminde kalsiyum ve fosfat dengesini düzenlemek ve kemik mineralizasyonu olduğu pek çok kez gösterilmiştir (144). Literatürde besi yerine farklı konsantrasyonlarda VitD3 metaboliti olan  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilave edilmiştir (16, 217). Bazı çalışmalar  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün tek başına bile odonto/osteojenik farklılaşmayı indüklemek için yeterli olduğunu belirtirken (16, 217) bazı çalışmalar ise askorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat ve/veya deksametazon ile kombine edilmesi gerektiğini belirtmektedir (218-222). Khanna-jain ve ark. (223) askorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat ve VitD3 kombinasyonunun, osteogenezisi askorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat ve deksametazon kombinasyonuna göre daha fazla indüklediğini belirtilmişlerdir. Diğer taraftan  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün farelerden izole edilen periodontal fibroblastlarda

osteojenik farklılaşmayı inhibe ettiği de bildirilmiştir (224). Farklı hücre kaynaklarının bu sonuçların ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Kombine kullanımları sırasında MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konsantrasyonlarına karar vermeden önce literatürde sıklıkla kullanılan konsantrasyonlar ile kontrollerden elde edilen hücreler kullanılarak 24. ve 72. saate MTT testi yapılmıştır. Bu test, sarı renkte, suda çözünebilen tetrazolyum tuzlarının metabolizmaları aktif olan canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz tarafından parçalanarak, suda çözülmeyen mor renkteki tetrazolyum formazan yan ürünü salınması esasına dayanır. Tezde 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ve 0,02mg/mL konsantrasyonda kullanılan MTA'nın 72 saat sonunda diğer kombinasyonlara göre anlamlı olarak proliferasyonu arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle deneylerde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün farklılaşmaya katkısını gözlemleyebilmek için 0,02mg/mL konsantrasyondaki MTA da ayrıca askorbik asit ve  $\beta$ -gliserofosfat ile kombine edilmiştir. Diğer taraftan farklılaşmayı indüklemek için kullanılan 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konsantrasyonunun fizyolojik seviyeleri olan 0.03–0.14 nM çok çok üzerinde olduğu da belirtilmelidir (225).

Odonto/osteojenik farklılaşma potansiyeli literatürde farklı yöntemlerle incelenmektedir. Hücre dışındaki kalsiyum birikiminin, alizarin red ve Von Kossa ile değerlendirilmesi (179), *ALP*, *OCN*, *OPN*, *COL1 $\alpha$ 1*, *BSPII*, *Runx-2*, *DSPP*, *DMP1* gibi özelleşmiş odonto/osteogenez belirteçlerinin ifadesinin ölçülmesi (183), westernblot analizi ile spesifik proteinlerin gösterilmesi bu yöntemler arasındadır. Tezde literatürdeki diğer çalışmalar gibi 14. gün sonunda (41, 184) hücre dışındaki kalsiyum birikimi alizarin red kırmızısı ile kantite edilmiş, *OCN*, *COL1 $\alpha$ 1*, *DSPP*, *DMP1* ifadeleri göreceli olarak değerlendirilmiş ve BSP II, *DMP1* ve *COL1 $\alpha$ 1* proteinlerinin immünofloresan analizi gerçekleştirilmiştir.

Alizarin Red S kalsiyum katyonları ile reaksiyona girerek şelat oluşturmaktadır. Boyanma sonucunda kalsiyum tuzları turuncu/kırmızı renk almaktadır (179). Tüm besi yerleri göz önünde bulundurulduğunda DM grubunda en yüksek alizarin red absorbans değeri MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kombine kullanıldığında elde edilmiştir. Ancak her koşulda DM grubunda tespit edilen absorbans değerleri kontrol grubunda



elde edilenlerden düşük olarak ölçülmüştür. Kontrollerde hem MTA hem de MTA+VitD3 kombinasyonu absorpsiyon değerlerinde anlamlı artışa neden olmuştur. Literatürde MTA'nın diyabet varlığında etkilerini incelemek için farklı çalışma protokolleri oluşturulmuştur. Hayvan modellerinde diyabetin stimüle edilmesi bu protokollerden biri olup bu konuda çelişkili sonuçlar sunulmuştur (3). Gomes-Filho ve ark. (10) Angelus MTA ile yapılan pulpa kuafajında Alloxan-ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kontrol sıçanlarına göre inflamasyon ve dentin köprüsü kalınlığı açısından herhangi bir farklılık olmadığını bildirmiştir. Diğer taraftan, Garber ve ark. (9), MTA ile yapılan pulpa kuafajında streptozotocin-ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kontrol sıçanlarına kıyasla dentin köprüsü oluşumunun azaldığını ve inflamasyonun arttığını bildirmiştir. Diyabeti taklit etmek için besi yerinde 4 farklı glikoz konsantrasyonu kullanılarak (5,5mM: normal; 8 mM: yemek sonrası ya da kontrollü DM, 12mM veya 24mM: kontrolsüz DM) insan periodontal ligament kök hücrelerinin osteojenik farklılaşma potansiyelini değerlendirildiği çalışmada glikoz konsantrasyonu arttıkça anlamlı olarak ALP aktivitesinin ve oluşan mineralizasyon nodüllerinin azaldığı bildirilmiştir (44). Mevcut tezde literatürdeki diğer çalışmalar gibi 5,5mM glikoz içeren DMEM kullanılmıştır (226, 227). Tezin sonuçlarında DM'den elde edilen hücreler MTA ile farklılaşmaya maruz kaldıklarında kalsiyum birikimi göstergesi olan alizarin kırmızısı absorpsiyonunda normal besi yerine göre anlamlı bir değişim olmadığı ancak ortama VitD3 eklenmesi ile absorpsiyon değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı fakat bu artışın da kontroller seviyesine ulaşamadığı gözlenmiştir.

Çalışma kapsamında değerlendirilen genlerden COL1 $\alpha$ 1 osteoblast farklılaşmasının erken dönem belirteci iken, OCN olgun osteoblastların bir belirteci olarak kabul edilir (185, 186). OCN'in bir diğer adı "kemik- $\delta$ -karboksiglutamik asit içeren protein" olup osteoblastlar, odontoblastlar ve sementoblastlar tarafından üretilir (228). DSPP ise odontoblast farklılaşmasının bir belirteci olarak kullanılır ve hücre dışı matrikste mineralizasyonun indükleyicisidir (6). Başlangıçta sadece dentinde olduğu düşünülse de kemik, sement ve de akciğer ve böbrek gibi kalsifiye olmayan dokularda da tespit edilmiştir (229). DMP1 ise odontogenez sürecinin hem erken hem de ileri safhalarında gerekli olup (230), doğrudan kemik

mineralizasyonunu indükler ve mineralizasyonda çekirdek görevi görür (231). DMP1, BSP, DSPP küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlı glikoprotein (SIBLING) ailesi üyeleridir (229). Çalışmada, 14 günün sonunda özellikle MTA ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün birlikte kullanımının tüm belirteçlerde (*OCN, COL1\alpha1, DMP-1, DSPP*) hem DM'de hem de kontrollerde farklılaştırma ajanı içermeyen normal besi yerine göre anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Tüm belirteçlerdeki kat artışı ve alizarin red ile gösterilen mineralizasyon odakları gruplardaki odonto/osteojenik farklılaşmanın bir göstergesi olarak kabul edilebilir (60). Kontrol grubunda MTA ilavesinin hem alizarin red absorbansını hem de genlerin ifadesini tek başına da anlamlı olarak arttırdığı literatürde yer alan diğer çalışmalarda olduğu gibi tespit edilmiştir (17, 41, 232, 233). Ancak aynı besi yerine maruz kalan hasta ve kontrol hücrelerindeki ifade kat artışları değerlendirildiğinde COL1 $\alpha$ 1'in ve özellikle de geç dönem mineralizasyonun bir göstergesi olan OCN'nin kontrollerde anlamlı olarak daha yüksek ifadesinin olması ve de alizarin red absorbansı sonuçları, kontrollerden elde edilen hücrelerde farklılaşma sürecinin daha etkin bir şekilde ilerlediğini göstermektedir.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün, *in vitro* ortamda insan dental pulpa ve kemik hücrelerinin OCN sentezlemelerinde temel bir rol üstlendiği bildirilmiştir (234, 235). OCN ifadesinin  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilave edildiği gruplardaki fark edilir ifade artışı bu duruma bağlanabilir, ifadedeki artış eğilimi Khanna-Jain ve ark. (223) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca, insan dental pulpa hücrelerinde D vitamini eksikliğine bağlı olarak OCN üretiminin azaldığı ve hipokalsifiye dentin oluştuğu bildirilmiştir (234). Genlerin ifadeleri analiz edildiğinde  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ile kombine edilen MTA'nın anlamlı olarak DM'den elde edilen hücrelerde odonto/osteojenik farklılaşmayı indüklediği görülmüştür.

İmmünofloresan, hücrelerde (hücre kültürlerinde ya da süspansiyon hücrelerde) spesifik bir protein veya antijenin varlığını, ona bağlanan ve böylece onu mikroskop altında görmeye ve incelemeye izin veren spesifik bir antikor kullanarak değerlendirmeye olanak tanıyan bir tekniktir. Tezde 24 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler çalışmadaki besi yerleri ile 14 gün boyunca inkübe edildikten sonra COL1 $\alpha$ 1, DMP1 ve BSP II antikorları ile muamele edilmiştir. Hem kontrol hem de DM grubunda normal besi yerine maruz kalan hücrelerde literatürdeki diğer çalışmalar gibi floresan

gözlenmezken, farklılaştırma besi yerine maruz kalan hücrelerde floresan izlenmiştir (226, 236). Test edilen antikorların kontrollerden elde edilen hücrelerde daha yüksek floresan yoğunluğu oluşturduğu gözlenmiştir. MTA ve MTA+1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3, FB'ye ilave edildiğinde kontrollerden elde edilen hücrelerde BSP II ve COL1 $\alpha$ 1'de floresan yoğunluğu arttırmıştır, ancak DM'den elde edilen hücreler için böyle bir artış izlenmemiştir. BSP II matriks birikimini ve mineralizasyonu gösteren diğer bir protein olup yeni sentezlenmiş kemik matriksinde ifadesi oldukça yüksek bulunmuştur (176, 237-239). Ayrıca çalışmada GZ-PZR ile gen ifadesi incelenen OCN ile ilişkili olduğu ve BSP *knockout* hücre kültürlerinde OCN ifadesi izlenmediği bildirilmiştir (240). Kolajen olmayan ECM proteinlerinden biri olan DMP1'in kantitasyon verilerini incelediğimizde immünfloresan boyama kantitasyonu sonucunda hem DM'de hem de K grubunda besi yerine 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3 eklendiğinde DMP1'in floresan miktarında azalma olduğu göreceli olarak görülmüştür. Koşullar farklı olsa da Nociti ve ark. (241) tarafından da murin sementoblastları kullanılarak yapılan çalışmada besi yerine VitD3 eklendiğinde 48 saat sonra DMP1 protein ifadesinin azaldığını westernblot analizi ile belirtilmiştir. Gen ve protein ifadelerinin göreceli kat artışlarındaki olası farklılıklar tekniklerin getirdiği farklılıklardan ve transkripsiyon/translasyon süreçlerindeki değişimlerden kaynaklanabilir. İlerleyen dönemde veriler westernblot analizi ile değerlendirilebilir, ayrıca floresan görüntülerinin kantitasyonunun pek çok değişkenden etkilendiği ve dikkatle yorumlanması gerektiği de belirtilmiştir (242).

Mevcut tezin sonuçlarına göre, DM'den elde edilen hücrelerdeki farklılaşmanın besi yerine 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D3 ilave edildiğinde kontrollerdeki kadar belirgin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak DM hücrelerinde kontrol hücrelerine göre VDR geninin de daha az ifade olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla DM hücrelerindeki VDR gen ifadesinin göreceli olarak düşük olmasından dolayı bu hücrelerde VitD3'ün metabolize edilemediği ve odonto/osteojenik farklılaşma sürecinde aksaklıklar oluşabileceği düşünülmüştür. Literatürde, T1DM hastaların kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük seviyede serum 25-hidroksi vitamin D3 sahip oldukları (243) ve VDR'deki polimorfizmlerin T1DM'e yakınlığı arttırdığı bildirilmiştir (159, 244, 245). Ayrıca VDR genindeki polimorfizimlerin gen ifadesinde veya fonksiyonunda değişime

yol açtığı da bildirilmiştir (187).  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilavesinin DM hücrelerinin farklılaşmasındaki sınırlı etkisi mevcut tezdeki hasta grubundaki tüm bireylerin de T1DM olmasından kaynaklanabileceği ön görülmektedir. Farklı diyabet tipleri dahil edilerek ilave çalışmalar yapılmalıdır.

Diş hekimliğinde klinik uygulamalarda sistemik hastalıklar, yaş gibi bireysel farklılıklar göz önüne alınmadan rutin, standart tedavilerin uygulanmaktadır, ancak farklı hastalıklarda farklı kombinasyonların uygulanması uzun vadede tedavilerin başarı şansını arttırarak hastaların yaşam kalitesine ve ekonomik düzeylerine katkıda bulunabilir. Mevcut tezin sonuçlarına göre MTA+ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kombinasyonu DM'den elde edilen dental pulpa kök hücrelerinin odonto/osteojenik farklılaşmasını tek başına MTA kullanımına göre anlamlı yönde arttırmaktadır. DM hastalarında rejeneratif diş tedavileri sırasında VitD3 ilavesi mineralizasyon sürecine katkıda bulunabilir. Diğer taraftan bu sonuçların çalışmanın sınırları dahilinde yorumlanması önemlidir, çünkü odonto/osteojenik farklılaşma kompleks bir süreç olup literatürde işlemde kullanılan primer hücre kaynaklarından (168, 246), kaynakların yaşından (247), hücrelerin elde edilme metodundan (193), besi yerine ilave edilen serumdan (223, 248, 249), glikoz miktarından (44, 250) ve de hatta besi yerine ilave edilen antimikrobiyal ajanlardan (251) etkilendiği rapor edilmiştir.

İlerleyen çalışmalarda, diyabetik hayvan modellerinde MTA- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  karışımının lokal etkileri değerlendirilerek ve  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ilavesi ile MTA'nın fiziksel ve kimyasal özelliklerini nasıl etkileneceği test edilerek klinik uygulamalar öncesinde kapsamlı veri elde edilmelidir. Olumlu veriler diş hekimliğinde sistemik hastalıklara özgü ve de hatta kişiye özgü tedavi yaklaşımlarının kapısını aralayacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

1. Çalışmada T1DM hastalarından dental pulpa kök hücreleri *in vitro* olarak izole edilebilmiş ve kök hücre belirteçlerinin ifadesi gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılarak gösterilmiştir.
2. Kalsiyum birikimini göstermek için kullanılan alizarin kırmızısı testi, kontrollerde hem MTA hem de MTA+1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 kombinasyonunun kalsiyum odaklarını arttırdığını ama DM'de sadece MTA+1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 kombinasyonunun kalsiyum odaklarını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca kalsiyum odaklarının miktarı kontrollerde daha fazla bulunmuştur.
3. Odonto/osteojenik belirteçler (*COL1 $\alpha$ 1*, *DMP*, *DSPP* ve *OCN*) kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR deneyi hem kontrollerde hem de DM'de MTA+1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 kombinasyonunun mineralizasyonu anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir, ancak gen ifadelerine bakıldığında mineralizasyonun kontrollerde daha fazla olduğu görülmüştür.
4. İmmünfloresan deneylerinde proteinlerin (BSP II, COL1 $\alpha$ 1, DMP1) floresan yoğunluğunun besi yerine MTA ve 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D3 ilave edilmesiyle özellikle kontrol grubunda daha çok arttığı görülmüştür.
5. VDR geni ifadesi tüm besi yerlerine maruz kalan hücreler göz önünde bulundurulduğunda her zaman kontrollerde daha yüksek bulunmuştur.
6. DM'den elde edilen hücrelerin odonto/osteojenik farklılaşma potansiyeli kontrollere göre düşüktür.

## 6.2. Öneriler

Literatürde odonto/osteojenik farklılaşma için üretilen standart bir besi yeri olmaması hatta hücre kültürü çalışmaları için üretilen ticari odonto/osteojenik farklılaşma besi yerlerinin değişken farklılaştırma potansiyellerine sahip olması bu alanda çalışmalar yapılarak her yönüyle daha optimize/standart besi yerlerinin oluşturulmasını gerektirmektedir.

Daha yüksek örneklem sayısı ve diğer diyabet tipleri de göz önünde bulundurularak çalışmaların kapsamı genişletilebilir. Westernblot analizi ile odonto/osteojenik proteinlerin ifadesi kantite edilmelidir.

MTA hazırlama şekli ve hücre kültürü çalışmalarındaki olası etkileri ilave *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile test edilmelidir. Ticari VitD3 damlalarının MTA'nın sertleşme süresi, kalsiyum salınımı, bağlanma dayanımı gibi fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmalı, uygun verilerin elde edilmesiyle bu kombinasyon *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmelidir.

DM gibi diş hekimlerinin sıklıkla karşılaştığı diğer hasta gruplarında da rutin tedavi protokolleri dışında tedavinin başarısına olumlu katkıda bulunacak tedavi protokolleri başka moleküllerin ve kombinasyonların etkinliği çalışılarak oluşturulmalıdır, bu bağlamda *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sayısı arttırılmalı ve sistemik hastalığa yönelik (kişiye yönelik) klinik uygulamaların oluşturulması sağlanmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kaya S. Ağız ve Diş Sağlığı Hastalarında Yaşam Kalitesinin İncelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
2. Jaacks LM, Siegel KR, Gujral UP, Narayan KM. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(3):331-43.
3. Lima SM, Grisi DC, Kogawa EM, Franco OL, Peixoto VC, Gonçalves-Júnior JF, ve ark. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. *Int Endod J.* 2013;46(8):700-9.
4. Hegab A. Dental Infection and Diabetes: The Cycle. *Oral Hygiene and Health.* 2015;3:e110.
5. Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissue Eng.* 2017;8:2041731417702531.
6. Sfeir C, Lee D, Li J, Zhang X, Boskey AL, Kumta PN. Expression of phosphophoryn is sufficient for the induction of matrix mineralization by mammalian cells. *J Biol Chem.* 2011;286(23):20228-38.
7. Kulan P, Karabiyik O, Kose GT, Kargul B. The effect of accelerated mineral trioxide aggregate on odontoblastic differentiation in dental pulp stem cell niches. *Int Endod J.* 2018;51(7):758-66.
8. Shamel M, Al Ankily MM, Bakr MM. Proliferative Capacity and Differentiation Potential of Isolated Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells in Diabetic Patients. *Stem Cells Regen Med.* 2017;1(3):1-6.
9. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod.* 2009;35(1):60-2.
10. Gomes-Filho JE, de Azevedo Queiroz Í O, Watanabe S, da Silva Santos LM, Lodi CS, Okamoto R, ve ark. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dent Traumatol.* 2015;31(1):67-72.
11. de Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L, ve ark. Systemic bone marker expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and diabetic conditions. *Int Endod J.* 2018;51(8):889-900.
12. Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. *Biochem J.* 2017;474(8):1321-32.
13. Barron MJ, McDonnell ST, Mackie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:31.
14. van Driel M, Pols HA, van Leeuwen JP. Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des.* 2004;10(21):2535-55.
15. de Almeida FM, Marques SA, Ramalho BdS, Rodrigues RF, Cadilhe DV, Furtado D, ve ark. Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(9):1939-49.

16. Woo SM, Lim HS, Jeong KY, Kim SM, Kim WJ, Jung JY. Vitamin D Promotes Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells via ERK Activation. *Mol Cells*. 2015;38(7):604-9.
17. Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):215-20.
18. Khan D, Moffet CR, Flatt PR, Kelly C. Role of islet peptides in beta cell regulation and type 2 diabetes therapy. *Peptides*. 2018;100:212-8.
19. Atlas ID. IDF diabetes atlas 8th edition [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 2019 May 13]. Erişim adresi: [https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/previous/files/8/IDF\\_DA\\_8e-EN-final.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/previous/files/8/IDF_DA_8e-EN-final.pdf)
20. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
21. Labazi H, ve Trask AJ. Coronary microvascular disease as an early culprit in the pathophysiology of diabetes and metabolic syndrome. *Pharmacol Res*. 2017;123:114-21.
22. Kolb H, ve Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med*. 2017;15(1):131.
23. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, ve ark. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone*. 2008;42(6):1122-30.
24. Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc*. 2003;134 Spec No:4s-10s.
25. Fouad AF, ve Burlison J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc*. 2003;134(1):43-51; quiz 117-8.
26. Soell M, Hassan M, Miliauskaite A, Haïkel Y, Selimovic D. The oral cavity of elderly patients in diabetes. *Diabetes Metab*. 2007;33 Suppl 1:S10-8.
27. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
28. Bryan CS, Reynolds KL, Metzger WT. Bacteremia in diabetic patients: comparison of incidence and mortality with nondiabetic patients. *Diabetes Care*. 1985;8(3):244-9.
29. Gulia S, Bhatt V, Shetty M, Prasad KD, Gupta P. Effect of Type II Diabetes Mellitus, *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* on the Biofilm Formation on Prosthetic Materials. *J Contemp Dent Pract*. 2018;19(12):1538-45.
30. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):30-9.



31. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993;16(1):329-34.
32. Belting CM, Hiniker J, Dummett CO. Influence of diabetes mellitus on the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 1964;35(6):476-80.
33. Mealey BL, ve Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289-303.
34. Nikbin A, Bayani M, Jenabian N, Khafri S, Motallebnejad M. Oral health-related quality of life in diabetic patients: comparison of the Persian version of Geriatric Oral Health Assessment Index and Oral Health Impact Profile: A descriptive-analytic study. *J Diabetes Metab Disord*. 2014;13(1):32.
35. Kofahl C, Doğan M, Doğan G, Mnich E, von dem Knesebeck O. Quality of life of Turkish type 2 diabetics in Germany and Turkey—a comparison between Hamburg and Istanbul. *Ethnicity & health*. 2014;19(6):617-30.
36. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod*. 2011;37(5):598-601.
37. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod*. 2011;37(1):1-5.
38. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, Patumraj S. The effect of long-term supplementation of vitamin C on pulpal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003;29(3-4):313-9.
39. Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J, Haneji T, ve ark. High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues. *J Endod*. 2010;36(6):1014-20.
40. Bender IB, ve Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod*. 2003;29(6):383-9.
41. Seo MS, Hwang KG, Lee J, Kim H, Baek SH. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod*. 2013;39(2):242-8.
42. Yan M, Wu J, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, ve ark. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway. *J Endod*. 2014;40(5):640-7.
43. Gomes Filho JE, Queiroz ÍO, Watanabe S, Cintra LT, Ervolino E. Influence of diabetes mellitus on the mineralization ability of two endodontic materials. *Braz Oral Res*. 2016;30:S1806-83242016000100218.
44. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Kimura D, Yamawaki I, Noguchi M, ve ark. High Glucose Concentrations Suppress the Proliferation of Human Periodontal Ligament

Stem Cells and Their Differentiation Into Osteoblasts. *J Periodontol.* 2016;87(4):e44-51.

45. Madani ZS, Haddadi A, Mesgarani A, Seyedmajidi M, Mostafazadeh A, Bijani A, ve ark. Histopathologic responses of the dental pulp to calcium-enriched mixture (CEM) and mineral trioxide aggregate (MTA) in diabetic and non-diabetic rats. *Int J Mol Cell Med.* 2014;3(4):263-71.

46. Leite MF, De Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *Int Endod J.* 2010;43(11):959-67.

47. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod.* 2008;34(10):1211-4.

48. Ilić J, Radović K, Roganović J, Brković B, Stojić D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *J Endod.* 2012;38(6):764-8.

49. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, ve ark. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet.* 2018;392(10159):1789-858.

50. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite ed).* 2011;3:711-35.

51. Hacking S, ve Khademhosseini A. Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *J Dent Res.* 2009;88(5):409-21.

52. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 2008;12(2):113-8.

53. Goldberg M. The healthy root pulp, degradation and regeneration. *J Dent Health Oral Disord Ther.* 2019;10(1):70-81.

54. Catón J, Bostanci N, Remboutsika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med.* 2011;15(5):1054-65.

55. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, ve ark. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008;34(8):962-9.

56. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, ve ark. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet.* 2004;364(9429):149-55.

57. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-51.

58. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, ve ark. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.
59. Shi S, Robey P, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29(6):532-9.
60. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, ve ark. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):709-21.
61. Cantore S, Ballini A, De Vito D, Martelli F, Georgakopoulos I, Almasri M, ve ark. Characterization of human apical papilla-derived stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2017;31(4):901-10.
62. Lin L, Ricucci D, Huang GJ. Regeneration of the dentine–pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *Int Endod J.* 2014;47(8):713-24.
63. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT-J. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod.* 2011;37(9):1217-24.
64. Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS, ve ark. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *J Endod.* 2014;40(8):1063-70.
65. Saoud TMA, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Lin LM, Gibbs JL. Clinical and radiographic outcomes of traumatized immature permanent necrotic teeth after revascularization/revitalization therapy. *J Endod.* 2014;40(12):1946-52.
66. 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. *J Endod.* 2012;38(10):1330-6.
67. Verma P, Nosrat A, Kim J, Price J, Wang P, Bair E, ve ark. Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration in vivo. *J Dent Res.* 2017;96(1):100-6.
68. Lenzi R, ve Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod.* 2012;38(3):411-4.
69. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT-J. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2010;36(1):56-63.
70. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, ve ark. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):743-7.

71. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.
72. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13(5):452-5.
73. Huang J, Wang F, Okuka M, Liu N, Ji G, Ye X, ve ark. Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res*. 2011;21(5):779-92.
74. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, ve ark. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
75. Thomson M, Liu SJ, Zou L-N, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*. 2011;145(6):875-89.
76. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Engineering of stem cells: Springer*; 2009. p. 185-99.
77. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*. 2011;9:29.
78. Ross J, ve Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(4):237-42.
79. Li Z, ve Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(10):589-95.
80. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, ve ark. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
81. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, ve ark. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
82. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol*. 2002;197(4):430-40.
83. Malek A, ve Bersinger NA. Human placental stem cells: biomedical potential and clinical relevance. *J Stem Cells*. 2011;6(2):75-92.
84. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2001;19(3):180-92.
85. Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, Keegan DJ, Reh TA, Luthert PJ, ve ark. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(8):2033-43.
86. Chen B, Zhou L, Wang L, Hu S, Wang R. Better induction and differentiation strategy for rat pancreatic stem cells: transplant in liver niche. *Transplant Proc*. 2009;41(9):3898-904.

87. Yousefifard M, Shamseddin J, Babahajian A, Sarveazad A. Efficacy of adipose derived stem cells on functional and neurological improvement following ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* 2020;20(1):294.
88. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.
89. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008;16:1-9.
90. Crane JF, ve Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:267-86.
91. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, ve ark. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.
92. Casagrande L, Mattuella LG, de Araujo FB, Eduardo J. Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;31(1):25-7.
93. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, ve ark. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Inter.* 2008;32(7):827-34.
94. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, ve ark. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS one.* 2006;1(1):e79.
95. Kumar A, Narayanan K, Chaudhary RK, Mishra S, Kumar S, Vinoth KJ, ve ark. Current Perspective of Stem Cell Therapy in Neurodegenerative and Metabolic Diseases. *Mol Neurobiol.* 2017;54(9):7276-96.
96. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813-23.
97. Chen S, Santos L, Wu Y, Vuong R, Gay I, Schulze J, ve ark. Altered gene expression in human cleidocranial dysplasia dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 2005;50(2):227-36.
98. Gonzalez-Garza MT, ve Cruz-Vega DE. Regenerative capacity of autologous stem cell transplantation in elderly: a report of biomedical outcomes. *Regen Med.* 2017;12(2):169-78.
99. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, ve ark. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):5807-12.
100. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, ve ark. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1231-40.

101. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, ve ark. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):5.
102. Zhu Y, Shang L, Chen X, Kong X, Liu N, Bai Y, ve ark. Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):207-15.
103. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):571-4.
104. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci.* 2010;52(4):541-52.
105. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 2008;87(8):767-71.
106. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, ve ark. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 2007;327(2):301-11.
107. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, ve ark. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Inter.* 2005;29(7):567-75.
108. Yen AH, ve Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2008;331(1):359-72.
109. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, ve ark. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res.* 2008;87(7):676-81.
110. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, ve ark. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2010;10(2):105-13.
111. Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Sunay H, Şahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(4):351-7.
112. Song M, Cao Y, Shin SJ, Shon WJ, Chugal N, Kim RH, ve ark. Revascularization-associated Intracanal Calcification: Assessment of Prevalence and Contributing Factors. *J Endod.* 2017;43(12):2025-33.
113. Song M, Yu B, Kim S, Hayashi M, Smith C, Sohn S, ve ark. Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation: Lessons Learned from Pulp-Capping Materials and the Emerging Roles of Calcium. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1):93-110.

114. Linde A, ve Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):213-22.
115. Mizuno M, ve Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J.* 2008;41(11):933-8.
116. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(10):489-92.
117. Parirokh M, ve Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-13.
118. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate--a review. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;34(1):1-7.
119. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993;19(11):541-4.
120. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA, 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999;130(7):967-75.
121. Torabinejad M, ve Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-205.
122. Parirokh M, ve Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27.
123. Torabinejad M, ve Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010;36(2):190-202.
124. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303.
125. Fridland M, ve Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod.* 2005;31(5):376-9.
126. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(3):345-7.
127. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J.* 2013;46(1):3-19.
128. Hofer AM, ve Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):530-8.

129. Kim JM, Choi S, Kwack KH, Kim SY, Lee HW, Park K. G protein-coupled calcium-sensing receptor is a crucial mediator of MTA-induced biological activities. *Biomaterials*. 2017;127:107-16.
130. Theman TA, ve Collins MT. The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(3):289-301.
131. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*. 2012;246(1):379-400.
132. Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, ve ark. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system. *J Endod*. 2009;35(6):843-6.
133. Liu CH, Huang TH, Hung CJ, Lai WY, Kao CT, Shie MY. The synergistic effects of fibroblast growth factor-2 and mineral trioxide aggregate on an osteogenic accelerator in vitro. *Int Endod J*. 2014;47(9):843-53.
134. Woo SM, Kim WJ, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim SM, ve ark. Combination of Mineral Trioxide Aggregate and Platelet-rich Fibrin Promotes the Odontoblastic Differentiation and Mineralization of Human Dental Pulp Cells via BMP/Smad Signaling Pathway. *J Endod*. 2016;42(1):82-8.
135. Han JW, Lee BN, Kim SM, Koh JT, Min KS, Hwang YC. Odontogenic Potential of Parathyroid Hormone-related Protein (107-111) Alone or in Combination with Mineral Trioxide Aggregate in Human Dental Pulp Cells. *J Endod*. 2017;43(12):2054-60.
136. Oka S. Potential synergistic effects of a mixture of mineral trioxide aggregate (MTA) cement and *Bacillus subtilis* in dental caries treatment. *Odontology*. 2018;106(1):46-55.
137. Ashry S, Abu-seida A, Emar R. The influence of addition of osteogenic supplements to mineral trioxide aggregate on the gene expression level of odontoblastic markers following pulp capping in dogs. *Veterinarski Arhiv*. 2016;86:685-97.
138. DeLuca HF, Nakada M, Tanaka Y, Sicinski R, Phelps M. The plasma binding protein for vitamin D is a site of discrimination against vitamin D-2 compounds by the chick. *Biochim Biophys Acta*. 1988;965(1):16-21.
139. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2062-72.
140. Bellan M, Guzzaloni G, Rinaldi M, Merlotti E, Ferrari C, Tagliaferri A, ve ark. Altered glucose metabolism rather than naive type 2 diabetes mellitus (T2DM) is related to vitamin D status in severe obesity. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:57.
141. Lim S, Kim MJ, Choi SH, Shin CS, Park KS, Jang HC, ve ark. Association of vitamin D deficiency with incidence of type 2 diabetes in high-risk Asian subjects. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(3):524-30.



142. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, ve ark. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012;33(3):456-92.
143. Lim S, Shin H, Kim MJ, Ahn HY, Kang SM, Yoon JW, ve ark. Vitamin D inadequacy is associated with significant coronary artery stenosis in a community-based elderly cohort: the Korean Longitudinal Study on Health and Aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):169-78.
144. Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(3):185-97.
145. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Prioletta A, Salomone E, Pontecorvi A, ve ark. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab.* 2012;61(4):337-48.
146. Alvarez JA, ve Ashraf A. Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:351385.
147. Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;108(2):201-9.
148. Haussler MR, ve Norman AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969;62(1):155-62.
149. van Etten E, ve Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):93-101.
150. Doğan M, ve Doğan AG. Vitamin D yetersizliği ve eksikliğine güncel yaklaşım. *J Health Sci Med.* 2019;2(2):58-61.
151. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia.* 2008;51(8):1391-8.
152. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67(2):373-8.
153. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):820-5.
154. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(11):561-8.
155. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, ve ark. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 2004;47(3):451-62.
156. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347(1-2):106-20.

157. Wang Y, He D, Ni C, Zhou H, Wu S, Xue Z, ve ark. Vitamin D induces autophagy of pancreatic  $\beta$ -cells and enhances insulin secretion. *Mol Med Rep.* 2016;14(3):2644-50.
158. Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 2013;44(3):235-41.
159. Zhang J, Li W, Liu J, Wu W, Ouyang H, Zhang Q, ve ark. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: An update by meta-analysis. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;355(1):135-42.
160. Zhang X, Beck P, Rahemtulla F, Thomas HF. Regulation of enamel and dentin mineralization by vitamin D receptor. *Front Oral Biol.* 2009;13:102-9.
161. Gorter EA, Hamdy NA, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. The role of vitamin D in human fracture healing: a systematic review of the literature. *Bone.* 2014;64:288-97.
162. Davideau JL, Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Berdal A. In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinol.* 1996;137(8):3577-85.
163. Chen JJ, Jin H, Ranly DM, Sodek J, Boyan BD. Altered expression of bone sialoproteins in vitamin D-deficient rBSP2.7Luc transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 1999;14(2):221-9.
164. Fraser DR. Vitamin D. *Lancet.* 1995;345(8942):104-7.
165. Giunta JL. Dental changes in hypervitaminosis D. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(4):410-3.
166. Kawakami M, Kuroda S, Yoshida CA, Yamashita K, Takada K. Dental follicle cell-conditioned medium enhances the formation of osteoclast-like multinucleated cells. *Eur J Orthod.* 2000;22(6):675-82.
167. Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, Cutchins DC, Cutchins C, Grant WB, ve ark. Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermatoendocrinol.* 2011;3(4):220-9.
168. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32(11):1066-73.
169. Moazzami F, Ghahramani Y, Tamaddon AM, Dehghani Nazhavani A, Adl A. A histological comparison of a new pulp capping material and mineral trioxide aggregate in rat molars. *Iran Endod J.* 2014;9(1):50-5.
170. Mucuk G, Sepet E, Erguven M, Ekmekci O, Bilir A. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) stimulates odontoblastic differentiation of human dental pulp-stem cells in vitro. *Connect Tissue Res.* 2017;58(6):531-41.
171. Bao Ha TL, Nguyen Vu D, Quan TM, Phan Kim N, Hoang Tu H, Hoang Dao BT, ve ark. Study on Culture of Human Dental Pulp Stem Cells to Apply in Tissue Engineering. *J Biomimetic, Biomaterial Tissue Engineer.* 2011;11:13-20.

172. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, ve ark. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PloS one*. 2018;13(1):e0190014.
173. Widbiller M, Bucchi C, Rosendahl A, Spanier G, Buchalla W, Galler KM. Isolation of primary odontoblasts: Expectations and limitations. *Aust Endod J*. 2019;45(3):378-87.
174. Conde MC, Nedel F, Campos VF, Smith AJ, Nör JE, Demarco FF, ve ark. Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. *Int Endod J*. 2012;45(3):266-72.
175. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, ve ark. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J*. 2017;50(1):39-47.
176. Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod*. 2009;35(4):513-9.
177. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, ve ark. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J*. 2017;50 Suppl 2:e31-e9.
178. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, ve ark. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2018;44(1):126-32.
179. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004;329(1):77-84.
180. Dimitrova-Nakov S, Uzunoglu E, Ardila-Osorio H, Baudry A, Richard G, Kellermann O, ve ark. In vitro bioactivity of Bioroot (TM) RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. *Dent Mater*. 2015;31(11):1290-7.
181. Soundararajan M, ve Kannan S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9099-109.
182. Asgharian-Rezaee M, Alipour-Farmad R, Tayarani-Najaran Z. Comparison of Osteogenic Potential of Phenytoin with Dexamethasone in Cultured Dental Pulp Stem Cells. *Rep Biochem Mol Biol*. 2020;9(3):331-7.
183. Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Declercq H, Martens L, De Coster P. Gene Expression Profiling and Molecular Signaling of Various Cells in Response to Tricalcium Silicate Cements: A Systematic Review. *J Endod*. 2016;42(12):1713-25.

184. Lee SK, Lee SK, Lee SI, Park JH, Jang JH, Kim HW, ve ark. Effect of calcium phosphate cements on growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2010;36(9):1537-42.
185. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2003;29(6):407-12.
186. Zhang W, Walboomers XF, van Osch GJ, van den Dolder J, Jansen JA. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(2):285-94.
187. Van Etten E, Verliden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: Functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):395–405.
188. Arya S, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Ghalaut V, Aggarwal S. Healing of Apical Periodontitis after Nonsurgical Treatment in Patients with Type 2 Diabetes. *J Endod.* 2017;43(10):1623-7.
189. Phadnis SM, Ghaskadbi SM, Hardikar AA, Bhonde RR. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. *Rev Diabet Stud.* 2009;6(4):260-70.
190. Milosavljević A, DJukić L, Toljić B, Milašin J, Dželetović B, Brković B, ve ark. Melatonin levels in human diabetic dental pulp tissue and its effects on dental pulp cells under hyperglycaemic conditions. *Int Endod J.* 2018;51(10):1149-58.
191. Assem M, Kamal S, Sabry D, Soliman N, Aly RM. Preclinical Assessment of the Proliferation Capacity of Gingival and Periodontal Ligament Stem Cells from Diabetic Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(2):254-9.
192. Mehrabani D, Mahdiyar P, Torabi K, Robati R, Zare S, Dianatpour M, ve ark. Growth kinetics and characterization of human dental pulp stem cells: Comparison between third molar and first premolar teeth. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(2):e172-e7.
193. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* 2012;69:4372.
194. Alraies A, Alaidaroos NY, Waddington RJ, Moseley R, Sloan AJ. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):12.
195. Akmal MR, Zari ZA, Rohaya MAW, Sahidan S, Ariffin Z, Hi ZA. Isolation and Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Murine Incisors. *J Biol Sci* 2014;14:327-31.
196. Monterubbianesi R, Bencun M, Pagella P, Woloszyk A, Orsini G, Mitsiadis TA. A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. *Sci Rep.* 2019;9(1):1761.

197. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986;38(3):143-54.
198. Brauer A, Pohlemann T, Metzger W. Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements. *Biotech Histochem.* 2016;91(3):161-9.
199. Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, ve ark. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* 2010;11(6):517-31.
200. Tang J, Qing MF, Li M, Gao Z. Dexamethasone inhibits BMP7-induced osteogenic differentiation in rat dental follicle cells via the PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Int J Med Sci.* 2020;17(17):2663-72.
201. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, ve ark. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res.* 2005;321(3):391-400.
202. Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010;5(6):062001.
203. Ghali O, Broux O, Falgayrac G, Haren N, van Leeuwen JP, Penel G, ve ark. Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation. *BMC Cell Biol.* 2015;16:9.
204. Kim HS, Zheng M, Kim DK, Lee WP, Yu SJ, Kim BO. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2018;48(1):34-46.
205. Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Zarina Zainol Abidin I, Zainal Ariffin Z, Senafi S, Hisham Zainal Ariffin S. Differentiation capacity of mouse dental pulp stem cells into osteoblasts and osteoclasts. *Cell J.* 2014;16(1):31-42.
206. Kitagawa M, Ueda H, Iizuka S, Sakamoto K, Oka H, Kudo Y, ve ark. Immortalization and characterization of human dental pulp cells with odontoblastic differentiation. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):727-31.
207. Yun HM, Chang SW, Park KR, Herr L, Kim EC. Combined Effects of Growth Hormone and Mineral Trioxide Aggregate on Growth, Differentiation, and Angiogenesis in Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2016;42(2):269-75.
208. Chang SW, Kim JY, Kim MJ, Kim GH, Yi JK, Lee DW, ve ark. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(4):298-306.
209. Kim JH, Kim SY, Woo SM, Jeong HN, Jung JY, Kim SM, ve ark. Combination of mineral trioxide aggregate and propolis promotes odontoblastic differentiation of

human dental pulp stem cells through ERK signaling pathway. *Food Sci Biotechnol.* 2019;28(6):1801-9.

210. Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY, ve ark. Odontoblastic Differentiation, Inflammatory Response, and Angiogenic Potential of 4 Calcium Silicate-based Cements: Micromega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and Experimental Calcium Silicate Cement. *J Endod.* 2015;41(9):1524-9.

211. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014;40(1):113-8.

212. Park JB. The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and  $\beta$ -glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression. *J Surg Res.* 2012;173(1):99-104.

213. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, ve ark. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017;50(Suppl 2):e63-e72.

214. Woo SM, Hwang YC, Lim HS, Choi NK, Kim SH, Kim WJ, ve ark. Effect of nifedipine on the differentiation of human dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):801-5.

215. Wang Y, Zhou Y, Jin L, Pang X, Lu Y, Wang Z, ve ark. Mineral trioxide aggregate enhances the osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells via NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):2386-97.

216. Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, ve ark. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health.* 2019;19(1):133.

217. Nebel D, Svensson D, Arosenius K, Larsson E, Jönsson D, Nilsson BO.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes osteogenic activity and downregulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2015;50(5):666-73.

218. Ji Y, Zhang P, Xing Y, Jia L, Zhang Y, Jia T, ve ark. Effect of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells and the underlying regulatory mechanism. *Int J Mol Med.* 2019;43(1):167-76.

219. Wang D, Song J, Ma H. An in vitro Experimental Insight into the Osteoblast Responses to Vitamin D<sub>3</sub> and Its Metabolites. *Pharmacology.* 2018;101(5-6):225-35.

220. Posa F, Di Benedetto A, Colaianni G, Cavalcanti-Adam EA, Brunetti G, Porro C, ve ark. Vitamin D Effects on Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Dental Tissues. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9150819.

221. Khanna-Jain R, Vuorinen A, Sándor GK, Suuronen R, Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(4):133-41.
222. Zhou YS, Liu YS, Tan JG. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(15):1278-86.
223. Khanna-Jain R, Mannerström B, Vuorinen A, Sándor GK, Suuronen R, Miettinen S. Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on  $\beta$ -tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *J Tissue Eng*. 2012;3(1):2041731412467998.
224. Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Miyazawa H, Nakamura H.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2012;57(5):453-9.
225. Vieth R, Pinto TR, Reen BS, Wong MM. Vitamin D poisoning by table sugar. *Lancet*. 2002;359(9307):672.
226. Baldi3n PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol*. 2018;2018:6853189.
227. Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant*. 2010;24(2):E23-8.
228. Giacaman RA, Perez VA, Carrera CA. Mineralization processes in hard tissues: Teeth. Aparicio C, Ginebra MP, edit3rler. *Biomaterialization and Biomaterials*. Woodhead Publishing, 2016: 147-85.
229. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol*. 2012;214(3):241-55.
230. Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res*. 2005;20(12):2169-77.
231. Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, Fisher LW, Butler WT, Qin C, ve ark. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18115-20.
232. Ajlan SA, Ashri NY, Aldahmash AM, Alnbaheen MS. Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. *BMC Oral Health*. 2015;15:132.
233. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei DD, ve ark. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater*. 2015;31(12):1510-22.

234. Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, ve ark. Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res*. 2001;80(7):1653-9.
235. Titorencu I, Jinga V, Constantinescu E, Gafencu A, Ciohodaru C, Manolescu I, ve ark. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy*. 2007;9(7):682-96.
236. Wang YX, Ma ZF, Huo N, Tang L, Han C, Duan YZ, ve ark. Porcine tooth germ cell conditioned medium can induce odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(5):354-62.
237. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod*. 2007;33(7):836-9.
238. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*. 2007;33(6):703-8.
239. Khan SZ, Kokubu E, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of rat-cultured dental pulp cells in three-dimensional collagen type-1 gel in vitro and in vivo. *Aust Endod J*. 2013;39(3):137-45.
240. Bouet G, Boulefour W, Juignet L, Linossier MT, Thomas M, Vanden-Bossche A, ve ark. The impairment of osteogenesis in bone sialoprotein (BSP) knockout calvaria cell cultures is cell density dependent. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117402.
241. Nociti FH Jr, Foster BL, Tran AB, Dunn D, Presland RB, Wang L, ve ark. Vitamin D represses dentin matrix protein 1 in cementoblasts and osteocytes. *J Dent Res*. 2014;93(2):148-54.
242. Hamilton N. Quantification and its applications in fluorescent microscopy imaging. *Traffic*. 2009;10(8):951-61.
243. Türken M, Yılmaz S, Çolpan L, Aydınol B, Tuzcu AK. The effect of vitamin D deficiency on serum sIL-2R, IL-6 and TNF-alpha levels in adults with Type 1 diabetes. *Dicle Med J*. 2015;42(4):6.
244. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, ve ark. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia*. 1997;40(8):971-5.
245. Skrabić V, Zemunik T, Situm M, Terzić J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003;59(1):31-5.
246. Scuteri A, Donzelli E, Foudah D, Caldara C, Redondo J, D'Amico G, ve ark. Mesengenic differentiation: comparison of human and rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Stem Cells*. 2014;7(2):127-34.



247. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Pinton P, Stellini E, Botticelli D, ve ark. Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds. *PLoS one*. 2012;7(11):e49146.
248. Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, Huhtala H, Rajala KM, Skottman H, ve ark. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(1):17.
249. Okajcekova T, Strnadel J, Pokusa M, Zahumenska R, Janickova M, Halasova E, ve ark. A Comparative In Vitro Analysis of the Osteogenic Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Using Various Differentiation Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2280.
250. Wang Y, Wang Y, Lu Y, Yu J. High Glucose Enhances the Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla via NF-KappaB Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2019;2019:5068258.
251. Skubis A, Gola J, Sikora B, Hybiak J, Paul-Samojedny M, Mazurek U, ve ark. Impact of Antibiotics on the Proliferation and Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2522.

## 8. EKLER

### EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1120

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 28 MAYIS 2019 SALI  
**Toplantı No** : 2019/14  
**Proje No** : GO 18/611 (Onay Tarihi: 21.06.2018)  
**Karar No** : 2019/14-04

Kurulumuzun 21.06.2018 tarihli toplantısında GO 18/611 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emel Uzunoglu ÖZYÜREK'in sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU, Arş. Gör. Gizem ÖNAL ile birlikte çalışacakları ve Dr. Öğr. Üyesi Emel Uzunoglu ÖZYÜREK'in yüksek lisans tezi olan, GO 18/611 kayıt numaralı ve "*Rejeneratif Endodontik Tedavilerde Kullanılan Mineral Trioksit Agregatın 1 $\alpha$ ,25-Dihidroksivitamin D<sub>3</sub> ile Kombinasyonunun Tip 2 Diyabet Hastalarından Elde Edilen Dental Pulpa Kök Hücrelerindeki Odontojenik Farklılaşmaya Etkisinin in vitro Olarak Değerlendirilmesi*" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 24.05.2019 tarihli başlık değişikliği dilekçesi talebi Kurulumuzun 28.05.2019 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Çalışmanın başlığı "*Diyabet Hastalarında Mineral Trioksit Agregat/1 $\alpha$ ,25-Dihidroksivitamin D<sub>3</sub> Kombinasyonu ile Dental Pulpa Kök Hücrelerinde Odontojenik Farklılaşmanın Araştırılması*" olarak değiştirilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir. /

## EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Tezin Tam Başlığı: **Diyabet Hastalarında Mineral Triksit Agregat/1 $\alpha$ ,25-Dihidroksivitamin D3 Kombinasyonu ile Dental Pulpa Kök Hücrelerinde Odontojenik Farklaşmanın Araştırılması.**

Öğrencinin Adı Soyadı: **Emel UZUNOĞLU ÖZYÜREK**

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: **77**

### ORIJINALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLIK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%**4**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>adudspace.adu.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>2</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<b>www.journalagent.com</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>KARAGÖL, Arda and ATAKA, Nazlı. "D vitamini ve Tip 2 diyabet", Palme Yayıncılık, 2016.</b> Yayın	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>dergipark.ulakbim.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>

## EK-3: Tez Çalışması Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Emel Uzunoğlu Özyürek  
Ödev başlığı: EMEL\_YL\_TEZ  
Gönderi Başlığı: DİYABET HASTALARINDA MİNERA..  
Dosya adı: Emel\_Uzunog\_lu\_O\_zyu\_rek\_YLT.d..  
Dosya boyutu: 22.91M  
Sayfa sayısı: 77  
Kelime sayısı: 15,180  
Karakter sayısı: 108,711  
Gönderim Tarihi: 06-Şub-2021 02:30PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1503038947



**EK-4:** Tezde Yer Alan Grafiklerdeki Alizarin Kırmızısı Absorbansının ve RNA İfadesinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

**Tablo EK-4.1.** Şekil 4.4.'teki grafikte yer alan gerçek zamanlı PZR deneylerindeki kat değişim değerleri.

Genler	Kontrol		DM	
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma
CD45	1,11	0,50	1,50	1,15
CD34	7,10	1,71	4,83	0,80
Nanog	15,96	6,17	22,54	8,93
OCT4	32,78	10,71	88,01	25,81
CD73	6288,75	1324,87	9051,30	3751,43
CD90	3981,29	1187,87	17832,87	4782,42
CD106	44,25	16,63	272,62	95,46

**Tablo EK-4.2.** Şekil 4.6.'da yer alan alizarin kırmızısı absorbans değerleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma
NB	0,11	0,02
FB/-DEX	0,23	0,05
FB/+DEX	0,19	0,04

**Tablo EK-4.3.** Şekil 4.7.'de yer alan alizarin kırmızısı absorbans değerleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma
NB	0,09	0,01
FB	0,19	0,01
FB_MTAD	0,16	0,01
FB_MTAT	0,23	0,06

**Tablo EK-4.4.** Şekil 4.12.'de yer alan alizarin kırmızısı absorbans değerleri.

Besi yeri grupları	Kontrol		DM	
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma
NB	0,336	0,007	0,299	0,007
FB	0,348	0,013	0,300	0,013
FB+MTA	0,377	0,025	0,301	0,011
FB+MTA+VitD3	0,456	0,011	0,353	0,017

**Tablo EK-4.5.** Şekil 4.13. ve 4.14.'te yer alan grafiklerdeki kat değişim verilerinin ortalama (O) ve standart sapma (SS) değerleri.

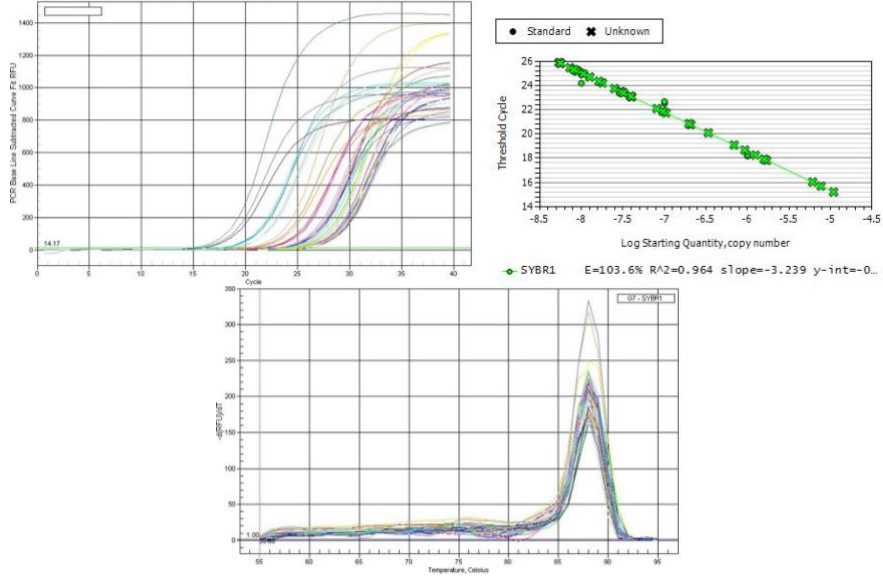
	Besiyeri	OCN		COL1 $\alpha$ 1		DMP 1		DSPP	
		O	SS	O	SS	O	SS	O	SS
<b>K</b>	NB	1,08	0,46	1,03	0,28	1,02	0,24	1,11	0,51
	FB	2,39	0,81	1,47	0,26	1,57	0,23	1,50	0,21
	FB+MTA	7,63	0,10	1,66	0,50	2,74	1,50	1,66	0,10
	FB+MTA+VitD3	130,23	38,98	1,77	0,14	2,52	0,94	2,03	0,30
<b>D M</b>	NB	0,67	0,40	0,17	0,10	36,57	5,00	5,48	3,10
	FB	0,57	0,28	0,17	0,06	34,16	12,79	6,58	2,43
	FB+MTA	2,12	1,28	0,29	0,06	35,16	9,42	7,74	2,49
	FB+MTA+VitD3	11,17	2,58	0,45	0,24	58,83	26,24	11,59	3,96

**Tablo EK-4.6.** Şekil 4.15. ve 4.16.'da 'te yer alan grafiklerdeki kat değişim verilerinin ortalama (O) ve standart sapma (SS) değerleri.

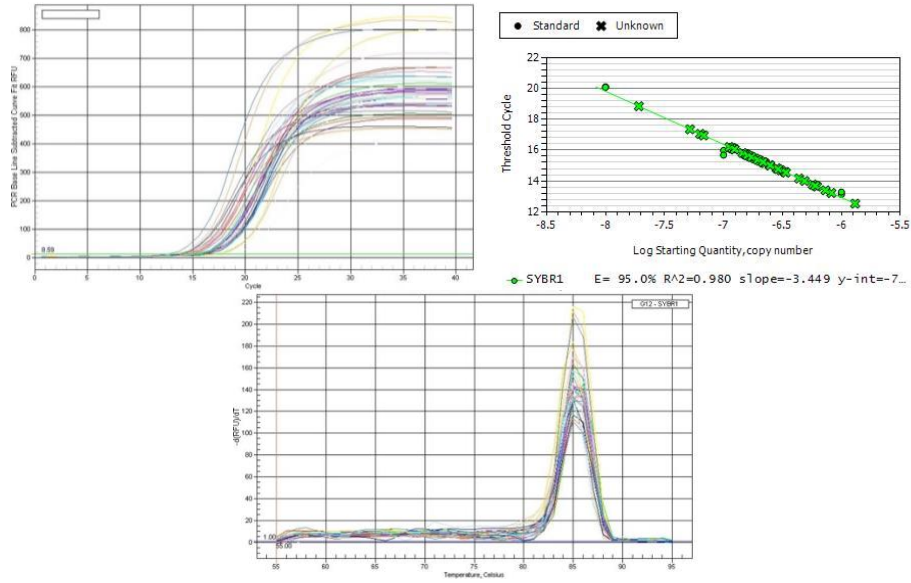
Genler	Besiyeri	Kontrol		DM	
		O	SS	O	SS
<b>OCN</b>	NB	1,08	0,46	1,12	0,59
	FB	2,39	0,81	0,96	0,46
	FB+MTA	7,63	0,10	3,55	2,10
	FB+MTA+VitD3	130,23	38,98	18,69	4,33
<b>COL1<math>\alpha</math>1</b>	NB	1,03	0,28	1,09	0,47
	FB	1,47	0,26	1,07	0,36
	FB+MTA	1,66	0,50	1,89	0,40
	FB+MTA+VitD3	1,77	0,14	2,88	1,56
<b>DMP 1</b>	NB	1,02	0,24	1,01	0,14
	FB	1,57	0,23	0,94	0,35
	FB+MTA	2,74	1,50	0,97	0,30
	FB+MTA+VitD3	2,52	0,94	1,62	0,72
<b>DSPP</b>	NB	1,11	0,51	1,14	0,64
	FB	1,50	0,21	1,36	0,50
	FB+MTA	1,66	0,10	1,60	0,50
	FB+MTA+VitD3	2,03	0,30	2,40	0,82

**EK-5: OCN, COL1 $\alpha$ 1, DMP1, DSPP Genlerine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri**

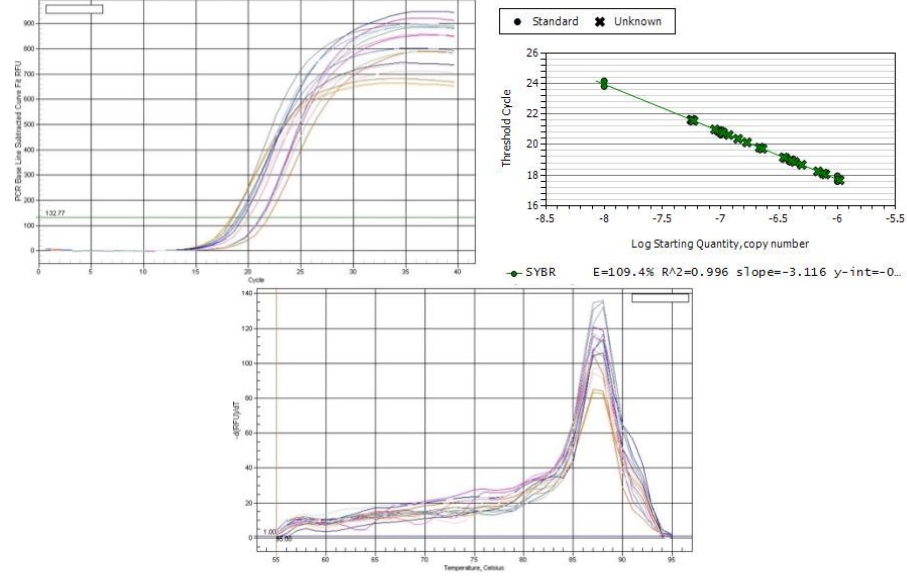
**Şekil EK-5.1.** Farklı besi yerlerine maruz kalan dental pulpa kök hücrelerindeki OCN Genine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri



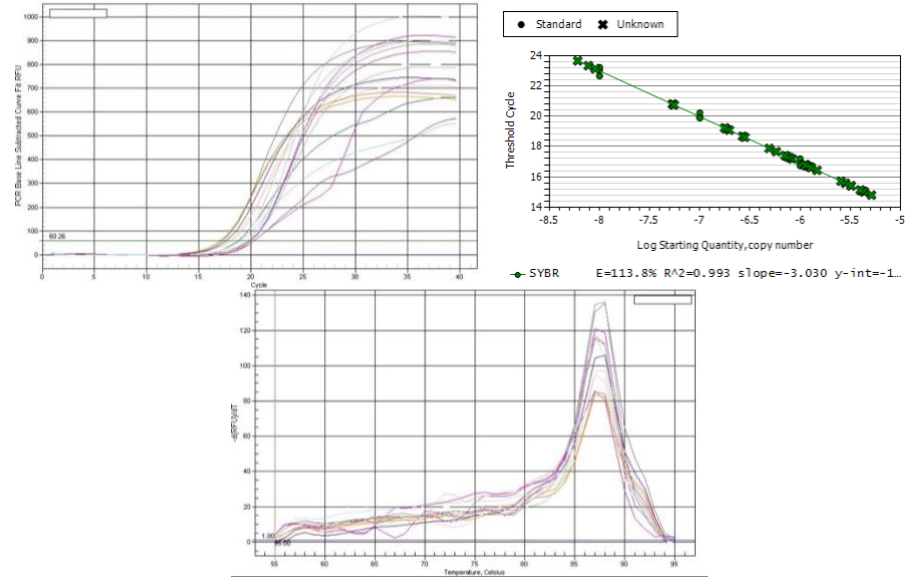
**Şekil EK-5.2.** Farklı besi yerlerine maruz kalan dental pulpa kök hücrelerindeki COL1 $\alpha$ 1 Genine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri



**Şekil EK-5.3.** Farklı besi yerlerine maruz kalan dental pulpa kök hücrelerindeki DMP1 Genine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri



**Şekil EK-5.4.** Farklı besi yerlerine maruz kalan dental pulpa kök hücrelerindeki DSPP Genine Ait Gerçek Zamanlı-PZR Amplifikasyon, Standart ve Erime Eğrileri





**EK-6.** Çalışmada yer alan genlerin gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda elde edilen ortalama Ct değerleri

**Tablo EK-6.1.** Çalışmada yer alan genlerin gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda elde edilen ortalama Ct değerleri.

Genler		Kontrol	DM
<b>CD45</b>		31,65	32,96
<b>CD34</b>		29,14	30,42
<b>CD73</b>		19,34	19,92
<b>CD90</b>		20,04	18,88
<b>CD106</b>		26,54	24,95
<b>OCN</b>	<b>NB</b>	25,40	26,44
	<b>FB</b>	22,85	25,84
	<b>FB+MTA</b>	20,57	22,95
	<b>FB+MTA+VitD3</b>	16,94	20,37
<b>COL1<math>\alpha</math>1</b>	<b>NB</b>	15,56	18,36
	<b>FB</b>	14,96	17,55
	<b>FB+MTA</b>	14,09	16,75
	<b>FB+MTA+VitD3</b>	13,66	15,33
<b>DMP 1</b>	<b>NB</b>	32,78	29,62
	<b>FB</b>	31,46	28,74
	<b>FB+MTA</b>	30,54	28,64
	<b>FB+MTA+VitD3</b>	30,63	27,77
<b>DSPP</b>	<b>NB</b>	33,29	31,67
	<b>FB</b>	32,49	30,46
	<b>FB+MTA</b>	32,46	30,82
	<b>FB+MTA+VitD3</b>	32,03	29,79
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	<b>NB</b>	18,85	18,79
	<b>FB</b>	18,19	18,16
	<b>FB+MTA</b>	18,53	18,82
	<b>FB+MTA+VitD3</b>	18,54	18,63

## EK-7. Çalışmaya dişi dahil edilen bir hastanın kan değerleri ve panoramik filmi

Hastanın Adı, Soyadı :		
TC Kimlik :		
Doğum Tarihi, Cinsiyeti :	1996 / K	
Protokol / Dosya / İşlem No:		
Rapor No : 92399		
HPLC Laboratuvarı	Tetkik İstek Zamanı: 05/04/2019 16:02	Numune Kabul Zamanı: 08/04/2019 14:36
Tetkiki İsteyen:	Numune Türü : Kan	Uzman Onay Zamanı: 08/04/2019 16:06
Prof.Dr.	Numune Alma Zamanı: 08/04/2019 14:25	
Aile Hekimliği		

Test Adı	Durum	Sonuç	Birim	Referans Değerler	Önceki Sonuçlar
Glikozile hemoglobin (HbA1c)	Y	6,6	%	3,5 - 5,6	6,5 (24/12/18) 6,0 (25/06/18) 7,7 (16/02/18)

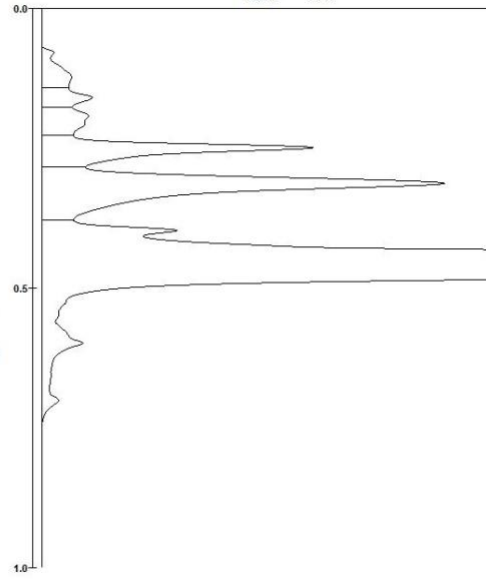
>=6,5 Diyabet

NO: 0102 SL: 0001 - 01

ID: 82249892

CALIB Y = 1.1655X + 0.6853

NAME	%	TIME	AREA
A1A	0.5	0.25	10.13
A1B	0.5	0.32	9.92
F	0.7	0.39	14.80
LA1C+	2.3	0.50	48.27
SA1C	6.6	0.63	105.95
A0	91.0	0.91	1904.28
H-V0	0.0	0.00	0.00
H-V1	0.0	0.00	0.00
H-V2	0.0	0.00	0.00
TOTAL AREA			2093.35
HBA1C	6.6 %		
HbA1	7.5 %		
HbF	0.7 %		



1 / 2

NUCLEUS - Monad Yazılım & Danışmanlık

Test Adı	Durum	Sonuç	Birim	Referans Değerler	Önceki Sonuçlar
25-OH Vitamin D		23,15	µg/L	23,75	12,04 22,29
	Ciddi eksiklik		µg/L	< 10	(08/04/18) (24/12/18) (16/02/18)
	Orta derecede eksiklik		µg/L	10 - 24	
	Optimum düzey		µg/L	25 - 80	
	Olası toksik düzey		µg/L	> 80	

\*LC-MS/MS yöntemi ile çalışılmıştır.\*

Onaylayan: Prof. Dr. Biyokimya Birim Sorumlusu: Prof. Dr. Tıbbi Laboratuvarlar Direktörü: Doç.Dr.

Açıklamalar:

- Karşıtaf analizlerde iç kalite kontrol sonuçlarımız Wesgart kurallarına göre değerlendirilmektedir.
- Hastanın diğer klinik ve diğer laboratuvar bulguları ile uyumsuz olduğunu düşündüğünüz veya elinizdeki laboratuvar sonucu ile girişimsel işlem yapacağınız durumlarda sonucun doğrulanması için laboratuvar ile temasa geçmeniz rica olunur.
- Hastadan numune alınması ve barkodlanması kuralımıza yapılmamış olup bu sonuçlar sadece inceleme için yapılmış numuneler ile ilgilidir.
- Y: Yüksek değer, D: Düşük değer
- \*: Karar sınırı

Şekil EK-7.1. Hastanın kan değerlerini gösterir sonuçları.



**Şekil EK-7.2.** Hastanın çekim öncesi alınan panoramik filmi. Alt sol 3. molar dişi çalışmaya dahil edilmiştir.