

DERLEME

## Direkt pulpa kaplama çalışmasında rat modeli

### Rat as a model for direct pulp capping research.

Ekim Onur Orhan

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti AD, Isparta, Türkiye

#### Özet

Bu derlemenin amacı direkt pulpa kaplaması için medikal materyallerin klinik öncesi değerlendirilmesinde rat dişlerinin uygunluğunu değerlendirmektir. Uluslararası standartlara göre, diş hekimliğinde hayvan çalışmaları için yalnızca kemirgen olmayan memelileri türlerinin direkt pulpa kaplamasında amacıyla kullanım uygunluğu oldukça açıktır. Öte yandan geçmiş yarım yüzyılda birçok çalışma, rat dişleri üzerinde pulpanın ağız ortamına açılmasından sonraki direkt pulpa kaplamasını, pulpotomileri ve doku reaksiyonlarını değerlendirmiştir. Birçok çalışmada rat pulpa dokusunun direkt pulpa kaplamasından sonraki iyileşmesinin histolojik olarak insan dişlerinin ve diğer hayvan türlerinin pulpa dokusu ile karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir. Pulpa dokusu içeren rat dişlerinde, pulpa dokusunun temel biyolojik tepkimeleri ve rat dişlerinin yara iyileşmesinin farklı aşamaları boyunca görülen etkileşimler, diğer memeli türleri ile karşılaştırılabilir. Diş hekimliğinde rat dişleri, direkt pulpa kaplaması sonrasında pulpa dokusu tepkimelerini içeren kayda değer veriler elde etmede geçerli bir çalışma modelidir. Bundan dolayı ratların kullanılması evrim düzeyi yüksek memelilerin kullanıldığı çalışmaların sayısını önemli ölçüde azaltabilmektedir. Sonuçları belirgin olmayan çalışmalarda evrim düzeyi yüksek hayvanların kullanımı sınırlandırılmalıdır. Her ne kadar küçük diş yapısına sahip olmaları gibi bazı teknik zorluklara sahip olsalar da, rat dişleri ile yapılan herhangi bir çalışmanın üstesinden gelinebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Deney hayvanları, Direkt pulpa kaplaması, Diş hekimliği, Rat

#### GİRİŞ

Uluslararası standardizasyon örgütünün (ISO) 7405 sayılı belgesinde diş hekimliğinde, klinik öncesi medikal bir materyalin biyoyumluluğunun değerlendirilmesinde dental materyalleri için belirlenen standartlar yer almaktadır (1). Bu amaçla ISO 7405 standardı, diş hekimliğinde dental araç ve gereçlerin, dental materyallerin biyolojik olarak değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

#### Abstract

The aim of this review is to evaluate the suitability of rat teeth in preclinical evaluation of medical materials for direct pulp capping. The international standards state clearly that only non-rodent mammals are suitable species for animal research in dentistry. However, in the past half of the century numerous research have been published using rat teeth in order to evaluate direct pulp capping, pulpotomies and tissue reactions after pulp exposure. Several studies showed that the healing of rat pulp tissue after direct pulp capping was histologically comparable with human's and other animal species' pulp tissue. In the rat teeth including pulp tissue, basic biological reactions of the pulp tissue and the interactions seen during the different stages of wound healing are comparable with those of the other mammal species. Rat teeth are a valid study model in order to provide valuable data concerning pulp tissue reaction after direct pulp capping in dentistry. Therefore, the use of rats may significantly reduce the number of currently used higher animals in research. Tests in higher developed animals should be limited to experiments which clarify inconsistent results. However, some technical difficulties, like the small size of rat teeth must be dealt with before undertaking any research.

**Keywords:** Animal model, Direct pulp capping, Pulp, Dentistry Rat

ISO 7405 bölüm 6.3 ve 6.4 de yer alan diş pulpası ile dentin kullanım testleri ve direkt pulpa kaplaması testleri yer almaktadır. ISO standartlarına göre, pulpa ve dentin ile doğrudan temasta olan dental materyallerin biyoyumluluğunun değerlendirildiği çalışmalar, yalnızca insanlar üzerinde yapılan uygulamalar ile sınırlı değildir. ISO standartlarına göre bu çalışmalar aynı zamanda maymunlar, köpekler, gelincikler ve minyatür domuzlarda

da yapılabilmektedir. Kemirgenler, bu listede uygun olmayan hayvanlar olarak açıkça belirtilmektedir. Vital diş pulpa dokusu ile direkt temasta olan pulpa kaplama maddelerinin veya diş dolgu maddelerinin (kalsiyum hidroksit formülleri, simanlar, kompozit rezinler, mineral trioksit agregat veya mine matriks türevi gibi) temel biyouyumluluk çalışmalarında primatlar ile yüksek organizasyonlu hayvanlar tavsiye edilmiştir. Uluslararası standartlara göre uygun bir model olarak görülmeyen rat dişlerinde, 50 yıldır direkt pulpa kaplamaları, pulpotomiler ve pulpa ekspozundan sonra oluşan doku reaksiyonları çalışılmaktadır (2–71).

Diş hekimliğinde direkt pulpa kaplaması maddesi olarak altın standart kabul edilen kalsiyum hidroksit ile kaplanan rat dişi pulpalarının histolojik olarak iyileşmesinin, insanlardaki iyileşmeye benzer olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (3, 7, 8, 10, 16, 21 – 28, 30, 32, 41 – 43, 45 – 47, 49, 50, 53, 55 – 59, 61, 62, 65 – 67, 69). Bu duruma bir örnek oluşturarak ratlarda, primatlarda ve insanlardaki kalsiyum hidroksit ile direkt pulp kaplaması sonrası hücresel reorganizasyon sıralanmasının tanımlanabilir olduğu bulunmuştur (72). Bundan dolayı rat dişlerinin bu tarz çalışmalar için uygun bir model oluşturduğu düşüncesi araştırmacılar tarafından kabul görmektedir.

Bu derlemenin amacı rat dişlerinin güncel literatürler eşliğinde dental bir materyali direkt pulpa kaplamasında test etmek için uygun bir model olmasını değerlendirmektir.

### Test yöntemleri

1974 yılında Autian (73) tarafından dental materyalleri test edebilmek için ilk kez 3 farklı test yöntemi sunulmuştur, daha sonra bu yöntem Langeland ve Cotton (74) tarafından yeniden düzenlenmiştir. Bu da 1997 yılında diş hekimliğinde kullanılacak materyallerin klinik öncesi biyouyumluluklarını test edilmesinin ve değerlendirilmesinin kapsadığı ISO 7405'in yayımlanmasına öncülük etmiştir (1). Gangler ise dental materyallerin biyouyumluluğunu test etmede 3 aşamalı bir model tanımlamıştır (75). Buna göre;

1. Özel olmayan toksisitenin görüntülediği testler (Ör. Sitotoksosite testleri, genotoksosite testleri).
2. Rat, domuz ve maymunlara üzerinde uygulanan hayvan deneylerini kapsayan özel toksisitenin kullanıldığı testler (Ör. fare ve ratların kemik ve bağ doku implantasyonlarının histopatolojik testleri).
3. İnsanlar üzerinde uygulanan kontrollü çalışmalar.

Gangler (75), rat dişlerini kullanarak dental materyallerin test edilmesinin 2. kısımda yer aldığını bildirmiştir. Ayrıca rat dişlerinin dental materyallerin kısa inceleme dönemlerinde kullanılması gerekliliği olduğunu öne

sürerek, uzun inceleme dönemi için domuz veya maymun gibi evrim düzeyi yüksek deney hayvan modellerinin kullanılması gerekliliği olduğunu bildirmiştir.

Stanley (76), direkt pulpa kaplaması uygulamalarında ISO 7405 de yer almayan rat modeli kullanımının, pulpa enflamasyonu ve pulpa enfeksiyonu ile ilişkili sorunlar ile sonuçlandığı görüşünü reddetmiştir. Ayrıca rat dişlerinin direkt pulpa kaplamasının histolojik sonuçlarını değerlendirebilmek için güvenilir ve geçerli bir model olduğunu vurgulamıştır.

### Rat dişlerinin kullanıldığı direkt pulpa kaplaması çalışmaları

Rat dentisyonu alt ve üst çene arkında geniş bir çift diastema ile birbirinden ayrılan iki kesici diştten ve üç büyük azı diştten oluşmaktadır (Resim 1).

**Resim 1.** Rat kafatasının genel görünümü. Tipik bir kemirgen anatomisine sahip alt ve üst çenenin genel görünümünde kesici dişlerin arkasında dişsiz uzun bir diastema ve azı dişleri görünmektedir.

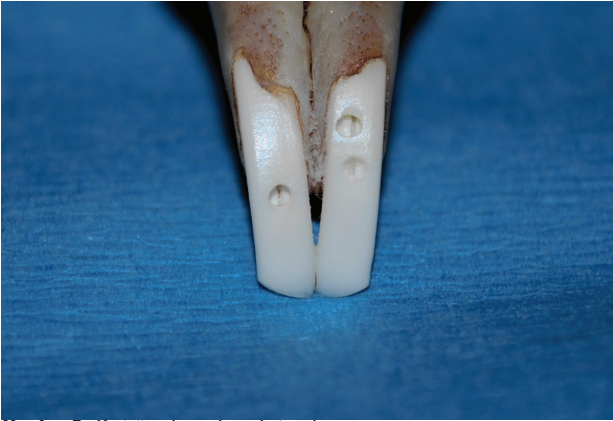


Kesici dişler tipik bir kemirgen kesicisine benzemektedir. Bu dişler pulpa dokusu içeren, kök ucu açık, hayat boyu uzayan bir yapıdadır. Buna karşın büyük azı dişleri, insan büyük azı dişine anatomik, fizyolojik, histolojik ve biyolojik yönden benzeyen pulpa dokusu içeren yapıdadır. Araştırmacılar rat büyük azı dişini, insan büyük azı dişinin küçük boyutlara sahip bir minyatürü olarak tanımlamaktadır (2,4,5,47,77,78).

Ratların diş formülü şöyledir:

3001	1003
3001	1003

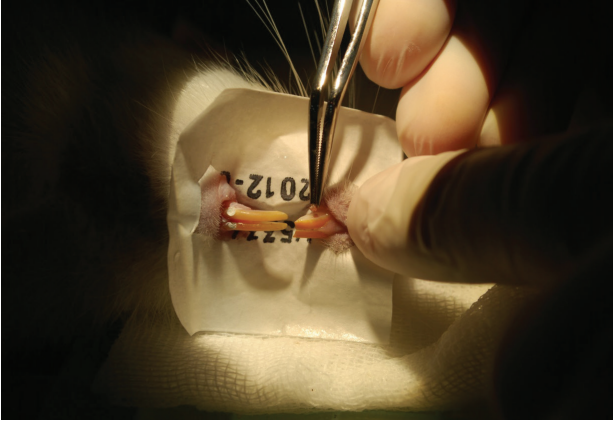
Rat dişlerine bir materyali uygulayabilmek için öncesinde mutlaka bir pilot çalışma yaparak deneyim kazanılması gereklidir (Resim 2).



**Resim 2.** Rat ön dişinde pilot çalışma

Ratlar üzerinde yapılacak pilot çalışmalar sayesinde, anatomisinden kaynaklanan olumsuzlukların azalacağı ve daha az deneğin protokol dışında bırakılmasına neden olacağı vurgulanmıştır. Ağız açıklığının dar olması, diş ve pulpa boyutlarının çok küçük olması, dişlerin anatomik konumlanması (uzun diastema), rat azı dişlerinde çalışmada teknik zorluk oluşturan durumlardır (62–67). Bu nedenle uygun ışık kaynağı ve büyütme altında, mikrocerrahi için uygun el aletleri ve döner aletlerin tercih edilmesi, çalışma öncesi pratik uygulamaların yapılarak deneyim kazanılması ile bu olumsuz durumların üstesinden gelinmektedir (Resim 3) (76).

**Resim 3.** Rat ön dişlerine küçük boyutlara sahip el aletleri ile direkt pulpa kaplama uygulaması.



Bunların dışında ratlarda uygulanacak her işlem öncesinde mutlaka derin genel anestezi altına alınması önerilmiştir (2).

Rat azı dişlerinin gelişim süreci insanların azı dişlerinin analogudur. Bundan dolayı rat büyük azı dişlerinin pulpa dokusundaki temel biyolojik tepkimeler ve yara iyileşmesinin farklı dönemlerindeki etkileşimlerin diğer memeli türleri ile karşılaştırılabilir olduğu savunulmuştur (25, 28). Jean ve ark. (45), kalsiyum hidroksit ile yapılan direkt pulpa kaplamalarında iyileşmeyi 21. günden 4 aya

kadar izledikleri dönemde rat, köpek ve domuz modelleri arasında herhangi bir farklılık bulamamışlardır. Buna karşın Watts ve Peterson (25) direkt pulpa kaplaması uygulamasından sonraki iyileşmede köpek ve rat modelleri arasında farklılık rapor etmişlerdir. Rat azı dişlerinde 4 hafta sonra örneklerin %83'ünde tersiyer dentin oluşumu gözlemlenmiş, köpeklerin azı dişlerinde ise 6 hafta sonra yalnızca örneklerin %60'ında tersiyer dentin oluşumu izlenmiştir. Araştırmacılar bu farklılığın daha önce köpek ve insan dişlerinde karşılaştırmalı tersiyer dentin oluşumunun değerlendirildiği bir başka çalışmayı kaynak göstererek köpek azı dişlerine göre rat azı dişlerinin, insan azı dişleri ile daha benzer sonuçlar oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir.

Rat büyük azı dişlerinin pulpası ağız ortamına açıldıktan sonra insanlarda tanımlanan odontoblast benzeri hücrelerin ürettiği tipik tersiyer dentine benzeyen sert doku tamiri görülmektedir (79). Eğer rat büyük azı pulpa odasının tavanı uzaklaştırılarak ağız ortamına açılırsa, insanlarda ve diğer memelilerde gözlemlenen enflamatuvar yanıtı benzer bir enflamasyon ile sonuçlanmaktadır (80). Bununla birlikte bu biyolojik yanıtın ilerleyişi insanlardakine göre rat dişlerinde 30 kat hızlı olduğu rapor edilmiştir (82,83).

Direkt pulpa kaplaması sonrasında kaplama ve dolgu materyallerinin kimyasal olarak toksisitesi dışında bakteriyel sızıntının veya bakteri toksinlerinin varlığı da pulpanın canlılığını tehlikeye atan önemli durumlardır. Bakteriyel floranın çeşitliliği ve ürettikleri toksinler hayvan türleri arasında farklılık göstermektedir (78). Rat dişlerinin oral bakteriyel mikroflorasının insanlarınkine, köpek bakteriyel mikroflorasından daha çok benzediği birçok çalışmada ortaya konmuştur (46,83–85). İnsanlar, maymunlar ve ratların kök kanal mikrobiyal florasının incelendiği bir çalışmada her iki hayvan modelinin insanlara bu açıdan oldukça benzediği rapor edilmiştir (86).

ISO 7405'e göre enflamasyon zaman grupları kısa dönem için  $7 \pm 2$  ve uzun dönem için  $70 \pm 5$  gün olarak belirlenmiştir (1). Bu dönemler FDI standartlarına göre enflamasyonun erken dönemi için 3–5 gün, orta dönemi için 21–30 gün ve uzun dönemi için  $90 \pm 10$  gün olarak belirlenmiştir (87).

Post operatif uzun dönem iyileşme söz konusu olduğunda, özel immün savunma mekanizmasının ratlarda, insanlara veya diğer memelilere göre oldukça reaktif olmasından dolayı bu modelin kullanımı uygun değildir (88–90). Rat dişlerine kalsiyum hidroksit ile direkt pulpa kaplamaları sonrasında 1 hafta içinde tersiyer dentin oluşumunun gözlemlendiği, 2 hafta içinde dentin köprüsünün tamamlandığı belirtilmiştir. 2 haftayı geçen inceleme dönemlerinde ise rat dişi pulpa hücreleri tarafından osteodentin benzeri ara madde oluşumunun sürekli sentezlenmesine bağlı olarak tersiyer dentin



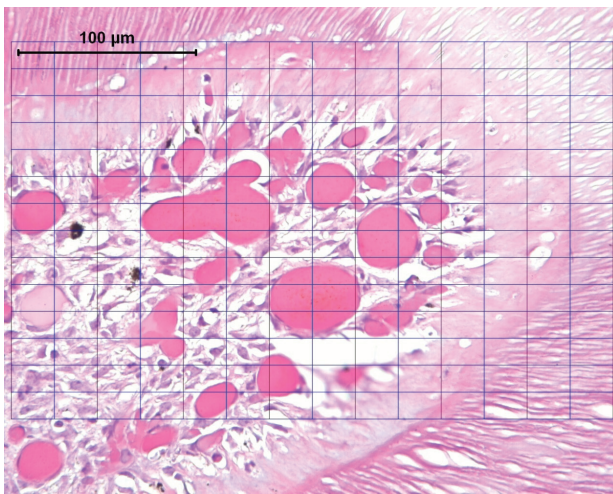
kalınlığının arttığı gözlemlenmiştir (88).

Rat azı dişlerinin olumlu yönlerine rağmen çeşitli teknik zorluklardan dolayı birçok araştırmacı vital pulpa tedavisi çalışmalarında rat azı dişleri yerine kesici dişleri kullanmayı tercih etmişlerdir (91–96).

Sloan ve Smith (94), 28 günlük ratların kesici dişlerinde direkt pulpa kaplamasından sonra tersiyer dentin yapımı ile bir büyüme faktörü olan TGF- $\beta$ 'nin ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Hu ve ark. (95) gelişimini tamamlamış ortalama 100g ağırlığındaki 40 adet ratın 80 adet alt çene ön dişine sınıf V kaviteler hazırlamış ve 1 mm<sup>2</sup> boyutunda pulpa dokusunu ağız ortamına açmıştır. Büyüme faktörleri ile tersiyer dentin oluşumu arasındaki ilişkiyi inceledikleri 2 ve 3 haftalık inceleme dönemlerinde, büyüme faktörlerinin kontrol gruplarına ve kalsiyum hidroksite göre daha fazla örnekte tersiyer dentin oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Orhan ve ark. (96) deney modeli olarak 36 adet ratın 144 adet alt ve üst çene kesici dişini etik uygunluk, teknik uygulama açısından yeterlilik, çalışma alanına kolay ulaşılabilirlik ve çalışma standardizasyonunu göz önüne alarak kullanılmışlardır. Ağız ortamına 0,4 mm çapında açılan rat orta kesici diş pulpalarını ilk kez trombosit zengin plazma kaplayarak 7. ve 28. gündeki histopatolojik ve histomorfometrik değişiklikleri incelemişlerdir. Trombosit zengin plazma grubunda en düşük şiddette enflamasyon izlenirken, tersiyer dentin bakımından gruplar arasında herhangi bir farklılık oluşmamıştır (Resim 4).

**Resim 4.** Rat ön dişine trombosit zengin plazma uygulanmasının 7. gününde aktif tersiyer dentin yapımının histolojik görünümü.



(Hematoxilen&Eozin boyama ve 400 kat optik büyümede çekilen mikrogram).

Decup ve ark. (97) 36 adet ratın 36 adet sol üst 1. molarının mezial yüzeylerine hazırladıkları kaviteler ve pulpal perforasyonlar sonrasında *in vivo* olarak kemik sialoproteinleri ile direkt pulpa kaplaması uygulayarak

8, 14 ve 30 günlük sonuçlarını histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. Dammaschke ve ark. (98) 36 adet ratın 72 adet dişine *in vivo* olarak MTA ve kalsiyum hidroksit ile direkt pulpa kaplaması uygulamışlar, histolojik ve immünokimyasal değerlendirmeleri operasyonu takiben 1, 3 ve 7.günler sonunda gerçekleştirmişlerdir.

İnsan dişi pulpa dokusu için, kemik dokusunda ya da bazı yumuşak dokularda olduğu gibi “kritik yara boyutu” olarak adlandırılan ve herhangi bir tedavi uygulanmadığında kendiliğinden iyileşmeyen bir yara yüzey alanı belirlenmemiştir. Bu durum ile ilişkili olarak rat dişlerinde de kullanılabilir bir kritik pulpa perforasyon boyutu bulunmamaktadır. Ancak bir makale derlemesinde, yeni bir maddenin pulpa üzerine yerleştirilerek biyoyumluluğunun değerlendirilebilmesi için rat modeli kullanılacaksa, kavite hazırlığı aşamasında en fazla ISO 008 çapında bir frez kullanılması gerekliliği bildirilmiştir (99). Rat kesici dişleri üzerinde büyüme faktörlerinin DPK ajanı olarak kullanıldığı bir çalışmada ise, rat kesici dişlerinin bukkal yüzeyine 331/2 no’lu tersine konik frez yardımı ile 1mm<sup>2</sup> büyüklüğünde sınıf V kaviteler hazırlanarak 1 mm<sup>2</sup> büyüklüğünde pulpal perforasyonlar oluşturulmuştur (95). Çalışmacılar bu perforasyon boyutunda 6 farklı materyalin karşılaştırılmasını incelemiştir. Öte yandan bir başka çalışmada perfore edilen rat kesici dişlerinde 0.4 mm büyüklüğünde 144 adet kavite oluşturulmuş ve çalışmanın sonucunda herhangi bir materyal kullanmaksızın oluşturulan 24 adet diştan oluşan pozitif kontrol grubuna ait örneklerin tümünde nekroz görülmüştür (96). Çalışmacılar, rat kesici diş pulpalarında kritik yara boyutunun 0.4 mm den küçük olduğu sonucuna ulaşmıştır (96).

## Sonuç

Diş hekimliğinde bir materyalin biyoyumluluğunun pulpa ve dentin üzerinde test edilmesi için rat dişleri geçerli bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Direkt pulpa kaplamasından sonra kaplama materyalinin toksisitesi veya pulpa iyileşmesi kısa dönem değerlendirmesi planlanıyorsa rat dişleri kullanılabilir. Böylece ratlar üzerinde yapılan çalışmalar ile evrim düzeyi yüksek diğer hayvan türleri ve insanlar üzerinde aynı konunun işlendiği çalışmaların sayısı azaltacaktır.

## Kaynaklar

1. International Standard Organisation. ISO 7405 Dentistry – Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry – Test Methods for Dental Material. Geneva: International Standard Organisation, 1997.
2. Maurice CG, Schour I. Experimental cavity preparations in the molar of the rat. J Dent Res. 1955;

- 34(3):429–434.
3. Berman DS, Massler M. Experimental pulpoto-  
mies in rat molars. *J Dent Res.* 1958;37(2):229–  
242.
  4. Kiryati AA. The effect of hydrocortisone plus  
polyantibiotics upon the damaged and infected  
dental pulp of rat molars. *J Dent Res.* 1958; 37(5):  
886–901.
  5. Kozlov M, Massler M. Histologic effect of various  
drugs on amputated pulps of rat molars. *Oral Surg  
Oral Med Oral Pathol.* 1960; 13:455–469.
  6. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The ef-  
fects of surgical exposure of dental pulps in germ-  
free and conventional laboratory rats. *Oral Surg  
Oral Med Oral Pathol.* 1965; 20:340–349.
  7. Harris R, Bull AW. The healing of the traumatized  
dental pulp following capping. *Aust Dent J.* 1966;  
11(4):236–247.
  8. Rowe AHR. Reaction of the rat molar pulp to var-  
ious materials. *Br Dent J.* 1967;122(7):291–300.
  9. Harris R. Further observations on the pulp reac-  
tions to a tetracycline compound. *Aust Dent J.*  
1968; 13(1):82–86.
  10. Sela J, Ulmansky M. Reaction of normal and in-  
flamed dental pulp to Calxyl and zinc oxide and  
eugenol in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*  
1970; 30(3):425–430.
  11. Hirschfeld Z, Sela J, Ulmansky M. Hydrex and  
its effect on the pulp. Preliminary findings on the  
rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;  
34(2):364–371.
  12. Sela J, Hirschfeld Z, Ulmansky M. Reaction of the  
rat molar pulp to direct capping with the separate  
components of Hydrex. *Oral Surg Oral Med Oral  
Pathol.* 1973; 35(1):118–122.
  13. Cotton WR. Bacterial contamination as a factor in  
healing pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral  
Pathol.* 1974; 38(3):441–450.
  14. Paterson RC. The reaction of the rat molar pulp to  
various materials. *Br Dent J.* 1976;140(3):93–96.
  15. Paterson RC. Corticosteroids and the exposed  
pulp. *Br Dent J.* 1976; 140(5): 174–177.
  16. Paterson RC. Bacterial contamination and the ex-  
posed pulp. *Br Dent J.* 1976;140(7):231–236.
  17. Ranly DM, Fulton R. An autoradiographic study of  
the response of rat molar pulp to Formocresol us-  
ing 3H-thymidine. *Pediatr Dent.* 1983; 5(1):20–4.
  18. Watts A, Paterson RC. Simple metallic compounds  
as pulp-capping agents. A pilot study. *Oral Surg  
Oral Med Oral Pathol.* 1977; 44(2):285–92.
  19. Gangler P, Hoyer I, Krehan F. Biological testing of  
pulp-preserving agents on the pulp of rat molars.  
*Zahn Mund Kieferheilkd.* 1977; 65(8):851–8.
  20. Watts A, Paterson RC. Simple metallic compounds  
as pulp-capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral  
Pathol.* 1979; 48(6):561–3.
  21. Negm MM, Combe EC, Grant AA. Reaction of the  
exposed pulps to new cements containing calcium  
hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;  
51(2):190–204.
  22. Paterson RC. Pulp response in sound and cari-  
ous teeth: a pilot study *Oral Surg Oral Med Oral  
Pathol.* 1981; 51(2):209–12.
  23. Paterson RC, Radford JR, Watts A. The response  
of the rat molar pulp to two proprietary calci-  
um hydroxide preparations. *Br Dent J.* 1981;  
151(6):184–6.
  24. Sela J, Tamari I, Hirschfeld Z, Bab I. Transmission  
electron microscopy of reparative dentin in rat mo-  
lar pulps. Primary mineralization via extracellular  
matrix vesicles. *Acta Anat.* 1981; 109(3):247–51.
  25. Watts A, Paterson RC. A comparison of pulp re-  
sponses of two different materials in the dog and  
the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;  
52(6):648–52.
  26. Hirschfeld Z, Bab I, Tamari I, Sela J. Primary  
mineralisation of dentin in rats after pulp cap-  
ping with calcium-hydroxide. *J Oral Pathol.*  
1982;11(6):426–33.
  27. Smith HS, Soni NN. Histologic study of pulp cap-  
ping in rat molars using calcitonin. *Oral Surg Oral  
Med Oral Pathol.* 1982; 53(3):311–17.
  28. Watts A, Paterson RC. Migration of materials and  
microorganisms in the dental pulp of dogs and rats.  
*J Endod.* 1982; 8(2):53–8.
  29. Ranly DM, Fulton R. The reaction of rat molar  
pulp tissue to Formocresol, formaldehyde, and  
cresol. *J Endod.* 1976; 2(6):176–81.
  30. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination and  
the ‘toxicity’ of materials to the exposed pulp. *Oral  
Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983; 56(5):542–8.
  31. Niamonitos C, Shklar G, Krakow AA. Effects of  
vitamin E dietary supplements on the exposed den-  
tal pulp in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*  
1985; 59(6):627–36.
  32. Paterson RC, Watts A. Further studies on the ex-

- posed germ-free dental pulp. *Int Endod J.* 1987; 20(3):112–21.
33. Watts A, Paterson RC. Pulp-capping studies with analar calcium hydroxide and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J.* 1987; 20(4):169–76.
  34. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64(4):466–76.
  35. Khayat BG, Byers M, Taylor PE, Mecifi K, Kimberly CL. Responses of nerve fibres to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene-related peptide immunocytochemistry. *J Endod.* 1988; 14(12):577–87.
  36. Kimberly CL, Byers MR. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat Rec.* 1988; 222(3):289–300.
  37. Thomas GP, Soni NN, Palmer JE. Histological study of pulp capping in rat molars using protraction. *Natl Dent Assoc J.* 1988; 44(1):9–11.
  38. Yanagisawa T, Ogiwara H, Kumamoto Y, Sawada T, Takuma S. Electron microscopic study of osteodentin-forming cells induced in experimentally exposed rat-molar pulp and of their acid- and alkaline-phosphatase activity. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1988; 29(4):165–73.
  39. Heling I, Zalkind M, Sela J. Pulp capping with hydroxyapatite ceramic in rat molars. *Isr J Dent Sci.* 1989; 2(3):128–32.
  40. Zalkind M, Heling I, Sela J. Response of the dental pulp to capping with a composite resin-bonded ceramic and dental adhesive in rat molars. *Isr J Dent Sci.* 1989; 2(3):133–6.
  41. Jaber L, Mascres C, Donohue WB. Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20(10):502–8.
  42. Jaber L, Mascres C, Donohue WB. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73(1):92–8.
  43. Chiego DJ Jr. An ultrastructural and autoradiographic analysis of primary and replacement odontoblasts following cavity preparation and wound healing in the rat molar. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88(Suppl 1):243–56.
  44. Robson WC, Katz RW. Preliminary studies on pulp capping with demineralized dentin. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88(Suppl 1):279–82.
  45. Jean AH, Pouezat JA, Daculsi G. Pulpal response to calcium phosphate materials. In vivo study of calcium phosphate materials in endodontics. *Cell Mater.* 1993; 3(1):193–200.
  46. Watts A, Paterson RC, Cohen BD, Combe EC. Pulp response to a novel adhesive calcium hydroxide based cement. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1994; 3(1):27–32.
  47. Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecularweight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol.* 1995; 40(3):209–19.
  48. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent.* 1995; 20(6):223–9.
  49. Hu C-C, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998; 24(11):744–51.
  50. Zhang M, Fukuyama H. CGRP immunohistochemistry in wound healing and dentin bridge formation following rat molar pulpotomy. *Histochem Cell Biol.* 1999; 112(5):325–33.
  51. Cortes O, Garcia C, Bernabe A. Pulpal evaluation of two adhesive systems in rat teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2000; 25(1):73–7.
  52. Costa CAS, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent.* 2000; 13(2):81–7.
  53. Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues J-J, Salih E, Goldberg M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig.* 2000;4(2):110–19.
  54. Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. Histocytological evaluation of the reaction of rat pulp tissue to Carisolv. *J Dent.* 2001; 29(4):283–90.
  55. Goldberg M, Six N, Decup F, et al. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res.* 2001; 15:91–5.
  56. Jayawardena JA, Kato J, Moriya K, Takagi Y. Pulpal response to exposure with Er:YAG laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(2):222–229.
  57. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res.* 2000; 15:108–112.



58. Six N, Lasfargues J-J, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3):177-187.
59. Six N, Decup F, Lasfargues J-J, Salih E, Goldberg M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(2):225-232.
60. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod.* 2003; 29(10):646-650.
61. Costa CAS, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility of resinbased materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36(12):831-839.
62. Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. Histocytological evaluation of immediate reactions of rat pulp tissue to three different adhesive systems. *Dtsch Zahnarztl Z.* 2003; 58(11):32-37.
63. Igarashi R, Sahara T, Shimizu-Ishiura M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivate enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2003; 52(2):227-236.
64. Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol.* 2003; 19(6):314-320.
65. Dammaschke T, Stratmann U, Kaup M, Ott KHR. Histocytological evaluation of reaction of rat pulp tissue to Carisolv 2. *Stomatologie. J Dent.* 2001; 29(4):283-290.
66. Sena M, Yamashita Y, Nakano Y, et al. Octacalcium phosphate-based cement as a pulp-capping agent in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(6):749-755.
67. Lovschall H, Tummers M, Thesleff I, Fuchtbauer E-M, Poulsen K. Activation of the Notch signaling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(4):312-317.
68. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 2005; 47(3):135-138.
69. Dammaschke T, Stratmann U, Danesh G, Schafer E, Ott KHR. Reaction of rat pulp tissue to Carisolv 'new gel' – a histocytological evaluation. *Aust Dent J.* 2006; 51(1):57-63.
70. Jegat N, Septier D, Veis A, Poliard A, Goldberg M. Short-term effects of amelogenin gene splice products A + 4 and A – 4 implanted in the exposed rat molar pulp. *Head Face Med.* 2007; 3:40.
71. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008; 34(8):970-974.
72. Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res.* 1979; 58(Spec Iss D):2198-2206.
73. Autian J. General toxicity screening tests for dental materials. *Int Dent J.* 1974; 24(2):235-250.
74. Langeland K, Cotton WR. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30:140-188.
75. Gangler P. The controversy: restoration technique – should there be exclusively adhesive restorations? *Dtsch Zahnarztl Z.* 2005; 60(1):11-14.
76. Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent.* 1998; 11(Spec Iss):S17-34.
77. de Terra P. *Vergleichende Anatomie des menschlichen Gebisses und der Zahne der Vertebraten.* Jena: Fischer. 1911:295-305.
78. Schour I, Massler M. The teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ, eds. *The Rat in Laboratory Investigation.* 2nd edn. Philadelphia: Lippincott. 1949:104-165.
79. D'souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res.* 1995; 74(2):702-709.
80. Muruzabal M, Erasquin J. *Processos apicales experimentales en el molar de rata.* *Rev Asoc Odont Argent.* 1963; 51(2):3-12.
81. Muruzabal M, Erasquin J. Discussion of: methods and criteria in evaluation of periapical response. *Int Dent J.* 1970; 20(3):539-554.
82. Moreton TR, Brown CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res.* 2000; 52(3): 528-533.

83. Huxley HG. Histology of rat molar fissure plaque. *Arch Oral Biol.* 1971; 16(11): 1311–1328.
84. Huxley HG. The recovery of micro-organisms from the fissures of rat molar teeth. *Arch Oral Biol* 1972; 17(10):1481–1485.
85. Wunder JA, Briner WW, Calkins GP. Identification of the cultivable bacteria in dental plaque from the beagle dog. *J Dent Res.* 1976;55(6): 1097–1102.
86. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(4):494–502.
87. Fédération Dentaire Internationale (FDI), Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980; 30(11):140–188.
88. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(1):13–27.
89. Guttuso J. Discussion: the process of healing following endodontic treatment. *Trans Inter Conf Endod.* 1973; 5(0):155–157.
90. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985; 64(Spec Iss):541–548.
91. Obersztyn A, Jedrzejczyk J, Smiechowska W. Direct capping of infected rat incisor pulp with lyophilized dentin chips, prednisolone and neomycin. *Czas Stomatol.* 1969; 22(2):115–122.
92. Obersztyn A. A new method for testing drugs used in direct pulp capping on a rat incisor as an experimental model. *Czas Stomatol.* 1965; 18(5):213–220.
93. Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang KH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP. Sheathlin: cloning, cDNA/ polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res.* 1997; 76(2): 648–657.
94. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growthfactor-beta isoforms 1–3 in vitro. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(1):149– 156.
95. Murray PE, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. *Arch Oral Biol* 2002; 47(7):709–715.
96. Orhan EO Maden M, Sengüven B. Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 317-325.
97. Decup S, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. Bone sialoprotein induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 2000; 4(1): 110–119.
98. Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schäfer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod* 2010; 36(5): 814–819.
99. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010; 44(1):1–6.