

TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 'İN PULPA TEDAVİLERİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

THE HISTOPATHOLOGICAL RESEARCH OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 FOR PULPAL THERAPIES

SİBEL YILDIRIM †, ALEV ALAÇAM §, ZÜLFİKAR KADİR SARITAŞ ††, TÜLİN OYGÜR ††

ÖZET

Çürük ya da diğer etkenlerle kaybedilen dentin ve pulpa dokularının terapötik olarak rejenerasyonun sağlanması dişhekimliğinde yeni bir alandır. Bugün, tıbbın her alanında uygun mikro çevre koşullarının sağlanması ve büyüme faktörlerinin kullanımıyla gerçekleştirilen indüksiyon sayesinde hasarlı dokuların kendini yenilemesi mümkün hale gelmiştir. Bu çalışmada, odontogenezis ve primer dentinogeneziste birincil roller üstlendiği kanıtlanmış olan büyüme faktörlerinden "Transforming Growth Factor- β_1 " (TGF- β_1) reparatif dentinogenezis üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Doza bağımlı etkiler sergilediği bilinen TGF- β_1 'in, köpek dişlerinde oluşturulan 2x2x1 mm'lik pulpa perforasyonlarının iyileşmesi üzerinde olan etkileri 10, 100 ve 1000 ng dozlarda ve hidroksiapatit taşıyıcı ile birlikte test edilmiştir. İki farklı köpeğin toplam 20 dişinin kullanıldığı araştırmanın 30 günlük takip süresi sonunda yapılan histopatolojik tetkikler sonucunda TGF- β_1 'in pulpa iyileşmesini teşvik edici etkileri gözlenmiştir. Özellikle taşıyıcının tek başına kullanıldığı kontrol grubunda gözlenen yoğun inflammatuar cevabın, TGF- β_1 /taşıyıcı kombinasyonunun kullanıldığı grupta ortadan kalktığı ve iyileşmenin devam ettiğinin gözlenmesi bu savı kuvvetlendirmiştir.

Anahtar kelimeler : Reparatif dentin, Transforming Growth Factor- β_1 , odontoblast diferansiyasyonu

SUMMARY

Therapeutic regeneration of dentinal and pulpal tissues which were lost due to caries or other factors will be a promising field in dentistry. Today, in all medical areas, induction of injured tissue regeneration has become possible with the help of growth factors and appropriate micro environmental conditions. In this study, it is planned to search the effects of Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1), which has primary influence on odontogenesis and primary dentinogenesis, on reparative dentinogenesis. The effects of TGF- β_1 , which is known to have dose-dependent effects, on healing of 2x2x1 mm pulpal perforations, which were created on beagle dogs' teeth, were tested at the dosages of 10, 100, and 1000 ng and with hydroxyapatite carrier. After 30 days, two beagle dogs' 16 teeth were examined by using routine histopathological techniques and it was observed that TGF- β_1 promoted the healing of pulpal tissue. While hydroxyapatite carrier caused severe inflammatory responses alone, the combination of hydroxyapatite/ TGF- β_1 prevented this inflammation. This finding strengthened the fact that TGF- β_1 promoted healing.

Key words : Reparative dentin, Transforming Growth Factor- β_1 , differentiation of odontoblasts

* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

† Bu çalışma Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi 2. Uluslararası Bilimsel Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

‡ Dr.Dt.Serbest Dişhekimisi

§ Prof. Dr. GÜ Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı

|| Uzm. Vet. Hk. Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı

¶ Prof.Dr. GÜ Dişhekimliği Fakültesi Patoloji Bilim Dalı

GİRİŞ

Dentin ve pulpa tedavilerinde, dişin normal fizyolojik durumunun korunabileceği bir tedavi şeklinin uygulanması, teşhis rahatlığını getirmesi yanında, tedavi sonuçlarının önceden tahmin edilebileceği akılcı prensiplere sahip yeni materyal ve metotların gelişmesini sağlayabilir. Dentin ve pulpa dokularında böyle bir tedavi şeklinin uygulanabilmesi ancak, dişin birçok fonksiyonunu yerine getiren dentin-pulpa kompleksinde fizyolojik olayların devam etmesinin sağlanmasıyla mümkündür. Bu durum ise dişin gelişim süreçlerinde gözlenen primer dentinogenezis ve dişin olgun dönemlerinde devam eden sekonder dentinogenezis arasında kurulacak bağıntılarla gerçekleştirilebilir.

Primer odontoblastların harabiyetinden sonra pulpada gelişen tamir işlemleri Baume² tarafından ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Klinikte gerçekleştirilen operatif işlemleri takiben dentinde oluşan hasar sebebiyle odontoblastlarda harabiyet gözlenebilmekte ve bu da pulpada tamire yönelik cevapların açığa çıkmasına yol açmaktadır. Harabiyete uğrayan odontoblastlar, pulpa hücrelerinden odontoblastlara diferansiye olan hücrelerle veya diğer bazı yollarla odontoblastlara diferansiye olan odontoblast-benzeri hücrelerle yer değiştirmekte ve bu yeni hücreler tarafından tamir dentini depolanmaya başlamaktadır¹⁰.

Dentinogenezis, pulpa parankiminin undiferansiye veya dediferansiye hücreleri tarafından sekonder olarak başlatılabilmektedir. Pulpanın spesifik dentinogenik yeteneğinin, iyi bir kan ve oksijen desteği ile, muhtemelen büyüme faktörlerini de içeren uygun bir çevrede ortaya çıkan normal bir doku fonksiyonu olduğu ve morfolojik olarak pre-dentin benzeri bir yapının salgılanmasıyla ortaya çıkan bir tübüler matrisin varlığıyla karakterize edildiği bildirilmiştir. Bu matris tipik bir odontoblastik sıralanım gösteren ve uzunlaşmış, polarize hücreler tarafından sentezlenmektedir²⁸.

Öte yandan Baume², mekanik travmadan kaynaklanan bir doku nekrozunun ve/veya polarize olmayan hücreler tarafından sentezlenen bir atübüler matris tabakasının yani fibrodentinin bu odontoblast-

benzeri hücrelere öncülük ettiğini bildirmektedir. Ruch ve arkadaşları¹⁷ da bu fibrodentin tabakasının primer dentinogenezis sırasında preodontoblastlar üzerine etkili olan bazal membranın bir analogu gibi davranarak, pulpa hücreleri üzerinde dinamik bir etkiye yol açan bir role sahip olabileceğini öne sürmektedirler.

Bununla beraber Ten Cate²⁵, olgun bir dişte pulpa hücrelerinin odontoblast-benzeri hücrelere diferansiyasyonunu sağlayan mekanizmada, primer odontoblast diferansiyasyonunda söz konusu olan epiteliyo-mezenşimal etkileşimlerden kaynaklanan indüktif sinyallerin olmadığını belirtmektedir. Bu görüşe yine Ruch ve arkadaşları¹⁷ bu sinyallerin ekstrasellüler matris moleküllerinden (fibronektin ve TGF- β gibi) kaynaklanabileceğini ileri sürerek yanıt vermektedirler. Araştırmacılar matris moleküllerinden oluşan fonksiyonel bir ağın ve büyüme faktörlerinden kaynaklanan epigenetik sinyallerin odontoblast benzeri hücre diferansiyasyonunu tetikleyip kontrol edebileceğini ileri sürmektedirler¹⁷.

Tüm bu görüşleri bünyesinde toplayan bir hipotez olarak Rutherford¹⁸ pulpanın belirli reseptör bağlantılarına sahip olan uygun hücrelerinde oluşan sinyallerin, reparatif ve reaksiyoner dentin formasyonu ile sonuçlanan bir seri moleküler ve hücresele olayları tetiklediğini öne sürmektedir. Günümüzde araştırmacılar tarafından kabul edilen görüş ise bu sinyallerin büyüme faktörleri gibi moleküllerden kaynaklanabileceği yönündedir¹¹.

Bu hipotezler çatısı altında özetlenen ve primer odontoblast diferansiyasyonu ile başlayıp pre-dentin, ardından da dentin sekresyonu ile devam eden primer dentinogenezisin, bazal membranın ekstrasellüler matrisi tarafından ayarlanan epiteliyo-mezenşimal etkileşimlerle tetiklendiği ve bu sürecin olgun dişte ise, büyüme faktörleri gibi bazal membranı taklit eden substratlarla başlatılabileceği gösterilmiştir¹¹.

Spesifik olarak dental dokularda bu büyüme faktörleri, sitokinler ve mitojenler arasında transforme edici büyüme faktörleri tip β (Transforming Growth Factor- β , 'TGF- β ') ailesi üyelerinin dişin gelişim dönemlerinde diferansiyasyon ve doku morfogenezin-

den, dişin olgunluk dönemlerinde rejenerasyon ve tamir olaylarına kadar çok geniş bir olaylar zincirinde önemli roller oynadıkları gösterilmiştir. Primer, sekonder ve tersiyer dentin matrislerinde TGF- β ailesine ait üyelerin reseptör ve proteinleri tespit edilmiştir^{4,5,7}.

Pulpa ekspozundan sonra ortamda bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin, vücudun diğer dokularında oluşan yaralanmalarda olduğu gibi, kaybedilen hücrelerin yenilenmesi için hücre bölünmesini indüleyeceği ve dentin ekstrasellüler matrisinde bulunan hücrelerden büyüme faktörlerinin ve iyileşmede rol oynayan diğer proteinlerin salgılanmasına yoi açacağı bildirilmektedir⁶. Hasar görmüş pulpa dokusu üzerine eksojen olarak büyüme faktörlerinin uygulanmasıyla inflamatuvar cevabın sınırlanması, doku rejenerasyonunun hızlandırılması ve fizyolojik kalitede bir reparatif dentin depolanması hedeflenmektedir. Bunun yanı sıra büyüme faktörleri, kalsiyum hidroksitin dokuda oluşturduğu irritasyona ikincil olarak oluşan artmış nekroz riskini veya aşırı kalsifikasyonu da engelleyebilecektir. Ayrıca büyüme faktörlerinin pulpa yarası üzerine uygulanmasıyla ortaya çıkacak doku tipi ve miktarının önceden tahmin edilebileceği ve böylece tedavinin yönlendirilebileceği de ileri sürülmektedir^{6,19}.

Dentin matrislerinde tespit edilen TGF- β ailesi proteinlerinin diş gelişiminde yer aldıkları ve bazı üyelerin de dentinogeneziste rol oynadığı hipotezinden yola çıkılarak bu araştırma kapsamında ön görülen şartlar doğrultusunda tersiyer dentinogenezis modeli kullanılarak, köpek dişlerinde pulpa perforasyonları üzerine hidroksiapatit taşıyıcıyla ve 3 farklı dozda uygulanan TGF- β_1 'e karşı oluşan doku cevaplarının histopatolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

TGF- β_1 'in pulpa tedavilerinde kullanılabilirliği: 10, 100 ve 1000 ng dozlarla 3 ayrı dozda, kalsiyum hidroksiapatit taşıyıcıyla birlikte, 2x2x1 mm boyutlarındaki pulpa yarasında ve 30 günlük iyileşme süreci sonunda test edildi.

Araştırmanın deneyleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesinin 13. Maddesinde belirtilen hususlar dikkate alınarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulunun onayıyla gerçekleştirildi. Araştırmada 2-3 yaş arasında, 18±5 kilo canlı ağırlığındaki 2 adet sahipsiz sokak köpeği kullanıldı. Çalışma ve gözlem periyodu süresince köpekler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında barındırıldı ve bakımları sağlandı. Köpeklere günde iki kez, toplam 1800 kalori besin değerinde besin verildi. Deneyden önce köpeklerin fizik ve klinik muayeneleri yapıldı ve köpekler 15 gün karantina altında tutulup, iç ve dış parazitlere karşı antiparaziter ilaç uygulandı. Bunun yanı sıra tüm köpeklere kuduz aşısı yapıldı.

Araştırmada rekombinan insan TGF- β_1 taşıyıcısı olarak, ODTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında Dr. Taş ve ekibi²⁴ tarafından üretilen saf hidroksiapatit (HA) kullanıldı.

Test grubunda 10, 100 ve 1000 ng olmak üzere 3 ayrı dozda TGF- β_1 her bir doz için 4 dişte; negatif kontrol grubunda taşıyıcının (hidroksiapatit) tek başına kullanılmasıyla 4 dişte ve pozitif kontrol grubunda hızlı sertleşen kalsiyum hidroksit 4 dişte olmak üzere toplam 20 diş kullanıldı. Deneklerin cerrahi anestezisi sağlandıktan sonra operasyon alanı izole edildi. Alt çenede 2., 3., 4. premolarlar ile 1. ve 2. molarlar, üst çenede ise 2. ve 3. premolarlar ile 1., 2. ve 3. molarlar kullanıldı. Deneyde kullanılan dişler tamamıyla sağlıklıydı. Dişler temizlendi ve iodin solüsyonuyla dezenfekte edilip, serum fizyolojikle yıkayıp kurulandı. Köpek dişlerinin konik şekilleri, undercut alanına sahip olmamaları ve interproksimal kontakta yoksun oluşları rubber dam kullanımını engelledi. Bununla birlikte genel ve lokal anestezisi sebebiyle deneğin tükürük akışının neredeyse durduğu gözlemden tükürük kontrolüne gereksinim duyulmadı. Deneğin ağız boşluğu steril spançlarla zaman zaman nemlendirildi.

Keskin, yeni ve steril bir frezle, frez ve diş temasını hedefleyen su soğutma altında Black V kavite-ler açıldı. Kavite dişin gingival alanında konumlandırıldı. Pulpalar su soğutma altında, yüksek devirli el

aleti ile, 2 mm çapında steril rond frezle perfor edildi. Frezin pulpa odası içine, yaklaşık olarak 1 mm sokulmasıyla perforasyonlar genişletildi. Böylece 2x2x1 mm boyutlarında pulpa perforasyonları gerçekleştirildi.

Kanama kontrolü serum fizyolojik ile nemlendirilmiş pamuk peletlerle sağlandı. Hazırlanan taşıyıcı ve ilgili dozları içeren vial veya mikro cam tüp içeriklerinin karıştırılmasıyla TGF- β_1 /taşıyıcı kompleksleri elde edildi. Elde edilen karışımlar, çapı 2 mm olan bir amalgam tabancasının hazne derinliğinin 1 mm olacak şekilde modifiye edilmesiyle pulpa perforasyonları üzerine yerleştirildi. Böylece standart olarak hazırlanmış kavitelere, standart miktar ve hacimde TGF- β_1 /taşıyıcı yerleştirilmiş oldu.

Hangi kavitelere, test edilecek deney materyali ya da kontrol materyali uygulanacağı kavite preperasyonundan önce rasgele seçimle kararlaştırıldı. Kontrol ve deney grubu dişleri anatomik olarak çiftleştirildi, rasgele seçimle bir diş test örneği olurken kontralateral ve karşısındaki diş kontrol örneği oldu. Pulpar güçlendirilmiş çinko oksit öjenol siman[#] ile restore edildi.

Köpekler genel anestezi altına alındıktan sonra Lysthenon ampullerin intrakardiyak uygulanması ile ötenazi gerçekleştirildi. Ardından ilgili alveol segmentlerini içeren kısımda gingiva, mukogingival sul-

kusa kadar, periost elevatörü ile kaldırıldı. Dişlerin apikal 1/3'ünü dışarıda bırakacak şekilde bu alveol segmentleri, bol miktarda su soğutma altında, düşük devirde el aleti ve karbon separe ile çeneden ayrıldı ve rutin histopatolojik inceleme hazırlık işlemlerine tabi tutuldu. Parafine gömülen dişlerden mikrotomla^{††} 4 μ kalınlığında labio-lingual doğrultuda seri kesitler alındı. Kesitler hematoksil-eozinle boyandı. Değerlendirmeler ışık mikroskopunda^{††} 40, 100, 200 ve 400 büyütmede tek tek değerlendirildi. Fotomikrograflar^{††} çekildi.

Histolojik değerlendirmeler Browne ve arkadaşları³ tarafından tanımlanan kriterlere "mikroorganizma varlığı" parametresi yok (-) / var (+) şeklinde eklenerek yapıldı (Tablo I).

BULGULAR

Histopatolojik değerlendirme sonuçları Tablo II'de yer almaktadır.

10 ng TGF- β_1 /Hidroksiapatit grubu: Vital pulpa örneklerinde, perforasyon alanının devamlılığındaki kavite tabanı altında, odontoblastik tabakanın, genellikle eozinofilik, granüler sitoplazmalı kübik hücrelerden oluştuğu izlenmektedir. Bu örneklerden birinde kavite tabanı altında reparatif dentin varlığı yer almaktadır. Reparatif dentin irregüler tübüller içermektedir ve kısmen kalsifiye yapıdadır. Reparatif dentini sınırlayan hücreler çok sıralı dizilimde olup, eozinofi-

Tablo I. Browne ve arkadaşlarının⁸ histolojik değerlendirmesindeki kriterler

Skorlar	Kriterler				
	0	1	2	3	4
Odontoblast sayısında azalma	Azalma yok	Hafif düzeyde	Orta düzeyde	Tümüyle kayıp	—
Dentin tübüllerinde nukleus varlığı	YOK	Tübüllerin yaklaşık %10'u dolu (<%10)	Tübüllerin %10-50'si dolu	Tübüllerin %50'sinden fazlası dolu (<%50)	—
Odontoblastik tabakada iltihabi hücre infiltrasyonu	0-4 hücre	5-25 hücre	26-100 hücre	>100 hücre	Apse
Pulpa genelinde iltihabi hücre infiltrasyonu	0-4 hücre	5-25 hücre	26-100 hücre	>100 hücre	Apse
Reparatif dentin oluşumu	YOK	Kavitenin her iki tarafında predentin kalınlığına eşit ya da daha az	Kavitenin her iki tarafında predentin kalınlığından biraz fazla ve iki katından fazla (>1 ve <x2)	Kavitenin her iki tarafında predentin kalınlığının iki katı veya daha fazla (>x2)	—
Mikroorganizma varlığı	+ VAR	- YOK			

IRM, Dentsply

** Reichert-Jung, Germany

†† Olympus BH 5, Japan

‡ Olympus C-35 AD, Japan

Tablo II. 30 gün sonunda tüm gruplardan elde edilen histopatolojik bulgular

	10 ng n=4				100 ng n=4				1000 ng n=4				HA taşıyıcı n=4				Ca(OH) ₂ n=4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Odontoblast sayısında azalma	0	0	1	-	3	2	0	-	2	1	1	-	3	3	3	-	1	0	0	2
Dentin tübüllerinde nukleus varlığı	0	0	0	-	2	0	0	-	0	1	1	-	3	3	3	-	1	1	0	3
Odontoblastik tabakada iltihabi hücre infiltrasyonu	0	0	1	-	1	2	0	-	0	1	1	-	2	1	1	-	0	1	0	2
Pulpa genelinde iltihabi hücre infiltrasyonu	0	1	4	-	4	2	0	-	0	2	2	-	3	1	1	-	1	1	1	3
Reparatif dentin oluşumu	0	3	0	-	0	0	3	-	0	3	3	-	0	0	0	-	0	0	3	0
Mikroorganizma varlığı	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

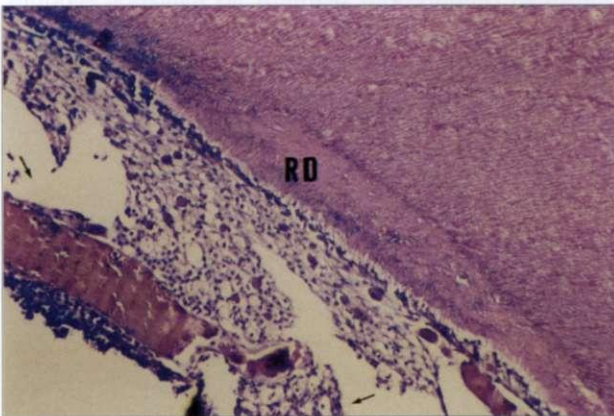
lik granüler sitoplazmalı ve kübik yapıda hücrelerdir. Fotomikrografta, oklar arasında nötrofilik infiltrasyon ve kapiller proliferasyonla karakterize "demarkasyon dokusu", komşuluğunda, kavite tabanında irregüler, seyrek tübül yapısı ile reparatif dentin görülmektedir (Şekil 1).

100 ng TGF- β_1 /Hidroksiapatit grubu: Pulpa genelinde ılımlı inflamasyon (skor 2) yer almakta, perforasyon alanında ise nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ve kapiller damardan zengin "demarkasyon dokusu" izlenmektedir. Kavite tabanı altındaki odontoblastik tabaka yer yer hücresel kayıp ve nötrofilik infiltrasyon göstermekle birlikte genelde basıklaşmış birkaç sıralı hücreden oluşmaktadır (Şekil 2). Örneklerden birinde gözlenen reparatif dentin irregüler tübüller içermesinin yanı sıra, hücre inklüzyonları göster-

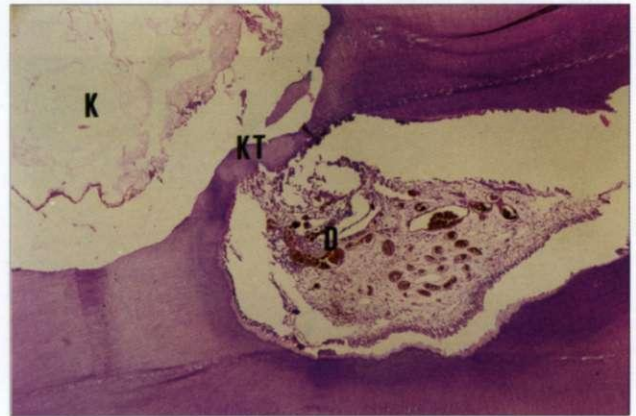
mesi nedeniyle "osteodentin" görünümündedir.

1000 ng TGF- β_1 /Hidroksiapatit grubu: Örneklerden iki tanesinde pulpada normale yakın görünüm izlenmektedir. Demarkasyon dokusu dışında pulpa genelinde inflamasyon gözlenmemektedir (skor 0). Kavite tabanı altında ise seyrek tübül yapıda reparatif dentin yer almaktadır. Diğer örnekte pulpa genelinde skor 2 düzeyinde inflamasyon yer almaktadır. Perforasyon alanını çevreleyen kavite tabanında oldukça sık tübüller içeren reparatif dentin izlenmektedir. Seri kesitlerde reparatif dentinin düzensiz trabeküllerle pulpa içine uzandığı görülmektedir (Şekil 3).

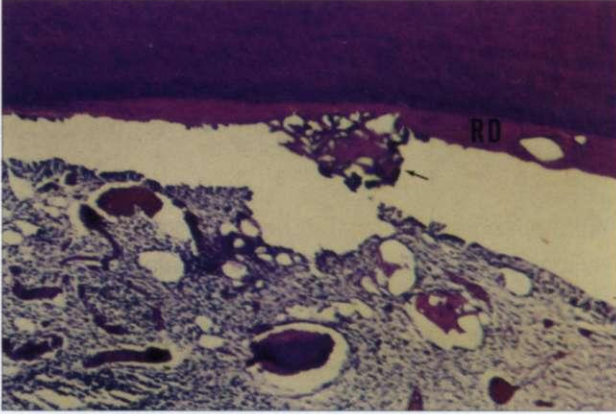
Tübül içermeyen bu matris, kısmen ve/veya zayıf kalsifiye yapıdadır. Önündeki döşeyici hücreler eozinofilik, kompakt sitoplazmalı, kübik hücrelerdir. Su-



Şekil 1. Nötrofilik infiltrasyon ve kapiller proliferasyonla karakterize "demarkasyon dokusu" (oklar arasında) komşuluğunda, kavite tabanında, irregüler, seyrek tübül yapısı ile reparatif dentin (RD). (X200, h.e.)



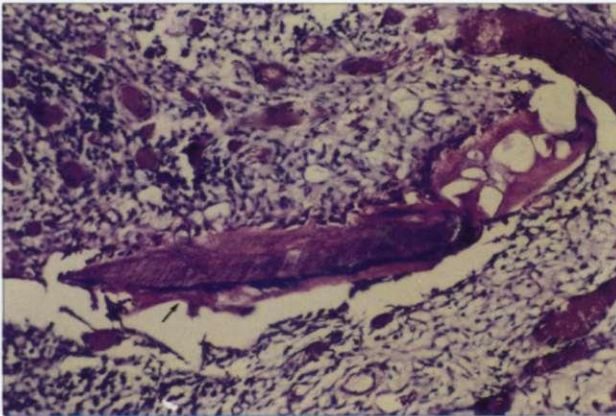
Şekil 2. Perforasyon alanına hemen komşu kavite tabanından geçen kesitte kavite (K), kavite tabanı (KT), demarkasyon dokusu (D) ve ödemli ve hiperemik pulpa (X40, h.e.)



Şekil 3: Kavite tabanında tübüllerden nispeten zengin reparatif dentin (RD) ve pulpa doğru düzensiz, ince trabeküllerle uzanan matris yapısı (ok). (A:Artifisyonel ayrışma) (X100, H.E.)

odontoblastik alanda da pulpa ile itilmiş dentin parçacıklarını çevreleyen ve tübül içermeyen kalsifiye birkaç düzensiz yapının yer aldığı dikkati çekmektedir. Bu yapıları basıklaşmış fibroblast-benzeri hücreler çevrelemektedir. Kavite tabanı altındaki bu alanlarda mezensimal hücre yoğunluğu dikkati çekmektedir (Şekil 4).

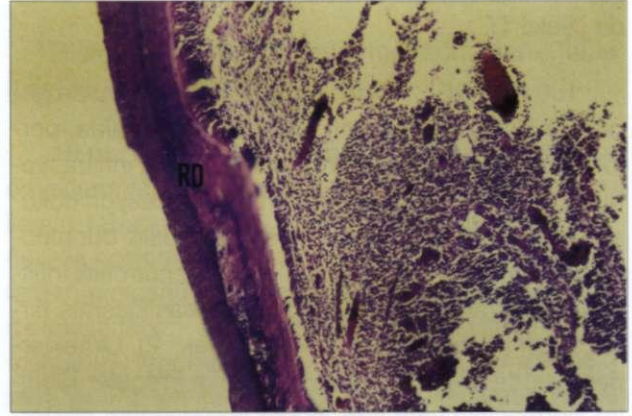
Kalsiyum hidroksit grubu: 4 örnekte bu grupta tüm örneklerde kalsiyum hidroksiti sınırlayan nötrofil ve makrofaj tabakası ve hemen altında bu hücrelere ek olarak bol kapiller damarların yer aldığı demarkasyon dokusu ve pulpa genelinde ödem gözlenmektedir. Pulpa içine düşmüş birkaç dentin parçacı-



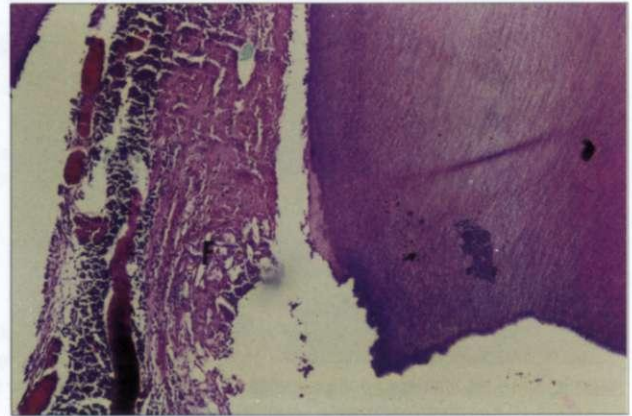
Şekil 4. Pulpa ile itilmiş dentin parçacığını çevreleyen irregüler matris yapıları (ok). (X200, H.E.)

ğı etrafında çok çekirdekli dev hücrelerin varlığı gözlenmektedir. Bu örnekte kavite tabanı altında tersiyer dentin yapımı yer almaktadır. Bu yapı oldukça sık tübüller içermekte ve kısmen kalsifiye görünümündedir. Hemen önünde hücreler küçük, kompakt, koyu eozinofilik sitoplazmalı ve birkaç sıralıdır (Şekil 5).

Saf hidroksiapatit grubu: Perforasyon alanı ve kavite altından başlayarak pulpa genelinde fibrin eksüda ve ileri ödem izlenmektedir. Skor 3 inflamasyon gösteren bu örnekte kavite tabanı altındaki odontoblastik tabaka ve preentinin ortadan kalktığı, daha periferdeki odontoblastların ise kısmen harap olduğu ve tübül içinde nükleus varlığı dikkati çekmektedir (Şekil 6).



Şekil 5. Kavite tabanında kısmen kalsifiye reparatif dentin (RD) ve önünde birkaç sıralı küçük odontoblastlar (X100, H.E.)



Şekil 6. Fibrin eksüda (F), yoğun eozinofilik infiltrasyon ve odontoblastik tabakada harabiyet (X100, H.E.)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Büyüme faktörleri arasında reparatif dentinogenezis indüksiyonunda üzerine en fazla rol atfedilen üye olan TGF- β_1 'in in vivo şartlarda etkisini araştıran çok az sayıda araştırma bulunmaktadır^{6,15,29}. TGF- β_1 'in pulpa tedavilerinde rejeneratif bir ajan olarak etkinliğinin test edilmesinin amaçlandığı bu çalışmada TGF- β_1 'in in vivo şartlarda reparatif dentinogenezis üzerinde doza bağımlı stimülatör bir etki gösterdiği saptanmıştır.

Araştırmamızın sonucunda tüm örneklerde odontoblastik tabakada ve pulpada iyileşmenin devam ettiği; perforasyon alanını tamamen kapatır nitelikte olmamakla birlikte, perforasyon alanını çevreleyen ve kavite tabanını temsil eden alanlarda reparatif dentin varlığı gözlenmiştir. Gruplara göre reparatif dentinin izlenme sıklığı; 10 ng grubunda 1/3, 100 ng grubunda 1/3, 1000 ng grubunda 1/2 ve kalsiyum hidroksit kontrol grubunda 1/4 olarak saptanmıştır. Her 3 dozaj uygulamasında da pulpaya etkileri iyi bilinen kalsiyum hidroksite göre iyileşmenin gecikmediği gözlenmiştir.

TGF- β_1 'in uygulandığı gruplar ile kalsiyum hidroksitin uygulandığı gruplarda gözlenen reparatif dentinde bazı morfolojik farklılıklar saptanmıştır. Perforasyon alanına yakın bağ dokusu içine düşmüş dentin parçacıklarının kalsiyum hidroksit uygulanmış dişlerde hala rezorbe olması; TGF- β_1 grubunda ise atübüler kalsifiye bir matrisle (fibrodentin) çevrelenmesi ilginçtir. Bu durumun eksojen olarak uygulanan TGF- β_1 'in pulpada sergilediği etkilerle, dentin kırıntısı gibi kalsifiye bir odak çevresinde kümelenmiş olan reparatif hücrelerin aktivitesine olanak sağlayan uygun bir mikroçevre yaratılmasıyla oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan taşıyıcının tek başına kullanıldığı grupta gözlenen yoğun inflamasyon, taşıyıcı TGF- β_1 ile kombine edildiğinde ortadan kalkmış ve pulpa mezenşim hücrelerinde proliferasyon ve infiltrasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte bu yoğun inflamasyonun aslında TGF- β_1 ile elde edilebilecek sonuçları gölgeleme olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Bunun aksine bu bulgu TGF- β_1 'in inflamasyonu önleme ya

da sınırlama kapasitesine sahip olduğunu da gösterebilir. Taşıyıcının tek başına kullanıldığında elde edilen yoğun inflamasyonun ise kullanılan hidroksiapatitin sahip olduğu çok küçük partikül formu sebebiyle oluşabildiği düşünülmektedir.

TGF- β_1 ile kemik iyileşmesi üzerinde yapılan araştırmalarda, uygulanan dozun oluşacak doku tipini (kıkırdak dokusundan kemik dokusuna) ve dokunun oluşma tarzını (kondrogenesis-osteogenesis) belirlediği bildirilmiştir^{9,12,16}. Benzer şekilde deneysel olarak reparatif dentinogenezisin indüklendiği araştırmalarda da kullanılan ajanın doğasına bağlı olarak farklı tipte dentin dokularının oluştuğu gözlenmiştir.

Araştırmamızda 10 ng dozda TGF- β_1 ile irregüler tübüler tipte bir dentin, 100 ng dozda irregüler tübüler fakat hücre inklüzyonları içeren bir dentin, 1000 ng dozda ise tübül içermeyen kısmen kalsifiye bir yapıyla (fibrodentin) devam eden sık tübüllü reparatif dentin gözlenmiştir^{13,14,18,-20,27,28}.

Deneysel olarak reparatif dentinogenezisin indüklendiği araştırmalarda da farklı tipte reparatif dentin dokusunun oluştuğunun gözlemlendiği bildirilmiştir^{13,14,18,-20,27,28}. Reparatif dentinogenezis sonucunda oluşan atübüler ve tübüler dentinlerden hangisinin klinik olarak daha elverişli olduğu konusu açıklığa kavuşturulmamıştır. Rutherford ve Fitzgerald²⁰ oluşan bu farklı tiplerdeki reparatif dentinlerin klinik yararlarını tartışmışlardır. Araştırmacılar atübüler dentinin çürüğe daha dirençli olabileceğini, post-operatif duyarlılığı azaltabileceğini ve dentin bondingler için elverişli bir yüzey sağlayabileceğini bildirmektedirler. Bununla birlikte optimal reparatif dentin daha derin bir tübüler-benzeri dentin tabakasıyla, yüzeyel bir atübüler dentin tabakasından oluşabileceği iddia edilmektedir. Diğer taraftan, odontoblastların diferansiyasyonunun kontrol edilmesinin, terapötik olarak şekillenecek reparatif dentinin tipini (irregüler veya tübüler dentin) belirleme olasılığına yol açacağı da bildirilmektedir. Bu durumda, odontoblast diferansiyasyonunun anlaşılmasının, spesifik olarak dentin formasyonunun genel olarak da doku rejenerasyonu ve iyileşmenin anlaşılmasını sağlayacağı ifade edilmektedir¹⁹.

Araştırmamızda da gözleendiği üzere farklı dozlarda farklı tipte dokuların oluşmasına yol açan TGF- β_1 ile odontoblast diferansiyasyonunun kontrol edilmesi, terapötik olarak şekillenecek reparatif dentin tipini (irregüler veya tübüler dentin) belirleme olasılığını taşımaktadır.

Bu yaklaşımlar çerçevesinde reparatif dentinogenezis indüksiyonunun hedeflendiği rejeneratif pulpa tedavisi yaklaşımlarında biyolojik olarak aktif olan moleküllerle indüklenen yeni sert doku kütesine rehberlik edecek bir şablon gibi davranan inorganik moleküllerin kombinasyonu, bu alanda yeni yaklaşımların doğmasına yol açabilecektir^{21,26}.

Araştırmamızda biyolojik olarak aktif olan moleküllerle indüklenen yeni sert doku kütesine rehberlik edecek bir şablon gibi davranan bir inorganik molekül olarak kullanılan mikron altı partikül boyutunda ve geniş toz yüzey alanına sahip bir kalsiyum fosfat biyomateryal kullanılmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen TGF- β_1 /Kalsiyum hidroksiapatit kombinasyonu; aktif protein kısmının kemotaktik ve mitojenik aktivitesiyle pulpa mezenşimal hücrelerinin infiltrasyonu ve proliferasyonu, hidroksiapatit kısmıyla bu mezenşimal hücrelerin fiksasyonuna uygun bir çatı sağlanması amaçlanmıştır.

Köpek dişlerinde pulpa tamirinin insanlardan daha hızlı olduğu ve küçük perforasyonların kendiliğinden iyileşmeye meyilli olduğu bildirildiğinden², 2x2x1 mm'lik pulpa perforasyonu, hem kendiliğinden iyileşmeyecek hem de elde edilen cevabın tamamıyla terapötik ajana atfedilebileceği bir pulpa yarasının oluşturulması planlanmıştır. Böylece elde edilen cevabın pulpanın intrensek tamir yeteneğine değil, kullanılan amputasyon ajanına (TGF- β_1) atfedilebileceği öngörülmüştür. Stanley ve Pameijer'in²³ lezyonun iyileşmesi için gerekli olan damarlanmanın, oluşturulan defektin büyüklüğü ile doğru orantılı olarak artacağını ve bunun da iyileşmeyi sağlayacağını bildirmelerini de bu planlamada etkili olmuştur.

Pulpa perforasyonunun ve bu perforasyon alanına yerleştirilecek madde miktarının standardize edilmesi girişimimiz de Rutherford ve arkadaşlarının^{18,19}, reparatif dentin oluşumunu stimüle ettiğini gösterdik-

leri OP-1 ile yaptıkları çalışmalardan köken almaktadır. Bu araştırmaların sonunda, yaratılan pulpa perforasyonu alanlarına yerleştirilen OP-1/kollajen matris miktarı ile eşit oranda reparatif dentin kütesinin indüklendiği gösterilmiştir. Ayrıca oluşan reparatif dentinin, pulpa dokusunun perforasyon sırasında ya da pulpa odasının derinliklerine doğru ampute edilmesiyle kaldırılan miktarıyla olan bağıntısının, pulpa dokusunda yaratılan defektin lokalizasyonu ve boyutlarıyla da özdeş olduğu gösterilmiştir.

Literatürde reparatif dentinogenezis mekanizmalarına yönelik olarak gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda iyileşme periyodunun genel olarak 2. haftada başlayıp, net bir reparatif dentinin en geç 30 gün sonunda oluştuğu görülmektedir^{6,8,13,19,22,28,29}. Bu nedenle araştırmamızda son yıllarda yayınlanan araştırmalar da esas alınarak, her bir grupta örnek sayısı 4 ve gözlem periyodu sadece 30 gün olarak alınmıştır. Test edilmesi planlanan kavram dentinojenik etki olduğundan ve Baume² köpek dişlerinde insana göre daha hızlı bir iyileşme süreci olduğunu bildirdiğinden bu tek gözlem periyodu seçilmiştir. Hu ve arkadaşları⁶ ise rat dişlerinde ideal reparatif dentin köprüsünün en geç 3 haftada oluştuğunu bildirmişlerdir. Nitekim araştırmamız sonucunda da reparatif dentin var ya da yok şeklinde veya inflamatuvar cevabın niteliği ve şiddetine ilişkin yeterli veri toplanabilmiştir. Diğer taraftan mevcut koşullarda sonuçların ultrastrüktürel seviyede tetkike tabi tutulabileceği bir *in vivo* araştırmanın gerçekleştirilmesinin mümkün olmaması ışık mikroskobu seviyesinde yapılan çalışmalarda mekanizmalardan çok meydana gelen olayın türü ve niteliği hakkında yorumlar yapılabilmesi sonucunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak; rekombinan insan TGF- β_1 'in 2x2x1 mm'lik pulpa defekti üzerinde 10, 100 ve 1000 ng dozlarda ve hidroksiapatit taşıyıcıyla birlikte kullanıldığı deneyin 30 günlük iyileşme dönemi sonucunda elde edilen bulgularına göre TGF- β_1 'in doza bağımlı bir dentinojenik etki sergilediği görülmüştür. Ayrıca doz artışına paralel olarak reparatif dentin yapımı üzerine olan etkinin arttığı gözlenmiştir. Hidroksiapatit taşıyıcının tek başına pulpa dokusu iyileşmesinde inhibitör etkiler sergilediği saptanmıştır. Tek başına kullanıldığında pulpa dokusu iyileşmesini inhibe

eden hidroksiapatit taşıyıcının TGF- β_1 ile birlikte kullanıldığında, TGF- β_1 'in her 3 doz grubunda da pulpa dokusu iyileşmesinin sürdüğü gözlenmiştir. Kontrol ve test gruplarında, hiçbir örnekte yara yüzeyini tamamıyla kapatan reparatif dentin yapımı gözlenmiştir. 30 günlük iyileşme süresinde, pulpa kaplama materyali olarak kullanılan TGF- β_1 'e karşı verilen doku cevabı olumlu bir gelişme göstermiştir. Ancak uzun takip süresine sahip çalışmalara ve prognozun değerlendirilmesine yönelik araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Alaçam A, Yıldırım S. Transforming Growth Factor- β_1 'in pulpa tedavilerinde kullanılabilirliğinin araştırılması. TÜBİTAK projesi, Proje No: SBAG-1522 1997.
2. Baume LJ. The biology of pulp and dentine: a historic, terminologic, taxonomic, histological-biochemical, embryonic survey. in: The Biology of Pulp and Dentine, ed. Meyers HM, Basel, Karger 159-182, 1980.
3. Browne RM, Tobias RS, Crombie I.K, Plant CG. Bacterial microleakage and pulpal inflammation in experimental cavities. Int Endodont J 16:147-155, 1983.
4. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF,IGF-II, and TGF-B in human dentin. J Bone Miner Res 5:717-723, 1990.
5. Hauscha PV, Mavrokos AE, Iafrazi MD, Doleman SM, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. J Biol Chem 261:12665-12674, 1986.
6. Hu CC, Zhang C, Q,na Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. J Endod 24:744-75, 1998.
7. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. J Dent Res 65:12-22, 1986.
8. Jepsen S, Albers H, Fleiner B. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. J Endod 23:378-382, 1997.
9. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor- β_1 and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. J Cell Biol 110:2195-2207, 1990.
10. Lesot H, Begue-Kirn C, Kubler MD. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative process. Cells and Materials 3:201-217, 1993.
11. Lesot H, Smith AJ, Tziafas D. Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. Cells and materials 4:199-218, 1994.
12. Mackie EJ, Trecshel U. Stimulation of bone formation in vivo by transforming growth factor- β_1 , remodelling of woven bone and lack of inhibition by indomethacin. Bone 11:295-300, 1990.
13. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. Endod Dent Traumatol 5:279-289, 1989.
14. Nakasima M. Induction of dentin in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -4 with collagen matrix. Archs Oral Biol 39:1085-1089, 1994.
15. Nakashima M. The induction of reparative dentin in the amputated pulp of the dog by bone morphogenetic protein. Archs Oral Biol 35:493-497, 1990.
16. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- β_1 . Endocrinol 124:2991-2994, 1989.
17. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol 39:51-68, 1995.
18. Rutherford BR, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charatte M. Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Archs Oral Biol 38:571-576, 1993.
19. Rutherford RB, Spangberg L, Tucker M, Rueger D, Charatte M. Time course of the induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. Archs Oral Biol 39:833-838, 1994.
20. Rutherford RB, Fitzgerald M. A new biological approach to vital pulp therapy. Crit Rev Oral Biol Med 6:218-229, 1995.
21. Sasano Y, Mizoguchi I, Takahashi I. BMPs induce intramembranous and/or endochondral ossification in ectopic sites depending on the physicochemical property of the carrier. Conn Tissue Res 35:292 Abst. No: 346, 1996.
22. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. Preliminary studies on the in vivo morphogenetic properties of dentine matrix proteins. Biomat 11:22-24, 1990.
23. Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. Op Dent 22:1-3, 1997.
24. Taş AC. Synthesis and crystallographic analysis of submicron, spherical particles of HA and TCP bioceramics. The American Ceramic Society, 97th Annual Meeting and Exposition April 30-May 3 Cincinnati OH USA, 1995.
25. Ten Cate AR. Reaction paper: odontoblasts. J Dent Res 64:549-551, 1985.

26. Tian WD, Dazhang W, Ishikawa T. Experimental study on bovine bone morphogenetic protein/hydroxyapatite composite as a bone substitute Oral Surg Oral Med Oral Pathol 53:112-116, 1997.
27. Tziafas D, Kolokuris A, Alvanou A, Kaidoglou K. Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine Archs Oral Biol 37:119-128, 1992.

Yazışma adresi

Dr. Dt. Sibel Yıldırım
Nene Hatun Cad.
No : 21/11 06700
Küçükesat - Ankara

28. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis J Dent Res 69:75-81, 1990.
29. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF β in induction of reparative dentinogenesis in vivo Eur J Oral Sci 106 (Suppl 1):192-196, 1998.