

REJENERATİF PULPA TEDAVİ YÖNTEMLERİ REGENERATIVE PULPA TREATMENT METHODS

Şeyhmus BAKIR¹, Elif Pınar BAKIR¹

¹Dr. Öğr. Üyesi Dicle Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

Özet

Kök gelişimi tamamlanmamış daimi dişlerin pulpa nekrozunda kök gelişimi durmakta ve kökler kırılmağa başlamaktadır. Böyle durumlarda, dişe yeniden vitalite kazandırmak ve kök gelişimini devam ettirmek amacıyla, rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarına başvurulmaktadır. Kullanılan teknikleri; revaskülarizasyon, kök hücre tedavisi, pulpa implantı, doku iskeleleri, enjekte edilebilir scaffold uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralamak mümkündür. Kan pıhtısının; hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Rejenerasyon sağlamanın en kolay yolu, kök kanallarına erişkin kök hücrelerin enjekte edilmesidir. Pulpa implantasyonu, hücre tabakalarının büyütülmesinin kolay olması avantajına sahiptir. Doku iskeleleri; hücre canlılığının devamını sağlayacak besinleri ve büyüme faktörlerini içerir. Kök kanallarına enjekte edilen doku iskeleleri, pulpa rejenerasyonuna yardımcı olmaktadır. Üç boyutlu hücre yazılımında, doğal pulpa dokusu taklit edilebilmektedir. Mineralizasyonu artıracak genlerin pulpaya aktarılması konusu yeterli ilgi görmemiştir. Bağışıklık sistemi zayıf, önemli sistemik veya genetik hastalığa sahip kişilerde rejeneratif endodontik tedavilerin başarılı olamayacağı iddia edilmektedir. Kullanılacak tüm tekniklerin, uzun vadeli sonuçlarının araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Rejeneratif endodonti, pulpa tedavisi, revaskülarizasyon, kök hücre

Abstract

In pulp necrosis of permanent teeth with incomplete root development, root development stops and the roots become brittle. In such cases, regenerative endodontic treatment is applied to restore vitality to the tooth and to maintain root development. Techniques used; revascularization, stem cell therapy, pulp implant, tissue scaffolds, injectable scaffold applications, three-dimensional cell software and gene therapy. It has been reported that the blood clot plays a role in the differentiation and maturation of cells. The easiest way to achieve regeneration is to inject adult stem cells into the root canals. Pulp implantation has the advantage that cell sheets are easy to grow. tissue scaffolds; It contains nutrients and growth factors that will ensure the continuation of cell viability. Tissue scaffolds injected into root canals help pulp regeneration. In three-dimensional cell software, natural pulp tissue can be imitated. The transfer of genes that will increase mineralization to the pulp has not received sufficient attention. It is claimed that regenerative endodontic treatments will not be successful in people with weakened immune systems and significant systemic or genetic diseases. There is a need to investigate the long-term results of all techniques to be used.

Keywords: Regenerative endodontics, pulp therapy, revascularization, stem cell

Giriş

Doku rejenerasyonu; birtakım nedenlerle fonksiyonunu yitirmiş olan hastalıklı dokuların, benzer orjinli canlı hücreler kullanılmak suretiyle yenilenmesidir. Rejenerasyon prosedürü; zarar görmüş yapıların fizyolojik fonksiyonlarının iade edildiği, biyolojik tedavi stratejilerini içerir. Bu prosedürlerin pratiğe aktarılmasında, kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliğindeki gelişmeler

Biyoloji ve mühendislik ilkelerini birleştiren doku mühendisliği uygulamaları; insanlarda hastalık veya benzer nedenlerle hasar görenek yapısı bozulan hücre, doku ve organları normal fizyolojilerine ve fonksiyonlarına kavuşturmaya yönelik multidisipliner çalışmalardır. Bu çalışmaların temelinde; kök hücre, doku iskelesi ve indükleyici morfojenler ve büyüme faktörleriyle ilgili uygulamalar yer alır. Morfogenezisi düzenleyen morfojenler, ekstrasellüler olarak sentezlenirler. Morfojenetik sinyal ağı, bazı proteinleri ve büyüme faktörlerini ihtiva eder. Büyüme faktörleri; hücre büyümesi ve farklılaşması amacıyla sinyaller oluşturan protein yapılarıdır (1- 8).

İletişim Adresi

Dr. Şeyhmus BAKIR
Dicle Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı,
21280 DİYARBAKIR.
E-mail: seyhmusbakir@gmail.com

önemli yer tutmaktadır.

Dişhekimliğinde Uygulamalar

Dişhekimliği alanındaki rejeneratif uygulamalar, kalsiyum hidroksitin vital amputasyon tedavisinde kullanımıyla başlamış ve pulpa nekrozlu daimi dişlerde kök kanalı içerisinde pulpa benzeri bir doku oluşturmaya yönelik klinik deneylerle devam etmiştir. Diş pulpası, zararlı etkenlere karşı immun cevap oluşturabilen hücrelere ve özelleşmiş odontoblast hücrelerine sahiptir. Yapılan çalışmalarda; henüz kök ucu kapanmamış daimi bir diş canlılığını yitirmesi durumunda, pulpa odasında yeni doku oluşma ihtimali üzerinde durulmuştur. Dentin, sement, pulpa ve periodontal dokularda meydana gelen hasarlar karşısında söz konusu dokuların yenisiyle yer değiştirmesini sağlamak asıl hedef olmuştur (4, 9, 10).

Kök gelişimi tamamlanmamış daimi dişlerin travmaya maruz kalması halinde, pulpa nekrozunun yanı sıra, kök gelişimi durmakta, dentin duvarları ince kalmakta ve kökler kırılmağa başlamaktadır. Bu tür dişlerin geleneksel apeksifikasyon tedavisinde kullanılan kalsiyum hidroksit, apekte sert doku oluşumunu uyarmasına rağmen, çok sayıda seansa gereksinim göstermektedir. Ca(OH)₂'nin uzun süreli kullanımının dentini zayıflattığı ve kırılma riskini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, yüksek pH'sı nedeniyle pulpa dokusunun rejenerasyonunu önlediği vurgulanmıştır (9, 11-17).

Apeksifikasyon tedavisinde biyouyumluluğa ve etkili tıkama kabiliyetine sahip MTA (mineral trioxide aggregate) kullanılmış, ancak materyalin sertleşme zamanının uzun olması, yüksek maliyeti ve dentin kalınlaşmasını yeterince sağlayamaması nedeniyle alternatif yaklaşımlar araştırılmaya başlanmıştır (9, 16, 18).

Bu yöntemler arasında, pulpanın yeniden canlandırılması ve kök gelişiminin devamının sağlanmasına yönelik en ideal tedavi rejeneratif endodontik uygulamalardır. Kök gelişimi tamamlanmamış daimi dişlerde, apikalde patoloji ve radyolüsensite var olduğunda bile, kök kanallarında canlı pulpa hücreleri kalabilmektedir. Pulpa kök hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin dentin-pulpa kompleksine benzer bir yapı meydana getirebildikleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, enfeksiyonun uzaması bu

hücrelerin hayatta kalma ihtimalini azaltmaktadır (19-21).

Rejeneratif Endodontik Tedavinin Avantajları

Dişe yeniden vitalite kazandıran, dentin kalınlığını ve dişin sağlamlığını arttıran ve kök gelişiminin devamını sağlayan rejeneratif endodontik tedaviler; enfeksiyonun rahatça kontrol altına alınabildiği, uygulanması basit, pahalı olmayan, ulaşılması kolay el aletleri ve ilaçların kullanıldığı biyoteknolojik yöntemlerdir. Hastanın kendine ait doku ve kan hücrelerinin kullanılmış olması, potansiyel immün yanıtları ve çapraz enfeksiyon ihtimalini önlemeye yardımcıdır. Geleneksel apeksifikasyondaki tekrar seanslarına ihtiyaç duyulmaz. Bununla birlikte, 3 ay süresince kök gelişimi gözlenmeyen vakalarda geleneksel apeksifikasyon tedavisine geçilmesi gerekir (6, 22).

Rejeneratif Endodontik Tedavinin Dezavantajları

Oluşan rejenerasyon dokusunun kaynağının henüz tanımlanamamış olması, pıhtı formasyonundaki hücrelerin konsantrasyon ve kompozisyonunun tam olarak bilinmemesi, hücre ve dokuların enfekte olma ihtimali gelmesi bu yöntemde duyulan güveni sarsmaktadır. Bununla birlikte, pulpanın tamamıyla nekroz olması durumunda, revaskülarizasyon gerçekleşmeyebilir. Ayrıca diş kronunda renklenme, alerjik reaksiyonlar ve bakteriyel direnç gelişimi gibi komplikasyonlar görülebilmekte, sistemik ve immünolojik rahatsızlıkların mevcudiyetinde yöntemin başarı şansı azalmaktadır. Uzun vadede kök kanallarının tıkanması veya apikal periodontitis gelişmesi riski de söz konusudur (6, 21, 23).

REJENERATİF PULPA TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Rejeneratif endodontide kullanılan teknikleri; kök kanalının yeniden damarlanması (revaskülarizasyon), erişkin kök hücre tedavisi, pulpa implantı, scaffold (iskele, çatı) implantı, enjekte edilebilir scaffold uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralamak mümkündür (6).

1. Revaskülarizasyonunun Pıhtılaşmayla Sağlanması

Rejeneratif endodontik prosedürlerin temelinde; pulpa vitalitesinin yeniden sağlanmasına ve kök gelişiminin sürdürülmesine yönelik revaskülarizasyon işlemleri yer alır. Pulpa dokusunun rejenerasyonuna yönelik klinik araştırmalarda, kan pıhtısının yara iyileşmesindeki etkisi göz önünde tutulmuştur. Büyüme faktörleri bakımından zengin içeriğe sahip olan kan pıhtısının; fibroblast, odontoblast ve sementoblastların farklılaşması, olgunlaşması ve rejenerasyonunda rol oynadığı ve yeni gelişecek doku için matriks (protein iskelesi) vazifesi gördüğü bildirilmiştir (6, 21, 24-26).

Revaskülarizasyon uygulamalarında dikkat edilmesi gereken önemli faktörlerden ilki vaka seçimi olup; kök gelişimini tamamlamamış, apeksi açık, vitaliteye negatif yanıt veren daimi dişler tercih edilmelidir. Bununla birlikte, revaskülarizasyonun başarısı için, apikaldeki vital dokular zarar görmemiş olmalıdır. Hastaların onayına sunulacak aydınlatılmış onam formları, tedavinin seans sayısını, olası yan etkileri (diş renklemesi vb.), tedaviye yanıt alınamaması ve tedavi sonrası gelişebilecek semptomları kapsamalıdır. Tedaviye başlanmadan önce, dikkatli bir anamnez alınarak, alerjik reaksiyon potansiyeli bakımından iyi bir değerlendirme yapılmalıdır. Dişe anestezi yapılması ve izolasyon işlemlerini takiben, giriş kavitesi açılarak minimal bir enstrümantasyon gerçekleştirilir. Tedavi esnasında, dentin tübüllerini tıkayacak bir smear tabakası oluşumunu engellemek ve fraktür ihtimalini ortadan kaldırmak için, gereksiz enstrümantasyondan kaçınmak gerekir (21, 27-31).

Pulpa dokusunun rejenerasyonu için, ortamın bakterilerden izole edilmesi gerekir. Bununla birlikte, apeksi kapanmamış dişlerin kanal duvarları mekanik olarak yeterince temizlenemediğinden, enfekte kanalların çeşitli irrigasyon solüsyonları ve antibiyotik patlarla dezenfekte edilmesi önem kazanmaktadır. Revaskülarizasyonda kullanılan irrigasyon ajanları; güçlü antibakteriyel etkinin yanı sıra kök hücre ve fibroblastların canlılığı ve proliferasyonuna imkan sağlamalıdır. Kök kanallarının dezenfeksiyonu amacıyla, %5.25'lik sodyum hipoklorit ve %0.12-2'lik klorheksidin irrigasyon solüsyonları kullanılmaktadır.

İrrigasyon işleminin ucu kapalı, yanlardan açık iğnelerle ve apikal üçlüye yerleştirilmek suretiyle yapılması önem arzeder. Kullanılan irrigasyon iğnesi kanala sıkıştırılmadan diş apeksine 1mm mesafede konumlandırılarak dikkatli bir yıkama yapılmalıdır. (21, 30-34).

Kanalların paper pointlerle kurutulmasının ardından, yine kanalın dezenfeksiyonu için belirli sürelerde antibakteriyel içerikli bir pat kullanılması önerilmektedir. Revaskülarizasyonun başarı oranını arttırmak için kanal içi ilaç olarak antibiyotiklerle kombine kalsiyum hidroksit, formokrezol veya odontojen mikroorganizmalara etkili üçlü antibiyotik patları (3Mix-MP) kullanılmaktadır. Üçlü antibiyotik patının içeriği:

Antibiyotikler (3Mix): metronidazol (500mg), siprofloksasin (200mg) ve minosiklin (100mg) kombinasyonu,

Taşıyıcı (MP): macrogol merhem, propylen glycol'den oluşur (23, 35).

Zorunlu anaeroblara karşı geniş spektrumlu bir bakterisid olan metronidazol, çürüğün derin tabakalarına kolayca penetre olabilmektedir. Bununla birlikte periradiküler enfeksiyonlarda metronidazolün, siprofloksasin ve minosiklin ile kombine edilmesi tavsiye edilmektedir. Florokinolon grubu bir antibiyotik olan siprofloksasin, bakteri DNA'larını etkilemektedir. Minosiklin ise, tetrasiklin türevi bir antibiyotik olup bakteriyostatik etkilidir. Ancak, patın içeriğindeki minosiklinin 6 hafta gibi bir sürede renklemeye sebep olabileceği ifade edilmektedir. Bu nedenle son yıllarda, daha az renklemeye neden olduğu belirlenen alternatif antibiyotiklerin (amoksisilin, cefaclor, cefroxadine, fosfomycin ve rokitamycin) kullanımını gündeme gelmiştir (21, 35-40).

Üçlü antibiyotik patının 4 hafta süreyle kullanılmasının, kanal içi dezenfeksiyon sağlayarak, yeni vital doku oluşumuna rehberlik ettiği belirlenmiştir. Kanal içerisine yerleştirilen antibiyotik karışımları sayesinde kök kanalında pıhtı (fibrin matriks) oluşturularak revaskülarizasyon ve tamir dokusu oluşumu uyarılabilmektedir. Pat uygulanmasının ardından 2-4 hafta sonraki randevuya kadar, giriş kavitesi cam iyonomer simanla geçici olarak kapatılır. Koronal sızıntı ve kullanılan kanal içi ilaçların etkinliğinin zayıf olması, rejeneratif pulpa tedavilerinde başarısızlık nedeni olarak kabul edilmektedir (19-21, 41-44).

İkinci seansta yapılan kontrolde, diş mevcut semptomlar bakımından değerlendirilir. Herhangi bir patolojik bulgu ve semptom yok ise, geçici dolgu çıkarılır. Pıhtı oluşturulması bu seansta gerçekleştirileceği için, vazokonstriktör içeren lokal anestezipler kullanılmaz, %3'lük mepivacaine tercih edilebilir. Vazokonstriktörsüz anestezi tercih edilmesinin nedeni, bölgedeki kan damarlarının daralmasını önlemektir. İzolasyon işlemlerinin ardından kanal içindeki patlar NaOCl irrigasyonu ile çıkarılır ve kurutulur. Doku iskelesi görevi yapması için kan pıhtısı oluşturmak amacıyla, apikal foramenin birkaç milimetre aşağısına itilen kanal eğeleri sayesinde periapikal dokularda kanama ve buna bağlı geçici bir inflamasyon sağlanır. Oluşan kan pıhtısının enfekte olmasını önlemek amacıyla, pulpa odası sızdırmaz özellikteki MTA ile, koronal kavite CİS veya rezinle modifiye CİS ile kapatılır. Kök gelişiminin periyodik takibinde; ağrı, şişlik veya abse varlığı söz konusu olursa alternatif bir tedavi yöntemine geçilmelidir (13, 19, 21, 30, 45, 46).

Oluşan pıhtının yerini başlangıçta granülasyon dokusunun ve ardından fibröz dokunun aldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, dentinde rezorpsiyon olduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, pulpaya tam olarak benzemeyen tamir dokusunun vitalite testlerine zamanla olumlu yanıt verdiği ve kök formasyonunun devam ettiği belirlenmiştir. Revaskülarizasyon tedavisinden sonra oluşan tamir dokusunun kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte, oluşan sert dokunun; dentin, sement, kemik veya osteodentin yapısında olduğu bildirilmiştir (47, 48).

Revaskülarizasyon uygulamasının başarısına; kök boyu ve kök kalınlığındaki artışla birlikte kök gelişiminin devam ettiğinin radyografik tespitiyle karar verilir. Tedavinin başarısı, dişin asemptomatik olması ve diğer bazı testlere (laser doppler flowmetri, sıcak, soğuk ve elektrikli vitalite testleri vb) pozitif yanıt alınmasıyla desteklenir (49).

Revaskülarizasyon tedavisinden yaklaşık 3.5 hafta sonra, fraktür sebebiyle çekilen üst santral diş üzerinde yapılan histolojik incelemede, kanalın yarısından fazlasında gevşek bağ doku ve predentin boyunca odontoblast benzeri hücre tabakası izlenmiş, ancak sert doku varlığı belirlenmemiştir (50).

Diğer bir çalışmada, revaskülarizasyon uygulanmış alt birinci molar dişin 2 yıl sonra kron kök fraktürü nedeniyle çekilmesinin ardından yapılan histolojik incelemesinde; inflamasyonun geçtiği, kanal içerisinde mineralize ve fibröz bağ doku mevcudiyeti tespit gösterilmiştir (51).

Benzer çalışmalarda, vital dişlerde fibröz doku oluşma oranının devital dişlere kıyasla çok daha yüksek olduğu, dentin duvarlarında sement benzeri mineralize doku olduğu rapor edilmiştir (52).

Kök gelişimini tamamlamamış nekrotik pulpalı dişlerin revaskülarizasyon tekniği ile tedavisinin diğer yöntemlere (geleneksel apeksifikasyona) üstünlüğü, kök duvarlarının kalınlığında ve boyunda artış sağlanabilmesidir. Yapılan araştırmalar; travma sonucu kök gelişimini tamamlayamamış ve periapikal apse, periradiküler lezyon veya kemik rezorpsiyonu ihtiva eden daimi dişlerde, apikal foramenin 1.1mm'den geniş olması durumunda revaskülarizasyon prosedürlerinin daha başarılı olduğunu göstermiştir (9, 28, 48, 53).

2. Erişkin (Postnatal) Kök Hücre Enjeksiyon Yöntemi

Belirlenmiş bir görevi olmayan kök hücrelerin; sınırsız bölünebilme, kendini yenileyebilme ve aldıkları sinyale göre özelleşmiş doku hücrelerine farklılaşabilme (plastisite) kabiliyetleri mevcuttur. Zarara uğramış bir dokunun fonksiyonlarını düzeltmenin en iyi yolu, yerine yenisini koymaktır. Farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilen kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre; embriyonal (fetal), erişkin (postnatal) ve fetus kök hücresi olarak sınıflandırılırlar. Doku rejenerasyonuna elverişli olan embriyonik kök hücrelerin, bağışıklığa bağlı nedenler ve etik ilkelere dolayı kullanımı sınırlandırılmış, yapılan çalışmalar postnatal kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır. Kök hücre tedavilerinin temeli; hastalanan veya fonksiyonunu yitiren dokulardaki hücrelerin, sağlıklı ve düzgün çalışan hücrelerle değiştirilmesi prensibine dayanır (4, 6, 54-56).

Dişin gelişiminde rol oynayan kök hücreler;

1. Dental epitelyal kök hücreler,
2. Dental pulpa kök hücreleri (DPSCS),
3. Süt dişi pulpası kök hücreleri (SHEDS),

4. Apikal papilladan kaynaklı kök hücreler (SCAPS),
5. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCS) ve
6. Dental folikül progenitör hücreleridir (57).

Pulpal rejenerasyon sağlamanın en kolay yolu, kök kanallarının dezenfeksiyonunun ardından kanal içerisine erişkin kök hücrelerinin enjekte edilmesidir. Yapılan çalışmalar, kök hücrelerin rejenerasyon ve iyileşme kapasitesinin genç hastalarda daha yüksek olduğunu göstermiştir. Pulpadaki fibroblast ve odontoblast hücrelerine dönüşebilecek yeterliliğe sahip erişkin kök hücrelerin temininde bazı zorluklar yaşanmakla birlikte, enjeksiyon yönteminde hücre kaynağı olarak; hastanın derisi, yanak mukozası, kemik ve yağ dokusu, dondurularak saklanmış göbek kordonu kanı, allojenik saflaştırılmış pulpa hücrelerinden veya laboratuvarında geliştirilmiş xenojenik (hayvan kaynaklı) pulpa kök hücrelerinden faydalanılmaktadır. Son yıllarda yapılan kök hücre araştırmalarında en çok kullanılan kök hücre kaynağı, diş pulpası olmuştur (6, 53, 58).

Yapılan araştırmalar dental pulpa kök hücrelerinin; yüksek proliferasyon, kendini yenileme, odontoblastlara farklılaşabilme ve tübüler dentin sentezleyebilme potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir. Dental pulpa kök hücreleri; dentin ve periodontal dokuların onarımında, bağışıklık sistemi, kas hastalıkları ve bağ dokusu hasarlarının tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (55, 56).

Apikal papil, periodontal ligament ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, pulpa rejenerasyonunda ve kök gelişiminde önemli rol oynadıkları belirtilmiştir. Olgunlaşmamış daimi dişlerden izole edilebilen ve odontoblast benzeri hücrelere dönüşebilen apikal papilla kök hücrelerinin, dental pulpa kök hücrelerine kıyasla proliferasyon oranları ve hücre migrasyon aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur (20, 25, 59).

Kök kanalında yeni doku oluşumu ve kök gelişiminin devamıyla ilgili farklı görüşler ileri sürülmüştür. Bunların ilki, apikal papilla kök hücreleri veya kemik iliğiyle alakalıdır. Apikal papilla kaynaklı kök hücrelerinin, rejeneratif endodontik tedavide kullanılabilir bir depo olduğu ve apikal bölgenin stimülasyonu ile elde edilen kanama neticesinde kemikte bulunan proliferasyon kapasitesi yüksek mezenkimal

kök hücrelerinin kanal boşluğuna doğru ilerlediği ileri sürülmüştür (60).

Diğer bir görüş, kök gelişimini tamamlamamış daimi dişlerde kök kanalının apikalinde vitalitesini koruyabilmiş pulpa hücrelerinin odontoblastlara farklılaşarak yeni matriks oluşumunu uyardığı, atübüler dentin birikimiyle de kök gelişiminin devamlılığının sağlandığı yönündedir (56).

Üçüncü görüş; apikale ve kanal içerisine proliferere olabilen periodontal ligament kök hücrelerinin her iki alanda sert doku birikimini uyardığı şeklindedir (61).

Başka bir teori ise; kök kanalında oluşturulan pıhtının büyüme faktörleri içerdiği ve bunların da farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerinin fibroblast, odontoblast ve sementoblastlara dönüşümünü sağlayarak rejenerasyonda önemli rol oynadığı düşüncesine dayanır (62).

Uygulaması kolay olan bu yöntemin en önemli dezavantajları, pulpadan elde edilen hücre popülasyonları arasında farklılaşmadan sorumlu erişkin kök hücrelerin belirlenmesi, hücrelerin sağ kalma oranının düşük olması ve vücudun farklı bölgelerine ulaşarak anormal mineralizasyonlara neden olabilmesidir. Bu nedenle kök hücrelerin bir scaffold (doku iskeslesi) veya fibrin pıhtıyla beraber uygulanma görüşü ağırlık kazanmıştır. Scaffoldlar ve büyüme faktörleri, kök hücrelerin dental hücrelere dönüşümünü uyarmada etkilidir. İskele ve biyoaktif sinyal molekülleri olmadan, sadece kök hücrelerin kanal içerisine enjeksiyonuyla yeni ve fonksiyonel bir pulpa dokusu oluşma olasılığı zayıftır (1, 6, 53, 58).

3. Pulpa İmplantasyonu Yöntemi

Bu yöntem; hastalıklı ve patojen olmayan arıtılmış pulpa kök hücre dizisinin veya biyopsi ile alınan ve laboratuvar ortamında membran filtreleri (biyoçözünür polimer nanofiber tabaka, kollajen-1 veya fibronektin gibi ekstrasellüler matriks protein tabakası) üzerinde geliştirilerek çoğaltılan pulpa hücrelerinin, dezenfekte edilmiş kök kanallarına transplante edilmesi esasına dayanır üzerinde yetiştirilirler. Ancak yapılan çalışmalarda, kollajen-1 ve kollajen-3 üzerinde yetiştirilmiş pulpa hücreleriyle yeterli başarı sağlanamadığı bildirilmiştir (6, 63-65).

Pulpa implantasyonu, hücre tabakalarının büyütülmesinin kolay olması

avantajına sahiptir. Enjeksiyon işlemi esnasında, bir araya toplanmış hücre tabakalarının birbirinden ayrılmış hücrelere kıyasla daha fazla stabilite sergilediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre tabakalarının kök kanal duvarına bağlandığından her zaman emin olunamamaktadır. Filtrelerin çok ince olması sebebiyle, kültür ortamında yetiştirilen yaprak şeklindeki hücre tabakalarının kanal içerisine kırılmadan yerleştirilmesi ve uyumlandırılması oldukça zordur. (6, 54).

Hücrelerin tabakalar halinde bulunması yeterli kanlanmaya engel olur, sadece apikal bölgede kanlanma oluşabilir. Kapiller kan desteğinden yoksun hücrelerin (200µm'den daha uzakta bulunan), oksijen yetersizliğine bağlı nekroz olma ihtimali düşünüldüğünde, kronal bölgede de hücre büyümesini teşvik etmek üzere doku iskelelerinin desteğine ihtiyaç görülmüştür (6).

4. İskele İmplantasyonu Tekniği

Pulpa odasının boş olması, pulpa kök hücrelerinin organizasyonu ve vaskülarizasyonuna engel teşkil etmektedir. Rejenere edilecek dokuların formunu belirleyecek üç boyutlu bir yapıya ihtiyaç vardır. Bu amaçla, pulpa kök hücrelerinin gömülebileceği poröz polimer yapıda biyolojik doku iskeleleri (döküm veya enjekte edilebilir scaffold) kullanılır. Scaffold, hücreleri içinde bulunduran basit bir çerçeve (kafes) gibi düşünülebilir. Kullanılacak iskele materyali; biyouyumlu olmalı, hücrelere seçici bağlanabilmeli, hücre beslenmesi ve diffüzyona müsaade edecek gözenek genişliğine sahip olmalı, yapısal bütünlüğü sağladıktan sonra yerini yeni kurulan dokuya bırakmalı ve yeni bir cerrahi müdahaleye gerek kalmadan çevre dokularca rezorbe edilebilmelidir (3, 6, 53).

Ekstrasellüler matriksi taklit eden doku iskeleleri; hücrelerin canlılığının devamı ve büyümesini sağlayacak besinleri, hücrelerin çoğalıp farklılaşmasını sağlayacak büyüme faktörlerini ve enfeksiyon gelişimini önleyecek antibiyotik karışımları ihtiva eder (6, 66).

Polimer iskeleler, üretildikleri materyale göre doğal veya yapay olabilmektedirler. Doğal polimerlerin (kollajen, fibronektin, kitosan, glikozaminoglikan ve kemik siyaloproteinleri) hücre uyumluluğu ve biyoaktiviteleri yüksektir. Yapay (sentetik) polimerlerde (aljinat hidrojel, MTA, alendronat sodyum); mekanik özellikler,

porözite ve biyolojik bozulma gibi faktörlerin kontrol edilebilmesi mümkündür (67, 68).

İskelelerin yapılarına ilave edilen morfogenetik proteinler sayesinde fonksiyon görebilmektedir. Bu proteinler, erişkin bireylerde dental pulpa kök hücrelerinin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasını uyararak doku rejenerasyonuna katkı sağlar. Bununla birlikte, yarılanma ömrü oldukça kısa olan bu proteinlerin yıkımını yavaşlatmak oldukça zordur. Günümüzde, rejeneratif endodontide doku iskelesi olarak genellikle, PRP (trombositten zengin plazma) ve PRF (trombositten zengin fibrin) gibi otojen materyaller kullanılmaktadır (69).

5. Enjekte Edilebilir Scaffold Uygulamaları

Kemik ve benzeri fiziksel destek isteyen dokular için rijid karakterli doku iskeleleri daha uygun iken, kök kanallarına yapısal bir desteği söz konusu olmayan yeni oluşturulmuş pulpa dokusunun polimer hidrojel gibi üç boyutlu yumuşak bir scaffold matriksinin içine yerleştirilmesi düşünülmüştür (70).

Kök kanallarına şırınga yardımıyla kolaylıkla uygulanabilen non-invaziv hidrojel doku iskelelerinin, hücre büyümesi ve farklılaşmasında substrat vazifesi gördüğü, pulpa rejenerasyonuna ve organizasyonuna yardımcı olduğu iddia edilmiştir (71, 72).

6. Üç Boyutlu Hücre Yazılımı

Doğal pulpa dokusunun taklidinin oluşturulabildiği üç boyutlu hücre baskı yöntemi; bazı özel cihazlar yardımıyla hücre tabakalarının hidrojel içine dağıtılması, her bir hasta ve her bir diş için farklı bir üç boyutlu model oluşturulması ve cerrahi implantasyonu aşamalarını içerir. Tekniğin en büyük avantajı, doku mühendisliği araştırmalarında da arzu edildiği gibi, farklı hücrelerin ideal yerlerine konumlandırılmasıdır (6, 58).

Üretilen dokuların dar kök kanallarına yerleştirilmesinde yaşanan güçlükler ve yerleştirilen pulpa dokusunun apikali ile koronali arasında meydana gelen asimetrikler, tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir (58).

7. Gen Terapisi

Gen tedavisi; vücudun ihtiyaç duyduğu maddeleri (morfojenler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve ekstrasellüler matriks molekülleri) vücut dışından vermek yerine, sağlıklı bir şekilde kendisinin üretmesini sağlamak üzere somatik hücrelere gen nakledilmesi yöntemidir. Gen tedavileri; genlerin hedef dokuya veya sistemik kan dolaşımına enjeksiyon ya da solunumla nakledilmesinin yanı sıra, in-vitro ortamda manipülasyonla modifiye edilmiş hücrelerin rejenerasyon bölgesine yerleştirilmesi şeklinde de uygulanabilmektedir (58).

Dokunun rejenerasyonu için gerekli biyolojik olayları uyarmak ve kalsifiye doku oluşturmak amacıyla pulpa dokusuna genlerin nakledilmesi işlemi, özellikle büyüme faktörü üretimi için yararlıdır. Gen terapisinde dokulara büyüme faktörü değil, bu faktörleri kodlayan gen gerekli zamanda ve yeterli miktarda verilmektedir. Böylece arzu edilmeyen toksik neticelerin önüne geçilmektedir (3).

Tablo 1. Rejeneratif tekniklerin avantaj ve dezavantajları

Son yıllarda, rejeneratif endodontik tedavide pulpanın mineralizasyonunu artırıcı genlerin pulpa dokusuna aktarılması konusu gündeme gelmiş, ancak yeterli destek bulamamıştır. Yapılan araştırmalar, gen tedavisi esnasında istenmeyen sağlık problemlerinin oluşabileceğine dikkat çekmiştir. Bu yöntemin sağlık açısından potansiyel yarar ve zararlarının yeterince bilinmemesi, rejeneratif pulpa tedavilerinde kullanımının önündeki en büyük engel olmuştur (6, 54).

Diş pulpasının canlılığının korunması, şüphesiz en başarılı kanalı tedavisinden daha sağlıklı bir yaklaşımdır. Bununla birlikte, rejeneratif pulpa tedavi yöntemlerinin her birinin ayrı avantaj ve dezavantajları mevcut olup, bazı tekniklerin kullanımı etik açıdan sorgulanabileceği unutulmamalıdır (Tablo 1).

REJENERATİF PULPA TEDAVİ YÖNTEMLERİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI		
TEKNİK	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
REVA SKÜLARİZASYON	* Düşük patojen geliş	* Tekrar enfekte olması halinde nekroz riski
ERİŞKİN KÖK HÜCRE ENJEKSİYONU	* Hızlı ve kolay nakil * En az ağrı * Hücreleri toplama kolaylığı	* Hücrelerin düşük yaşama şansı * Hücrelerin yeni fonksiyonel pulpa yaratamaması * Yüksek koaptasyon riski
PULPA İMPLANTASYONU YÖNTEMİ	* Hücre tabakasını yetiştirmek kolay * Çözünür hücrelerin enjeksiyonundan daha çabuk	* Tabaka damarsız olduğundan sadece küçük yapı oluşturma olasılığı * Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılması
İSKELE İMPLANTASYONU TEKNİĞİ	* Hücreleri destekleyen yapı varlığı * Bazı materyaller damarlanmayı hızlandırabilir	* İmplantasyondan sonra hücrelerin düşük yaşama şansı * Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılması
ENJEKTE EDİLEBİLİR SCAFFOLD	* Kolay nakil * Ekstrasellüler matriks yerine geçerek rejenerasyonu hızlandırabilir	* Hücrelerin düşük yaşama şansı * Başlangıç araştırmaları fonksiyonel in-vitroyu henüz desteklemiyor * Doku yapışma yüzünde sınırlı kontrol
ÜÇ BOYUTLU HÜCRE YAZILIMI	* Çok sayıda hücre tipi tam olarak yerleştirilebilir	* Başlangıç araştırmaları fonksiyonel in-vitroyu henüz desteklemiyor * Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılması
GEN TERAPİSİ	* Kök kanalının temizleme ve şekillendirilmesi yapılmaz * Kök hücre nakline gerek olmayabilir	* Nekrotik dişteki çoğu hücre zaten ölü * Kontrolü zor * Sağlığa zarar riski * FDA onaylamıyor

Sonuç

Rejeneratif pulpa tedavisi sonucunda, kök kanalının apikalinde canlı kalabilmiş birkaç pulpa hücresi yeni oluşan matriks içerisinde çoğalıp farklılaşarak odontoblastlara dönüşebilmektedir. Bu sayede yeni dentin oluşumuyla birlikte, kök uzunluğu ve dayanıklılığı artmaktadır. Bununla birlikte, SCAP (apikal papilla kökenli kök hücreleri), kemik iliğinden gelen veya periodontal ligamentte bulunan kök hücreleri ya da büyüme faktörlerinden zengin kan pıhtısının da pulpa rejenerasyonda önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (20, 56).

Avulse süt dişleri ve kök oluşumunu tamamlamış daimi dişlerde, 8 yaş altı ve 16 yaş üstü hastalarda rejeneratif pulpa tedavilerinin uygulanması tercih edilmemektedir. Bağışıklık sistemi zayıf olan, önemli sistemik veya genetik hastalığa sahip kişilerde yapılacak rejeneratif endodontik tedavilerin başarılı olamayacağı bildirilmiştir (40, 73).

Yapılan çalışmalar; kalan pulpa dokusunun dişi vitalize etme potansiyeline sahip olduğunu ve oluşan yeni dokunun pulpadan ziyade periodontal ligamente benzediğini göstermiştir. Bununla birlikte, revaskülarizasyonun çeşitli pulpa hastalıklarına yol açabilme olasılığı ve bu durumda yapılacak tedavilere nasıl cevap verebileceği merak konusudur. Rejeneratif endodontide uygulanan tekniklerin klinik pratiğine yansımaları için, kök hücrelerin dişi dokusunun gelişimindeki rolünün ve lokal faktörlerden nasıl etkilendiğinin araştırılmasına ve uzun vadeli sonuçların değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Canoğlu E, Çehreli ZC. [An update of regenerative pulp therapies]. Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2008; 32(2): 21-7.
2. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. Dent Clin North Am 2012; 56: 549-61.
3. Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. Aust Endod J 2005; 31: 111-3.
4. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. J Endod 2005; 31: 711-8.
5. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. J Endod 2011; 37: 265-8.
6. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. J Endod 2007; 33: 377-90.
7. Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. Indian J Dent Res 2011; 22(1): 122-131.
8. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. Arch Oral Biol 2012; 57: 109-21.
9. Altın KT, Ekçi ES, Gürdoğan EB, Şenöz D. [A general outlook to regenerative pulp therapy]. Cumhuriyet Dental Journal 2015; 19(3): 238-46.
10. Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. J Endod 2013; 39: 26-9.
11. Elkarim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2007; 103: 560-9.
12. Odabaş ME. Apikal Periodontitis İzlenen İmmatür Diş Pulpasının Revaskülarizasyonu: Vaka Raporu. Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg 2011; 21: 236-40.
13. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. J Endod 2008; 34: 13-7.
14. Mendoza AM, Reina ES, Garcia-Godoy F. Evolution of apical formation on immature necrotic permanent teeth. Am J Dent 2010; 23: 269-74.
15. Jadhav GR, Shah N, Logani A. Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. J Conserv Dent 2013; 16: 568-72.
16. Rafter M. Apexification: a review. Dent Traumatol 2005; 21: 1-8.
17. Rosenberg B, Murray PE, Namerow K. The effect of calcium hydroxide root filling on dentin fracture strength. Dent Traumatol 2007; 23: 26-9.
18. Parirokh M, Jalali S, Haghdoost AA, Abbott PV. Comparison of the effect of various irrigants on apically extruded debris after root canal preparation. J Endod 2012; 38: 196-9.
19. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. J Endod 2006; 32: 1205-13.
20. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. J Endod 2008; 34: 611-6.
21. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endod 2004; 30: 196-200.
22. Siu-Fai Leung S. Revascularization of immature permanent teeth with periapical lesions-report of three consecutive cases. Hong Kong Dent J 2010; 7: 31-5.
23. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. J Endod 2010; 36: 1086-91.

24. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(7): 997-1004.
25. Özcan E, Altuğ Özcan SS. Periodontal Rejenerasyonda Kök Hücrenin Yeri. *Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg* 2010; 20: 123-30.
26. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011; 37(4): 562-7.
27. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013; 39: 319-26.
28. Kumar ARP, Subbiya A. Regenerative endodontic therapy on non-vital immature maxillary incisors: Working protocol and a case report. *Journal of Interdisciplinary Dentistry* 2011; 1(1): 55-7.
29. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod* 2009;35:160-164.
30. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009, 42: 1118-26.
31. Ritter AL, Ritter AV, Murrah V, Si-gurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol* 2004; 20: 75-84.
32. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007; 29(1): 47-50.
33. Akgun OM, Altun C, Guven G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 62-5.
34. Gomes-Filho JE, Aurelio KG, Costa MM, Bernabe PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008; 16: 137-44.
35. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008; 36: 379-86.
36. Gelman R, Park H. Pulp revascularization in an immature necrotic tooth: a case report. *Pediatr Dent* 2012; 34(7): 496-9.
37. Dabbagh B, Alvaro E, Vu DD, Rizkallah J, Schwartz S. Clinical complications in the revascularization of immature necrotic permanent teeth. *Pediatr Dent* 2012; 34(5): 414-7.
38. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyath S, Kumar MR. Platelet Rich Fibrin in the revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex. *J Conserv Dent* 2012; 15(4): 395-8.
39. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* 2007; 40: 186-97.
40. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009; 42: 84-92.
41. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008; 34: 876-87.
42. Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent* 2007; 86: 33-5.
43. Thibodeau B, Teixeira F, Caplan DT, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2007; 33: 680-9.
44. Güler B, Vural S. [Revascularization of immature permanent teeth: 3 case reports]. *AÜ Diş Hek Fak Derg* 2012; 39(3): 135-41.
45. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010; 36: 536-41.
46. Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent* 2009; 31: 145-8.
47. Aydın AK, Berbercan P. Biyomühendislik esasları ile diş oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar. *SÜ Dişhek Fak Derg* 2012; 19: 99-114.
48. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. 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.
49. Strobl H, Gojer G, Norer B, Emshoff R. Assessing revascularization of avulsed permanent maxillary incisors by laser Doppler flowmetry. *J Am Dent Assoc* 2003; 134: 1597-603.
50. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization /regeneration procedure. *J Endod* 2012; 38: 1293-7.
51. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized /revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod* 2013; 39: 138-44.
52. Karabulut C, Demiryürek EÖ, Özyürek T. [Regenerative Endodontics and Revascularization]. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2013; 14(1): 27-32.
53. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008; 34: 51-6.
54. Akgün ÖZ, Polat GG, Altun CA. Rejeneratif pulpa tedavilerinde doku mühendisliği uygulamaları. *Klinik bilimler dergisi* 2008; 2(4): 238-44.
55. Yılmaz G, Nur BG, Tanrıver M, Altunsoy M, Ok E. [Revascularization and Treatment Methods]. *EÜ Dişhek Fak Derg* 2016; 37(2): 88-98.
56. Yıldırım C, Akgün ÖM, Polar GG. [Regeneration of pulp-dentin complex in immature permanent teeth with apical periodontitis: a literature review]. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2013; 23(1): 269-73.
57. Morsezeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 113-8.
58. Murray PE, Windsor U, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 33(4) :377-90.
59. Sonoyama W, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34: 166-71.
60. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod* 2011; 37(2): 133-8.
61. Akyıldız BM, Sönmez I. [Regenerative endodontics therapy: a literature review]. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Dent-Special Topics* 2016; 2(1): 1-12.
62. Dali M, Rajbanshi L. Regenerative endodontics: changes, chances, and challenges of revascularization in pediatric dentistry. *SRM Journal of Research in Dental Sciences* 2014; 5(3): 186-9.

63. Fukuda J, et al. Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* 2006; 27: 1479-86.
64. Venugopal J, Ramakrishna S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; 125: 147-58.
65. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 225-36.
66. Forghani M, Parisay I, Maghsoudlou A. Apexogenesis and revascularization treatment procedures for two traumatized immature permanent maxillary incisors: A case report. *Rest Dent Endod* 2013; 38: 178-81.
67. Guo T, et al. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials* 2006; 27: 1095-103.
68. Cengiz SB, et al. Histological comparison of alendronate, calcium hydroxide and formocresol in amputated rat molar. *Dent Traumatol* 2005; 21: 281-8.
69. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 148-59.
70. Yılmaz A. [Regenerative Endodontics]. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2012; 46(3) 91-8.
71. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vi-natier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle GF, Rochet N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*, 2005; 26: 5509-17.
72. Dhariwala B, Hunt E, Boland T. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Eng* 2004; 10: 1316-22.
73. Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol* 2012; 28: 33-41.