

**KALSİYUM SİLİKAT ESASLI MATERYALLERİN
İNSAN PULPA FİBROBLASTLARI ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ADIGÜZEL

**İnönü Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi
Endodonti Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fuat AHMETOĞLU
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayçe Ünverdi ELDENİZ**

Doktora Tezi-2015

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KALSIYUM SİLİKAT ESASLI MATERYALLERİN
İNSAN PULPA FİBROBLASTLARI ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ADIGÜZEL

**İnönü Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi
Endodonti Anabilim Dalı
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fuat AHMETOĞLU**

**Ortak Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ**

**Bu araştırma Mustafa Kemal Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
12361 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA
2015**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi ile Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Endodonti Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Mehmet ADI GÜZEL'in "Kalsiyum Silikat Esaslı Materyallerin İnsan Pulpa Fibroblastları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

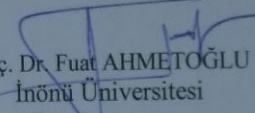
Tez Savunma Tarihi: 10/09/2015



Prof. Dr. Nevin KARTAL
Marmara Üniversitesi
Jüri Başkanı



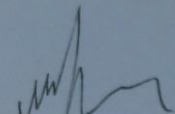
Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ
Selçuk Üniversitesi
Ortak Tez Danışmanı
Üye



Doç. Dr. Fuat AHMETOĞLU
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye



Doç. Dr. Cihan YILDIRIM
Gaziantep Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Muhammet YALÇIN
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2015 tarih ve 2015/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diş Dokuları.....	4
2.2. Pulpa Kuafaj Materyali Olarak Kullanılan Materyaller	10
2.3. Biyouyumluluk	21
2.4. Hücre Apoptozu.....	29
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. İnsan Diş Pulpa Fibroblast Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Stoklanması.....	33
3.2. Test Örneklerinin Hazırlanması.....	35
3.3. Kalsiyum Silikat Esaslı Test Örneklerinin MTT Testi ile Pulpa Fibroblastları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	38
3.4. Kalsiyum Silikat Esaslı Materyallerin Pulpa Fibroblast Hücre Kültürü Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi.....	41
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	66
EKLER.....	79
EK. 1. Etik Kurul Onayı	79
Ek.2. ÖZGEÇMİŞ.....	80

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bütün akademik faaliyetlerimde ve bu tezin her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen, akademik ve manevi olarak bana çok şeyler kazandıran danışman hocam Doç. Dr. Fuat AHMETOĞLU'na;

Kısa dönemde beni hem insani hem de bilimsel olarak geliştiren ikinci danışmanım Prof. Dr. Ayçe Ünverdi ELDENİZ' e ve Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve asistanlarına;

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim Doç. Dr. Muhammed YALÇIN'a, Doç. Dr. Ali KELEŞ'e, Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK'e, Yrd. Doç. Dr. Halenur ALTAN'a ve çalışma arkadaşlarım Dr. Dt. Mevlüt Sinan OCAK'a, Arş.Gör.Dt. Elçin Tekin BULUT'a, Arş.Gör.Dt. Hatice ALÇİN'e, Arş.Gör. Dt. Levent AKINCI' ya, Arş.Gör.Dt. Aliye KAMALAK'a ve Arş.Gör.Dt. Seren İSPİR'e;

Materyallerin hücre kültürlerine uygulanması aşamasında sabırla bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Dr. Dt. Mehmet Gökhan TEKİN'e;

Hücre kültürlerinin hazırlanması ve sonuçların değerlendirilmesinde emeğini esirgemeyen Doç. Dr. Bülent GÖĞEBAKAN'a ve Nilüfer BİLGİÇ'e;

Bugünlere gelmeme vesile olan ve hayatımın her anında hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan çok sevgili anne ve babama;

Sonsuz bir sabırla beni her zaman destekleyen sevgili eşime;

Sonsuz teşekkür ederim...

ÖZET

Kalsiyum Silikat Esaslı Materyallerin İnsan Pulpa Fibroblastları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı; insan pulpa fibroblastları üzerinde kalsiyum silikat esaslı yeni bir kuafaj materyali olan Theracal LC ile yine kalsiyum silikat esaslı olan Biodentine™, MTA Angelus, iRoot BP Plus materyallerinin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada, vital pulpa tedavilerinde kullanılan Theracal LC, Biodentine™, MTA Angelus ve iRoot BP Plus pulpa kuafaj materyallerinin MTT testi ile sitotoksik etkilerinin ve FACS yöntemiyle apoptotik etkilerinin sonuçları değerlendirildi.

Bulgular: Theracal LC, Biodentine™, MTA Angelus ve iRoot BP Plus materyallerin insan pulpa fibroblastı hücre hatlarında oluşturduğu sitotoksik etkiler arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). TheraCal LC materyalinin orijinal ekstratı 24 (%28,3), 48 (%44,9) ve 72 (%49,2) saatlik değerlendirmede hücre canlılık oranları bakımından diğer kuafaj materyallerinden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Buna karşın en az sitotoksik etki Biodentine™ grubunda (%97,1, %130,0, %103,7 sırasıyla) gözlemlenmiştir. Çalışmanın FACS sonuçlarına göre Theracal LC materyalinin diğer materyallere göre apoptoz/nekroz oranlarını arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuçlar: Elde edilen verilerle; Biodentine™ ve MTA Angelus materyalleri vital endodontik tedavilerde kullanılabilir materyaller olarak değerlendirilebilir. iRoot BP Plus ve Theracal LC materyallerinin sitotoksik etkileri yönünden dikkatli olunmalı ve ilave çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: kalsiyum silikat, pulpa kuafaj materyalleri, sitotoksosite

ABSTRACT

Investigation Of Cytotoxic Effects Of Calcium Silicate-Based Materials On

Human Pulp Fibroblasts

Aim: The aim of this study was to compare the in vitro cytotoxicity of Theracal LC, Biodentine™, iRoot BP Plus, MTA Angelus on human pulp fibroblasts.

Material and Method: In this research, the effects of pulp capping materials that are being used in vital pulp therapies such as Theracal LC, Biodentine™, MTA Angelus, iRoot BP Plus are evaluated. These materials are compared using MTT test to evaluate cytotoxic effects and the results of the effects of apoptosis were evaluated with FACS method.

Results: The difference between the effects of Theracal LC, Biodentine™, MTA Angelus and iRoot BP Plus, on human pulp fibroblast cells are found to be statistically significant ($p < 0.05$). The original extract of TheraCal LC found to be more sitotoxic considering other vital pulp capping materials after 24h (28,3%), 48h (44,9%) and 72h (49,2%) evaluation periods. On the other hand Biodentine™ showed the least sitotoxic effects (97,1%, 130,0%, 103,7% respectively). According to FACS results of the research, it is observed that Theracal LC material increases apoptosis/necrosis ratios compared to the other materials.

Conclusions: According to the data; Biodentine™ and MTA Angelus can be classified as biocompatible materials in vital endodontic treatments. iRoot BP Plus and Theracal LC materials should be used carefully due to their sitotoxic effects and further research is necessary.

Keywords: calcium silicate, cytotoxicity, pulp capping materials

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
Bis-GMA	: Bisphenol a-glicidil metakrilat
CİS	: Cam iyonomer siman
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle esansiyel vasatı
FBS	: Fetal sığır serumu
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
IL-1	: İnterlökin-1
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Birliği
KH	: Kalsiyum hidroksit
MEM	: Minimal esansiyel medium
Mm	: milimetre
MTA	: Mineral trioksit aggregate
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
PBS 1X	: Fosfatla tamponlanmış salin
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
pH	: Power of hydrogen (Hidrojenin gücü)
RMCİS	: Rezin modifiye cam iyonomer siman
rpm	: Rotations per minute
TEG-DMA	: Trietilen glikol dimetakrilat
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü
TTCP	: Tetrakalsiyum fosfat
UDMA	: Üretan dimetakrilat
ZnOE	: Çinko oksit ojenol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2. 1. Pulpa dokusunun maruz kaldığı dış etkenler	9
Şekil 2. 2. Apoptoz ve nekrozun şematik görüntüsü	30
Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan çekilmiş üçüncü büyük azı dişleri ve % 70'lik etanol solüsyonu.....	33
Şekil 3. 2. Çalışmada kullanılan dişlerin temizlendiği steril plastik petri kapları ve çıkarılan pulpa dokusunun muhafaza edildiği PBS 1X (Gibco, US) solüsyonunu bulunduran falkon.....	34
Şekil 3. 3. Çalışmada kullanılan laminar akışlı kabin	34
Şekil 3. 4. Elde edilen pulpa fibroblast hücrelerinin görüntüsü	35
Şekil 3. 5. Steril ortamda hazırlanan test örnekleri	36
Şekil 3. 6. Biodentine™ kuafaj materyali	36
Şekil 3. 7. Theracal LC kuafaj materyali.....	37
Şekil 3. 8. iRoot BP Plus kuafaj materyali	37
Şekil 3. 9. MTA Angelus kuafaj materyali.....	38
Şekil 3. 10. Örneklerin konulduğu falkon şişeler	38
Şekil 3. 11. Materyal ekstratlarının enjektör yardımıyla toplanması ve filtrelenmesi ...	39
Şekil 3. 12. Materyal ekstratlarının seyreltilmesi	39
Şekil 3. 13. Materyal ekstratlarının fibroblast hücrelerine uygulanması.....	40
Şekil 3. 14. Kullanılan spektrofotometre.....	40
Şekil 3. 15. Akım Sitometri (BD FACS Calibur).....	41
Şekil 4. 1. Seyreltilmemiş ekstratlara maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri (n:16) ..	44
Şekil 4. 2. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	46
Şekil 4. 3. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	47
Şekil 4. 4. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri....	47
Şekil 4. 5. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	48

Şekil 4. 6. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	48
Şekil 4. 7. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	49
Şekil 4. 8. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	49
Şekil 4. 9. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	50
Şekil 4. 10. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	50
Şekil 4. 11. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	51
Şekil 4. 12. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	51
Şekil 4. 13. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri...	52
Şekil 4. 14. Deney gruplarının ve hücre kontrol grubunun canlı hücrelerinin yüzdesini gösteren grafik.....	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2. 1.	Hücre kültürü yönteminin avantajları-dezavantajları.....25
Tablo 2. 2.	Yaygın olarak kullanılan hücre hatları.....26
Tablo 3. 1.	Çalışmada kullanılan kalsiyum silikat esaslı materyaller.....31
Tablo 3. 2.	Çalışmada kullanılan materyallerin çalışma süreleri.....32
Tablo 4. 1.	Örneklerin hücre canlılık yüzdelerine ait ortalamalar ve standart sapmalar.....43
Tablo 4. 2.	Kalsiyum silikat esaslı ekstratların pulpa fibroblast hücrelerine apoptotik etkisi.....52

1. GİRİŞ

Günümüz diş hekimliğinin en önemli amaçlarından biri; mümkün olduğunca az doku kaybı ile uzun süreli fonksiyon, fonasyon ve estetik sağlanmasıdır. Bu doğrultuda derin dentin çürüklü dişlerde meydana gelen patolojilerin düzeltilmesi, kaybolan fonksiyonunun yerine getirilmesi ve pulpa canlılığının sürdürülmesi amaçlanmaktadır. Derin dentin çürüklü dişlerde patolojik ya da mekanik olarak gelişen pulpa açılmaları söz konusu olabilmektedir. Enfekte olmamış canlı pulpanın açıldığı durumlarda kuafaj materyalleri ile pulpanın korunması amaçlanmaktadır. Bu tedavilerde zarar görmüş diş yapılarının geleneksel olarak uzaklaştırılmasının ardından, kalan sağlam dentin ve pulpa dokusunun biyouyumlu bir materyal ile örtülmesi sonucu tersiyer dentin oluşumunun uyarılması hedeflenmektedir (1).

Kök kanal tedavilerinin standart tedavilerde oldukça iyi başarılarla sahip olmasına rağmen kompleks kök kanal sistemlerine ve anatomik düzensizliklere sahip dişlerde başarısızlık oranının yüksek olduğu bildirilmektedir (2). Ayrıca canlı dişlerle karşılaştırıldığında, endodontik tedavi yapılmış dişlerin daha yüksek kırılma dayanıklılığına sahip olduğu belirtilmektedir (3). Dişlerin canlılığının korunması prognoz açısından oldukça önemlidir. Dişin innervasyonunda ve korunmasında önemli bir rolü bulunan pulpa, dentinin yapısını ve beslenmesini sağlamaktadır. Ayrıca canlı pulpa dokuları dış uyaranlara karşı sekonder, sklerotik ve tamir dentinin yapımında önemli rol oynamaktadır.

Vital pulpa tedavileri; biyouyumlu materyallerin yerleştirilmesini, ekspozite pulpa sağlığının biyoinduktör etki ile korunmasını ve mineralize doku formasyonu tarafından onarımın uyarılmasını içerir (1, 4). Pulpa sağlığını korumayı hedefleyen bu tedavi yönteminde, uygulanan materyaller ve pulpa dokusu birbiri ile temas halindedir. Bu nedenle materyalin toksisitesi son derece önemlidir. Pulpa kuafajında, perforasyon tamirinde ve retrograd dolgularda kullanılabilen bu materyaller, pulpa ve periradiküler hücrelerin canlılığını olumsuz etkileyebilmekte ve hücre ölümüne neden olabilmektedir (5). Dental materyaller; iyileşmeyi desteklemeli, diş fonksiyonunun restorasyonu için onarımı uyarmalı ve biyolojik olarak nötr olmalıdır (6). Bu nedenle, pulpal ve pariapikal dokulara biyouyumlu olmayan materyaller kullanmak klinik açıdan tedavi sonuçlarını olumsuz etkileyebileceğinden dikkatli olunmalıdır (7, 8).

Vital pulpa tedavilerinde standart bakım olarak kalsiyum hidroksit kullanımı kabul görmüştür. Bu materyalin mineralizasyon indüksiyonu, yüksek pH ve düşük toksisite gibi yararlı özellikleri bulunmasına rağmen zamanla çözüneme, mekanik olarak zayıflık ve dentin bariyerinde tünellerin varlığı gibi bazı olumsuz özellikleri de belirtilmektedir. Geçmişten günümüze kalsiyum hidroksitin yanısıra hidroksiapatit, tetrakalsiyum fosfat, büyüme faktörleri ve adeziv sistemler kuafaj materyali olarak kullanıldığı görülmektedir. Günümüze kadar vital pulpa tedavilerinde, çeşitli gelişmelere ve farklı yaklaşımlara karşın genel görüş tedavi yöntemi ve materyal seçimi konusunda bir fikir birliğine varılmadığı şeklindedir (9).

Biyouyumluluk, örtücülük ve tamir yeteneği gibi önemli özellikleri bulunan Mineral trioxide aggregate (MTA), kalsiyum silikat içeriğiyle pulpal ve periodontal dokularda güvenle kullanılabilir. MTA materyalinin dört saati bulabilen sertleşme süresi ve manipulasyon zorluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Uzun sertleşme süresi klinik olarak pek çok probleme yol açabilmektedir. Özellikle vital pulpa tedavileri gibi klinisyenin MTA'nın üzerine hemen restoratif bir ajan yerleştirmesinin gerekli olduğu durumlarda bu süre problem yaratacak ve seans sayısının artmasına neden olacaktır (10). Ayrıca henüz sertleşmemiş materyalin canlı dokularla birebir temasta olması nedeniyle simanın stresler altında şeklini koruyabilmesi azalacağından simanın ortamdan uzaklaşması gibi olumsuzluklar meydana gelebilmektedir (11). Bu nedenle, hızlı sertleşen kalsiyum silikat esaslı materyaller, pulpa ile doğrudan temas edecek olgularda pulpa kuafaj materyali olarak önerilmektedir (12).

Çeşitli materyaller bu tedavi yöntemlerinde kullanılmak üzere üretilmekte ve piyasaya sunulmaktadır. MTA'nın olumlu özelliklerinden faydalanmak ve dezavantajlarının da en aza indirilmesi amacıyla Theracal LC, Biodentine™, iRoot BP Plus, MTA Angelus gibi birtakım yeni kalsiyum silikat bazlı materyaller üretilmiştir. Güncel olarak Theracal LC, MTA Angelus, Biodentine™, iRoot BP Plus gibi materyallerin pulpa hücreleri üzerine sitotoksiteleri ile ilgili literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmada; insan pulpa fibroblastları üzerinde kalsiyum silikat esaslı yeni bir kuafaj materyali olan Theracal LC ile yine kalsiyum silikat esaslı olan Biodentine™, MTA Angelus, iRoot BP Plus materyallerinin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Endodontik tedaviler, vital ve devital endodontik tedaviler olarak iki bölüm altında incelenmektedir. Vital endodontik tedaviler (indirekt kuafaj, direkt kuafaj, pulpotomi) geri dönüşümlü pulpa yaralanmalarının tedavisini içermektedir. Bu tedaviler diş inervasyonu ve savunması gibi fonksiyonlarının yanı sıra dentinin beslenmesinde ve formasyonunda önemli rolleri bulunan pulpanın, vitalitesini korumayı amaçlamaktadır.

İndirekt kuafaj, derin dentin çürüklü dişlerde pulpa ekspozundan kaçınmayı ve dentinin üzerine doku dostu bir materyal yerleştirilmesi ile pulpa dokusunun iyileşmesine uygun bir ortam oluşturmayı amaçlayan bir tedavidir (13). Direkt kuafaj, enfekte olmamış ve dentin yapma yeteneğini kaybetmemiş pulpanın travmayla veya iatrojenik nedenler ile perfore olması halinde doku uyumlu bir maddeyle örtülerek tamir dokusunun oluşmasının sağlanmaya çalışıldığı bir tedavidir (14). Pulpotomi ise pulpa odasındaki etkilenmiş dokunun cerrahi olarak kaldırılmasını, kök kanalındaki sağlıklı veya iyileşme kapasitesine sahip canlı pulpanın bırakılmasını içeren bir prosedürdür (15). Şişlik (pulpal kaynaklı), fistül, patolojik mobilité, patolojik kök rezorpsiyonu, periapikal radyolüensi, pulpa kalsifikasyonları gibi enfeksiyon belirtisi bulunan dişlerde bu tedaviler kontrendikedir.

Vital endodontik tedavilerin başarısında pulpa hücrelerinin tamir mekanizması önemli bir role sahiptir. Pulpa hücrelerinin dış etkenlere karşı kendi kendini tamir edebilme özelliği vardır. Subodontoblastik pulpa hücreleri, çeşitli yaralanmalardan sonra odontoblastlara dönüşebilmekte ve yara iyileşmesi boyunca çeşitli dentin matriks proteinleri üreterek tamir yapabilmektedir (16). Diş uygulanan stres, pulpanın iyileşme kapasitesini aşmadığı müddetçe, dentin-pulpa kompleksinde değişimler ve tamir meydana gelebilmektedir. Pulpa biyolojik olarak aktif olduğu sürece bu süreç devam etmektedir (17).

Dentin-pulpa kompleksinin korunması, restoratif materyal ile diş dokuları arasına bir ya da birden fazla koruyucu materyal uygulanmasıyla sağlanmaktadır. Böylelikle pulpal doku operatif işlemlerin yarattığı ilave stresten, restoratif materyallerin toksisitesinden ve mikro sızıntıya bağlı bakteri penetrasyonundan korunmuş olmaktadır. Bu kompleksin korunması, pulpanın fonksiyon görebilmesini ve pulpa canlılığının da korunmasını sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılabilecek dental

materyallerin biyolojik uyumluluğu pulpa dokusunun irritasyonuna ya da dejenerasyonuna neden olmaması açısından büyük önem taşımaktadır.

Vital endodontik tedavilerde kaybedilen işlevin yeniden kazandırılmasındaki başarı, hekimin diş yapısının (mine, dentin, pulpa) ve çevre dokuların anatomisi, histolojisi ve fizyolojisi hakkında yeterli ve gerekli bilgi sahibi olması ile ilgilidir.

2.1. Diş Dokuları

2.1.1. Mine

Diş minesi vücudun en sert ve en yoğun mineralleşmiş biyolojik dokusudur. Ameloblast hücreleri tarafından oluşturulmuştur. Minenin %96 mineralden geri kalanı ise su ve organik maddeden oluşur. Esas olarak kalsiyum, fosfor, karbon, magnezyum ve sodyumdan oluşur. Organik kısmı su, lipit, protein, sitrat, laktat ve karbonhidrat oluşturur. Mine dişin yüzeyinde farklı kalınlıklarda bulunur ve en kalın olarak tüberkül denilen tepe çıkıntılarında; en ince olarak ise mine-sement sınırında bulunur (18).

2.1.2. Dentin

Dentin odontoblast hücrelerinin ürettiği kollajenden zengin organik matriksin mineralizasyonu ile meydana gelmektedir. Tamamen olgunlaşmış dentin %60-70 inorganik yapılardan, %20-30 organik yapılardan ve %10 sudan meydana gelen heterojen bir yapıdır. Dişin hacimsel olarak en büyük bölümünü oluşturan dentinin inorganik komponenti kalsiyum hidroksiapatitten, organik komponenti kollojen ve kollojen olmayan proteinlerden (en fazla tip I kollajen ve en az tip V kollajen) oluşmaktadır (18).

Dentinin yapısında tübüller, odontoblast uzantıları, intratübüler dentin ve intertübüler dentin bulunmaktadır. Dentinin önemli bir özelliği olan tübüller, mine-sementten başlayarak pulpaya doğru genişlemektedir. Çapları 1-25 um aralığında değişmekte olup, pulpaya doğru sayı ve çapları artmaktadır. Derin dentin dokularının yüzeysel dentine göre daha zengin tübül sayısına ve yoğunluğuna sahip olması nedeniyle derin dentin dokuları daha fazla su içeriğine ve daha az mineralize doku oranlarına sahiptir (18).

Dentin tübülleri, pulpa ile doğrudan bağlantılı olan odontoblastik uzantılar içerirler. Dentinin yapısında odontoblast uzantıları ve sinir hücreleri bulunması nedeniyle uyaranlara karşı savunma mekanizması geliştirebilmekte ve bundan dolayı canlı bir doku olarak kabul edilebilmektedir. Dentinin tübüllü yapısı, irrite edici maddelerin pulpaya geçişini kolaylaştırabilmektedir. Ayrıca bu yapısı dentin hassasiyetinin meydana gelmesinde ve polimerize olabilen monomerlerin penetre olabilmesinde önemli rol oynamaktadır (19).

Dentin geçirgenliği bakteri veya bakteri yan ürünlerinin, irrite edici ajanların pulpaya ulaşarak, etki oluşturabilme durumlarını belirleyen önemli bir özelliktir. Dentin geçirgenliğinde en belirleyici faktörlerinden biride kalan dentin kalınlığıdır. Kalan dentin kalınlığının azalması sonucu tübüllerin boyları kısaltmakta ve dentin iletkenliği artmaktadır. Farklı dentin kalınlıklarının pulpaya olan sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada sağlam dentin kalınlığının azalması ile sitotoksik etkinin artış gösterdiği belirtilmiştir. Elde edilen verilerde 1 mm kalan sağlam dentin kalınlığında pulpaya ulaşan iritan madde konsantrasyonunun oldukça az olduğu, ancak bu mesafenin 0.5 mm'ye düşürüldüğü durumlarda pulpada toksik etkiler meydana gelebileceği rapor edilmiştir (20). Ayrıca düşük dentin kalınlığına sahip olan dişlerde dentinin daha nemli olması nedeniyle adeziv sistemlerle olan bağlanma kuvveti olumsuz etkilenebilmektedir (21).

Dentin dokusu, “intertübüler dentin” ve “intratübüler dentin” olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. İntertübüler dentin, organik yapının ana kısmını oluşturan kollajen fibrilleri üzerine çökelmiş hidroksiapatit kristallerinden oluşmaktadır. İntertübüler dentin, dentine gerilme direnci kazandıran ve dentin tübülleri arasında kalan dentindir. İnatrübüler dentin de dentin tübüllerinin iç duvarını saran tübüller olarak tanımlanabilmektedir. İnatrübüller dentin, intertübüler dentine göre daha az kollojen ve daha fazla mineral içermekte ve yaş, restoratif işlemlere bağlı olarak tübüllerinde tıkanma izlenebilmektedir. İnterglobüler dentin ise mineralize olmamış organik matriks içeren dentindir (22).

Diş gelişimi yönünden ise dentin dokusu primer dentin, sekonder dentin ve tersiyer dentin olmak üzere üç şekilde incelenmektedir. Primer dentin kök gelişimi sırasında dişin erüpte olup, yerini alana kadar geçen sürede yapılan tübüler dentindir. Oldukça hızlı üretilen primer dentin, dentinin büyük kısmını oluşturmaktadır. Sekonder dentin, diş sürdükten sonra başlayan ve pulpanın canlılığını devam ettirdiği sürece

yapımı devam eden dentindir. Daha düşük bir hız ile oluşan ve daha az düzenli bir dentindir. Tersiyer dentin, çürük, travma veya atrizyon gibi patolojik dış uyaranların varlığında oluşan ve geçirgenliği sekonder dentine göre daha az olan dentindir. Pulpayı zararlı etkenlerden korumayı amaçlayan düzensiz yapılı bir dentindir. Dış uyaranlar, yaralanma bölgesinin altındaki primer odontoblastlara zarar verebilmektedir. Bundan dolayı pulpa, canlılığını koruyabilmek adına farklılaşmamış mezankim hücrelerden yeni odontoblast benzeri hücreler oluşturabilmekte ve tamir dentini üretmektedir. Bu tip sert doku üretimi ile pulpa dokusunu koruyabilecek sert bir doku bariyerinin oluşturulması amaçlanmaktadır (22, 23).

2.1.3. Pulpa

Pulpa, içerik olarak %25'i organik yapı ve %75'i ise su'dan oluşan müköz tipte gevşek bir bağ dokusudur. Pulpa dokusunda lifler, damarlar, interstisyel sıvı, sinir fibrilleri, ve içerisinde hücrelerin dağılmış olarak bulunduğu bir ana madde vardır. Pulpa bu içeriğiyle dış uyaranlara cevap vermektedir.

Ana maddenin %90'ı su'dan, %10'u ise glikoprotein, protein ve mukopolisakkaridlerden oluşmaktadır. Enfeksiyonların yayılmasına, hücrelerde metabolizma değişikliklerine, hormonlara, vitaminlere ve diğer metabolizma maddelerine etki eder. Kıvamlı bir sıvıdır, hücrelere gerekli olan besin maddeleri ve hücre artıkları bu ortamda kolayca hareket ederler. Arterlerden hücrelere geçen besin maddeleri ana madde içinde ayrışır, hücre artıkları da bu maddeden geçerek venlere ulaşırlar (22).

Pulpa, genel olarak dört farklı tabakadan oluşmaktadır.

Merkez Tabaka: Bağ dokusunun hücreleri, kan ve lenf damarları ile sinirlerin bulunduğu pulpanın en iç tabakasıdır. En baskın hücreleri fibroblastlardır. Pulpa dokusunda çoğunlukla miyelin kılıfa sahip "A delta" ve miyelinsiz "C" grubu lifler uzanmaktadır. A-delta lifleri keskin tipte ağrıya neden olurlar ve kolayca uyarılabilirler. Uzun ve yaygın bir ağrı hissine yol açan C lifleri ise daha yüksek eşiklerde şiddetli ağrıya neden olmaktadır. Sinir lifleri pulpanın savunma mekanizmasının aktive olmasında ve pulpa içi basıncın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (22).

Hücreden Zengin Tabaka: Bu tabakada yoğun olarak farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve fibroblastlar olmak üzere makrofajlar ve lenfositler de yer

almaktadır. Bu tabaka daha çok zarar görmüş odontoblast hücrelerinin yeni hücre yapımından sorumludur.

Hücreden Fakir Tabaka: “Weil tabakası” veya "subodontoblastik tabaka" olarak da bilinmektedir. Hücreden zengin tabakanın etrafında yer alan bu tabaka dentin oluşumunun hızlı olduğu genç pulpalarda ve reparatif dentin yapımının meydana geldiği bölgelerde genellikle görülmemektedir. Bu tabakanın varlığı pulpanın fonksiyonel düzeyi ile ilişkilidir. Aktif dentin yapımı sonrasında bu tabaka kaybolabilmektedir.

Odontoblastik Tabaka: Pulpa dokusunun en dış kısmındaki hücrelerden oluşan tabakadır. Predentin hemen altındadır. Histolojik kesitinde oldukça ince bir tabaka görünümü vermektedir. Genel olarak bu tabaka odontoblast hücre gövdesinden oluşurken, yapısında kapiller, sinir lifleri ve dendritik hücreler de izlenebilmektedir.

2.1.3.1. Pulpa Hücreleri

2.1.3.1.1. Odontoblastlar

Pulpa, dentin kompleksinin en özelleşmiş hücreleridir. Pulpanın yüksek düzeyde farklılaşmış bu hücreleri diş gelişimi aşamasında primer dentin yapımından, daha sonra ise “sekonder” ve “tersiyer” dentin yapımından sorumludurlar (23).

Odontoblast hücresi, gövdeden ve gövdenin uzantısından oluşmaktadır. Hücre gövdesi predentinin hemen altında bulunur, uzantısı ise hücre gövdesinden çıkarak dentin tübüllerine kadar uzanır. Miyelinsiz sinir liflerinin bir kısmı odontoblast uzantıları ile birlikte dentin kanalları içerisine uzanabilmektedir. Morfolojik yapısı dişin farklı kısımlarında değişiklik göstermektedir. Kuronda yüksek silindirik olan odontoblastlar, kökün orta kısmında silindirik, kökün uç kısmında ise kısa ve az çok kübik olabilmektedir. Kök ucunda ise odontoblastlar düzleşir ve fibroblastlara benzer bir şekil kazanırlar.

Odontoblastlar dokuda oluşan yaralanmanın şiddetine, büyüklüğüne ve süresine göre geri dönüşümlü olarak zarar görebilmekte veya tamamen yok olabilmektedir. Hücrelerin ölmesi durumunda odontoblast benzeri hücreler ölü hücrelerin yerini almakta ve dentin matriksi oluşturma görevine katılmaktadır (23).

Odontoblast tabakası dental işlemler sırasında yapısal olarak etkilenebilmektedir. Az çürüklü dişlerde açılan kaviteler, odontoblastlar arasındaki bağlantının bozulmasına, derin dentin çürüklü dişlerde açılan kaviteler ise odontoblastların dentin kanallarından

pulpaya doğru çekilmesine ve hücre ölümüne kadar giden olaylara neden olabilmektedir (23).

2.1.3.1.2. Fibroblastlar

Fibroblastlar diş pulpasında en çok bulunan hücrelerdir. Rutin preparatlarda ışık mikroskopisinde yalnız uzun elips çekirdek şeklinde görülürler. Çekirdeğin büyüklüğü 10-12 mikron kadar olup, birkaç çekirdekçik bulundurur. Bu hücreler pulpanın kollajen liflerini yaparlar, bununla birlikte kollajeni çözdüklerinden kollajenin dönüşümünde de rol sahibidirler. Pulpanın her tabakasında, en çok da hücreden zengin tabakada bulunurlar (24). Tip I ve Tip II kollajen fibrillerin ve kollajen olmayan ekstrasellüler hücre matriks içeriklerinin sentezlenmesinden sorumludurlar (25).

Pulpanın yaşı, vitalitesi ve dış etkilere dayanma gücü fibroblastların sayısından ve aktivitesinden etkilenebilmektedir. Fibroblastların sayısı yaş, çürük, atrizyon, erozyon gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu nedenle yaşlı pulpalarda kollojen liflerin fibroblastlara göre oranı fazladır.

2.1.3.1.3. Savunma Hücreleri (Histiyosit, Makrofajlar, Lenfositler)

Pulpada görülen iltihabi durumda pulpa dokusunu koruyan hücrelerdir. Histiyosit, farklılaşmamış mezankim hücreleri ve lenfositler gibi çeşitli tipleri vardır. Histiyositler kan damarına yakın bulunurlar; uzun, silindir şekillidirler, dışarı doğru uzantıları bulunur. Gerekğinde makrofaj haline dönüşebilirler (24).

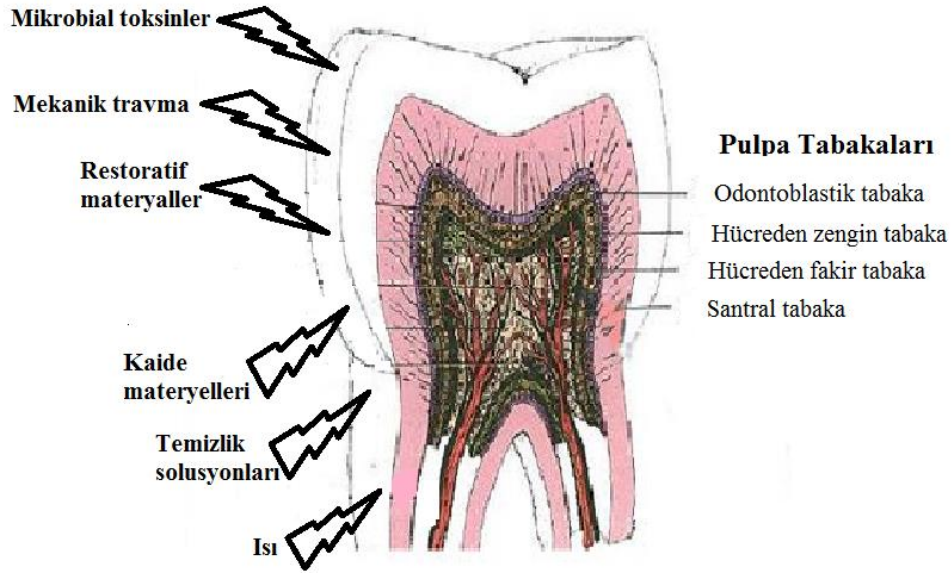
Makrofajlar sağlıklı pulpa dokusunda da görülebilmekle beraber travma durumunda sayıları artan savunma hücreleridir. Monositlerin farklılaşmasıyla oluşan hareketli savunma hücreleridir. Uyarılan makrofajlar interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktörü (TNF- α), sitokinler ve büyüme faktörlerinin üretiminde rol oynarlar. Ölü hücrelerin, hücre kalıntılarının ve dokularda bulunan patojenlerin fagosite edilmesinden sorumlu hücrelerdir.

Tüm bağ dokularında olduğu gibi, pulpada da farklılaşmamış mezankim hücreleri bulunur. Pulpadaki hücreden zengin tabakanın büyük kısmı, farklılaşmamış mezankim hücrelerinden meydana gelir. Bunlar çeşitli potansiyellere sahiptirler. Bir yaralanma sırasında makrofaj haline dönüşebilirler. Aynı zamanda bu hücreler fibroblastlara, odontoblastlara yada osteoklastlara dönüşebilmektedirler (24).

Lenfositler çoğunlukta hücreden fakir tabakada bulunmaktadır. Sağlıklı pulpada T lenfositler bulunurken enfekte pulpada B lenfositler görülür. Lenfositler, farklı antijenleri tanıyabilme özelliğine sahiptir. Bundan dolayı immün cevabın ortaya çıkmasında önemlidir.

2.1.3.2. Pulpa Hasarı ve Tamiri

Pulpa dokusu sürekli olarak dış etkenlere maruz kalmaktadır. Bu dış etkenlere mikrobial toksinler, ısı, mekanik travma, restoratif materyaller, temizlik solüsyonları ve kaide materyalleri örnek verilebilir. Pulpa yaralanmasını takiben yara iyileşmesi esnasında, pulpa hücrelerinin kendi kendini tamir etme ya da odontoblastlara dönüşerek çeşitli dentin matriks proteinlerini üretebilme özelliği vardır (16). Bu sebepten dolayı tüm enflamatuar reaksiyonlar kalıcı hasarla sonuçlanmaz.



Şekil 1. 1. Pulpa dokusunun maruz kaldığı dış etkenler

Bazı araştırmalarda gingival (26) ve pulpal fibroblast hücrelerinin (27); aynen odontoblastlarda, endotel hücrelerinde ve immün hücrelerde olduğu gibi farklı uyaranlara yanıt olarak pek çok sitokin salgılayabildiği gösterilmiştir (28). Sitokinler, doğal bağışıklık ya da kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan ve bu hücreleri uyaran proteinlerdir. Mikroorganizmalara ve diğer uyaranlara karşı farklı sitokinler üretilir. Bu sitokinler, immün ve inflamatuvar hücreler üzerinde birçok yanıtı tetikler. Bazı sitokinler, lökosit dislokasyonunu ve kanın dokuya göçünü düzenleyen

özellikleri bulunmaktadır. Bu sitokinlere “kemoatraktan sitokinler” denmektedir. Bu sitokinler, farklı hücre tipleri tarafından inflamatuvar uyaranlara karşı üretilmekte ve enflamasyon sahasına lökositlerin toplanmasına yol açmaktadırlar. Bazı araştırmalar, pulpa fibroblastlarının gerçek birer kemokin kaynağı olduğunu göstermiştir (29-31).

Pulpa hasarına neden olan etken ortadan kaldırıldıktan sonra, iyileşme süreci başlar ve bu aşamada kollajen sentezi hızlanır (31). Pulpadaki kollajen birikimi sitokinler tarafından artırılır. Kollajen sentezi TGF- β 1, TGF- β 2 ve IL-1 β tarafından artırılır (16). Normal durumun tersine, fibroblastlar inflamatuvar bir ortamda iken önemli miktarlarda kollajen depolarlar (32). Enflamasyon sürecinde, fibroblastlar tarafından gerçekleştirilen bu kollajen sentezi pulpa tamir mekanizmasında anahtar bir rol oynar (16).

2.2. Pulpa Kuafaj Materyali Olarak Kullanılan Materyaller

Dış hekimliğinde kullanılan materyallerdeki gelişmelerin esas amacı restorasyon işlemleri için en uygun dental materyali bulmaktır. Bu amaçla farklı içerik ve özelliklere sahip çok çeşitli materyaller piyasaya sunulmuştur. Bu materyallerin çoğu uygulandıklarında yumuşak doku ve sıvılarla temas halinde olduklarından mekanik ve fiziksel özelliklerinin yanı sıra olası sitotoksik etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Geçmişten günümüze kadar pek çok kuafaj materyali vital pulpa tedavilerinde kullanılmıştır. Ancak materyal seçimi konusunda henüz tam bir fikir birliği bulunmamaktadır.

Günümüze Kadar Kullanılan Kuafaj Materyal Çeşitleri

- Kalsiyum hidroksit
- Çinko oksit ojenol
- Cam iyonomer siman
- Büyüme faktörleri
- Hidroksiapatit
- Tetra kalsiyum fosfat
- Adeziv sistemler ve kompozit rezinler
- Kalsiyum silikat esaslı materyaller

2.2.1. Kalsiyum Hidroksit

İlk olarak 1920’li yıllarda Herman tarafından ‘calxyl’ halinde kullanılınca dikkatleri üzerine çeken kalsiyum hidroksit (KH), günümüze kadar en çok tercih edilen pulpa kuafaj materyali olmuştur (33). En çok incelenen dental materyallerden biri olan KH klasik olarak biyouyumluluk testlerinde altın standart olarak kullanılmışlardır. Suda düşük çözünürlüğe (25 C⁰’de 1.2g/1 civarında) sahip olan KH’in moleküler ağırlığı 74.08’dir (34). pH’sı yüksektir (12,5-12,8 civarında) ve alkolde çözünmemektedir.

KH mineralizasyonu indüklemesi ve bakteriyel büyümeyi önlemesi gibi özelliklerinden dolayı sıklıkla pulpa kuafajında kullanılmaktadır. KH materyali açık pulpal dişlerde uygulandığında ise üç tabakalı bir nekroz alanı oluşturabilmektedir. Yüzeyde oluşan nekroz bölgesi basınç nekroz alanıdır. Bu katmanın altında hidroksil iyonlarının etkisiyle likefaksiyon nekroz alanı oluşmaktadır. En altta da kanamanın devam etmesini önleyen koagülasyon nekroz alanı meydana gelmektedir. Bu işlemler esnasında koagülasyon nekroz alanı çevresindeki canlı pulpa dokusunda hafif şiddetli bir enflamasyon başlamaktadır. Yaklaşık 12 saat içerisinde nötrofilik hücre infiltrasyonu, dört gün sonra pulpal hücrelerin proliferasyonu, yedi gün sonunda fibroblastların ve üç ay sonunda da düzensiz yapılı sert dokuların oluşumu meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalarda ilk tamir dentinin 12. günde görüldüğü, dentin köprü oluşumunun 21. günde izlendiği ve 12 ay boyunca devam ettiği belirtilmektedir. Bununla beraber dentin köprüsü oluşumunun pulpanın devamlılığının korunmasında bir kıstas olarak kabul edilemeyeceği ve dentin köprüsündeki tünel defektlerinden pulpaya bakterilerin geçiş yapabileceği bildirilmiştir (35). Araştırmacılar dentin köprüsü oluşumunun diğer bazı materyallerin kullanımında da meydana geldiğini belirtmişlerdir (36).

Vital doku karşısında kesin ve sınırlı bir nekroz alanı oluşturması, enzimatik faaliyetleri durdurması, sklerotik ve reparatif dentin oluşumunu uyarması KH’in tercih edilme sebeplerindendir. KH’in termal uyarılara ve antibakteriyel hareketlere karşı pulpayı koruyan özellikleri de önemini artırmıştır (37). Sayısız araştırmaya rağmen direk pulpa kuafaj ajanı olan KH’in pulpa tamir mekanizması hala iyi anlaşılabilmiş değildir. KH’in tedavi edici özelliğinin ve dentin köprüsü yapabilme yeteğinin yüksek pH yapısına ve ortamdaki serbest hidroksil iyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir (38). Yüksek bazik yapısı temas ettiği yüzeyde geçici bir koagülasyon nekroz tabakası oluşturmakta ve pulpa hücrelerini uyarak yeni tamir dokusunun oluşumunu

sağlamaktadır. Ayrıca hidroksil iyonlarının salımına bağlı olarak kalsiyum hidroksit; bakteriyel hücrenin DNA'sını bozmakta, bakteriyel stoplazmik membran hasarı oluşturmakta, protein denatürasyonu yapmakta ve bu şekilde de antibakteriyel etkinlik sağlamaktadır (39).

KH'in bu olumlu özelliklerine karşılık bazı olumsuz özellikleri de bulunmaktadır. Dentin köprüsünün yapısındaki tünel defektleri morfolojik bir bozulma meydana getirmektedir. Bu durum dentin köprüsünün sağlam bir bariyer olarak görev görmesini engellemekte, bakteriyel enfeksiyona karşı uzun süreli biyolojik sızdırmazlık sağlanamamasına neden olmaktadır. Oral kontaminantlar, tüneller sayesinde diş/restorasyon arayüzünde oluşan marjinal boşluktan pulpa dokusuna erişim sağlayabilmektedir. Sonuç olarak, mikrosızıntı yoluyla pulpaya ulaşan bakteri ve kimyasal ürünlerinin varlığı pulpa inflamasyonuna ve nekrozuna sebep olurlar (37).

KH, sulu ve asitli ortamlar içerisinde çözünebilmektedir. Düşük mekanik direnci ve dental yapılara bağlanmada eksikleri bulunan KH'in adeziv sistemlerin uygulanması esnasında çözülebildiği de rapor edilmiştir (40). Ayrıca materyalin uygulandıktan sonra rezorbe olma özelliğine bağlı olarak zaman içerisinde mikrosızıntıya sebep olması ise bir dezavantaj oluşturmaktadır (41).

2.2.2. Çinko Oksit Ojenol

Çinko Oksit Ojenol (ZnOE) formülasyonları kaide, astar, siman ve geçici restoratif materyali olarak yıllardır diş hekimliğinde kullanılmaktadır. Bu simanların sedatif etkilerinin yanında bakterilerin çoğalmasını önleyici etkisi olduğu bildirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ZnOE'nün dentine uygulanmasının pulpaya zarar vermediği, ancak açık pulpalı dişlerde uygulanmasının enflamasyona sebep olabileceği bildirilmiştir. Diğer bazı çalışmalarda ise enflamatuvar semptomlara neden olmadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle direk pulpa kuafajı için kullanımı tartışmalıdır. Bununla birlikte öjenol son derece sitotoksiktir (42). ZnOE'nün sitotoksik konsantrasyonlarda öjenol salınımı yaptığı bilinmektedir (43). Ancak zamanla bu salınım azalmaktadır.

2.2.3. Cam İyonomer Siman

Cam İyonomer Siman (CİS), Wilson ve Kent tarafından 1971 yılında geliştirilmiş ve piyasaya sunulmuştur. Materyalin popülerliği florür salınımı, termal genleşme katsayısı, dentine benzer elastisite modülü, mine ve dentine bağlanabilmesi ve biyouyumluluk gibi önemli özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (30). Crisp ve arkadaşları (44) cam iyonomer simanlarının diğer simanlara göre sertleşirken dışarıya daha az ısı verdiklerini ve termal kaynaklı nekroz gelişme olasılığının da düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu avantajlarına rağmen, geleneksel CİS yüksek çözünürlük ve düşük sertleşme oranı gibi zayıf fiziksel özellikler ile nem hassasiyeti gibi restoratif materyallere ilişkin kısıtlılıklara sahiptir (45).

CİS alanında gelişmeler rezin modifiye cam iyonomer simanın (RMCİS) ortaya çıkmasını sağlamıştır. HEMA (2-hidroksietil metakrilat) gibi polimerize edilebilir, su-uyumlu monomerlerin geleneksel CİS formülasyonuna eklenmesi artırılmış esneme gücü, çapsal çekme direnci, esneme modülü ve aşınma direnci ile sonuçlanmıştır. Fakat bu geliştirilmiş materyallerin biyouyumluluğu geleneksel CİS gibi olamamıştır (46, 47). Geleneksel simanların formülasyona HEMA'nın dahil edilmesinin simanların toksik etkilerini artırdığı kanıtlanmış ve sonuç olarak RMCİS'lerin geleneksel CİS'a göre daha sitotoksik olduğu kanıtlanmıştır. RMCİS'in monomer dönüşüm düzeyi tespit edilememiş olmasına rağmen çeşitli çalışmalar HEMA'nın ölçülebilir miktarlarda salındığını göstermiştir (48). Süzülen artık HEMA yüksek hidrofilik özelliğine ve düşük molekül ağırlığına bağlı olarak dentin tübülleri üzerinden difüze olmakta ve dolayısıyla dental pulpa hücrelerine ulaşabilmektedir. Artık monomerlerin pulpa hücrelerinde neden olabileceği hasar büyüklüğü kavite tabanı ve pulpa dokusu arasında kalan dentin kalınlığı ile ters orantılıdır (48). RMCİS'in bir bağ dokusuna doğrudan teması iltihabi bir reaksiyonu tetikleyebilmektedir (49).

2.2.4. Büyüme Faktörleri

Araştırmacılar pulpanın açıldığı durumlarda kayıp hücrelerin yenilenmesinin dışarıdan suni olarak sağlanabileceğini düşünmüşlerdir. Bu amaçla büyüme faktörleri ve sitokinler gibi molekülleri kullanarak yeni hücrelerin proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriksin salgılanmasını ve bu şekilde de tamir dentinin oluşumunu indüklemeyi planlamışlardır (50, 51). Fakat proteinlerin yarı ömürleri sınırlı olduğundan

ve dokuları indüklemek için yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğundan, proteinin doğrudan pulpaya uygulanması beklenen sonuçları vermemiştir (51).

2.2.5. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit dişhekimliğinin yanında ortopedi ve plastik cerrahide kullanılmakta ve sıklıkla yara iyileşmesinde tercih edilmektedir. Mineral yapısı kemik ve diş oldukça benzeyen hidroksiapatitler diş sert dokularının yapısında da bulunmaktadır. Özellikleri arasında mükemmel biyolojik uyumluluğu önde gelmektedir. Bu sebeplerden dolayı direkt pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabilir. Bu sebeplerden dolayı direkt pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabilir.

Jaber ve arkadaşları (52) ratlarda yapmış oldukları bir çalışmalarında kuafaj materyali olarak sentetik hidroksiapatit ve kalsiyum hidroksiti karşılaştırmışlardır. Farklı günlerde dentin bariyerinin oluşumunu ve enflamasyon varlığını değerlendirmişlerdir. Elde edilen verilerde 28. günde sentetik hidroksiapatitte hala enflamasyon olduğu bildirilmiş ve kuafaj materyali olarak kullanılmaması gerektiği rapor edilmiştir.

2.2.6. Tetrakalsiyum Fosfat

Vital pulpa tedavileri için tamir materyali olarak önerilen tetrakalsiyum fosfat (TTCP), baryum sülfat ve zirkonyum oksit içeren bir bileşiktir. Organik asitlerle karıştırıldığında hidroksiapatite dönüşen bu bileşik, diş ve kemik mineraline benzer kristal yapıya ve kimyasal kompozisyona sahiptir (53). Materyalin pulpa boşluğunun dentin yüzeylerine sıkı ve üniform bir adaptasyonu olduğu bildirilmiştir. Yoshimine ve arkadaşları (54) tetrakalsiyum fosfat ile temas halinde olan dokularda yapmış oldukları gözlemlerinde herhangi bir enflamasyon olmadığını ve materyalin hem biyouyumlu hem de osteokondüktif olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.7. Adeziv Sistemler ve Kompozit Rezinler

Adeziv teknolojisindeki gelişmelerle birlikte daha güçlü bağlanma özelliklerine sahip sistemler geliştirilmiştir. Bu güçlü bağlanma özelliklerine sahip sistemlerin dentin tübüllerini hermetik bir şekilde örteceği, mikrosızıntıyı önleyeceği ve dolayısıyla pulpa

hücrelerinin iyileşme sürecine gireceğini bildirilmiştir (55). Bu özelliklerinden dolayı adeziv sistemlerin pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Adeziv rezin sistemler, kompozit rezin restorasyonun retansiyonunu (tutuculuğu) arttırmada, mikrosızıntıyı azaltmada ve post-operatif hassasiyeti önlemede kullanılmaktadır. In vivo çalışmalarda, adeziv rezinlerin, doğrudan açık pulpaya ya da ince tabakalı bir dentine (0.5mm'den az) uygulanmasının kan damarlarında dilatasyona neden olduğu, buna bağlı olarak kan hücrelerinin bölgeye hücum ettiği ve pulpada kronik inflamatuvar yanıtı yol açtığı belirtilmiştir (56). Adeziv rezinlerin tamamen polimerizasyonu, pulpal ödeme bağlı olarak, direkt pulpa kuafajı esnasında elde edilemeyebilir. Buna ek olarak; oksijen de adeziv rezin monomerlerinin tamamen polimerize olmasına engel olmaktadır (57). Sonuç olarak, rezin bazlı materyalden salınan polimerize olmamış monomerler, açık pulpaya doğrudan difüze olabildiği gibi dentin kanallarından da difüze olarak pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere yol açabilir (58).

Her ne kadar klinik ve in vivo çalışmalarda, adeziv sistemleri istenmeyen yan etkiler açısından düşük insidanslar gösterse de, kompozit restorasyonların yapılmasından sonra pulpa dokusunda patolojik değişimler (dilatasyon ve buna bağlı kan damarlarında tıkanıklık, inflamatuvar yanıtlar, düzensiz dentin yapımı, odontoblastların yer değiştirmesi ya da diş hassasiyeti) oluşabilmektedir (58). Oksijen ile temas halindeki monomerler polimere dönüşmeyerek adeziv sistemin en dış kısmında kalmaktadır (59). Dentin sıvısı aracılığıyla adeziv sistemin ve rezin kompozitin polimerize olmamış monomerleri pulpaya sızabilmekte ve istenmeyen etkiler doğurabilmektedir (60). En güncel bonding sistemlerinde bile ana bileşen olarak kullanılan Bisphenol A-glicidil Metakrilat (Bis-GMA) derin kavitelerde ya da doğrudan pulpa üzerine uygulandığında istenmeyen etkilere yol açabilmektedir (61).

Rezin kompozitlerin fiziksel özellikleri sürekli geliştirilse de, rezinlerin restoratif materyal olarak kullanılmalarının zaman zaman pulpa irritasyonu ve nekrozu ile ilişkili bulunduğu rapor edilmiştir (58). Bis-GMA, üretan dimetakrilat (UDMA), trietilen glikol dimetakrilat (TEG-DMA), kamforokinon, HEMA gibi rezin kompozit bileşenleri; memeli fibroblast hücreleri ile direkt temas sonucu kesin sitotoksisiteye neden oldukları bildirilmiştir (61). Çalışmada hücre metabolizmasında geri dönüşümsüz etkileri olan en sitotoksik monomerler; Bis-GMA ve UDMA bulunmuştur. Bu monomerler dentin disklerine uygulandıklarında, iç basınca rağmen dentin tübüllerinden geçerek monomerik materyalin moleküler ağırlığı ile doğru orantılı bir şekilde pulpal

alana erişebilmektedir. Rezin kompozit bileşenleri konversiyon derecesine ulaşılmadığında, tükürükteki esteraz enzimi ile yıkıldığında ya da hidrolitik yıkım meydana geldiğinde sızabilmektedir (59, 62).

Her ne kadar pek çok rezin materyal, mükemmel fiziksel ve mekanik özelliğe sahip olsa da kısa süreli ışınlandığında ya da düşük yoğunlukta ışıkla polimerize edilmeye çalışıldığında, monomerlerin yetersiz polimerizasyonu mekanik özellikler üzerinde olumsuz etki yapabilir ve rezinlerin sitotoksik etkilerini arttırabilir. Costa ve arkadaşları (63) 2003'te yaptıkları bir in vitro çalışmada restoratif rezin kompozitlerin sitotoksik etkilerini odontoblast hücre dizisi üzerinde değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, pulpal dokuda kimyasal hasara yol açan artık monomerlerin, pulpal alana difüzyonunun engellenmesi adına dentin üzerindeki polimerize olmamış monomerlerin azaltılması gerektiğini göstermiştir. Bu etkininde restoratif rezin katmanlarına yeterli yoğunlukta ve sürede ışık uygulanarak elde edilebileceği belirtilmektedir (63).

2.2.8. Kalsiyum Silikat Esaslı Materyaller

Kalsiyum silikat esaslı malzemeler son yıllarda popülerlik kazanmıştır ve pulpa kuafajı endikasyonu olan durumlarda kullanılabilmektedir. Çeşitli kalsiyum silikat esaslı ürünler son zamanlarda piyasaya sürülmüş olmasına rağmen, özellikle bunlardan bazıları çeşitli araştırmaların konusu ve ilgi odağı olmuştur.

2.2.8.1. Mineral Trioksit Agregat (MTA)

Mineral trioksit agregat (MTA) 1993 yılında Loma Linda Üniversitesinde geliştirilmiş ve sonrasında US Federal Drug Administration tarafından kabul almıştır. Ticari olarak ProRoot MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) şeklinde piyasaya sunulan bu materyal diş hekimliğinin birçok alanında ön plana çıkmıştır. Nem varlığında sertleşen MTA; trikalsiyum silikat, trikalsiyum aluminat, trikalsiyum oksit ve bizmut oksit yapılarından oluşmaktadır. Genel içerik ve yapı olarak Portland simanına benzemektedir. Gri ve beyaz renkte iki çeşidi bulunmaktadır.

Kalsiyum hidroksite göre daha etkili olan MTA materyali dental pulpa dokusunda daha az kostik etki ve daha az pulpa inflamasyonu oluşturma yeteneklerine sahiptir (64, 65). MTA, diş pulpa hücrelerinin farklılaşmasını kolaylaştırmaktadır.

Ayrıca yeni sert doku formasyonunu uyarma yeteneği sergilemektedir. Bu özellikleri dokularda enfeksiyonun önlenmesi için uygun bir materyal olmasını sağlamıştır (66).

Uzun sertleşme süresi problemi bu materyalin kullanımını kısıtlamaktadır (67). Sahip olduğu özellikler ve potansiyeli düşünüldüğünde, MTA'nın sertleşme süresinin uzun olması en büyük dezavantajlarından biridir (68). Ayrıca taşınma ve yerleştirilme işlemlerinin zor olması ile simanın stresler altında şeklini koruyamaması bu materyalin vital pulpa tedavilerde kullanımını sınırlandırmaktadır (69). Bu sebeple MTA'nın sertleşme süresi ve basınca dayanıklılığı gibi fiziksel özelliklerini inceleyen daha çok çalışma yapılarak, MTA'nın vital pulpa tedavilerinde kullanımının kolaylaştırılması amaçlanabilir.

2.2.8.2. Biodentine™

Kalsiyum silikat bazlı bir ürün olan Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) 2009 yılından beri ticari olarak mevcuttur ve özellikle "dentin replasman" materyali olarak dizayn edilmiştir. Biodentine™ ayrıca endodontik tamir (kök perforasyonları, apeksifikasyon, rezorbtif lezyonlar ve endodontik cerrahide retrograd dolgu malzemesi) uygulamalarını içeren geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Bu malzeme MTA bazlı siman teknolojisi kullanılarak formüle edilmiş ve bu simanın fiziksel nitelikleri ve manipasyonu gibi bir takım dezavantajlı özellikleri geliştirilmiştir. Bu materyaller, MTA'daki Portland simanın aksine yüksek saflıktaki hammaddelerden laboratuarda sentezlenmişlerdir. "Biodentine™" sıklıkla son yıllardaki literatürde telaffuz edilmekte ve trikalsiyum silikat esaslı simanların önemli bir temsilcisi olarak kullanılmaktadır.

Biodentine™'nin toz bileşenlerinin trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve oksit doldurucu (demir oksit, zirkonyum oksit) yapılarından oluştuğu belirtilmektedir. Diğer taraftan likit kısmı, kalsiyum klorit ve süperplastisize edici ajan olan modifiye polikarboksilattan oluşmaktadır (12). Materyal solüsyonda olduğu zaman kalsiyumu serbest bırakması ile karakterize edilmektedir (81). Trikalsiyum silikat bazlı malzemeler sentetik doku sıvıları ile temas halinde olduğunda hidroksiapatit kaynağı olarak da tanımlanabilmektedir (82).

Ürünün önemli bir özelliği olan hızlı sertleşme süresi; artan parçacık boyutu, sıvı komponente kalsiyum kloridin eklenmesi ve sıvı içeriğinin düşürülmesiyle sağlandığı belirtilmiştir. Bu kısa sertleşme süresi diğer kalsiyum silikat malzemelerle

karşılaştırıldığında önemli bir gelişmedir (70). Grech ve arkadaşları (71) Biodentine™'nin sertleşme zamanını malzemenin Hank çözeltisi içine batırıldığı bir teknikle araştırmış ve Biodentine™'nin sertleşme süresini 45 dakika olarak belirtmişlerdir. Bu kısa sertleşme zamanına karışım sıvısının yapısına katılan kalsiyum klorid ilaveside katkıda bulunmuştur (71). Biodentine™ ürün katologunda ise sertleşme süresi Grech ve arkadaşları tarafından çalışmalarında gözlenenenden daha kısa bir sertleşme süresi olan 9-12 dakikalık bir zamanı göstermektedir.

Materyallerin pulpaya etkilerinin değerlendirildiği in vivo çalışmalarda hayvan ve insan dişlerinin kullanımı tercih edilmektedir. Bu çalışmaların klinik denemelerle desteklenmesi ile materyallerin genel özellikleri daha açık ve net olarak ortaya konmaktadır. Altın standart olarak görülen MTA, pek çok hayvan ve insan çalışmasında kullanılmıştır. Ancak Biodentine™ ve MTA'nın kıyaslandığı vital pulpa tedavilerini konu alan çalışmalar sınırlıdır. Efektif dentin tamirinin başlangıcını gösteren ilk çalışma Tran ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (72). Bu çalışmada materyal mekanik olarak ekspoze edilen rat pulpalari üzerine doğrudan uygulanmıştır. Tamir dentini köprüsü oluşumu açısından Biodentine™, MTA ve KH'in kıyaslandığı çalışmada KH'in tünel şeklindeki bozukluklara neden olduğu görülmüştür. Bu kusurlu/bozuk alanlar istenmeyen bölgelerdir. Bu alanlara mikroorganizmalara göç ederek pulpada endodontik bir enfeksiyona yol açabilmektedir. Kalsiyum hidroksit tarafından oluşturulan dentin köprüsü pulpa odasına doğru genişleme gösterirken, Biodentine™ tarafından oluşturulan dentin köprüsü açık dentin yüzeyi üzerinde lokalize kalmaktadır. Oluşan dentin kalitesi de Biodentine™ lehine daha kaliteli bulunmuş ayrıca ortodontin oluşumu gözlemlenmiş ve oluşan dentin tübüleri açıkça görülebilmektedir (73).

Ortodontik amaçlarla çekilen molar dişler üzerinde yapılan klinik ve histolojik çalışmalar, Biodentine™'in, en az MTA kadar, pulpa kuafaj işlemlerinde, klinik açıdan etkinlik gösterdiğini desteklemektedir. Tam anlamıyla oluşmuş bir dentin köprüsü ve inflamatuvar yanıt oluşmaması gözlenen ana bulgulardır (74).

Gösterdiği üstün sızdırmazlık potansiyeli nedeniyle pulpanın enfekte olmasına yol açabilecek bir mikrosızıntı riski yoktur. Kalsiyum hidroksit kullanıldığında meydana gelen sert doku, pulpanın irritasyona karşı kendisini koruma amacıyla meydana getirdiği bir oluşum iken kalsiyum silika içerikli malzemeler doku dostudur. Üstelik kalsiyum hidroksit ile meydana gelen nekrotik tabaka diğerleriyle kıyaslandığında daha büyüktür (75).

Daha önce bahsedilen olumlu biyolojik sonuçlara ek olarak, destekleyici sonuçlar Marijana ve ekibi tarafından da bildirilmiştir (76). Biodentine™'nin tedavi edici etkilerinin vietnam domuzları üzerinde yapılan pulpa kuafaj işlemleri doğrultusunda oluşan pulpa yanıtı ProRoot MTA ile benzerlik göstermektedir.

Tomson ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada, kalsiyum hidroksit ve Biodentine™ kullanımında, pulpa hücrelerince dentine salgılanan TGF- β 1 ve tamir dentini sentez kapasitesinin seviyelerini karşılaştırmışlardır (77). Bütünüyle bir insan dişi kültür modeli kullanılarak yapılan bu çalışmada ekspozite pulpa üzerinde Biodentine™'nin TGF- β 1 sekresyonunu anlamlı derecede artırma potansiyeli olduğu ve tamir dentininin erken formlarının sentezini tetiklediği görülmüştür (78).

Özellikle pulpa kaplamalarında, perforasyon tamirinde veya retrograd dolgularda kullanılan dental materyallerde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktör biyoyumluluktur. Belirtilen işlemler sırasında materyal bağ doku ile direkt temas halindedir ve pulpal ve periradiküler hücrelerin canlılığını etkileyebilecek potansiyele sahiptir. Bu koşullar altında hücre ölümü apoptoz veya nekroza bağlı olarak gerçekleşir (79). Bu nedenle, toksik malzemelerden kaçınılması, materyallerin onarımı teşvik etmesi veya biyolojik olarak nötr olması materyalin çevre dokular ile doğrudan temas halinde olan işlemleri sırasında tercih edilmektedir. Şimdiye kadar ki Biodentine™ biyoyumluluğuna ilişkin bilgi birikimi oldukça sınırlı olmasına rağmen genellikle mevcut veriler, sitotoksisite ve doku kabul edilebilirliği açısından malzemenin lehinedir.

2.2.8.3. Theracal LC

Kimyasal olarak sertleşen materyallerin sertleşme sürelerinin uzun olması veya fiziksel özelliklerinin yetersiz olması nedeniyle ışıkla sertleşen rezin modifiye pulpa kuafaj materyalleri son yıllarda önem kazanmıştır. Bu amaçla son yıllarda TheraCal LC (Bisco Inc., Schaumburg, IL, Amerika Birleşik Devletleri) materyali geliştirilmiştir. Kompozit, amalgam, siman ve diğer malzemelerin altında astar olarak görev yapan Theracal LC, vital pulpa tedavileri için geliştirilmiş ışıkla sertleşen, rezin modifiye pulpa kuafaj materyalidir. Kalsiyum silikat dolduruculu rezin modifiye bir pulpa kuafaj ajanı olan Theracal LC'in yeterli dentin stimülasyonunu sağlayabildiği, güçlü fiziksel özelliklere sahip olduğunu dolayısıyla pulpa kuafajı konusunda başarılı olduğu iddia edilmektedir. Ayrıca ışınla sertleşebildiği için zaman tasarrufu ve uygulama kolaylığı sunduğu üretici firma tarafından belirtilmektedir.

Materyalin içeriğinde yaklaşık %45 rezin, %45 kalsiyum silikat, %10 radyoopak içerik ve %5 hidrofilik ajan bulunmaktadır. Theracal LC'nin bileşenleri kalsiyum iyonlarını salmakta ve güçlü bir baz olarak görev yapmaktadır. Salınan kalsiyum iyonları da hidroksi apatit ve ikincil dentin köprüsü oluşumunu uyarmaktadır (80).

Gandolfi ve arkadaşları (81) TheraCal, ProRoot MTA ve Dycal materyalin fizikokimyasal özelliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında TheraCal'in ProRoot MTA ve Dycal materyallerine göre daha düşük bir çözünürlüğe sahip olduğu ve daha yüksek kalsiyum iyonunu serbest bıraktığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada; TheraCal'in 7 gün sonunda fizyolojik pH'a yakın bir pH oluşturabildiği iddia edilmiştir.

Bu materyalin polimerizasyon reaksiyonunun gerçekleşmesinde kamforokinon ve alifatik amin önemli rol oynamaktadır. Alifatik amin hızlandırıcı olarak görev alırken, kamforokinon monomer/polimer dönüşümünde fotoinitiatör olmaktadır. Resinin yapısındaki fotoinitiatör molekülleri ancak ışık kaynakları varlığında harekete geçebilmekte ve ortaya çıkan serbest radikallerle polimerizasyon reaksiyonunu başlatabilmektedir. TEGDMA, UDMA, HEMA gibi monomerler de rezin içeriğinde bulunmaktadır. Monomer içerikli materyellerden salınan artık monomerlerin sitotoksik olabileceği, pulpaya veya ağız ortamına sızması durumunda olumsuz etkilere sebep olabileceği bilinmektedir (82).

2.2.8.4. iRoot BP Plus

iRoot BP Plus (Innovative BioCeramix, Vancouver, Kanada) materyali su bazlı seramik bir simandır. Kullanıma hazır, beyaz, hidrolik, önceden karıştırılmış formüle sahiptir. Sertleşme esnasında büzülmediği söylenmektedir. Bu özelliklerinden dolayı üretici firma tarafından daha uygun bir tamir materyali olduğu iddia edilmektedir. Wang ve arkadaşları (83) yapmış oldukları çalışmada iRoot BP ve MTA'nın mikrosızıntılarının karşılaştırmış ve iRoot BP'nin MTA'ya göre daha iyi kapatma özelliği sergilediğini belirtmişlerdir. Azimi ve arkadaşları (84) tarafından yapılan klinik bir çalışmada hastalara iRoot BP ve MTA materyali kullanılarak parsiyel pulpotomi işlemi yapılmıştır. Uygulamadan 6 hafta sonraki verilerde pulpası iRoot BP ile kapatılan dişlerin soğuk uyarana daha hassas olduğu bildirilmiştir. iRoot BP'nin biyouyumluluğunun araştırıldığı bir çalışmada, iRoot BP ve MTA'nın biyouyumlu olduğu ve kritik sitotoksik etki sergilemediği gösterilmiştir (85). Zhang ve arkadaşları (86) yapmış oldukları çalışmada Bioagregat ve iRoot BP'nin dental pulpa hücrelerinin

proliferasyonunu ve mineralizasyonuna olan etkisini değerlendirmiş ve Bioagregat ve iRoot BP'nin toksik olmadığını, mineralizasyonu indüklediğini belirtmişlerdir.

2.2.8.5. MTA Angelus

MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brezilya) direk pulpa kuafajlarında da uygulanabilen hidrofilik ve kendi kendine sertleşebilen kalsiyum silikat esaslı bir materyaldir (11). Yapısında tip III Portland simanı, bizmut oksit, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat trikalsiyum alüminat ve tetrakalsiyum aluminoferrit bulunmaktadır.

İlk olarak üretilen ProRoot MTA ile zaman içerisinde kullanıma sunulan MTA'lar arasında kimyasal ve fiziksel farklar ortaya çıkabilmektedir. Her iki MTA çeşidi, pH ve kalsiyum iyon salınımı gibi özellikleri bakımından birbirinden çok fazla farklılık göstermemesine rağmen sertleşme zamanı ve partikül boyutu gibi özellikler bakımından belirgin farklılıklar göstermektedir (11, 87). Gri MTA'nın kimyasal yapısında %75 Portland simanı, %5 Kalsiyum Sülfat Dehidrat ve %20 Bizmut Oksit bulunurken, çalışmada kullanılan Angelus MTA'da ise %80 Portland simanı ve %20 Bizmut Oksit bulunmaktadır (88). Portland simanın oranının artırılması ile orijinal MTA'nın maliyetinden kaynaklanan dezavantajın giderilmesi amaçlanmıştır.

Santos ve arkadaşları (89) Angelus MTA'nın sertleşme zamanını ortalama 14.28 ± 0.49 dakika olarak bildirmişlerdir. Bu süre diğer MTA'lara göre oldukça kısadır. ProRoot MTA'nın sertleşme zamanı ile ilgili ise farklı araştırmalarda farklı bulgular rapor edilmiş ve ortalama sertleşme süresi 165 ± 5 dakika olarak bildirilmiştir (11, 90). Önemli özelliklere ve potansiyele sahip ProRoot MTA'nın bu uzun sertleşme süresi en önemli dezavantajlarından biridir.

2.3. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk canlı dokuya yerleştirilen bir maddenin; bir dokunun ya da bir organizmanın biyolojik fonksiyonlarına toksik ve zararlı etkiler göstermeden kullanım amacına uygun fonksiyon göstermesidir. Diğer bir deyişle biyouyumluluk, materyalin uygulandığı alanda uygun biyolojik cevap göstermesidir (91). Bir materyalin biyouyumluluğu materyalin fizikokimyasal yapısına, fonksiyonuna ve uygulandığı bölgeye bağlıdır (92). Biyouyumlu materyaller canlı dokularda sistemik ve lokal

toksiste, mutajenik ve kanserojenik etki gibi doku reaksiyonları oluşturmamalıdır (93, 94).

Materyallerden salınan bazı kimyasal maddelerin hücrelerin genetik yapısına etki göstererek bazı değişiklere sebep olması genotoksiste olarak adlandırılmaktadır. DNA molekülündeki kalıtsal değişim gen mutasyonuna neden olabilmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak da ortaya çıkan değişim DNA replikasyonu esnasında diğer molekülleri etkilemektedir. Genotoksik hasarın bir sonraki nesle aktarılmasına da mutajenite adı verilmektedir (95). DNA değişikliklerinin mutasyonu sonucu, hücrelerin istenmeyen şekilde büyümesine ve bölünmesine sebep olması karsinojenite olarak adlandırılmaktadır (96). Teratojenite ise embriyonik gelişimde, materyaller nedeni ile meydana gelen malformasyonlara denir. Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin; mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin incelenmesinde ve biyouyumluluklarının belirlenmesi gerekmektedir (97).

Bir materyalin biyolojik uyumluluğu materyalin çözünmesi ya da aşınması ile ortaya çıkan bileşenlerle tespit edilebilmektedir. Bu bileşenler interlökin-1 interlökin-6 gibi inflamasyon öncesi mediatörlerin hücrede sentezlenmesini indükleyebilmekte, hücre hasarı oluşturabilmekte ve böylelikle enflamatuvar reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bununla beraber biyouyumlu materyaller tamamen inert (etkisiz) olmayabilmektedir (98). Bundan dolayı materyale karşı gelişen doku reaksiyonları uzmanlar tarafından değerlendirilerek, uygun doku reaksiyonunun saptanması gerekebilmektedir.

Günümüzde pulpa kuafaj malzemesi olarak farklı içerikli birçok materyal kullanılmaktadır. Kullanılan materyallerin biyouyumlu olmaması hücre hasarlarına ve hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarında bozulmalara neden olabilmektedir. Diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin biyouyumluluk kriterleri içerisinde; pulpa ve yumuşak dokulara hasar vermemesi, sistemik dolaşıma difüzyon yoluyla toksik maddeler salmaması, alerjik reaksiyona neden olabilecek ajan içermemesi, karsinojenik etki göstermemesi yer alır.

2.3.1. Biyolojik Uyumluluğun Değerlendirilmesi

Yeni bir materyalin biyolojik olarak kabul edilebilirliğinin ölçülmesinde in vitro testler, in vivo hayvan testleri ve kullanım testleri kullanılmaktadır. (ISO Technical report 7405, 1984)

2.3.1.1. İn Vitro Testler (Birincil ya da eleme testleri)

İn vitro testler hızlı sonuç alınabilen, standardize edilebilir ve ucuz testlerdir. Diğer testlere göre daha az kompleks olan bu testler karşılaştırılabilir sonuçlar vererek materyalin ilk kullanımı hakkında bilgi verebilmektedir. Yapılan testler; LD50 ağız içi test, LD50 karın içi test, styles testi, dominant letal testi, hemoliz testi, soluma testi, ames testi ve sitotoksisite testleridir (99). Dişhekimliğinde sitotoksisite testleri sıklıkla kullanılmaktadır.

2.3.1.1.1 Sitotoksisite Testleri

Moleküler olaylar sebebiyle çeşitli makromoleküllerin yapılamaması ve bu nedenle hücre yapısında ve fonksiyonlarında hasar oluşması sitotoksisite olarak adlandırılmaktadır. Sitotoksisite testlerinde muhtemel toksikolojik reaksiyonları in vitro değerlendirmek amacıyla hücre kültürleri kullanılır. Bu testler bize; hücrenin canlılığı, membran ve organelleri, DNA sentezi ve bölünmesiyle ilgili bilgi sağlarlar. Test materyalinin fiziki yapıları ve temas özellikleri yapılan çalışma için büyük önem teşkil etmektedir (100).

Bu testlerde hücrelerin enzim aktiviteleri, membran geçirgenlikleri, hücre metabolizmaları (DNA, RNA ve protein sentezi), hücre morfolojileri, hücre gelişimleri ve hücre sayıları incelenerek sitotoksisiteleri değerlendirilmektedir. İn vitro ortamda uygulanan bu test yöntemlerinde seçilen materyalin, dokuda sebep olduğu reaksiyonların laboratuvar ortamında görülmesi amaçlanmaktadır (100).

Bu yöntemin avantajları; hızlı bir şekilde uygulanabilmesi, düşük maliyetli olması, kullanım testlerine göre daha hassas olması ve ayrıca spesifik fonksiyon değerlendirmesine olanak tanınmasıdır. Dezavantajları ise tek tip hücre kullanım zorunluluğu sebebiyle test hücreleriyle konak hücrelerin farklılık gösterebilmesi, koruyucu mekanizmaların yokluğundan dolayı uzun dönem immün cevap değerlendirmesine olanak tanınmamasıdır (101).

Sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılan test metodları boya tutulumu, hücre sayımı, metabolik bozulma ya da membran bütünlük testlerini baz almaktadır. Materyal sitotoksik etki göstermediğinde hücreler, kültür kabında yapışık kalmakta ve çoğalabilmektedir. Materyal sitotoksik etki gösterdiğinde ise hücreler çoğalamamakta ve hücre sayısında azalma gözlenmektedir. Membran bütünlüğü testleri hücre ölümünün

sonuçlarından biri olan, hücre membran geçirgenliği ile ölçülmektedir. Hücre zarı geçirgenliği, zarı geçebilen bir boya ile oldukça basit bir şekilde tespit edilebilmektedir. Bu yöntem için iki tip boya kullanılabilir. Vital boyalar, aktif transport ile canlı hücre içine taşınırlar ve hücre zarının geçirgenliği artmadıkça içeride kalmaktadır. İnkubasyondan sonra çözünebilen toksik maddeler, membranın lizisi sonucu hücredeki boya kaybıyla tespit edilmektedir. Non vital boyalar ise aktif transport ile hücre içine taşınmazlar ve sitotoksik etki ile hücre zarı geçirgenliği değiştiğinde hücre içine girerler (102).

2.3.1.2. İn Vivo Hayvan Testleri (İkincil testler)

Bu testler kemik implantasyon testi, oral mukoza membran testi, duyarlılaştırma testi, deri altı implantasyon testlerini içermektedir. Bu testlerde oluşan biyolojik yanıt in vitro testlere göre daha kapsamlıdır. Bu testlerin dezavantajları ise değişkenleri kontrol altında tutmanın zor olması, testlerin uzun sürede tamamlanması ve pahalı olmasıdır (95). Dikkat edilmesi gereken bir husus da hayvan ve insan türlerinde aynı yanıtın alınamayabilecek olmasıdır.

2.3.1.3. Kullanım Testleri (İnsanlarda Klinik Çalışmalar)

Bu testler; ilk iki test grup aşamalarını başarıyla tamamlayan güvenilir materyallerin insanlarda hedeflenen bölgelere yerleştirilerek oluşacak yanıtların gözlemlenmesine dayanmaktadır. Bunlar restoratif malzemeler için pulpa ve pulpotomi kuafaj malzemeleri testi, endodontik malzeme testi ve kemik içi implant malzeme testleridir. Amaç maddelerin uzun dönem biyouyumluluklarını test edebilmektir. Sadece gönüllülerle çalışılması, yüksek maliyeti ve zaman alıcı olması dezavantajlarıdır. Klinik çalışmalarda değerlendirilecek konular pulpa reaksiyonları, gingiva ve periodonsiyum ile olan biyouyumluluk, oral mukozada irritasyon ve plak oluşumudur (95).

2.3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü sağladığı avantajlar nedeniyle diş hekimliğinde dental materyallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin gösterilmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Hücre kültürleri maksimum standardizasyon sağlaması sebebiyle günümüzde yaygın kullanım alanı bulmaktadır (103).

Hücre kültürleriyle canlı dokulardan alınan parçaların in vitro şartlarda yaşamaları ve çoğalmaları sağlanılarak, deney materyallerinin kültürler üzerindeki etkileri belirlenebilir. Bu yöntemde steril tüp veya şişelerde in vivo şartlar (ph, osmolarite, oksijen, karbondioksit konsantrasyonu) sağlanarak 36 °C’de hücrelerin üremesi beklenmektedir. Hücre üremesi için gereken tuzlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, peptidler, vitaminler ve mineraller kültüre ilave edilen besiyerleriyle sağlanmaktadır. Böylece canlı dokuların vücut dışında yaşatılması ve çoğaltılması sağlanarak canlı dokuların gelişimi taklit edilmiş olmaktadır (103).

Tablo 2. 1. Hücre kültürü yönteminin avantajları-dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Çevre koşulları kontrol altındadır	Diğer tip hücrelerle etkileşim olmaz
Tekrarlanabilir	Zaman alıcıdır
Deneklerin öldürülmesine gerek yoktur	Pahalı bir yöntemdir
Ara aşama kontrolleri kolaydır	Kontaminasyon riski vardır
Malzemeler arasında parametrik karşılaştırma olanağı sağlar	Uzun süreli temas sonrası sitotoksikite değerlendirmesinde yetersizdir.

2.3.2.1. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması

1. Primer hücre kültürleri
2. Devamlı hücre kültürleri
3. Diploid hücre kültürleri olarak gruplandırılabilir

Primer/diploid hücre kültürleri doğrudan orijinal dokudan elde edilmektedir. Primer/diploid hücre kültürleri dokunun fizyolojik yapısını iyi yansıtmakta ve orijinal hücreyle benzer özellikler göstermektedir. Kültürdeki hücreler dokuyu direk yansıttığı için sağlıklı dokular tercih edilmelidir. Tümoral dokulardan elde edilen hücreler patolojik sonuçlara sebep olabilmektedir. Primer/diploid hücrelerin çoğalma kapasiteleri sınırlıdır bu nedenle ilk kültürden sonra farklı bir kültür ortamına taşınır ve subkültüre edilir. Böylece aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatları oluşturulur ancak hücre sayısı arttıkça orijinal yapılarda bozulmalar meydana gelmektedir (104).

Devamlı hücre kültürleri kolaylıkla çoğalabilen, ancak transforme oldukları için in vivo özelliklerinin tümünü muhafaza edemeyen kültürlerdir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında devamlı hücre hatları kolay çoğalabilmeleri sebebiyle sık tercih edilmektedir.

Tablo 2.2. Yaygın olarak kullanılan hücre hatları

Devamlı Hücre Kültürleri	Primer Hücre Kültürleri
Fare cilt fibroblastları (L929)	İnsan cilt fibroblastı
Fare fibroblastları (L 60T)	Gingival epitelyum
İsviçre fare fibroblastı (3T3)	Gingival fibroblast
Sıçan osteojenik sarkom (RT)	PDL fibroblastı
Hamster böbrek fibroblastı (BHK 21(C-13))	Pulpa fibroblastı
İnsan cilt epitel hücresi (NCTC 2544)	Sığır pulpa fibroblastı
İnsan servikal karsinom (HeLa)	Domuz pulpa fibroblastı
İnsan gingival karsinom (ca 9.22)	Kacaciğer fibroblastı
İnsan oral karsinom (KB)	Kalp fibroblastı

2.3.2.2. Hücre Kültürü Test Yöntemleri

Uluslararası Standardizasyon Birliği (ISO) standartlarına göre; direkt kontak testi, ekstrakt testi, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi ve dentin bariyer testi kullanılması önerilen in vitro sitotoksosite testleridir.

2.3.2.2.1. Direk Temas Testi

Bu test, hücrelerle dental materyallerin arada herhangi bir bariyer olmadan fiziksel temas ettirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu testte kullanılacak materyaller kimyasal değişimlere uğramayacak nitelikte olmalıdır ve temas steril şartlarda sağlanmalıdır. Suda çözünür materyallerde oldukça iyi bir temas sağlanmaktadır. Suda çözünmeyen materyallerde ise direk temas sağlamak için materyalin hücrelere olabildiğince yakın yerleştirilmesi ya da hücre kültür kabına önce materyalin ardından hücrelerin eklenmesi gerekmektedir (105).

2.3.2.2.2. Ekstraksiyon Metodu

Kalsiyum silikat esaslı pulpa kuafaj materyalleri için uygun bir metottur. Bu testte materyalden çözünen bileşenler bir sıvı çözücü içerisinde hücrelerle temas ettirilmektedir. Bu sıvı çözücüler serum içeren medyum, serum içermeyen medyum, fizyolojik tuz solüsyonu olabilmektedir. Materyaller hücre besiyerinde %5 CO₂ bulunan 37 °C'lik ortamda belirlenen sürelerde bekletilmektedir. Böylelikle katı materyallerin yapısındaki sitotoksik bileşenlerin çözülmesi ve besiyerinde toplanması sağlanmaktadır. Sürenin sonunda elde edilen materyal ekstraktları hücreler üzerine uygulanarak belirli sürelerde yine aynı ortamda bekletilmektedir. Bu süre sonunda seçilen test metotları (MTT, MTS, XTT vb.) ile materyalin sitotoksitesi tespit edilmektedir.

2.3.2.2.3. Bariyer Test Metodu

Klinik pratiğinde dentin dokusu, kaviteye uygulanan materyalle pulpa arasında bariyer görevi üstlenerek direkt materyal-hücre temasını engellemektedir. Bu nedenle bariyer test metodunda dentini taklit eden sistemler bariyer olarak kullanılırlar. Bu amaçla bariyer olarak hücre kültür insert sistemleri kullanılmaktadır. Materyal insert içine yerleştirilerek asılı bir şekilde medyum içinde tutulur. Bariyer fonksiyonu üstlenen ve insertin alt kısmında bulunan poröz bir membran materyalden çözünen bileşenlerin geçişine izin vererek medyum tabanında bulunan hücrelerle temas olanağı sağlar. Bu metodla ilgili oluşturulmuş yeterli test prosedürü yoktur (106, 107).

2.3.2.2.4. Agar Difüzyon Testi

Bu yöntem sitotoksisite deneylerinde kullanılan en eski yöntemlerdendir. Bu test yönteminde hücrelerin üstü agar ile kaplanır ve sitotoksisitesi değerlendirilecek olan materyal agar üzerine yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkiyi belirlemek için ortama verilen nötral kırmızı boyanın lizozomlardaki birikme miktarı değerlendirilir. Değerlendirme hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz oluşumuna göre yapılır. Basit ve ucuz bir yöntemdir fakat agarda çözünemeyen veya difüze olamayan test materyallerinde uygulanamaması dezavantajıdır (106).

2.3.2.2.5. Milipor Filtre Difüzyon Testi

Bu yöntemde 47 mm çapında ve 0,45 µm boyutunda gözenekli selüloz asetat filtre kullanılır. Sitotoksisitesi ölçülecek materyal bu filtreden difüze olabilecek özelliğe sahip olmalıdır. Filtrenin bir tarafına primer hücreler, diğer tarafına test materyali yerleştirilir. Oluşan hasar dekolorizasyon alanının ölçülmesiyle veya boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile tespit edilir (102).

2.3.2.2.6. Dentin Bariyer Testi

Klinikte dentin ile kontakt içinde olan materyallerin in vitro sitotoksisite testleri arasında kullanılan bir metoddur. Çalışmalarda insan veya sığır dişlerinden hazırlanmış dentin diskleri kullanılır. Bu yöntemde, insan dentin disklerinin kullanılması, in vivo ortamı taklit edebilmesi açısından kullanışlı olmasına rağmen geçirgenlik özelliklerinin çeşitlilik göstermesi ve dentinin elde edilmesinin kısıtlı olması gibi dezavantajlar da bulunmaktadır (108). Sığır dentininin bu yöntemlerde kullanımı çok sayıda elde edilebilmesi ve geçirgenlik bakımından insan dentininden daha az çeşitlilik göstermesi gibi nedenlerden dolayı daha avantajlıdır (103).

2.3.3. MTT Testi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)

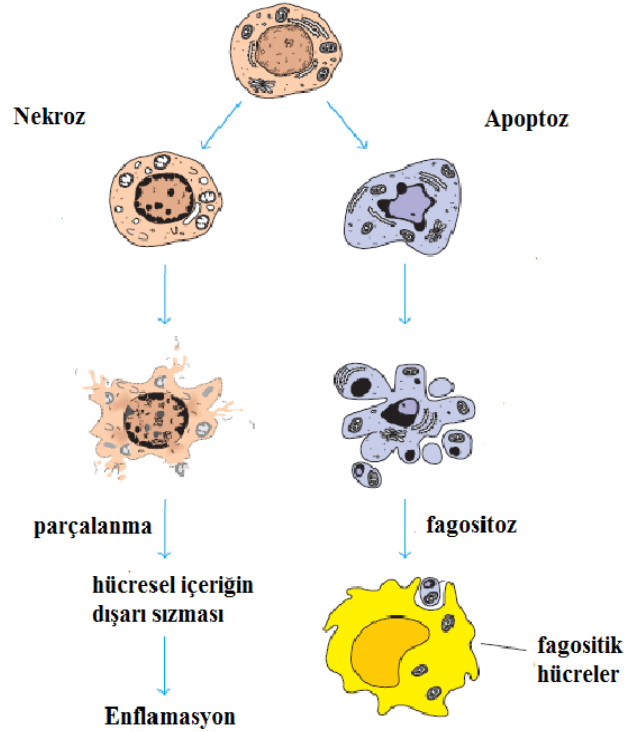
MTT genellikle sitotoksisite deneysel çalışmalarında en sık kullanılan in vitro enzimatik testdir ve ilk olarak Mosmann tarafından kullanılmıştır. Bu test ile bir hücre kolonisindeki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilir. Aynı zamanda

mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülebilir. Ana bileşeni 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromid olan MTT, sarı renklidir. Canlı hücrelerde tetrazolium halkasının parçalanması sebebiyle sarı MTT boyası mor renge boyanmakta, ölü veya mitokondriyal aktivitesi hasara uğramış hücrelerde boyanma olmamaktadır. Elde edilen mor renkli çözelti spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Hücre sayısındaki artma veya azalma miktarı, hücre sayısı ile bağlantılı olarak oluşan formazan miktarında değişmeye neden olmaktadır. Test örneği etrafındaki formazan oluşumu optik yoğunluk ölçümüyle, ışık veya elektron mikroskobu ile veya özel boya okuyucu cihazlarla tespit edilebilmektedir. Bu ölçüm sonucu elde edilen değerler teste tabi tutulan malzemenin toksisitesi hakkında bilgi vermektedir (105).

2.4. Hücre Apoptozu

Hücre ölümü, apoptoz ve nekroz olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılmaktadır. Apoptoz çok hücreli organizmalarda programlanmış hücre ölümü olarak bilinmekte ve birtakım hücresel sinyal yollarıyla düzenlenmektedir. Normal fizyolojik koşullarda ortaya çıkabilen apoptoz, hücrenin kendi ölümünde katılımcı rol oynamaktadır. Apoptozda hücre hasarına ve ölümüne yol açan bir takım biyokimyasal olaylar meydana gelmektedir. Apoptoz meydana gelirken hücresel fragmentasyon, kromozomal DNA'nın ayrılması, DNA'nın bozulması gibi olaylar gözlenmektedir. (109). Buna karşın nekroz, hücrelerin ya da dokuların zamanından önce ölmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Nekroz olayı boyunca hücreler şişmekte ve plazma membranı büzülmesinde sonra hücreler hızlı bir şekilde parçalanmaktadır (110). Apoptoz ile hücrelerin ölümü ve eliminasyonu immun sistem tarafından farkedilmemiş olarak kalırken nekrotik hücrelerden ekstraselüler alana intraselüler içeriğin salımı enflamatuar cevabın verilmesini etkilemektedir (111). Makrofajlar tarafından temizlenen apoptotik hücrelerden dolayı ölen hücrenin etrafında enflamasyon gözlenmemektedir. Birçok yönden apoptoz ve nekroz birbirinden farklıdır. Bazen uyarının derecesi hücrenin apoptoza ya da nekroza gideceğini belirlemektedir (112). Sitotoksik ajanlara maruz bırakılan hücreler nekroza ya da apoptoza gidebilmektedir. Hücre ölümünün şeklinin tespit edilmesi kullanılan materyal sitotoksik ise, materyalin biyoyumluluğunun belirlenmesi açısından faydalı olacaktır. Bununla birlikte apoptoz, hücreler toksik dental

materyallere maruz bırakıldığında da oluşabilir. Apoptozun analiz edilmesi dental materyallerin sitotoksitesi için ilave bir belirleyici olarak kullanılabilir.



2.4.1. Flow Sitometri

Hücreler ya da kromozomlar gibi mikroskopik partiküllerin sayılması ve incelenmesi için kullanılan flow sitometride; hücreler akan bir sıvının içerisinde konmakta ve elektronik belirleyici bir aparatın içerisinde geçirilmektedir. Flow sitometri kullanılarak apoptozise ekspres olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteini saptanabilmekte ve apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Bu uygulamada floresan bir madde olan propidium iyodür ve Anneksin V kullanılmaktadır. Uzun zaman almaması, kolay uygulanabilir olması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından apoptozun belirlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir (113). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda dental materyallerin ya da kök ucu dolgu maddeleri ve perforasyon tamir materyallerinin hücreler üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek üzere flow sitometri yöntemini kullanılmaya başlanmıştır (79, 114, 115).

3. MATERİYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında, vital pulpa tedavilerinde kullanılan kalsiyum silikat esaslı pulpa kuafaj materyallerinin MTT testi ile sitotoksik etkilerinin ve flow sitometri yöntemiyle apoptotik etkilerinin sonuçları incelenerek değerlendirilmesi yapıldı. Çalışmada kullanılan kalsiyum silikat esaslı materyallerin içerikleri ve üretici firmaları Tablo 3.1.'de, materyallerin çalışma süreleri ve sertleşme tipleri ise Tablo 3.2.'de gösterildi.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan kalsiyum silikat esaslı materyaller

PULPA KUFAJ MATERİYALİ ADI	İÇERİK	ÜRETİCİ FİRMA
Biodentine™	Tozunda trikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve zirkonyum oksit likitinde ise su, kalsiyum klorid (hızlandırıcı) ve modifiye polikarboksilat içermektedir.	Septodont, Saint-Maur-Fosses Codex, Fransa
Theracal LC	Tip III portland siman, Polietilen glikol dimetakrilat, baryum zirkonat	Bisco Inc., Schaumburg, IL, Amerika Birleşik Devletleri
iRoot BP Plus	Kalsiyum silikat, zirkonyum oksit, tantal pentoksit, kalsiyum fosfat monobazik ve doldurucu ajanlar	Innovative BioCeramix Inc. Vancouver, Kanada
MTA Angelus	Tozunda tip III Portland siman, bizmut oksit, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat ve tetrakalsiyum aluminoferrit	Angelus, Londrina, PR, Brezilya

Tablo 3. 2. Çalışmada kullanılan materyallerin çalışma süreleri ve sertleşme tipleri

Materyaller	Çalışma Süresi	Sertleşme Süresi	Sertleşme Tipi
Biodentine™	6 dk	12 dk	Kimyasal olarak sertleşen
Theracal LC	∞	20 sn (Işıklı sertleşme)	Işıklı sertleşen
iRoot BP Plus	30 dk	120 dk	Kimyasal olarak sertleşen
MTA Angelus	4 dk	15 dk	Kimyasal olarak sertleşen

Çalışmada kalsiyum silikat esaslı materyallerin insan diş pulpa fibroblastları üzerine olan sitotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesinde aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi.

- Pulpa fibroblast hücre kültürünün hazırlanması ve stoklanması
- Test örneklerinin hazırlanması
- Kalsiyum silikat esaslı test örneklerinin MTT testi ile pulpa fibroblast hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi
- Kalsiyum silikat esaslı materyallerin pulpa fibroblast hücre kültürü üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan dişler Mustafa Kemal Üniversitesi (MKÜ) Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda çekildi. İnsan diş pulpa fibroblastlarının üretilmesi, stoklanması, MTT ve flow sitometri testleri, MKÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce MKÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı. (Protokol kodu 04/06/2014/103).(Ek:1)

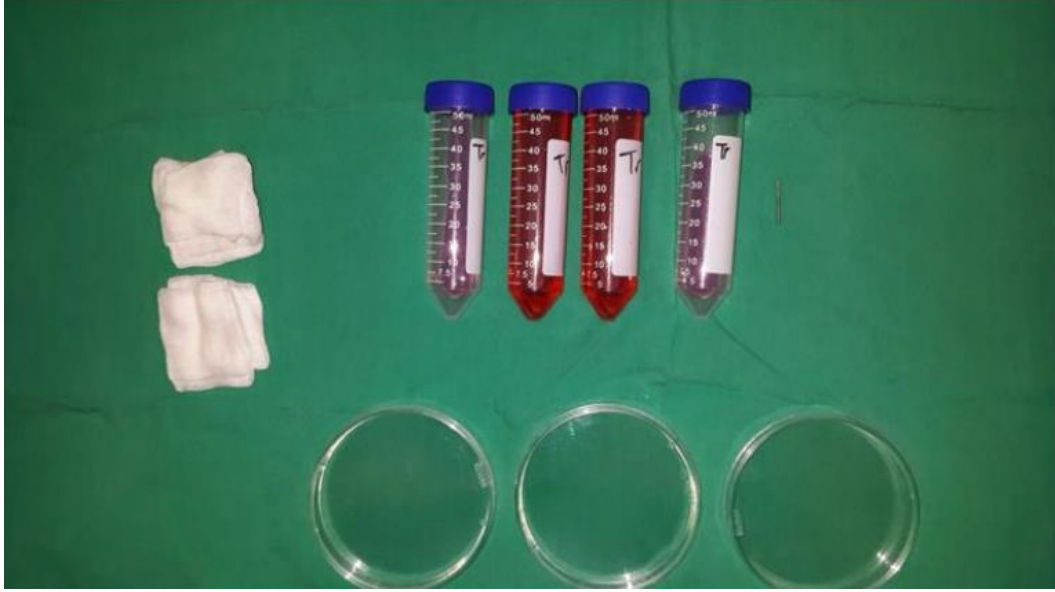
3.1. Pulpa Fibroblast Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Stoklanması

İnsan dişi pulpa fibroblastı primer hücre kültürünün elde edilmesinde Zare JM ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları prosedürler uygulandı (116). Çalışmada; MKÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvurmuş, 18-30 yaşlarında, herhangi bir rahatsızlığı olmayan hastaların çekim endikasyonu konulan sağlıklı iki adet üçüncü büyük azı dişi kullanıldı. Helsinki Bildirgesi uyarınca hastaya açıklama yapıp, onay alındıktan sonra hastalarının diş çekimleri mümkün olduğunca dişlere zarar vermeden yapıldı. Deney materyellerinde kontaminasyonu önlemek için dişe yapışık olan gingival doku veya diş taşı gibi artık maddeler işlem yapmadan önce uzaklaştırıldı. Çekimin hemen sonrasında, %70 etanol ile ıslatılmış gazlı bez ile üçüncü büyük azı dişleri temizlendi; ardından da steril saf suyla yıkandı. (Şekil 3.1)



Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan çekilmiş üçüncü büyük azı dişleri ve % 70'lik etanol solüsyonu

Üst kesici forseps ile tutulan dişler, mine ve sement sınırından su soğutması altında fissür frez kullanılarak kesildi. Kesim aynı hat üzerinde yapıldı ve diş parçaları PBS 1X (Gibco, Carlsbad, US) içeren falkon şişelerin içine yerleştirildi. (Şekil 3.2)



Şekil 3. 2. Çalışmada kullanılan dişlerin temizlendiği steril plastik petri kapları ve çıkarılan pulpa dokusunun muhafaza edildiği steril PBS 1X (Gibco, Carlsbad, US) solüsyonunu bulunduran falkon

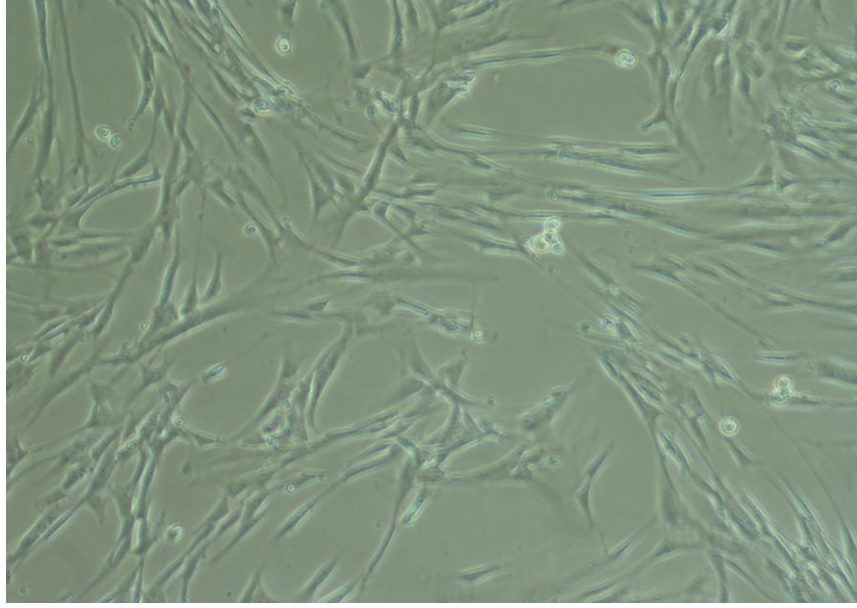
Numuneler laboratuvara ulaştırıldı ve laminar akışlı kabin (Herasafe KS, Berlin, Almanya) içerisindeki petri kaplarının içine yerleştirildi. (Şekil 3.3) Tüm bu işlemler 15 dakika içerisinde gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3. Çalışmada kullanılan laminar akışlı kabin

Steril ortam olan laminar akışlı kabin içerisinde steril tirnef ve penset kullanılarak kesilmiş diş parçalarından diş pulpası izole edildi. Hücresel ayrılma, 37° C'de 60 dakika boyunca 3 mg/ml kollajenaz tip I ile bölünmüş pulpa dokusunun

sindirilmesi ile tamamlandı. Hücreler daha sonra, bir insülin şırıngası kullanılarak ayrıldı ve 1800 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje edildi. Hücre fraksiyonu, PBS 1X ile iki kere yıkandı ve oda sıcaklığında 1800 rpm'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüje tabi tutuldu. Elde edilen fibroblastlar; DMEM #Hams F12 ile desteklenen % 10 FBS, 2 MLglutamin, 100 mg/ml desteklenmiş penisilin G, 100 ug/ml streptomisin ve % 1 Fungizone içinde kültüre edildi ve 3 hafta boyunca 37 °C'lik sıcaklıkta nemli % 95 hava ve % 5 CO₂'de inkübe edildi. Hücreler % 80 yoğunluğa ulaşınca kadar ortam her 3 günde bir yenilendi. (Şekil 3.4)



Şekil 3. 4. Elde edilen pulpa fibroblast hücrelerinin görüntüsü

3.2. Test Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada dört adet kalsiyum silikat esaslı pulpa kuafaj materyali olan Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-Fosses Codex, Fransa), Theracal LC (Bisco Inc., Schaumburg, IL, ABD), iRoot BP Plus (Innovative BioCeramix Inc., Vancouver, Kanada), Angelus MTA (Angelus, Londrina, PR, Brezilya) test edildi.

Araştırmada kullanılan bütün materyal örnekleri laminar akışlı kabin içerisinde üretici firmaların önerileri dikkate alınarak hazırlandı. (Şekil 3.4) Materyallerin örnek boyutları belirlenirken, yüzey/vasat oranının 0.5 - 6 cm²/ml olması (ISO 10993-5:4.2.3.5, 1992) ve salım aşamasında kültür medyumunun örnekleri tümüyle çevreleyebilmesi hedeflendi. Silindirik şekilli steril standart teflon halkalar kullanılarak 5 mm (milimetre) çapında ve 2 mm yüksekliğinde materyal diskleri oluşturuldu.

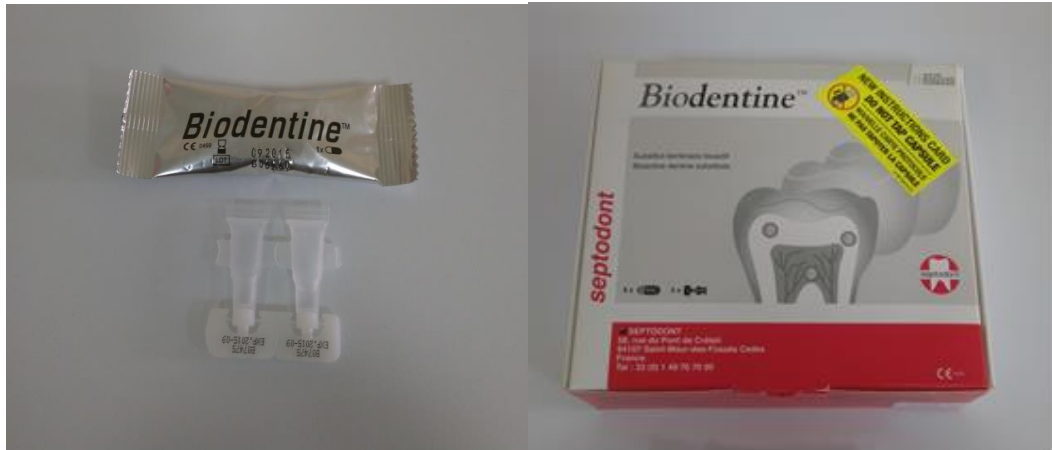
Sitotoksosite testleri için örneklerin başlangıç sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı.



Şekil 3. 5. Steril ortamda hazırlanan test örnekleri

Grup I: Biodentine™

Üretici firma talimatlarına göre kapsül Biodentine™ tozu içerisine beş damla likit eklenerek amalgamatörde 30 saniye karıştırıldı. Steril bir el aleti ile karışım teflon kalıplara yerleştirildi ve kondanase edildi. (Şekil 3.6.)



Şekil 3. 6. Biodentine™ kuafaj materyali

Grup II: Theracal LC

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda materyal teflon kalıpların içerisine eşit ve homojen bir şekilde uygulandı. 1 mm kalınlıkta uygulanan materyal 1200 mW/cm² güce sahip LED ışık kaynağı ile (Bluephase, Ivoclar Vivadent, Lichtenstein, Almanya) 20 saniye boyunca polimerize edildi. Ardından polimerize olmuş tabakanın üzerine materyal tekrar 1 mm kalınlığında uygulandı ve 20 saniye boyunca polimerize edildi. (Şekil 3.7)



Şekil 3. 7. Theracal LC kuafaj materyali

Grup III: iRoot BP Plus

Bu materyal doğrudan kullanıma hazır bir formülasyona sahiptir. Steril ortamda siman fulvarı, amalgam fulvarı ve el aletleri ile materyal teflon kalıplara yerleştirildi ve kondanse edildi. Distile su ile nemlendirilen karışımın sertleşmesi için beklendi. (Şekil 3.8)



Şekil 3. 8. iRoot BP Plus kuafaj materyali

Grup IV: MTA Angelus

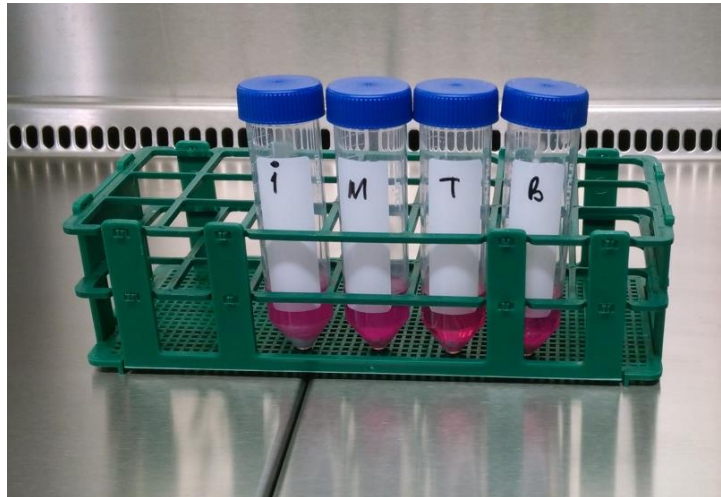
Üretici firmanın talimatları doğrultusunda 1 ölçek MTA ile 1 damla distile su steril bir metal spatül ile steril cam üzerinde karıştırıldı. Karışım homojen bir hal alınca kadar bu işleme devam edildi. Steril edilmiş başka bir el aleti ile elde edilen karışım teflon kalıplara yerleştirildi ve kondanse edildi. Distile su ile nemlendirilen karışımın sertleşmesi için beklendi. (Şekil 3.9)



Şekil 3.9. MTA Angelus kuafaj materyali

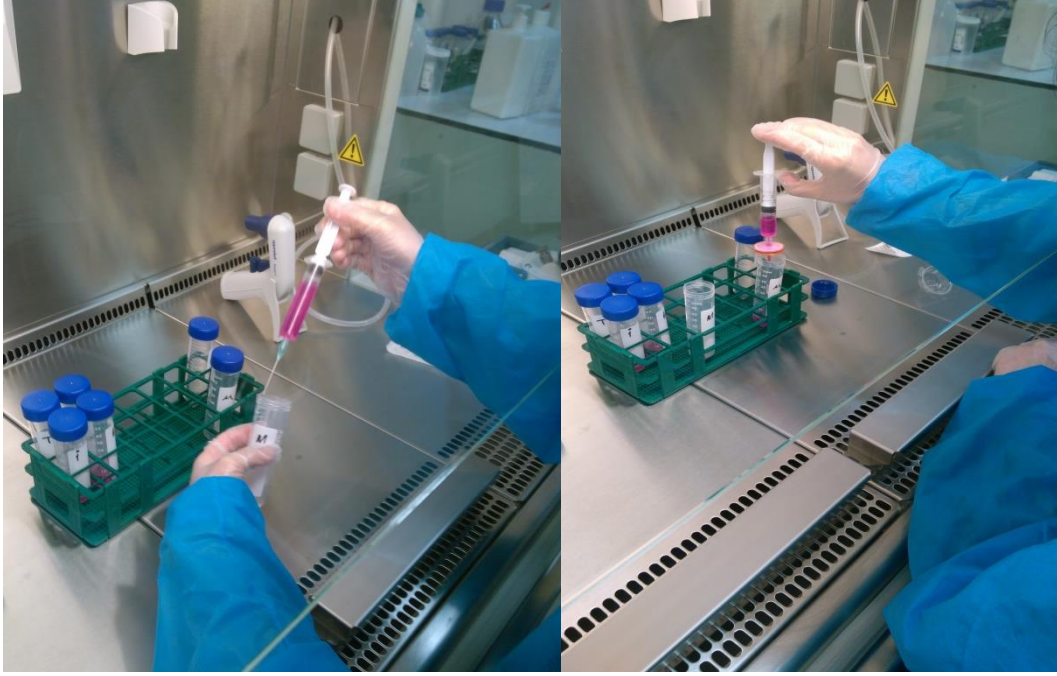
3.3. Kalsiyum Silikat Esaslı Test Örneklerinin MTT Testi ile Pulpa Fibroblastları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Materyal ekstraktlarını hazırlamak için her bir gruptan 15 adet disk hazırlandı. Hazırlanan test örnekleri falkon şişelerin içerisine her şişede 15 örnek olacak şekilde yerleştirildi. Şişelerdeki örneklerin üzerine yüzey/vasat oranı (0.5 - 6 cm²/ml) dikkate alınarak hücre kültür medyumunu (DMEM ve penicillin/streptomycin) (Biochrom Ag, Almanya) eklendi ve 37 °C’de 24 saat inkübatörde bekletildi. (Şekil 3.10)



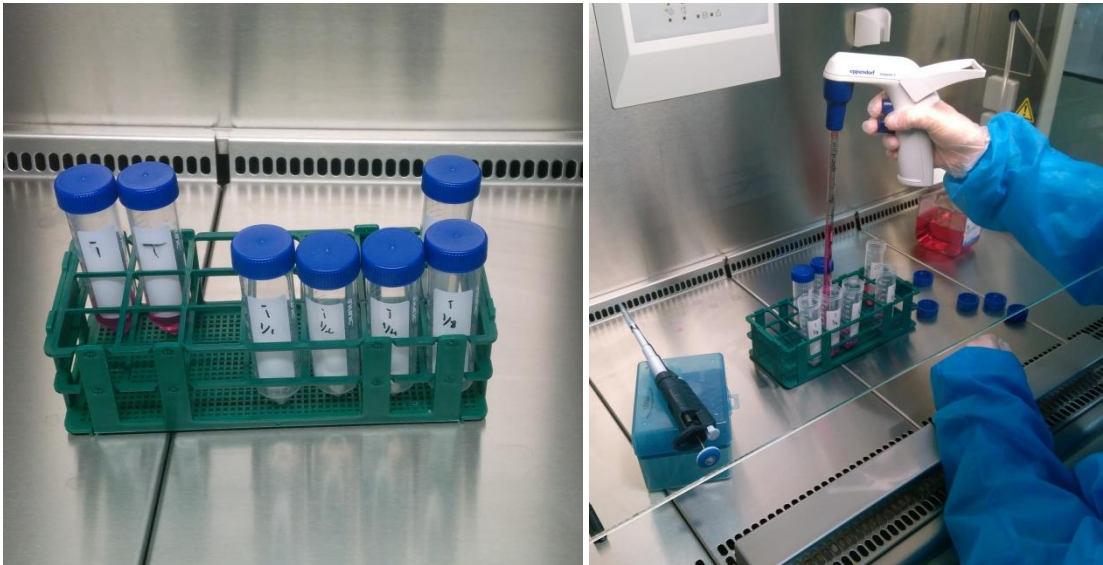
Şekil 3.10. Örneklerin konulduğu falkon şişeler

İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra materyallerin ekstratları 10 cc'lik bir enjektör yardımıyla falkon şişelerden alındı ve hücreler üzerinde kullanılmak üzere 0.22 µm'lik steril filtre ile filtrelendi. (Şekil 3.11)



Şekil 3. 11. Materyal ekstratlarının enjektör yardımıyla toplanması ve filtrelenmesi

Materyal ekstratları 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında seyreltilerek farklı dilüsyonlar hazırlandı. (Şekil 3.12)



Şekil 3. 12. Materyal ekstratlarının seyreltilmesi

Yirmi dört kuyucuklu hücre kültürü kaplarına her bir kuyucukta 0.5 ml (5000 hücre/ml) hücre olacak şekilde pulpa fibroblast hücreleri ekildi ve 37 °C’de, %5 CO₂ ve %95 hava olan ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler, materyallerin 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/8’lik konsantrasyonlarına 24, 48 ve 72 saat boyunca maruz bırakıldı. Kontrol grubundaki (%100 canlılık) hücrelerde yalnızca serum içeren besi ortamı kullanıldı. (Şekil 3.13)



Şekil 3. 13. Materyal ekstratlarının fibroblast hücrelerine uygulanması

Her bir test materyali için 8 kuyucuk kullanıldı. Materyallerden elde edilen ekstraktlara maruz bırakıldı. Ekstraktlara maruz kalan hücrelerin canlılığı hücre sayısı ve etkinliğini gösteren süksinik dehidrogenaz enzim aktivitesine göre değerlendirildi. 1 mg/ml MTT (Sigma, Türkiye) ile 60 dk inkübe edildikten sonra MTT solüsyonu döküldü ve hücrelerin üzerine 0.5 ml dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) konuldu. Renkteki değişim kolorometrik bir okuyucu olan spektrofotometre ile 550 nm’de okutuldu. (Şekil 3.14) Her test materyali için deneyler en az iki kez tekrar edildi. (n=16)



Şekil 3. 54. Kullanılan spektrofotometre

3.4. Kalsiyum Silikat Esaslı Materyallerin Pulpa Fibroblast Hücre Kültürü Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmamızda apoptoz tayini için MTT yöntemindeki en etkili doz-maruziyet süresi esas alındı. Kalsiyum silikat esaslı materyallerin hücre canlılığını baskıladığı en etkili doz (1:1) ve maruziyet süresi (24. saat); kontrol grubu ile kıyaslanarak bu materyallerin pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri incelendi.

Kalsiyum silikat esaslı test örnekleri daha önce MTT testinde belirtildiği gibi hazırlandı. Üretici firmanın önerileri dikkate alınarak steril materyal diskleri oluşturuldu. Hazırlanan test örnekleri falkon şişelerin içerisine yerleştirildi. Her şişedeki örneklerin üzerine hücre kültür medyumu (DMEM ve penicillin/streptomycin) eklendi ve 37 °C’de 24 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra materyallerin ekstratları 10 cc’lik enjektör yardımıyla falkon şişelerden alındı ve hücreler üzerinde kullanılmak üzere 0.22 µm’lik steril filtreden geçirildi. Kontrol grubu ve dört ayrı test materyali için pulpa fibroblast hücreleri kuyucuklara ekildi. Apoptoz tayini floresanın aktive ettiği hücre tarayıcı (‘fluorescence-activated cell sorter’, FACS) yöntemi kullanılarak Annexin V-PE ve 7AAD (Becton Dickinson, Türkiye) boyası ile akım sitometri cihazında (Becton Dikenson FACSorter) gerçekleştirildi. Hücre apoptozu Annexin V-PE ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı. (Şekil 3.15) Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V-PE ve 7AAD ile aynı anda boyandı. Örnekler Cell Quest programı kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3. 15. Akım Sitometri (BD FACS Calibur)

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 18.0 programı kullanılarak yapıldı. Grafikler, Microsoft Excel 2010 ile çizildi. Öncelikle, elde edilen verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarına Kolmogorov-Smirnov Testi ile bakıldı. Sonuca göre tek yönlü varyans analizi (One-way analysis of variance, ANOVA) ve post-hoc Tukey testi yapıldı. Her bir grubun kontrole, birbirlerine ve üç zaman dilimindeki gösterdikleri etkilerinin farkı dağılımlar esas alınarak gruplar arası karşılaştırmalar eşleştirilmemiş t- testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama&standart sapma olarak gösterildi. Her test grubu uygun kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı ve 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi ($p<0.05$).

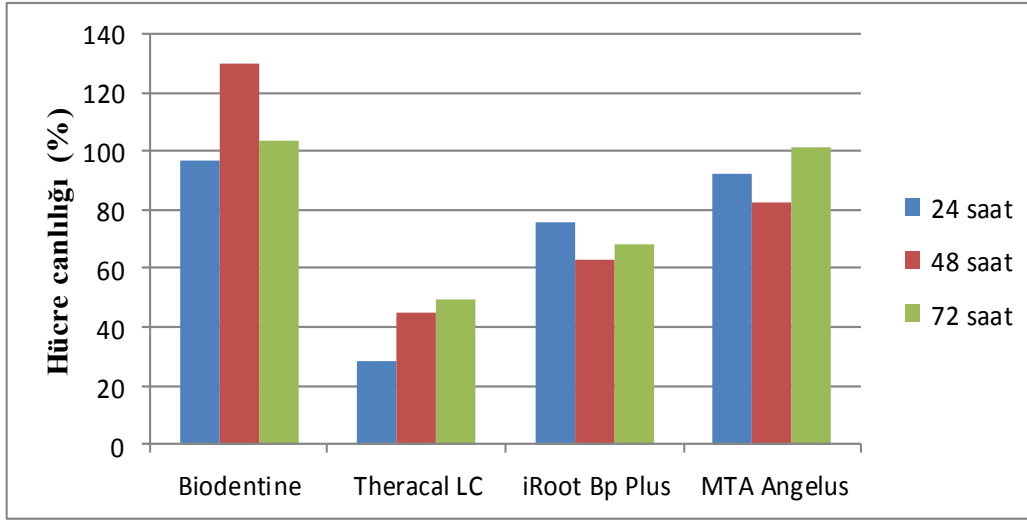
4. BULGULAR

Bu araştırmada kullanılan kalsiyum silikat esaslı dört farklı pulpa kuafaj materyali steril ortamda üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Materyaller, sertleşme reaksiyonlarının tamamlanmasının ardından bir gün boyunca medyumda ekstraksiyona maruz bırakıldı. Böylece elde edilen ekstratlar farklı oranlarda (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) seyreltilmiş ve pulpa fibroblastları ile farklı periyotlarda (24, 48, 72 saat) inkübe edildi. MTT yöntemi ile analiz yapıldı, yaşayabilen hücre yüzdeleri belirlendi. Pulpa fibroblast hücrelerinin canlılığı ile ekstraksiyon konsantrasyonları ve inkübasyon süresi arasındaki ilişki değerlendirildi. Kullanılan kuafaj materyalleri ile kültüre edilen pulpa fibroblast hücrelerinin, MTT testi sonucundaki hücre canlılık değerleri Tablo 4.1 'de verildi.

Tablo 4. 1. Örneklerin hücre canlılık yüzdelerine ait ortalamalar ve standart sapmalar

İnk.Süresi	Seyreltme Oranı	Biodentine™	Theracal LC	iRoot BP Plus	MTA Angelus
		Ort(S.Sp.)	Ort(S.Sp.)	Ort(S.Sp.)	Ort(S.Sp.)
24 saat	1:1 oranı	97,1(±3,2)	28,3(±5,3)	75,5(±4,9)	92,4(±20,8)
	1:2 oranı	97,5(±13,5)	40,1(±7,3)	86,1(±3,3)	57,0(±3,1)
	1:4 oranı	92,0(±11,1)	65,9(±2,3)	92,8(±4,6)	49,7(±4,0)
	1:8 oranı	94,8(±14,4)	83,2(±5,9)	97,1(±7,3)	53,5(±13,7)
48 saat	1:1 oranı	130,0(±7,6)	44,9(±6,1)	63,1(±6,4)	82,8(±2,0)
	1:2 oranı	128,6(±6,1)	61,8(±3,1)	75,1(±4,2)	75,2(±4,1)
	1:4 oranı	126,8(±5,9)	64,7(±5,2)	80,0(±10,5)	78,8(±4,9)
	1:8 oranı	132,3(±15,5)	79,3(±4,8)	89,9(±6,6)	94,8(±6,1)
72 saat	1:1 oranı	103,7(±2,7)	49,2(±11,0)	68,3(±12,9)	101,5(±35,3)
	1:2 oranı	90,4(±5,3)	74,7(±4,1)	55,8(±8,9)	93,3(±35,8)
	1:4 oranı	86,9(±7,8)	78,5(±3,6)	53,4(±6,6)	90,9(±32,6)
	1:8 oranı	75,3(±12,9)	85,0(±5,8)	54,2(±9,3)	91,8(±36,5)

Yapılan istatistiksel analizlere göre kalsiyum silikat esaslı materyallerin insan pulpa fibroblastı hücre hatlarında oluşturduğu sitotoksik etkiler arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4. 1. Seyreltilmemiş ekstratlara maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Yirmi dört saatlik inkübasyon süresinde kalsiyum silikat esaslı materyallerin hücre canlılıkları değerlendirildiğinde en yüksek canlılık değeri % 97,1 ile BiodentineTM de, en düşük canlılık değeri ise % 28,3 ile ışık ile polimerize olan Theracal LC ekstratlarında gözlemlendi. Yirmi dört saatlik inkübasyon süresi sonrasında kullanılan ekstratlarda, Theracal LC ekstratı diğer ekstratlara göre istatistiksel olarak daha sitotoksik etki gösterdi ($p<0,05$). BiodentineTM ve MTA Angelus ekstratları arasında ise hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu iki ekstrat iRoot BP Plus ve Theracal LC ekstratlarına göre anlamlı şekilde daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,05$). Özetle 24 saatlik değerlendirmede hücre canlılık değerleri yüksekten düşüğe doğru;

$$\text{Biodentine}^{\text{TM}} = \text{MTA Angelus} > \text{iRoot BP Plus} > \text{Theracal LC}$$

Kırk sekiz saatlik inkübasyon süresi sonrasında kullanılan ekstratlarda en yüksek canlılık değeri %130 ile BiodentineTM materyalinde gözlenirken en düşük canlılık değeri %44,9 ile ışık ile polimerize olan Theracal LC ekstratlarında gözlemlendi. Kırksekizinci saatte bütün gruplar arasında anlamlı bir farklılık görüldü. Theracal LC ekstratlarının diğer ekstratlara göre istatistiksel olarak daha sitotoksik etki gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). BiodentineTM ekstratlarında anlamlı olarak tüm gruplar içerisindeki en yüksek canlılık değeri gözlemlendi ($p<0,05$). MTA Angelus ekstratlarında, BiodentineTM ekstratlarına göre anlamlı şekilde daha az hücre canlılığı gözlenirken, iRoot BP Plus ve Theracal LC ekstratlarına göre anlamlı şekilde daha yüksek hücre canlılığı gözlemlendi.

($p<0,05$). Özetle 48 saatlik değerlendirmede hücre canlılık değerleri yüksekten düşüğe doğru;

$$\text{Biodentine}^{\text{TM}} > \text{MTA Angelus} > \text{iRoot BP Plus} > \text{Theracal LC}$$

Yetmiş iki saatlik inkübasyon süresi sonrasında kullanılan ekstratlarda, en yüksek canlılık değeri %103,7 ile BiodentineTM, en düşük canlılık değeri %49,2 ile Theracal LC ekstratlarına aittir. Theracal LC ile birlikte iRoot BP Plus ekstratları diğer ekstratlara göre istatistiksel olarak daha sitotoksik etki gösterdi ($p<0,05$). BiodentineTM ve MTA Angelus ekstratları ise iRoot BP Plus ve Theracal LC ekstratlarına göre anlamlı şekilde daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,05$). Özetle 72 saatlik değerlendirmede hücre canlılık değerleri yüksekten düşüğe doğru;

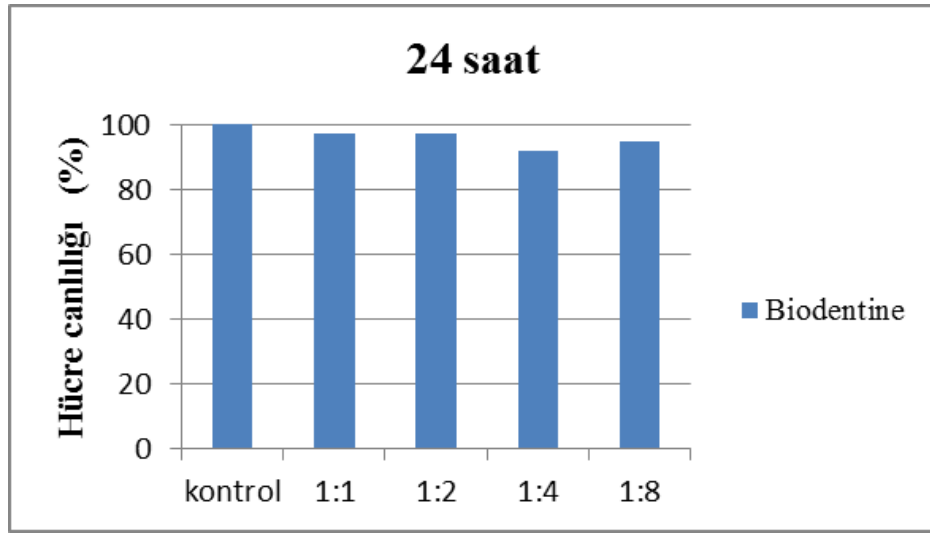
$$\text{Biodentine}^{\text{TM}} = \text{MTA Angelus} > \text{iRoot BP Plus} = \text{Theracal LC}$$

Theracal LC'in 24 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiği hücre canlılığı, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiğinden anlamlı olarak daha azdır. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası gösterdiği hücre canlılığı tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$) ve 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrası gösterdiği hücre canlılığı birbirleri ile istatistiksel olarak anlamlı değildir. BiodentineTM'in 48 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiği hücre canlılığı, 24 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrasında gösterdiğinden anlamlı olarak daha yüksektir. Ayrıca BiodentineTM'nin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiği hücre canlılığı anlamlı olarak tüm gruplardan daha yüksektir ($p<0,05$) ve 72 saatlik inkübasyonunda görülen hücre canlılığı 24 saatlik inkübasyonundan anlamlı olarak daha yüksektir. iRoot BP Plus'ın 24 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiği hücre canlılığı, 48 saatlik inkübasyonu sonrasında gösterdiğinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$). Kırk sekiz ve yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrasında görülen hücre canlılıkları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı şekilde 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında da anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). MTA Angelus ekstratlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında hücre canlılığı açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Deney Gruplarının Kendi İçinde Ekstraksiyon Konsantrasyonlarının Pulpa Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

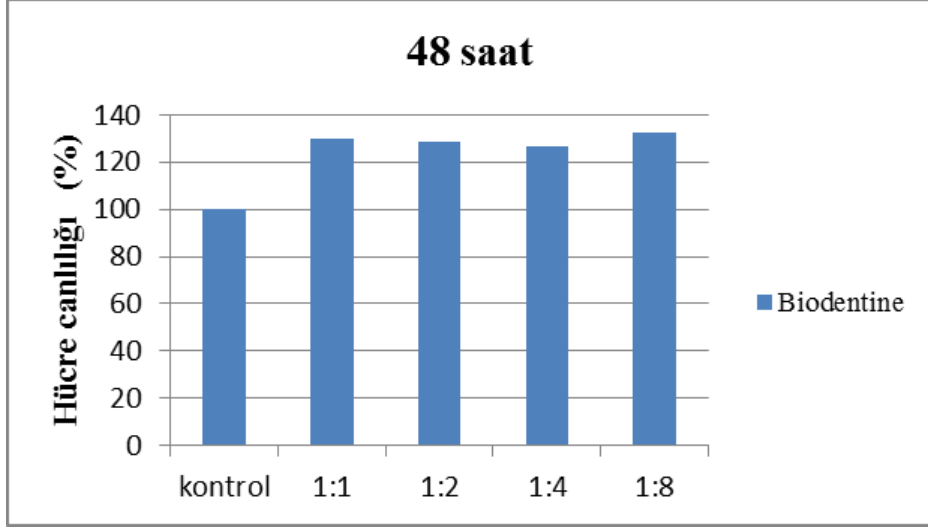
Biodentine™ Materyalinin Değerlendirilmesi

Yirmi dört saatlik inkübasyona maruz bırakılan Biodentine™ grubunda ekstratların farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü ($p>0,05$). (Şekil 4.2)



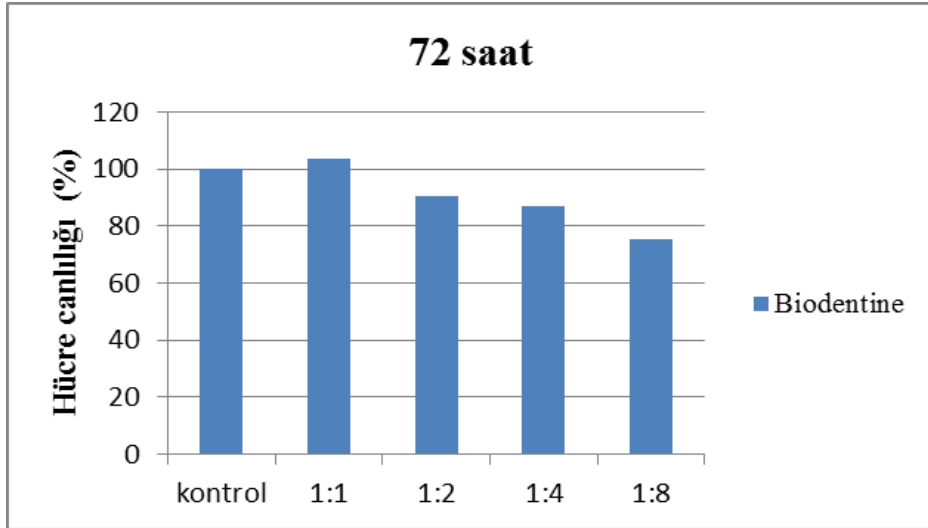
Şekil 4. 2. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Kırk sekiz saatlik inkübasyona maruz bırakılan Biodentine™ grubunda ekstratların bütün konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ve 1:2, 1:4 ve 1:8 konsantrasyondaki grupların 1:1 konsantrasyondaki gruba göre anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p<0,05$). (Şekil 4.3)



Şekil 4. 3. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

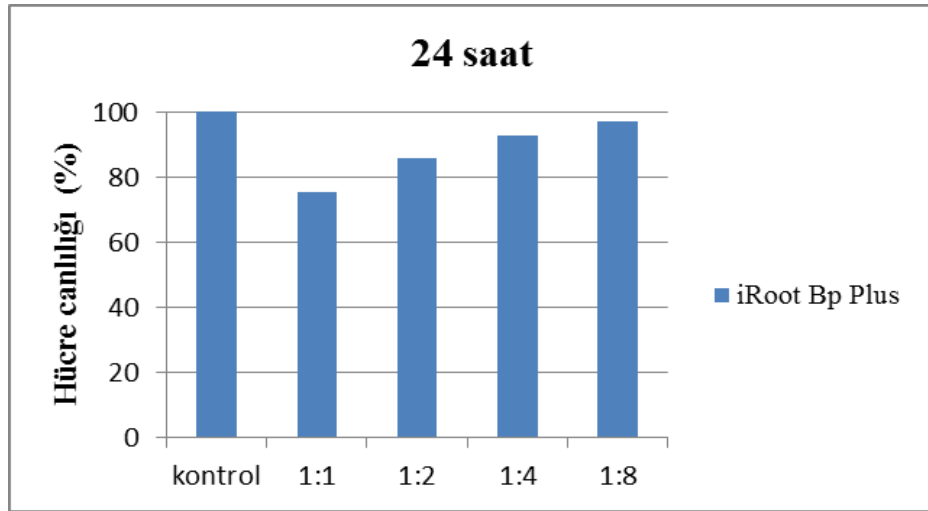
Yetmiş iki saatlik inkübasyona maruz bırakılan Biodentine™ grubunda ekstratlarının 1:4 ve 1:8 konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdiği ve 1:2, 1:4 ve 1:8 konsantrasyonlardaki ekstratların 1:1 konsantrasyondaki ekstratlara göre anlamlı azalma gösterdiği saptandı ($p < 0,05$). (Şekil 4.4)



Şekil 4. 4. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Biodentine™ ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

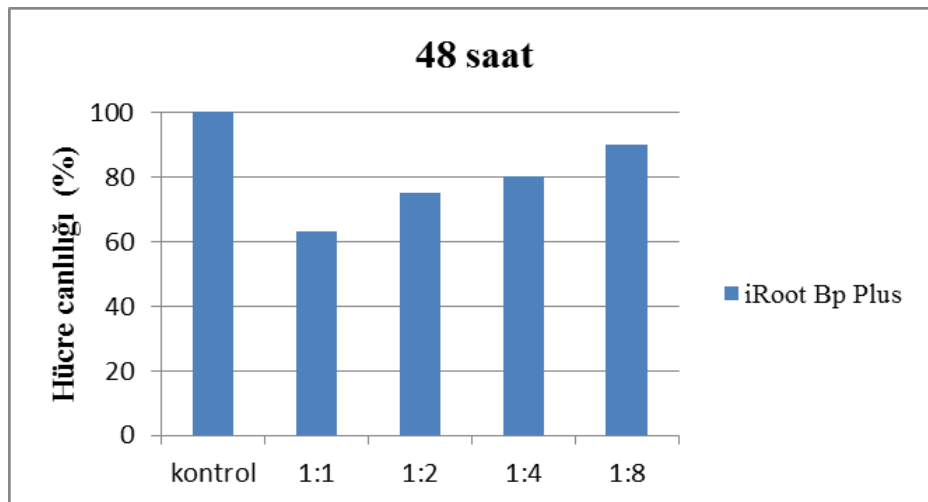
iRoot BP Plus Materyalinin Değerlendirilmesi

Yirmi dört saatlik inkübasyona maruz bırakılan iRoot Bp Plus grubunda ekstratların 1:1, 1:2 ve 1:4 konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdiği ($p<0,05$), 1:8 konsantrasyondaki grubun ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermediği tespit edildi ($p>0,05$). (Şekil 4.5)



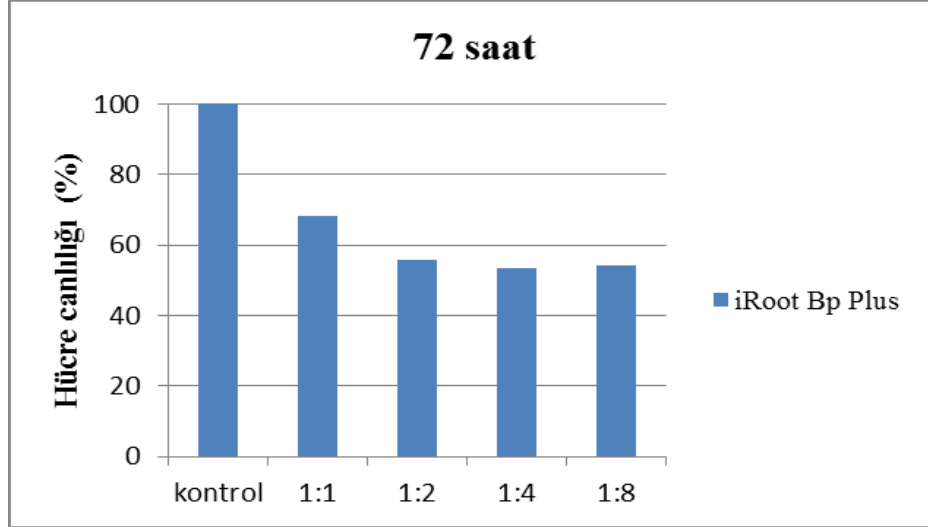
Şekil 4. 5. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Kırk sekiz saatlik inkübasyona maruz bırakılan iRoot BP Plus grubunda ekstratların bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 4.6)



Şekil 4. 6. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

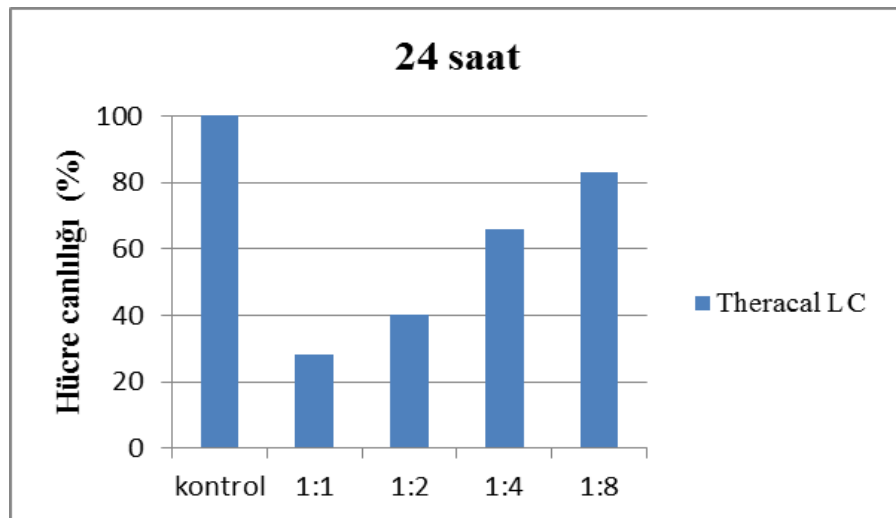
Yetmiş iki saatlik inkübasyona maruz bırakılan iRoot BP Plus grubunda ekstratlarının bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 4.7)



Şekil 4. 7. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki iRoot BP Plus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

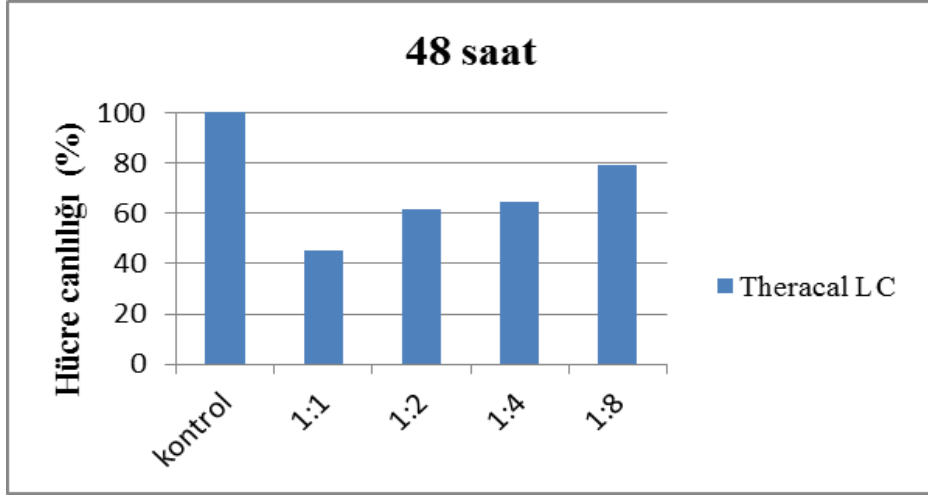
Theracal LC Materyalinin Değerlendirilmesi

Yirmi dört saatlik inkübasyona maruz bırakılan Theracal LC grubunda ekstratların bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). Theracal LC ekstratlarının seyreltme oranı artırıldıkça sitotoksik etki de anlamlı derecede azalma gösterdi. (Şekil 4.8)



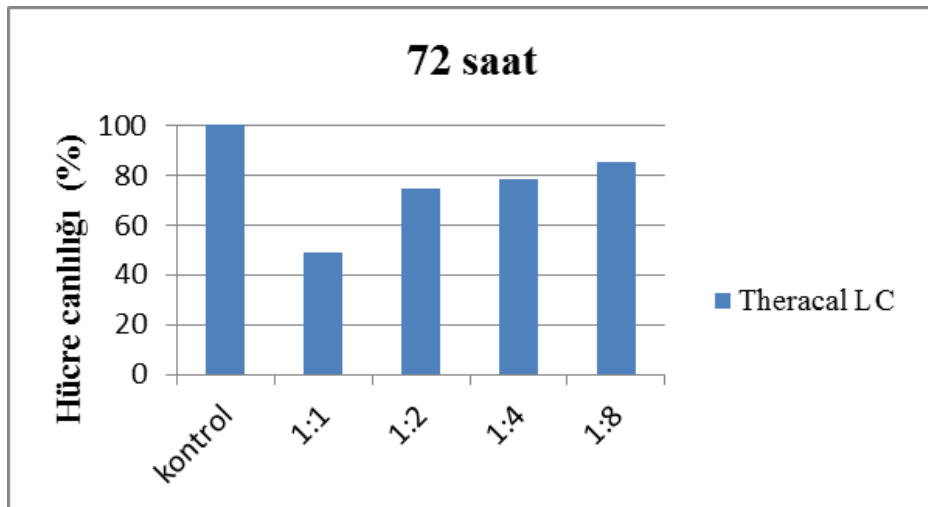
Şekil 4. 8. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Kırk sekiz saatlik inkübasyona maruz bırakılan Theracal LC grubunda ekstratların bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p<0,05$). Theracal LC ekstratlarının seyreltme oranı artırıldıkça olduğu sitotoksik etki de anlamlı derecede azalma gösterdi. (Şekil 4.9)



Şekil 4. 9. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

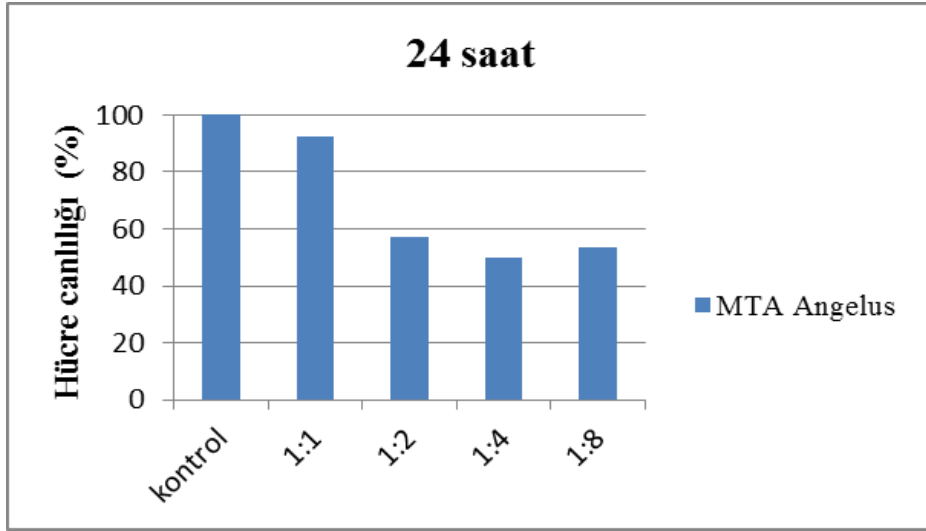
Yetmiş iki saatlik inkübasyona maruz bırakılan Theracal LC grubunda ekstratların bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). Theracal LC ekstratlarının seyreltme oranı artırıldıkça sitotoksik etki de anlamlı derecede azalma gösterdi. (Şekil 4.10)



Şekil 4. 10. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki Theracal LC ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

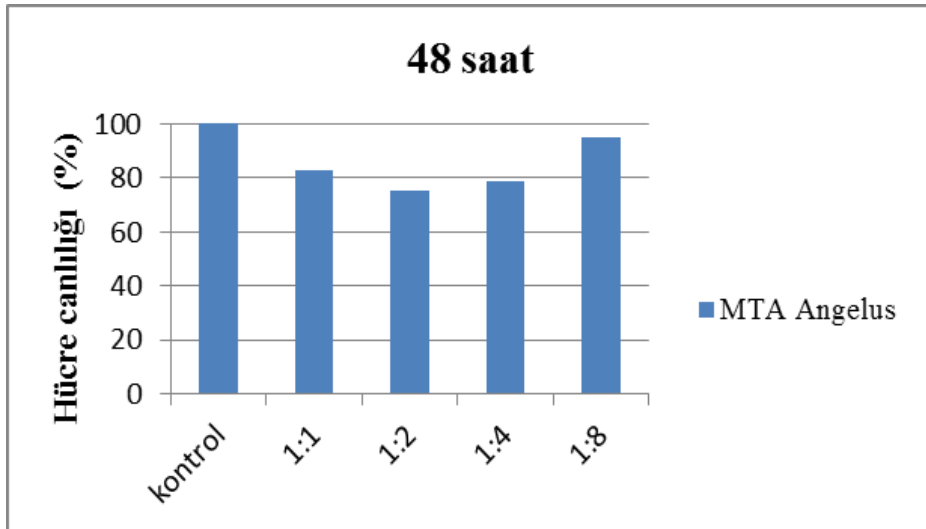
MTA Angelus Materyalinin Değerlendirilmesi

Yirmi dört saatlik inkübasyona maruz bırakılan MTA Angelus grubunda ekstratların 1:2, 1:4 ve 1:8’lik konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 4.11)



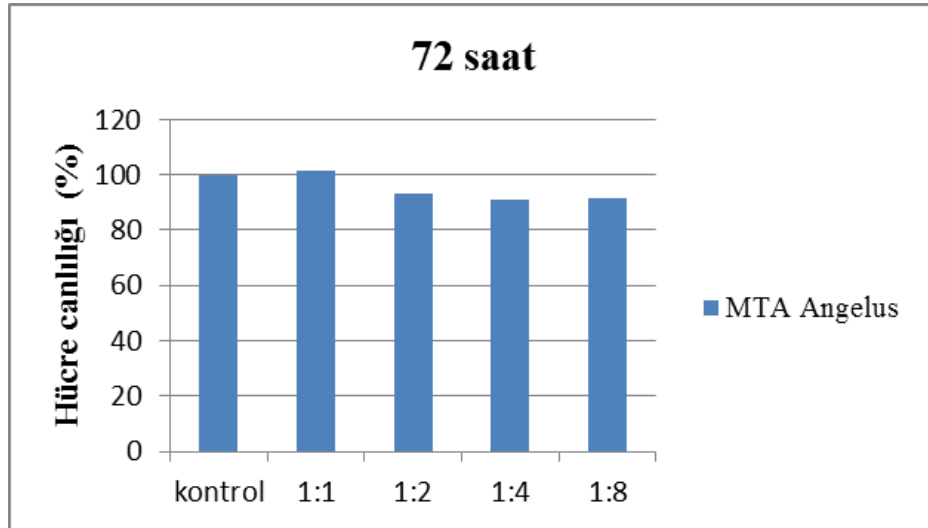
Şekil 4. 11. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Kırk sekiz saatlik inkübasyona maruz bırakılan MTA Angelus grubunda ekstratların 1:1, 1:2 ve 1:4’lik konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermekte ($p<0,05$) iken 1:8’lik konsantrasyonu anlamlı bir fark göstermedi ($p>0,05$). (Şekil 4.12)



Şekil 4. 12. Kırk sekiz saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Yetmiş iki saatlik inkübasyona maruz bırakılan MTA Angelus grubunda ekstratların bütün konsantrasyonları kontrol grubuna ve birbirlerine göre hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). (Şekil 4.13)



Şekil 4.13. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrası farklı oranlardaki MTA Angelus ekstratlarına maruz kalan pulpa fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Kalsiyum Silikat Esaslı Materyallerin Pulpa Fibroblast Hücre Kültürü Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

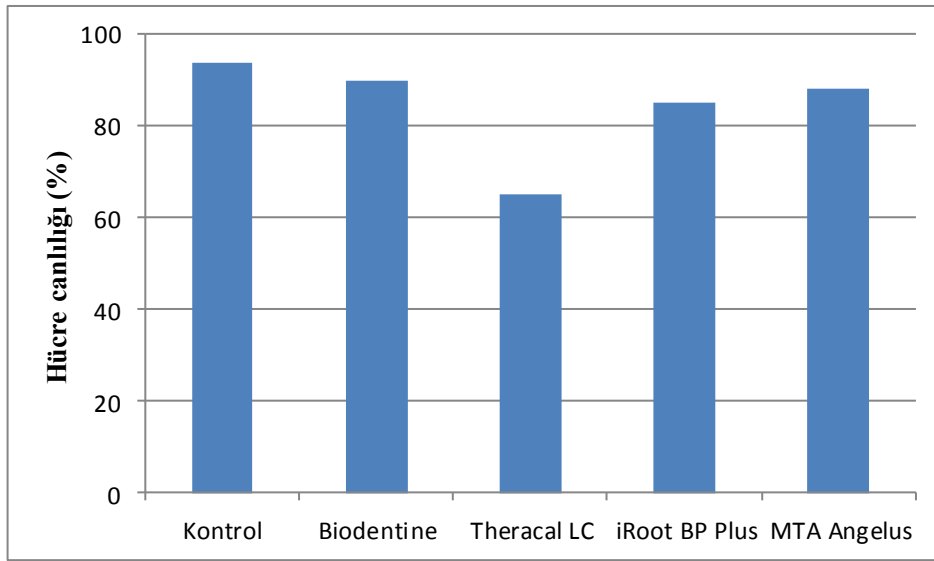
Kullanılan kuafaj materyalleri ile kültüre edilen pulpa fibroblast hücrelerinin, flow sitometri testi sonucundaki hücre canlılık değerleri Tablo 4. 2’de verildi.

Tablo 4. 2. Kalsiyum silikat esaslı ekstratların pulpa fibroblast hücrelerine apoptotik etkisi (% hücre; ortalama±standart sapma)

	Kontrol	Biodentine™	iRoot BP Plus	TheraCal LC	MTA Angelus
Canlı	94.45±0.4	90.48±0.4	83.71±1.2	69.25±1.9	85.57±1.4
Erken Apoptotik	0.83±0.7	2.11±0.5	3.79±0.2	8.70±0.1	3.54±0.3
Geç Apoptotik	4.38±0.4	6.62±0.0.5	6.72±0.4	15.48±1.4	6.76±0.6
Nekrotik	0.34±0.02	0.79±0.0.1	5.78±0.7	6.57±0.8	4.13±0.6

Yapılan istatistiksel analizlere göre kalsiyum silikat esaslı materyallerin insan pulpa fibroblastı hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiler arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Yirmi dört saatlik maruziyet süresi sonrasında kalsiyum silikat esaslı materyallerin sitotoksik etkileri flow sitometri yöntemi ile değerlendirildiğinde en yüksek hücre canlılığı % 90,48 ile Biodentine™ de, en düşük hücre canlılığı ise % 69,25 ile Theracal LC ekstratlarında gözlemlendi. Yirmi dört saatlik maruziyet süresi sonrasında kullanılan ekstratlarda, Theracal LC ekstratı diğer ekstratlara göre istatistiksel olarak daha yüksek sitotoksik etki gösterdi ($p<0,05$). Biodentine™, iRoot BP Plus ve MTA Angelus ekstratları arasında hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu üç materyalin ekstratları Theracal LC ekstratlarına göre anlamlı derecede daha yüksek hücre canlılığı gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 4.14)



Şekil 4. 14. Deney gruplarının ve hücre kontrol grubunun canlı hücrelerinin yüzdesini gösteren grafik

5. TARTIŞMA

Vital endodontik tedavilerde kullanılan materyallerde biyouyumluluk, en başta aranan özelliklerdendir. Pulpa kuafajı işlemlerinde kullanılan materyalin çevredeki vital pulpa dokusu ile uzun süre temasta olmasından dolayı materyalin biyouyumluluğu oldukça önem taşımaktadır. Dental pulpanın canlılığı dişin fonksiyonel işlevinin temelini oluşturmakta ve biyouyumlu materyaller yaralanma sonrası ekspozite olan dental pulpanın tamirinde ve yaralanmış ya da hasar görmüş dişlerin rejenerasyonunun sağlanmasında önemli rol oynamaktadır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok geleneksel pulpa kuafajı tamir materyalleri incelenmiştir. Ancak son yıllarda kalsiyum silikat esaslı materyallerin kullanımı popülerlik kazanmıştır ve bu materyaller hakkındaki çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle MTA materyali son yıllarda diş hekimliğinin birçok alanında ön plana çıkmıştır. Fakat bu materyalin uzun sertleşme süresi ve manipülasyon zorluğu nedeniyle vital endodontik tedavilerde çeşitli sorunlar meydana gelmektedir. Bu nedenle hızlı sertleşen kalsiyum silikat esaslı materyallerin klinik önemi daha da artmış ve bu tedavilerde kullanılmak üzere çeşitli materyaller üretilmiştir. Son zamanlarda yeni bir ürün olarak piyasada bulunan Theracal LC materyali hakkında literatürde yayınlanmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Aynı zamanda orijinal MTA'ya göre sertleşme süresini oldukça azalttığı düşünülen MTA Angelus ve yine kalsiyum silikat esaslı iRoot BP Plus materyallerinin biyouyumluluğu ile ilgili de literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda; Theracal LC, iRoot BP Plus ve MTA Angelus materyalleri ile başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilen BiodentineTM'nin biyouyumluluğunun in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Endodontik tedavilerde kullanılan materyallerin hücresel yanıtlarını ve biyouyumluluklarını değerlendirmek amacıyla in vitro test yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (117-119). İn vitro test yöntemleri araştırmacılar tarafından eleştirilse de birçok avantajları vardır. Bu yöntemin kontrollü deneysel koşullarda yürütülebilmesi, canlı deney modellerini etkileyecek değişkenleri içermemesi, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanıyabilmesi ve tekrarlanabilmesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (103, 120). İn vivo testler, konak ve incelenen materyaller arasındaki kompleks etkileşimlerin belirlenmesine olanak tanımaktadır. İn vivo yapılan deneylerde sıklıkla deneysel değişkenler problem oluşturmaktadır. Fakat in vitro

testlerde bu değişkenler kontrol altına alınabilmektedir. Bu çalışmada, dört farklı kalsiyum silikat esaslı materyalin sitotoksik etkileri, in vitro koşullarda hücre kültürü test yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Klinik koşulları taklit eden deney sistemleri hazırlanarak in vitro testlerin özelliğinden kaynaklanan problemler çözülebilmektedir. Bu problemlerin çözümü sırasında deney düzeneği, klinik kullanımına benzer şekilde hazırlanmalıdır. İn vitro sitotoksisite testleri planlanırken, test edilecek materyallerin pratikteki kullanımının (direkt ve indirekt temas) taklit edilmesi amaçlanmalıdır. İndirekt temasın sağlanması hücreler ve materyaller arasında dentin bariyer, agar overlay veya milipor filtre gibi sert bir katman kullanımı önerilmektedir (121). Direkt temas yönteminde ise materyallerin doğrudan hücre üzerine yerleştirilmesi yapılmakta veya materyallerden elde edilen ekstratlar kullanılmaktadır (121, 122). Bu tez çalışmasında ekstraksiyon metodu kullanılarak materyallerin pratikteki kullanımının taklit edilmesi amaçlanmıştır.

Kullanılan dental materyallerin, insan sağlığı üzerinde zararlı bir etkisinin olmaması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız materyaller ayrıca pulpa kuafajının yanısıra retrograd dolgusu, kök kanal dolgusu veya perforasyon tamir dolgusu olarak da kullanılabilmektedir. Materyal bileşenleri kan veya doku sıvısı yoluyla yayılabilmekte, vücutta toksik etki gösterebilmektedir (123). Kalsiyum silikat esaslı pulpa kuafaj materyallerinin pulpaya direkt temasına ek olarak bu materyallerden salınan bileşenlerin de pulpaya zararlı etkileri olmaktadır (124). Çalışmamızda kullandığımız kalsiyum silikat esaslı test materyallerinin hidrofilik yapıda olması ve iyonik bileşenlerini serbestleştirme eğiliminde bulunmasından dolayı ekstraksiyon temas testi kullanılmıştır.

Saw ve arkadaşları (125) alışmalarında kompozit materyallerin sitotoksik etkilerini L-929 hücre kltrleri üzerinde üç farklı temas yöntemi kullanarak incelemişlerdir. MTT testi ile elde edilen sonuçlara göre hassasiyet derecelerinin sırasıyla ekstraksiyon temas testi, direk temas testi, indirek temas testi olacak şekilde sıralandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte test materyallerinin doğrudan hücreler üzerine yerleştirilmesi klinik kullanımı tam olarak yansıtmadığı belirtilmiştir. Çünkü doku sıvıları ve vücut savunma sistemi, hücrelerin maruz kaldığı yaralanma şiddetini hafifletebilmektedir (126). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda ekstraksiyon temas testi kullanılarak klinik sonucun daha güvenilir ve gerçekçi olması amaçlanmıştır.

Primer hücre kültürünün elde edilmesinin oldukça zor olması ve hücrelerin üretilmesinin yüksek hassasiyet gerektirmesi gibi bazı dezavantajları olmasına rağmen devamlı hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında daha spesifik metabolik cevap verdiği görülmektedir (127). Primer hücre kültürleri orijinal fizyolojik yapıyı taklit eden ve kromozal anomalilerin görülmesine izin vermeyen özellikleriyle yapılan araştırmalarda daha çok tercih edilmektedir (115). Bu hücrelerin genetik yapısı in vivo ortamı daha iyi temsil etmektedir. Çalışmalarda daha güvenilir ve gerçekçi bilgiler elde edilmesi ideal bir çalışma için önem arz etmektedir. Çalışmamızda, in vivo ortamı daha benzer olması nedeniyle primer hücre kültürlerinin kullanımı tercih edilmiştir (128).

Pulpa kuafaj tamir materyalleri pulpa dokusu ile doğrudan temas halinde olmasından dolayı çalışmalarda da benzer ortam oluşturulmalıdır. Pulpayı oluşturan yapıda en çok fibroblast hücrelerinin bulunması sebebiyle araştırmalarda sıklıkla pulpa fibroblast hücreleri kullanılmaktadır (116). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, biyouyumluluğun belirlenmesinde insan hücre hatlarının hayvan hücre hatlarına göre daha hassas olduğu belirtilmiştir (128). Bu amaçla çalışmamızda insan pulpa fibroblast hatları kullanılmıştır.

Hücre canlılığını ölçmek için triptan mavisi testi, MTS (Metiltiazol sülfenil deneyi) testi ve MTT testi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Triptan mavisi testi sadece canlı veya ölü hücreleri ayırt edebilen bir yöntemdir (129). MTS yönteminin avantajı formazan kristallerinin doku hücre kültürü ortamı içinde çözülebilmesidir. Bu nedenle MTS yönteminde çözme prosedürü ortadan kalkmıştır (130). MTT, suda çözülebilir sarı renkli tetrazolyum tuzunu koyu mavi formazan kristaller haline dönüştürmektedir. Canlı-ölü hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim metabolizması ile ayırt edilmesini sağlayan kolorimetrik bir testtir. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. MTT, renk yoğunluğu değişimi ile düşük toksisite değerlerinin incelenebilmesine imkan vermesi sebebiyle oldukça güvenilir bir test metodudur. Birçok araştırmacı tarafından da kullanılan bu test yöntemi ile elde ettiğimiz bulguların karşılaştırılabilmesi mümkündür. Çalışmamızda hücre canlılığının ölçüm kolaylığı ve kullanım hassasiyeti nedeniyle MTT testi tercih edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında materyallerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde farklı ekstraksiyon süreleri önemlidir (131). ISO 10993-5 numaralı “Sitotoksikite testleri-in vitro yöntemler” bölümünde inkübasyon için en az 37°C’ de 24 saatlik süre önerilmektedir. Ayrıca hücresel adezyonun daha iyi olması için inkübasyon süresinin uzatılmasının avantaj sağlayabileceğini bildiren çalışmalar

bulunmaktadır (132, 133). Camilleri ve arkadaşları (134) çalışmalarında beyaz ve gri MTA'nın 1 günlük inkübasyon süresi sonunda biyouyumluğun yüksek olduğunu, 28 günlük inkübasyon süresi sonunda ise biyouyumluluk değerlerinde düşüş görüldüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızda materyallerin pulpa fibroblast hücreleriyle olan inkübasyon süresi 24, 48 ve 72 saat olarak seçilmiştir.

Yan ve arkadaşları (135) primer hücre kültürü üzerinde yaptıkları çalışmada Bioaggregate ve MTA materyallerinin sitotoksik etkilerini MTT yöntemiyle 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlarda farklı zaman periyotlarında Bioaggregate, MTA ve kontrol grupları arasında sitotoksik etki açısından anlamlı farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Karimjee ve arkadaşları (136) perforasyon tamirinde kullanılan MTA/su, MTA/KY Jelly, Fuji II LC ve amalgam materyallerinin sitotoksik etkilerini 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda incelemişlerdir. Sonuç olarak 24. ve 48. saatteki örnekler hücre canlılığı bakımından benzer sonuçlar gösterdiğini, 72. saatteki sonuçlarda ise diğer periyotlara göre istatistiksel olarak daha düşük hücre canlılığı gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda her bir test materyallerinden hazırlanan örnekler 24, 48 ve 72 saat süre ile bekletilerek hücre canlılık testinde kullanılmıştır.

Çalışmamızdaki test materyallerine ait kontrol grubu örneklerinin hücre canlılık ortalaması %100 olarak belirlenmiştir ve diğer örneklerin canlılık oranları yüzdelik değer olarak hesaplanmıştır. Mosmann (137) çalışmasında uygulama sonrası hücre canlılığını dört sınıfta incelemiştir. %90 ve üzeri hücre canlılığını non-sitotoksik , %60-%90 hücre canlılığını hafif , %30- %59 arasını orta ve %30 ve daha aşağısını ise şiddetli düzeyde sitotoksik olarak kabul etmiştir. Bu sınıflamaya göre çalışmamızın sonuçlarının 24 saatlik değerlendirmesinde Biodentine™ (%97,1) ve MTA Angelus (%92,4) materyallerinin sitotoksik etki göstermediği, iRoot BP Plus (%75,5)' in hafif sitotoksik etki gösterdiği, Theracal LC (%28,3)'ın ise şiddetli düzeyde sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. 48. saat sonraki değerlendirmelere göre Biodentine™ (%130,7) yine sitotoksik etki göstermezken MTA Angelus (%82,8) ve iRoot BP Plus (%63,1) hafif, Theracal LC (%44,9) orta derecede sitotoksik etki göstermiştir. 72. Saat sonraki değerlendirmede ise Biodentine™ (%103,7) ile MTA Angelus (%101,5) sitotoksik etki göstermezken iRoot BP Plus (%68,3) hafif, Theracal LC (%49,2) orta derecede sitotoksik etki göstermiştir.

Kalsiyum silikat esaslı materyallerinin MTT testi ile sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada TheraCal LC örneklerinin bulunduğu kültür ortamında canlı hücre sayısında önemli bir azalma gözlenmiş ve diğer materyallere göre TheraCal LC materyalinin sitotoksik etkisi daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun TheraCal LC materyalinden salınan reaksiyona girmemiş bileşiklerden veya rezin içeriği yapısından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, Camilleri ve arkadaşlarının (138) pulpa kuafaj materyallerinin kalsiyum hidroksit salınımı üzerine yaptıkları bir çalışmada; kalsiyum hidroksit salınımı ile pulpa doku rejenerasyonu arasında doğru orantılı bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir. Theracal LC’de hidrasyonun tamamlanmasına bağlı olarak materyalde yeterli kalsiyum hidroksitin üretilmediği ve bu sebeple materyalde daha düşük bir kalsiyum hidroksit salınımı gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak Theracal LC materyalindeki sitotoksik etkinin; içeriğinde bulunan toplam portland siman oranının düşük olmasından ve kalsiyum silikat tozlarının yeterli düzeyde ıslanamamasından dolayı kaynaklandığını düşünmekteyiz. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, materyalin içeriğinde bulunan toplam portland siman/rezin oranının değiştirilerek yapılacak sitotoksikite çalışmaları ile Theracal LC’nin sitotoksik etki mekanizmasının daha iyi anlaşılabilceği düşünülmektedir.

Poggio ve arkadaşları (139) hücre canlılığını MTT test yöntemiyle değerlendirdikleri çalışmalarında farklı kuafaj materyallerinin (Dycal (Dentsply), Calcicur (Voco), Calcimol LC (Voco), Theracal LC (Bisco), MTA Angelus (Angelus), ve Biodentine™ (Septodont)) MDPC-23 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda incelemişlerdir. Yirmi dört saatlik değerlendirme sonuçlarına göre en yüksek hücre canlılığı Biodentine™ ve MTA Angelus materyallerinde, en düşük Dycal materyalinde tespit edilmiştir. Kırk sekiz saatlik değerlendirme sonuçlarına göre en yüksek hücre canlılığı Biodentine™ ve MTA Angelus materyallerinde, en düşük Dycal ve Theracal LC materyallerinde tespit edilmiştir. 72 saatlik değerlendirme sonuçlarına göre en yüksek hücre canlılığı Biodentine™ materyalinde, en düşük hücre canlılığı ise Theracal LC, Dycal, Calcimol LC materyallerinde izlenmiştir. Schmalz yaptığı bir çalışmada primer hücre kültürlerinin devamlı hücre kültürlerine göre biraz daha hassas olduğunu, ancak kültürlerin benzer bulgular verdiğini belirtmiştir (103). Çalışmamızda da 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmelerde Theracal LC, Biodentine™ ve MTA Angelus materyalleri hücre canlılığı açısından benzer sonuçlar vermiştir.

Biodentine™ pulpa kuafaj materyali, yüksek sıkıştırma kuvvetine ve kısa sertleşme süresine sahip olan kalsiyum silikat bazlı bir malzemedir. Dentin için uygun bir replasman materyali olarak önerilmektedir. Shayegan ve arkadaşları (71) domuzlardaki primer dentisyonda Biodentine™'nin meydana getirdiği pulpal yanıtı hem kuafajda hem de pulpotomide 7, 28 ve 90'nıncı günlerde değerlendirmişlerdir. Elde edilen veriler doğrultusunda Biodentine™'nin bioaktif özelliği olduğu, sert doku oluşumunu desteklediği ve pulpada şiddetli ya da orta şiddetli yanıt oluşturmadağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca materyalin, yüzeyde oluşturduğu hidroksiapatit kristalleri sayesinde yapışma kabiliyetini artırarak, sızdırmaz bir kenar uyumu/ bütünlüğü gösterdiğini de bildirmişlerdir. Zhou ve arkadaşlarının (79) çalışmasında, Biodentine™, beyaz MTA (ProRoot) ve cam iyonomer simanı insan fibroblastları üzerinde karşılaştırılmış ve 1. ve 7. günde, Biodentine™ ve ProRoot'un cam iyonomer simana kıyasla daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Zhou ve arkadaşları Biodentine™'nin gingival fibroblast hücreleri üzerine yaptıkları çalışmalarında hücre canlılığı açısından MTA ile benzer sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarının sonuçları Biodentine™ ile ilgili verilerimizi desteklemektedir. Çalışmamızda herhangi bir zaman diliminde Biodentine™ sitotoksik etki göstermemiştir.

Khedmat ve arkadaşları (140) kalsiyum silikat esaslı materyallerin sitotoksitelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında CEM siman ve Tech Biosealer ile karşılaştırıldığında Biodentine™'nin ve ProRoot MTA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucu ortaya çıkan değerlerin sitotoksik etki açısından önemli ölçüde daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda da Biodentine™'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu ortaya çıkan değerlerin sitotoksik etki açısından anlamlı olarak diğer simanlara göre azaldığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz veriler bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Ortaya çıkan farkın, kullanılan simanların kimyasal bileşimlerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Biodentine™ ve MTA'nın biyouyumluluğunu ve genlerin aktarımını kıyaslayan diğer bir çalışma ise Perard ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (141). Üç boyutlu çok hücreli, küremsi kültürlerin günümüzde in vitro modeller arasında insan doku ortamını en gerçekçi olarak taklit eden model olduğu görüşünden yola çıkılarak biyouyumluluk çalışmalarını bu tip modeller üzerinde yapmışlardır. Biodentine™ ve MTA'nın pulpa hücrelerinde proliferasyonu etkilediğini belirtmişlerdir. Her iki materyalin benzer olduğunu gözlemleyerek, bu materyallerin direkt pulpa kuafaj materyali olarak

kullanılabileceğini önermişlerdir (141). Poggio ve arkadaşları farklı kuafaj materyallerinin MDPC-23 hücreleri üzerindeki etkinliğini 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda incelemişlerdir. Araştırmada Biodentine™, bütün periyotlarda kontrol grubuna göre daha fazla hücre canlılığı göstermiştir. Çalışmamızda ise Biodentine™ 48. ve 72. saatte kontrol grubuna göre daha fazla hücre canlılığı göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları Perard ile arkadaşlarının ve Poggio ile arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Meydana gelen hücre canlılığındaki artışın, üretici firmanın belirttiği gibi yapısında saf olmayan elementlerin bulunmadığı Biodentine kompozisyonundan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Luo ve arkadaşları Biodentine™'nin değişik konsantrasyonlardaki etkilerini çekilmiş gömülü yirmi yaş dişlerinden elde ettikleri pulpa kök hücreleri üzerinde; proliferatif, migratif ve adeziv etkiler yönünden değerlendirmişlerdir (142). Sonuçlar 0,2 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarındaki kök hücrelerinde artmış proliferasyon gösterirken, hücresel aktivitenin, 20 mg/mL gibi yüksek konsantrasyonlardaki kök hücrelerinde belirgin düşüş gösterdiği yönündedir. Biodentine™'nin, pulpa hücreleri üzerine konulduğu zaman, iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği, proliferasyonu, migrasyonu ve adezyonu arttırdığı görülmüştür. Bu durum materyalin biyoaktivite ve biyouyumluluk özelliklerini doğrulamaktadır (142).

Nano boyutlu biyomateryaller doku tamirinde rol oynamakta ve kendilerine özgü nano yapıları ile biyolojik fonksiyonlarına bağlı olarak rejenerasyon sağlayabilmektedir. Son zamanlarda kolay taşıma özelliğine sahip hazır kullanımlı, nanopartiküllü, bioseramik iRoot BP Plus materyali pulpa kuafajı ve dental cerrahi uygulamaları için geliştirilmiştir.

Shi ve arkadaşları (143) iRoot BP Plus ve MTA materyallerinin sitotoksik etkilerini insan gingival fibroblastları üzerinde in vitro ortamda karşılaştırmışlardır. Materyaller 1, 3 ve 7 gün boyunca kültür medyumunda inkübe edilmiş ve MTT testi ile hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki iRoot BP Plus ve MTA ekstratlarının hücre canlılıkları %77,3 ile %113,8 değerleri arasında bulunmuş ve her iki materyalde da sitotoksik etki görülmemiştir. Zhang ve arkadaşları (86) BioAggregate ve iRoot BP Plus materyallerini insan diş pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri değerlendirdikleri çalışmalarında her iki materyalin de toksik olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda iRoot BP Plus materyali bütün periyotlarda hücre canlılığı değerlendirilmesinde Biodentine™ ve MTA Angelus materyallerinden daha düşük hücre canlılığı, Theracal LC materyalinden daha yüksek hücre canlılığı

göstermiştir. Çalışmamızda iRoot BP Plus grubu Monsmanın sınıflandırmasına göre hafif sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalar ile arasındaki farkın kullandığımız hücre türünden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Biyolojik uyum, örtücülük ve tamir yeteneği gibi önemli özellikleri bulunan ProRoot MTA, kalsiyum silikat içeriğiyle pulpal ve periodontal dokularda güvenle kullanılabilir. MTA materyalinin uzun sertleşme süresi ve manipulasyon zorluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır (11). Bu amaçla son yıllarda üretici firmalar MTA Angelus gibi alternatif MTA materyallerini piyasaya sürmüşlerdir. Yeni üretilen MTA'lar, ProRoot MTA'ya göre kimyasal içerik, sertleşme süresi ve manipülasyon açısından farklılık göstermekte ve dokularda oluşturacağı etkileşimde bazı değişik sonuçlar gözlenmektedir. Çalışmamızda sertleşme süresi ProRoot MTA'ya göre daha kısa olan MTA Angelus materyali kullanılmıştır.

Poggio ve arkadaşları (144) Dycal, ProRoot MTA ve MTA Angelus materyellerinin MDPC-23 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT ve Alamar mavisi testleri ile değerlendirmişlerdir. Dycal materyalinde yüksek sitotoksik etki, Biodentine ve MTA-bazlı ürünlerde düşük sitotoksik etki gözlenmiştir. Silva ve arkadaşları (145) kalsiyum hidroksit, EndoBinder ve MTA Angelus materyallerinin 3T3 fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada kalsiyum hidroksitin diğer materyallere göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Fakat MTA Angelus materyalinin ise non-sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Hirschman ve arkadaşları (146) beyaz MTA Angelus, Endosequence, Dycal ve Ultra-blend Plus (ışıkla sertleşen kalsiyum hidroksit patı) materyallerinin insan dermal fibroblastlarındaki sitotoksik etkilerini MTT yöntemi ile değerlendirdikleri çalışmalarında Dycal materyalinin yüksek sitotoksik etki gösterdiğini; MTA, Endosequence ve Ultra-blend Plus Plus'ın ise düşük sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Samara ve arkadaşları (147) MTA Angelus, ProRoot MTA ve Super EBA materyallerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyodu boyunca insan periodontal ligament hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini tripan mavisi testi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında MTA Angelus'un hücre adezyonu açısından oldukça iyi özelliklere sahip olduğunu fakat ProRoot MTA'ya göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaların MTA Angelus materyali ile ilgili sonuçları çalışmamızın bulgularıyla uyumludur. Elde edilen verilerle; MTA Angelus materyalinin klinik açıdan kullanımında herhangi bir sakınca bulunmadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada test edilen Biodentine™, iRoot BP Plus, TheraCal LC ve MTA Angelus materyallerinden elde edilen farklı konsantrasyonlardaki ekstratların, hücre canlılığı açısından pulpa fibroblast hücreleri üzerinde büyük oranda etkisinin olduğu gözlenmiştir. Genel olarak ekstratların 1:8'lik seyrelti konsantrasyonlarının en az sitotoksik etkiyi, seyreltilmemiş konsantrasyonlarının (1:1) en fazla sitotoksik etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Theracal LC ve iRoot BP Plus grubunda konsantrasyonlar dikkate alındığında, seyreltme oranının artırılması (1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8) sitotoksik etki de anlamlı derecede azalmaya ($1:1 < 1:2 < 1:4 < 1:8$) neden olduğu görülmüştür. Biodentine™ ve MTA Angelus gruplarında ise konsantrasyonlar dikkate alındığında, seyreltme oranının artırılmasının sitotoksik etkide anlamlı derecede değişikliklere neden olmadığı gözlenmiştir.

Hücrelerin kalitatif ve kantitatif olarak incelenmesine olanak sağlayan flow sitometri yöntemi, hücrelerin DNA ve RNA içeriklerinin, sitoplazmik granüleritesinin ve hücreye ait fenotipik-karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde hedef hücrenin flüoresan madde ile işaretli antikor veya nükleik asitlere özgü propidium iodide ile işaretlenmesi amaçlanmaktadır. Flow sitometri yöntemi, test materyallerinin sitotoksik etkileri hücre geçirgenliğinin değerlendirilmesi yöntemiyle (apoptoz/nekroz) belirleyerek yardımcı olmaktadır (113).

Hücrel hasar sonucu meydana gelen plazma membran değişiklikleri apoptoz deneyleri ile gözlemlenebilmektedir. Apoptozun ilk basamaklarında membran içi fosfotidilserin maddesinin membran dışına geçişi görülmektedir. Fosfotidilserine karşı yüksek afiniteye sahip fosfolipit bağlı bir protein olan An-V membran dışına geçen fosfotidilserini tespit etmektedir (115, 148). Ancak An-V boyası plazma membranı bozulmuş nekrotik hücrelerde de gözlenmektedir. Dolayısıyla çalışmalarda fosfotidilserin bulunan hücrelerin membran geçirgenliğini belirleyebilmek için 7-aminoactinomycin-d (7AAD) gibi membranı geçemeyen DNA boyaları ile boyama yapılması gerekmektedir (115, 149).

Çalışmamızın flow sitometri sonuçlarına göre Theracal LC materyali diğer materyallere göre daha fazla sitotoksik etki gösterirken Biodentine™, iRoot BP Plus ve MTA Angelus materyallerinde düşük sitotoksik etki ve yüksek oranda hücre canlılığı izlenmiştir. Poggio ve arkadaşları (139) farklı kuafaj materyallerini MDPC-23 hücreleri ile 24 saat boyunca inkübe ederek apoptotik etkilerini incelemiştir. Apoptotik hücrelerin boyanmasında PSVue480 reaktif maddenin kullanıldığı çalışmada Theracal

LC materyali Biodentine ve MTA Angelus materyallerine göre daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Çalışmamızda Theracal LC, Biodentine™ ve MTA Angelus ile ilgili elde ettiğimiz veriler bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda MTT yönteminde hafif sitotoksik etki gösteren iRoot BP Plus materyali, apoptotik etkilerinin incelendiği flow sitometri yönteminde non-sitotoksik etki göstermiştir. iRoot BP Plus grubunda flow sitometri ile belirlediğimiz hücre canlılık değerleri MTT sonuçlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu verilere göre apoptoz sonuçları ve MTT sonuçlarının uyum göstermediğini belirtebiliriz. Akbulut ve arkadaşları farklı kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinin periodontal ligament fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, Vitrebond grubunun flow sitometri ile belirledikleri hücre canlılık değerlerinin XTT ile belirledikleri değerlere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Flow sitometri yönteminin membran geçirgenliğini belirleyerek hücre ölüm şeklini değerlendirdiği ve XTT mitokondriyal metabolik aktiviteyi ölçerek hücre canlılığı hakkında bilgi vermesi sebebiyle; apoptoz ve XTT sonuçlarının benzerlik göstermediği belirtilmiştir (115). Çalışmamızda ortaya çıkan farkın bu sebepten kaynaklandığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vital pulpa tedavilerinde kullanılan kalsiyum silikat esaslı Biodentine™, iRoot BP Plus, TheraCal LC ve MTA Angelus materyallerinin MTT testi ile sitotoksik etkilerinin ve flow sitometri yöntemiyle apoptotik etkilerinin sonuçlarını incelediğimiz çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmanın hücre canlılığının ölçüldüğü birinci bölümünde 24 saatlik değerlendirmede Biodentine™ ve MTA Angelus grupları arasında hücre canlılığı açısından anlamlı fark saptanmazken, bu iki grup iRoot BP Plus ve Theracal LC ekstratlarına göre anlamlı şekilde daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir ($p<0,05$). Grupların 48 saatlik değerlendirmelerinde en yüksek hücre canlılığı Biodentine™ grubunda gözlenirken en düşük hücre canlılığı ışık ile polimerize olan Theracal LC grubunda gözlenmiştir. MTA Angelus grubunda, Biodentine™ grubuna göre anlamlı şekilde daha az hücre canlılığı gözlenirken, iRoot BP Plus ve Theracal LC grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek hücre canlılığı görülmüştür ($p<0,05$). 72 saatlik değerlendirmede Biodentine™ ve MTA Angelus grupları ise iRoot BP Plus ve Theracal LC gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek oranda hücre canlılığı göstermiştir ($p<0,05$).
2. Biodentine™, iRoot BP Plus, TheraCal LC ve MTA Angelus kalsiyum silikat esaslı materyallerin sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, kalsiyum silikat esaslı materyallerin sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Biodentine™'nin 48 saatlik değerlendirmede gösterdiği hücre canlılığı anlamlı olarak tüm gruplardan yüksek iken, Theracal LC materyalinin 24 saatlik değerlendirmede gösterdiği hücre canlılığı ise tüm gruplardan anlamlı derecede düşüktür.
3. Kalsiyum silikat esaslı materyallerin apoptotik etkilerinin değerlendirildiği bölümünde ise en fazla sitotoksik etki Theracal LC materyalinde gözlenmiştir. Biodentine™, iRoot BP Plus ve MTA Angelus materyallerinde sitotoksik etki açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

4. Elde edilen verilerle; BiodentineTM ve MTA Angelus materyalleri vital endodontik tedavilerde kullanılabilir materyaller olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda hafif sitotoksik etkileri görülen iRoot BP Plus materyalinin geniş pulpa ekspozu bulunan dişlerde kullanımını önermemekteyiz. Rezin içerikli Theracal LC materyalinin ise sitotoksik etkileri nedeniyle indirek pulpa kuafaj tedavilerinde kullanımını tavsiye etmekteyiz. Materyallerin başarılı bir şekilde değerlendirilmesi için daha uzun periyotlu ilave in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar yapılmalıdır.
5. Sonuç olarak, kalsiyum silikat esaslı materyallerin geliştirilmesiyle işlemlerden sonra hastaların daha konforlu bir post-operatif dönem geçirebilmesi, diş kaybı gibi istenmeyen durumların önüne geçilebilmesi ve ekonomik olarak daha avantajlı bir durumun gerçekleşmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E, Jr., et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):1-6.
2. Kato A, Ziegler A, Higuchi N, Nakata K, Nakamura H, Ohno N. Aetiology, incidence and morphology of the C-shaped root canal system and its impact on clinical endodontics. *Int Endod J*. 2014 Jan 31.
3. Hannig C, Westphal C, Becker K, Attin T. Fracture resistance of endodontically treated maxillary premolars restored with CAD/CAM ceramic inlays. *J Prosthet Dent*. 2005 Oct;94(4):342-9.
4. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009 Mar;42(3):227-37.
5. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):203-10.
6. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):372-5.
7. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J*. 2008 Apr;34(1):30-5.
8. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M. Sealing ability of a novel endodontic cement as a root-end filling material. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Dec 1;87(3):706-9.
9. Liu C, Huang Y, Shen W, Cui J. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials*. 2001 Feb;22(4):301-6.
10. Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandag M, Canpolat C, Malkondu O, Kaptan F, et al. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2009 Nov;42(11):1004-14.

11. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):400-13.
12. Laurent P, Camps J, De Meo M, Dejou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater*. 2008 Nov;24(11):1486-94.
13. Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and Treatment perspectives. *Pediatr Dent*. 2008 May-Jun;30(3):211-9.
14. Dammaschke T. The history of direct pulp capping. *J Hist Dent*. 2008 Spring;56(1):9-23.
15. Bishop BG, Woollard GW. Modern endodontic therapy for an incompletely developed tooth. *Gen Dent*. 2002 May-Jun;50(3):252-6; quiz 7-8.
16. Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, et al. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 2005 May;50(5):469-79.
17. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*. 2010;2010:856087.
18. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(1):13-29.
19. Pashley DH PE, Carvalho RM, Tay FR. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dent Clin North Am*. 2002;46:211–45.
20. Bouillaguet S, Wataha, J.C., Hanks, C.T., Ciucchi, B., Holz, J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*. 1996;22 (5):244-8.
21. Orchardson R, Cadden, S.W. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update*. 2001;28 (4):200-9.
22. Mjör IA. Pulp- Dentin Biology in Restorative Dentistry. O. B. S. Ivar A. Mjör, Karin J. Heyeraas (Ed.). Normal Structure and Physiology. IL: Quintessence. 2002.
23. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):273-80.
24. Cox CF BG, Kopel HM, Ruby JD. Repair of pulpal injury by dental materials In: Dental Pulp. Hargreaves KM, Goodis HE. Quintessence Publishing Co,Inc Chicago. 2002;325:43.

25. Hargreaves KM, Cohen, S. Cohen's Pathways Of The Pulp, Tenth Edition. St. Louis: Mosby Company. 2011.
26. Gutierrez-Venegas G, Maldonado-Frias S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cardenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci.* 2005 May 20;77(1):60-73.
27. Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod.* 2004 Feb;30(2):88-91.
28. Durand SH, Flacher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2880-7.
29. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, et al. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. *J Endod.* 1996 Jan;22(1):9-12.
30. Ogura N, Tobe M, Sakamaki H, Nagura H, Abiko Y, Kondoh T. Tumor necrosis factor-alpha increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jul;34(6):357-63.
31. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented Bacteroides in human pulp cell cultures. *Int Endod J.* 2003 May;36(5):352-7.
32. Barkhordar RA, Ghani QP, Russell TR, Hussain MZ. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):157-9.
33. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999 Aug;32(4):257-82.
34. Cvek M. [Calcium hydroxide in the treatment of traumatized teeth]. *Rev Fr Endod.* 1989 Sep;8(3):11-27.
35. Heitmann T, Unterbrink G. Direct pulp capping with a dentinal adhesive resin system: a pilot study. *Quintessence Int.* 1995 Nov;26(11):765-70.

36. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent*. 1995 Nov-Dec;20(6):223-9.
37. Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Oper Dent*. 1997 Jan-Feb;22(1):1-3.
38. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J*. 2005 Oct;55(5):293-301.
39. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sep;32(5):361-9.
40. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araujo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int*. 2001 Mar;32(3):211-20.
41. Kitasako Y, Inokoshi S, Tagami J. Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent*. 1999 May;27(4):257-63.
42. Ho YC, Huang FM, Chang YC. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):389-93.
43. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod*. 2005 Jan;31(1):44-6.
44. Crisp S, Lewis BG, Wilson AD. Characterization of glass--ionomer cements. 6. A study of erosion and water absorption in both neutral and acidic media. *J Dent*. 1980 Mar;8(1):68-74.
45. Mount GJ. Buonocore Memorial Lecture. Glass-ionomer cements: past, present and future. *Oper Dent*. 1994 May-Jun;19(3):82-90.
46. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(3):277-88.
47. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2000 Mar;16(2):129-38.
48. Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater*. 2006 Sep;22(9):864-9.

49. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006 Sep;22(9):838-44.
50. de Souza Costa CA, Lopes do Nascimento AB, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater.* 2001 May;17(3):230-40.
51. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998 Nov;24(11):744-51.
52. Jaber L, Mascres C, Donohue WB. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992 Jan;73(1):92-8.
53. Chohayeb AA, Chow LC, Tsaknis PJ. Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material. *J Endod.* 1987 Aug;13(8):384-7.
54. Yoshimine Y, Akamine A, Mukai M, Maeda K, Matsukura M, Kimura Y, et al. Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute. *Biomaterials.* 1993 May;14(6):403-6.
55. Stockton LW. Vital pulp capping: a worthwhile procedure. *J Can Dent Assoc.* 1999 Jun;65(6):328-31.
56. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod.* 1999 Oct;25(10):676-82.
57. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996 Jan-Mar;24(1-2):125-8.
58. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* 2009 Nov-Dec;17(6):544-54.
59. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990 Oct;6(4):282-7.
60. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998 Sep 5;41(3):474-80.
61. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991 Nov;70(11):1450-5.

62. Freund M, Munksgaard EC. Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res*. 1990 Aug;98(4):351-5.
63. de Souza Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent*. 2003 Jul-Aug;28(4):365-70.
64. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):415-22.
65. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod*. 2005 May;31(5):387-91.
66. Okiji T, Yoshiba K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent*. 2009;2009:464280.
67. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995 Jul;21(7):349-53.
68. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*. 2009 Apr;35(4):550-4.
69. Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET. Properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 2005 Sep;31(9):665-8.
70. Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*. 2014;2014:160951.
71. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*. 2013 Feb;29(2):e20-8.
72. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1166-71.

73. Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*. 1996 Jan-Feb;21(1):4-11.
74. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):743-7.
75. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbee AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent*. 2012 Nov-Dec;34(7):e202-8.
76. Popović-Bajić M, Prokić B, Prokić B, Jokačević V, Danilović V, Živković S. Histological evaluation of direct pulp capping with novel nanostructural materials based on active silicate cements and Biodentine® on pulp tissue. *Acta veterinaria*. 2013;63(2-3):347-60.
77. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*. 2007 Aug;35(8):636-42.
78. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012 May;45(5):439-48.
79. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013 Apr;39(4):478-83.
80. Qureshi A, E S, Nandakumar, Pratapkumar, Sambashivarao. Recent advances in pulp capping materials: an overview. *J Clin Diagn Res*. 2014 Jan;8(1):316-21.
81. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J*. 2012 Jun;45(6):571-9.
82. Salgado VE, Albuquerque PP, Cavalcante LM, Pfeifer CS, Moraes RR, Schneider LF. Influence of photoinitiator system and nanofiller size on the optical properties and cure efficiency of model composites. *Dent Mater*. 2014 Oct;30(10):e264-71.
83. Wang M, Yin S, Wang Q, Gao Y, Wang Y, Zhang L. [Study of molar furcal perforation repaired with iRoot BP]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2013 Jun;31(3):257-9, 66.

84. Azimi S, Fazlyab M, Sadri D, Saghiri MA, Khosravanifard B, Asgary S. Comparison of pulp response to mineral trioxide aggregate and a bioceramic paste in partial pulpotomy of sound human premolars: a randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2014 Sep;47(9):873-81.
85. De-Deus G, Canabarro A, Alves GG, Marins JR, Linhares AB, Granjeiro JM. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012 Jun;45(6):508-13.
86. Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2013 Oct;46(10):923-9.
87. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):16-27.
88. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007;18(1):3-7.
89. Santos AD, Araujo EB, Yukimitu K, Barbosa JC, Moraes JC. Setting time and thermal expansion of two endodontic cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Sep;106(3):e77-9.
90. Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate--a review. *J Clin Pediatr Dent*. 2009 Fall;34(1):1-7.
91. Wataha J HC. Biocompatibility testing-what can we anticipate? *Trans Acad Dent Mater*. 1997:109-20.
92. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. 2001 Aug;86(2):203-9.
93. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003 Feb;36(2):75-85.
94. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*. 1996 May;12(3):186-93.
95. Schmalz G, Arenholt-Bindslev. *Biocompatibility of dental materials*. Berlin: Springer. 2009.
96. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2000;83(2):223-34.

97. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of dental materials: Springer; 2009.
98. Wataha J. Biocompatibility of Dental Materials. In Anusavice KJ, ed. Phillip's Science Of Dental Materials. Missouri: Elsevier Science. 2003:171-202.
99. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res. 2002 Oct;81(10):660-3.
100. Nicholson J. The Chemistry of Medical and Dental Materials. The Royal Society of Chemistry. 2002.
101. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater. 1994;15(3):173-90.
102. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerdendirmeleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 2011;2011(2).
103. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-- advantages and limitations. J Dent. 1994;22 Suppl 2:S6-11.
104. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dent Mater. 2002 Jun;18(4):318-23.
105. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. Materials. 2009;2(2):514-48.
106. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007 May;12(3):E258-66.
107. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. J Biomed Mater Res. 1999 Jun 5;45(3):214-22.
108. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. J Endod. 2001 Jan;27(1):23-30.
109. Aslan JE, Thomas G. Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. Traffic. 2009 Oct;10(10):1390-404.
110. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Exp Cell Res. 2003 Feb 1;283(1):1-16.
111. Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem. 2004 May;271(9):1638-50.

112. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
113. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008;19(2):73-8.
114. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):255-60.
115. Akbulut MB. Farklı kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinin periodontal ligament fibroblastlarının proliferasyonu, adezyonu ve morfolojisi üzerindeki etkisi [Doktora tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi; 2014.
116. Zare Jahromi M, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2014 Summer;8(3):130-3.
117. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2007 Dec;33(12):1450-4.
118. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Oct;92(4):446-50.
119. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod.* 2005 Oct;31(10):746-8.
120. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig.* 1997 Dec;1(4):154-62.
121. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent.* 2000 Aug;84(2):229-36.
122. Lonroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2003 Feb;61(1):52-6.
123. Kum KY, Kim EC, Yoo YJ, Zhu Q, Safavi K, Bae KS, et al. Trace metal contents of three tricalcium silicate materials: MTA Angelus, Micro Mega MTA and Bioaggregate. *Int Endod J.* 2014 Jul;47(7):704-10.
124. Tai KW, Chang YC. Cytotoxicity evaluation of perforation repair materials on human periodontal ligament cells in vitro. *J Endod.* 2000 Jul;26(7):395-7.

125. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro*. 2005 Feb;19(1):145-54.
126. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dent Mater*. 2011 Jul;27(7):e134-57.
127. Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod*. 1990 Mar;16(3):129-34.
128. Illeperuma RP, Park YJ, Kim JM, Bae JY, Che ZM, Son HK, et al. Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Mar;23(3):753-62.
129. Rezende TM, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, de Oliveira Mendes ST, Jorge ML, et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J*. 2007 Aug;40(8):603-11.
130. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1101-5.
131. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Sep;94(3):361-5.
132. Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T. Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthop Scand*. 1994 Apr;65(2):147-53.
133. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil*. 1999 Aug;26(8):666-71.
134. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2004 Oct;37(10):699-704.

135. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J*. 2010 Dec;43(12):1116-21.
136. Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Oct;102(4):e115-20.
137. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
138. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod*. 2014 Nov;40(11):1846-54.
139. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, et al. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:181945.
140. Khedmat S, Dehghan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar MH, Dummer PM. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restor Dent Endod*. 2014 Aug;39(3):149-54.
141. Perard M, Le Clerc J, Watrin T, Meary F, Perez F, Tricot-Doleux S, et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Jun;24(6):1527-34.
142. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*. 2014 Apr;42(4):490-7.
143. Shi S, Bao ZF, Chen X, Zhang DD. [Cytotoxicity of a novel endodontic treatment material iRoot BP Plus to human gingival fibroblasts]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2014 Dec;23(6):681-4.
144. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014 Apr;5(2):69-76.
145. Silva EJ, Herrera DR, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J*. 2012 Sep;45(9):815-20.

146. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012 Mar;38(3):385-8.
147. Samara A, Sarri Y, Stravopodis D, Tzanetakis GN, Kontakiotis EG, Anastasiadou E. A comparative study of the effects of three root-end filling materials on proliferation and adherence of human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2011 Jun;37(6):865-70.
148. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1597-601.
149. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Messer RL, Mao J, et al. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):936-42.

EKLER

EK. 1. Etik Kurul Onayı

MKÜ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Kalsiyum silikat esaslı materyallerin insan pulpa fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi"
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	04/06/2014/103

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	2014/87	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:04 Tarih: 05/06/2014 Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.
-----------------	---

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF.DR.YUSUF ÖNLEN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Yusuf ÖNLEN	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.İsmet Murat MELEK	Nöroloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Katılmadı
Prof.Dr.Cumali GÖKÇE	İç Hastalıkları	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Nazan SAVAŞ	Halk Sağlığı	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Aydiner KALACI	Ortopedi ve Travmatoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	Katılmadı
Doç.Dr.Zafer YÖNDEN	Tıbbi Biyokimya	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Neslihan PINAR	Tıbbi Farmakoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Fatih SEFİL	Fizyoloji	MKÜ T.A.S. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı Prof.Dr.Yusuf ÖNLEN
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

EK.2. ÖZGEÇMİŞ

31.01.1988 tarihinde Adana’da doğdu. İlköğretimi Adana’da, orta öğretimini ise Konya’da tamamladı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’ni kazandı. 2011 yılında fakülteden mezun oldu. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Endodonti Anabilim Dalı’nda doktora programına başladı ve halen eğitimine devam etmektedir.