

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .

ılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**( DOKTORA TEZİ )**

**YÜKSEK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL HIALURONİK ASİTİN  
İNSAN PULPA HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK  
ETKİSİNİN VE ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN  
İNCELENMESİ**

**ÖZGE ATIKLER**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. ELİF BAHAR TUNA İNCE**

**PEDODONTİ ANABİLİM DALI  
PEDODONTİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2016**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı Pedodonti Programında Özge ATIKLER tarafından hazırlanan Yüksek Molekül Ağırlıklı Hyaluronik Asitin İnsan Pulpa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Ve Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 05 / 2016

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Doç. Dr. Elif Bahar TUNA İNCE-Danışman (İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD)	
2.Prof. Dr. Oya AKTÖREN (İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD)	
3.Prof. Dr. Fatma Aytül UYAR (İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji AD)	
4.Prof. Dr. Işın ULUKAPI (Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD)	
5.Prof. Dr. Betül KARGÜL (Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD)	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dt. Özge Atikler



## İTHAF

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen *sevgili eşim ve canım aileme* ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle her fırsatta paylaşan, iyi niyeti ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında anlayış ve özveriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Elif Bahar Tuna İnce'ye**,

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve olgunlaşmasında emeği geçen, tez çalışmamın laboratuvar aşamalarını gerçekleştirmeme imkan tanıyan, bu süreçte bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın **Prof. Dr. Fatma Aytül Uyar'a**,

Tez çalışmamın oluşturulmasında çok emeği olan, her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sevgisini ve desteğini hissettiğim hocam Sayın **Prof. Dr. Işın Ulukapı'ya**,

Doktora eğitimim süresince ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, değerli görüş ve fikirlerine başvurduğum Tez İzleme Komitesi hocam Sayın **Prof. Dr. Oya Aktören'e**

Doktora eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlanmama olanak veren İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım başta Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Figen Seymen** olmak üzere Sayın **Prof. Dr. Tevfik Akıncı, Prof. Dr. Zeynep Aytepe, Prof. Dr. Koray Gençay, Prof. Dr. Gamze Aren, Prof. Dr. Elif Sepet** ve **Doç. Dr. Arzu Pınar Erdem'e**,

Tez çalışmamın deney aşamaları sırasında bana hücre kültürü işlemlerini öğreten, çalışmalarım boyunca sabır ve güler yüzle tecrübelerini paylaşan İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi **Dr. Sibel Penbe Yentür'e**,

Doktora eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, güzel anılar paylaştığım dostlarım **Dr. Melis Araz Topuz** ve **Dr. Yelda Kasımoğlu'na**, beraber çalıştığım tüm **sevgili asistan arkadaşlarıma** ve **Pedodonti Anabilim Dalı çalışanlarına**,

Hayatıma girdiği günden beri her zaman sevgisi ve desteği ile hayatımı kolaylaştıran ve tez çalışmam sırasında bilimsel desteğini esirgemeyen sevgili eşim ***Dr. Mert Atikler***'e,

Hayatım boyunca attığım her adımda sevgi ve anlayışlarıyla hep yanımda olan ve beni her zaman destekleyen ***Canım Aileme***,

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **44158**



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	XİV
ÖZET .....	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Pulpa .....	4
2.1.1. Pulpa hücreleri .....	4
2.1.2. Hücreler Arası Esas Madde.....	6
2.1.3. Pulpanın Bağ Dokusu Lifleri .....	6
2.1.4. Pulpanın Damarları .....	7
2.1.5. Pulpanın Lenf Damarları.....	7
2.1.6. Pulpanın Sinirsel Uyarımı .....	7
2.1.7. Pulpanın Fonksiyonları .....	8
2.1.7.1. Pulpanın Dentin Yapıcı Görevi.....	8
2.1.7.2. Pulpanın Besleyici Görevi.....	9
2.1.7.3. Pulpanın Sinirsel İşlevi .....	9
2.1.7.4. Pulpanın Savunma Görevi.....	9
2.2. Direkt Pulpa Kuafaj Tedavisi.....	10
2.2.1. Direkt Pulpa Kuafaj Tedavisinde Başarıyı Etkileyen Faktörler.....	10
2.2.1.1. Bakteri kontaminasyonu ve mikrosızıntı .....	10
2.2.1.2. Perforasyonun Büyüklüğü.....	11
2.2.1.3. Kanama kontrolü.....	11

2.2.1.4. Pulpanın yaşı .....	11
2.2.1.5. Kavite dezenfeksiyonu .....	12
2.2.1.6. Uygulama yapılan dişin süt ya da sürekli diş olması .....	12
2.2.1.7. İyatrojenik faktörler .....	12
2.2.1.8. Kullanılan kuafaj materyali seçimi .....	13
2.3. Kalsiyum Hidroksit .....	13
2.4. Mineral Trioksit Agregat (MTA) .....	15
2.5. Biodentine™ .....	17
2.6. Hyaluronik Asit .....	19
2.6.1. Hyaluronik Asitin Fizikokimyasal ve Yapısal Özellikleri .....	20
2.6.2. Hyaluronik Asitin Sentezi .....	20
2.6.3. Hyaluronik Asitin Yara İyileşmesindeki Rolü .....	21
2.6.4. Diş Hekimliğinde Hyaluronik Asit Uygulamaları İle İlgili Çalışmalar .....	22
2.7. Biyouyumluluk ve Sitotoksiste .....	23
2.7.1. Sitotoksiste Testlerinde Biyolojik Sistemler .....	24
2.7.2. İn-Vitro Sitotoksiste Testleri .....	25
2.7.2.1. Filtre diffüzyon testi .....	25
2.7.2.2. Agar diffüzyon testi .....	25
2.7.2.3. Dentin Bariyer testi .....	26
2.7.2.4. Direkt temas testi .....	26
2.7.3. Sitotoksiste Testlerinde Değerlendirme Yöntemleri .....	27
2.7.3.1. Canlılık değerlendirme testleri .....	27
2.7.3.2. Hücre proliferasyonunu değerlendirme testleri .....	28
2.7.3.3. Metabolik sitotoksiste değerlendirme testleri .....	28
2.7.3.4. Yaşam değerlendirme testleri .....	28
2.7.4. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler ve akım sitometri .....	28
2) İmmünohistokimyasal yöntemler .....	29
3) Biyokimyasal yöntemler .....	30
4) İmmunolojik yöntemler .....	30
5) Moleküler biyoloji yöntemleri .....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	31
3.1. Gereç .....	32
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller .....	32

3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	34
3.1.2.1. Cihaz ve Aletler.....	34
3.1.2.2. Kimyasal Malzemeler .....	34
3.1.2.3. Sarf Malzemeler .....	35
3.1.3. Akım Sitometri Analizinde Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Sarf Malzemeler...35	
3.1.3.1. Cihazlar .....	35
3.1.3.2. Kitler .....	36
3.1.3.3. Sarf Malzemeler .....	36
3.1.4. Alkalen Fosfataz Enzim Düzeyi Analizinde Kullanılan Cihazlar, Kitler .....	36
3.1.4.1. Cihazlar .....	36
3.1.4.2. Kitler .....	36
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Hücre Kültürü .....	36
3.2.2. Materyal Örneklerinin Hazırlanması .....	39
3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Salınım Sıvılarının Uygulanması.....	41
3.2.4. Akım Sitometri Analizi ile Sitotoksite Değerlendirilmesi .....	43
3.2.5. ELISA ile Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini .....	44
3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi .....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Sitotoksite Analizine Ait Bulgular .....	47
4.1.1. Materyallere Ait Salınım Sıvılarının Uygulandığı Hücrelerin Invert Mikroskop Görüntüleri.....	47
4.1.2. Akım Sitometri Analizine İlişkin Bulgular.....	50
4.1.2.1 Akım Sitometri Analizinde Ölü Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi ..	52
4.1.2.2. Akım Sitometri Analizinde Nekrotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi .....	55
4.1.2.3. Akım Sitometri Analizinde Erken Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi.....	58
4.1.2.4. Akım Sitometri Analizinde Geç Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi.....	60
4.1.2.5. Akım Sitometri Analizinde Canlı Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi...63	
4.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular .....	67

5. TARTIŞMA.....	69
SONUÇLAR.....	86
KAYNAKLAR.....	88
FORMLAR.....	104
ETİK KURUL KARARI.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	110



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firma bilgileri.....	33
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan materyallerin uygulama prosedürleri .....	39
Tablo 4-1: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre bulgularının değerlendirilmesi.....	53
Tablo 4-2: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre bulgularının post hoc değerlendirilmesi.....	53
Tablo 4-3: 1. gün ve 7. günde saptanan nekroz bulgularının değerlendirilmesi.....	56
Tablo 4-4: 1. gün ve 7. günde saptanan nekroz bulgularının post hoc değerlendirilmesi.....	57
Tablo 4-5: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptoz bulgularının değerlendirilmesi..	59
Tablo 4-6: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptoz bulgularının post hoc değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4-7: 1. gün ve 7. günde saptanan geç apoptoz bulgularının değerlendirilmesi....	61
Tablo 4-8: 1. gün ve 7. günde saptanan geç apoptoz bulgularının post hoc değerlendirilmesi.....	62
Tablo 4-9: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre bulgularının değerlendirilmesi.....	64
Tablo 4-10: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre bulgularının post hoc değerlendirilmesi.....	64
Tablo 4-11: 7. gün ve 14. günde saptanan alkalen fosfataz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	67

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hyaluronik asitin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan materyaller.....	32
Şekil 3-2: Laminar akım hücre kültür kabini.....	37
Şekil 3-3: Bistüri yardımı ile parçalara ayrılan doku parçalarının doku kültür flaskına alınması.....	37
Şekil 3-4: İnkübatör.....	38
Şekil 3-5: Santrifüj Cihazı.....	38
Şekil 3-6: Steril teflon kalıplarda materyallerin hazırlanması.....	40
Şekil 3-7: Sertleşmesi tamamlanan kuafaj materyallerinin salınım sıvılarının hazırlanması için hücre kültür medyumuna ile 24 saat inkübasyonu.....	40
Şekil 3-8: Materyallerin santrifüj tüplerine alınan salınım sıvıları.....	41
Şekil 3-9: Hücrelerin tripan mavisi ile boyanarak hemositometri ile ışık mikroskopunda sayılması.....	42
Şekil 3-10: Materyal salınım sıvılarının uygulanacağı; 1. gün, 7. gün ve 14. günler için hücre ekimi yapılmış plaklar.....	42
Şekil 3-11: Apoptotik/Nekrotik Hücre Tespit Kiti .....	43
Şekil 3-12: Akım Sitometri Cihazı.....	44
Şekil 3-13: Dondurma tüpleri içinde -80 °C’de muhafaza edilen üst sıvılar.....	45
Şekil 3-14: Elisa Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) .....	45
Şekil 3-15: Elisa okuyucusu .....	46
Şekil 4-1: 1. gün sonunda materyallerin hücreler üzerine olan etkisi.....	48
Şekil 4-2: 7. gün sonunda materyallerin hücreler üzerine olan etkisi.....	49
Şekil 4-3: Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 1. güne ilişkin akım sitometri grafiği örneği.....	50

Şekil 4-4: Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 7. güne ilişkin akım sitometri grafiği örneği.....	51
Şekil 4-5: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre oranları.....	54
Şekil 4-6: 1. günde tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı.....	54
Şekil 4-7: 7. günde tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı.....	55
Şekil 4-8: 1. gün ve 7. günde saptanan nekrotik hücre oranları.....	57
Şekil 4-9: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptotik hücre oranları .....	60
Şekil 4-10: 1. gün ve 7. günde saptanan geç apoptotik hücre oranları .....	62
Şekil 4-11: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre oranları.....	65
Şekil 4-12: 1. günde kontrol grubuna göre canlı hücre oranları.....	65
Şekil 4-13: 7. günde kontrol grubuna göre canlı hücre oranları.....	66
Şekil 4-14: 1. günde tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranlarının dağılımı .....	66
Şekil 4-15: 7. günde tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranlarının dağılımı .....	67
Şekil 4-16: 7. gün ve 14. günde saptanan alkalen fosfataz düzeyi oranları.....	68

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

°C: Derece, Celcius

µl: Mikrolitre

ALP: Alkaline Phosphatase, Alkalen Fosfataz

cm<sup>2</sup>: Santimetrekare

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EDTA: Etilendiamintetraasetikasit

ELISA: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay

ETD-III: Ethidyum Homodimer III

FBS: Fetal Bovine Serum, Fötal Sığır Serumu

FDA: Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FITC: Floresan İzosiyanat

HA: Hyaluronik Asit

ISO: International Organization for Standardization, Uluslararası Standardizasyon Birliği

kDA: Kilo Dalton

LDH: Laktat Dehidrogenaz

MA: Molekül Ağırlığı

ml: Mililitre

mm<sup>3</sup>: Milimetreküp

MTA: Mineral Trioksit Agregat

MTT: Metilmazol Difenil Tetrazolyum Testi

PBS: Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tampon Solüsyonu

PI: Propidium İyodür

SS: Standart Sapma

TGF: Transforming Growth Factor, Transforme Edici Büyüme Faktörü

$\mu\text{m}$ : Mikrometre, Mikron



## ÖZET

Atikler Ö. Yüksek Molekül Ağırlıklı Hyaluronik Asitin İnsan Pulpa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Ve Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pedodonti ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016.

Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin insan pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin ve alkalen fosfataz aktivitesinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. 19-25 yaş arası bireylerin gömük üçüncü büyük azı dişlerine ait pulpa dokusundan elde edilen insan pulpa hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmış ve çalışmada kullanılmak üzere 3. pasaj hücreler seçilmiştir. Oluşturulan hücre kültürlerine hyaluronik asit (H-9390, Sigma Aldrich), Gengigel Prof®, ProRoot® MTA, Biodentine™ ve Dycal® materyallerine ait salınım sıvıları uygulanmıştır. 1. ve 7. günler sonunda hücrelere aneksin V ve ethidyum homodimer III boyaması yapılarak akım sitometri analizi yapılmıştır. Hücre oranları canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre olacak şekilde belirlenmiştir. 7. ve 14. günler sonunda ELISA ile alkalen fosfataz aktivitesi değerlendirilmesi yapılmıştır. Bulgular IBM SPSS Statistics 22 programı ile analiz edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesi sonucunda hyaluronik asit ve Gengigel Prof grupları 1. ve 7. günlerde kontrol grubu ile benzer hücre canlılığı göstermiş ve apoptoz ve nekrozu uyarmamıştır ( $p>0.05$ ). ProRoot MTA ve Biodentine grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında biyoyumlu bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Dycal grubunda her iki günde de hücre canlılığı diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Mineralizasyonun erken belirteçlerinden olan alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi tüm gruplarda kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. ALP aktivitesinin 7. ve 14. gün sonuçları karşılaştırıldığında 14. günde artış olduğu belirlenmiş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Sonuç olarak yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit, insan pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturmamış ve biyoyumluluk göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hyaluronik asit, sitotoksikite, alkalen fosfataz, hücre kültürü, insan pulpa hücresi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 44158

## ABSTRACT

Atikler O. Evaluation of the cytotoxicity and alkaline phosphatase activity of high molecular hyaluronic acid on human dental pulp cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pedodontics. PhD Thesis. İstanbul. 2016.

The aim of this study was to investigate the cytotoxicity and alkaline phosphatase activity of high molecular hyaluronic acid on human dental pulp cells. Human dental pulp cells were derived from pulp tissue obtained from impacted third molars. After cultures reached confluence, cell passages were performed and the cells at 3<sup>rd</sup> passages were used in experiments. Cultures were treated with hyaluronic acid (H-9390, Sigma Aldrich), Gengigel Prof®, ProRoot® MTA, Biodentine™ and Dycal® extracts. On the 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> days of culture, after cell staining with annexin V and ethidium homodimer III, flow cytometry analysis was performed and vital, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells were determined. On the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of culture, alkaline phosphatase activity of the cells was performed with ELISA. The data were analyzed using IBM SPSS Statistics 22. Hyaluronic acid and Gengigel Prof showed similar cell viability with control group on 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> days and did not induce apoptosis and necrosis of cells ( $p>0.05$ ). Proroot MTA and Biodentine was found biocompatible when compared by control group however Dycal decreased cell viability on both days significantly more than all the other groups ( $p<0.05$ ). In all groups the induction of alkaline phosphatase activity which is an early marker of mineralization increased depending on time however statistically significant difference was not found with control groups ( $p>0.05$ ). In conclusion, high molecular hyaluronic acid has shown any cytotoxicity effects on human dental pulp cells and exhibited good biocompatibility.

Key Words: Hyaluronic acid, cytotoxicity, alkaline phosphatase, cell culture, human pulp cells

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No:44158

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pulpa dokusunun canlılığını sürdürerek korunması uzun süredir dental tedavilerin temel amaçlarından biri haline gelmiştir (18). Dentinojenik özelliğini kaybetmemiş ve enfekte olmamış pulpanın travma sonucunda veya kavite preparasyonu sırasında perfore edilmesi veya yaralanması halinde doku dostu olan bir kimyasal maddeyle örtülerek canlılığını korumasını sağlamak amacıyla yapılan tedavi "direkt pulpa kuafajı" olarak adlandırılmaktadır (8, 13, 123, 167, 176, 191).

Çeşitli nedenlerle diş pulpasında meydana gelen perforasyonların iyileşmesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerden öne çıkanlar; pulpa açıklığının boyutu, perforasyonun oluşum şekli (travmatik, mekanik veya çürük nedeni ile), bakteriyel kontaminasyon durumu, pulpanın iyileşme yeteneği, hastanın yaşı, kökün oluşum aşaması, periodontal durum ve tedavide kullanılan materyaller olarak belirtilmektedir (149, 158).

Günümüzde pulpa kuafajı için birçok farklı materyal bulunmasına ve kliniklerde kullanılmasına karşın, ilk kez 1930'lu yıllarda pulpa kuafajında kullanılmaya başlanan kalsiyum hidroksitin bu uygulamada altın standart olma özelliğini koruduğu bildirilmektedir (149, 158). Yüksek alkali yapıda olma özelliği bakterisidal etki oluşturmakta ve pulpa hücrelerini stimüle ederek onarıcı dentin oluşumunu sağlamaktadır (16, 18, 33, 167, 168).

Bu olumlu özelliklerinin yanı sıra kalsiyum hidroksitin zamanla çözünmesi, oluşturduğu dentin köprüsünün tüneller içeren düzensiz bir yapı olması ve zamanla sızıntıyı önleme kabiliyetindeki düşüş kullanımında bazı soru işaretleri oluşmasına neden olmuş, araştırmacıları yeni ve daha üstün özellikli materyal arayışına yöneltmiştir (4, 149, 158).

Son yıllarda, yüksek doku uyumluluğuna sahip olması, oluşturduğu dentin köprüsünde tünel defektlerinin olmaması, yüksek alkali pH'sı ve bakteri geçişini son derece iyi önlemesi gibi olumlu özellikleri ile Mineral Trioksit Agregat (MTA) materyali, pulpa perforasyonlarının kuafajında ön plana çıkmaya başlamıştır (94, 149, 158).

MTA ilk olarak 1993 yılında Torabinejad tarafından Loma Linda Üniversitesi'nde geliştirilmiş biyouyumlu bir materyaldir. 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylandıktan sonra, deneysel ve klinik olarak geniş çaplı kullanım alanı bulmuştur (179). İlk olarak kök kanal ucu dolgu materyali olarak kullanılmış, daha sonra pulpa dokusunun kaplanması, furkal perforasyonların tamiri, iatrojenik perforasyonların kanal içi tamiri, rezorpsiyon tedavisi, apeksifikasyon sırasında bariyer oluşturması gibi çeşitli klinik uygulamalarda da kullanım alanı bulmuştur. Bu uygulamaların temelini MTA'nın biyouyumluluğu, hermetik örtme yeteneği, dental pulpa ve periradiküler dokuların rejenerasyonunu artırma kapasitesi gibi özellikleri oluşturmaktadır (103). Özgün yapısı ve yukarıda sayılan bu özellikleri materyale büyük avantaj sağlasa da, klinik kullanımda MTA materyalinin uzayan sertleşme süresi ve manipülasyon özelliklerinin zorluğunun klinisyenlere dezavantaj oluşturduğu belirtilmiştir (23).

Biodentine™; son yıllarda aktif biyosilikat teknolojisi ile üretilmiş olan, dentine benzer mekanik özellikler taşıyan ve kuafaj ajanı olarak da kullanılabilen bir materyaldir. Biodentine™ pulpa canlılığının korunması için dentin yüzeyinde çok sıkı sızdırmazlık sağlayarak, uygun koşulları yaratmaktadır. Bu şekilde postoperatif hassasiyet oluşmamasını ve vital diş restorasyonlarının uzun ömürlü olmasını sağlamaktadır. Pulpa hücreleri üzerinde olumlu özellikleri bulunmakta olup canlı pulpa dokusu ile direkt teması durumunda onarıcı dentin oluşumunu desteklemektedir (144, 193).

Hyaluronik asit, ekstrasellüler matriksin ana komponentlerinden biri olup sinoviyositler, fibroblastlar ve kondrositler tarafından sentezlenmekte ve hücre proliferasyonunda, doku tamirinde, hücre migrasyonunda ve bazı malign tümörlerin progresyonunda rol oynamaktadır. Glikozaminoglikan ailesinin bir prototipidir; sodyumsetilglikozamin ve glukuronik asitin oluşturduğu disakkarit birimlerinden meydana gelen bir polisakkarittir (40). Hyaluronik asit fizikokimyasal özellikleri ve saf formunun non immünojenik olması nedeniyle yıllardır tıbbi alanlarda eksojen olarak uygulamakta olup; diş hekimliği alanında da antiinflamatuvar, antibakteriyel ve nemlendirici etkilerinden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (29).

Bu çalışmanın amacı hyaluronik asitin insan pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin kalsiyum hidroksit, MTA ve Biodentine™ materyalleri ile karşılaştırmalı

olarak in vitro koşullarda incelenmesi ve hyaluronik asitin direkt pulpa kuafajı için potansiyel bir materyal olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pulpa

Diş pulpası; hücreler, hücreler arası esas madde, lifler, damarlar ve sinirler içeren bir bağ dokusudur. Dentinle kaplı olan pulpa dokusu, apikal foramen ve kökün apeksi yakınlarındaki aksesuar kanallar yoluyla periodonsiyum ve vücudun geri kalanıyla bağlantı halindedir (13, 184).

Işık mikroskobu altında genç ve gelişimini tamamlamış bir sürekli diş pulpasının yapısına ilişkin belirgin yapılar incelendiğinde, preentine komşu en dış tabakasında odontoblast katmanı bulunmaktadır. Pulpanın kuronal kısmındaki odontoblastlar kollajen sentezi yaparak mineralize olabilen dentin matiksini meydana getirmektedir. Bu tabakanın iç kısmında '*Weil katmanı*' olarak adlandırılan göreceli olarak hücresiz bir katman bulunmaktadır. Burada kan damarları, miyelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların silindirik şeklindeki sitoplazmik uzantıları vardır. Bu hücresiz alanın içinde ise daha daha yüksek oranda hücrenin bulunduğu hücreden zengin katman görülmektedir. Merkezde ise çoğunlukla fibroblastlar ile damar ve sinir paketinin en büyük dallarının bulunduğu pulpa özü olarak adlandırılan kısım mevcuttur (183).

#### 2.1.1. Pulpa hücreleri

Pulpada başlıca 3 tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; odontoblastlar, fibroblastlar ve savunma hücreleridir.

**Odontoblastlar:** Pulpanın yüksek derecede farklılaşmış hücreleridir. Pulpanın dış ortama en yakın hücreleri oldukları için çevresel uyaranlardan ilk etkilenen hücrelerdir. Odontoblastlar, dentinin mineralizasyonunu kontrol etmekte; ayrıca mineralizasyonla bağlantılı olan asit fosfataz ve alkalik fosfataz enzimlerini salgılamaktadır (151, 183).

Pulpanın kuronal kısmında morfolojik olarak sütun şeklinde ve çok sayıda olan odontoblastlar; düzenli kanalları bulunan normal ve düzenli dentin yapısını oluştururlar. Kökün orta kısmında odontoblastlar daha çok silindirik haldedir, yaptıkları dentin kanalları daha az sayıda ve daha az düzenlidir. Kökün apikal kısmında ise daha az farklılaşmış olan odontoblastlar daha kısa ve kübik şekilde olup daha az kanallı ve daha

amorf yapıdaki dentini oluştururlar. Odontoblastlar kök kısmında düzleşerek fibroblastlara benzer bir görünüm kazanırlar. Odontoblastlar farklılaşmanın son aşamadaki hücreler olması nedeni ile daha fazla bölünemezler (13, 183).

Odontoblastlar hücre gövdesi ve uzantısı olarak iki ana bileşenden meydana gelmektedir. Hücre gövdesi kalsifiye bir doku olan dentin sınırında dizilmiştir ve hücrenin sentezden sorumlu kısmıdır. Hücre uzantısı ise pre-dentin ve dentini aşmış dentin kanalcıklarının içinde çeşitli mesafelere kadar uzanır. Bu uzantılar 'Tomes lifi' olarak da adlandırılmaktadır. Odontoblast uzantıları yan dallarla birbirine bağlanmaktadır (13, 183).

Odontoblast hücreleri arasında komşu odontoblastlar ile bağlantıyı sağlayan özel oluşumlar bulunmaktadır. Bunlar desmozomlar, geçirgen bölge (gap junction) ve sıkı bağlantılardır (tight junction). Desmozomlar dışarıdan gelen uyarılara karşı birlikte hareket etmeyi sağlarken, geçirgen bölge hücreler arası alışveriş ve iletişimi; sıkı bağlantı bölgesi (tight junction) ise dışarıdan yabancı madde girişinin engellenmesini sağlamaktadır (15, 183).

**Fibroblastlar:** Diş pulpasında en çok bulunan esas hücrelerdir ve en fazla oranda kuron pulpasında bulunurlar. Kollajen sentezinde aktif rol alan hücre grubudur. Uzantıları ile birleşerek pulpa dokusunun her tarafına yayılmışlardır. Elektron mikroskopunda iğ şeklinde görülürler. Odontoblastlar gibi mezenkimden gelişirler fakat odontoblastlara göre daha az farklılaşmış hücrelerdir. En sık hücreden zengin tabakada görülmektedir (13, 183).

**Savunma hücreleri:** Savunma hücreleri pulpada görülen iltihabi bir durumda pulpanın immün cevabını başlatan hücrelerdir (32).

*Farklılaşmamış mezenkim hücreleri* bütün bağ dokularında olduğu gibi pulpada da vardır. Hücreden zengin tabakada görülürler. Bu hücreler pulpa da kan damarlarının dışında bulunmaktadır. Bir yaralanmadan önce uzun olan bu hücreler, yaralanmayı takiben makrofajlara dönüşerek yabancı maddeleri sindirmektedir. Ayrıca bu hücreler gereksinime göre fibroblastlara ve odontoblastlara dönüşebilmektedir (13).

*Histiyositler* uzun silindirik şeklinde hücreler olup dışarıya uzantı verirler. Gerektiğinde bu uzantıları geri çekerek makrofajlara dönüşebilmekte böylece bakteri, yabancı cisim ve ölü hücreleri fagosite edebilmektedir (13).

Ayrıca pulpada; lenfosit, perisit, plazma hücresi, eozinofil, ameboid hücre ve mast hücresi gibi hücre tipleri de gösterilmiştir (8, 13, 32).

### 2.1.2. Hücreler Arası Esas Madde

Pulpa dokusunun hücreleri, kan damarları, sinirleri jelatinöz kıvamlı amorf yapıda bir ana madde içerisinde bulunmaktadır. Hücreler arasındaki bu yapı pulpa dokusunun bütünlüğünü sağlar. Pulpanın ana maddesinin molekül yapısı mukopolisakkaridlerdir. Bu bileşikler oldukça asidik olduklarından ‘asid mukopolisakkarid’ olarak isimlendirilirler. Pulpadaki asit mukopolisakkaridler; kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve hyaluronik asit tipinde glikozaminoglikanlardır. Glikozaminoglikanlar protein ve diğer sakkaritlere bağlanarak proteoglikanları oluştururlar. Hidrofilik yapıdaki bu büyük hacimli moleküller su ile birlikte jel bir yapı meydana getirmektedir (8, 13, 32). Aktif dentinogenez sürecinde görev alan en önemli proteoglikan, kondroitin sülfatken dişin sürmesiyle birlikte hyaluronik asit ve dermatan sülfat miktarında artış olmakta ve kondroitin sülfat miktarı önemli ölçüde azalmaktadır (151).

### 2.1.3. Pulpanın Bağ Dokusu Lifleri

Pulpayı oluşturan yapılardan bir diğeri bağ dokusu lifleridir.

*Kollajen Lifler:* Kollajen lifler en çok kural pulpada hücreden zengin tabakanın altında ve kan damarlarının etrafında bulunurlar. Pulpa kollajenleri 50 nm genişliğinde ve birkaç mikron uzunluğundaki liflerdir. Rastgele bir biçimde düzenlenmiş demetler oluştururlar. Dentin kollajeni tip I kollajen iken pulpa kollajenleri tip I ve tip III karışımıdır. Odontoblastlar dentin matriksi ile bütünleşmesi için sadece tip I kollajeni üretmekte, fibroblastlar ise hem tip I hem de tip III kollajenin üretilmesinden sorumlu olmaktadır. Kollajen tipinin oranı pulpada sabit olup yaş ile birlikte pulpanın genel kollajen içeriğinde bir artış meydana gelmektedir (13, 147, 183).

*Retiküler Lifler:* Retiküler lifler kan damarları ve odontoblastların çevresinde bulunmaktadır. Pulpa hücrelerinden çıkarak dönen bantlar halinde odontoblastlar arasından geçerek mineralize olmayan pre-dentin ağ yapısına girerler. Bu lifler dentine yakın yerlerde daha sık görülür ve ‘Von Korff lifleri’ olarak adlandırılmaktadır (13).

#### **2.1.4. Pulpanın Damarları**

Pulpanın kendine has, geniş ve özelleşmiş bir damarsal yapısı mevcuttur. Pulpada gerçek arter ve venler bulunmadığı için pulpadaki en büyük damarlar arteriyoller ve venüllerdir. Dişlere gelen arterlerin dalları olan bir veya birkaç arteriol, sinir demetleri ile birlikte foramen apikaleden girerek pulpanın kan akımını sağlamaktadır. Daha küçük damarlar da lateral veya yan kanallar yolu ile girebilirler (13, 147, 151). Arterioller kök pulpasının orta kısmından yukarıya doğru uzanarak yan dallarını odontoblast tabakasının altına doğru gönderirler. Kronal pulpaya ulaştıklarında incelerek yelpaze şeklinde açılıp terminal arteriyolleri ve prekapilleri oluşturmak suretiyle subodontoblastik alanda kapiller ağ meydana getirirler (159).

Venüller pulpadaki kan dolaşımının çıkış tarafını oluştururlar. Arteriollerden çok az daha genişler. Venüller venöz kılcal damarların bağlantı yerlerinden meydana gelirler ve daha fazla kılcal damar katıldıkça genişlerler. Apikal foramenden çıkarak arka bölgede maksiller vene, ön bölgede ise fasiyal vene dökülürler (183).

Pulpa kendini beslediği kadar dentini de beslemek zorundadır. Besinlerin ve artık ürünlerin alışverişi bu kılcal damarlarda meydana gelir. Pulpanın içinde, ihtiyacı olan bütün alanlara en iyi kan akımını temin eden birçok arteriyovenöz anastomozlar bulunur. Kan bu bağlantılarla arteriyollerden venüllere geçmektedir (183).

Pulpaya kanın sağlanması büyük oranda prekapiller sfinkterler ve bu sfinkterin innervasyonunu sağlayan sempatik sinir sistemi sayesinde olmaktadır (183).

#### **2.1.5. Pulpanın Lenf Damarları**

Lenfatik damarlar pulpanın çevresindeki küçük, kör uçlu ve ince duvarlı damarlardır (116). Bu damarların duvarlarında çeşitli kesintiler mevcuttur. Bu gözenekli yapı hücrelerarası doku sıvısının, hücrelerin, hücre artıklarının, plazma proteinlerinin ve gerekli olduğu durumlarda lenfositlerin damar duvarından geçmesini sağlamaktadır (183). Pulpadan dışarı çıktıktan sonra periodontal ligamentteki benzer damarlara katılarak bölgesel lenf düğümlerine drene olurlar (173).

#### **2.1.6. Pulpanın Sinirsel Uyarımı**

Pulpa dokusu hem duyu hem de motor sinirler içermektedir. Diş pulpasını inerve eden duyu sinirleri hem miyelinli hem de miyelinsiz aksonlar içermektedir. Pulpada iki tip duyu siniri lifi bulunmaktadır. Bunlar A ve C sinir lifleridir. A lifleri miyelinli

liflerdir ve çaplarının geniş olmasından dolayı hızlı iletim yaparlar. Hızlarına göre A-alfa, A-beta, A-gamma ve A-delta şeklinde alt gruplara ayrılırlar. Pulpada çoğunlukta bulunan A-delta lifleridir. C lifleri ise miyelinsiz lifler olup çaplarının da küçük olması nedeniyle ağrı liflerini daha düşük hızda taşırlar. A lifleri çoğunlukla mekanik ve termal uyarıların neden olduğu keskin ve batıcı tipteki ağrıları iletirken C lifleri sızı ve karıncalanma gibi yanıcı ve spontan ağrıları iletirler (13, 105, 151, 183).

Motor sinirler, otonom sistemin sempatik bölümünden kaynağını alırlar. Bu sinirler pulpa boşluğuna ana pulpa damarları ile girer ve onlarla birlikte dağılır. Bunlar damar çapını kontrol ederek kan hacmini, kan akımını ve pulpa içi basıncını kontrol altında tutmaktadır (183).

## **2.1.7. Pulpanın Fonksiyonları**

### **2.1.7.1. Pulpanın Dentin Yapıcı Görevi**

Diş yaşam süresi boyunca pulpa hücreleri farklı derecelerde ve değişik formlarda dentin yapımına devam ederler. Odontoblastlar dentin yapımına inorganik matriksi sentezleyip salgılayarak, yeni oluşmuş matrikse başlangıçta inorganik bileşenleri taşıyarak ve matriksin mineralizasyonuna izin veren bir ortam sağlayarak üç farklı yolla katılmaktadır (183).

Erken diş gelişimi boyunca primer dentin oluşumu hızlı ve düzenli bir şekilde ilerler. Primer dentinin kanallı bir yapısı vardır. Diş olgunluğa eriştikten sonra daha düşük hızla ve daha asimetrik bir biçimde oluşan ve primer dentine göre daha az sayıda kanal içeren dentin sekonder dentin olarak adlandırılır. Primer dentinin salgılanmasından sonra orijinal postmitotik odontoblastlar herhangi bir yaralanma durumu dışında istirahate geçerek yaşamları boyunca çok sınırlı miktarda sekonder dentin oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (13, 133).

Odontoblastlar çürük, travma veya restoratif işlemlerle ilişkili yaralanmaya cevap olarak da dentin üretebilmektedir. Yaralanmanın olduğu alanda konumlanan, primer ve sekonder dentine göre daha az organize olan bu dentin tersiyer dentin olarak adlandırılmaktadır (13, 183).

Tersiyer dentin, dış etkenin şiddetine ve ona karşı gelişen biyolojik olaylara bağlı olarak, kendi içinde reaksiyoner tersiyer dentin ve tamir dentini olmak üzere iki alt sınıfta değerlendirilmektedir. Reaksiyoner tersiyer dentin, hafif yaralanmalarda zarar

görmeyen odontoblastlar tarafından üretilen dentin kanalcıklarının devamlılık gösterdiği dentindir. Tamir dentini ise, şiddetli yaralanmalarda odontoblastlar canlılığını kaybettikten sonra farklılaşan kök hücreleri tarafından oluşturulan, kanalcıksız yapıda bir dentindir. Kemiğe benzer bir görünüm kazandığı için bu tip dentin '*osteodentin*' olarak da adlandırılır (13, 124, 183).

Tamir dentini ile primer veya sekonder dentinin tübülleri arasında devamlılık olmaması, tamir dentinindeki tübüllerin düzensiz ve az sayıda olması nedeniyle ve canlılığını kaybeden odontoblastların yerini alan yeni odontoblast benzeri hücrelerde genellikle sitoplazmik uzantı bulunmasından ötürü tersiyer dentinin geçirgenliğinin daha az olduğu düşünülmektedir (48, 135).

#### **2.1.7.2. Pulpanın Besleyici Görevi**

Pulpa, zengin kapiller ağ ve odontoblastik tabakadaki çok sayıdaki uzantılar ile oksijen ve besin maddelerini sağlayarak dentinin canlılığını korumak zorundadır (13).

#### **2.1.7.3. Pulpanın Sinirsel İşlevi**

Diğer bağ dokuları gibi diş pulpasının da temel fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için sinir kaynağına ihtiyacı vardır. Pulpadaki sinirler, direkt dokunun kendisine uygulanan ya da mine ve dentin boyunca oluşan uyarılara yanıt vermektedir. Uyaranların algılanabilmesi kendini savunma olanağı sağlamaktadır. Pulpa dokusu sinir uçları yoluyla kan damarlarının duvarlarındaki kas tabakasının genişleme ve büzülme hareketleriyle kontrol edilmesini sağlamakta ve kan akım hızını düzenlemektedir. Böylelikle kapiller ile doku arasındaki sıvı alışverişini etkilemekte ve pulpa içi basıncın şiddeti üzerine etkin olmaktadır (8, 13, 32).

#### **2.1.7.4. Pulpanın Savunma Görevi**

Odontoblastlar çürük, travma, atrizyon ya da restoratif işlemler nedeniyle dentin kalınlığının azaldığı ve devamlılığının bozulduğu durumlarda yeni odontoblastların indüklenmesi, farklılaşması ve bu alana göçünü sağlayarak dentin oluşumunu uyarmaktadır (183).

Ayrıca pulpa yabancı cisimleri tanımlama yeteneğine sahiptir. Örnek olarak diş çürüğündeki bakterilerin meydana getirdiği toksinleri tanıyarak bu maddelere bağışıklık yanıtı oluşturabilir (183).

## 2.2. Direkt Pulpa Kuafaj Tedavisi

Pulpa, kavite preparasyonu sırasında çürük oluşumu, travma veya iyatrojenik faktörler gibi nedenler ile perfore olabilmektedir. Direkt pulpa kuafaj tedavisi, kuronal doku kaybının sınırlı olduğu, dentin yapma gücünü yitirmemiş sağlıklı pulpanın canlılığını sağlamak ve iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla dentin yapımını uyaracak biyoyumlu bir materyal ile örtülmesi işlemidir (8, 124, 168).

Açık pulpa dokusunun üzeri biyolojik olarak, sızıntı ve oral kontaminasyonu engelleyecek şekilde kapatıldığında, pulpanın hücre reorganizasyonunu ve dentin köprüsü oluşumunu sağlayacak kapasitede olduğu kanıtlanmıştır (34, 172).

Direkt pulpa tedavisinde prognoz, tedavinin başlamasından önceki pulpanın durumu ile çok yakından ilgilidir (41). Hastanın genel sağlık durumu ve klinik hikayesi, çürüğün ilerlemesi, ileride yapılması planlanan restorasyon çeşidi, mevcut pulpa semptomları, pulpanın uyaranlara verdiği cevap, pulpal yaralanmanın büyüklüğü ve perforasyonun boyutları, pulpal kanamanın derecesi, periodontal durum ve perforasyonun üzerinden geçen süre uygulanacak tedavinin seçimi ve prognozu açısından önemli faktörlerdir (137).

Direk pulpa kuafajının pulpal kanamanın kontrol altına alınabildiği, irreversible pulpitis semptomları göstermeyen, perküsyon ve palpasyonda ağrı olmayan, vitalite testlerine olumlu cevap veren, restorasyon açısından madde kaybının fazla olmadığı dişlerde uygulanma endikasyonu bulunmaktadır (41, 175).

### 2.2.1. Direkt Pulpa Kuafaj Tedavisinde Başarıyı Etkileyen Faktörler

#### 2.2.1.1. Bakteri kontaminasyonu ve mikrosızıntı

Bakteriyel kontaminasyon direkt pulpa kuafajında başarıyı belirleyen en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Diş hekimliğinde uzun yıllar bir çok restoratif materyalin pulpa için toksik olduğuna inanılmıştır. Ancak 1970'li yıllardan itibaren yapılan çalışmalarda pulpanın bakteri sızıntısını önlediği sürece uygulanan materyalleri tolere edebildiği gösterilmiştir (12, 177). Pulpanın iyileşme kapasitesi incelendiğinde, pulpa iltihabı ve nekrozu oluşmasında bakteriyel sızıntının önlenmesi önemli bir etkidir. Çalışmalar bakteriyel mikrosızıntının dentin köprüsü oluşumunu azalttığını ve bu nedenle kullanılan kuafaj materyalinin mikrosızıntıyı önleyecek kapasitede ve özellikte olması gerektiğini göstermiştir (74, 124, 138). Ayrıca kavite preparasyonu sırasında oluşabilecek bakteriyel kontaminasyona engel olmak için

kavitede çürük bırakılmamasına, tükürük izolasyonun iyi yapılmasına dikkat edilmesi gerektiği bildirilmiştir (104, 126).

### **2.2.1.2. Perforasyonun Büyüklüğü**

Bazı araştırmacılar tarafından pulpal perforasyonun büyüklüğü arttıkça direkt pulpa tedavisinde başarının düştüğü düşünülse de, zaman içerisinde perforasyon boyutunun zannedildiği kadar etkili olmadığı, pulpanın durumunun ve bakteriyel kontaminasyonun tedavinin başarısı için daha önemli olduğu öne sürülmüştür (112). Travmaya bağlı oluşan geniş perforasyonlar ve amputasyon tedavisi sonrası dentin köprüsü oluşması da perforasyon büyüklüğünün başarıyı etkileyen bir faktör olmadığını düşündürmektedir (14, 38, 107, 112, 189).

### **2.2.1.3. Kanama kontrolü**

Direkt pulpa tedavisinde önemli faktörlerden biri de kuafaj materyalinin uygulanmasından önce kanama kontrolünün iyi bir şekilde sağlanabilmesidir (117, 170). Pulpanın perforasyonu odontoblast tabakasında harabiyete ve altında yer alan pulpa dokusundaki kapillerde hemorajiye neden olmaktadır. Kanama miktarı açılan kan damarlarının sayısına ve yaranın genişliğine bağlıdır (25).

Kanama kontrolünün sağlanması iki nedenle önemlidir. Bunlardan birincisi kontrol altına alınamayan kanamanın pulpada inflamasyon belirtisi olma ihtimali, diğeri kanamanın kontrol altına alınamamasına bağlı olarak çevre dentin dokusunun kirlenmesi ve bunun sonucunda uygulanacak materyalin iyi bir bağlanma sağlayamayarak mikrosızıntıya neden olmasıdır (45, 170). Ekspoze olmuş pulpa dokusu üzerinde kan pıhtısı kalmasının dentin köprüsü oluşum hızını azaltabileceği, ayrıca internal rezorpsiyona sebep olabileceği bildirilmiştir (25).

Pulpa perforasyonunda açılan bölgede küçük, açık kırmızı veya pembe renkli ve 2-3 dakika içerisinde kontrol altına alınabilen bir kanama mevcut ise pulpa kuafajı işlemi yapılması uygun görülmektedir. Açılan pulpada kanama yoğun ve kolayca kontrol altına alınamıyor ise pulpa kuafajında başarı ihtimalinin düşük olacağı düşünülmektedir (30, 136, 172).

### **2.2.1.4. Pulpanın yaşı**

Diş pulpasında yaşa bağlı olarak hücreler ve hücreler arası ana maddede bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Hücreler arası ana maddede hyaluronik asit azaldığı, kondroidin sülfatın ise arttığı gözlenmektedir. Ayrıca su-elektrolit dengesi değişmekte

ve hücreler arası maddenin fonksiyonları kısıtlanmaktadır. Genç bireylerde pulpa dokusunda hücreler çoğunlukta iken yaşlı bireylerde pulpa dokusunda fibröz doku ve kalsifik birikintilerde artma olur ve pulpa dokusunun hacminde küçülme olmaktadır (8, 13). Yaşa bağlı olarak hücre farklılaşması, mitoz hızı, yenilenme azalır ve hücreler atrofiye uğramaktadır. Buna bağlı olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri azalmakta ve dış etkenlere yanıt verme güçleri kaybolmaya başlamaktadır (8, 112). Direkt pulpa tedavisinde iyileşmenin genç bireylerde daha iyi olduğu düşünülse de, pulpanın yaşlanmasında kişinin yaşından çok dişi etkileyen dış faktörlerin önemli olduğu bildirilmiştir (112).

#### **2.2.1.5. Kavite dezenfeksiyonu**

Kavite preparasyonunu sonrası çürükten etkilenmiş mine ve dentinin yetersiz miktarda uzaklaştırılması sonucu kavite içerisinde bırakılabilen bakteriler iyi bir restorasyon sağlanabilse de pulpaya difuze olarak pulpal irritasyon ve inflamasyona sebep olmaktadır. Bu nedenle genellikle dentin dezenfeksiyonu amacı ile kavite dezenfektanlarının kullanılması veya içeriğinde dezenfektan etkili bileşimlerin var olduğu materyallerin kullanılması önerilmektedir (20, 134).

#### **2.2.1.6. Uygulama yapılan dişin süt ya da sürekli diş olması**

Süt dişlerinde direkt pulpa kuafajı tavsiye edilmemekle birlikte olgunlaşmamış sürekli dişlerde başarı ile kullanılabilir. Süt dişlerinde direkt pulpa kuafajındaki başarısızlığın süt dişi pulpasının yüksek hücresel içeriğinden kaynaklanabileceği ve farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin odontoklastlara dönüşerek internal rezorbsiyona neden olması sebebi ile gerçekleştiği öne sürülmüştür (98, 104).

#### **2.2.1.7. İyatrojenik faktörler**

Tedavi sürecinde, kavite preparasyonu sırasında el aletinin veya frezin uyguladığı basınç, frezin dönme hızı, sürtünmeye bağlı oluşan ısı, kullanılan soğutucunun çeşidi ve kavite dezenfeksiyonu için kullanılan bazı ajanlar, kuafaj materyalinin yerleştirilmesi sırasında uygulanan basınç gibi birçok dış faktörün pulpa dokusunun tedaviye vereceği yanıtı olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (36, 67, 125, 172).

### 2.2.1.8. Kullanılan kuafaj materyali seçimi

Başarılı bir kuafaj tedavisi için, direkt pulpa kuafaj tedavisinde kullanılan materyallerin çeşitli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Kullanılan kuafaj materyali biyouyumlu olmalı, açığa çıkmış pulpa dokusuna iyi bir bağlantı sağlayarak bakteriyel sızıntıyı önleyebilmeli ve tamir dentin köprüsü oluşumunu uyarabilmelidir (33, 134).

Direkt pulpa kuafajı için geçmişten günümüze kadar deneysel veya tedavi amaçlı birçok materyal önerilmiştir. Bunlar; kalsiyum hidroksit (4, 5, 39, 56, 77, 117), adeziv sistemler (6, 56, 60, 77, 101), büyüme faktörleri (78, 140), siyanoakrilatlar (39, 143), hidroksiapatit (174), hyaluronik asit (18, 162), tetrakalsiyum fosfat (192), çeşitli antibiyotikler (21, 119), kortikostreoidler (21, 81), dentin parçaları (139), albumin (130), kondroitin sülfat (91), kollajen (91), propolis (51, 160), mineral trioksit agregat (4, 5, 16, 22, 54, 142) ve Biodentine (142, 144)'dir.

### 2.3. Kalsiyum Hidroksit

İlk olarak 1838 yılında Nygren ve 1851 yılında Codman tarafından kullanılan kalsiyum hidroksitin diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılması 1920 yılında Herman tarafından pulpa kaplama ajanı olarak önerilmesinden sonra başlamıştır. Kalsiyum hidroksit direkt ve indirekt pulpa kuafajı, apeksogenezis, apeksifikasyon, kök rezorpsiyonları, iatrojenik kök perforasyonları, kök kırıkları, reimplante dişlerin tedavisi ve seanslar arası kök kanal medikamenti gibi çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Günümüzde halen kuafaj tedavilerinde sıklıkla kullanılmakta, çalışmalarda 'altın standart' olarak kabul görmektedir (7, 55).

Kalsiyum hidroksit molekül ağırlığı 74.08 olan, suda düşük çözünürlük gösteren (25°C'de 1.2 g/l), beyaz kokusuz bir tozdur ve 12.5-12.8 arasında değişen pH'lardaki formları mevcuttur. Kalsiyum hidroksitin düşük çözülme değeri, kalsiyum ve hidroksil iyonlarının yavaş salınımı sağlamakta ve bu özelliği uzun dönem kullanımı için avantaj yaratmaktadır (55).

Kalsiyum hidroksitin antibakteriyel etkisinin hem yüksek alkalen özelliği hem de reaktif bir serbest radikal olan hidroksil iyonlarının salımına bağlı olduğu bildirilmiştir (59). Ortama salınan hidroksil iyonları etkilerini bakterilerde hücre membran hasarı oluşturarak, protein denatürasyonu yaparak ve bakteriyel hücrenin DNA'sına zarar vererek göstermektedir (52, 55).

Kalsiyum hidroksitin pulpa dokusu üzerinde yüksek pH'sından kaynaklanan bir kostik etki (kimyasal koterizasyon) yarattığı ve bu kostik etki sonucunda oluşan nekrozun dentin köprüsü yapımı için uyarıcı bir etki gösterdiği bildirilmektedir. Açık pulpa dokusu üzerine kalsiyum hidroksit patı yerleştirildiğinde kuvvetli kimyasal etki ile enzimleri bloke ederek yüzeysel likefaksiyon nekrozuna neden olmaktadır. Bu bölgede dokunun yapısı bozularak koagülasyon nekrozu oluşmakta ve bu tabakanın altındaki mezenkim hücreleri nekrotik tabaka tarafından indüklenerek önce fibroblastlara daha sonra odontoblastlara dönüşmektedir. Koagüle nekrotik dokunun yaygın olarak kalsifiye hale gelmesi sonucunda sert doku köprüsü olduğu ancak oluşan dentin köprüsünde tünel defektlerine sahip bir yapı olabildiği bilinmektedir (16, 33, 167).

Kalsiyum hidroksitin hidroksil grubunun oluşturduğu alkali pH, dentinin mineral yapısını bozan osteoklast kaynaklı laktik asitin nötralizasyonunu sağlamakla birlikte aynı zamanda sert doku oluşumunda önemli rol oynayan alkalen fosfataz enzimini de aktive etmektedir. Alkalen fosfataz, fosfat esterlerini ayırarak fosfat iyonlarının serbestleşmesini sağlamakta, serbestleşen fosfat ise kalsiyum iyonları ile etkileşerek organik matrikste kalsiyum fosfat olarak çökelmektedir (128).

Yapılan çalışmalarda kalsiyum hidroksit uygulanması sonucu pulpa yüzeyinde duran enzimatik faaliyetlerin ancak yedi gün sonra başladığını ve farklılaşan bu yeni hücrelerin ancak 28. günde orjinal hücrelerin enzimatik faaliyet düzeyine ulaştığını göstermiştir (13). Stanley ve ark. çalışmalarında ilk tamir dentinini 12. günde gözlediklerini bildirirken (171), Mcwalter ve ark. dentin köprüsünün 1-4 aylar arasında oluştuğunu belirtmişlerdir (118).

Kalsiyum hidroksitin dentin köprüsü oluşturması üzerine diğer bir görüş ise, kalsiyum hidroksiti sert doku oluşumunu uyardığı fakat mineralizasyon sırasındaki kalsiyum iyonlarının tamir bölgesine kan dolaşımı yoluyla geldiği şeklindedir. Buna göre kalsiyum hidroksit mineralizasyon için bir kaynak değil, mineralizasyonu stimüle eden bir araçtır (72).

Bazı araştırmacılar kalsiyum hidroksit sonrası dentin köprüsü oluşumu gözlenebile pulpanın kronik iltihaplı kalabildiğini ve canlı pulpanın kalsiyum hidroksitle örtülmesini takiben iç rezorsiyon görülebildiğini bildirmişlerdir (13, 166).

Kalsiyum hidroksit esaslı materyallerin tamir dentini oluşumunu uyarması ve yapılan pulpa kuafajından sonra uzun dönemli takiplerde pulpa dokusunun canlılığını koruduğunun gösterilmesi en olumlu özelliği olarak bilinmektedir. Ancak kalsiyum hidroksit altındaki dentin köprülerinde gözlenebilen tünel defektleri nedeniyle materyalin dentin yüzeyine zayıf bağlanması sonucu mikrosızıntının önlenemediği ve bir süre sonra restorasyon altında çözündüğü gözlenmiştir. Bu olumsuz özelliklerinedeni ile kalsiyum hidroksite alternatif olabilecek klinik materyaller konusundaki arayışlar halen devam etmektedir (35, 65, 76, 133).

#### **2.4. Mineral Trioksit Agregat (MTA)**

İlk olarak 1993 yılında Torabinejad tarafından Loma Linda üniversitesinde geliştirilen Mineral Trioksit Agregat 1998 yılında “Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA)” tarafından onaylanmış ve klinik kullanım alanı bulmuştur (179).

MTA, Torabinejad ve ark. tarafından trikalsiyum silikat ( $3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ ), trikalsiyum aluminat ( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ ), trikalsiyum oksit ( $\text{Ca}_2\text{O}_3$ ) ve silikat oksit'in ( $\text{SiO}_2$ ) ince hidrofilik partiküllerini içeren bir toz olarak tanımlanmıştır. Bizmut oksit ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) tozu yapıya radyopak özelliği sağlamak amacıyla katılmıştır (181). Piyasada gri ve beyaz MTA olarak iki formda bulunmaktadır. İlk olarak gri versiyonu üretilmiştir. Ancak ön dişlerde renkleşmeye neden olduğu için daha sonra beyaz MTA piyasaya sürülmüştür. Beyaz renkli MTA'da gri renkli olan MTA'dan farklı olarak tetra kalsiyum alumino ferrit ( $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) bulunmamaktadır. Ayrıca beyaz MTA'nın gri MTA'ya göre daha küçük partiküller içerdiği bildirilmektedir (57).

1995 yılında ticari olarak ProRoot® MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) şeklinde piyasaya sunulan gri MTA ilk olarak kök ucu dolgu materyali olarak kullanılmış; daha sonra günümüze kadar furkasyon perforasyonlarının tamiri, süt ve sürekli dişlerin pulpa kuafajı, süt dişi pulpatomi tedavileri, apeksifikasyon, süt ve sürekli dişlerin kök kanal tedavisi, rezorbe defektlerin tamiri, iyatrojenik perforasyonların tamiri gibi çeşitli klinik uygulamalarda kullanım alanı bulmuştur (179).

MTA tozu su ile karıştırıldığında yaklaşık 3 saatte sertleşen kolleidal jel haline gelmektedir. Torabinejad ve ark. ProRoot® MTA için sertleşme süresini 2 saat 45 dk (+5 dk) olarak rapor etmiştir (180). Gandolfi ve ark. gri MTA'nın sertleşme süresini 2 saat 50 dk olarak bildirirken (63), Islam ve ark. beyaz MTA için final sertleşme

süresisini 140 dk, gri MTA için ise 175 dk olarak bildirmiştir (86). MTA'nın diğer materyallere göre uzun sürede sertleşmesi klinik olarak bir dezavantaj olarak görülsede, buna bağlı olarak daha az boyut kaybına uğraması mikrosızıntıyı önlemesi açısından lehine bir özellik olarak değerlendirilmiştir (180).

MTA düşük çözünürlük özelliğine sahiptir, ayrıca hidrofilik özelliğinden dolayı çevre dokudaki nem varlığı bu materyalin kimyasal reaksiyonu için bir aktivatör vazifesi görmektedir. Radyoopasitesinin dentinden biraz daha fazla olduğu bildirilmektedir (181).

MTA karıştırıldığında pH değeri 10,2 olarak görülürken sertleşme reaksiyonundan sonra pH'sının 12,5'e yükseldiği bildirilmektedir. Gri MTA ile karşılaştırıldığında beyaz MTA'nın karıştırıldıktan 60 dk. sonra belirgin derecede daha yüksek pH değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Maddenin mikroorganizmalara karşı olan antibakteriyel etkisinin bu yüksek pH özelliğine bağlı olduğu düşünülmektedir. MTA'nın kalsiyum hidroksit ile benzer alkali pH derecelerine sahip olması, her iki materyalin de sert doku oluşumunu indüklemeye özelliğini artırdığını düşündürmektedir (86, 180).

Materyalin etki mekanizmasıyla ilgili olarak temelde kalsiyum hidroksit içermediği, yapısındaki kalsiyum oksit doku sıvıları ile teması sonucu kalsiyum hidroksite dönüştüğü şeklinde görüşler olduğu gibi, materyalin saldıdığı temel iyonun kalsiyum olduğu ve salınan kalsiyumun doku sıvılarındaki fosfatlarla reaksiyona girerek hidroksiapatit oluşumu gözlemlendiği şeklinde farklı görüşler de mevcuttur (75, 161).

MTA'nın doku tarafından iyi tolere edilebilir bir materyal olduğu, aynı zamanda hücre farklılaşması ve aktivasyonunu uyararak sert doku oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir. MTA'nın oluşturduğu dentinogenez, materyalin sızdırmazlık özelliğinin, yüksek doku uyumunun ve bazik karakterde olmasının bir sonucu olduğu belirtilmektedir (122, 149, 181).

Aeinehchi ve ark. insanlarda pulpa kuafaj materyali olarak MTA ve kalsiyum hidroksiti kıyasladıkları histolojik bir çalışmada; MTA grubunda kalsiyum hidroksit grubuna göre daha sık odontoblastik tabaka formasyonu ve daha kalın dentin tabakası gözlemlendiğini, ayrıca daha az hiperemi, nekroz ve iltihap oluştuğunu belirtmişlerdir (5).

In-vitro araştırmaların birçoğu MTA'nın, sert doku iyileşmesi s¼recinde gerekli olan sitokin ve sinyal molek¼llerinin üretimini teşvik ettiğini g¼stermektedir. Bonson ve ark. MTA'nın gingival ve periodontal h¼crelerde alkalen fosfataz, osteonektin, osteopontin ve osteonidjen gibi osteojenik fenotipler ¼zerinde ind¼ksiyon etkisi olduğunu g¼stermiřtir (19).

Son yıllarda materyalin antimikrobiyal ¼zelliklerini geliştirmek i¼in klorheksidin gibi ajanlarla karıştırılması y¼n¼nde ¼alıřmalar yapılmakla birlikte bu uygulamanın sitotoksik ¼zellięi arttırdığı d¼ř¼n¼lmektedir. Hernandez ve ark. yaptıkları bir ¼alıřmada distile su ve % 0.12'lik klorheksidin ile hazırladıkları MTA'yı fare gingival fibroblast ve makrofaj h¼creleri ¼zerine uygulayarak h¼creler ¼zerinde oluşturdukları apoptozu incelemişler, sonu¼ olarak klorheksidinle karıştırılan grupta h¼cre apoptozunun ind¼klendięi belirtmişlerdir (73).

MTA'nın basıncı dayancı d¼ř¼k olduğu i¼in daimi dolgu maddesi olarak kullanımı ¼nerilmemektedir. Bir restoratif madde ile birlikte kullanıldığında MTA, biyouyumluluğu ve bakteriyel sızdırmazlık gibi ¼zellikleri sayesinde pulpanın korunması, tamiri ve canlılığının devamını sağlamada ideal bir materyal olarak ¼n plana ¼ıkmaktadır. Ancak teknik olarak halen ¼z¼lemediř renkleşme problemi, sertleşme s¼resinin uzun olması, taşıma ve yerleştirme g¼çl¼ę¼ ve y¼ksek maliyet gibi dezavantajlarının klinik kullanımı sınırlandırdığı bildirilmekte ve bu nedenlere bağlı olarak alternatif materyal arayışları devam etmektedir (17, 23, 90, 179).

## **2.5. Biodentine™**

Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) aktif biyosilikat teknolojisi ile ¼retilmiř kalsiyum silikat esaslı yeni bir materyaldir. Toz kısmı bir kaps¼l i¼erisindeki trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat, zirkonyum oksitten oluşurken likit kısmı ayrı bir t¼p i¼erisindeki kalsiyum kloritten oluşmaktadır. Likit kısmın kaps¼le eklenmesi sonrası amalgamat¼rde karıştırılarak kullanıma hazır hale gelmektedir (145, 157). Trikalsiyum silikat MTA ve Biodentine™ i¼in ortak komponent olarak g¼z¼kse de X-ray difraksiyon analizi, Biodentine™'nin yapısındaki trikalsiyum silikatın triklinik kristal formunda, MTA'nın ise monoklinik kristal formunda olduğunu g¼stermiřtir. Ayrıca Biodentine™'in MTA'ya g¼re daha k¼çük yapıda ve y¼zey alanına g¼re daha fazla sayıda trikalsiyum silikat partik¼l¼nden oluştuğu bildirilmiştir (24).

Biodentine™'in toz ve likit kısımları karıştıktan sonra jel bir yapıya dönüşmektedir, ardından iyonik değişim başlamakta ve sertleşme reaksiyonu sonrası tamamen katı halini almaktadır (24). Sertleşme süresi üretici firma tarafından 12 dakika olarak bildirilmekle beraber Grech ve ark. yaptıkları çalışmalarında final sertleşme süresini 45 dakika (69), Kaun ve arkadaşları 85.66 dakika olarak belirtmişlerdir (95). Biodentine™'in elastiklik modülü dentine çok benzer olup 22.0 Gpa'dır. Basınç dayanımı ve mikrosertlik değerleri de dentin dokusuna benzemektedir (157).

Bu materyal ilk olarak dentinin taklit edebilen bir materyal olarak tanıtılmış ve iyi tıkama kabiliyeti, yüksek sıkışma dayanımı, kısa sertleşme süresi, biyouyumlu ve biyoaktif oluşu gibi özellikleri nedeniyle kuron ve kök perforasyonlarının tamiri, apeksifikasyon ve kök ucunun doldurulması gibi işlemler için kullanımı önerilmiştir (145, 157).

Biodentine™ yeni bir materyal olmakla beraber, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda veriler materyalin periradiküler ve pulpal hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı ve doku tarafından kabul edilebilir bir materyal olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada gömük üçüncü büyük azı dişlerinden elde edilen dental kök hücreler üzerinde Biodentine'in hücre proliferasyonu, migrasyonu ve adezyonunu artırdığı belirlenmiş ve bu özellik materyalin biyoaktif ve biyouyumlu olmasına bağlanmıştır (114).

Biodentine™, uygulandığı alanda pulpa hücrelerini uyararak hücrelerde erken mineralizasyonu başlatan TGF-B1 sekresyonunu artırmaktadır. Sertleşme reaksiyonu sırasında ortaya çıkan kalsiyum hidroksitin yüksek pH'sına bağlı olarak yara bölgesinde koagülasyon nekrozu oluşturmaktadır. Bu nekroz alanı öncü hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını uyararak reaksiyoner dentin oluşumunu sağlamaktadır. Antibakteriyel özelliği de yüksek alkalin yapısından kaynaklanmaktadır (157). Araştırmacılar fare pulpa hücreleri üzerinde Biodentine™'in biyoaktif etkisi olduğunu, hücrelerde proliferasyonu artırdığını ve biyomineralizasyonu indüklediğini göstermiştir (193).

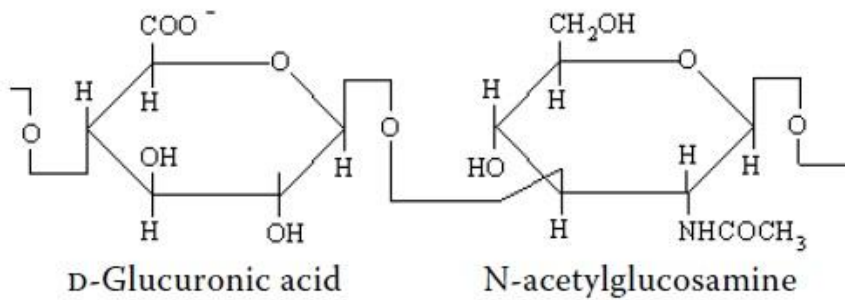
Laurent ve ark. insan lefositleri ve pulpa hücreleri üzerinde Biodentine™'in sitotoksik ve genotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında materyalin mutajenik olmadığını, biyouyumluluğu olduğunu ve hücrelerin mineralizasyon, kollajen sentezi, dentin sialoprotein sentezi, nestin ekspresyonu gibi spesifik fonksiyonlarını olumsuz etkilemediğini belirtmişlerdir (108). Diğer bir çalışmada ise Biodentine™'nin pulpa

progenitör hücreleri aktive ederek odontoblastlara farklılaşmasını ve dentin rejenerasyonu sağladıklarını belirtmişlerdir (3).

Nowicka ve ark. ortodontik amaçla çekilecek olan 28 sürekli dişe direkt kuafaj materyali olarak Biodentine™ ve MTA'yı uygulamışlar; her iki grupta da 6 haftalık gözlem periyodu boyunca örneklerin büyük çoğunluğunda dentin formasyonu gözlenirken enflamatuvar pulpa cevabının olmadığını ve kuafaj materyali olarak Biodentine™'in MTA'ya iyi bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir (144).

## 2.6. Hyaluronik Asit

“Hyaluronat” veya “hyaluronan” olarak da bilinen Hyaluronik Asit (HA) özellikle bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde bulunan,  $\beta$ 1-3 ve  $\beta$ 1-4 glikozidik bağlarla bağlanmış glukuronik asit ve n-asetilglukozamin disakkaritlerinin lineer polimeridir (Şekil 2-1). İlk olarak 1934 yılında Karl Meyer ve John Palmer tarafından gözün vitröz cisminde keşfedilmiştir. Ardından eklemlerin sinovyal sıvısı ve deri, kıkırdak, göbek bağı, ekstrasellüler matriks, eklem kapsülü, kas dokusu gibi birçok vücut bölgesinde varlığı tespit edilmiştir. Organizmada her yerde dağılmış olmasına rağmen en yüksek oranda bağ dokusunda, en düşük oranda ise kan serumunda bulunmaktadır (141).



Şekil 2-1: Hyaluronik asitin kimyasal yapısı

Vücuttaki birçok hücre, hücre sikluslarının belirli bir aşamasında HA sentezleyebilme kapasitesine sahiptir. HA ekstrasellüler matriksin pasif, yapısal bir bileşeni olarak düşünülmüşse de günümüzde hücre migrasyonu ve morfogenezisin de içinde bulunduğu bazı biyolojik olaylarda etkili olduğu bilinmektedir (1, 188).

HA ya hayvansal kaynaklardan ya da bakteriden fermentasyon ya da doğrudan izolasyonla elde edilir. Elde edildiği hayvansal kaynaklar, horoz ibiği, omurilik, deri ve eklem sıvısıdır. Diğer hayvansal dokulara göre oldukça yüksek oranda HA taşıması nedeniyle, en fazla kullanılan kaynak horoz ibiğidir. Mikroorganizmalardan fermentasyon tekniği ile elde edilen HA yüksek saflıktadır (178).

### **2.6.1. Hyaluronik Asitin Fizikokimyasal ve Yapısal Özellikleri**

HA doğadaki en higroskopik moleküllerden birisidir. İçinde bulunduğu ortamdaki su moleküllerini difüzyon yoluyla veya çeperinde yoğunlaştırarak azaltabilmektedir. Bu özellik biyolojik fonksiyonlarına katkıda bulunan esas özelliktir ve tüm iyileşme, hücre yenilenmesi, hücre sinyali, dokulara yapışma süreçlerini etkilemektedir. Su tutabilme yeteneği ile ekstrasellüler matriks içinde yarattığı hacim kendi hacminin 1000 katı kadardır. Bu sayede hücrelerin proliferasyonuna izin verirken inhibitör temasları önleyebilmektedir (9, 29, 50, 89).

Farklı molekül ağırlığına sahip olan HA'nın molekül ağırlığı  $1 \times 10^5$  ile  $10^7$  Da (Dalton, MA birimi) arasında değişmektedir. Yapısına eklenen her disakkarit için yaklaşık 400 dalton kadar ağırlığı artmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıkta ve moleküler yapısı yoğun bir şekilde polimerize iken biyolojik işlevi en yüksek seviyededir. Suda çözünen HA çok visközdür. Viskoelastisitesi, molekül ağırlığına, konsantrasyonuna, pH'sına ve iyon gücüne bağlı olarak değişebilmektedir (87, 141).

HA fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak CD44 ve RHAMM adı verilen membran reseptörleri aracılığı ile değişik hücrelerle etkileşime girebilmektedir. Reseptörler aracılığı ile embriyonik dönemde hücre gelişimi ve farklılaşması, hücrel homeostazın sürdürülmesi, doku hidrasyonun sağlanması, matriks yapısının düzenlenmesi ve proteoglikan organizasyonu, hücreler arası madde göçünün önlenmesi ve hücrel hareketleri etkilemek gibi pek çok olayda biyolojik rol oynamaktadır (87, 141).

### **2.6.2. Hyaluronik Asitin Sentezi**

HA'nın matriks molekülleri arasında kendine has özellikleri bulunmaktadır. Kondroitin sülfat, keratan sülfat gibi diğer glukozaminoglikanlar golgi cisimciğinde sentezlenirken HA plazma membranının sitoplazmasında sentezlenmektedir. Ayrıca HA

sülfat içermemesi ve proteinlere kovalent bağlarla bağlanabilmesi gibi özellikleri ile diğer glukozaminlerden farklıdır (97).

HA'nın biyosentezinden sorumlu moleküler mekanizma ile yeterli bir bilgi olmamakla birlikte biyosentez hızı; büyüme faktörleri, hormonlar, inflamatuvar mediatörler gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir (9, 97). Yeni sentezlenen HA sentezin ardından doğrudan ekstrasellüler boşluğa salınmakta ve sentez alanında son derece hidrate bir mikroçevre oluşumunu sağlamaktadır (9, 29).

### **2.6.3. Hyaluronik Asitin Yara İyileşmesindeki Rolü**

Serbest HA konsantrasyonu istirahat dönemlerinde kollajenlerle ve diğer yüksek molekül ağırlıklı maddelerle çapraz bağlı bulunması nedeniyle düşük iken doku yaralanmasından hemen sonra önemli miktarda yükselmektedir (100, 187).

HA, mineralize ve mineralize olmayan tüm dokulardaki yara iyileşme süreçlerinde önemli bir role sahiptir (131). Yaralanmayı takiben yara iyileşmesinde sırasıyla gerçekleşen inflamasyon, granülasyon doku formasyonu, reepitelizasyon ve remodeling safhalarında hücre ve hücre dışı matriks faaliyetlerinde önemli görevler taşımaktadır (64).

İnflamasyon safhasında bu bölgede ciddi bir artış göstererek inflamasyon tamir sürecini başlatmakta ve ekstrasellüler matriks hücrelerinin inflamasyon bölgesine göçünü sağlamaktadır. Yara iyileşmesinin ikinci aşaması olan granülasyon dokusunun ve matriksinin oluşumu safhasında HA çeşitli hücre fonksiyonlarına katkıda bulunarak granülasyon dokusunun organizasyonunu sağlamaktadır. Bunu fizyokimyasal özellikleri sayesinde, hücre migrasyonunu kolaylaştıran hidrate bir matriks oluşturularak ve spesifik hücrelerin yüzey reseptörleriyle etkileşimde bulunarak düzenlemektedir. Granülasyon dokusu oluşumundan sonra gerçekleşen hücre proliferasyonu aşamasında artmış HA seviyesi fibroblastların matriksten ayrılarak mitoz bölünmesini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle HA'nın hücre proliferasyonuna direkt etkiyle olmasa bile dolaylı olarak mitoz mitojenik aktiviteyi etkilediği düşünülmektedir (29, 131).

Yara iyileşmesinde ilk olarak ortaya çıkan inflamasyon oldukça şiddetli olmakta ve inflamatuvar hücreler tarafından yüksek oranda doku yıkımına neden olan reaktif O<sub>2</sub> metabolitleri salınmaktadır. Doku formasyonunu oluşturabilmesi için iltihabi yanıtın

hafiflemesi gerekmektedir. HA serbest radikallerin hücelere zarar vermesini engelleyerek inflamasyonun hafiflemesine yardımcı olmakta ve granülasyon doku matriksinin stabilizasyonuna olanak sağlamaktadır (29, 131).

#### **2.6.4. Diş Hekimliğinde Hyaluronik Asit Uygulamaları İle İlgili Çalışmalar**

HA fizikokimyasal özellikleri ve saf formunun non immünojenik olması nedeniyle tıp alanında uzun yıllardır uygulama alanı bulmuştur. HA'nın viskoelastik matris yapısı, destek maddesi olarak kullanımına olanak vermektedir. Bu nedenle özellikle göz cerrahisinde ve yara iyileştirmeyi hızlandırma amaçlı olarak kullanımı söz konusudur. Ayrıca osteoartrit belirtilerini azaltabilmek için eklem içine uygulanabilmektedir. Ortopedi, romatoloji, dermatoloji, oftalmoloji gibi alanlarda sıklıkla kullanılan HA'nın yakın zaman içerisinde doku onarım amaçlı olarak yaralara eksojen olarak uygulamaları bildirilmiştir ve HA esaslı biomateryaller üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (29).

HA'nın jel formunun bariyer görevi görmesi, antiinflamatuvar ve antiödematöz özellikleri ağız içindeki ülserle lezyonlar üzerinde klinik olarak kullanımını avantajlı hale getirmiştir (40).

Yapılan bir araştırmada, araştırmacılar rekkürent aftöz stomatitis ve Behçet hastalığına bağlı oral ülserli hastalarda iki hafta boyunca günde iki kez %0.2'lik HA jel uygulamışlar ve inflamasyon belirtilerinden şişlik, kırmızılık ve lokal ısı bulgularının önemli miktarda azaldığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, topikal %0.2'lik HA kullanımının bu hasta grubunda etkili ve güvenli bir tedavi şekli olduğunu belirtmişlerdir (111).

Diş hekimliğinde rejeneratif cerrahi işlemler üzerinde yapılan çalışmalarda da yüksek molekül ağırlıklı HA'nın oral ve periodontal lezyonlarda bulunan mikroorganizmalar üzerinde bakteriyostatik etki gösterdiği ve yara iyileşmesini olumlu etkilediği gösterilmiştir (153).

Pirnazar ve ark. HA'nın periodontal doku rejenarasyonunda terapotik etkisini inceledikleri çalışmalarında oral ve oral olmayan mikroorganizma (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella oris*, *Staphylococcus aureus*, and *Propionibacterium acnes*) kültürleri üzerine düşük (141kDa), orta (757 kDa) ve yüksek (1300 kDa) molekül ağırlıklı HA'yı distile su içerisinde çözerek farklı konsantrasyonlarda

uygulamışlar ve sonuç olarak yüksek molekül ağırlıklı HA'nın bakteriyel kontaminasyonunu minimize ederek yara iyileşmesi lehine koşullar oluşturabileceğini belirtmişlerdir (153).

Engström ve ark. periodontal kemik defektleri olan hastalarda HA'nın cerrahi ve cerrahi olmayan uygulamalardan sonra antienflamatuar ve kemik rejenerasyonu üzerine olan etkisini incelemişlerdir. 12 aylık klinik ve radyografik gözlem sonucunda her iki grupta da HA uygulanan gruplarda kemik apozisyonunun görüldüğünü, periodontal cep derinliğinde azalmanın daha fazla olduğunu ve hem kemik dokusunda hem de yumuşak dokuda HA'ya karşı bir immün yanıtın gelişmediğini belirtmişlerdir (50).

Son yıllarda HA'nın vital pulpanın canlılığının korunması için alternatif bir materyal olarak kullanılabilirliği üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

HA'nın rat pulpa dokusundan elde edilen odontoblast ve fibroblastlar üzerine olan etkisinin incelendiği in vitro bir çalışmada HA, kalsiyum hidroksit ve dentin adesiv materyalleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda HA ile muamele edilmiş kültürlerde kontrol grubu, kalsiyum hidroksit ve dentin adesivlere oranla daha fazla sayıda odontoblast ve fibroblast hücresi varlığını saptamışlar ve HA'nın onarıcı dentin oluşturmak için iyi bir potansiyel gösterdiğini belirtmişlerdir. HA'nın mineralizasyon lehine olumlu koşullar yarattığını bildirmişlerdir (18).

Yapılan başka bir çalışmada yüksek molekül ağırlıklı HA'yı rat molar dişlerinde kuafaj materyali olarak kullanmışlar ve 2. haftada yara kenarlarında ince reperatif dentin tabakalarının oluştuğunu, 1. ve 2. aylarda oluşan reperatif dentinin, dentin duvarlarından pulpa odasının merkezine doğru ilerlediğini gözlemlemişlerdir (162).

## **2.7. Biyouyumluluk ve Sitotoksiste**

Biyouyumluluk bir materyalin canlı dokular ile temasta iken sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki oluşturmayan inert özelliklere sahip olması ve vücudun yumuşak ve sert dokularında herhangi bir doku reaksiyonu oluşturmaması olarak tanımlanmaktadır. Bir materyalin biyouyumluluğu materyalin tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlanmaktadır (163, 185).

Biyouyumlu olmayan materyallere karşı oluşan olumsuz doku reaksiyonları 'toksisite' olarak değerlendirilmektedir. 'Sitotoksiste' moleküler olaylar sonucu çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin

fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır (156, 185).

Günümüzde yeni bir materyalin klinik olarak kullanımına geçmeden önce geniş kapsamlı testler ile biyoyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit in vitro test yöntemleri ile başlanmaktadır ve değerlendirmelere daha pahalı ve uzun zaman gerektiren hayvan testleri ile devam edilmektedir. Bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde kullanım testleri gibi daha kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır (185).

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) testlerin belirli standartlarda yapılması amacıyla diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyallerin biyoyumluluğunun değerlendirilmesi için ISO 7405 dokümanını sunmuştur. Bu dokümanda geçen testlere ek olarak ISO 10993-5 standartları da in vitro sitotoksik testleri için önerilen genel bir test protokolüdür (83, 84).

### **2.7.1. Sitotoksik Testlerinde Biyolojik Sistemler**

Sitotoksik testlerinde kullanılan biyolojik sistemler organ kültürleri, kültür hücreleri ve hücre organelleridir. Bunların arasında en yaygın kullanılan biyolojik ortam kültür ortamındaki hücrelerdir (163). Hücre kültürü uygulamalarında temel amaç canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır (163, 185). Hücre kültürü çalışmalarında çoğunlukla primer kültür ve devamlı hücre soyları olmak üzere iki tip hücre kullanılmaktadır (185).

Primer hücre kültürleri bir canlının doku ve organlarından direkt alınıp kültüre konarak 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilmektedir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotipi ve fenotipi yönden orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içermektedir. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadır ve bu şekilde alt kültürler elde edilmektedir. Bu işlem seri bir şekilde yapıldığında devamlı hücre hatları elde edilmektedir. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik özelliğini inceleyen çalışmaların çoğunda devamlı hücre soyu olarak fare fibroblastları (3T3 ve L929) kullanılmaktadır (163).

Hücre kültürü çalışmaları maliyeti düşük ve tekrarlanabilir olması, kısa süreli etkileşimlerin incelenmesinde kullanışlı olması, hücre üzerinde etkilerinin direkt gözlemlenebilerek standart ölçümler yapılabilmesi ve ortam şartlarının kontrol edilebilir olması gibi avantajların yanı sıra kontaminasyon riski, çok fazla hücre üretmenin zaman alması, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik incelemenin uzmanlık gerektirmesi gibi dezavantajlara da sahiptir (154).

### **2.7.2. İn-Vitro Sitotoksosite Testleri**

In vitro sitotoksosite testleri bir materyalin vücut dokuları üzerine ve içine yerleştirildiğinde oluşan reaksiyonları taklit eden testlerdir (53). Sitotoksosite testlerinde; protein veya DNA sentezi, hücre membranı, hücre organelleri, hücre canlılığı ve ölümü ile ilgili sonuçlar alınabilmektedir (154).

Dental materyallerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde, test materyali ile hedef hücreler arasında temas sağlanmalıdır. Bu temas, direkt veya indirekt şeklinde olabilir. Direkt temas testlerinde hücrelerle kültür ortamı direkt temas halinde iken indirekt temas testlerinde hücrelerle test materyalleri arasında geçirgen bir bariyer bulunmaktadır (53).

ISO 10993-5 standartlarının önerdiği dental materyallere uygun in vitro sitotoksosite testleri; filtre diffüzyon testi, agar diffüzyon testi, dentin bariyer testi ve direkt temas testidir (84, 185).

#### **2.7.2.1. Filtre diffüzyon testi**

Filtre diffüzyon testinde test materyalleri ve hücreler selüloz asetat bir filtre ile birbirinden ayrılmıştır. Test materyallerinden sızan tüm materyaller 0.45 µm filtreden difüze olarak hedef hücrelere ulaşmaktadır. Hücrelerde meydana gelen hasarlar dekolorizasyon alanının ölçülmesi veya boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile tespit edilmektedir (132).

#### **2.7.2.2. Agar diffüzyon testi**

Toksosite deneyleri içinde en uzun süredir kullanılan ve en bilinen bariyer test yöntemidir. Bu yöntem ile nötral vital boya ile boyanmış hücrelerin üzeri agar ile kaplanarak agarın üzerine test materyali yerleştirilmekte ve difüze olan test materyalleri bileşenlerinin toksisitesi incelenmektedir. Bu yöntemde sitotoksosite hücre membranındaki geçirgenlik artışına bağlı olarak boyanın lizozomlarda birikme oranı ile

değerlendirilmektedir. Değerlendirme, dekolorizasyon ve lizis parametreleri kullanılarak yapılmaktadır. Bu test yöntemi, agar tabakasından difüze olamayacak veya agar ile reaksiyona girebilen materyaller için uygun bulunmamaktadır (132).

### **2.7.2.3. Dentin Bariyer testi**

Dentin bariyer testleri dentinin geçirgen özelliğinden yararlanılması fikri ile ortaya çıkmıştır. Bu test yönteminde steril edilmiş dentin diskleri hücre ile materyal arasında bariyer olarak görev yapmaktadır. Bu diskler insan veya sıgır dişlerinden kesilerek hazırlanmış farklı kalınlıklardaki disklerdir. Bu yöntem dentin dokusunun taklit edilmesi amacıyla geliştirilmiş olup dentin disklerinin geçirgenliğinin standardize edilememesi ve buna bağlı olarak dentin bariyerinden difüze olabilen materyal hacminin azalması gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca dentin diskin yerleştirileceği test cihazının farklı materyallerden yapılması, farklı boyutlarda olması ve ticari olarak satılmaması bu cihazların standart test uygulamalarında kullanılmasını engellemektedir (165, 185).

### **2.7.2.4. Direkt temas testi**

Direkt temas testi dental materyal veya bileşenlerini içeren ekstraktların doğrudan kültür içerisindeki hücrelerin üzerine uygulanmasıdır. Suda çözünebilir materyaller medyum içerisinde çözünebilmektedir. Suda çözünmeyen materyallerde ise direkt temas, test örneğinin kullanılan hücrelerin tam üzerine uygulanması, test örneğinin hücre kültür kabınının tabanına yerleştirilerek hücre süspansiyonunun örnek üzerine uygulanması ve hücrelerin direkt olarak örnekler üzerine yerleştirilerek kültür edilmesi gibi farklı yöntemlerle sağlanabilmektedir (163, 185).

Ekstrakt yolu ile direkt temas testinde materyalin bir sıvı çözücü içinde bekletilerek çözünen bileşenlerinin hücreler ile temas ettirilmesi ile değerlendirilir. Ekstraksiyon sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı çözücüler serum içeren veya içermeyen hücre kültür ortamı, fizyolojik tuz solüsyonu veya diğer uygun çözücülerden biri olabilmektedir. Test materyalleri deney tüplerine konulduktan sonra üzerlerine seçilen ekstraksiyon sıvısı ilave edilmekte ve materyalin salınımını yapması için önerilen ortam standartlarında bırakılmaktadır. Bu sürenin sonunda elde edilen ekstraktlar, hazırlanan hücre kültürlerindeki vasat ile değiştirilerek deney sonunda sitotoksik etkiler değerlendirilir. Ekstrakt içinde maddelerin konsantrasyonu ve hücrelere temas edecek materyalden salınacak bileşenlerin oranı ekstraktı alınan materyalin yüzey alanına,

ekstraksiyon sıvısının hacmine, materyalin pH'sına, kimyasal çözülebilirliğine, difüzyon oranına, osmolaritesine, ısıya, zamana ve diğer faktörlere bağlı olmaktadır (132, 185).

ISO'nun önerdiği ekstraksiyon ortamları;

- a) 24 saatten az olmamak üzere  $37\pm 2$  °C
- b)  $72\pm 2$  saat  $50\pm 2$  °C
- c)  $24\pm 2$  saat  $70\pm 2$  °C
- d)  $1\pm 0.2$  saat  $121\pm 2$  °C şeklindedir (84, 132, 185).

### 2.7.3. Sitotoksisite Testlerinde Değerlendirme Yöntemleri

Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri şu başlıklar altında toplanmaktadır:

1. Canlılığı değerlendiren testler
2. Yaşamı değerlendiren testler
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
4. Hücre metabolizmasını değerlendiren testler

#### 2.7.3.1. Canlılık değerlendirme testleri

Canlılık testleri ile kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenmektedir. Bu testler, test materyalinin ekisi sonrasında kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır (185). Canlılık değerlendirme testlerinde vital boyalar ve vital olmayan boyalar şeklinde iki farklı tipte boya kullanılmaktadır. Vital boyalar, canlı hücrelerin içerisine aktif olarak alınmakta ve sitotoksik etkiler membran geçirgenliğini arttırmaya kadar hücre içerisinde tutulmaktadır. Vital olmayan boyalar ise hücre içerisine aktif olarak geçemezler ancak sitotoksisite nedeniyle membran geçirgenliği bozulduğu zaman hücre içine alınmaktadır (37).

*Tripan mavisi testi:* Tripan mavisi membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde biriken non-vital bir boyadır. Hemositometre adı verilen bölümlenmiş cam yardımı ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilmektedir (37, 185).

*Nötral kırmızı testi:* Nötral kırmızı vital bir boyadır. Canlı hücreler, nötral kırmızıyı içine alarak lizozomlarında tutar. Nötral kırmızı, canlı olmayan hücreler tarafından tutulmaz. Optik mikroskop altında hemositometreye yerleştirilmiş hücre süspansiyonundaki canlı hücrelerin yüzde oranı tespit edilmektedir (37, 185).

Floresan metodu: Bu yöntemde hücreler floresan boyalar ile boyanarak akım sitometri veya floresan mikroskobu ile değerlendirilmektedirler (37, 185).

### **2.7.3.2. Hücre proliferasyonunu değerlendirme testleri**

Hücre hasarını belirlemek için proliferasyon oranının kullanımı en eski ve en yaygın yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Test süresi içinde belirli bir anda yapılan hücre sayımının belirgin bir sonuç verebilmesi için testin erken aşamalarında elde edilen bir büyüme eğrisi ile desteklenmesi gerekmektedir. Hücre sayımında büyüme eğrisi analizleri çok sayıda örnek olduğunda kullanışlı olmayabilmektedir. Proliferasyonun değerlendirilmesinde H-timidin testi ve bromodeoksiuridin immünohistokimyasal teknik kullanılmaktadır (129, 185).

### **2.7.3.3. Metabolik sitotoksosite değerlendirme testleri**

Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçmektedir. Metabolizma testlerinde hücrelerin canlılıkları mikropilokoku okuyuculu spektrofotometre yardımı ile tespit edilmektedir. Ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Kolorimetrik MTT testi, alamar mavisi testi ve laktat dehidrogenaz (LDH) testleri bu gruba giren testlerdir (129, 185).

### **2.7.3.4. Yaşam değerlendirme testleri**

Uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenmektedir. Kısa dönem testleri kullanışlı, hızlı ve kolay uygulanabilir olmasına rağmen sadece test sırasındaki ölü hücreleri göstermektedir. Bununla beraber toksik etkilere maruz kalan hücreler, saatlerce, günlerce veya daha fazla süre etki gösterebilir. Bu nedenle geri dönüşüm olabildiğinden kısa dönem testleri yerine yaşamı değerlendirmek için uzun dönem testleri kullanılmaktadır (129, 185).

### **2.7.4. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler ve akım sitometri**

Hücreler belli bir süre yaşar ve sonra da ölürlür. Hücrelerin yaşamını sonlandırmada rol oynayan iki önemli olay; apoptoz ve nekrozdur. ‘Programlanmış hücre ölümü’ olarak bilinen apoptoz normal fizyolojik koşullarda ortaya çıkabilmekte ve hücre kendi ölümünde katılımcı rol oynamaktadır. Ayrıca hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immun reaksiyonlarda koruyucu bir

mekanizma olarak da ortaya çıkabilmektedir. Nekroz ise hücre ölümünün pasif şeklidir ve hücrelerin ya da dokuların fiziksel ya da toksik zarar sonucu, zamanından önce ölmesi şeklinde tanımlanmaktadır (46).

Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak, komşu hücrelerle bağlantısını koparmakta ve büzüşmektedir; ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korumaktadır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilmekte ancak inflamasyon görülmemektedir. Nekrozda ise dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik madde) hücrenin iyon dengesini bozmaktadır. Hücre sıvı alarak organeller şişmekte ve plazma membran bütünlüğü bozularak osmotik basınç nedeniyle hücre patlamaktadır. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması enflamatuvar cevabı indüklemektedir (42).

Hücrelerin sitotoksik ajanlara maruz bırakılması apoptoz ya da nekroza sebebiyet verebilmektedir. Apoptoz ve nekroz çoğu yönlerden birbirinden farklı olmakla birlikte bazen uyarının tipi veya derecesi hücrenin apoptoza ya da nekroza gideceğini belirlemektedir. Düşük konsantrasyonlarda uyarılar apoptozu indükleyebilirken aynı uyarının yüksek dozu nekroza yol açabilmektedir (49).

Araştırmacılar materyallerin toksisitesinin neden olduğu hücre ölüm tiplerini araştırmışlar ve canlı hücreleri erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroza uğramış hücre tiplerinden ayırt edebilmek adına yeni yöntemler geliştirmişlerdir (129).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şunlardır (62):

1) Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- a. Işık Mikroskobu
  - i. Hematoksilen Boyama
  - ii. Giemsa Boyama
- b. Floresan Mikroskobu
- c. Elektron Mikroskobu
- d. Faz Kontrast Mikroskobu

2) İmmünohistokimyasal yöntemler

- a. Anneksin V Yöntemi
- b. TUNEL Yöntemi
- c. M30 Yöntemi
- d. Kaspaz-3 Yöntemi

### 3) Biyokimyasal yöntemler

- a. Agaroz Jel Elektforezi
- b. Western Blotting
- c. Akım Sitometri

### 4) İmmunolojik yöntemler

- a. ELİSA
- b. Fluorimetrik yöntem

### 5) Moleküler biyoloji yöntemleri

Akım sitometri, apoptozisin belirlenmesine olanak sağlayan metotlardan biridir. Akım sitometri ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilmekte ve hücreler ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilmektedir. Bu yöntemde floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkün olmaktadır. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlı bulunmaktadır (71).

Apoptoz, akım sitometri uygulamasında propidium iyodür ve Anneksin V kullanılarak belirlenir. Anneksin-V floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlendikten sonra hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidium iyodür eklenmektedir (71).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma in vitro koşullarda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroimmunoloji ve İmmunogenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Ağız, Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran 19-25 yaş aralığında, sistemik bir hastalığı bulunmayan hastalarda çekim endikasyonu konulmuş gömük üçüncü büyük azı dişlerinden elde edilen pulpa dokuları kullanıldı.

Bu çalışma için; İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Dosya No: 2014/784). Gönüllü katılımcıların, yapılacak çalışmanın amacı, içeriği, yöntem ve sorumluluklarını belirten “Gönüllü Bilgilendirme ve Onam Formu”nu okumaları sağlandı ve imzalı onayları alındı (Ek 1. Gönüllü Bilgilendirme ve Onam Formu).

Sitotoksosite incelemeleri için akım sitometri analizleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) İmmünoloji Anabilim Dalı'nda ve alkalen fosfataz tayini için ELISA işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroimmunoloji ve İmmunogenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan materyaller (Şekil 3-1), içerikleri ve üretici firma bilgileri (Tablo 3-1)'de gösterilmektedir.

A



B



C



D



E



Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan materyaller

A) Hyaluronic acid sodium salt from Stretococcus zooepidemicus B) Gengigel® Prof Hyaluronic Acid %0.8 C) Biodentine™ D) ProRoot® MTA E) Dycal® Dentin

**Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firma bilgileri**

Materyal	İçerik	Üretici Firma	LOT Numarası
Hyaluronic acid sodium salt from Stretococcus zooepidemicus-H9390	Hyaluronik asit 1g (1240 kDA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	120K15211V
Gengigel®Prof Hyaluronic Acid 0,8%	Hyaluronik asit 800mg, Xylitol (1800 kDA)	Richerfarma, Milano, Italia	A15814
Biodentine™	<u>Toz:</u> trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat, zirkonyum oksit <u>Likit:</u> kalsiyum klorit	Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France	B12468
ProRoot® MTA	<u>Toz:</u> trikalsiyum silikat, trikalsiyum aluminat, trikalsiyum oksit, silikat oksit, bizmut oksit <u>Likit:</u> Distile su	Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA	13073104
Dycal® Dentin	<u>Baz:</u> 1,3-butilen glikol disalisilat, çinko oksit, kalsiyum fosfat, kalsiyum tungsten, demir oksit pigmentleri <u>Katalizör:</u> Kalsiyum hidroksit, N-etil o/p toluen sülfonamid, çinko oksit, titanyum oksit, çinko sitrat, demir oksit pigmentleri	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany	140528

### 3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

#### 3.1.2.1. Cihaz ve Aletler

- Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan, İstanbul, Türkiye)
- CO<sub>2</sub>'li İnkübatör (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Santrifüj Cihazı (Beckman Coulter Allegra X-22R, California, USA)
- Invert mikroskop (Nikon TMS, New York, USA)
- Işık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japan)
- Derin dondurucu (-80°C) (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)
- Otomatik pipet (Eppendorf Easypet, Hamburg, Germany)
- Mikropipet seti (Gilson, Middleton, USA)
- Su banyosu (Elektromag, İstanbul, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, İstanbul, Türkiye)
- Digital fotoğraf makinası (Sony CyberShot)

#### 3.1.2.2. Kimyasal Malzemeler

- L-Glutamin Solüsyonu (Sigma-Aldrich G7513, St. Louis, MO, USA)
- Tripan Mavisi Solüsyonu %0.4 (Sigma-Aldrich T8154, St. Louis, MO, USA)
- DMEM-F12 (Biological Industries 11-170-1A, Kibbutz Beit-Haemek, Israel)
- Tripsin EDTA Solüsyonu (Sigma- Aldrich T4049, St. Louis, MO, USA)
- Penisilin/ Streptomisin (Sigma- Aldrich A5955, St. Louis, MO, USA)
- Fötal sığır serumu (Biological industries 04-007-1B, Beit Haemek, Israel)
- DMSO (Sigma-Aldrich D2650 St. Louis, MO, USA)
- Povidon İyot Solüsyonu (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makine San. Tic. Ltd. Şti., Türkiye)

- Fosfat Tamponu (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 3.1.2.3. Sarf Malzemeler

- 50 ml'lik steril falkon tüp
- 15 ml'lik steril santrifüj tübü
- 24 kuyulu steril hücre kültürü plağı
- 48 kuyulu steril hücre kültürü plağı
- 0.22 µm steril medyum süzme filtresi
- 0.45 µm steril medyum süzme filtresi
- Tek kullanımlık, steril plastik Pastör pipeti
- Cam Pastör pipeti
- Tek kullanımlık, 25 cm<sup>2</sup>'lik steril plastik kültür flaskı
- Hemasitometre lamı
- Kriyotup 1 ml
- Bistüri ucu (Raymond no.22)
- Steril petri kabı
- Serolojik pipet 5 ml
- Serolojik pipet 10 ml
- Pipet ucu 200 ul
- Pipet ucu 1000 µl

### 3.1.3. Akım Sitometri Analizinde Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Sarf Malzemeler

#### 3.1.3.1. Cihazlar

- Akım Sitometri Cihazı (Becton Dickinson FACS Calibur, California, USA)
- BD Cell Quest TM software programı (BD Biosciences, California, USA)

### 3.1.3.2. Kitleler

- Apoptotik/Nekrotik Hücre Tespit Kiti (Promokine-PK-CA707-30017)

### 3.1.3.3. Sarf Malzemeler

- FACS tüpü

## 3.1.4. Alkalin Fosfataz Enzim Düzeyi Analizinde Kullanılan Cihazlar, Kitleler

### 3.1.4.1. Cihazlar

- ELISA okuyucusu (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc, Vermont, USA)

### 3.1.4.2. Kitleler

- ELISA Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) (Cloud- Clone Corp. SEB091Hu, Houston, USA)

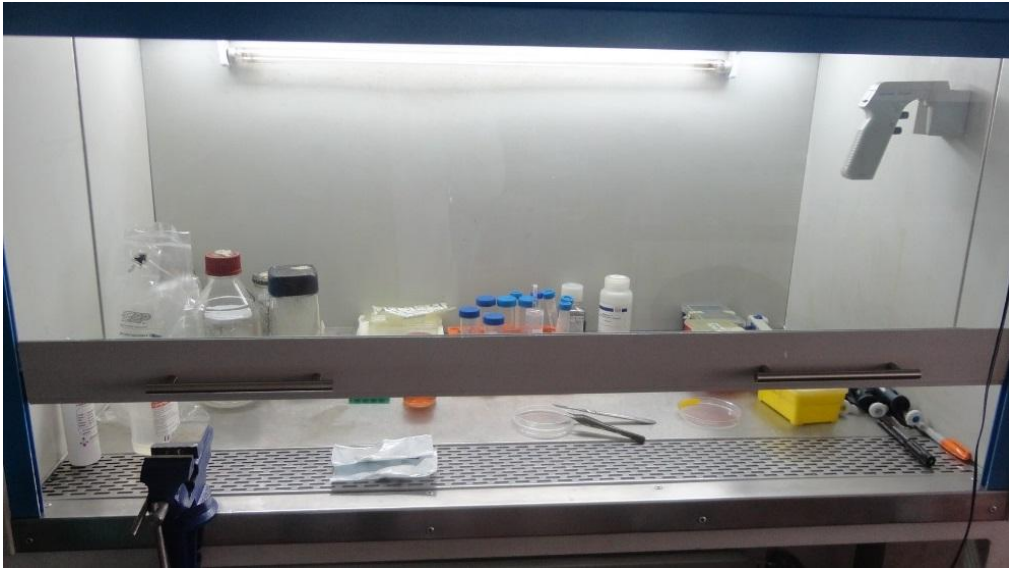
## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü

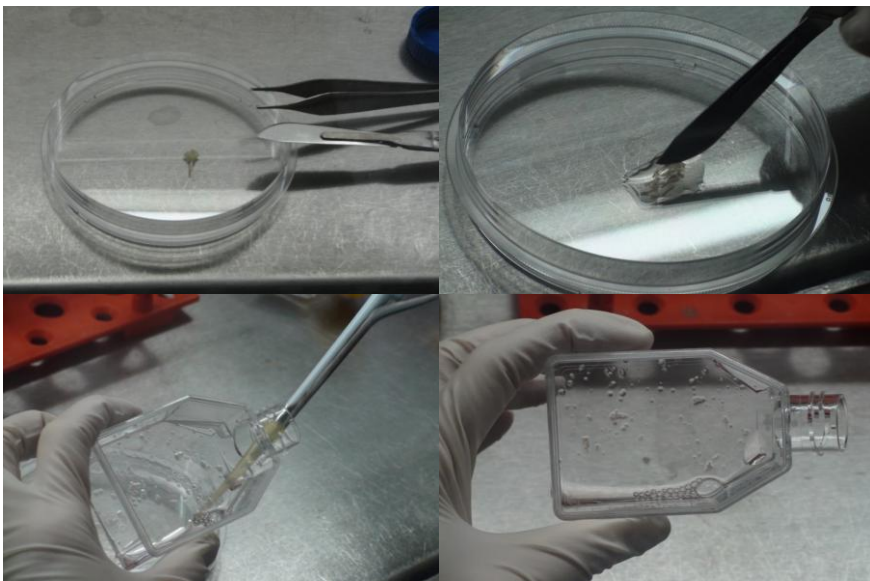
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda çekim endikasyonu konulmuş gömük üçüncü büyük azı dişleri çekim işleminden hemen sonra %10'luk povidon iyot solüsyonu içeren steril biyopsi kaplarına alındı. Dişlerin üzerlerindeki doku artıkları dental scaler ile diş yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra içerisinde kültür medyumunu (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM-F12) olan steril falkon tüplerinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Nöroimmunoloji ve İmmunogenetik Laboratuvarı'na taşındı. Çekilmiş dişler yarım saat içerisinde steril koşullarda mengene yardımı ile kırılarak pulpa dokusu elde edildi.

Dişlerden elde edilen pulpa dokusu, steril kabin (Şekil 3-2) içinde, mekanik ayrıştırma yöntemi uygulanarak bistüri (No.22) yardımı ile 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalara ayrıldı (Şekil 3-3). Doku parçaları 25 cm<sup>2</sup>'lik doku kültür flaskına alınarak, içerisinde %20 fetal sığır serumu, %1 penisilin/ streptomisin (Sigma A5955) ve %1 L-glutamin içeren hücre kültür medyumunu yavaş bir şekilde dokuların üzerini kaplayacak şekilde uygulandı. Daha sonra ekim yapılan kültür flaskları dokuların yerlerinden kalkma olasılığını engellemek amacıyla sarsmamaya özen gösterilerek 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli

ortamdaki inkübatöre (Şekil 3-4) kaldırıldı. 10 gün süreyle kültür flaskları yerlerinden oynatılmadan kültüre edildi. 10 gün sonunda besi yeri değiştirilerek kültür kabının tabanına yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. İverted mikroskofta kontrol edilerek kültür kabı tabanı yüzeyinin %70-80 oranında hücreler ile kaplandığı gözlemlendiğinde pasajlama işlemine geçildi. Bu süre içerisinde her 3 günde bir besiyeri değiştirilerek taze besiyeri eklendi.



**Şekil 3-2: Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan, İstanbul, Türkiye)**



**Şekil 3-3: Bistüri yardımı ile parçalara ayrılan doku parçalarının doku kültür flaskına alınması**



**Şekil 3-4: İnkübatör (Sanyo, Etten Leur, The Netherlands)**

Hücreler istenen yoğunluğa ulaşıp konfluent hale geldiğinde üzerindeki besi yeri çekilerek serumdan arındırılmak için fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. PBS aspire edilip uzaklaştırıldıktan sonra hücreler inkübatörde 1 ml tripsin EDTA solüsyonu ile 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücrelerin flask yüzeyinden tamamen ayrıldığı mikroskopta kontrol edildikten sonra santrifüj tüpüne alınarak tripsinin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla üzerine 10 ml hücre kültür medyumunu eklenerek 1500 rpm’de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı (Şekil 3-5). Santrifüj sonrası, üst sıvı aspire edilerek hücreler yeni bir kültür flaskına aktararak inkübisyona bırakıldı. Yaklaşık 7-10 gün aralığında aynı işlemler tekrarlanarak ikinci ve üçüncü pasajlar elde edildi. Deney için üçüncü pasaj pulpa hücreleri kullanıldı. Elde edilen hücreler materyallerin uygulanacağı güne kadar dondurma medyumunu ve hücre süspansiyonu oranı 1:1 olacak şekilde dondurma tüplerine alınarak  $-80^{\circ}\text{C}$ ’de derin dondurucuya kaldırıldı.



**Şekil 3-5: Santrifüj Cihazı (Beckman Coulter Allegra X-22R, California, USA)**

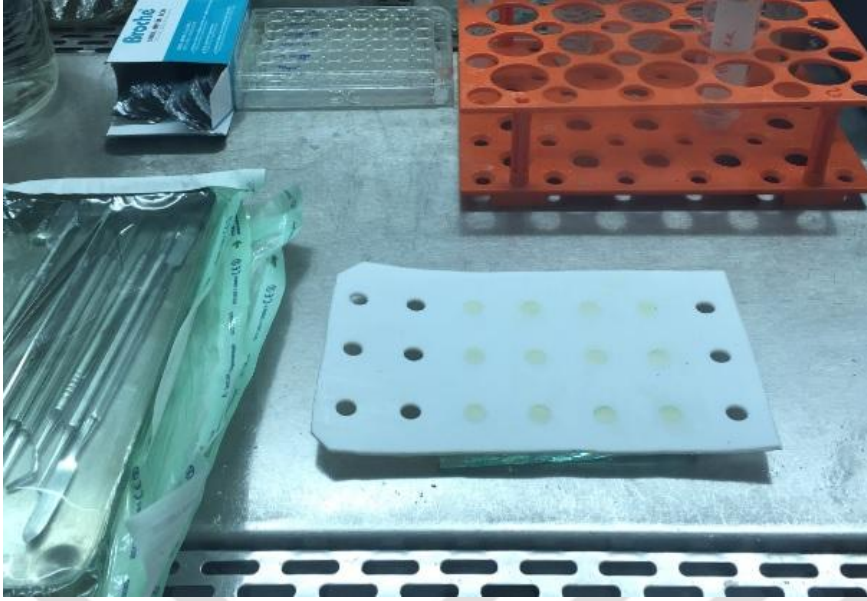
### 3.2.2. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı saf HA (Sigma Aldrich H-9390), sitotoksik etkileri ve alkalen fosfataz aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile HA içerikli diğer bir preparat (Gengigel Prof %0.8 HA) ve üç farklı kuafaj materyali ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Örnekler materyallerin üretici firmalarının önerileri doğrultusunda hazırlandı (Tablo 3-2). Kullanılan yöntem ekstrakt yolu ile direkt temas testi olup katı formdaki ProRoot® MTA, Biodentine™ ve Dycal® materyallerinin salınım (ekstrakt) sıvıları hazırlanırken materyallerin örnek boyutları ISO 10993-5 standartlarında belirtildiği gibi yüzey/besiyeri oranının 0.5 - 6 cm<sup>2</sup>/ml olması, salınım aşamasında besiyeri ortamının örnekleri tümüyle çevreleyebilmesi ve polimerizasyonun tamamlanması hedeflendi. Her bir materyalden 16 adet örnek, 8 mm iç çapında ve 2 mm derinliğinde steril teflon kalıplarda, üretici firmaların talimatları doğrultusunda, steril kabin içerisinde aseptik şartlarda hazırlandı (Şekil 3-6). Örnekler sertleşme reaksiyonlarını tamamlamaları için 4 saat bekletildikten sonra bakteri, mantar ve maya kontaminasyonunu önlemek amacı ile deney öncesi 30 dakika UV (ultraviyole) altında tutuldular. Bu işlem sonrasında yine ISO 10993-5 standartlarının önerdiği ekstraksiyon ortam şartları göz önünde bulundurularak materyaller 24 saat 37±2 °C'de hücre kültür medyumunda inkübe edilerek salınım (ekstraksiyon) sıvıları elde edildi (Şekil 3-7).

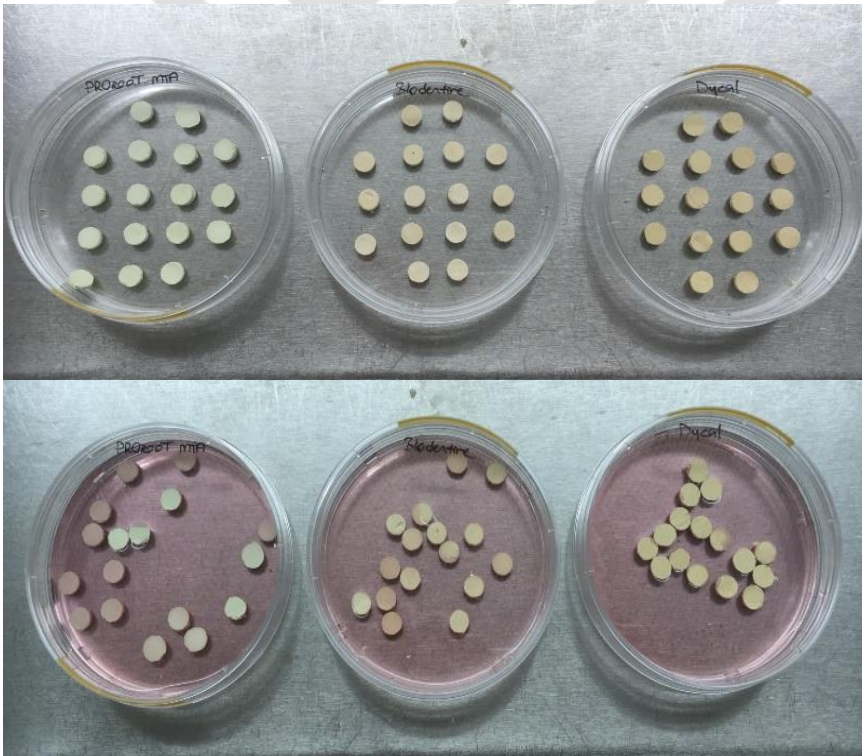
**Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan materyallerin uygulama prosedürleri**

#### Uygulama Prosedürleri

Biodentine™	Bir kapsül Biodentine™ tozu içerisine 5 damla likit ilave edildi. Amalgamatörde 30 saniye karıştırıldı.
ProRoot® MTA	1 paket toz (1 gram), 1 kapsül likit (0,35 gram) karıştırılarak hazırlandı.
Dycal® Dentin	1:1 oranında baz ve katalizör bileşenleri karıştırıldı.



**Şekil 3-6: Steril teflon kalıplarda materyallerin hazırlanması**

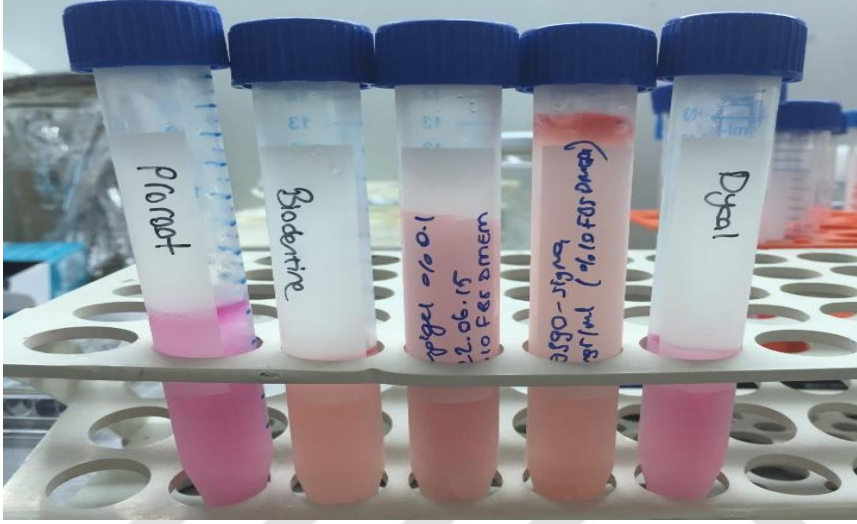


**Şekil 3-7: Sertleşmesi tamamlanan kuafaj materyallerinin salınım sıvılarının hazırlanması için hücre kültür medyumunu ile 24 saat inkübasyonu**

Yüksek molekül ağırlıklı HA H-9390, sodyum tuzu formunda olup üretici firmanın belirttiği çözünürlük özellikleri doğrultusunda hücre kültür medyumunda %0.1'lik konsantrasyonda hazırlandı. Gengigel Prof %0.8 HA preparatı jel formunda

olup standardizasyon açısından HA konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde hücre kültür medyumunda çözünerek kullanıldı.

Kontaminasyon riskine karşı materyallere ait sıvılar steril kabin içerisinde 0.45 mikron ve 0.22 mikron steril medyum süzme filtrelerinden geçirildi ve steril doku kültürü santrifüj tüplerine alınarak  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 3-8).

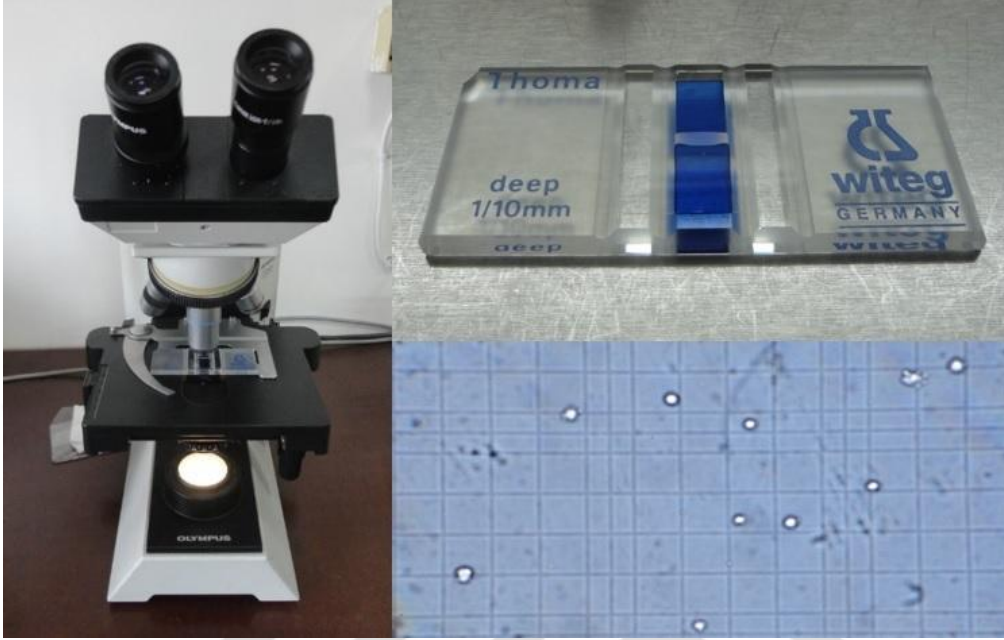


**Şekil 3-8: Materyallerin santrifüj tüplerine alınan salınım sıvıları**

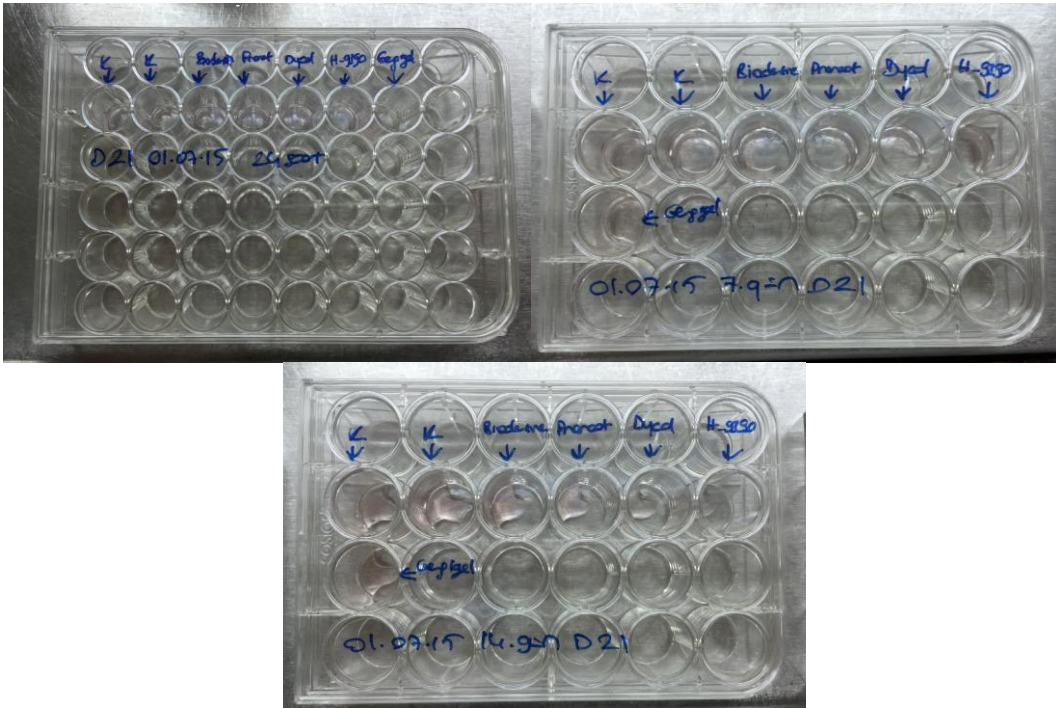
### 3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Salınım Sıvılarının Uygulanması

Hücreler saklama ortamları olan  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda kısa sürede çözündürüldü ve santrifüj işleminden sonra, içinde %15 fetal sıgır serumu içeren DMEM besi ortamı ile hücre kültürü flaskına alınarak  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li etüve kaldırıldı. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıncaya tripsin/ EDTA solüsyonu ile  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika inkübe edilerek yüzeyden ayrılması sağlandı ve tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için üzerine 10 ml hücre kültür medyumunu eklenerek 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Hücre süspansiyonunun  $10\text{ }\mu\text{l}$ 'si 1/10 oranında tripan mavisi ile boyanarak hemositometre ile ışık mikroskobu altında sayıldı (Şekil 3-9). 1. gün sitotoksite değerlendirmesi için 48'lik kuyuların olduğu plaklara  $1 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde, 7. gün sitotoksite ve 14. gün alkalen fosfataz aktivitesi değerlendirmeleri için 2 ayrı 24'lük kuyuların olduğu plaklara  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı (Şekil 3-10) ve hücrelerin yapışması için 2 saat süreyle inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kuyulara yapışmasının ardından 48'lik kuyulara 200

$\mu\text{l}$  ve 24'lük kuyuları 500  $\mu\text{l}$  materyal salınım sıvıları eklenerek plaklar inkübatöre kaldırıldı. Her üç günde bir salınım sıvıları değiştirildi.



Şekil 3-9: Hücrelerin tripan mavisi ile boyanarak hemositometri ile ışık mikroskobunda sayılması



Şekil 3-10: Materyal salınım sıvılarının uygulanacağı; 1. gün, 7. gün ve 14. günler için hücre ekimi yapılmış plaklar

### 3.2.4. Akım Sitometri Analizi ile Sitotoksisite Değerlendirilmesi

İki kontrol ve beş materyal grubu olmak üzere toplam yedi kuyuda üst sıvılar mikropipetle toplanıp  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuya kaldırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanarak ayrı ayrı tüm kuyucuklara  $100\text{ }\mu\text{l}$  tripsin/ EDTA solüsyonu uygulandı. Kaldırılan hücreler FACS tüplerine aktarılarak üzerlerine  $5\text{ ml}$  PBS eklendi ve  $1500\text{ rpm}$ 'de  $10$  dakika santifüj edildi. FACS tüpleri içindeki üst sıvı döküldükten sonra tüm tüplere üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanan  $100\text{ }\mu\text{l}$  bağlama tamponu eklendi. İlk kontrol grubuna cihazın kalibrasyonu için herhangi bir boya eklenmezken diğer grupların olduğu tüplere Apoptotik/Nekrotik hücre tespit kiti (Şekil 3-11)' ne ait  $5\text{ }\mu\text{l}$  FITC-Anneksin V ve  $5\text{ }\mu\text{l}$  Ethidyum homodimer III boyaları eklenerek karanlık ortamda ve oda ısısında  $15$  dakika inkübasyona bırakıldı.  $200\text{ }\mu\text{l}$  bağlama tamponu eklenerek akım sitometre cihazı (BD FACS Calibur, California, USA) (Şekil 3-12) ile ölçüm yapıldı. Sonuçlar CellQuest (BD Biosciences, California, USA) analiz programı ile değerlendirilerek kontrol grubuna göre karşılaştırmalı olarak test materyallerinin canlı, nekroz, erken ve geç apoptotik hücre oranları üzerine etkileri belirlendi. Tüm işlemler 1. ve 7. gün örnek grupları için tekrarlandı.



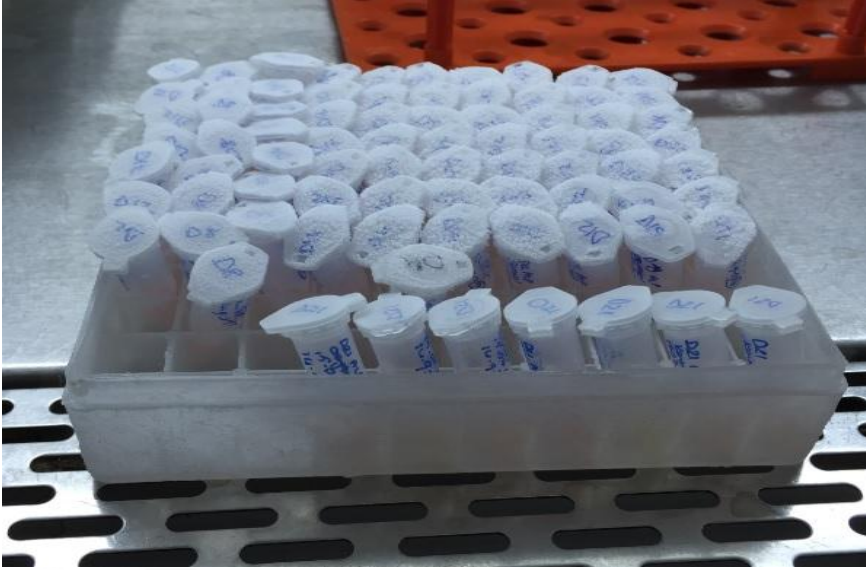
Şekil 3-11: Apoptotik/Nekrotik Hücre Tespit Kiti (Promokine-PK-CA707-30017)



**Şekil 3-12: Akım Sitometri Cihazı (BD FACS Calibur, California, USA)**

### 3.2.5. ELISA ile Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini

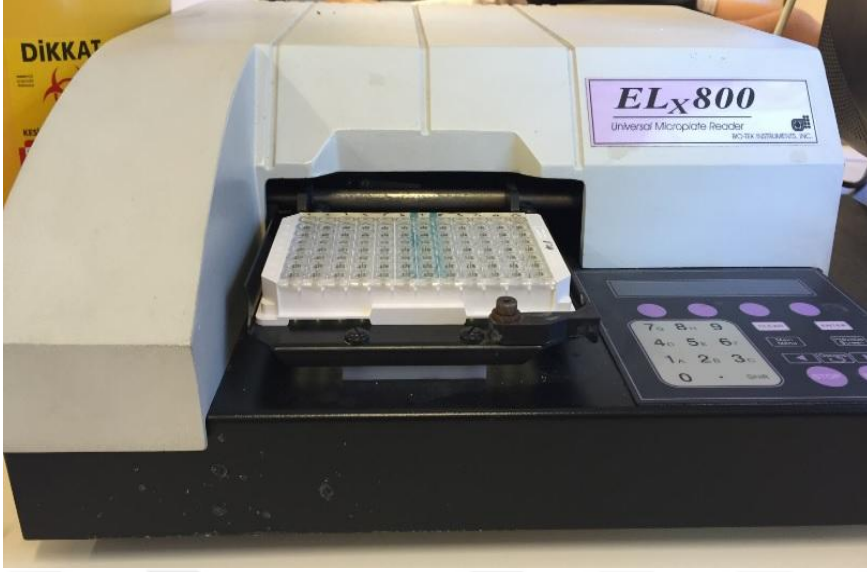
7. ve 14. günlerde üst sıvılar steril pipet yardımıyla toplanarak ELISA işlemi yapılana kadar örnekler dondurma tüpleri içinde  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 3-13). Bu yöntem ALP'ye özgü bir antikor ile kaplanmış 96 kuyulu kemiğe özgü ALP ELISA kiti (Şekil 3-14) ile gerçekleştirildi. Tüm reaktifler, örnekler ve standartlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Standart kuyularına 100'er  $\mu\text{l}$  standart ve örnek kuyularına 100'er  $\mu\text{l}$  örnek ilave edilip  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. Kuyuların içi aspire edildikten sonra 100  $\mu\text{l}$  reaktif A eklenerek  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edildi. Kuyular 350  $\mu\text{l}$  yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Her kuyuya 100  $\mu\text{l}$  reaktif B eklenerek  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyular 350  $\mu\text{l}$  yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı. 90  $\mu\text{l}$  substrat solüsyonu eklenerek  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 15-25 dakika inkübe edildi. Renk değişikliği gerçekleşince her kuyuya 50  $\mu\text{l}$  durdurma çözeltisi ilave edilerek bekletilmeden 450 nm dalga boyunda okundu (Şekil 3-15). ALP konsantrasyonu standart eğri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3-13: Dondurma tüpleri içinde -80 °C’de muhafaza edilen üst sıvılar



Şekil 3-14: ELISA Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) (Cloud-Clone Corp. SEB091Hu)



**Şekil 3-15: ELISA okuyucusu (ELX 800 Universal Microplate Reader, Vermont, USA)**

### **3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi**

Çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesinde, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptandı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin günlere göre karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

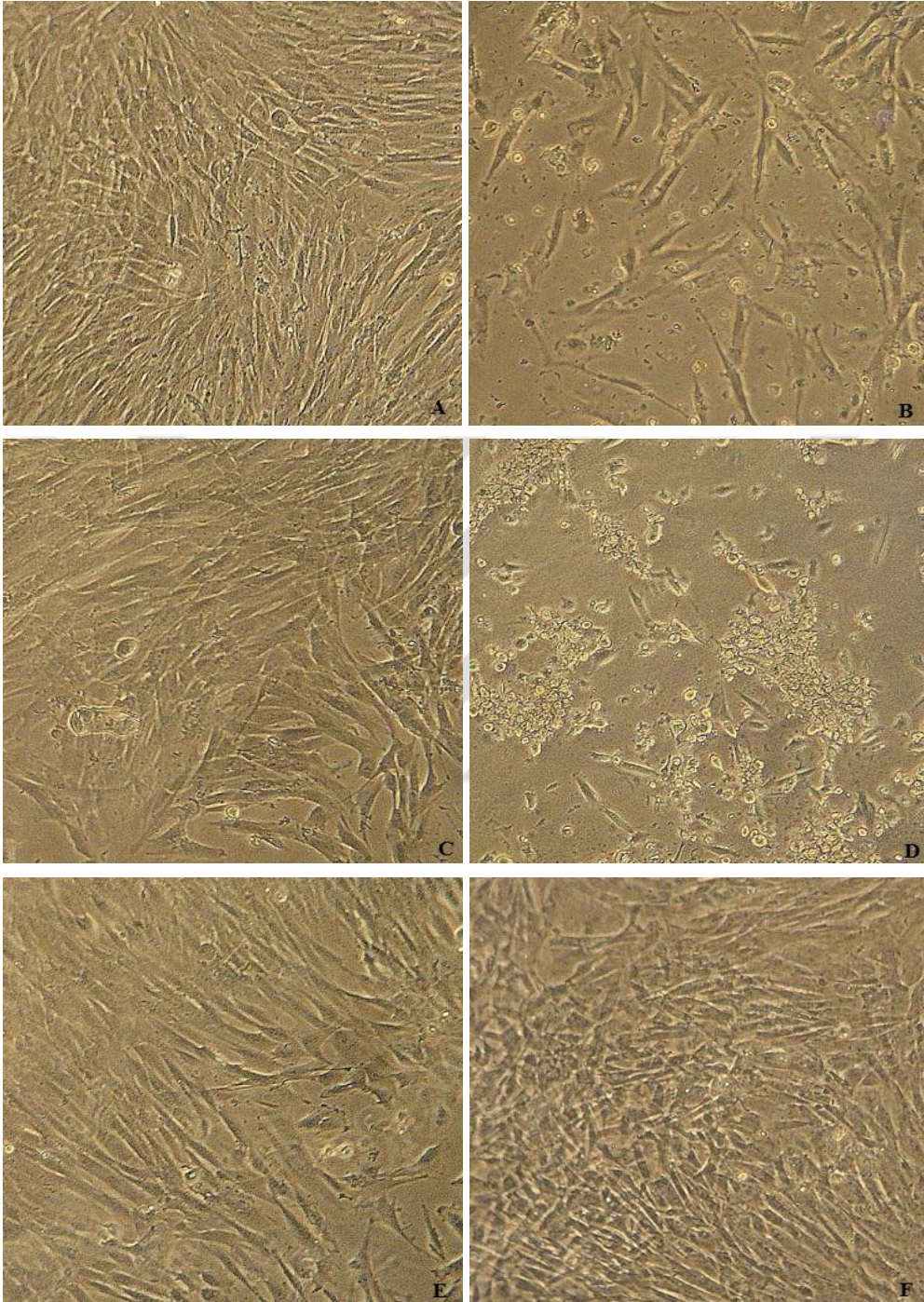
## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksisite Analizine Ait Bulgular

#### 4.1.1. Materyallere Ait Salınım Sıvılarının Uygulandığı Hücrelerin Invert Mikroskop Görüntüleri

Herhangi bir işlem uygulanmayan kontrol grubu ve materyal salınım sıvılarının uygulandığı gruplara ait pulpa fibroblast hücrelerinin 1. gün sonunda invert mikroskop görüntüleri Şekil 4-1'de gösterilmektedir. Hücrelerin kontrol grubuna ait görüntüsünde hücreler; fibroblast hücrelerinin normal olarak taşıdığı hücre kenar konturlarının parlak, membran yapısının sağlam olduğu, iğ şeklindeki morfolojik özellikleri göstermektedir (Şekil 4-1. A). ProRoot MTA, HA H-9390 ve Gengigel HA materyallerine ait salınım sıvılarına maruz bırakılan hücre gruplarında; hücrelerin hücre kültür kabının tabanına yapıştığı, kabın tabanında yayılım gösterdiği, kümeler oluşturduğu, fibroblast gövdelerinin uzun mekik şeklinde olduğu ve iğsi uzantılara sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4-1. C, E, F). Biodentine grubunda hücreler uzun mekik şeklindeki morfolojik özelliklerini taşımakla beraber, hücre yoğunluğunda kontrol grubuna göre azalma gözlenirken (Şekil 4-1.B); Dycal grubunda ise 1. günün sonunda hücrelerin daha yuvarlaklaşmış gövdeye ve daha kısa uzantılara sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4-1. D).

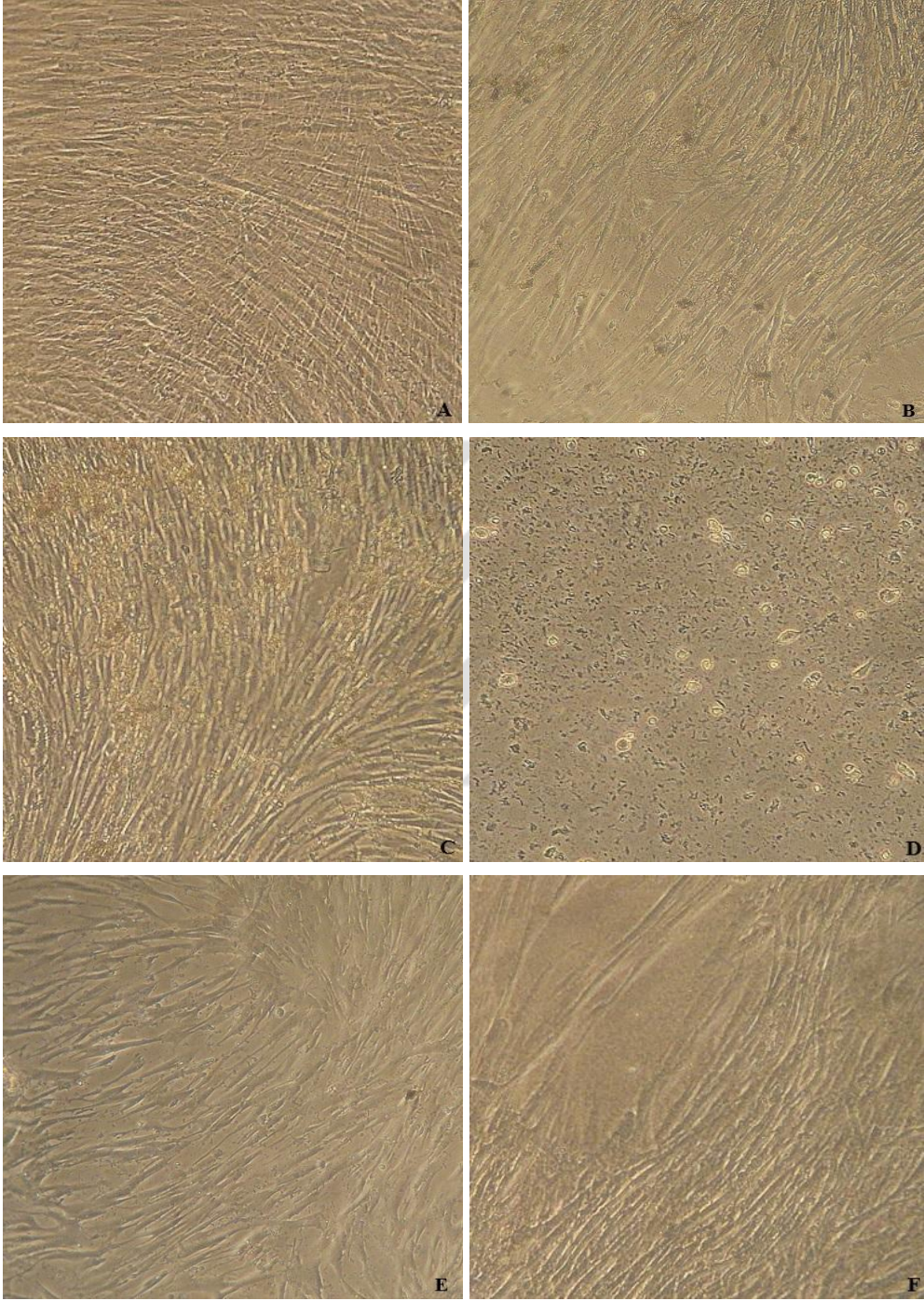
7. gün sonunda kontrol grubu ve materyal salınım sıvılarının uygulandığı pulpa fibroblast hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4-2'de gösterilmektedir. HA H-9390, Gengigel HA ve Biodentine gruplarında hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre daha az gözlenmekle beraber, hücreler mekik şeklindeki iğsi morfolojik özelliklerini korumaktadır (Şekil 4-2. B, E, F). ProRoot MTA salınım sıvısına maruz kalan grupta, hücre yoğunluğunda belirgin bir artış ve sıkışık iğsi hücreler gözlenmektedir (Şekil 4-2. C). Dycal grubunda ise çoğunlukla yüzeyden ayrılmış ölü hücre artıkları gözlenmektedir (Şekil 4-2.D).



**Şekil 4-1: 1. gün sonunda materyallerin hücreler üzerine olan etkisi (x20 büyütme)**

**A) Kontrol grubu, B) Biodentine, C) ProRoot MTA, D) Dycal, E) HA H-9390,**

**F) Gengigel HA**



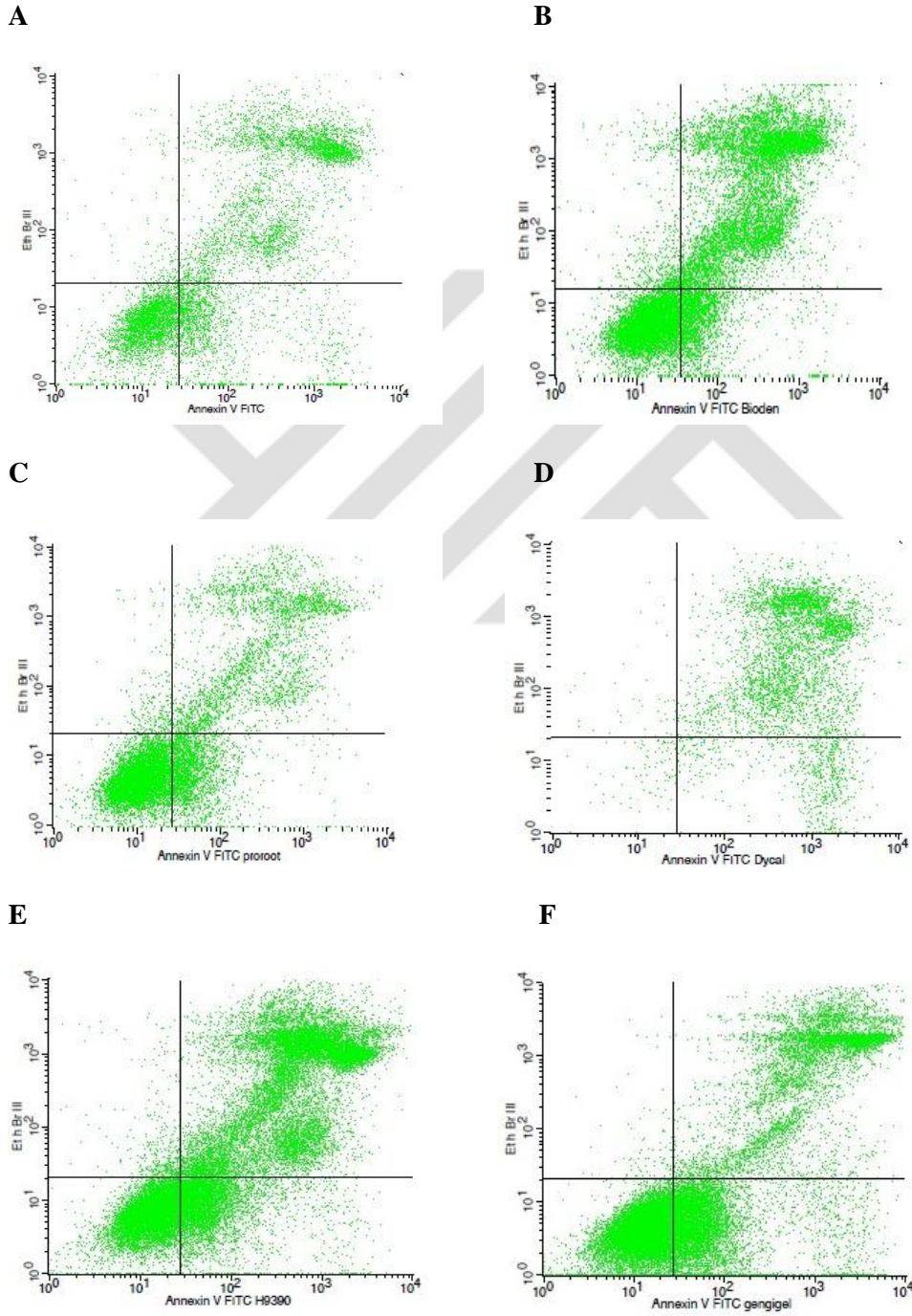
**Şekil 4.2: 7. gün sonunda materyallerin hücreler üzerine olan etkisi (x10 büyütme)**

**A) Kontrol grubu, B) Biodentine, C) ProRoot MTA, D) Dycal, E) HA H-9390,**

**F) Gengigel HA**

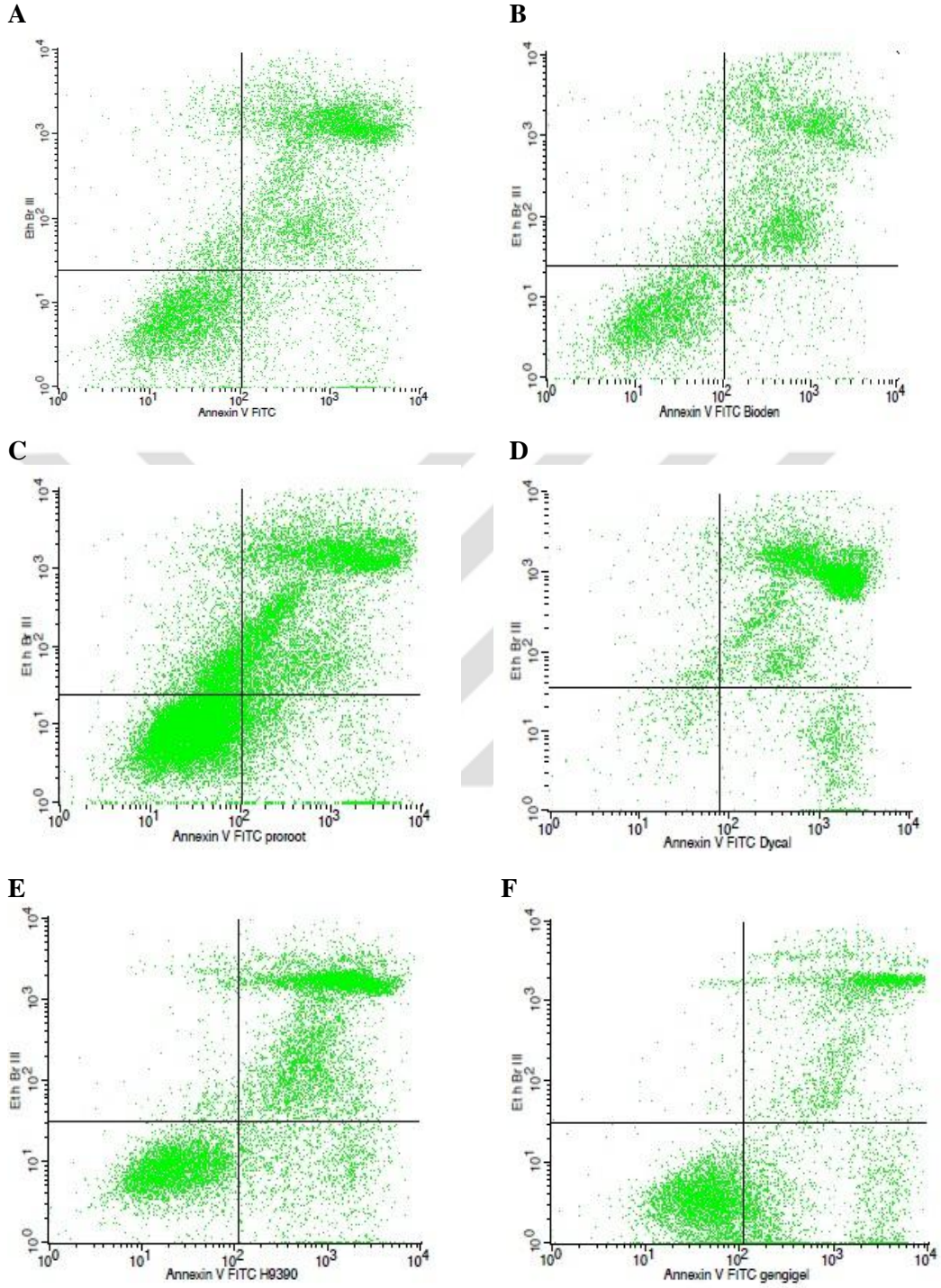
#### 4.1.2. Akım Sitometri Analizine İlişkin Bulgular

Hücre kontrol ve test gruplarının 1. güne ait akım sitometri grafiği örneği şekil 4-3'te, 7. güne ait akım sitometri grafiği örneği şekil 4-4'te verilmiştir. Grafik görüntülerinde alt-sol alan canlı hücreleri, alt-sağ alan erken apoptotik hücreleri, üst-sol alan nekrotik ve üst-sağ alan geç apoptotik hücreleri temsil etmektedir.



Şekil 4-3: Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 1. güne ilişkin akım sitometri grafiği örneği (x: Anneksin V FITC, y: EtD III)

A) Kontrol grubu, B) Biodentine, C) ProRoot MTA, D) Dycal, E) HA H-9390, F) Gengigel HA



**Şekil 4-4: Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 7. güne ilişkin akım sitometri grafiği örneği (x: Anneksin V FITC, y: EtD III)**

**A) Kontrol grubu, B) Biodentine, C) ProRoot MTA, D) Dycal, E) HA H-9390, F) Gengigel HA**

#### 4.1.2.1 Akım Sitometri Analizinde Ölü Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizinde materyaller ölü hücre (nekrotik+geç apoptotik+erken apoptotik) bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 1. gün ölü hücre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunduğu gözlemlendi ( $p:0.004$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda, Dycal grubunun 1. gün ölü hücre oranı, kontrol, ProRoot MTA, H-9390 HA ve Gengigel HA gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 1. gün ölü hücre oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-2).

Materyallerin ölü hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 7. gün ölü hücre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu gözlemlendi ( $p:0.011$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda, Dycal grubunun 7. gün ölü hücre oranı, kontrol, ProRoot MTA ve H-9390 HA gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). ProRoot MTA grubunun 7. gün ölü hücre oranı, Biodentine, H-9390 HA ve Gengigel HA gruplarından anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 7. gün ölü hücre oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-2). Materyallere ait salınım sıvıları uygulandıktan 1 gün ve 7 gün sonra ölü hücre oranları Şekil 4-5'te gösterilmektedir.

**Kontrol Grubunda;** 1. gün ve 7. gün ölü hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.337$ ).

**Biodentine Grubunda;** 1. gün ve 7. gün ölü hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.873$ ).

**ProRoot MTA Grubunda;** 1. gün ölü hücre oranları, 7. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ( $p:0.011$ ).

**Dycal Grubunda;** 1. gün ölü hücre oranları, 7. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ( $p:0.037$ ).

**H-9390 HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün ölü hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.631$ ).

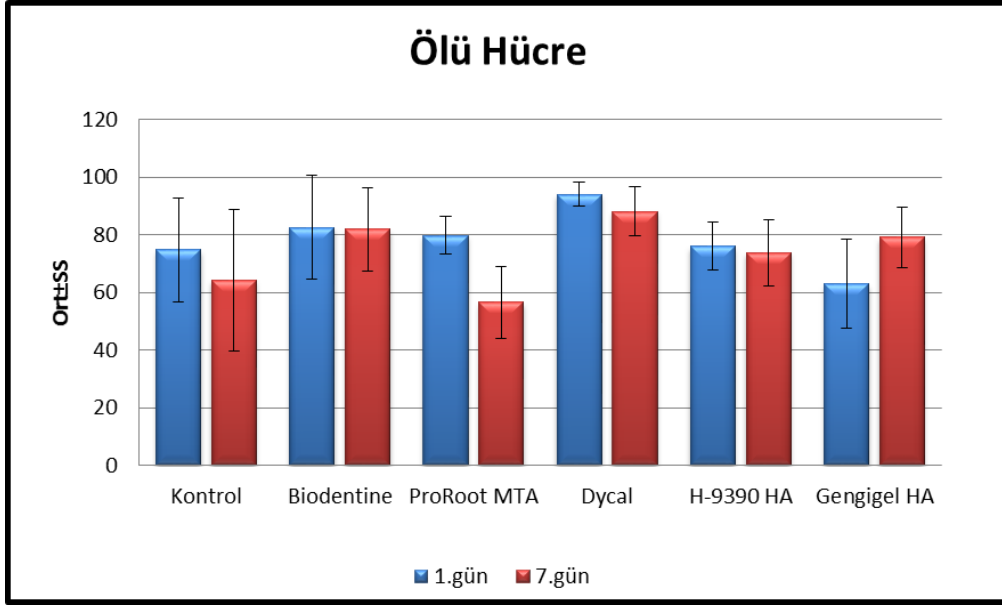
**Gengigel HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün ölü hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.078$ ).

Tablo 4-1: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre bulgularının değerlendirilmesi

	Ölü Hücre (Nekrotik+Geç Apoptotik+Erken Apoptotik)		<sup>2</sup> p
	1. gün	7. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	74,89±18,06 (78,8)	64,35±24,57 (67,12)	<b>0,337</b>
<b>Biodentine</b>	82,66±17,85 (88,9)	81,95±14,54 (88,73)	<b>0,873</b>
<b>ProRoot MTA</b>	79,9±6,6 (82,47)	56,66±12,46 (52,09)	<b>0,011*</b>
<b>Dycal</b>	94,16±4,25 (95,32)	88,12±8,52 (90,92)	<b>0,037*</b>
<b>H-9390 HA</b>	76,1±8,24 (76,53)	73,89±11,43 (76,72)	<b>0,631</b>
<b>Gengigel HA</b>	63,07±15,6 (59,99)	79,26±10,53 (81,58)	<b>0,078</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,004*</b>	<b>0,011*</b>	
<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test	<sup>2</sup> Mann Whitney U Test	* p<0.05	

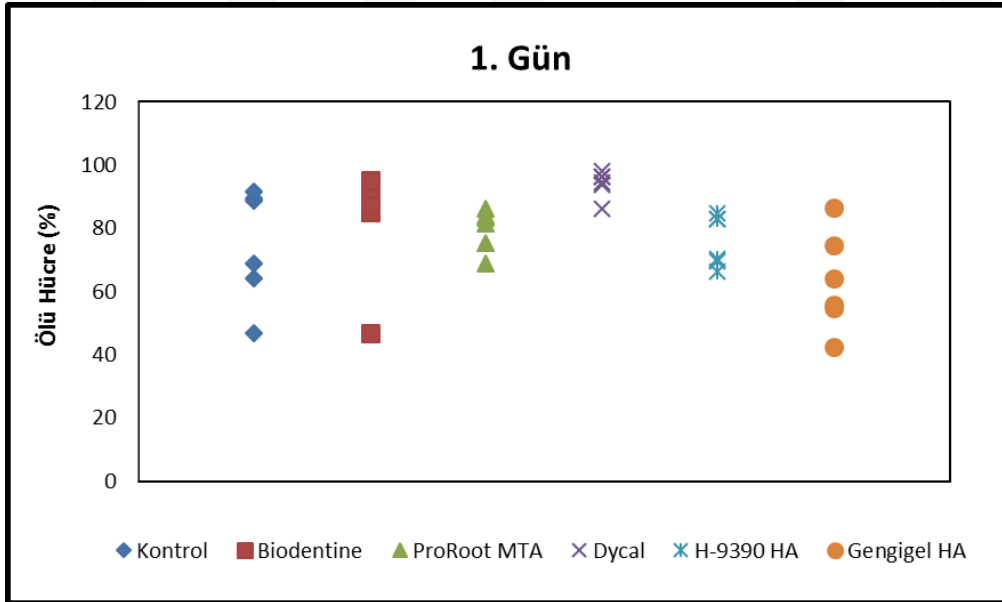
Tablo 4-2: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre bulgularının post hoc değerlendirilmesi

	Ölü hücre (Nekrotik+Geç Apoptotik+Erken Apoptotik)	
	1. gün	7. gün
<b>Kontrol-Biodentine</b>	0,423	0,200
<b>Kontrol-ProRoot MTA</b>	0,873	0,337
<b>Kontrol-Dycal</b>	0,016*	0,011*
<b>Kontrol-H-9390 HA</b>	0,873	0,522
<b>Kontrol-Gengigel HA</b>	0,150	0,337
<b>Biodentine-ProRoot MTA</b>	0,078	0,025*
<b>Biodentine-Dycal</b>	0,055	0,749
<b>Biodentine-H-9390 HA</b>	0,055	0,150
<b>Biodentine-Gengigel HA</b>	0,055	0,423
<b>ProRoot MTA-Dycal</b>	0,006*	0,006*
<b>ProRoot MTA-H-9390 HA</b>	0,423	0,037*
<b>ProRoot MTA-Gengigel HA</b>	0,078	0,016*
<b>Dycal-H-9390 HA</b>	0,004*	0,025*
<b>Dycal-Gengigel HA</b>	0,006*	0,078
<b>H-9390 HA-Gengigel HA</b>	0,150	0,262
Mann Whitney U Test	* p<0.05	

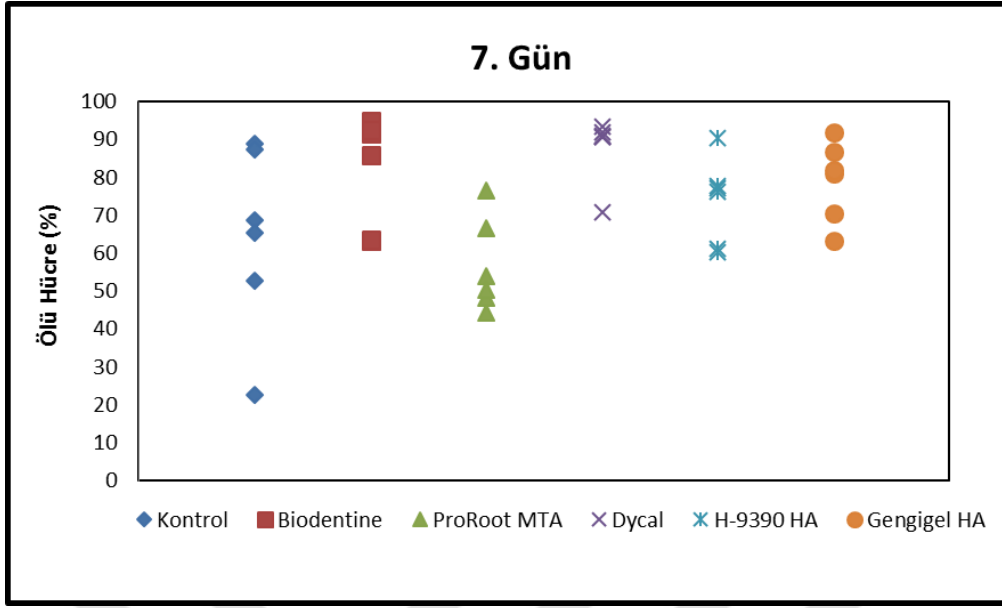


**Şekil 4-5: 1. gün ve 7. günde saptanan ölü hücre oranları**

Materyallere ait salınım sıvıları uygulandıktan 1 gün sonra tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı Şekil 4-6'da, 7 gün sonra tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı Şekil 4-7'de gösterilmektedir.



**Şekil 4-6: 1. günde tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı**



Şekil 4-7: 7. günde tüm gruplarda elde edilen ölü hücre oranlarının dağılımı

#### 4.1.2.2. Akım Sitometri Analizinde Nekrotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizinde materyallerin nekrotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 1. gün nekroz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p:0.189$ ;  $p>0.05$ ) (Tablo 4-3).

Materyallerin nekrotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 7. gün nekroz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlendi ( $p:0.043$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-3). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Dycal grubunun 7. gün nekroz oranı, kontrol, ProRoot MTA, H-9390 HA ve Gengigel HA gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 7. gün nekroz oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-4). Materyallere ait salınım sıvıları uygulandıktan 1 gün ve 7 gün sonra nekrotik hücre oranları Şekil 4.8'de gösterilmektedir.

**Kontrol Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.749$ ).

**Biodentine Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.337$ ).

**ProRoot MTA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.337).

**Dycal Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.200).

**H-9390 HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.337).

**Gengigel HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün nekroz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.109).

**Tablo 4-3: 1. gün ve 7. günde saptanan nekroz bulgularının değerlendirilmesi**

	Nekroz		<sup>2</sup> p
	1. gün	7. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	7,03±5,22 (7,5)	12,78±19,93 (6,5)	<b>0,749</b>
<b>Biodentine</b>	5,58±3,04 (5,7)	15,02±14,68 (8,6)	<b>0,337</b>
<b>ProRoot MTA</b>	9,8±4,97 (11,3)	6,57±4,84 (5,5)	<b>0,337</b>
<b>Dycal</b>	15,91±15,71 (9,3)	27,04±15,24 (23,3)	<b>0,200</b>
<b>H-9390 HA</b>	6,75±5,17 (4,7)	9,42±5,99 (9,4)	<b>0,337</b>
<b>Gengigel HA</b>	3,6±6,21 (0,9)	6,16±3,36 (6,4)	<b>0,109</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,189</b>	<b>0,043*</b>	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test

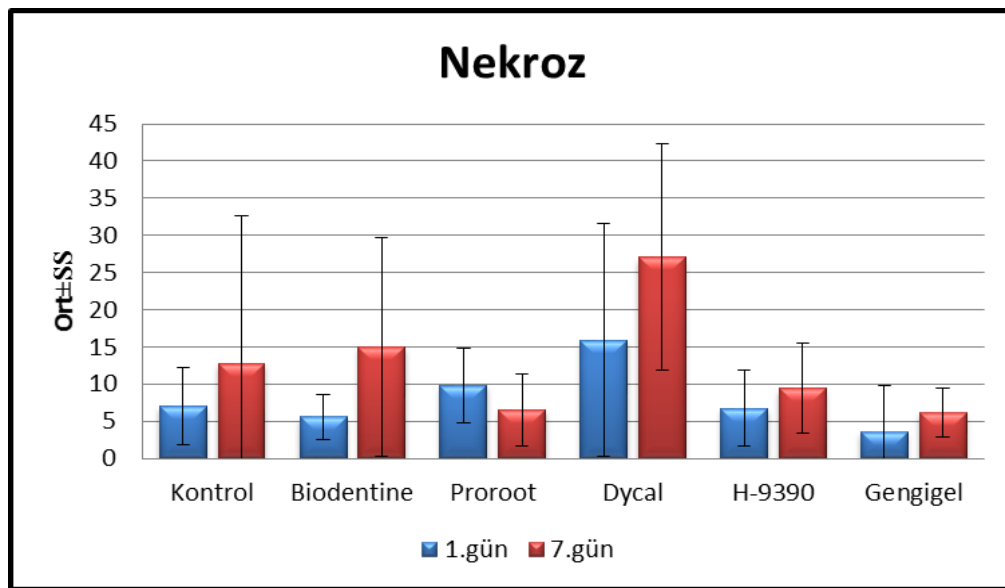
<sup>2</sup> Mann Whitney U Test

\* p<0.05

Tablo 4-4: 1. gün ve 7. günde saptanan nekroz bulgularının post hoc değerlendirilmesi

	Nekroz	
	1. gün	7. gün
Kontrol-Biodentine	0,631	0,337
Kontrol-ProRoot MTA	0,262	0,873
Kontrol-Dycal	0,522	0,037*
Kontrol-H-9390 HA	0,873	0,749
Kontrol-Gengigel HA	0,109	0,749
Biodentine-ProRoot MTA	0,109	0,337
Biodentine-Dycal	0,262	0,150
Biodentine-H-9390	1,000	0,749
Biodentine-Gengigel HA	0,078	0,522
ProRoot MTA-Dycal	1,000	0,006*
ProRoot MTA-H-9390	0,262	0,423
ProRoot MTA-Gengigel HA	0,078	1,000
Dycal-H 9390	0,423	0,016*
Dycal-Gengigel HA	0,078	0,004*
H-9390-Gengigel HA	0,078	0,337

Mann Whitney U Test

\*  $p < 0.05$ 

Şekil 4-8: 1. gün ve 7. günde saptanan nekrotik hücre oranları

#### 4.1.2.3. Akım Sitometri Analizinde Erken Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizinde materyallerin erken apoptotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 1. gün erken apoptoz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p:0.044$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-5). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespiti edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Gengigel HA grubunun 1. gün erken apoptoz oranı, Biodentine, ProRoot MTA ve Dycal gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 1. gün erken apoptoz oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-6).

Materyallerin erken apoptotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 7. gün erken apoptoz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p:0.003$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-5). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Gengigel HA grubunun 7. gün erken apoptoz oranları; kontrol, Biodentine, ProRoot MTA, Dycal ve H-9390 HA gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu. Dycal grubunun 7. gün erken apoptoz oranı, ProRoot MTA ve H-9390 HA gruplarından anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 7. gün erken apoptoz oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-6). Materyallere ait salınım sınırları uygulandıktan 1 gün ve 7 gün sonra erken apoptotik hücre oranları Şekil 4-9'da gösterilmektedir.

**Kontrol Grubunda;** 1. gün ve 7. gün erken apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.423$ ).

**Biodentine Grubunda;** 1. gün ve 7. gün erken apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.873$ ).

**ProRoot MTA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün erken apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.810$ ).

**Dycal Grubunda;** 7. gün erken apoptoz oranı, 1. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak bulundu ( $p:0.004$ ).

**H-9390 Grubunda;** 1. gün ve 7. gün erken apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.150$ ).

**Gengigel HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün erken apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.109$ ).

Tablo 4-5: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptoz bulgularının değerlendirilmesi

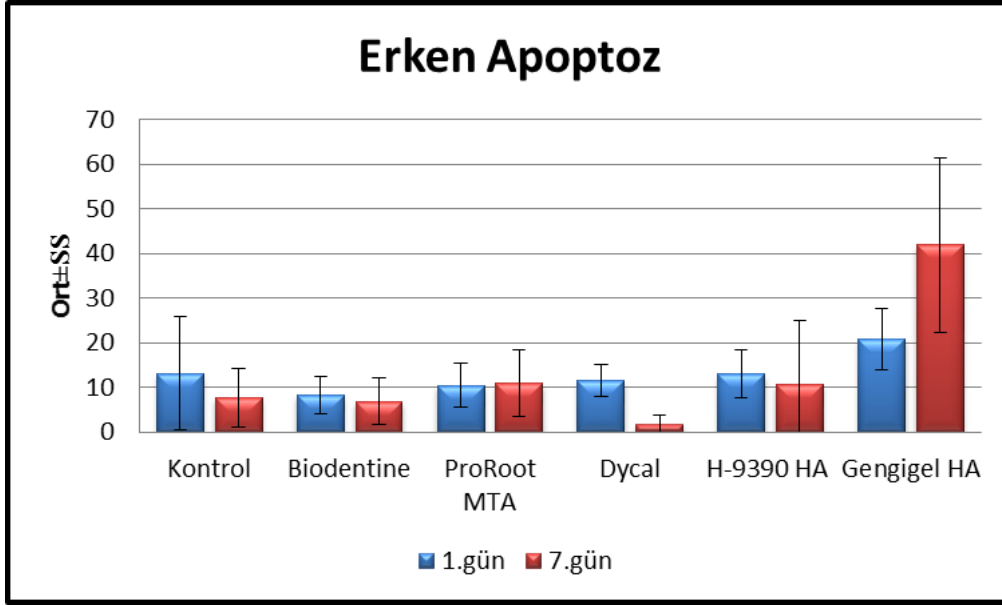
	Erken Apoptoz		<sup>2</sup> p
	1. gün	7. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	13,16±12,74 (8,2)	7,83±6,57 (6,1)	<b>0,423</b>
<b>Biodentine</b>	8,35±4,16 (8,3)	6,94±5,15 (7,6)	<b>0,873</b>
<b>ProRoot MTA</b>	10,48±4,95 (10,5)	10,96±7,47 (12)	<b>0,810</b>
<b>Dycal</b>	11,56±3,68 (10,9)	1,86±1,87 (1,4)	<b>0,004*</b>
<b>H-9390</b>	12,98±5,38 (12,2)	10,75±14,19 (6,9)	<b>0,150</b>
<b>Gengigel HA</b>	20,9±6,92 (22,2)	41,94±19,49 (50,5)	<b>0,109</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,044*</b>	<b>0,003*</b>	

<sup>1</sup>Kruskal Wallis Test      <sup>2</sup>Mann Whitney U Test      \* p<0.05

Tablo 4-6: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptoz bulgularının post hoc değerlendirilmesi

	Erken Apoptoz	
	1. gün	7. gün
<b>Kontrol-Biodentine</b>	0,631	0,749
<b>Kontrol-ProRoot MTA</b>	0,873	0,423
<b>Kontrol-Dycal</b>	0,631	0,055
<b>Kontrol-H-9390</b>	0,423	0,873
<b>Kontrol-Gengigel HA</b>	0,109	0,006*
<b>Biodentine-ProRoot MTA</b>	0,337	0,337
<b>Biodentine-Dycal</b>	0,109	0,109
<b>BiodentineH-9390</b>	0,078	1,000
<b>Biodentine-Gengigel HA</b>	0,011*	0,004*
<b>ProRoot MTA-Dycal</b>	0,631	0,025*
<b>ProRoot MTA-H-9390</b>	0,337	0,631
<b>ProRoot MTA-Gengigel HA</b>	0,016*	0,016*
<b>Dycal-H 9390</b>	0,337	0,025*
<b>Dycal-Gengigel HA</b>	0,025*	0,004*
<b>H-9390-Gengigel HA</b>	0,109	0,011*

Mann Whitney U Test      \* p<0.05



Şekil 4-9: 1. gün ve 7. günde saptanan erken apoptotik hücre oranları

#### 4.1.2.4. Akım Sitometri Analizinde Geç Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizinde materyallerin geç apoptotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 1. gün geç apoptoz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p:0.040$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-7). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Gengigel HA grubunun 1. gün geç apoptoz oranları; Biodentine, ProRoot MTA, Dycal ve H-9390 HA gruplarından anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 1. gün geç apoptoz oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-8).

Materyallerin geç apoptotik hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 7. gün geç apoptoz oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p:0.024$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-7). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Gengigel HA grubunun 7. gün geç apoptoz oranı; Biodentine ve Dycal gruplarından anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). ProRoot MTA grubunun 7. gün geç apoptoz oranı Dycal grubundan anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 7. gün geç apoptoz oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-8). Materyallere ait salınım sıvıları uygulandıktan 1 gün ve 7 gün sonra geç apoptotik hücre oranları Şekil 4-10'da gösterilmektedir.

**Kontrol Grubunda;** 1. gün ve 7. gün geç apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.423).

**Biodentine Grubunda;** 1. gün ve 7. gün geç apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.109).

**ProRoot MTA Grubunda;** 7. gün geç apoptoz oranı, 1. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak bulundu (p:0.037).

**Dycal Grubunda;** 1. gün ve 7. gün geç apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.262).

**H-9390 HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün geç apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.873).

**Gengigel HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün geç apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.378).

**Tablo 4-7: 1. gün ve 7. günde saptanan geç apoptoz bulgularının değerlendirilmesi**

	Geç Apoptoz		<sup>2</sup> p
	1. gün	7. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	54,71±26,02 (61,3)	43,74±22,22 (42,2)	<b>0,423</b>
<b>Biodentine</b>	68,74±18,18 (76,9)	59,99±11,42 (57,1)	<b>0,109</b>
<b>ProRoot MTA</b>	59,63±6,15 (60,6)	39,14±15,58 (33)	<b>0,037*</b>
<b>Dycal</b>	66,69±20,74 (77,2)	59,22±11,96 (61,8)	<b>0,262</b>
<b>H-9390 HA</b>	56,37±7,44 (54,6)	53,72±19,45 (60,1)	<b>0,873</b>
<b>Gengigel HA</b>	38,57±13,31 (33,3)	31,16±7,81 (29,5)	<b>0,378</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,040*</b>	<b>0,024*</b>	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test

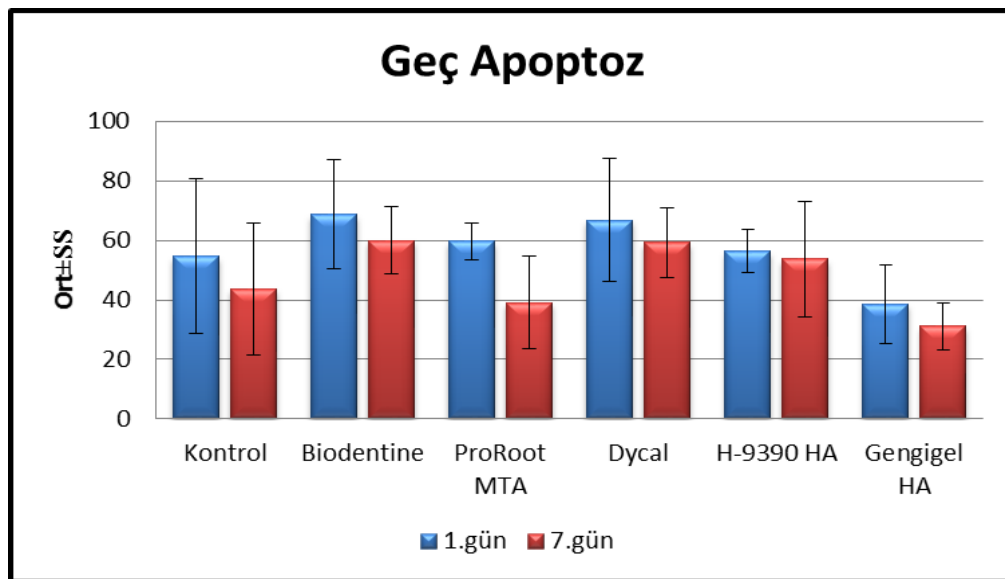
<sup>2</sup> Mann Whitney U Test

\* p<0.05

Tablo 4-8: 1. gün ve 7.günde saptanan geç apoptoz bulgularının post hoc değerlendirilmesi

	Geç Apoptoz	
	1. gün	7. gün
Kontrol-Biodentine	0,200	0,150
Kontrol-ProRoot MTA	0,873	0,522
Kontrol-Dycal	0,262	0,109
Kontrol-H-9390 HA	0,631	0,337
Kontrol-Gengigel HA	0,150	0,200
Biodentine-ProRoot MTA	0,055	0,055
Biodentine-Dycal	0,873	1,000
Biodentine-H-9390 HA	0,078	0,873
Biodentine-Gengigel HA	0,016*	0,004*
ProRoot MTA-Dycal	0,262	0,025*
ProRoot MTA-H-9390 HA	0,337	0,200
ProRoot MTA-Gengigel HA	0,025*	0,423
Dycal-H 9390	0,262	0,749
Dycal-Gengigel HA	0,025*	0,011*
H-9390 HA-Gengigel HA	0,037*	0,055

Mann Whitney U Test

\*  $p < 0.05$ 

Şekil 4-10: 1. gün ve 7. günde saptanan geç apoptotik hücre oranları

#### 4.1.2.5. Akım Sitometri Analizinde Canlı Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizinde materyallerin canlı hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 1. gün canlı hücre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu gözlemlendi ( $p:0.004$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-9). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Dycal grubunun 1. gün canlı hücre oranı; kontrol, ProRoot MTA, H-9390 HA ve Gengigel HA gruplarından anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 1. gün canlı hücre oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-10).

Materyallerin canlı hücre bulguları açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında 7. gün canlı hücre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu gözlemlendi ( $p:0.011$ ;  $p<0.05$ ) (Tablo 4-9). Anlamlılığın hangi materyallerden kaynaklandığının tespit edilmesi için yapılan post hoc analizi sonucunda; Dycal grubunun 7. gün canlı hücre oranı; kontrol, ProRoot MTA ve H-9390 HA gruplarında anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). ProRoot MTA grubunun 7. gün canlı hücre oranı, Biodentine, H-9390 HA ve Gengigel HA gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer grupların 7. gün canlı hücre oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 4-10). Materyallere ait salınım sınırları uygulandıktan 1 gün ve 7 gün sonra canlı hücre oranları Şekil 4-11’de gösterilmektedir.

**Kontrol Grubunda;** 1. gün ve 7. gün canlı hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.337$ ).

**Biodentine Grubunda;** 1. gün ve 7. gün canlı hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.873$ ).

**ProRoot MTA Grubunda;** 7. gün canlı hücre oranı, 1. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ( $p:0.011$ ).

**Dycal Grubunda;** 7. gün canlı hücre oranı, 1. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu ( $p:0.037$ ).

**H-9390 HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün canlı hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.631$ ).

**Gengigel HA Grubunda;** 1. gün ve 7. gün canlı hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p:0.078$ ).

Tablo 4-9: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre bulgularının değerlendirilmesi

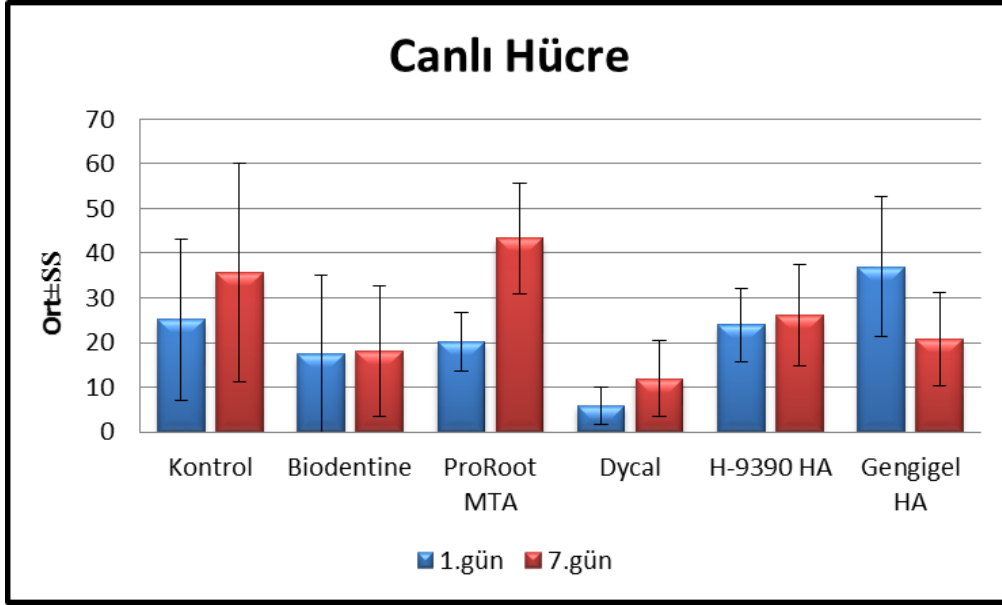
	Canlı Hücre		<sup>2</sup> p
	1. gün	7. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	25,11±18,06 (21,2)	35,65±24,57 (32,9)	<b>0,337</b>
<b>Biodentine</b>	17,34±17,85 (11,1)	18,05±14,54 (11,3)	<b>0,873</b>
<b>ProRoot MTA</b>	20,1±6,6 (17,5)	43,34±12,46 (47,9)	<b>0,011*</b>
<b>Dycal</b>	5,84±4,25 (4,7)	11,88±8,52 (9,1)	<b>0,037*</b>
<b>H-9390 HA</b>	23,9±8,24 (23,5)	26,11±11,43 (23,3)	<b>0,631</b>
<b>Gengigel HA</b>	36,94±15,6 (40)	20,74±10,53 (18,4)	<b>0,078</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,004*</b>	<b>0,011*</b>	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test      <sup>2</sup> Mann Whitney U Test      \* p<0.05

Tablo 4-10: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre bulgularının post hoc değerlendirilmesi

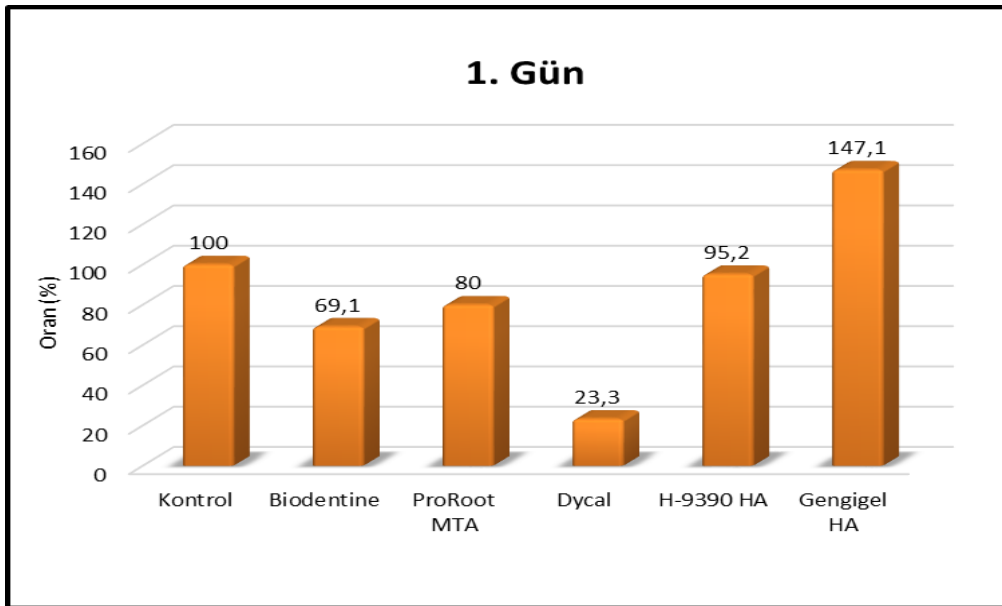
	Canlı Hücre	
	1. gün	7. gün
<b>Kontrol-Biodentine</b>	0,423	0,200
<b>Kontrol-ProRoot MTA</b>	0,873	0,337
<b>Kontrol-Dycal</b>	0,016*	0,011*
<b>Kontrol-H-9390 HA</b>	0,873	0,522
<b>Kontrol-Gengigel HA</b>	0,150	0,337
<b>Biodentine-ProRoot MTA</b>	0,078	0,025*
<b>Biodentine-Dycal</b>	0,055	0,749
<b>Biodentine-H 9390</b>	0,055	0,150
<b>Biodentine-Gengigel HA</b>	0,055	0,423
<b>ProRoot MTA-Dycal</b>	0,006*	0,006*
<b>ProRoot MTA-H-9390 HA</b>	0,423	0,037*
<b>ProRoot MTA-Gengigel HA</b>	0,078	0,016*
<b>Dycal-H 9390 HA</b>	0,004*	0,025*
<b>Dycal-Gengigel HA</b>	0,006*	0,078
<b>H-9390 HA-Gengigel HA</b>	0,150	0,262

Mann Whitney U Test      \* p<0.05



**Şekil 4-11: 1. gün ve 7. günde saptanan canlı hücre oranları**

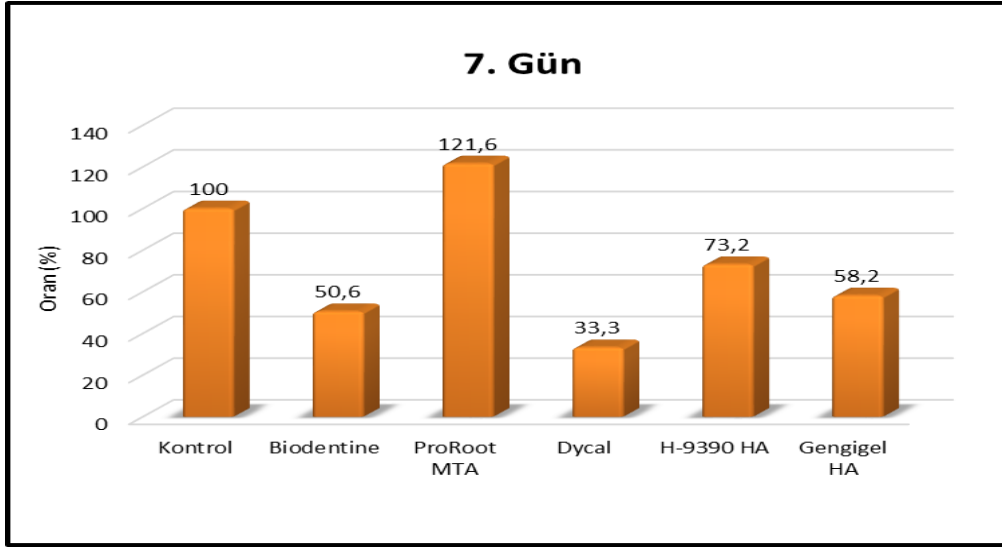
Kontrol grubunun 1. gün canlı hücre oranı %100 kabul edildiğinde; Biodentine grubunun 1. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %69.1'i, ProRoot MTA grubunun 1. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %80'i, Dycal grubunun 1. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %23.3'ü, H-9390 HA grubunun 1. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %95.2'si ve Gengigel HA grubunun 1. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %147.1'idir (Şekil 4-12).



**Şekil 4-12: 1. günde kontrol grubuna göre canlı hücre oranları**

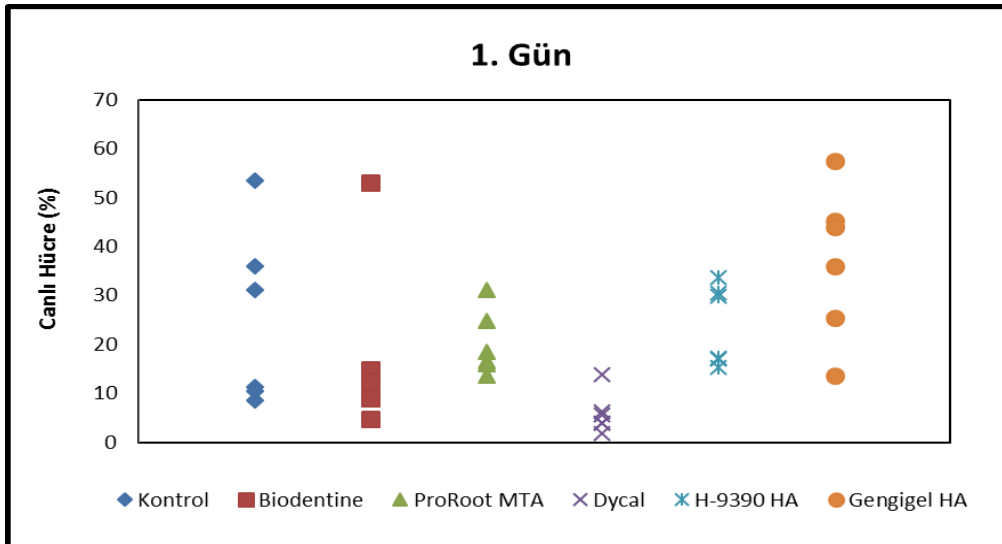
Kontrol grubunun 7. gün canlı hücre oranı %100 kabul edildiğinde; Biodentine grubunun 7. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %50.6'sı, ProRoot MTA grubunun

7. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %121.6'sı, Dycal grubunun 7. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %33.3'ü, H-9390 HA grubunun 7. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %73.2'si ve Gengigel HA grubunun 7. gün canlı hücre oranı kontrol grubunun %58.2'sidir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: 7. günde kontrol grubuna göre canlı hücre oranları

Materyallere ait salınım sıvıları uygulandıktan 1 gün sonra tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranları dağılımı Şekil 4-14'te, 7 gün sonra tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranları dağılımı Şekil 4-15'te gösterilmektedir.



Şekil 4-14: 1. günde tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranlarının dağılımı



Şekil 4-15: 7. günde tüm gruplarda elde edilen canlı hücre oranlarının dağılımı

#### 4.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular

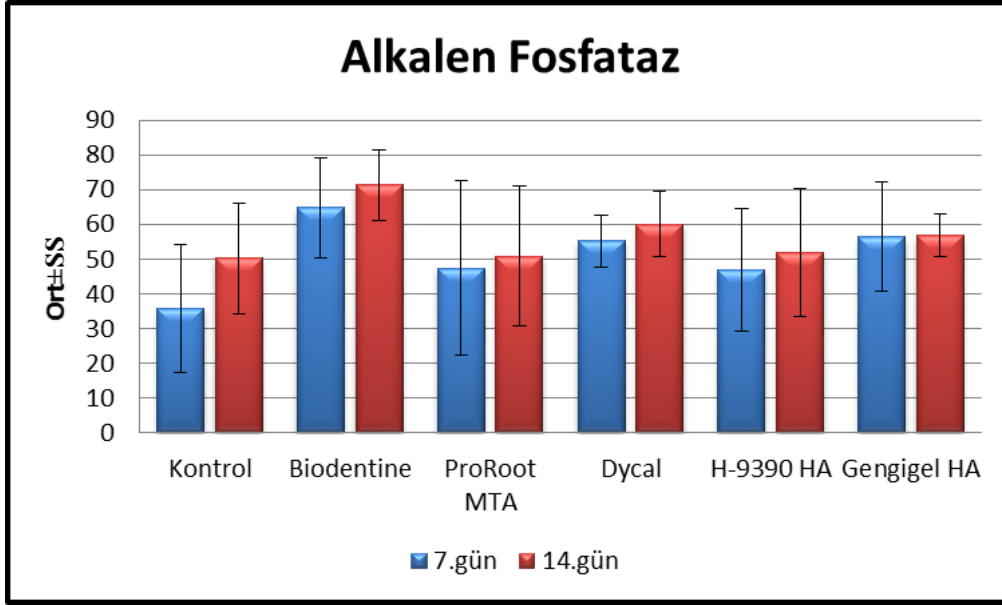
Deney gruplarında 7. ve 14. günlerde toplanan hücre kültürü medyumlarında yapılan alkalen fosfataz aktivitesi analizi sonuçları istatistiksel açıdan değerlendirildi, gruplar arasında 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-11). Materyallere ait salınım sınırları uygulandıktan 7 gün ve 14 gün sonra alkalen fosfataz düzeyi oranları Şekil 4-16'da gösterilmektedir.

Tablo 4-11: 7. gün ve 14. günde saptanan alkalen fosfataz sonuçlarının değerlendirilmesi

	Alkalen Fosfataz		<sup>2</sup> p
	7. gün	14. gün	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
<b>Kontrol</b>	35,83±18,51 (30,1)	50,2±15,87 (48,7)	<b>0,075</b>
<b>Biodentine</b>	64,73±14,39 (59,5)	71,38±10,16 (65,6)	<b>0,175</b>
<b>ProRoot MTA</b>	47,42±25,24 (31,7)	50,8±20,21 (48,7)	<b>0,462</b>
<b>Dycal</b>	55,14±7,34 (53,3)	60,08±9,31 (57,9)	<b>0,465</b>
<b>H-9390 HA</b>	46,96±17,61 (40,9)	51,9±18,54 (48,7)	<b>0,465</b>
<b>Gengigel HA</b>	56,38±15,73 (58,7)	56,84±5,97 (59,5)	<b>0,917</b>
<sup>1</sup> p	<b>0,373</b>	<b>0,124</b>	

<sup>1</sup> Kruskal Wallis Test

<sup>2</sup> Mann Whitney U Test



**Şekil 4-16: 7. gün ve 14. günde saptanan alkalen fosfataz düzeyi oranları**

**Kontrol Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.075).

**Biodentine Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.175).

**ProRoot MTA Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.462).

**Dycal Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.465).

**H-9390 HA Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.465).

**Gengigel HA Grubunda;** 7. gün ve 14. gün alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p:0.917).

## 5. TARTIŞMA

Çeşitli nedenlerle diş pulpasında meydana gelen perforasyonların tedavisinde pulpanın canlı olarak korunmasını sağlamak en önemli amaçtır. Bu amaçla yapılan pulpa kuafaj tedavisinin klinik, radyolojik ve histolojik düzeydeki başarısı birçok etkene bağlıdır. Pulpanın yapısı, açılan pulpa dokusunun yeri ve büyüklüğü, bu bölgede kanama kontrolünün sağlanabilmesi, dentin parçacıkları ve debrisin pulpa dokusu içerisine itilmesi, bakteri ve bakteri ürünlerinin ortamdaki varlığı, bu başarıyı etkileyen temel faktörlerdir (13, 133, 169).

Günümüzde sıklıkla uygulanan vital pulpa tedavilerinden biri olan direkt pulpa kuafaj tedavisinin başarısı, tedavide kullanılan materyallerin etkinliği yönünden değerlendirildiğinde; iki farklı konu gündeme gelmektedir; bunlar kullanılacak materyallerin biyouyumluluğu ve reperatif dentin oluşturabilme yetenekleridir.

Biyolojik özellikleri önceden test edilmemiş materyaller, insanlarda kullanılmadan önce birçok alternatif test ile değerlendirilmektedir. Bir materyalin biyouyumluluğunun araştırılması için kullanılan bu testler; in vitro hücre kültürü testleri, in vivo hayvan deneyleri ve kullanım testleri olarak sınıflandırılmaktadır. İlk olarak bir materyal örneği bir seri in vitro sitotoksikite testleri kullanılarak incelenmektedir. Eğer in vitro yöntemlerle materyalin sitotoksik olmadığı belirlenirse materyal subkutanöz dokulara veya kas dokusuna implante edilerek lokal doku reaksiyonları değerlendirilmektedir. En son olarak da insan veya hayvan deneklerde materyalin kullanılacağı esas dokunun materyale karşı in vivo reaksiyonları değerlendirilmektedir (37, 185).

Yeni geliştirilen bir materyalin toksisitesini belirlemek amacı ile yapılan araştırmalarda kullanılan hücre kültürü testleri, canlı dokuların fizyolojik durumunu taklit etmektedir. In vitro çalışmalar bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, hızlı uygulanabilmeleri, tekrarlanabilme özellikleri, deney ortamının kontrollerinin kolay olması, standardize edilebilmeleri ve ucuz olmaları gibi avantajlara sahiptir. İn vitro çalışmalar hücresel olayları karmaşık hücreler arası ilişkilerden izole olarak incelemeye olanak tanımaktadır (37, 164, 185). Yeni bir materyalin deney hayvanlarında ya da insanlarda klinik kullanımı etik ve yasal problemleri de beraberinde getirdiğinden

dolayı dental materyallerin sitotoksitesilerinin değerlendirilmesinde in vitro testler başlangıç noktası görevi görmektedirler. Bu çalışmada biyouyumluluk testlerinden in vitro hücre kültür testleri tercih edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmasında kullanılmak üzere seçilen hücre tipinin, toksitesinin belirlenmesi amaçlanan materyalin kullanım sahası ile ilişkili olarak seçilmesi oldukça önemlidir. Sitotoksite değerlendirmelerinde biyolojik sistem olarak kültür ortamındaki primer hücreler veya devamlı hücre dizileri kullanılmaktadır. Primer hücre kültürleri, üretim aşamasındaki zorlukları ve hassas hücreler olmaları nedeniyle çalışma sırasında ortaya çıkabilen sorunlara rağmen orijinal fizyolojik durumu en iyi şekilde yansıtılabilmeleri nedeni ile pek çok çalışmada örnek sistem oluşturmaktadır (10, 37, 163). Illeperuma ve ark. yaptıkları bir sitotoksite çalışmasında insan hücre hatlarının, L929 gibi hayvan hücre hatlarına göre biyouyumluluk testlerine daha hassas olduğu göstermiştir (82). ISO 10993-5 standartlarında diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin sitotoksite değerlendirme testlerinde hızlı üremeleri ve primer hücre kültürüne oranla daha kolay elde edilebilmeleri nedeniyle L929, 3T3, MRC-5 gibi devamlı hücre hatlarının da kullanılabileceği belirtilmiştir (84, 185).

Bu çalışmada spesifik metabolik potansiyele sahip primer hücrelerin kullanımı ile in vivo şartlara daha yakın deneysel koşulların oluşacağı düşünülerek insan pulpa dokusundan primer hücre kültürü oluşturulması tercih edilmiştir. Hücreler üretilirken sık çekim endikasyonu olması, pulpa dokusu açısından zengin dişler olması ve ağız ortamı koşullarından etkilenmemiş olması nedeniyle gömük üçüncü büyük azı dişleri tercih edilmiştir. Bu çalışmada üçüncü pasaj sonrası hücreler kullanılmıştır. Hücreler az sayıda pasajlama sürecinden geçmiş oldukları için, hücrelerin karakteristik olarak en az oranda değişime uğradıkları düşünülmektedir. Pulpa dokusunun elde edilmesi aşamasında steril aeratör kullanarak diş kesme işlemi sırasında ortamda bulunan ve aeratörden gelen su içindeki bakterilere bağlı pulpa dokusunun kontamine olma riskini azaltmak için bu çalışmada steril kabin içinde mengene yardımıyla dişin kırılması tercih edilmiştir.

Dental materyallerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde test materyali ile hedef hücreler arasında kontakt sağlanmalıdır. Bu temas, direkt materyal veya materyallerden salınan bileşenlerin salınım sıvılarının teması şeklinde ya da indirekt temas şeklinde olabilmektedir. Direkt temas testlerinde hücrelerle kültür ortamı temas

halindedir. İndirekt temas testlerinde ise hücrelerle test materyalleri arasında geçirgen bir bariyer mevcuttur (156, 164). Temasın salınım sıvıları ile sağlandığı hücre kültürü çalışmalarında farklı ekstraksiyon süreleri, materyallerin sitotoksitelerinin incelenmesi bakımından önemlidir (79).

Bu çalışmada her bir deney materyalinden hazırlanan örneklerden, kültür ortamında 10993-5 standartlarında belirtildiği gibi yüzey/besiyeri oranının 0.5 - 6 cm<sup>2</sup>/ml olacak şekilde 37°C'de 24 saat süre ile bekletilerek elde edilen salınım sıvıları kullanılmıştır. Salınım sıvılarının, sterilizasyon filtreleri yoluyla kolayca steril edilebilmesi ile hücre kültür çalışmalarındaki enfeksiyon riskinin en aza indirgenebilmesi ve materyallerin komşu hücreler ya da materyallere uzak olan hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (96).

İn vitro deneylerde materyallerin biyolojik ortamda ve vücut sıcaklığında çok uzun süre tutulması mikroorganizmalarla kontaminasyon ve ortam bileşenlerinin azalması gibi nedenlerle uygun bulunmamaktadır (186). Bu çalışmada hücre kültürünün özelliklerini koruyabilmek açısından literatürlerdeki farklı süreler de göz önüne alınarak, tek bir inkübasyon süresine bağlı kalmadan materyallerin sitotoksik etkisi 1. ve 7. günlerin sonunda değerlendirilmiştir.

Materyallerin biyouyumluluğunu belirlemek amacıyla sitotoksite çalışmalarında günümüze kadar pek çok in vitro test yöntemi kullanılmıştır. Akım sitometri analizi son yıllarda hücre canlılığı ve sitotoksite belirlemede alternatif yöntemlere göre daha hızlı, daha güvenilir ve daha hassas sonuçlar vermesi bakımından önerilmektedir (194). Bir materyalin sitotoksik etkileri değerlendirilirken apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm tipi ayrımının yapılması bu iki ölüm tipinin farklı biyolojik cevaplar oluşturması açısından önemlidir. Apoptoza uğrayan hücreler apoptotik cisimcik olarak adlandırılan parçalara ayrılmaktadırlar. Bu parçalar plazma membranı ile kaplanarak immün sistemde enflamatuar yanıtı uyarmazlar ve makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Bu yüzden apoptotik hücre ölümünde otoimmün bir yanıt oluşmamaktadır. Nekroza bağlı hücre ölümünde ise hücre hasarı ortaya çıkmaktadır. Bu tip hücre ölümünde hücrelerin şişerek parçalanması sonucu ortaya çıkan hücre içeriği hücreler arası boşluğa salınarak enflamatuar cevabı indüklemektedir (42, 92). Bu sebeplere bağlı olarak dokularla temasta olan bir biyomateryal daha fazla oranda apoptozu indüklüyorsa dokularda inflamasyon oluşturmadığı ve dokularda oluşabilecek

modifikasyonlara daha çabuk adapte olduğu belirtilmektedir. Fakat daha fazla oranda nekrozu indüklüyorsa enflamatuar reaksiyon sonucu ciddi doku hasarları oluşabilmektedir (31).

Hücre apoptozunu belirlemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Anneksin-V floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlendikten sonra hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. Bu nedenle apoptoza giden hücrelerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidium iyodür eklenmektedir (71). Bu çalışmada kullandığımız hücre tespit kiti talimatları doğrultusunda Anneksin-V ve DNA'ya daha yüksek afinite gösterme ve daha floresan özellikte olması gibi sebepler ile propidium iyodüre iyi bir alternatif olan ethidyum homodimer III boyama ile akım sitometri analizi yapılarak canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler saptanmıştır.

HA ekstrasellüler matriksin ana komponentlerinden biri olup fizikokimyasal özellikleri ve saf formunun immünojenik olmaması nedeniyle yıllardır tıbbi alanlarda eksojen olarak uygulanmaktadır. Diş hekimliği alanında da antienflamatuar, antibakteriyel ve nemlendirici etkilerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Henüz sayı olarak çok kısıtlı olmakla beraber, son yıllarda HA'nın vital pulpanın canlılığının korunması için alternatif bir materyal olarak kullanılabilirliği üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Ferroni ve ark. ortodontik amaçla çekilmiş üçüncü büyük azı dişlerinden elde ettikleri dental pulpa kök hücresi ve üç boyutlu HA içerikli doku iskelesini birlikte kullanımının in vitro koşullarda pulpa dokusunun rejenerasyonunda etkinliğini incelemek için hücre morfolojisi, hücre proliferasyonu ve sert doku rejenerasyonu belirteçleri olan osteonektin, osteokalsin, osteopontin gibi çeşitli gen ekspresyonlarını değerlendirmişler ve immunofloresan boyama yapmışlardır. Dental pulpa kök hücrelerinin HA doku iskelesiyle birlikte uygulandığı grupta pulpa dokusuna benzer morfolojiye sahip yapının oluştuğunu belirtmişlerdir. Çalışmanın in vivo kısmının sonuçlarında hyaluronik asitin rat kalvaryal defektlerinde osteodentin benzeri doku yenilenmesini uyardığını ve iyi bir rejenerasyon potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir (58).

Inuyama ve ark. HA içerikli süngerlerin pulpa dokusu üzerinde rejeneratif etkisini odontoblastik hücre kültürü (KN-3) ve ampute edilmiş rat pulpa dokusu üzerinde incelemiştir. Çalışmanın in vitro kısmında HA içerikli süngerlerin hücreler üzerine enflamatuvar etkisi olup olmadığını değerlendirmişler, HA içerikli süngerlerin proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılaya yeteneği olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmanın in vivo kısmında, aynı materyaller ampute edilmiş pulpa yüzeyine implante edilmiş, 3 haftalık gözlem sonucunda HA içerikli süngerin uygulandığı grupta diğer gruba göre daha hücreden zengin ve daha az lökosit infiltrasyonun olduğu yeni pulpa dokusu gözlenmiştir. Sonuç olarak HA içerikli süngerlerin diş pulpası rejenerasyonunda doku iskelesi olarak kullanılabilir biyouyumlulukta olduğunu fakat konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (85).

Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı saf HA'nın insan pulpa dokusundan elde edilen hücreler üzerinde sitotoksik etkisi ve alkalen fosfataz aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yüksek molekül ağırlıklı HA, diş hekimliği kliniğinde kuafaj tedavilerinde sıklıkla kullanılan ProRoot® MTA, Biodentine™ ve Dycal® materyalleri ve hiç bir materyal uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Özdemir ve ark. çalışmalarında yüksek molekül ağırlıklı HA'nın farklı konsantrasyonlarının pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabilirliğini sitotoksik ve histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmanın in vitro kısmında saf HA (Sigma H-9390) steril fosfat tampon solüsyonu içerisinde çözündürülerek %2 (20 mg/ml), %1 (10 mg/ml), %0.5 (5mg/ml), %0.2 (2mg/ml), %0.1 (1mg/ml) ve %0.05 (0,5 mg/ml) konsantrasyonlarında solüsyonları hazırlanmış ve L929 hücreleri üzerine uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerdeki toksisiteyi incelenmiştir. 24 saat sonunda en düşük toksisitenin %0.1 ve %0.05 konsantrasyonlarda HA uygulanan gruplarda olduğunu ve 24, 48. ve 72. saatler sonunda doz arttıkça toksik etkinin arttığını belirtmişlerdir (148).

Bu çalışmada benzer çalışmalar referans alınarak, çalışmalarda kullanılan HA konsantrasyonları üzerine optimizasyon deneyi yapılmıştır ve %0.1'lik konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı HA kullanılması uygun görülmüştür (80, 148). Çalışmada saf HA'nın yanı sıra diş hekimliği kliniğinde tek yüksek molekül ağırlıklı HA içeren ticari preparat olması nedeni ile Gengigel Prof® HA materyali de deney grupları arasına dahil edilerek karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

Literatürde HA'nın sitotoksitesinin hücre kültüründe incelendiği az sayıda çalışma mevcuttur.

Bogovic ve ark. HA'nın rat pulpa dokusundan elde ettikleri odontoblast ve fibroblastlar üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada dört ayrı hücre kültürü oluşturularak; her bir gruba kalsiyum hidroksit, polimerize edilmiş dentin adeziv materyali, Gengigel Prof® HA preparatı uygulanmış ve bir grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Her dört günde bir kültür medyumunu değiştirilerek 14. gün sonunda hücreler akridin oranj ve ethidyum bromür boyaması yapılarak floresan mikroskopunda incelenmiştir. Araştırma sonucunda HA ile muamele edilmiş kültürlerde; diğer gruplara göre hücre canlılığının daha fazla olduğunu ve hem apoptotik hem nekrotik hücre sayılarının anlamlı derecede daha az olduğunu belirtmişlerdir. Kalsiyum hidroksit uygulanan grupta hücrelerdeki apoptoz ve nekroz oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hem HA hem de kalsiyum hidroksit gruplarında apoptotik ve nekrotik hücre oranları kıyaslandığında canlılığını kaybeden hücrelerin daha çok apoptoza uğradığını göstermişlerdir. Sonuç olarak HA'nın kalsiyum hidroksite göre daha az toksik ve daha biyouyumlu bir materyal olduğunu bildirmişlerdir (18). Bu çalışmada hem Gengigel Prof® HA hem de saf HA H-9390 gruplarında hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz oranları kontrol grubuyla benzer olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Her iki HA grubunda da hücre canlılığı hem 1. hem de 7. günde kalsiyum hidroksit preparatı olan Dycal grubuna göre yüksek bulunurken, nekroz ve geç apoptoz hücre oranları ise düşük bulunmuştur. Hem HA hem de kalsiyum hidroksit gruplarında apoptotik ve nekrotik hücre oranları kıyaslandığında canlılığını kaybeden hücrelerin daha çok apoptoza uğradığı sonucu elde edilmiştir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz HA'nın kalsiyum hidroksite göre daha az toksik bulunması Bogovic ve ark.'nın çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Aynı çalışmada HA grubunda hücre sayısını sonrası kontrol grubuna göre daha yüksek oranda fibroblast ve odontoblast varlığı saptanmıştır ve HA'nın reperatif dentin oluşumu için iyi bir potansiyel oluşturduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada araştırmacıların çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde Gengigel Prof HA grubunda hücre canlılığının 1. günde kontrol grubundan yüksek bulunmasını hücre proliferasyonunu uyardığı şeklinde yorumlamaktayız. Hücre canlılığı sonuçları değerlendirildiğinde 1. gün canlı hücre oranları Gengigel Prof HA grubunda, saf HA H-

9390 grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte 7. gün sonunda Gengigel Prof HA grubunda hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Her iki grupta HA konsantrasyonu eşit olacak şekilde hazırlanmış olsa da Gengigel Prof HA grubunda hücre canlılığındaki bu azalmanın saf HA'dan farklı olarak içeriğinde bulunan ksilitol, selüloz sakızı gibi diğer katkı maddeleri nedeni ile olabileceği görüşündeyiz. Bu içerik farklılığına rağmen her iki HA grubunda da hem 1. gün hem de 7. günde hücre canlılığı açısından kontrol grubu ile istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Ayrıca her iki grupta da 1. ve 7. günlerde geç apoptoz ve nekroz hücre oranlarının kontrol grubuna benzer olması bize yüksek molekül ağırlıklı HA'nın geç apoptoz ve nekroza bağlı hücre ölümünü uyardığını göstermektedir.

Bu çalışmanın diğer deney gruplarını oluşturan Biodentine, ProRoot MTA ve Dycal'ın toksisite özelliklerini belirlemeye yönelik farklı değerlendirme metodlarının kullanıldığı birçok in vitro araştırma yapılmıştır.

Hernandez ve ark. ProRoot MTA'nın fare gingival fibroblastları üzerinde hücre apoptozuna etkisini incelemişlerdir. Çalışmada hücreler ile materyallerin arasında indirekt temas sağlanmış ve 24 saat sonunda hücrelere propidium iyodür boyaması yapılarak akım sitometri analizi yapılmıştır. Sonuç olarak apoptoz oranında kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmamış ve ProRoot MTA'nın hücre apoptozunu indüklediğini bildirmişlerdir (73).

Gordoyus ve ark insan periodontal ligament hücreleri üzerinde ProRoot MTA'nın 24., 48. ve 72. saatlerde sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada propidium iyodür ve anneksin V boyaması sonrası akım sitometri analizi ile hücre apoptoz ve nekroz oranları değerlendirilmiş ve sonuç olarak ProRoot MTA'nın hücre apoptozunu indüklediğini bildirmişlerdir. Hücre canlılığı açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamış ve ProRoot MTA'nın biyouyumlu bir materyal olduğunu belirtmişlerdir (68).

Machado ve ark. fare pulpa hücreleri üzerinde ProRoot MTA'nın hücre canlılığına olan etkisini Anneksin V ve propidium iyodür boyaması yaparak 1., 4.ve 7. günlerde akım sitometri analizi yapmışlar ve ProRoot MTA'nın kontrol grubu ile benzer hücre canlılığı gösterdiğini ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir, ProRoot MTA'nın biyouyumlu bir materyal olduğunu belirtmişlerdir (115).

Damas ve ark. ProRoot MTA'nın 24 saatlik deney periyotlarında insan dermal fibroblastları üzerinde biyouyumlu olduğunu ve toksik etki oluşturmadığını (43), Kim ve ark. ProRoot MTA'nın MC3T3-E1 hücreleri üzerinde 48 saat sonunda sitotoksik etki göstermediğini (99), Park ve ark. ProRoot MTA'nın 3.büyük azı dişlerinden elde ettikleri insan pulpa hücreleri üzerinde 1. ve 7. günlerde sitotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir (150). Bu çalışmada da benzer olarak ProRoot MTA grubunda 1. gün ve 7. günlerde kontrol grubuna benzer hücre canlılığı sonuçları elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Hernandes ve ark ile Gordosus ve ark'nın çalışmalarıyla benzer olarak ProRoot MTA'nın hücre apoptozunu veya nekrozunu indüklediği saptanmıştır.

Literatürde Dycal'ın pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, Furey ve ark. Dycal'ın gömük üçüncü büyük azı dişlerinden elde ettikleri insan primer pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT testi ile değerlendirmişler ve 24 saat sonunda Dycal'ın %80'e yakın hücre ölümüne neden olduğunu ve anlamlı derecede sitotoksik olduğunu belirtmişlerdir (61). Bu çalışmada Dycal materyalinin uygulandığı pulpa hücrelerinden elde edilen bulgularda; canlı hücre oranının hem 1. gün hem de 7. günde kontrol grubu ve diğer materyal gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, geç apoptoz ve nekroza bağlı hücre ölümünün arttığı gözlenmiştir. 7. günde nekroza bağlı hücre ölümü kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Yasuda ve ark. ProRoot MTA ve Dycal materyallerinin rat kesici dişlerinden elde ettikleri pulpa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hücreler ile materyaller arasında indirekt temas sağlanarak 5, 10, 24 ve 72 saatlerde MTT testi yapılmıştır. 24 saat sonunda ProRoot MTA grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, Dycal grubunda hücre canlılığı kontrol grubundan ve ProRoot MTA grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Çalışma sonucunda ProRoot MTA'nın hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediğini, Dycal grubunun ise yüksek oranda hücre ölümüne yol açtığını bildirmişlerdir (190).

Min ve ark. insan pulpa dokusundan elde ettikleri hücreler üzerinde MTA ve Dycal materyallerinin sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Materyaller hazırlanıp sertleşme süreleri tamamlandıktan sonra hücreler üzerine direkt uygulamışlar ve 12, 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi yapmışlardır. Sonuç olarak MTA grubunun tüm inceleme

periyotlarında kontrol grubuyla benzer hücre canlılığı gösterdiği ve sitotoksik olmadığını, Dycal grubunun ise hem kontrol hem MTA gruplarından anlamlı derecede düşük hücre canlılığı gösterdiğini bildirmişlerdir (121).

de Souza ve ark. ProRoot MTA ve kalsiyum hidroksitin köpeklerde kuafaj uygulaması sonrası pulpaya olan histopatolojik etkisini ve murin odontoblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın in vitro bölümü sonuçlarına göre kalsiyum hidroksitin MTA'ya kıyasla daha sitotoksik bir materyal olduğu, dişe uygulandığında daha fazla miktarda pulpa hücresinde nekroza neden olduğunu bildirilmişlerdir (44).

Güven ve ark. çeşitli kuafaj materyallerinin biouyumluluğunu değerlendirdikleri çalışmalarında ProRoot MTA ve Dycal materyallerini üçüncü büyük azı dişinden elde ettikleri pulpa kök hücreleri üzerine uygulamışlardır. 48 saat sonunda MTS analizi sonucunda hücre canlılığı ProRoot MTA grubunda, Dycal grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek hücre canlılığı bulunmuştur (70). Bu çalışmada 1. ve 7. günler sonunda ProRoot MTA ve Dycal grupları karşılaştırıldığında her iki günde de hücre canlılığı ProRoot grubunda Dycal grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Dycal grubunda 1. gün geç apoptoz ve nekroza bağlı hücre ölüm oranı hem kontrol hem ProRoot MTA grubuna göre yüksek bulunmuş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 7. günde nekroza bağlı hücre ölümü Dycal grubunda her iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Takita ve ark. ProRoot MTA ve Dycal'ın üçüncü büyük azı dişinden elde ettikleri insan pulpa hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerini 3. günden 14. güne kadar takip ettikleri çalışmalarında, Dycal'ın hücre proliferasyonunu etkilemediğini fakat ProRoot MTA'nın bazı örneklerde 9. gün, bazı örneklerde ise 12. gün itibari ile anlamlı derecede yüksek hücre proliferasyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar her iki materyalin kalsiyum salınımını değerlendirmişler ve ProRoot MTA grubunda kalsiyum iyonu salınımının, Dycal grubuna göre bütün zamanlarda daha fazla olduğunu ve hücre proliferasyonun kalsiyum iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca ProRoot MTA grubunda kalsiyum iyonu salınımının deney periyodu olan 14 gün boyunca devam ettiğini fakat Dycal grubunda kalsiyum iyonu konsantrasyonunun deney süreci boyunca hemen hemen aynı seviyede

olduğunu bildirmişlerdir (176). Bu çalışmada da kontrol gruplarının canlılığı %100 kabul edildiğinde 7. gün sonunda ProRoot MTA grubunda görülen %121 hücre canlılık oranını ProRoot MTA'nın yüksek kalsiyum iyonu salınımı göstererek hücre proliferasyonunu uyarmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Jang ve ark. ProRoot MTA ve Biodentine'in insan periodontal ligament hücrelerinde sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Hazırlanan materyaller 37°C' de 24 saat inkübe edilerek salınım sıvıları elde edilmiş ve elde edilen salınım sıvıları hücreler üzerine uygulanarak 1, 3 ve 7. günlerde XTT testi ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir. 1. ve 7. günlerde ProRoot MTA ve Biodentine gruplarının salınım sıvılarına maruz kalan hücre gruplarının canlılık oranında kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, ProRoot MTA grubunda Biodentine grubuna göre hücre canlılığı daha yüksek olmakla beraber anlamlı bir fark gözlenmediğini, her iki materyalin de hücreler üzerinde sitotoksik olmadığını belirtmişlerdir (88).

Zhou ve ark. Biodentine, ProRoot MTA insan gingival fibroblastları üzerine sitotoksik etkisini incelemişlerdir. Materyal örnekleri 37°C'de 2 gün hücre kültür medyumunda bekletilerek salınım sıvıları edilmiştir. Hücre canlılığının belirlenebilmesi için 1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 gibi farklı konsantrasyonlarda sulandırılan salınım sıvıları uygulanan hücrelere Calcein AM ve ethidyum homodimer boyaması yapılarak 1, 3 ve 7. günlerde akım sitometri analizi yapılmıştır. Deney periyodu boyunca her iki grupta yüksek canlılık oranı gözlenmiştir. Aynı konsantrasyon uygulanan gruplarda Biodentine ve ProRoot materyalleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (194).

Poggio ve ark. Dycal, ProRoot MTA ve Biodentine materyallerinin murin odontoblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini inceledikleri bir çalışmada; 24 saat sonunda hücre canlılığını hem MTT testi ile hem de alamar mavisi testi uygulayarak incelemişlerdir. Her iki test ile yapılan değerlendirme sonucunda ProRoot MTA ve Biodentine gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış, ancak Dycal grubunda hücre canlılığı anlamlı derecede düşük bulunmuştur (155).

Attik ve ark. insan MG63 osteoblast hücreleri üzerinde ProRoot MTA ve Biodentine'in biyouyumluluklarını karşılaştırmışlardır. Hazırlanan materyal örneklerini direk temas testi ile hücrelerin üzerine uygulamışlar ve 1., 3. ve 5. günlerde MTT

analizi ile hücre canlılığı değerlendirmesi yapmışlardır. Her iki materyalin aynı deney periyotlarında benzer hücre canlılığı gösterdiğini fakat güne bağlı olarak hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir (11). Bu çalışmada Biodentine grubunda hücre canlılığı 1. ve 7. günlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Ayrıca hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları incelendiğinde Biodentine grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Nekroza bağlı hücre ölümü zamana bağlı olarak artarken, geç apoptoza bağlı hücre oranı zamana bağlı olarak azalmıştır, fakat her ikisinde de anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Lee ve ark. Biodentine, Bioagregat ve ProRoot MTA'nın mezenkimal kök hücreler üzerinde hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemiştir. Hücrelere materyallerin 37°C'de 24 saat bekletilerek elde edilen salınım sıvıları farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek uygulanmıştır. Hücre canlılığı XTT testi ile incelenmiş ve 5. gün sonunda 1:1 konsantrasyonda uygulanan Biodentine grubunda hücre canlılığı ProRoot MTA'ya göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu çalışmada Biodentine ve ProRoot MTA grupları karşılaştırıldığında hücrelerin 1. gün canlı, apoptoz ve nekroz hücre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 7. gün sonunda ise materyallerin apoptoz ve nekroz oranında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, ProRoot MTA grubunda, canlı hücre oranı Biodentine'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç Lee ve ark. çalışması ile benzerlik göstermiştir. Lee ve ark. Biodentine'in hücre canlılığının ProRoot MTA'ya göre düşük olmasını Biodentine materyalinin likit kısmı olan kalsiyum klorite bağlı olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir (110). Benzer şekilde Kang ve ark. ProRoot MTA'nın toz kısmını, sertleşme reaksiyonunu kısaltmak için %10'luk kalsiyum kloritle karıştırarak 1., 4. ve 7. günler sonunda MG-63 hücreleri üzerindeki etkisini XTT testi ile değerlendirmişlerdir. Kalsiyum klorit ile karıştırılan grupta distile su ile karıştırılan gruba göre hücre canlılığının tüm deney periyotlarında daha az olduğunu ve biyoyumluluğun daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada grupların kalsiyum iyon salınımı değerlendirilmiş ve kalsiyum kloritle karıştırılan grupta kalsiyum iyon salınımının en yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir (93). Bu görüşten farklı olarak MTA'nın kalsiyum kloritle karşılaştırıldığında biyolojik özelliklerinin değişmediğini ve hücreler üzerinde biyoyumlu olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (2, 106, 109). MTA'nın kalsiyum iyonu salınımını yaparak

ortamdaki kalsiyum iyonu konsantrasyonunu arttırdığı, hücre farklılaşması ve mineralizasyonunu uyardığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (74, 160, 181) . Kalsiyum iyonlarının varlığı hücrelerin canlılığı ve vital fonksiyonları için gerekli olduğu bilinmektedir. Fakat kalsiyum iyonunun yüksek konsantrasyonda hücreler üzerinde sitotoksik olduğunu ve apoptoz ve nekroza bağlı hücre ölümünü uyardığını gösteren araştırmalar da mevcuttur (120, 146).

Vital pulpa dokusu üzerine uygulanacak bir materyal için biyouyumluluk kadar sert doku formasyonunu uarması da önemli bir özelliktir. Biomateriyallerin mineralizasyonu uyarma yetenekleri değişik hücrel biyokimyasal belirteçlerin ekspresyonu ile değerlendirilebilmektedir (127). Sert doku mineralizasyonu ile bağlantılı osteoblastik aktivitenin belirlenmesinde erken ve geç dönem belirteçler kullanılmaktadır. Erken dönem belirteçler alkalen fosfataz ve tip I kollajen; geç dönem belirteçler ise osteonektin, osteopontin ve osteokalsin seviyeleridir (27, 113). Alkalen fosfataz genellikle mineralizasyon sürecine dahil olan plazma membranına bağlı bir enzim olup sert doku oluşumunun önemli bir bileşenidir. Alkalen fosfatazın serbestlediği fosfat iyonları kalsiyum iyonları ile reaksiyona girerek hidroksiapatitin moleküler bir birimi olan kalsiyum fosfatı oluşturmaktadır. Enzim ekspresyonunun yeni doku mineralizasyonunda iyi bir belirteç olduğu gösterilen doku mühendisliği deneyleri, alkalen fosfataz ekspresyonu konusuna olan ilginin daha da artmasına yol açmıştır. Bu çalışmalarda sert doku oluşum hızı alkalen fosfataz ekspresyonundaki artışla ölçülmektedir çünkü bu artış yeni dokuda kaçınılmaz olarak bir mineralizasyona neden olmaktadır. Biyokimyasal ve histolojik çalışmanın kolaylığının bir sonucu olarak, alkalen fosfataz mineralize doku hücrelerinin fenotipinin ya da gelişimsel maturitesinin değerlendirilmesi için en çok tercih edilen biyokimyasal belirteç halini almıştır (66).

Literatürde yüksek molekül ağırlıklı hayluronik asitin insan dental pulpa hücresinde alkalen fosfataz aktivitesi üzerine etkisini inceleyen sadece bir in vitro çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmanın çıkış noktalarından biri olan yüksek molekül ağırlıklı HA'nın kuafaj materyali olarak kullanılabilirliği açısından sert doku oluşumunu inceleyen in vivo çalışmalar değerlendirildiğinde literatürde kısıtlı sayıda çalışma bulunmuştur.

Özdemir ve ark. yüksek molekül ağırlıklı HA'nın farklı konsantrasyonlarının pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabilirliğini histopatolojik olarak değerlendirdikleri

çalışmada araştırmacılar saf HA (Sigma H-9390)'nın %2 ve %0.2 konsantrasyonları, kalsiyum hidroksit ve kontrol grubu olmak üzere dört deney grubu oluşturmuşlar ve materyalleri 84 deney köpeği pulpasına uygulayarak bir hafta, bir ay ve üç ay sonunda histopatolojik olarak incelemişlerdir. 1 aylık gözlem sonucu kontrol gruplarında tamir dentini oluşumu saptanmazken, HA ve kalsiyum hidroksit gruplarında tamir dentini oluşumu gözlenmiştir. 3 aylık gözlem sonucunda oluşan tamir dentininin belirgin bir hal aldığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak yüksek molekül ağırlıklı HA'nın düşük konsantrasyonlarının açık pulpa dokusunun iyileşmesi için elverişli bir ortam sağlayabildiğini bildirmişlerdir (148).

Sasaki ve ark. yüksek molekül ağırlıklı HA (NRD 101) ve kalsiyum hidroksitin reperatif dentin oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla rat molar dişlerinde oluşturdukları kavitelere materyalleri uygulamışlar ve 2. haftada yara kenarlarında ince reperatif dentin tabakalarının oluştuğunu, 1. ve 2. aylarda oluşan reperatif dentinin, dentin duvarlarından pulpa odasının merkezine doğru ilerlediğini gözlemlemişlerdir. Oluşan sert doku formasyonun kalsiyum hidroksitin oluşturduğu sert doku ile benzer şekilde kalsifikasyon odakları ve reperatif dentin indüksiyonu gösterdiğini belirtmişlerdir (162).

Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı HA'nın pulpa dokusu üzerinde sert doku mineralizasyonu etkisinin değerlendirilmesi amacıyla in vitro koşullarda mineralizasyonun erken belirteçlerinden olan alkalen fosfataz tespiti yapılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı HA'nın pulpa hücrelerinin alkalen fosfataz aktivitesi üzerine etkisi inceleyen literatürde sadece bir çalışma bulunmakla beraber başka hücre tipleri üzerine yapılmış in vitro çalışmalar bulunmaktadır.

Chen ve ark. yüksek molekül ağırlıklı HA'nın üçüncü büyük azı dişlerine ait pulpa dokularından elde edilen hücrelerin farklılaşması ve mineralizasyonu üzerine olan etkilerini incelemek için alkalen fosfataz aktivitesi tayini ve alizarin kırmızısı boyaması yapmışlardır. Bu amaçla yüksek molekül ağırlıklı HA farklı konsantrasyonlarda (0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml) hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Araştırmacılar 3. gün sonunda alkalen fosfataz aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiğini, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek olduğunu ve en yüksek aktivitenin 2 mg/ml HA uygulanan grupta olduğunu belirlemişlerdir. 2 mg/ml konsantrasyonda HA

uygulanan grupta alkalen fosfataz aktivitesi 7. ve 14. günlerde incelemeye devam edildiğinde 7. gün sonunda 2 mg/ml konsantrasyondaki HA'nın istatistiksel olarak kontrol grubuna benzer, 14. günde ise kontrol grubundan düşük alkalen fosfataz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak yüksek molekül ağırlıklı HA'nın dental pulpa hücreleri üzerinde erken mineralizasyonu uyardığını ve biyolojik özellikleri sayesinde rejeneratif pulpa tedavilerinde kuafaj materyali olarak kullanılabilirliğinin umut verici olduğunu belirtmişlerdir (28).

Zou ve ark. domuz kemik iliği stromal hücrelerinde hyaluronik asitin farklı konsantrasyonlarının (1mg/ml, 4mg/ml) alkalen fosfataz aktivitesi üzerine etkilerini 2. ve 7. günlerde incelemiştir. 1mg/ml konsantrasyonunda HA uygulanan grupta 7. günde alkalen fosfataz aktivitesinin uyarılmadığını bildirmişlerdir (195).

Huang ve ark HA'nın yenidoğan ratların kalvaryal hücrelerinden elde ettikleri mezenkimal kök hücreler üzerinde osteoblastik proliferasyon ve diferansiyasyona etkilerini incelemiştir. Düşük molekül ağırlıklı HA (60 kDA) ve yüksek molekül ağırlıklı (900, 2300 kDA) HA'yı 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2mg/ml olarak üç farklı konsantrasyonda hazırlayarak hücrelere uygulamışlar ve farklılaşmayı gözlemlemek için 7. günden 20. güne kadar alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin gen ekspresyonunu incelemiştir. Düşük molekül ağırlıklı HA alkalen fosfataz aktivitesini etkilemezken, yüksek molekül ağırlıklı HA grubunda özellikle 1 mg/ml konsantrasyonunda alkalen fosfataz aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını belirtmişlerdir. HA'nın molekül ağırlığına ve dozuna bağlı olarak osteojenik ve osteoindüktif etki gösterebildiğini belirtmişlerdir (80). Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı saf HA H-9390 ve Gengigel Prof HA gruplarında 7. ve 14. günlerde alkalen fosfataz aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Literatürde bu çalışmada kullanılan 1 mg/ml konsantrasyonunda yüksek molekül ağırlıklı HA'nın 7. ve 14. günlerde pulpa hücreleri üzerindeki alkalen fosfataz aktivitesini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aynı hücre tipi ve aynı konsantrasyonda HA'nın kullanıldığı tek çalışma olan Chen ve ark.'nın çalışmasında 3. günde alkalen fosfataz aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olarak uyarıldığı gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmaların ve bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde ortaya çıkabilen farklılıkların kullanılan hücre tipi, HA

konsantrasyonu ve deney zamanlarındaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Chang ve ark. ProRoot MTA'nın insan pulpa hücreleri üzerindeki biyouyumluluğunu ve odontoblastik differansiyasyonunu inceledikleri çalışmalarında materyaller hücre kültürlerine uygulandıktan sonraki 7. ve 14. günlerde alkalin fosfataz aktivitesini incelemişlerdir. Proroot MTA uygulanan grupta alkalin fosfataz aktivitesinin hem 7. gün hem de 14. günlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu ve aktivitenin zamana bağlı olarak arttığını belirtmişlerdir (27).

Eid ve ark. murin dental pulpa hücreleri üzerinde Proroot MTA'nın alkalin fosfataz aktivitesine etkisini 7. ve 14. günlerde incelemişlerdir. Alkalin fosfataz aktivitesinin 14. günde 7. güne artış göstermekle beraber istatistiksel anlamlı olmadığını fakat her iki gün periyodunda kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir (47). Bu çalışmada Proroot MTA'nın alkalin fosfataz aktivitesi sonuçları Chang ve ark., Eid ve ark. çalışmalarına benzer şekilde 14. günde 7. güne göre alkalin fosfataz aktivitesi artış göstermiş fakat bu çalışmalarından farklı olarak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

Lee ve ark. Biodentine, Bioagregat ve Proroot MTA'nın mezenkimal kök hücreler üzerinde mineralizasyona etkisini incelemek için alkalin fosfataz ekspresyonunu alkalin fosfataz boyaması yaparak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda Biodentine ve Proroot MTA gruplarında alkalin fosfataz aktivitesi kontrol grubuna göre artmış fakat istatistiksel anlamlılık göstermemiştir (110).

Peng ve ark. kalsiyum hidroksit ve trikalsiyumsilikat materyallerinin insan pulpa hücreleri üzerine odontojenik diferansiyonunu incelemişlerdir. Materyallerin hazırlanan salınım sıvılarını ortodontik amaçla çekilen sağlıklı küçük azı ve üçüncü büyük azı dişlerinden elde ettikleri hücrelerden oluşturdukları kültürlere uygulamışlar ve 4., 7. ve 10. günlerde osteonektin, alkalin fosfataz, kollajen tip I, dentin sialoproteinleri gibi odontejenik belirteçlerin ekspresyonunu incelemişlerdir. Trikalsiyum silikat grubunda alkalin fosfataz aktivitesinin 4. ve 7. günlerde kontrol grubuna göre farklılık göstermediğini fakat 10. günde kalsiyum hidroksit ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Kalsiyum hidroksit grubunda ise 4., 7. ve 10. günlerde alkalin fosfataz aktivitesinin

istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (152). Bu çalışmada Peng ve ark. çalışmasına benzer olarak 7. ve 14. günlerde kalsiyum hidroksit preparatı olan Dycal grubunda alkalen fosfataz aktivitesinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Zanini ve ark. murin pulpa hücreleri üzerinde Biodentine'in biomineralizasyon üzerine etkilerini incelemek için hücre proliferasyonu, alkalen fosfotaz aktivitesi ve mineralizasyondan sorumlu çeşitli genlerin ekspresyonlarını incelemiştir. Biodentine uygulanan grupta 7. gün sonunda alkalen fosfataz aktivitesi açısından kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmediğini bildirmişlerdir (193).

Chang ve ark. Biodentine, Ortho-MTA ve Angelus MTA'nın mineralizasyon potansiyellerini inceledikleri çalışmalarında materyallerin insan pulpa hücreleri üzerindeki odontoblastik differansiyasyon potansiyellerini incelemek için Alizarin kırmızısı boyaması, alkalen fosfataz aktivitesi tayini ve bazı mRNA gen ekspresyonlarının ölçümünü yapmışlardır. Çalışmanın alkalen fosfataz aktivitesi tayini bölümünde 7. ve 14. günlerde alkalen fosfataz aktivitesi incelenmiş ve 14. günde 3 grupta da 7. güne göre aktivitenin arttığı gözlenmiştir fakat kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (26). Bu çalışmada Biodentine grubunda alkalen fosfataz aktivitesi 7. ve 14. günlerde kontrol grubuna göre yüksektir. Ayrıca 14. günde 7. güne göre aktivitenin arttığı fakat anlamlı olmadığı sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlar Zanini ve ark., Chang ve ark.'nın çalışmalarının sonucuyla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada 7. ve 14. günde elde edilen alkalen fosfataz aktivitesi değerleri tüm gruplarda kontrol grubundan yüksek olmakla beraber güne bağlı olarak artmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Saptanan zayıf alkalen fosfataz aktivitesi; hücrelerin odontoblastik diferansiyasyonun erken döneminde olması nedeniyle henüz diferansiyatif etki oluşturamamış olabileceğini düşündürmektedir.

İn vitro çalışmalarda ISO (10993-5) test metodlarına birtakım standartlar getirmiş olsa da prosedürlerde tam bir standardizasyon uygulanabilmesi mümkün olmayabilmektedir. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmanın sonuçlarındaki farklılıkların, donörlerin farklı olması, kullanılan hücre çeşidi, materyalin hazırlanışı ve hücrelerle temas etme şekli, değerlendirme yöntemlerinin

farklılıkları ve hücrelerin materyalle temas etme sürelerindeki farklılıklar gibi bir çok nedene bağlı olabileceği düşünülmektedir.



## SONUÇLAR

Yüksek molekül ağırlık HA'nın insan pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin ve alkalen fosfataz aktivitesinin direkt pulpa kuafaj tedavilerinde günümüzde sıklıkla kullanılan Proroot MTA, Biodentine, Dycal materyalleri ile karşılaştırmalı olarak incelenen bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Çalışmanın 1. gün sonuçlarına göre saf HA H-9390 ve Gengigel Prof HA gruplarında canlı hücre oranı kontrol grubu, ProRoot MTA ve Biodentine gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermezken, Dycal grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- Çalışmanın 7. gün sonuçlarına göre saf HA H-9390 ve Gengigel Prof HA gruplarında canlı hücre oranında kontrol grubu ve Biodentine gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Hücre canlılığı 7. gün sonunda Dycal grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek, Proroot MTA grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.
- Gengigel Prof HA grubunda 1. günde canlı hücre oranı saf HA H-9390 grubuna göre daha yüksek iken 7. günde daha düşük bulunmuştur. Fakat her iki günde de hücre canlılığı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Saf HA H-9390 ve Gengigel Prof HA grupları 1. ve 7. günlerde geç apoptoz ve nekroza bağlı hücre ölümünü uyarmamış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.
- Gengigel Prof HA grubunda geç apoptoza bağlı hücre ölümü 1. ve 7. günlerde Biodentine grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- Sitotoksite değerlendirmesinde tüm gruplar içerisinde en yüksek hücre ölümü oranı hem 1. gün hem de 7. günde Dycal grubunda gözlenmiştir. 7. günde nekroza bağlı hücre ölümü Dycal grubunda tüm gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- ProRoot MTA ve Biodentine grupları 1. ve 7. gün canlı, apoptoz, nekroz hücre oranları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı bir fark

göstermemiş ve biyoyumlu bulunmuştur. Hücre canlılığı ProRoot MTA grubunda hem 1. gün hem de 7. gün Biodentine grubuna göre yüksek olup sadece 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

- Çalışmada 7. ve 14. günde elde edilen alkalen fosfataz aktivitesi değerleri tüm gruplarda kontrol grubundan yüksek olmakla beraber güne bağlı olarak artmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

Bu bulgular doğrultusunda çalışmada yüksek molekül ağırlıklı HA, insan primer pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturmamış ve biyoyumluluk göstermiştir. Mineralizasyonun erken belirteçlerinden olan alkalen fosfataz aktivitesini uyarılmış olmakla birlikte HA'nın doku mineralizasyonu üzerindeki etkilerini inceleyen kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmanın bulgu ve sonuçlarının, yüksek molekül ağırlıklı HA'nın kuafaj materyali olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi ve bu amaçla kullanılacak olan klinik materyal formlarına dönüştürülebilmesi açısından gelecekte yapılacak olan çalışmalara yardımcı olabileceği ve ışık tutabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Abatangelo G, O'Regan M. Hyaluronan Biological role and function in articular joints. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1995; **15**: 9-16.
2. Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002; **23**: 4001–4010.
3. About I, Laurent P, Tecles. Bioactivity of Biodentine a CA<sub>3</sub>SiO<sub>5</sub>-based Dentine Substitute. Oral session. IADR Congress July 2010, Barcelona, Spain. Erişim 25.10.2015, [https://live.blueskybroadcast.com/bsb/client/\\_new\\_default.asp?action=SEARCH&Client=404900](https://live.blueskybroadcast.com/bsb/client/_new_default.asp?action=SEARCH&Client=404900).
4. Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RHM, Murata SS, Holland R. Response of Human Dental Pulp Capped with MTA and Calcium Hydroxide Powder. *Oper Dent* 2008; **33**(5): 488-495.
5. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; **36**: 225-231.
6. Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Suzuki S, Cox C. Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on non-exposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int* 1998; **29**(3): 177–188.
7. Akyüz řN, Erdemir A. Kalsiyum hidroksitin endodontideki kullanım alanları. *Süleyman Demirel Üniv Diş Hek Fak Derg* 2010; **2**(1):53-66.
8. Alaçam T. *Endodonti*. Ankara: Özyurt Matbaacılık, 2012; pp. 41-70.
9. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**(13): 1591-1596.
10. Arenholt-Bindslev D, Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies; tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int Endod J* 1990; **23**(2): 84-91.
11. Attik GN, Villat C, Hallay F, Plasse NP, Bonnet H, Moreau K, Colon P. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblast cells: Biodentine™ versus MTA. *Int Endod J* 2014; **47**: 1133-1141.
12. Baume L, Holz J. Long-term clinical assessment of direct pulp capping. *Int Dent J* 1981; **31**(4): 251–260.

13. Bayırlı G. *Diş Pulpası ve Ağrı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, 1999. pp. 41-84.
14. Belobrov I, Weis MV, Parashos P. Conservative treatment of a cervical horizontal root fracture and a complicated crown fracture: a case report. *Aust Dent J* 2008; **53**: 260-264.
15. Bishop MA., Yoshida S. A Permeability barrier to lanthanum and the presence of collagen between odontoblasts in pig molars. *J Anat* 1992; **181**: 29-38.
16. Bogen G, Kim J, Bakland L. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate. *J Am Dent Assoc* 2008; **139**(3): 305–315.
17. Bogen, G.,Kuttler, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod* 2009; **35** (6): 777-790.
18. Bogovic A, Nizetic J, Galic N, Zeljezic D, Micek V, Mladinic M. The Effects of Hyaluronic Acid, Calcium Hydroxide, and Dentin Adhesive on Rat Odontoblast and Fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011; **62**: 155-161.
19. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; **83**: 408–413.
20. Brännström M. The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. *J Endod* 1986; **12**: 475- 481.
21. Brosch JW. Capping pulp with a compaund of calcium phosphate, neomycin and hydrocortisone. *J Dent Child* 1966; **33**(1): 42-49.
22. Caicedo R, Abbott P, Alongi D, Alarcon M. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Aust Dent J* 2006; **51**(4): 297–305.
23. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2005; **38**: 834-842.
24. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013; **29**: 580–593.
25. Cebe F. İki farklı kanama durdurucu müdahalenin insan diş pulpasının iyileşmesi ve bir bonding ajanın dentine bağlanma dayanımı üzerine etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Konya. 2013.

26. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of Calcium Silicate Endodontic Cements on Biocompatibility and Mineralization-inducing Potentials In Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2014; **40**(8): 1194-1200.
27. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2014; **40**(1): 113-118.
28. Chen KL, Yeh YY, Lung J, Yang YC, Yuan K. Mineralization Effect of Hyaluronan on Dental Pulp Cells via CD44. *J Endod* 2016; 1-6.
29. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep* 1999; **7**: 79–89.
30. Christensen GJ. Pulp capping. *J Am Dent Assoc* 1998; **129**: 1297-1299.
31. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Martre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000; **108**(1): 59-69.
32. Cohen S., Burns R.C. *Pathways of the Pulp*. 8<sup>th</sup> edition. St. Louis: CV Mosby, 2002.
33. Cox CF, Bogen G, Kopel HM, Ruby JD. Repair of pulpal injury by Dental materials. İçinde Hargreaves KM, Goodis HE, Seltzer S (Eds). *Seltzer's and Bender's dental pulp*. Chicago: Quintessence Publishing; 2002. pp. 325-343.
34. Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. *Int J Periodont Res Dent* 1996; **16**: 241-251.
35. Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc* 1994; **125**: 823-831.
36. Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int.* 1992; **23**: 257-70.
37. Craig RG, Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's Restorative Dental Materials*. 12th Ed. St. Louis: Mosby; 2006. pp. 97-125.
38. Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* 1978; **4**: 232-237.

39. Cvek M. Hard Tissue Barrier Formation in Pulpotomized Monkey Teeth Capped with Cyanoacrylate or Calcium Hydroxide for 10 and 60 Minutes. *J Dent Res* 1987; **66**(6): 1166-1174.
40. Çakır O, Kazancıoğlu HO, Ak G. Diş Hekimliğinde Hyaluronik Asit'in Yeri. *İ Ü Diş Hek Fak Derg* 2011; **45**(1): 37-41.
41. Çalışkan MK. *Endodontide Tanı ve Tedaviler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2014. pp. 31-82.
42. Çoşkun G, Özgür H. Molecular Mechanism of Apoptosis and Necrosis. *Archives Medical Review Journal* 2011; **20**(3): 145-158.
43. Damas BN, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod* 2011; **37**(3): 372-375.
44. de Souza Costa C, Duarte P, de Souza, P, Giro E, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent* 2008; **21**(4): 255-261.
45. de Souza Costa C, Edwards C, Hanks C. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent* 2001; **14**: 25–30.
46. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin in Cell Biol* 2004; **16**(6): 663- 669.
47. Eid AA, Niu L, Primus CM, Opperman LA, Pashley DH, Watanabe I, Tay FR. In Vitro Osteogenic/Dentinogenic Potential of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement. *J Endod* 2013; **39**(9): 1161-1166.
48. Elgalaid TO, Creanor SL, Creanor S, Hall AF. The permeability of natural dentine caries before and after restoration: An in vitro study. *J Dent* 2007; **35**(8): 656-663.
49. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; **35**: 495-516.
50. Engstrom PE, Shi XQ, Tronje G, Larsson A, Welander U, Frithiof L, and Engstrom GN. The effect of hyaluronan on bone and soft tissue and immune response in wound healing. *J Periodontol* 2001; **72** (9): 1192-1200.

51. Esmeraldo MR, Carvalho MG, Carvalho RA, Lima Rde F, Costa EM. Inflammatory effect of green propolis on dental pulp in rats. *Braz Oral Res* 2013; **27**(5): 417-422.
52. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 2003; **11**: 269-282.
53. Eyüboğlu GB. Dentin Hassasiyeti Tedavisinde Kullanılan Ajanların Sitotoksitesi Ve Rezin-Dentin Bağlanma Dayanımına Etkisi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hastalıkları Ve Tedavisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Trabzon. 2011.
54. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001; **17**: 163-166.
55. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* 2005; **55**(5): 293-301.
56. Fernandes A, Silva G, Lopes N, Napimoga M, Benatti B, Alves J. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: An immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; **105**: 385-390.
57. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004; **30**(6): 422-424.
58. Ferroni L, Gardin C, Sivoletta S, Brunello G, Berengo M, Piattelli A, Bressan E, Zavan B. A Hyaluronan-Based Scaffold for the *in Vitro* Construction of Dental Pulp-Like Tissue. *Int. J. Mol. Sci* 2015; **16**: 4666-4681.
59. Foreman PL, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990; **23**: 283-297.
60. Fujitani M, Shibata S, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Shintani H. Direct adhesive pulp capping: Pulpal healing and ultra-morphology of the resin-pulp interface. *Am J Dent* 2002; **15**(6): 395-402.
61. Furey A, Hjelmhaug J, Lobner D. Flow Line, Durafill VS, and Dycal toxicity to dental pulp cells: effects of growth factors. *J Endod* 2010; **36**(7): 1149-1153.
62. Galluzi L, Aaronson SA, Abrams J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2006; **16**: 1093-1107.

63. Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, Prati C. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; **108**: 39–45.
64. Gerdin B, Hallgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med* 1997; **242**: 49-55.
65. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent* 2003; **16**: 66-77.
66. Golub EE, Battaglia KB. Alkalen fosfataz enziminin mineralizasyondaki rolü. *Curr Opin Orthop Turkish Edition* 2007; **2**(3): 157-163.
67. Goodis HE, Pashley D, Stabholtz A. Effects of thermal and mechanical irritants. İçinde Hargreaves KM, Goodis HE, Seltzer S (Eds). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Chicago: Quintessence Publishing; 2002. pp. 371-388.
68. Gordoysus M, Avcu N, Gordoysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic Effects of Four Different Endodontic Materials in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Endod* 2007; **33**(12): 1450-1454.
69. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalciumsilicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013; **29**(2): 20–28.
70. Guven EP, Yalvac ME, Sahin F, Yazıcı MM, Rizvanov AA, Bayırlı G. Effect of Dental Materials Calcium Hydroxide-containing Cement, Mineral Trioxide Aggregate and Enamel Matrix Derivative on Proliferation and Differentiation of Human Tooth Germ Stem Cells. *J Endod* 2011; **37**(5): 650-656.
71. Güleş, Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Vet Fak Derg* 2008; **2**: 73-78.
72. Heide S. The effect of pulp capping and pulpotomy on hard tissue bridges of contaminated pulps. *Int Endod J* 1991; **24**(18): 126-134.
73. Hernandez, E.P., Botero, T.M., Mantellini, M.G., McDonald, N.J., Nor, J.E. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J* 2005; **38**: 137–143.
74. Hilton TJ. Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. *Oper Dent* 2009; **34**(5): 615-625.

75. Holland R, Souza V, Nery MJ, Ottoboni Filho JÁ, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999; **25**(3): 161-166.
76. Horsted P, Sandergaard B, Thylstrup A, El Attar K, Fejerskov O. A retrospective study of direct pulp capping with calcium hydroxide compounds. *Endod Dent Traumatol* 1985; **1**: 29-34.
77. Hörsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **96**: 591–600.
78. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998; **24**(11): 744-751.
79. 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; **94**: 361-365.
80. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003; **66**(4): 880-884.
81. Hume WR, Kennedy AE. Release of H-triamcinolone from Ledermix, *J Endod* 1981; **7**(11): 509-514.
82. Illeperuma RP, Park YJ, Kim JM, Bae JY, Che ZM, Son HK, Han MR, Kim KM, Kim J. Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci Mater Med* 2012; **23**(3): 753-762.
83. International Organization for Standardization. Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. ISO 7405: 2008.
84. International Organization for Standardization. Dentistry- Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5: 2009.
85. Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, Matsuo K, Chen KK, Terashita M. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; **92**(1): 120–128.
86. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod* 2006; **32** (3), 193-197.

87. Iwata H. Pharmacologic and clinical aspects of intraarticular injection of hyaluronate. *Clin Orthop Relat Res* 1993; **289**: 285-291.
88. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ, Joo NE, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, Hwang YC. Cytotoxicity and Physical Properties of Tricalcium Silicate-based Endodontic Materials. *Restor Dent Endod* 2014; **39**(2): 89-94.
89. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 435-61.
90. Joffe E. Preserving tooth vitality. *Oper Dent* 2003; **28**(4): 465-468.
91. Johansson BJ, Persson I, Manera P. Histologic effects of collagen and chondroitin sulfate as capping agents in amputated rat molar pulps. *Arch Oral Biol* 1963; **8**: 503-507.
92. Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000; **55**(11): 1081-1093.
93. Kang JY, Lee BN, Son HJ, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod* 2013; **39**: 497-500.
94. Karayılmaz H, Kırzioğlu Z. Mineral Trioksit Agregat ve Pedodontideki Önemi. *Süleyman Demirel Üniv Diş Hek Fak Derg* 2011; **3**(1): 30-46.
95. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med* 2015; **11**: 16.
96. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000; **26**: 288-291.
97. Kennedy CI, Diegelmann RF, Haynes JH, and Yager DR. Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts. *J pediatr Surg* 2000; **35** (6): 874-879.
98. Kennedy DB, Kapala JT. The dental pulp: biological considerations of protection and treatment. İçinde Braham RL, Morris E. *Textbook of Pediatric Dentistry*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985. pp. 492-522.
99. Kim M, Yang W, Kim H, Ko H. Comparison of Biological Properties Of ProRoot MTA, Ortho MTA, and Endocem MTA Cements. *J Endod* 2014; **40**(10): 1649-1653.
100. King SR, Hickerson WL, Proctor KG, Newsome AM. Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery* 1991; **109**(1): 76-84.

101. Kitasako Y, Inokoshi S, Tagami J. Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent* 1999; **27**(4): 257–263.
102. Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T OM, Higo Y, Inaba T, T T. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology* 2013; **101**(1): 43-51.
103. Koçak S, Erten H. Mineral Trioksit Aggregate'ın Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi. *GÜ Diş Hek Fak Derg* 2012; **29**(1): 63-71.
104. Kopel HM. Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. *J Dent Child* 1992; **59**(2): 141-149.
105. Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent* 1994; **16**: 29-35.
106. Kulan P, Karabıyık O, Kose GT, Kargul B. Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate on Stem Cells Derived from Human Dental Pulp. *J Endod* 2016; **42**(2): 276-279.
107. Kupietzky A, Holan G. Treatment of crown fractures with pulp exposure in primary incisors. *Pediatr Dent* 2003; **25**: 241-247.
108. Laurent P, Camps J, De MEo M, Dejou J, About J. Induction of specific cell responses to a Ca<sub>3</sub>SiO<sub>5</sub>-based posterior restorative material. *Dent Mater* 2008; **24**(11): 1486-94.
109. Lee BN, Hwang YC, Jang JH, et al. Improvement of the properties of mineral trioxide aggregate by mixing with hydration accelerators. *J Endod* 2011; **37**: 1433–1436.
110. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 Endodontic Bioactive Cements on Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *J Endod* 2014; **40**(8): 1217-1222.
111. Lee JH, Jung JY, Bang D. The efficacy of topical 0.2% hyaluronic acid gel on recurrent oral ulcers: comparison between recurrent aphthous ulcers and the oral ulcers of Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; **22**(5): 590-595.
112. Lim KC, Kirk EEJ. Direct pulp capping: a review. *Endod Dent Traumatol* 1987; **3**: 213-219.

113. Lin PS, Chang MC, Chan CP, Lee SY, Lee JJ, Tsai YL, Tseng HC, Tai TF, Lin HJ, Jeng JH. Transforming growth factor  $\beta$ 1 down-regulates Runx-2 and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells via ALK5/Smad2/3 signaling. *Pathol Oral Radiol Endod* 2011; **111**: 394-400.
114. 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; **42**(4): 490–497.
115. Machado J, Johnson JD, Paranjpe A. The Effects of Endosequence Root Repair Material on Differentiation of Dental Pulp Cells. *J Endod* 2016; **42**(1): 101-105.
116. Marchetti C, Poggi P, Calligaro A, Casasco A. Lymphatic vessels in the healthy human dental pulp. *Acta Anat* 1991; **140**: 329.
117. Matsuo T, Nakanishi T, Shuimizu H, Ebisu S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *J Endod* 1996; **22**(10): 551–556.
118. McWalter GM, El-Kafrawy AH, Mitchell DF. Rate of reparative dentinogenesis under a pulp capping agent in monkeys. *J Dent Res* 1977; **56**(1): 93.
119. McWalter GM, El-Kafrawy AH, Mitchell DF. Pulp Capping in monkeys with a calcium hydroxide compound, an antibiotic and a polycarboxylate cement. *Oral Surg* 1973; **36**: 90-100.
120. Midy V, Dard M, Hollande E. Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells. *J Mater Sci Mater Med* 2001; **12**: 259–265.
121. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human Pulp Cells Response to Portland Cement In Vitro. *J Endod* 2007; **33**(2): 163- 166.
122. Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999; **20**: 167-173.
123. Mjör IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med* 1991; **20**: 496-501.
124. Mjör IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int.* 2002; **33**(1): 35-63.

125. Mjör IA. Initial reactions to tooth preparation. İçinde Mjör IA. *Pulp-Dentin Biology in Restorative Dentistry*. Chicago: Quintessence Publishing; 2002; pp. 23-38.
126. Mjör IA. The exposed pulp. İçinde Mjör IA. *Pulp-Dentin Biology in Restorative Dentistry*. Chicago: Quintessence Book; 2002. pp. 125-147.
127. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and Alkaline Phosphatase Activity Evaluation of EndoSequence Root Repair Material. *J Endod* 2012; **38**(8): 1101-1105.
128. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011; **44**(8), 697-730.
129. Moharamzadeh K, Brook I, Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* 2009; **2**: 514-548.
130. Molven O. Dental pulp lesions covered with albumin. *Oral Surg.* 1970; **30**(3): 413-424.
131. Moseley R, Waddington RJ, and Embery G. Hyaluronan and its potential role in periodontal healing. *Dent Update* 2002; **29**: 144-148.
132. Murray PE, Garcia GC, Garcia GF. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; **12**(3): 258-66.
133. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Hierarchy of pulp capping and repair activities responsible for dentin bridge formation. *Am J Dent* 2002; **15**: 236-243.
134. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater* 2002; **18**: 470-478.
135. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Windsor LJ, Cox CF. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. *Int Endod J* 2003; **36**: 106-116.
136. Murray PE, Hafez AA, Windsor LJ, Smith AJ, Cox CF. Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *J Dent* 2002; **30**: 213-222.
137. Murray PE, Lumley PJ, Hafez AA, Cox CF, Smith AJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: 4. Factors influencing successful pulp capping. *Dent Update.* 2002; **29**: 225-230.

138. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**(6): 509–520.
139. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989; **5**(6): 279-286.
140. Nakashima M. Induction of Dentin Formation on Canine Amputated Pulp by Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 1994; **73**(9): 1515-1522.
141. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* 2008; **53**(8): 397-411.
142. Niranjani K, Prasad MG, Vasa AA, Divya G, Thakur MS, Saujanya K. Clinical Evaluation of Success of Primary Teeth Pulpotomy Using Mineral Trioxide Aggregate®, Laser and Biodentine™ -an In Vivo Study. *J Clin Diagn Res* 2015; **9**(4): 35-37.
143. Nixon GS, Hannah CM. N-butyl cyanoacrylate as a pulp capping agent. *Br Dent J* 1972; **133**: 14-18.
144. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buckzkowska-Radlinska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013; **39**(6): 743-747.
145. Nunez CMC, Bosomworth HJ, Field J, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate Induce Similar Cellular Responses in a Fibroblast Cell Line. *J Endod* 2014; **40**(3): 406-411.
146. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 552–565.
147. Özçobanoğlu G, Durutürk L. Süt Dişlerinde Pulpa Ve Dentinin Histolojik Yapısal Özellikleri. *Acta Odontol Turc* 2013; **30**(2): 99-109.
148. Özdemir Ö. Yüksek Molekül Ağırlıklı Hyaluronic Asitin Farklı Konsantrasyonlarının Pulpa Kapaklama Ajanı Olarak Kullanılabilirliğinin Sitotoksik Ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara. 2000.

149. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review-Part III: Clinical applications, drawbacks and mechanism of action. *J Endod*. 2010; **36**(3): 400-413.
150. Park SJ, Heo SM, Hong SO, Hwang YC, Lee KW, Min KS. Odontogenic Effect of a Fast-setting Pozzolan-based Pulp Capping Material. *J Endod* 2014; **40**(8): 1124-1131.
151. Pashley DH, Liewehr FR. Structure and functions of the dentin- pulp complex. İçinde Cohen S, Hargreaves KM (Eds). *Pathways of the pulp*. 9th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. pp. 460-513.
152. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, Zhu Y. Effect of Tricalcium Silicate on the Proliferation and Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2011; **37**(9): 1240-1246.
153. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, Bernard GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol* 1999; **70**: 370- 374.
154. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola C, Granchi D. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 1994; **15**(3), 173-190.
155. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol* 2014; **5**(2): 69-76.
156. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater* 1994; **16**(1): 21-60.
157. Priyalakshmi S. Review on Biodentine-A Bioactive Dentin Substitute. *IOSR-JDMS* 2014; **13**(1): 13-17.
158. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral Trioxide Aggregate-A Review. *J Clin Pediatr Dent* 2009; **34**(1): 1-8.
159. Rapp R. Vascular pathways within pulpal tissue of human primary teeth. *J Clin Pediatr Dent* 1992; **16**: 183-201.
160. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* 2005; **47**(3): 135-138.
161. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2005; **31**(2): 97-100.

162. Sasaki T, Kawamata H. Providing An Environment For Reperative Dentine Induction in Amputated Rat Molar Pulp By High Molecular-Weight Hyaluronic Acid. *Arch Oral Biol* 1995; **40**: 209-219.
163. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest.* 1997; **1**: 154-162.
164. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; **22**: 6-11.
165. Schmalz G., Hiller K., Nunez L., Stoll J., Weis K. Permeability Characteristics of Bovine and Human Dentin under Different Pretreatment Conditions. *J Endod* 2001; **27**: 23–30.
166. Schroder U. Effect of an extra-pulpal blood clot on healing following experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. *Odontol Rev* 1973; **24**: 257-269.
167. Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985; **64**: 541-548.
168. Schuur AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000; **16**: 240-250.
169. Schwartz RS, Hilton TJ. Caries management and the pulpal considerations. In: Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW. *Fundamentals of Operative Dentistry A Contemporary Approach*. Chicago: Quintessence Publishing. Co. Inc. 1996. pp: 51-66.
170. Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent* 1998; **11**(Spec No):17–34.
171. Stanley HR, White CL, McGrey L. The rate of tertiary (reparative) dentine formation in the human tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; **21**(4): 180-189.
172. Stockton LW. Vital pulp capping: A worthwhile procedure. *J Can Dent Assoc* 1999; **65**(4): 328-331.
173. Suda H, Ikeda H. The circulation of the pulp. Hargreaves KM, Goodis HE, eds. *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Chicago: Quintessence; 2002. pp.123-150.

174. Sübay RK, Aşci S. Human pulpal response to hydroxyapatite and a calcium hydroxide material as direct capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral* 1993; **76**(4): 485-492.
175. Swift EJ, Trope M, Ritter AV. Vital pulp therapy for the mature tooth can it work? *Endod Top* 2003; **5**: 49-56.
176. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006; **39**: 415-422.
177. Thompson V, Craig R, Curro F, Green W, Ship J. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal. *J Am Dent Assoc* 2008; **139**: 705-712.
178. Tırnaksız F, Kaymak Y. Hyalüronik asit. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2008; **18**: 9-16.
179. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; **25**(3): 197-205.
180. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; **21**: 349-353.
181. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995; **21**: 489-492.
182. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010; **36**(2), 190-202.
183. Torabinejad M., Walton R. *Endodonti Temel ilkeler ve Uygulamalar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2011. pp. 1-20.
184. Tronstad L. *Clinical Endodontics A Textbook*. 3th ed. New York: Thieme 2009. pp. 1-29.
185. Tuncer S, Demirci M. Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.* 2011; **21**(2): 141-149.
186. Wataha JC. Principles of biocompatibility for Dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; **86**: 203-209.
187. Weigel PH, Frost SJ, McGary CT, Leboeuf RD. The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int Tiss Reac* 1998; **10**(6): 355-365.

188. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnstörn EE. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**(5): 793-801.
189. Yaman E, Gorken F, Pinar Erdem A, Sepet E, Aytepe Z. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper® in vital primary molar pulpotomy. *Eur Arch Paediatr Dent* 2012; **13**: 197-202.
190. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of Mineral Trioxide Aggregate on the Mineralization Ability of Rat Dental Pulp Cells: An In Vitro Study. *J Endod* 2008; **34**(9): 1057-1060.
191. Yıldırım S, Alaçam A. Vital Pulpa Tedavilerinde Protein ve Gen Terapileri. *Hacettepe Üni Diş Hek Fak Derg* 2007; **31**(2): 54-63.
192. Yoshimine Y, Maeda K. Histologic evaluation of tetracalcium phosphate-based cement as a direct pulp-capping agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; **79**(3): 351-358.
193. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates. Biomineralization. *J Endod* 2012; **38**(9): 1220-1226.
194. Zhou H, Shen Y, Wang Z, Li L, Zheng Y, Hakkinen L, Haapasalo M. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material. *J Endod* 2013; **39**(4): 478-483.
195. Zou X, Li H, Chen Li, Baatrup A, Bünger C, Lind M. Stimulation of porcine bone marrow stromal cells by hyaluronan, dexamethasone and rhBMP-2. *Biomaterials* 2005; **25**: 5375-5385.

## FORMLAR

### **EK 1. Gönüllü Bilgilendirme Ve Onam Formu**

**Araştırma yürütücüsü:** Dok. Öğr. Dt. Özge Atikler

**Araştırma Adı:** Yüksek Molekül Ağırlıklı Hyaluronik Asitin İnsan Pulpa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Ve Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

Sizin İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı tarafından yürütülen bu çalışmaya katılmanızı arzu ediyoruz. Aşağıda bu çalışma ile ilgili bazı bilgiler bulacaksınız. Bu bilgiler sizin çalışmaya katılmanızın kolaylaştırılması ve öneminin anlaşılabilmesi için hazırlanmıştır.

#### **Araştırmanın Amacı ve Önemi:**

Günümüzde hyaluronik asit tıp alanında sıklıkla kullanılan bir materyaldir. Diş hekimliğinde kullanımı ise oldukça yeni olmakla beraber çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Derin çürüklerin temizlenmesi sırasında veya travma/darbe gören dişlerde, sinirlerin (pulpa dokusu) açılması halinde doku dostu olan bir kimyasal maddeyle örtülerek dişin canlılığının korunması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada hyaluronik asitin insan pulpa dokusu üzerine etkisi kliniklerde sıkça kullanılan 3 farklı malzeme ile karşılaştırılacaktır.

#### **Gerçekleştirilecek İşlemler**

Ağrı ya da herhangi bir şikayete sebebiyet vermesi nedeniyle uzman diş hekimi tarafından çekim kararı verilmiş yirmi yaş dişlerinin çekimi İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş-Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilecektir. Bu işlem Ağız, Diş-Çene Cerrahisi kliniklerinde uygulanan rutin bir işlemdir ve sıklıkla uygulanmaktadır. Hiçbir hastadan özellikle çalışmada kullanılmak amacıyla diş çekimi yapılması durumu söz konusu değildir. Bu çalışmaya katılıp katılmamanız tamamen sizin kendi iradeniz ile vereceğiniz karara bağlıdır.

### **1. Potansiyel Risk ve Sorunlar**

Araştırmada uzman diş hekimini tarafından çekim kararı verilmiş yirmi yaş dişleri çekim sonrasında hastanın izni alınarak kullanılacaktır. Bu nedenle çalışmada herhangi bir risk söz konusu değildir.

### **2. Katılımın Süresi**

Uzman diş hekimini tarafından çekim kararı verilmiş yirmi yaş dişleri çekim sonrasında hastanın iznini takiben alınacaktır. Herhangi bir katılım süresi söz konusu değildir.

### **3. Hastaların olası yararları**

Ayrıntılı ağız içi muayene sonrası ağız hijyeninin iyileştirilmesine ve koruyucu tedavilere yönelik bilgilendirmeler yapılacak, tedavi gereksinimi varsa bununla ilgili bilgi verilecek ve gerekli yönlendirmeler yapılacaktır.

### **4. Gizlilik**

Bu konudaki tüm kayıtlar gizli tutulacaktır. Herhangi bir yayında isminiz geçmeyecektir.

### **5. Kurumumuzun Sorumluluk Sınırları**

Herhangi bir fiziksel yaralanma oluşmaması için gereken her türlü özen ve hassasiyet gösterilecektir. Muayene işlemleri esnasında oluşacak herhangi bir fiziksel travmadan dolayı kurumumuz sorumluluk kabul etmemektedir. Fakat oluşacak zararlar konusunda yardımcı olmak için elimizden gelen gayret gösterilecektir.

### **6. Çalışmadan Çıkmak**

İstediğiniz takdirde başlangıçta çalışmaya katılmayı red edebilirsiniz. İstediğiniz takdirde önceden araştırmacıya haber vererek çalışma kapsamı dışında kalabileceğiniz gibi araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı da bırakılabilirsiniz. Çalışma kapsamı dışında kalmanız Diş hekimliği Fakültesinin tedavi hizmetlerinden yararlanmanızı etkilemeyecektir.

### **7. Mali Sorumluluk**

Katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca katılımcıya da bir ödeme yapılmayacaktır.

### **8. Sorularınız**

Çalışma ile ilgili sorularınız en kısa sürede yanıtlanacaktır. Sorularınızı doğrudan Dt. Özge Atıklar'e sorabileceğiniz gibi gerekirse 0-212-414 20 20 - 30400 no'lu telefonu da kullanabilirsiniz.

Bu proje İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurul komitesi tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır. Bu proje ile ilgili sorularınız gerekirse önceden telefon ile randevu alarak komiteye de yöneltebilirsiniz.

### **KATILIMCININ BEYANI**

Sayın Dt. Özge Atıklar tarafından İstanbul Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü

tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dt. Özge Atıklar'ı 0532 564 02 33 no'lu telefondan ve Pedodonti Anabilim Dalı Çapa/İstanbul'dan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

**GÖNÜLLÜ ONAM FORMU**

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün**

Adı-soyadı:

İmzası:

Adresi:

Tel:

Faks:

**Açıklamaları yapan araştırmacının**

Adı-soyadı:

İmzası:

**Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin**

Adı-soyadı:

İmzası:

Görevi:

**ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 893

Tarih : 02.06.2014

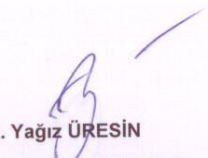
Konu : Doç.Dr.Elif Bahar TUNA İNCE

Sayın Doç.Dr.Elif Bahar TUNA İNCE  
Dış Hekimliği Fakültesi

İlgi :Dış Hekimliği Fakültesinin 02/05/2014 gün ve 861-2943 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dt.Özge ATIKLER'in yürüteceği 2014/784 dosya numaralı "Yüksek Molekül Ağırlıklı Hyaluronik Asitin İnsan Pulpa Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Ve Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurumumuzun 23/05/2014 tarih ve 10 sayılı sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu