



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**BİYOAKTİF CAM NANOPARTİKÜLLERİ İLE MODİFİYE  
EDİLMİŞ BİODENTİNE MATERYALİNİN SİTOTOKSİK  
ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

Dt. Tuğçe YUCA ÖZTÜRK

Endodonti Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından desteklenmiştir.

İSTANBUL – 2018

# İÇİNDEKİLER

<b>ONAY</b> .....	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>IX</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.MTA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.BİODENTİNE</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Kimyasal Kompozisyonu .....	6
2.2.2. Sertleşme Reaksiyonu.....	7
2.2.3. Sertleşme Süresi .....	7
2.2.4. Densite ve Pörözite.....	8
2.2.5. Basma Dayanımı .....	8
2.2.6. Radyoopasite.....	9
2.2.7. Renk Stabilitesi .....	9
2.2.8. Mikrosızıntı.....	9
2.2.9. Bağlanma Dayanımı .....	10
2.2.10. Biyoyumluluk ve Sitotoksosite .....	11
2.2.11. Biodentine kullanım alanları.....	12
<b>2.3.BİYOAKTİF CAMLAR</b> .....	<b>13</b>
2.3.1.Biyoaktif camlar ve özellikleri.....	13
2.3.2. Biyoaktif cam materyalinde HCA (Hidroksikarbonat apatit) tabakasının oluşum mekanizması .....	15
2.3.3. Biyoaktif cam üretim yöntemleri .....	16
2.3.4. Biyoaktif camların kullanım alanları.....	18
<b>2.4. BİYOUYUMLULUK</b> .....	<b>20</b>
2.4.1. Biyoyumluluğun değerlendirilmesi .....	20
2.4.2. MTT testi .....	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.Sol-jel yöntemi ile biyoaktif cam elde edilmesi</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2. Materyallerin karakterizasyonu</b> .....	<b>28</b>
3.2.1. X ışınları kırınım difraktrometresi (XRD) .....	28
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu analizi (SEM-EDX) .....	28
3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) .....	29
<b>3.3. Nanokompozitlerin hazırlanması</b> .....	<b>29</b>



3.4. Materyallerden eluat elde edilmesi.....	32
3.5.Hücre kültürü .....	34
3.6.Sitotoksitenin değerlendirilmesi .....	36
3.7. Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Değerlendirme .....	40
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
4.1. Materyal Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular .....	41
4.1.1. SEM-EDX Bulguları .....	41
4.1.2. SEM Analizi Görüntüleri.....	46
4.1.3. XRD Analizi Bulguları .....	49
4.1.4. FTIR Analizi Bulguları .....	50
4.2. Farklı Materyal Eluatlarının, Sertleşme Sürelerinin ve Hücre Muamele Sürelerinin Hücrelere Olan Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılmasına ait Bulgular .....	51
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>58</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>70</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>71</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>

## ONAY

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi  
Program Adı : Diş Hekimliğinde Uzmanlık Programı  
Anabilim Dalı : Endodonti Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Tuğçe YUCA ÖZTÜRK  
Tez Başlığı : Biyoaktif Cam Nanopartikülleri ile Modifiye Edilmiş  
Biodentine Materyalinin Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi  
Tez Sunum Tarihi : 21.12.2018

## JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER  
Çalıştığı Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Üye : Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ  
Çalıştığı Kurum : Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Asiye Nur DİNÇER  
Çalıştığı Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

## YEDEK JÜRİ ÜYELERİ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY  
Çalıştığı Kurum : Medipol Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Özlem KARA  
Çalıştığı Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Bu tez, Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından kabul / ret edilmiştir.

ANABİLİM DALI BAŞKANI

Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER

DEKAN

Prof. Dr. Alper ALKAN

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü teşvik ve fedakarlığını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve yararlanmaya devam edeceğim, eğitimimin ve tezimin her aşamasında desteğini hissettiğim, sevgisini ve anlayışını eksik etmeyen çok değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Burak Güneşer'e,

Eğitimim süresince kıymetli vaktini, klinik bilgi ve tecrübelerini ve pozitif enerjisini paylaşmaktan çekinmeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Asiye Nur Dinçer'e,

Tanıdığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Uzm. Dt. Mira Kebudi Benezra'ya, Uzm. Dt. Betül Aycan Alim'e, Dt. Fatma Kaplan'a ve Dt. Seyit Bilal Özdemir'e,

Tezimin istatistiksel değerlendirmeleri hususunda büyük bir sabır ve özveri göstererek tez çalışmama büyük katkı sağlayan Uzm. Dr. Ahmet Aydoğdu' ya,

Uzmanlık sürecimi daha da güzel kılan Endodonti kürsüsündeki tüm arkadaşlarıma,

Bana her zaman güvenen, başarılarımdaki en büyük paya sahip, sevgilerini ve desteklerini her daim hissettiğim biricik annem, canım abim ve sevgili kardeşime, güçlü karakterini örnek aldığım ve hayatım boyunca emeklerine ve sevgisine layık olmaya çalışacağım, aramızda olmayan canım babama,

Attığım her adımda beni destekleyen, sabrı ve sevgisiyle hep yanımda olan sevgili eşim, hayat arkadaşım Talip Öztürk'e

Hayatımı güzel kılan ve yanımda olan herkese,

En derin duygularıyla teşekkür ederim.

Tuğçe YUCA ÖZTÜRK

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmada kullanılan materyallerin kompozisyonları.....	41
<b>Tablo 4.2.</b> Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri.....	42
<b>Tablo 4.3.</b> Biyoaktif cam materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri.....	43
<b>Tablo 4.4.</b> Ağırlıkça %1 biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri.....	44
<b>Tablo 4.5.</b> Ağırlıkça %2 biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri.....	45
<b>Tablo 4.6.</b> Yüzde hücre canlılığı değerlerinin gruplara göre dağılımı.....	51
<b>Tablo 4.7.</b> Hücre canlılığı değerleri için gruplar arası karşılaştırmalar .....	52
<b>Tablo 4.8.</b> Grup içi günler arası karşılaştırmalar.....	52
<b>Tablo 4.9.</b> Grup içi 24 saat – 48 saatlik hücreyle muamele süreleri arası karşılaştırmalar.....	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. MTT solüsyonun hazırlanmasında kullanılan tiyazol blue tetrazolyum bromid tozu.....	22
Şekil 2.2. MTT ve renkli formazan ürününün yapısı .....	23
Şekil 3.1. Biyoaktif cam üretiminin gerçekleştiği platin kroze.....	26
Şekil 3.2. Biyoaktif cam üretimi sırasında çökeltinin ayrılması için kullanılan santrifüj cihazı.....	26
Şekil 3.3. Materyalin fırınlanmasında kullanılan kül fırın.....	27
Şekil 3.4. Biyoaktif cam materyalinin son fırınlama işlemi için platin kroze içerisinde fırına yerleştirilmesi.....	27
Şekil 3.5. Sol-jel yöntemiyle elde edilen biyoaktif cam nanopartikülleri.....	28
Şekil 3.6. Biyoaktif camın ağırlığının ölçüldüğü hassas terazi.....	29
Şekil 3.7. Biodentine .....	30
Şekil 3.8. Örneklerin karıştırılmasında kullanılan amalgamatör.....	30
Şekil 3.9. Örneklerin UV ışığı altında sterilizasyonu.....	32
Şekil 3.10. Örneklerin 96 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilmesi.....	33
Şekil 3.11. Hücre kültür medyasının örneklerin üzerine eklenmesi.....	33
Şekil 3.12. 1xDMEM hücre kültür besi yeri.....	34
Şekil 3.13. Besiyeri içerisindeki 3T3 hücrelerinin mikroskop altında incelenmesi.....	35
Şekil 3.14. Materyal eluatlarına eklenmeden önce flask tabanına yapışmış durumda besiyerinde bulunan 3T3 hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü (10X büyütme).....	35
Şekil 3.15. MTT testi öncesi 96 kuyucuklu hücre kültür kabının yerleşim planlaması.....	37
Şekil 3.16. MTT testi öncesi materyallerden elde edilen eluatların ve hücrelerin bir plan dahilinde hücre kültür kabına eklenmesi.....	37
Şekil 3.17. MTT solüsyonun hazırlanmasında kullanılan tiyazol blue tetrazolyum bromid tozu.....	38
Şekil 3.18. MTT solüsyonun hazırlandıktan hemen sonraki görüntüsü.....	38
Şekil 3.19. Kuyucuklara MTT solüsyonu eklendikten sonra hücre kültür kabının	

görüntüsü.....	39
<b>Şekil 3.20.</b> Optik yoğunluğun ölçümünde kullanılan spektrofotometik okuyucu.....	39
<b>Şekil 4.1.</b> Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları.....	42
<b>Şekil 4.2.</b> Biyoaktif cam materyaline ait SEM-EDX bulguları.....	43
<b>Şekil 4.3.</b> Ağırlıkça %1 biyoaktif cam materyali ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları.....	44
<b>Şekil 4.4.</b> Ağırlıkça %2 biyoaktif cam materyali ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları.....	45
<b>Şekil 4.5.</b> Biodentine materyalinin SEM görüntüsü (X5.000).....	46
<b>Şekil 4.6.</b> Biodentine materyalinin SEM görüntüsü (X10.000).....	46
<b>Şekil 4.7.</b> Biyoaktif cam nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.....	47
<b>Şekil 4.8</b> Ağırlıkça %1 biyoaktif cam nanopartikülleriyle modifiye edilmiş Biodentine materyalinin SEM görüntüleri.....	47
<b>Şekil 4.9.</b> Ağırlıkça %2 biyoaktif cam nanopartikülleriyle modifiye edilmiş Biodentine materyalinin SEM görüntüleri.....	48
<b>Şekil 4.10.</b> Biyoaktif cam materyalinin XRD analizi.....	49
<b>Şekil 4.11.</b> Çalışmada kullanılan materyallerin FTIR analizi.....	50
<b>Şekil 4.12.</b> Biodentine (BD) materyal grubuna ait kutu grafiği.....	55
<b>Şekil 4.13</b> Ağırlıkça %1 biyoaktif cam içeren Biodentine (BD+ %1 BAC) materyal grubuna ait kutu grafiği.....	56
<b>Şekil 4.14.</b> Ağırlıkça %2 biyoaktif cam içeren Biodentine (BD + % 2 BAC) materyal grubuna ait kutu grafiği.....	57

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

**BAC:** Biyoaktif cam

**BD:** Biodentine

**BD + %1 BAC:** Ağırlıkça %1 biyoaktif camla modifiye edilmiş Biodentine

**BD + %2 BAC:** Ağırlıkça %2 biyoaktif camla modifiye edilmiş Biodentine

**MTT:** Tetrazolium tuzu, 3-[4,5- dimethythiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide

**kV:** Kilovolt

**mA:** Miliamper

**MTA:** Mineral trioksit agregat

**dk:** Dakika

**FDA:** US Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi

**HCA:** Hidroksikarbonat apatit

**NADH:** Nikotinamid adenin dinukleotid

**XRD:** X-ray diffraction, X ışını kristalografisi

**FTIR:** Fourier transform infrared spectroscopy, Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrofotometresi

**SEM:** Scanning electron microscope , Taramalı elektron mikroskobu

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetil Sülfoksit

**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit

**NaOCl:** Sodyum hipoklorit

**EDTA:** Etilendiamin tetraasetik asit

**PBS:** Fosfat tamponlanmış solüsyon

**EDX:** Enerji dağılımlı X-ışını analizi

**°C:** Derece santigrad

**pH:** Hidrojen gücü (Power of hydrogen )

**nm:** Nanometre

**µm:** Mikrometre

**mm:** Milimetre

**cm:** Santimetre

**mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

# ÖZET

T.C.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

## **BİYOAKTİF CAM NANOPARTİKÜLLERİ İLE MODİFİYE EDİLMİŞ BİDENTİNE MATERYALİNİN SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DİŞ HEKİMLİĞİ UZMANLIK TEZİ / İSTANBUL 2018

Dt. Tuğçe YUCA ÖZTÜRK

Endodonti Anabilim Dalı

Bu tez çalışmasının amacı, özelliklerini geliştirmek amacıyla biyoaktif cam nanoparçacıkları ile modifiye edilen Biodentine (Septodont, Fransa) materyalinin sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesidir.

Sol-jel yöntemi kullanılarak, biyoaktif cam nanoparçacıkları üretildi. Değerlendirilmek üzere ağırlıkça %1 ve %2 oranında biyoaktif cam ilave edilerek modifiye edilen Biodentine materyalleri ve kontrol grubu olarak ticari olarak ulaşılabilen Biodentine olmak üzere üç deney grubu oluşturuldu. Hazırlanan örnekler sertleşme sürelerine göre (1, 3 ve 7 gün) her grupta 20 örnek olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Sertleşme sürelerine göre gruplara ayrılan örnekler, sitotoksik özellikleri değerlendirilmeden önce hücreyle muamele sürelerine göre (24 ve 48 saat) iki alt gruba ayrıldı (n =10). Ardından deney gruplarının sitotoksik özellikleri MTT testi kullanılarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi Kruskall Wallis testi ve Mann Whitney- U testi kullanılarak analiz edildi (p=0.05).

Farklı materyallerin sitotoksosite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05). Her bir materyal grubunda sertleşme süresi 1 gün olan deney gruplarının sitotoksosite düzeyi, 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0.05). Materyal tipi önemsenmeksizin 1 gün ve 3 gün sertleşme süresine sahip örneklerde, hücreyle muamele süresi 24 saat olan deney grupların sitotoksosite düzeyi, hücreyle muamele



süresi 48 saat olan grupların sitotoksosite düzeyine göre anlamlı ölçüde daha yüksek tespit edildi ( $p<0.05$ ).

Yapılan bu *in vitro* çalışmanın bulguları göz önüne alındığında; Biodentine içeriğine biyoaktif cam nanoparçacıklarının eklenmesinin, Biodentine'nin sitotoksitesini değiştirmeyeceği sonucuna varılabilir. Ayrıca Biodentine ve biyoaktif cam ile modifiye edilen Biodentine materyallerinin sitotoksosite düzeylerinin, sertleşmenin erken safhalarında daha yüksek olduğu söylenebilir.

**Anahtar Sözcükler:** Biodentine; biyoaktif cam; MTT; sitotoksosite



## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of Biodentine (Septodont, France) mixed with bioactive glass nanoparticles at 1 wt % and 2 wt %.

Bioactive glass nanoparticles was produced by sol-gel technique. The materials was assigned to 3 groups as Biodentine (control group) and Biodentine which modified with bioactive glass nanoparticles %1 wt and %2 wt. After preparation of material discs, groups were divided into 3 subgroups according to setting times (1, 3 and 7 days) (n=20). Before cytotoxicity tests, samples assigned to 2 more subgroups according to incubation time with cells. (24 and 48 hours) (n=10). Following assignation part, cytotoxic properties of the materials were evaluated by MTT method. Data were statistically analyzed by using Kruskal Wallis test and Mann Whitney- U test (p=0,05).

No statistical differences were observed between cytotoxicity levels of different material groups (p<0.05). One-day old samples were more cytotoxic than 3-days and 7-days old samples in all test groups (p<0.05). Regardless type of materials, significantly higher cytotoxicity levels were detected at 24 hours incubation time more than 48 hours at 1-day and 3-days old samples (p>0.05).

This *in vitro* study demonstrated that the addition of bioactive glass nanoparticles to Biodentine does not alter its cytotoxicity. Moreover, it is possible to mention that Biodentine and modified Biodentine have initial cytotoxicity.

**Keywords:** Biodentine; bioactive glass ; MTT; cytotoxicity

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Biodentine (Septodont, Fransa); spesifik olarak dentin vekili olarak üretilen, 2009 yılından itibaren piyasada ulaşılabilen kalsiyum silikat bazlı bir materyaldir. Biodentine'nin toz kısmı trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat ve kalsiyum karbonat içerirken, likit kısmı hızlandırıcı olarak kalsiyum klorit ve plastisize eden bir ajan içerir. Materyal solüsyon halindeyken kalsiyum salınımı ile karakterizedir [1]. Ayrıca trikalsiyum silikat bazlı materyaller, doku sıvılarıyla temas ettiklerinde hidroksiapatit kaynağı olarak tanımlanmıştır.

Biodentine, diş hekimliğinde dentin yerine geçen bir materyal olarak kullanılmakta olup endodontik tamir işlemleri (kök perforasyonları, apeksifikasyon, rezorptif lezyonlar ve endodontik cerrahide retrograd dolgu materyali) ve pulpa kaplaması tedavisi gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir [2].

Biyoaktif camlar silikat esaslı biyomateryallerdir ve dokularla güçlü bir kimyasal bağ oluşturabilirler. Bu biyomateryaller yüksek derecede biyouyumludur ve vücut içine yerleştirildiklerinde veya vücut sıvısı ile temas ettiğinde bir hidroksiapatit tabakası oluşturma kabiliyetine sahiptir [3]. Biyoaktif cam üretiminde, cam bileşenlerin eritilmesini içeren geleneksel cam işleme yönteminin çeşitli dezavantajlarından dolayı daha çok sol-jel yöntemi kullanılmaktadır. Sol-jel yöntemi, düşük işlem sıcaklığı, daha yüksek saflık sağlama ve homojenlik gibi avantajlar sayesinde biyoaktivitenin kontrolünü kolaylaştırır [4].

Biyoaktif camların sergilediği antibakteriyel aktiviteleri, defekt bölgesinin iyileşmesi ve rejenerasyonu sırasında bakterisiz bir ortam sağlamaları, silika bağlantısı kurabilmesi, stronsiyum ve fosfat gibi farklı iyonlarla birleşebilmesi en önemli özelliklerindedir [5]. Biyoaktif camın bu potansiyeli, bu materyalin diş hekimliğinde geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlamıştır. Bu materyaller partiküller veya monolitik şekiller halinde, pöröz ve kompakt biçimde kullanılabilir ve remineralizasyon ve hipersensitive gibi farklı uygulamalarda kullanım alanı bulurlar [6].

Materyalin antibakteriyel etkinliği gibi bazı özellikleri, içeriğine eklenen bazı elementlerce desteklenebilir [7]. Bunun yanısıra biyoaktif camlar biyoaktiviteye

ihhtiyaç duyulan bazı materyalleri modifiye etmede kullanılabilir [8].

Biodentine'nin biyoaktivitesini ve bulunduğu alanda oluşturduğu remineralizasyon özelliğini artırabilmek adına biyoaktif cam materyali ile modifikasyonu düşünölebilir [9]. Literatürde bu modifiye materyalin sitotoksik özelliklerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı biyoaktif cam nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş Biodentine materyalinin sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

Endodontik tedavinin ana amacı; kök kanal yapısının biyomekanik şekillendirme ile nekrotik artıklardan ve mikroorganizmalardan temizlenmesi ve sızdırmaz bir biçimde doldurularak yeniden enfekte olmasının önlenmesidir [10].

Kök kanal tedavisinin başarısı, kök kanalının sızdırmaz bir şekilde doldurulabilmesine bağlıdır. Biyolojik olarak kök kanal dolgusunun ana işlevi, çevre dokuların enfeksiyonuna karşı engel oluşturmaktır [11].

Pulpa dokusu; yan kanallar ve apikal açıklık yoluyla periodontal dokularla bağlantılıdır ve anatomik olarak yakın ilişki içerisindedirler. Pulpa dokusu, ağız ortamından mine, dentin ve dişeti bağlantısı ile fiziksel olarak ayrılmaktadır [12]. Pulpanın ve periradiküler dokularının ağız ortamıyla ilişkide olması, bu dokularda patolojik durumların ortaya çıkmasına sebep olabilir. Endodontik tedaviler sırasında, mikroorganizma sızıntısını engellemek amacıyla, kök kanal sistemi ile periodonsiyum arasındaki ilişkinin iyi bir örtülemeye sahip endodontik tamir materyaliyle engellenmesi gerekmektedir [13].

İdeal bir endodontik tamir materyali şu özellikleri taşımalıdır [14];

- Dentine bağlanabilmeli
- Yeterli derecede örtüleme sağlamalı
- Boyutsal olarak stabilitesini korumalı
- Doku sınırlarında çözünmemeli
- Zaman içinde rezorbe olmamalı
- Kontrol edilebilmesi açısından radyoopak olmalı
- Kolay uygulanabilmeli
- Kondanse edilebilmeli
- Yeterli çalışma süresi sağlamalı
- Sertleşme süresi çok uzun olmamalı
- Dokular tarafından tolere edilebilmeli

Endodontide görülen başarısızlıkların çoğu, irritanların periapikal dokulara sızması sonucunda oluşur [15, 16]. İdeal retrograd veya ortograd dolgu materyali; kök kanal sistemi ile çevre dokular arasındaki etkileşimi tamamen yok edecek şekilde

örtüleme sağlamalıdır. Aynı zamanda toksik ve karsinojenik olmamalı, doku sıvılarında çözünmemeli, biyouyumlu ve boyutsal olarak stabil olmalıdır [17]

Endodontide var olan materyallerin sayılan ideal özellikleri sağlamaması sebebiyle [17] mineral trioksit agregat (MTA) geliştirilmiş ve pulpa kaplaması, pulpotomi, apeksogenezis, açık apeksli dişlerde apikal tıkaç oluşturma gibi işlemlerde kullanılması önerilmiştir [18].

## 2.1.MTA

MTA; temel olarak kalsiyum ve silikat elementlerinden oluşan, 1990'larda Torabinejad tarafından tanıtılan, biyoaktif özellikte bir endodontik simandır. Yapılan çalışmalara göre mükemmel bir biyouyuma ve örtüleme yeteneğine sahip olmasının yanı sıra, perforasyonların tamirinde, vital pulpa tedavilerinde, kök ucu dolgularında kullanıldığında başarılı sonuçlar göstermektedir [19]. MTA ağırlıkça %75 portland çimentosu içeren portland çimentosunun bir modifikasyonudur. İçeriğinde bulunan bizmut oksit ve partiküllerinin daha küçük ve uniform oluşu materyali portland çimentosundan ayırır [20].

MTA'nın içeriği; trikalsiyum silikat ( $3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ ), trikalsiyum alüminat ( $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ ), dikalsiyum silikat ( $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ ), kalsiyum sülfat dihidrat [ $(\text{CaSO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$ ], tetra kalsiyum alüminoferrit ( $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ve materyale radyopak özellik veren %20 oranında bizmut oksit ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) olarak açıklanmıştır [20]. Aynı zamanda, kimyasal ve fiziksel özelliklerini modifiye eden mineral oksitler MTA'nın yapısının küçük bir kısmını oluşturur [21]. Bu karışım, bileşenlerin su ile reaksiyona girmesiyle sert bir yapıya dönüşerek pöröz katı bir jel haline dönüşmektedir. Bu hidratlaşma tepkimesi sonucu kalsiyum silikat hidrat ve kalsiyum hidroksit ana ürünler olarak ortaya çıkmaktadır [22, 23]. Oluşan kalsiyum ürünleri, MTA'ya yüksek alkalinite özelliğini kazandırmaktadır [23].

MTA başlangıçta sadece gri renkte üretilmiştir fakat sonra beyaz versiyonu da ulaşılabilir olmaya başlamıştır [22]. Yapılan araştırmalarda, beyaz renkli MTA'da gri renkli olan MTA'dan farklı olarak tetrakalsiyum alüminoferrit'in ( $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) bulunmadığı ortaya konmuştur. Demir bağlayıcı özelliği bulunan bu mineralin olmayışı materyale beyaz rengini sağlamıştır.[24] Bazı araştırmalar beyaz MTA içeriğinde gri MTA ya göre daha az oranda demir,

alüminyum ve manganez varlığını göstermiştir [25, 26].

MTA'nın yüksek örtüleme kabiliyeti ve biyouyumluluğu gibi avantajlarının yanında bazı olumsuz yanları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar arasında uzun sertleşme zamanı, dişte renklenmeye sebep olması, yüksek fiyat ve manipülasyonun zor olması sayılabilir [16, 19, 27].

MTA'nın uzun sertleşme süresi, materyalin dentinle bütünlüğünün şüphe oluşturmasına ve bulunduğu yerden ayrılma ihtimalinin ortaya çıkmasına yol açabilir [21, 28].

MTA'nın renklendirme potansiyeli, bu materyalin dezavantajlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır [19, 29]. Biyoaktif simanlar üzerinde yapılan çalışmalara göre, örnekler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında renklenmenin şiddeti değişiklik gösterebilir.[18]

Renklenmenin tam mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, materyalin bileşenleri, materyalin kan ile kontaminasyonu, irrigantların kalıntılarıyla etkileşim ve çevresel faktörler (ortamın oksijen durumu, floresan ışığına maruz kalma) gibi birçok sebebe bağlı olabilir [18].

Bazı çalışmalar MTA'nın renklendirme probleminden demir ve manganez elementlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir [19]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, bu durumun asıl sorumlusunun radyoopasiteyi sağlayan bizmut oksit olduğunu göstermiştir [30, 31]. Dentin kollajen komponentinin bizmut oksite maruz kalması, renklenmenin sebebi olarak sayılabilir.[32] Fakat şaşırtıcı bir şekilde radyoopasiteyi artırmak amacıyla bizmut oksit oranının artırılmasının renklenme üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür [33].

MTA kullanımına bağlı renklenmenin bir diğer sebebi de materyalin kan ile kontaminasyonu olabilir [34] [35]. Yapılan bir çalışmada bizmut oksit içermeyen portland simanın kan ile kontaminasyon sonucu renklendiği gözlenmiştir [34].

Bizmut oksit içeren biyoaktif endodontik simanlar için, işlemde kullanılan irrigasyon solüsyonunun türü de renklenme potansiyelini oluşturabilir.[36] MTA, dentin üzerine sodyum hipoklorit (NaOCl) irrigasyonunu takiben yerleştirildiğinde dentin tübülleri içinde kalan NaOCl'nin de renklenmenin sebebi olabileceği

gösterilmiştir.[37] MTA ile oluşan renklenme probleminin bir diğer sebebi oksijenden yoksun ortam ve ışık varlığının kombinasyonu olabilir [30].

Birkaç olgu raporunda MTA'nın yüksek fiyatlı oluşundan duyulan endişe dile getirilmiştir.[38-40] İngiltere'de yapılan bir ankette pedodonti kliniğinde çalışan uzmanların %63.6'sı MTA'nın fiyatından ve uygulama esnasındaki alet gerekliliğinden yakınmışlardır [39].

Bazı araştırmalar, birçok klinik uygulama için MTA manipülasyonunun kolay olmadığını ve pratik deneyim gerektirdiğini iddia ederken [39, 41], bazı klinisyenler MTA'nın kullanımının kolay olduğunu belirtmişlerdir [42].

## **2.2.BIODENTİNE**

MTA için sayılan bu kısıtlamaların üstesinden gelmek amacıyla diğer kalsiyum silikat esaslı simanlar piyasaya sürülmüştür. Bu kalsiyum silikat esaslı materyallerden biri de, 2009 yılında piyasaya sürülen, dentin vekili olarak tanıtılan Biodentine'dir.

Biodentine, endodontik tamir (kök perforasyonları, apeksifikasyon, rezorptif lezyonlar ve endodontik cerrahide retrograd dolgu materyali) ve pulpa kaplaması gibi geniş bir uygulama alanı bulmaktadır ve diş hekimliğinde dentinin yerine geçen bir materyal olarak kullanılmaktadır [1]. Bu materyal MTA esaslı siman teknolojisi kullanılarak üretilmiş ve ek olarak fiziksel nitelikler ve manipülasyon gibi bazı özellikleri geliştirilmiştir [2].

### **2.2.1. Kimyasal Kompozisyonu**

Biodentine kapsül içinde toz ve pipet içinde likitten oluşur. Toz kısmının esas kısmını MTA ve Portland simanda olduğu gibi dikalsiyum ve trikalsiyum silikat oluştururken, bunların yanı sıra içeriğinde kalsiyum karbonat bulunmaktadır [43]. Ayrıca zirkonyum oksit kontrast madde olarak kullanılır ve radyoopasiteyi sağlar [1]. Diğer yandan likit, hızlandırıcı kalsiyum klorit ve suyu indirgemek için su emici polimer içerir. Ayrıca ürünü benzersiz yapan hızlı sertleşme özelliği; partikül boyutunun büyütülmesi, likite kalsiyum klorit eklenmesi ve likit kısmın azaltılması ile sağlanmıştır [1]. Materyal solüsyon halinde iken kalsiyum salınımı ile karakterizedir.



Ayrıca trikalsiyum silikat esaslı materyaller sentetik doku sıvılarıyla temas halinde hidroksiapatit kaynağı olarak tanımlanabilir [44].

MTA ve Biodentine’de ortak olarak bulunan trikalsiyum silikatın, MTA içeriğinde monoklinik formunda, Biodentine içeriğinde ise triklinik formunda bulunduğu hidrate edilmemiş simanların X-ışını difraktometresi ile gösterilerek açıklanmıştır. Trikalsiyum silikatın partikül büyüklüğü MTA ile Biodentine arasında farklılık göstermektedir. Biodentine’ye ait spesifik yüzey alanı (2,811 m<sup>2</sup>/g) MTA ile karşılaştırıldığında (1,0335 m<sup>2</sup>/g) daha büyük bir değere sahiptir [45].

### **2.2.2. Sertleşme Reaksiyonu**

Biodentine hazırlanırken kapsül içindeki toza 5 damla likit eklenir ve 30 sn boyunca tritüratörde karıştırılır. Materyalin toz ve likitinin karıştırılması, katı bir ağ oluşumuna olanak sağlayan iyonik değişim ve polimerizasyona yol açar. [45]

Tepkime ürünü, trikalsiyum silikat içeren bir sementöz faz ve zirkonyum oksit içeren bir radyoopasite sağlayan fazdan oluşmaktadır. Kalsiyum karbonatın, çevresinde reaksiyon oluşumuna yardımcı olan bir nükleasyon alanı olarak görev yaptığı, buna bağlı olarak hidrasyonun artırılmasının ve daha yoğun bir mikroyapının üretilmesinin sağlandığı belirtilmektedir [45, 46]. Biodentine’nin sertleşmiş hali, kalsiyum silikat hidrat matriks içerisinde gömülü olarak bulunan 5-µm’ lik yuvarlak parçalardan oluşmaktadır. Sertleşmiş Biodentine’ de yoğun bir mikroyapı görülmesinin sebebi, pörözitelerin kalsiyum silikat hidrat ve kalsiyum hidroksit ile doldurulmasıdır [47].

İzotermik kalorimetri analizi ile izlenen ve 37°C' de gerçekleştirilen simanın hidrasyon kinetiği şu şekilde anlatılmıştır; katıksız trikalsiyum silikat 210 dakika sonra egzotermik tepe noktası gösterirken, Biodentine 30 dakika süre sonunda yoğun ve dar bir egzotermik tepe değeri göstermiştir. Bu durum Biodentine materyalinin saf trikalsiyum silikata göre daha yüksek hidrasyon kinetiğine sahip olduğunu göstermektedir. Otuz dakika sonra gözlenen erken egzotermik tepe değeri ise sertleşmiş Biodentine materyalinin mekanik kuvvet artışının belirtecidir [47].

### **2.2.3. Sertleşme Süresi**

Materyalin sertleşme süresi 9-12 dk’dır. Bu süre diğer kalsiyum silikat bazlı

materyallerle karşılaştırıldığında oldukça kısadır [2]. Yapılan bir araştırmaya göre Biodentine'nin final sertleşme süresi 45 dk olarak saptanmış, 9-12 dk'nın materyalin başlangıç sertleşmesi olduğu belirtilmiştir [48]. Biodentine'in içeriğindeki akseleratör varlığının hızlı sertleşme sağlaması, materyalin manipülasyon özelliklerinin ve gücünün gelişmesine de yardımcı olmuştur. Yapılan çalışmalar MTA'nın uzun sertleşme süresinin materyalin kısmi kaybına ve materyal ve diş ara yüzünde değişime sebep olduğu gösterilmiştir [19, 21].

#### **2.2.4. Densite ve Pörözite**

Bir materyalin yoğunluğu ve pörözitesi sızıntı miktarını ve tedavinin sonuçlarını etkileyen kritik faktördür. Bunun sebebi geniş porlara sahip materyalin daha çok sızıntıya sebep olması ve hermetik kapanmayı tehlikeye atmasıdır. Karıştırma aşamasındaki düşük likit oranı, Biodentine'ye MTA'ya göre daha düşük pörözite sağlar [49].

#### **2.2.5. Basma Dayanımı**

Basma dayanımı su ile sertleşen simanlar için her zaman endişe duyulan ana fiziksel özelliklerden biri olmuştur [1]. Vital pulpa tedavilerinin Biodentine için önemli bir kullanım alanı olduğunu düşünüldüğünde, simanın çiğneme kuvvetlerine dayanıklı olması zorunludur, diğer bir deyişle dış etkilere karşı yeterli basınç dayanımı göstermelidir [50]. Biodentine'in Vickers sertlik, bükülme dayanımı ve elastiklik modülü gibi fiziksel özellikleri dentine benzer değerler göstermekle beraber, bu değerlerin MTA'dan yüksek olduğu gözlenmiştir [51].

Bu konuda yapılan bir çalışmada Biodentine'nin basma dayanımı diğer test materyalleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar bu gelişmiş dayanımın Biodentine'in düşük likit/ toz oranıyla ilişkilendirmişlerdir [48]. Materyalin bu durumu likitine suda çözünebilir polimer eklendiğinden dolayı kabul edilebilirdir [1]. Biodentine'nin basma dayanımını başka bir açıdan değerlendirerek özellikle klinik durumla ilişkilendiren başka bir çalışmada, Biodentine uygulamasını takiben yapılan asit ile pürüzlendirme işleminin basınç dayanımına etkisi araştırılmış ve bu durumun sonucu etkilemediği saptanmıştır [50].

### **2.2.6. Radyoopasite**

Radyoopasite, endodontik tamir ya da retrograd dolgu materyalleri olarak kullanılan ve düşük kalınlıklarda uygulanan malzemelerin kolay bir şekilde ayırt edilebilmesi için bu materyallerde bulunması gereken mühim bir özelliktir. Biodentine materyaline radyoopasiteyi sağlamak amacıyla zirkonyum oksit eklenmiştir. [52]

Radyoopasite için bu materyalin seçilme sebepleri arasında, biyouyumlu olması, uygun mekanik özellikler göstermesi ve korozyon direncine sahip olması sayılabilir [52]. MTA'nın radyoopasitesinin 7.17 mm alüminyuma eşit olduğu [21], Biodentine'nin radyoopasitesinin ise 3.5 mm alüminyuma eşit olduğu belirtilmiştir [2].

### **2.2.7. Renk Stabilitesi**

Renk stabilitesi üzerine yapılan çalışmalarda, bizmut oksit varlığı ve materyalin porözitelerine yerleşen kanın çeşitli Portland siman kaynaklı materyallerin renklenmesini indüklediği gösterilmiştir [34].

Biodentine'in renk stabilitesinin, MTA ile karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda Biodentine'nin 6 aya kadar renk stabilitesini koruduğu ve anlamlı derecede daha az renklenme gösterdiği sonucuna varılmıştır [53-55]. Bunun yanında Biodentine kullanılan durumlarda, NaOCl, klorheksidin ve kan varlığında klinik olarak fark edilebilir renklenme oluştuğu tespit edilmiştir [56, 57].

### **2.2.8. Mikrosızıntı**

Biodentine'in yüksek pH değerine sahip olduğu, mineralizasyonu uyaran kalsiyum ve silikon iyonlarının salınımına neden olduğu ve dentin- sement ara yüzü boyunca 'mineral infiltrasyon bölgesi' diye adlandırılan bir tabakayı oluşturduğu bulunmuştur [49]. Mineral infiltrasyon bölgesi daha iyi bir örtüleme kazandıran bir ara tabakadır.

Rezin modifiye cam iyonomer siman ile Biodentine'nin sızdırmazlık özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, bu iki materyalin benzer sızdırmazlık özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, Biodentine'nin iyi marjinal integrasyon özelliği, kalsiyum silikat materyalin yüzeyde hidroksiapatit kristalleri

oluşturma yeteneğine bağlanmıştır. Bu kristallerin özellikle materyal ve dentin duvarları arayüzünde sızdırmazlık kabiliyetini artırdığından söz edilmiştir. Ayrıca tükürükteki fosfat iyonları ile kalsiyum silikat bazlı materyal arasında materyalin örtüleme kabiliyetini artıran apatit depozitleri oluşabileceği de söylenmiştir. Ayrıca kalsiyum silikat simanların nano yapısı ve şekillendirici jelin küçük yapısının sızdırmazlığı sağlayan faktörlerden biri olduğunun üzerinde durmuşlardır [58].

Biodentine'nin rezin modifiye cam iyonomer simanla karşılaştırıldığı başka bir çalışmanın sonuçları da daha önce bahsedilen çalışmanın sonuçlarını desteklemiştir. Biodentine'nin rezin modifiye cam iyonomer simanın da kullanım alanı bulduğu restorasyonlarda kaide materyali, aproksimal kavitelere restorasyon materyali, mine-sement sınırının altında servikal destek olarak kullanılabileceği savunulmuştur [59].

Biodentine, geleneksel cam iyonomer siman ve rezin modifiye cam iyonomer simanın fiziksel özelliklerinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, önceki çalışmaların sonuçlarının aksine, kompozitin altında kullanılan Biodentine'nin anlamlı derecede sızdırmaya sebep olduğu bulunmuştur [47].

### **2.2.9. Bağlanma Dayanımı**

Biodentine'nin genellikle daimi restorasyonlardan önce kavite tabanında kullanıldığı fikri göz önünde bulundurularak, çeşitli bağlanma sistemleriyle materyalin bağlanma dayanımını değerlendiren çalışmalar mevcuttur.

Bu alanda yapılan bir çalışmada, cam iyonomer siman ve Biodentine'nin süt dişi ve daimi dişi dentinine bağlanma dayanımları değerlendirilmiş ve cam iyonomer siman hem süt dişi hem de daimi dişi grubunda Biodentine'den anlamlı derecede daha yüksek makaslama bağlanma dayanımı gösterdiği tespit edilmiştir. Biodentine'nin bağlanma dayanımı daimi ve süt dişi grupları arasında karşılaştırıldığında ise daimi dişi grubunun daha yüksek değerler gösterdiği bulunmuştur [60].

Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, çeşitli adeziv sistemlerini kullanarak, Biodentine materyali ile kompozitin makaslama bağlanma dayanımlarını incelenmiş ve 2 aşamalı self etch adeziv sistemler ile en yüksek bağlanma dayanımı

değeri bulunmuştur [61].

MTA ve Biodentine'nin bağlanma dayanımının karşılaştırıldığı bir araştırmada, araştırmacılar çeşitli kompozit rezinler ve cam iyonomer simanlar ile MTA ve Biodentine arasındaki bağlanma dayanımını incelemiştir. Bunun sonucunda en yüksek bağlanma kuvveti metakrilat bazlı kompozit rezin ile Biodentine arasında, en düşük bağlanma kuvveti ise MTA ve cam iyonomer siman arasında gözlenmiştir. MTA ve Biodentine'nin çalışmadaki diğer restoratif materyallere bağlanma dayanımları benzer değerlerde bulunmuştur [62].

Farklı irrigasyon solüsyonlarının Biodentine ve MTA'nın bağlanma dayanımına etkisini değerlendiren bir çalışmada, Biodentine'nin MTA'ya göre yüksek bağlanma dayanımı gösterdiği gösterilmiştir [63].

#### **2.2.10. Biyouyumluluk ve Sitotoksiste**

Perforasyon veya furkasyon tamiri, retrograd dolgu veya pulpa kaplama malzemesi olarak kullanılan bir dental materyalin; pulpal ve periradiküler hücreler üzerindeki toksik etkisinin önlenmesi açısından materyalin biyouyumluluk ve sitotoksiste özelliklerine dikkat edilmelidir [49]. İnsan gingival fibroblast hücreleri kullanılarak, Beyaz MTA, Biodentine ve cam iyonomer simanın sitotoksitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, Biodentine ve MTA benzer özellik göstermiş ve her iki materyalin cam iyonomer simana göre daha az sitotoksik olduğu bulunmuştur [64]. Bu konuda yapılan ve fibroblast hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, MTA ve Biodentine'nin sitokin salınımının benzer olduğu gözlenmiştir [65].

Periodontal ligament fibroblastları üzerinde yapılan başka bir çalışmada; inkübasyonun 24. saatinden sonra Biodentine'nin anlamlı derecede daha az hücre canlılığına neden olduğu gözlenirken (%73), 48-72. saatlerde ise %90'dan fazla hücre canlılığı gözlenmiştir [66]. Biodentine'nin sitotoksik etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmiştir [49]. Ayrıca Biodentine'nin başlangıç sitotoksitesi yüksek pH ile ilişkilendirilmiştir [67].

Periodontal ligament hücrelerinin hayatta kalışı ve çoğalmasıyla ilgili olarak Biodentine'nin MTA ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha iyi sonuçlar gösterdiği bulunmuştur [68]. Bu sonuçlar, Biodentine içeriğinde daha az toksik

radyoopasite sağlayıcı ajan bulunmasına bağlanabilmektedir [66].

Ayrıca, Biodentine pulpa ile direkt temasta olduğunda, hücrelerin çoğalmasını, migrasyonunu ve adezyonunu artırarak iyileşmede pozitif etki sağladığı bilinmektedir [69].

### **2.2.11. Biodentine kullanım alanları**

Biodentine restoratif diş hekimliğinde, çocuk diş hekimliğinde ve endodonti alanlarında dentin vekili olarak kullanım alanı bulur. Kaybolan dentin hacminin yerine konması için kullanılabilir.

Biodentine'nin kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir [70];

- Derin ve/veya geniş çürük koronal lezyonların restorasyonları,
- Derin ve/veya geniş servikal ve kök çürüklerinin restorasyonları,
- Direkt pulpa kaplaması
- İndirekt pulpa kaplaması
- Pulpotomi
- Kök kanalı ve furkasyon perforasyonlarının tamiri
- Eksternal rezorpsiyonların tamiri
- Perfore olmuş internal rezorpsiyonların tamiri
- Rejeneratif endodonti
- Travma sonrası pulpa açılması durumunda apeksogenezis
- Apeksifikasyon
- Endodontik cerrahi esnasında yapılan retrograd kök ucu dolguları

## 2.3.BİYOAKTİF CAMLAR

### 2.3.1.Biyoaktif camlar ve özellikleri

İnsan vücudunun hasar görmüş kısımlarının tamiri ve bu kısımların yeniden yapılandırılmasında kullanılan materyaller biyomateryal olarak adlandırılmaktadır. Biyomateryaller; metaller, seramikler, polimerler ve kompozitlerin içinde yer aldığı 4 grupta incelenebilir. Seramikler biyomateryallerin önemli bir bölümünü oluşturur ve bu alanda kullanılan seramikler biyoseramik olarak adlandırılır [71]. Trikalsiyum fosfatlar, hidroksiapatitler, kalsiyum alüminatlar, alüminalar, cam seramikler ve biyoaktif camlar biyoseramiklere örnek olarak verilebilir [72]. Biyoseramik materyal grubunda yer alan biyoaktif camlar, son yıllarda diş hekimliğinde kullanım alanı bulmaktadır.

Biyoaktif camlar, yapısındaki silika gruplarının vücut içerisinde kalsiyum ve fosfor iyonları ile yer değiştirmesi sonucu doku ve implante edilen materyaller arasında kimyasal bağlanmanın gerçekleştiği biyomalzemelerdir [6]. Diş hekimliği ve ortopedi alanlarında kullanılan bir biyomateryal grubudur. Bu camlar, biyoinert durumdan insan vücuduna implantasyondan sonra güçlü bir cevabı stimule edebilecek biyoaktif duruma modifiye edilmiştir [73].

Biyoaktif camlar silika bazlı materyaller olmanın yanı sıra doku sıvılarıyla temas sonucu oluşan kimyasal tepkimelerle dokularda hızlıca bağlanabilme kabiliyetine sahiptir. Ayrıca, yüzey aktif özellikleri sebebiyle fizyolojik sıvılarla temasında yüzeyde hidroksil karbonat apatit (HCA) tabakası oluşmasını sağlayarak kemik gibi canlı dokulara bağlanabilmektedir [6].

Biyoaktif camlar fizyolojik sıvılarla temasa geçtiğinde; hızlı iyon değişimi, cam yüzeyinde silanol bağlantı oluşumu, silikadan zengin bölge oluşumu ile pH artışı, solüsyondan  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4^{3-}$  göçünü içeren, aynı zamanda apatit tabakası oluşumuna yol açan bir tepkime serisi oluşur [6].

Biyoaktif camların diğer biyoaktif seramik ve cam seramiklerden farklı olmasını sağlayan esas özellik, kimyasal özelliklerinin ve dokulara bağlanmalarının kontrol edilebilmesidir. Çeşitli tıbbi uygulamalar için hedeflenen türde biyoaktif cam tasarlamak olasıdır. Aynı durum biyoaktif cam seramikler için de söylenebilir; fakat

heterojen mikro yapıları sebebiyle daha sınırlı sayıda uygulama alanına sahiptir [74].

Biyoaktif camların sıradan ticari camlardan kimyasal kompozisyon açısından farklı olmasına neden olan en önemli üç faktör [75];

- 1- Düşük SiO<sub>2</sub> yüzdesi (%60'ın altında),
- 2- Yüksek Na<sub>2</sub>O ile CaO
- 3- Yüksek CaO / P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oranıdır.

Bu faktörlerin materyale kazandırdığı özellik, materyal yüzeyinin sıvı ortamda oldukça reaktif olmasını sağlamaktır [75].

Biyoaktif camların biyoaktivitesinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Yapay dış ortamlarda ve canlı organizmada biyoaktiviteleri değerlendirilen biyoaktif camların, çevre kemik dokularıyla güçlü bağlar meydana getirdiği gözlenmiştir. Ancak, yoğunluğu yüksek olan kemik ile karşılaştırıldığında, düşük kırılma direncine sahip olduğu saptanmıştır. Bu durum biyoaktif camların kullanım alanlarının, düşük dayanım gerektiren tıbbi uygulamalarla sınırlı kalmasına sebep olmuştur [76].

Biyoaktif camların eşit oranda çözünerek yeni şekillenen dokuya katıldığı, mükemmel osteokondüktif yeteneği sayesinde ve biyoyum çerçevesinde mezenkimal kök hücrelerin göçüne izin verdiği söylenmektedir [77]. Bu sebeple, biyoaktif camların diş hekimliğinde remineralizasyon ajanı olarak kullanımı konusunda araştırmalar yapılmıştır [78-80].

Biyoaktif camların biyoaktivitesinin iki mekanizması olduğu düşünülmektedir. Materyalin kemik ile bağlantısının, hasar görmüş kemiğin kollajen fibrilleri ile etkileşen ve bir bağ oluşturan bir HCA tabakasının oluşumuyla ilişkilendirilmektedir [81]. HCA tabakasının oluşumu günümüzde oldukça iyi anlaşılmaktadır, ancak HCA-konak kemik ara yüzündeki biyolojik etkileşimler hakkında yeterli bilgi henüz bulunmamaktadır. HCA tabakasına kemik dokusunun bağlanması; protein adsorpsiyonu, kollajen fibrillerin eklenmesi, kemik öncü hücrelerin tutunması, hücre farklılaşması ve kemik ekstraselüler matriksin atılımı ve onu takiben gerçekleşen mineralizasyonun sonucu olduğu düşünülmektedir [82].



Osteogenez, camların çözünme ürünlerinin osteoprogenitör hücreler üzerindeki hareketi sonucu yeni kemik büyümesinin uyarılmasıdır [82]. Bununla birlikte HCA tabakası aynı zamanda kemik yapıcı hücrelerin yapışması ve çoğalması için uygun bir yüzey sağlamaktadır [6].

### **2.3.2. Biyoaktif cam materyalinde HCA (Hidroksikarbonat apatit) tabakasının oluşum mekanizması**

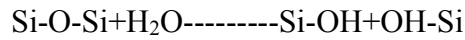
Çözünme ürünlerinin birikimi, hem kimyasal bileşimin, hem de solüsyon pH'ının yüzey alanı sağlanmasına ve HCA nükleasyonuna yardımcı olacak şekilde değişmesine yol açar [83].

Biyoaktif cam materyali vücut dokularına uygulandığında bir tepkime serisi oluşmaktadır. Beş ana aşamadan oluşan tepkime serisi; SiO<sub>2</sub> dağılımı, katyonların erimesi ve değişimi, kalsiyum ve fosfatın çökelp apatit oluşturmasını içerir [84].

1- Cam yüzeyindeki sodyum (Na) ve potasyum (K) iyonları vücut sıvılarındaki hidrojen (H) ve HCO<sub>3</sub> ile yer değiştirir.



2- İlk aşamanın sonunda Na kaybı bazı bölgelerde silika ağının hasarına sebebiyet verir. Si(OH)<sub>4</sub> formundaki çözünebilir silikanın hasarıyla birlikte cam ve vücut sıvıları ara tabakasında Si-OH formasyonu meydana gelir.



3- Kalsiyum fosfat tabakasının oluşumunda destek görevi olan SiO<sub>2</sub>'den zengin tabaka cam yüzeyi üzerinde yeniden polimerize olur. Bu polimerizasyonun ardından amorf kalsiyum fosfat formasyonu meydana gelir.

4- Kalsiyum (Ca) ve fosfat (PO<sub>4</sub>) grupları SiO<sub>2</sub> tabakasını geçer ve bu tabakanın dışında CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>'den zengin bir film tabakası oluşur. Oluşan bu tabakaya vücut sıvılarında çözünen Ca ve PO<sub>4</sub> katılır.

5- Vücut sıvılarından gelen çeşitli anyonların katılmasıyla CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

tabakasının kristalizasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda hidroksil, karbonat ve florapatit grupları oluşur.

Cam bileşimi, HCA katmanı oluşumu ve kemik bağlanma oranı üzerinde en büyük etkiye sahip değişkendir. Esasen daha düşük silika içeriği, daha az çözünen silika ağı anlamına gelir [6].

Bu durum da materyal çözülmeye daha yatkındır ve yukarıda listelenen aşamalar daha hızlı gerçekleşir. Biyolojik aktivitenin, camdaki silika çözünmesinin aktivasyon enerjisiyle direkt olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir [85].

### **2.3.3. Biyoaktif cam üretim yöntemleri**

Biyoaktif camlar, geleneksel ergitme yöntemi ve sol-jel yöntemi olmak üzere iki yöntem kullanılarak elde edilebilir: Biyoaktif camların bir kısmı, klasik ergitme yöntemi ile hazırlanır; burada oksitler platin bir pota içerisinde yüksek sıcaklıklarda (1300° C'nin üstünde) eritilir ve grafit kalıp veya suda söndürülür [86]. Sol-jel yöntemi ise esas itibarıyla oda sıcaklığında silika nano parçacıklarını oluşturur ve birleştirir. Bu yöntemde bileşim öncüllerini içeren bir çözeltinin, bir jel oluşturmak üzere polimer türü reaksiyonlara maruz kalacağı kimyasal bazlı sentez yolu vardır [86].

#### **2.3.3.1. Sol-jel Yöntemi**

Seramik malzemelerin bir buçuk asırdan fazla bir süredir üretimi için kullanılan sol-jel yöntemi; aktif proteinler, gözenekli seramik malzemeler, organik moleküller dahil olmak üzere ısıya duyarlı malzemelerin katılması için oldukça uygun ve basit araçlar sağlamasından ötürü gittikçe önem kazanmaktadır [87]. İnorganik-organik hibritler oluşturma yeteneğinden dolayı yıllar içinde hızla gelişmiştir.

“Sol-jel”, büyük ölçüde inorganik polimerlerin sentezlendiği bir süreci ifade etmektedir. "Sol", koloidal parçacıkların dağılımı; "Jel" ise solun bir araya getirilmesiyle oluşturulan birbirine bağlı bir polimerik ağıdır [88]. Sol-jel yöntemi kullanılarak; çözeltinin hazırlanması, jelleşmesi ve çözücünün sistemden uzaklaştırılması ile cam, cam-seramik veya kompozit malzemeler üretilebilmektedir [89].

### 2.3.3.1.1. Sol-jel Yönteminin Özellikleri

Sol-jel teriminin başka bir ifadeyle, jellerin koloidal süspansiyonlardan ya da sollardan üretildiği geniş bir üretim süreci şeklinde açıklanabilir. İsminden de anlaşılacağı üzere, koloidal süspansiyonun oluşumu ve solun jelleştirilmesi yoluyla inorganik matrislerin üretimi ve bu jelin kuruduktan sonra, "kuru jel" halini (kserojel) almasını içerir [90]. Kserojelin oluşturulmasından sonra, istenen özelliklerin elde edilebilmesi için matris içine çeşitli katkı maddeleri eklenir.

Sol-jel işlemi, şu temel aşamalardan oluşmaktadır [91];

- Ön başlatıcının hidrolizisi
- Sol-jel aktif türlerinin alkol ya da su kondensasyonu
- Jelasyon
- Yaşlanma
- Kurutma
- Yüksek sıcaklık uygulaması

### 2.3.3.1.2. Sol-jel yönteminin avantajları

Sol-jel yöntemi kullanılarak üretilen camların, klasik yöntem kullanılarak üretilen camlara göre pek çok avantajı mevcuttur [87]. Bunlar:

- Daha düşük ergime sıcaklığında ve süresinde çok daha homojen bir yapıya sahip cam malzemelerin üretilmesi,
- Sol-jel yöntemi ile yüksek saflıkta cam üretiminin gerçekleştirilmesi,
- Daha düşük sıcaklıkta cam üretiminin yapılmasıyla enerji sarfiyatının, buharlaşmayla oluşan kayıpların ve hava kirliliğinin çok az olması,
- Sol-jel yönteminin çeşitli bileşimlere uygulanabilmesi ve ayrıca, yöntemin klasik cam ergitmede kullanılan sıcaklıklardan çok daha düşük sıcaklıklarda uygulanabilmesinden dolayı, faz ayrımı ve kristalizasyonun gerçekleşmesi nedeniyle üretilmeyen bileşimlerin elde edilmesi,
- Jelin özellikleri sayesinde daha iyi cam ürünleri oluşumu,
- Filmler gibi özel ürünlerin elde edilmesidir [87].

#### **2.3.3.1.3. Sol-jel yönteminin dezavantajları**

- Hammaddelerin yüksek maliyeti,
- Üretim esnasında büzülmenin gerçekleşmesi,
- Artan küçük gözenekler,
- Artan karbon,
- Organik çözeltilerin sağlığa zararlı etkileri,
- Uzun işlem süresi ve
- Jel oluşumu sırasında, çözeltiyi sabit viskozitede tutmada yaşanan zorluklardır [87].

#### **2.3.3.1.4. Sol-jel Yönteminin Uygulanması**

Geleneksel seramik ve cam teknolojisi yüksek sıcaklıkta gerçekleşen uygulamalardır [92]. Sol-jel yönteminde ise düşük sıcaklıklarda camın gözenekliliği kontrol edilebilmekte ve klasik yöntem ile üretilen camlara göre çok daha homojen bir yapıya sahip cam malzemeler üretilmektedir. Bu yöntemde istenen oksitleri elde etmek için, yüksek saflıktaki sıvı organik başlatıcılar belirli oranlarda karıştırılır ve tepkimenin gerçekleşmesi sağlanır. Elde edilen camdaki oksit oranları sadece başlangıç bileşenlerinin oranlarına bağlıdır [87]. Başlangıç maddeleri çözelti oluşturan bütün maddeler bu yöntemde kullanılabilir. Sol-jel yönteminde öncelikle uygun başlangıç maddeleri kullanılarak çözelti elde edilir. Daha sonra, düşük sıcaklıkta gerçekleşen tepkimeler ile çözelti katı bir jele dönüşür. Jele uygulanan kurutma işlemi ile camsı yapı elde edilir [92].

#### **2.3.4. Biyoaktif camların kullanım alanları**

Biyoaktif camlar, ilk üretiminden itibaren biyomedikal alanda kullanım alanı bulmuştur. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA, Food and Drug Administration) tarafından da onaylanan bu materyal ilk olarak orta kulak cerrahisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İlk uygulamalarda daha sınırlı kemik replasmanlarında tercih edilirken, daha sonra klinik uygulamalarda da kullanım alanı bulmuştur [93].

Ortopedik implant veya medikal apareylerin yüzeyleri biyoaktif cam partikülleri ile kaplanarak, kemik doku ile kuvvetli bir kimyasal bağlantı

oluşturulabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre biyoaktif camlar, doku tamirini ve hatta yeniden oluşturulmasını hedefleyen doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında da kullanılmaya başlanmıştır. Biyoaktif camların kemik dokusundaki hızlı kemik oluşumunu uyarması, bu materyalin diş sert dokuları üzerinde oldukça etkili olduğu fikrini ortaya koymaktadır [93].

Osteokondüktif özellikte olduğu bilinen biyoaktif camların, diş dokularında da mineralizasyonu sağlayabilecekleri düşünülerek, diş hekimliğinde mineralizasyon ajanı olarak kullanılmaları konusunda çalışmalara yoğunlaşmıştır [79].

Periodontal kemik defektlerinde, kist boşluklarının ve rezorpsiyonların tedavisinde kullanılan kemik greftlerinin biyoaktif cam içerikli olanları, dokulara kimyasal olarak bağlanma yetenekleri sayesinde diğer greftlerden alloplastik greftlere göre üstünlük sağlamaktadır [94, 95].

Biyoaktif cam ve MTA'nın ampütasyon materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada, bu materyallerin formokrezol ve hidroksiapatite göre daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır [96].

Biyoaktif cam materyali pulpa kaplaması tedavilerinde de kullanım alanı bulmuştur. Süt dişleri üzerinde yapılan bir çalışmada, pulpa üzerine uygulanan biyoaktif cam materyalinin, kalsiyum hidroksite göre daha başarılı bir dentin köprüsü oluşumu sağladığı gözlenmiştir [97]. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, biyoaktif camların pulpa hücrelerinde odontoblastik farklılaşmayı tetiklediği saptanmış ve bu sonuç doğrultusunda bu materyalin dentin rejenerasyonunda kullanılabileceği söylenmiştir [98].

Biyoaktif camların doku sıvılarıyla temas ettiğinde meydana getirdikleri pH değişimi, araştırmacıları bu materyalin antibakteriyel özelliklerini değerlendirmeye yöneltmiştir [6, 99].

Dentin hassasiyetinde de kullanım alanı bulan biyoaktif camların bu alandaki çalışma sistemi, açık dentin tübüllerinde hidroksiapatit tabakası oluşmasını indükleyerek dentin tübüllerini tıkanmasını ve buna bağlı olarak dentin hassasiyetinin azalmasını sağlamaktır [100]. Bu alanda yapılan bir diğer çalışmada da biyoaktif cam içeren patların hassasiyet tedavisinde etkili olduğundan bahsedilmiştir [101].

Biyoaktif camların sert doku oluşmasını uyarıcı etkisi, remineralizasyonun artmasındaki desteği ve antibakteriyel özelliği diş hekimliğinde halihazırda olan materyallerin yapısına katılarak, bu materyallerin özelliklerini geliştirme fikrini ortaya çıkarmıştır. Bu konuda yapılan bir çalışmada biyoaktif camların kompozitlerin bazı mekanik özelliklerini geliştirdiği saptanmıştır [102].

Bildiğimiz kadarıyla literatürde şu ana kadar Biodentine materyaline biyoaktif cam ilave edilerek yapılan yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Çalışmada materyalin biyoaktiflik özellikleri değerlendirilmiş ve biyoaktif camların Biodentine'nin biyoaktiflik özelliğini artırdığı ve materyalin yüzeyinde kristalin apatit oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir [9].

## **2.4. BİYOUYUMLULUK**

Biyoyum; canlı dokularla temas halinde bulunan bir restorasyon materyali ya da implantın çevresindeki sert veya yumuşak dokuda herhangi bir değişikliğe ve tepkiye neden olmadan kalabilmesi durumudur [103]. Bu durum, materyalin konak cevabı oluşturmaması, materyalden herhangi bir ürün salınımının olmaması, materyal yüzeyinde yeni bir ürün açığa çıkmaması ve materyalin lokal ve sistemik açıdan karsinogenik etkili olmamasını gerektirmektedir [103].

Diş hekimliği alanında kullanılan materyallerin biyoyumlulukları şu kriterlerle değerlendirilebilir [104];

1. Pulpaya ve yumuşak dokulara zararlı olmamalıdır.
2. Materyalden herhangi bir ürün salınarak dolaşım sistemine geçmemeli ve difüzyon yolu ile emilerek sistemik toksik cevaba yol açmamalıdır.
3. Alerjik potansiyel cevap oluşturacak bir içeriği olmamalıdır.
4. Karsinogenik etkisi bulunmamalıdır.

### **2.4.1. Biyoyumluluğun değerlendirilmesi**

Biyoyumluluğu değerlendirmek için kullanılan yöntemler, uluslararası standartlara uygun olarak saptanmıştır [105]. Dental materyallerin biyoyumluluğunun değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler üç alt grupta sınıflandırılmıştır [106];

1. *İn vitro* testler
2. *İn vivo* hayvan deneyleri
3. İnsanlarda klinik çalışmalar

*İn vitro* testler; LD50 ağız içi test, LD50 karın içi test, soluma testi, hemolizis testi, ames testi, styles testi, dominant letal testi ve sitotoksisite testleri olarak sınıflandırılır [107].

#### **2.4.1.1. Sitotoksisite testleri**

Sitotoksisite testleri, test edilecek materyalin uygun görülen hücre kültüründeki hücrelerin büyüme oranı ve yapısal özelliği üstündeki etkisinin negatif ve pozitif kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak değerlendirildiği biyouyumluluk test yöntemidir [108]. Bu test yöntemi ile hücre membran bütünlüğü, hücre miktarı ve büyümesi, biyosentez ve enzim etkinliği, hücre genetik materyali üzerindeki etkileri değerlendirilebilir.

##### **2.4.1.1.1. Sitotoksisite Testlerinin Avantajları**

Sitotoksisite testlerinin diğer test yöntemlerine göre avantajları arasında [105, 107, 109];

1. Hücre metabolizmasında özel olarak bir işlevin değerlendirilebilmesi,
2. Kısa zamanda çok miktarda örneğin aynı zamanda ekonomik olarak test edilebilmesi,
3. Hesaplanabilir ve diğer gruplarla karşılaştırılabilecek verilere ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin tek tipte ayarlanabilmesi,
5. Kullanım testlerine göre daha hassas toksik madde değerlendirilme imkanı sunması sayılabilir.

##### **2.4.1.1.2. Sitotoksisite testlerinin dezavantajları**

Sitotoksisite testlerinin bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar;

1. Kullanılacak her bir test için bir tür hücre kullanılabilmesi,
2. Konak hücrelerin kültür hücrelerinden farklı olması,
3. *İn vitro* ortamda normal şartlarda organizmada bulunan bağışıklık sistemi ve

inflamatuvar sistem gibi işleyişlerin bulunmamasıdır [105, 107, 109].

#### 2.4.2. MTT testi

MTT (tetrazolium tuzu, 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi, bir hücre popülasyonundaki canlı hücrelerin sağ kalım ve çoğalma oranını saptamaya yarayan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir [110]. Bu testin temeli, canlı hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasına ait tetrazolyum halkasını parçalama kabiliyetine dayanmaktadır [110]. Bu tepkime, mitokondriye ait bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesiyle yakından ilişkilidir. Sözü edilen tetrazolyum halkasının parçalanmasıyla, soluk sarı renkli MTT boyası sağlıklı hücrelerde koyu mavi renge modifiye olurken, ölü veya mitokondriyel faaliyetleri bozulmuş hücrelerde herhangi bir modifikasyona uğramamaktadır [111].



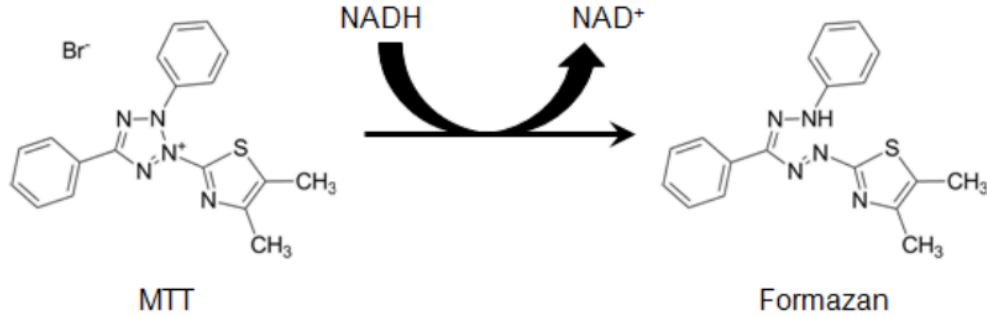
**Şekil 2.1:** MTT solüsyonun hazırlanmasında kullanılan tiyazol blue tetrazolyum bromid tozu

Testin hücrelerin MTT boyası ile etkileşiminden sonraki basamakları, presipite tepkime ürünlerinin çözünür hale gelmesi ve oluşan ürünün kolorimetrik olarak ölçümüdür. Bu testin avantajı hızlı uygulanabilmesi ve herhangi bir radyoizotop bulunmasıdır [112].

Bu prosedürde MTT substratı, fizyolojik olarak dengeli bir çözelti içinde hazırlanır, genellikle 0,2 – 0,5 mg / ml'lik bir konsantrasyonda kültürdeki hücrelere eklenir ve 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Formazan miktarı, bir spektrofotometre kullanılarak 570 nm absorbanstaki değişiklikler kaydedilerek ölçülür [113]. Aktif



metabolizması olan canlı hücreler MTT'yi mor renkli bir formazan ürününe dönüştürür ve maksimum emilim 570 nm'ye kadar çıkar. (Şekil 2.2)



**Şekil 2.2.** MTT ve renkli formazan ürününün yapısı

Hücreler öldüğünde, MTT'yi formazana dönüştürme yeteneklerini kaybederler. Böylece renk oluşumu, sadece canlı hücrelerin bir göstergesi olarak işlev görür. MTT'nin formazana indirgenmesinin tam hücrel mekanizması tam olarak anlaşılmalıdır, fakat muhtemelen NADH veya elektronları MTT'ye aktaran benzer indirgeyici moleküller ile reaksiyonu kapsamaktadır [114].

MTT tetrazolyumun formazan ürünü, hücre yüzeyi içinde ve kültür ortamı içinde birikmesinin yanı sıra, hücrelerin içinde de çözünmez bir çökelti olarak birikir [113].

Formazan ürününün oluşması, sadece aktif halde bulunan mitokondrinin olduğu canlı hücrelerde meydana gelir. Bu nedenle formazan ürünleri ile canlı hücre sayısı arasında bağlantı kurulmuştur [115, 116]. Formazan kristalleri bir solüsyon içinde çözüldükten sonra çözünen materyallerin optik yoğunlukları spektrofotometre ile ölçülür. Bulunan spektrofotometre değerinin metabolizmaları aktif olan hücre sayısı ile doğru orantılı olduğu kabul edilir [117].

MTT'nin kültürdeki hücreler tarafından formazana dönüşümü zamana bağlıdır [113].

Daha uzun inkübasyon süresi renk birikimi ve bir noktaya kadar artan hassasiyet ile sonuçlanır. Bunun yanında, inkübasyon süresi, bir sinyal oluşturmak için

hücreden enerji (NADH gibi eşdeğerleri azaltma) kullanan saptama reaktiflerinin sitotoksik doğası nedeniyle sınırlıdır [113].

#### **2.4.2.1. MTT test protokolü**

1. Hücreler ve her kuyucukta 100 µl son hacim içeren test edilecek bileşikler, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında hazırlanır.
2. İstenen süre boyunca inkübe edilir.
3. 0,45 mg/ml'lik bir son konsantrasyona ulaşmak için her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu eklenir.
4. 1-4 saat boyunca 37° C'de inkübasyon sağlanır.
5. Formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 100 µl çözücü solüsyon eklenir.
6. Tam çözünmeyi sağlamak için karıştırılır.
7. Son olarak 570 nm dalga boyunda absorban (optik yoğunluk) kaydedilir [113].

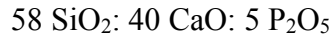
Biodentine'nin biyoaktivitesini ve bulunduğu alanda oluşturduğu remineralizasyon özelliğini artırabilmek adına biyoaktif cam materyali ile modifikasyonu düşünülebilir. [9] Literatürde bu modifiye materyalin sitotoksik özelliklerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı biyoaktif cam nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş Biodentine materyalinin sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesidir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında ticari olarak ulaşılabilen Biodentine (Septodont, Fransa) ve ağırlıkça %1 ve %2 oranında biyoaktif cam ilave edilerek modifiye edilmiş ve farklı sertleşme sürelerine sahip (1, 3 ve 7 gün) Biodentine örneklerinin sitotoksik özellikleri değerlendirildi. Tezde insan ve insana ait herhangi bir biyolojik materyal kullanılmadığından etik kurul onayına kurul kararınca gerek duyulmamıştır. Çalışma, 6.2017/24 bilimsel araştırma projesi (BAP) numarası ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu tarafından desteklenmiştir.

#### 3.1.Sol-jel yöntemi ile biyoaktif cam elde edilmesi

Nano boyuttaki biyoaktif cam partiküllerinin üretimi daha önce Hong ve ark. [118] tarafından anlatılan metotla sağlanmaktadır. Biyoaktivitesi daha iyi olan bir biyoaktif cam üretiminin sentezi için kullanılacak karışımda aşağıda gösterilen molar kompozisyonu kullanıldı;



Biyoaktif cam üretimi aşağıda anlatıldığı biçimde devam etmiştir;

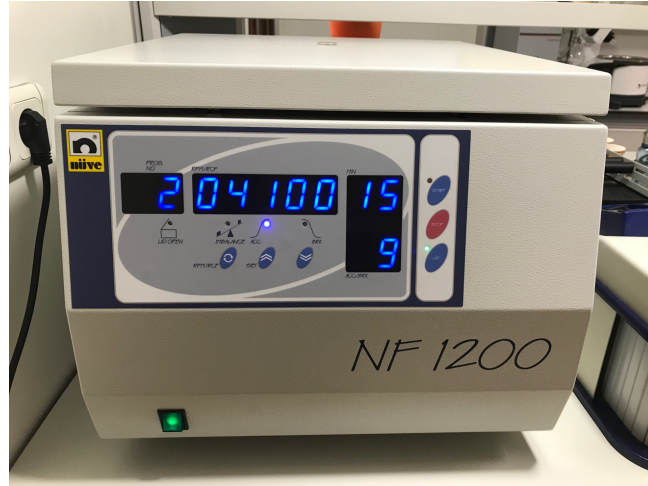
Oda sıcaklığındaki 117 ml distile suyun içerisinde, 7,7 g ağırlığında Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O çözümlenerek kalsiyum bazlı bir solüsyon hazırlandı. Ardından 9,7 ml tetraetilortosilikat (TEOS 98%; Aldrich, St. Louis, ABD), 63,5 ml etanol içerisinde seyreltilerek ikinci solüsyon hazırlandı ve bu karışıma kalsiyum nitrat solüsyonu eklendi. Elde edilen karışımın pH'ı sitrik asit yardımıyla 1-2'ye ayarlandı.

Bu saydam çözelti, 1500 ml distile su ve 1,2 g NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (May & Baker, İngiltere) karıştırılarak oluşturulan çözeltiye, kuvvetli karıştırma altında yavaşça damlatılarak eklendi. Damlatılma işlemi sırasında pH'ın, sulu amonyak yardımı ile yaklaşık olarak 10'da tutulması sağlandı. Karışım 48 saat boyunca karıştırıldı ve oda sıcaklığında yaşlandırıldı. Bu işlemler, biyoaktif camla tepkimeye girmemesi sebebiyle platin kroze içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Biyoaktif cam üretiminin gerçekleştiği platin kroze

Oluşan çökelti santrifüj (12,000 rpm) yardımı ile ayrıldı (Şekil 3.2) ve distile su ile üç kez santrifüj-redispersiyon döngüsü ile yıkandı. Ayrılan katı, 200 ml %2'lik bir polietilen glikol (PEG, 10,000) çözeltisi içinde dağıtıldı ve 24 saat boyunca karıştırıldı. Bu karışım, beyaz biyoaktif cam nanopartiküllerinin (Şekil 3.5) elde edilmesi amacıyla 700°C' de 3 saat boyunca kalsinasyon işlemine tabi tutuldu (Şekil 3.3, Şekil 3.4).



**Şekil 3.2.** Biyoaktif cam üretimi sırasında çökeltinin ayrılması için kullanılan santrifüj cihazı



**Şekil 3.3.** Materyalin kalsinasyonunda kullanılan kül fırın



**Şekil 3.4.** Biyoaktif cam materyalinin son fırınlama işlemi için platin kroze içerisinde fırına yerleştirilmesi



**Şekil 3.5.** Sol-jel yöntemiyle elde edilen biyoaktif cam nanopartikülleri

## **3.2. Materyallerin karakterizasyonu**

### **3.2.1. X ışınları kırınım difraktometresi (XRD)**

XRD, her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınları karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Biyoaktif cam materyal grubundan bir örnek seçilerek XRD analizi gerçekleştirildi. Seçilen numunelerin yüzeyleri ince taneli zımpara kağıdı kullanılarak parlatıldı. X-ışını difraktometresinde; Ni-filtreli Cu K $\alpha$  ve 40 Kv ve 40 mA parametreleri kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Materyallerin kristalin yapısı, materyal rotasyon hareketi yaptığı esnada bilinen bir dalga boyunda ve belli bir açıyla X-ray ışını geçirerek belirlendi. Tercih edilen oryantasyonun etkilerinin sınırlı olduğundan emin olmak için örneklere rotasyon hareketi yaptırıldı. Taramalar, 10°–80° 2 $\theta$  aralığında gerçekleştirilmiştir. Materyal içeriğindeki her bir bileşen, karakteristik kırınım paternine sahiptir ve çeşitli kimyasal bileşiklerden oluşan sementöz materyallerde her örnekte birden fazla pik noktası olabilir. Faz tanımlaması, ICDD veri tabanını (International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA, ABD) kullanan bir arama-eşleştirme yazılımı kullanılarak tamamlandı.

### **3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu analizi (SEM-EDX)**

Materyal örnekleri Polaron Sc7620 Sputter Coater (VG Microtech Inc. Japonya) cihazı yardımıyla ince bir tabaka platin ile kaplanarak hazırlandı. 10,000 X



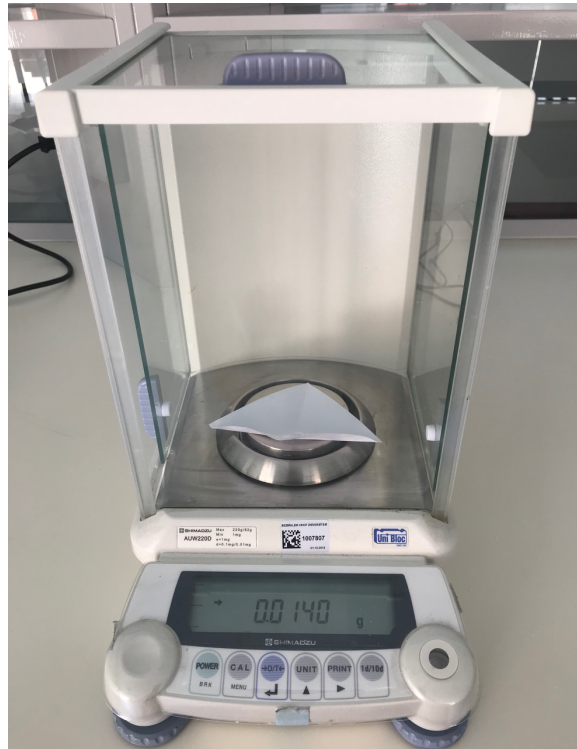
büyütmede materyal yüzeyleri ve morfolojileri incelendi. Materyallerin yüzeyinin platin film tabakası ile kaplanmasının ardından yüzeydeki sodyum, klor, oksijen, potasyum, kalsiyum, fosfor ve silikon iyonları hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla örneklerin üç farklı bölgesinden EDX analizi yapıldı.

### 3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR; moleküllerin titreşme ve dönme düzeylerinin uyarılması ile meydana gelen soğurma bölgelerinin kayda geçirilmesi ile elde edilir. Materyal örnekleri bir havanda dövülerek toz haline getirildikten sonra, 2-5 mg aralığında materyal örneklerine 100 mg potasyum bromid eklendi. Potasyum bromid ilavesinin ardından FTIR (Shimadzu IRAffinity-1; Shimadzu Corp, Kyoto, Japonya) ile analiz yapıldı.

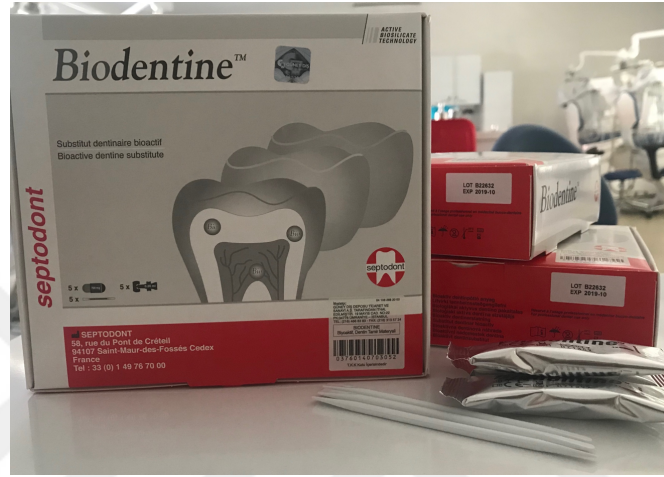
### 3.3. Nanokompozitlerin hazırlanması

Nano boyutlarda sol-jel yöntemi kullanılarak üretilen, molar kompozisyonu  $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5^{23}$  şeklinde olan, 48-96 nm boyutlarında biyoaktif cam partikülleri ağırlıkça sırasıyla 7 mg ve 14 mg (ağırlıkça %1 ve %2) olmak üzere Biodentine kapsülüne eklendi. Materyallerin ağırlıkları hassas terazi ile belirlendi (Şekil 3.6).

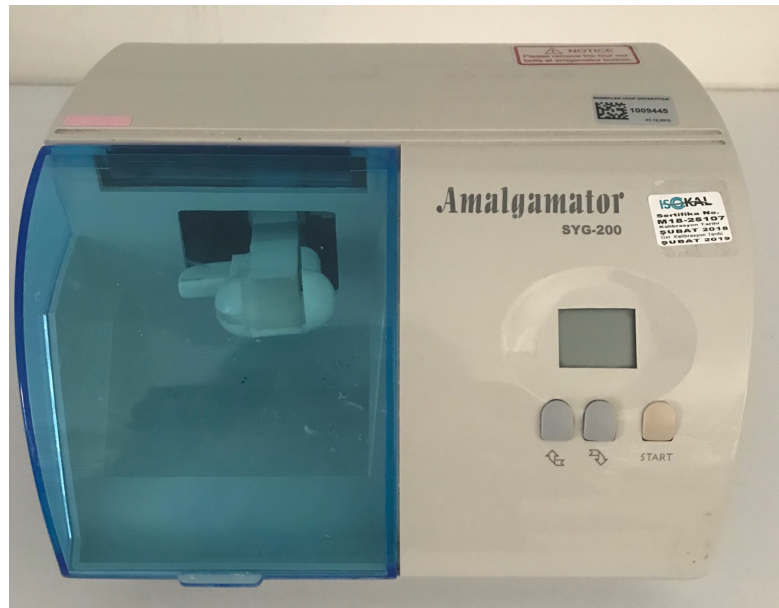


Şekil 3.6. Biyoaktif camın ağırlığının ölçüldüğü hassas terazi

Elde edilen Biodentine ve biyoaktif cam toz karışımı kuru olarak amalgamatörde 30 sn boyunca karıştırıldı. Biodentine (Şekil 3.7), üretici talimatında belirtildiği üzere, toz karışıma 5 damla Biodentine likit eklendi. Bu karışım da amalgamatörde 30 sn boyunca karıştırıldı (Şekil 3.8) ve sonuçta ağırlıkça %1 ve %2 biyoaktif cam içeren nanokompozitler elde edildi.



Şekil 3.7. Biodentine



Şekil 3.8. Örneklerin karıştırılmasında kullanılan amalgamatör



Çalışmada değerlendirilmek üzere biri kontrol grubu olmak üzere 3 deney grubu oluşturuldu;

**Grup 1:** Ağırlıkça %1 biyoaktif cam ile modifiye edilen Biodentine (BD+ %1 BAC)

Biodentine toz kapsülüne 7 mg biyoaktif cam eklenerek elde edilen Biodentine materyali, üretici talimatlarına bağlı kalınarak, toz kısmın yer aldığı kapsüle 5 damla likit eklendikten sonra, amalgamatörde 30 sn boyunca karıştırılarak hazırlandı. Elde edilen karışım 5 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde polietilen kalıplarda disk haline getirildi ve başlangıç sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı.

**Grup 2:** Ağırlıkça %2 biyoaktif cam ile modifiye edilen Biodentine (BD+ %2 BAC)

Biodentine toz kapsülüne 14 mg biyoaktif cam eklenerek elde edilen Biodentine materyali, üretici talimatlarına bağlı kalınarak, toz kısmın yer aldığı kapsüle 5 damla likit eklendikten sonra, amalgamatörde 30 sn boyunca karıştırılarak hazırlandı. Elde edilen karışım 5 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde polietilen kalıplarda disk haline getirildi ve başlangıç sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı.

**Grup3:** Biodentine (Kontrol grubu) (BD)

Biodentine, üretici talimatlarına bağlı kalınarak, toz kısmın yer aldığı kapsüle 5 damla likit eklendikten sonra, amalgamatörde 30 sn boyunca karıştırılarak elde edildi. Ardından 5 mm çapında 2 mm yüksekliğinde polietilen kalıplarda haline getirildi ve başlangıç sertleşmesinin tamamlanması sağlandı.

Gruplar oluşturulduktan sonra sitotoksiste testi için her bir deney grubu kendi içinde 1 günlük, 3 günlük ve 7 günlük sertleşen olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı.

Tüm deney gruplarında materyal örnekleri başlangıç sertleşme tepkimeleri tamamlandıktan sonra 37°C ve %100 nemli ortamda 1 gün, 3 gün ve 7 gün olmak üzere inkübasyonu sağlandı.

İndirekt sitotoksiste testinin uygulanması aşamasında; 1, 3 ve 7 günlük

sertleşen materyal gruplarının hepsi, her grup ayrı ayrı olmak üzere hücre ile muamele süreleri gözetilerek (24 ve 48 saat) 2 alt gruba daha ayrıldı.

### 3.4. Materyallerden eluat elde edilmesi

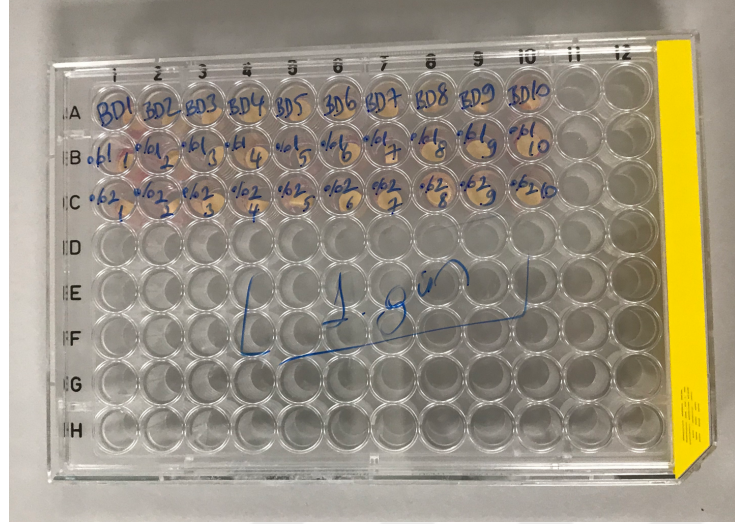
Sitotoksisite değerlendirmelerini yapmak üzere, her bir grupta 10 materyal diski 24 saat, 10 materyal diski ise 48 saat hücre ile muamele edilecek şekilde her bir grup için 20 adet materyal örneği hazırlandı. Sertleşme süreleri (1, 3 ve 7 gün) ve materyal çeşitliliği (BD, BD + %1 BAC, BD + %2 BAC) göz önüne alındığında toplam 180 adet örnek oluşturuldu.

Materyallerin başlangıç sertleşmeleri tamamlandıktan sonra, her bir materyalin her iki yüzü de 20 dk boyunca UV ışığına maruz bırakılarak steril koşullara gelmesi sağlandı (Şekil 3.9). Steril edilen örnekler, çalışmada planlanan sertleşme süreleri (1, 3 ve 7 gün) boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> oranına sahip steril inkübatörde bekletildi.



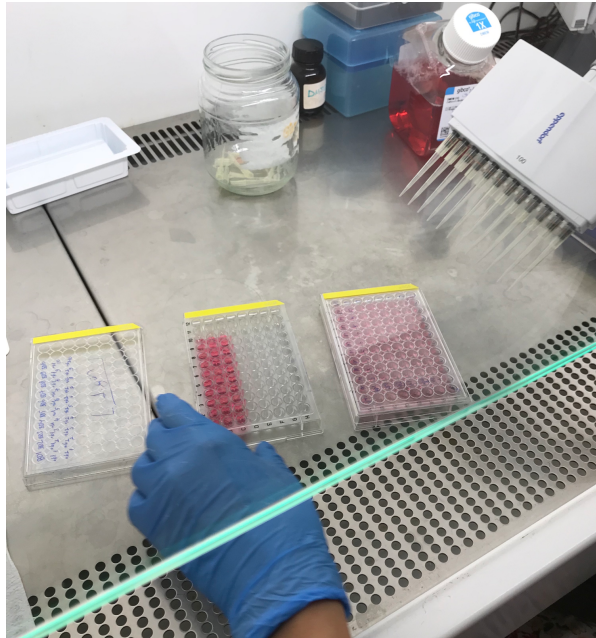
**Şekil 3.9.** Örneklerin UV ışığı altında sterilizasyonu

Sertleşme süreleri tamamlanan örnekler, eluat elde edilmek üzere, inkübatörden alınarak 96 kuyucuklu hücre kültür kabına aktarıldı (Şekil 3.10). Hazırlanan hücre kültür medyası (%10 FBS ve %1 penisilin + streptomisin içeren 1x DMEM) her bir kuyucuğa eklendi. Bu medya ile muamele edilen örnekler %5 CO<sub>2</sub> oranına sahip inkübatörde steril şartlarda 37°C’de 24 saat inkübe edildi.



**Şekil 3.10.** Örneklerin 96 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilmesi

İnkübasyon sonrası materyallerin içinde bulunduğu eluatlar pipet yardımıyla toplanarak, daha önce hücrelerin ekilmiş olduğu 96 kuyucuklu hücre kültür kabına alındı (Şekil 3.11). Hücrelerin bulunduğu hücre kültür kabına, 100 µl eluat ve 100 µl hücre medyası olacak şekilde, 1:2 konsantrasyon elde edildi.



**Şekil 3.11.** Hücre kültür medyasının örneklerin üzerine eklenmesi

### 3.5.Hücre kültürü

3T3L1 fibroblast hücreleri ATCC (Manassas, VA, ABD)'den temin edildi. Hücre kültürü çalışmaları, rutin olarak laboratuvarında uyguladığımız aseptik koşullar (37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortam) kullanılarak yapıldı. Hücre besi yeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) solüsyonu kullanıldı (Şekil 3.12).

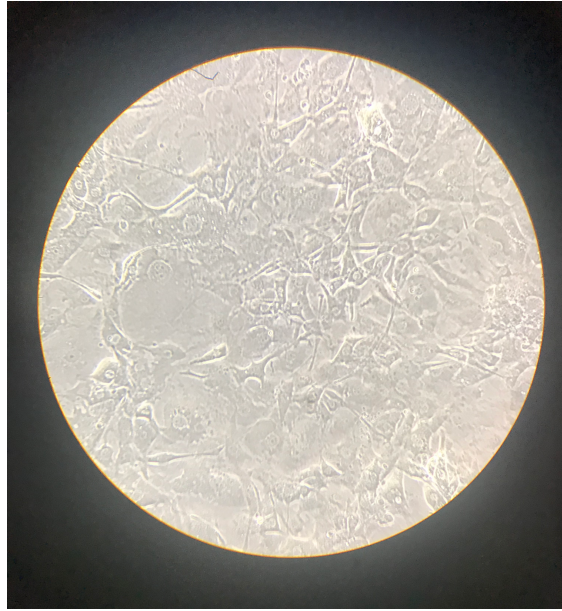


Şekil 3.12. 1x DMEM hücre kültür besi yeri

DMEM solüsyonuna %10 FBS, 100 ünite / ml penisilin ve 100 mg / ml streptomisin ilave edilerek uygun besi ortamı oluşturuldu. Oluşturulan besi yeri, kullanım süresince +4°C'de muhafaza edildi. Hücreler; T- flasklarda, %96 nem oranına sahip inkübatörde büyütüldü. Hücrelerin gelişimi, her gün mikroskop ile gözlemlendi (Şekil 3.13, Şekil 3.14) ve besi yerleri yenilendi. Steril kültür flasklarında büyütülen hücreler, %80 yoğunluğa ulaştıklarında önce 1x PBS ile yıkanarak, Tripsin-Etilen diamin tetraasetik asit (Tripsin-EDTA) yardımıyla flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve yeni flaska aktarıldı. Bu şekilde hücrelerin çoğalması sağlandı.



**Şekil 3.13.** Besiyeri içerisindeki 3T3 hücrelerinin mikroskop altında incelenmesi



**Şekil 3.14.** Materyal eluatlarına eklenmeden önce flask tabanına yapışmış durumda besiyerinde bulunan 3T3 hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü

(10X büyütme)

Hücrelerin sayımlarının yapılabilmesi için, tripan mavisi solüsyonu kullanıldı. Hücrelerin yapışıkları yüzeyden kaldırılmasıyla elde edilen hücre peleti, dondurma medyumu (1x DMEM + %20 FBS + %10 DMSO) ile karıştırılarak hücrelerin dondurulması sağlandı. Ardından 2 ml'lik steril cryo tüplere aktarılarak kademeli olarak donduruldu ve sıvı azot tankının içerisinde saklandı.

### **3.6.Sitotoksitenin değerlendirilmesi**

Bu çalışmada hücre canlılığının değerlendirilmesi bir tetrazolyum tuzu olan MTT testi ile yapılmıştır. Bu tuz canlı olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimine özgüdür ve bu enzimin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak su ile çözünmeyen formazan tuzları oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu oluşum sadece aktif mitokondrisi olan canlı hücrelerde görülmektedir ve suda çözünmeyen formazan kristallerinin DMSO ile çözülerek spektrofotometrede ölçülmesi ile elde edilen değer canlı hücre sayısını göstermektedir.

MTT ayırıcı ışığa duyarlı olduğundan dolayı deneyler doğrudan ışık almayacak şekilde gerçekleştirildi.

3T3L1 hücrelerinin yer aldıkları flaskın yüzeyinden kaldırılmalarının ardından, oluşan hücre süspansiyonu santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Pelet, 1x DMEM'de resüspanse edildi. Resüspanسیون işleminin ardından, 96 kuyucuklu hücre kültür kabına, 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi ve inkübatörde 37°C sıcaklıkta gece boyu bekletildi.

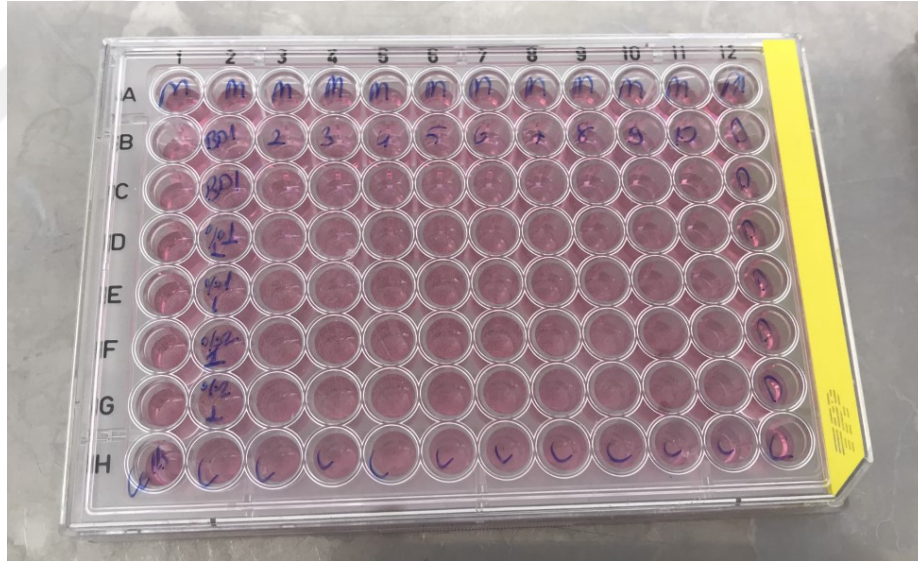
Bu esnada MTT testinde kullanılmak üzere, oluşturulan örneklerin her birinin 200 µl DMEM solüsyonunda bekletilmesi sonucu eluatlar elde edildi. Deney için her kuyucuktaki hücre 200 µl besiyerinde süspanse edildi.

İkinci gün 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 100 µl besiyeri ve 100 µl eluat olmak üzere MTT analizine uygun şekilde yerleştirildi ve 24 saat boyunca inkübasyonu sağlandı. Hücre kültür kabının yerleşim planlaması Şekil 3.15 'te gösterilmiştir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA	MEDYA
B	KONTROL	BD-1	BD-2	BD-3	BD-4	BD-5	BD-6	BD-7	BD-8	BD-9	BD-10	DMSO
C	KONTROL	BD-1	BD-2	BD-3	BD-4	BD-5	BD-6	BD-7	BD-8	BD-9	BD-10	DMSO
D	KONTROL	%1-1	%1-2	%1-3	%1-4	%1-5	%1-6	%1-7	%1-8	%1-9	%1-10	DMSO
E	KONTROL	%1-1	%1-2	%1-3	%1-4	%1-5	%1-6	%1-7	%1-8	%1-9	%1-10	DMSO
F	KONTROL	%2-1	%2-2	%2-3	%2-4	%2-5	%2-6	%2-7	%2-8	%2-9	%2-10	DMSO
G	KONTROL	%2-1	%2-2	%2-3	%2-4	%2-5	%2-6	%2-7	%2-8	%2-9	%2-10	DMSO
H	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL	KONTROL

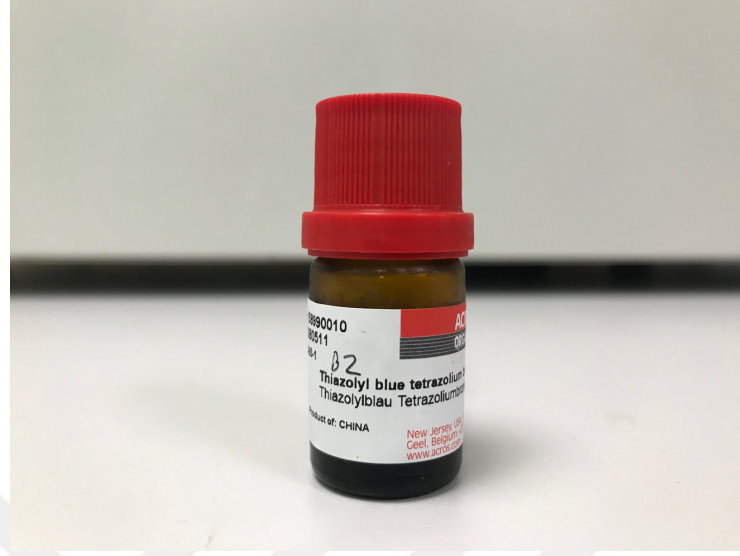
**Şekil 3.15.** Bu çalışma için MTT testi öncesi 96 kuyucuklu hücre kültür kabının yerleşim planlaması



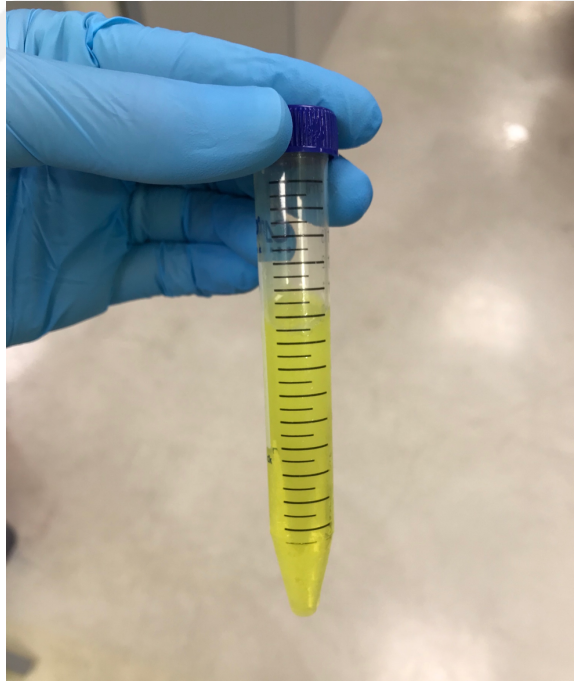
**Şekil 3.16.** MTT testi öncesi materyallerden elde edilen eluatların ve hücrelerin önceden oluşturulmuş yerleşim planı dahilinde hücre kültür kabına eklenmesi

Üçüncü gün 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her kuyucuğuna 5 mg / ml şekilde PBS içerisinde hazırlanan MTT solüsyonundan (Acros Organics, ABD) (Şekil 3.17, Şekil 3.18) 50 µl eklenmiştir ve 4 saat inkübatörde bekletildikten sonra,

üzerlerine 100 µl DMSO eklenip formazan kristalleri çözülerek, spektrofotometre ile 570 nm’de ölçümü yapıldı (BioTek Instruments, ABD) (Şekil 3.19, Şekil 3.20).

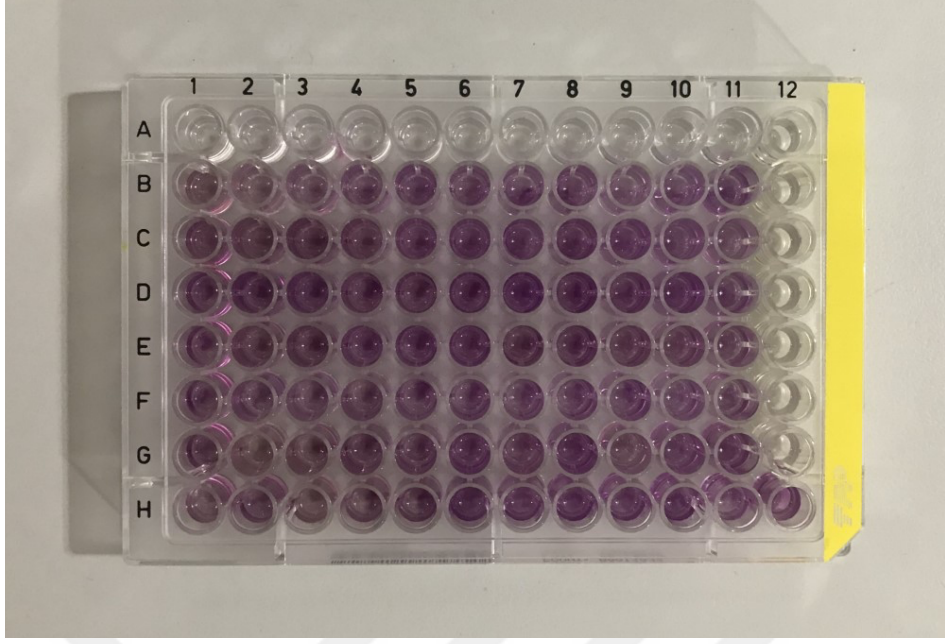


**Şekil 3.17.** MTT solüsyonun hazırlanmasında kullanılan %98’lik tiyazol blue tetrazolyum bromid

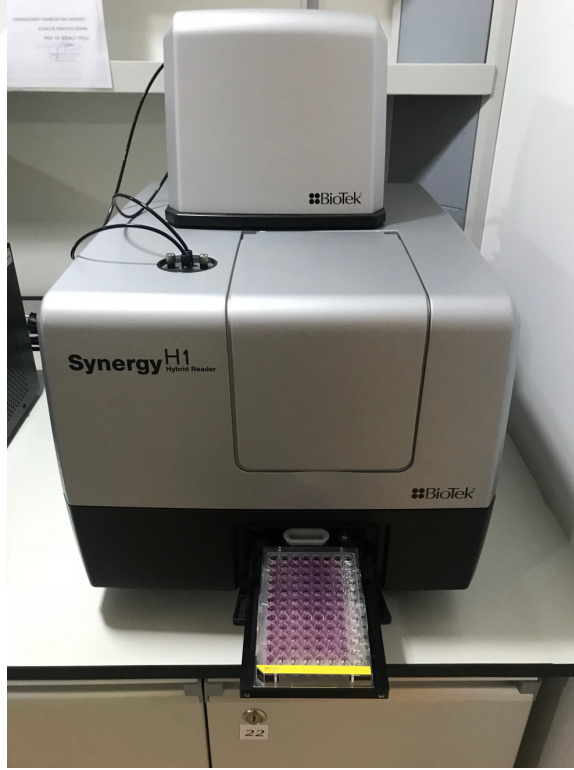


**Şekil 3.18.** MTT solüsyonun hazırlandıktan hemen sonraki görüntüsü





**Şekil 3.19.** Kuyucuklara MTT solüsyonu eklendikten sonra hücre kültür kabının görüntüsü



**Şekil 3.20.** Optik yoğunluğun ölçümünde kullanılan spektrofotometrik okuyucu

Her bir madde için ölçüm en az 2 kere tekrar edildi ve ulaşılan optik yoğunluk değerleri, kontrol medyumunun optik yoğunluk değeriyle kıyaslanarak konsantrasyona bağlı karşılaştırma yapıldı. Kontrol medyumunun göstermiş olduğu optik yoğunluk değerinin, %100 hücre canlılığını ifade ettiği varsayıldı. Bunun sonucunda rölatif yüzde hücre canlılığı tespit edildi.

### **3.7. Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Değerlendirme**

%99 güven aralığında, %5 duyarlılığa sahip olacak şekilde basit tesadüfi örnekleme yöntemi kullanılarak, örnek büyüklüğü belirlendi.

Tüm istatistiksel analizler için bir bilgisayar paket programı kullanıldı (SPSS, Windows 21.0). Ölçüme dayalı verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile araştırıldı. Materyal sitotoksitelerini gösteren, yüzde hücre canlılığı değerleri normal dağılıma uygunluk göstermediğinden bu veri türüne parametrik olmayan testler uygulandı. Veriler ortanca (%25-%75) olarak verildi.

Gün bazında gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız gruplarda Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney-U testi, bağımlı gruplarda ise Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Grup içi günler arası karşılaştırmalarda Friedman testi, Wilcoxon testi ve Bonferroni Düzeltmeli Wilcoxon testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlendi (Bonferroni Düzeltmeli testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi ise “ $p < 0,05 /$  karşılaştırma sayısı” olarak belirlendi).

## 4. BULGULAR

Bu araştırmada ağırlıkça farklı y%zdelerde (%1 ve %2) biyoaktif cam nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş Biodentine materyalinin sitotoksik özellikleri değerlendirildi.

### 4.1. Materyal Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular

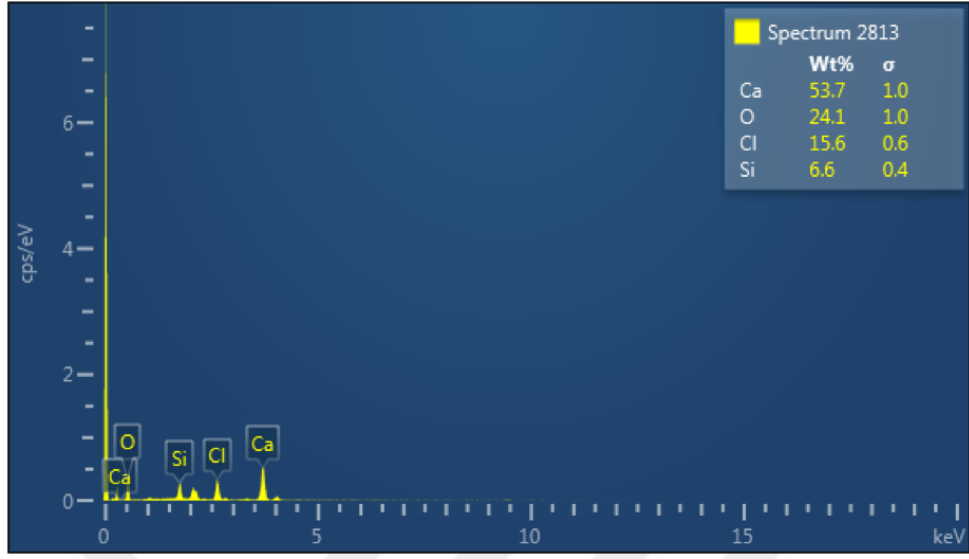
Biodentine ve biyoaktif cam materyallerinin kompozisyonları hakkındaki veriler Tablo 4.1' de gösterilmiştir.

Materyal	Kompozisyon
Biodentine	3CaO.SiO <sub>2</sub> , 2CaO.SiO <sub>2</sub> , CaCO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub>
Biyoaktif cam	58 mol. % SiO <sub>2</sub> , 40 mol. % CaO, 5 mol. % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

**Tablo 4.1.** Çalışmada kullanılan materyallerin kompozisyonları

#### 4.1.1. SEM-EDX Bulguları

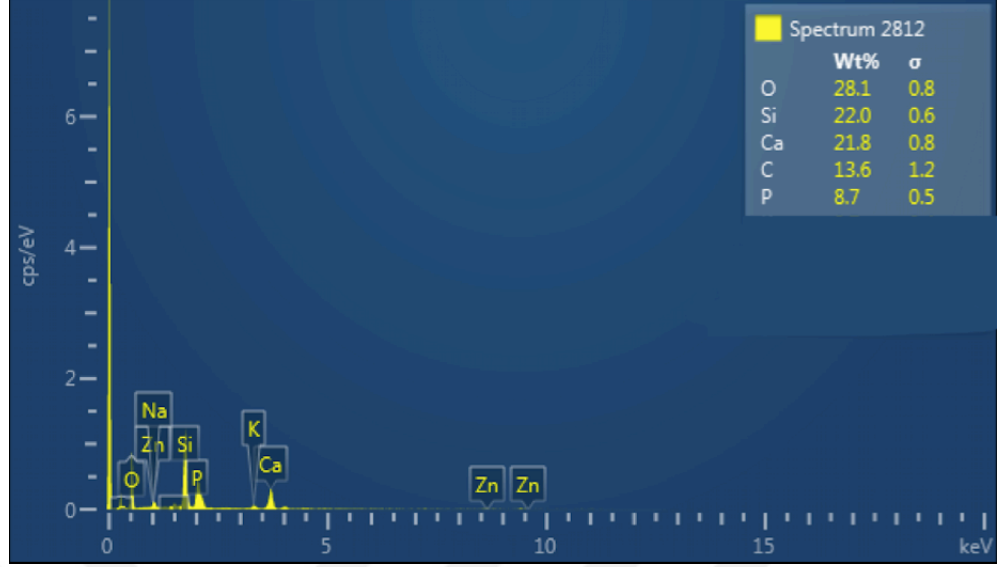
Biodentine, biyoaktif cam ve ağırlıkça farklı y%zdelerde biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyallerinin SEM-EDX grafikleri (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4) ve elemental içeriklerinin ağırlıkça yüzde değerlerinin gösterildiği tablolar (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları

Elemental İçerik	Ağırlıkça Yüzde (%)
Kalsiyum	53,7
Oksijen	24,1
Klor	15,6
Silikon	6,6

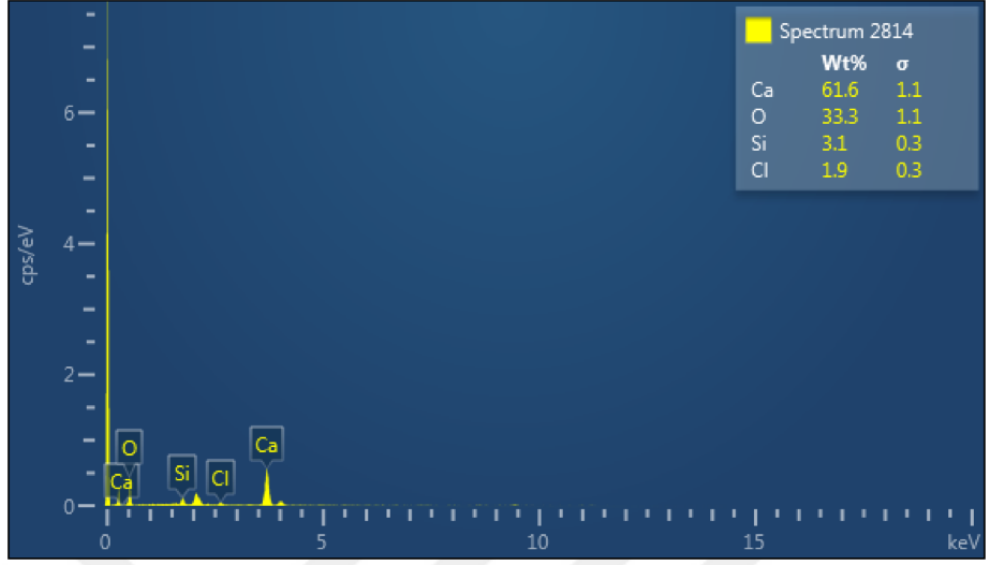
**Tablo 4.2.** Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri



**Şekil 4.2.** Biyoaktif cam materyaline ait SEM-EDX bulguları

Elemental İçerik	Ağırlıkça Yüzde (%)
Oksijen	28,1
Silikon	22,0
Kalsiyum	21,8
Klor	13,6
Fosfor	8,7

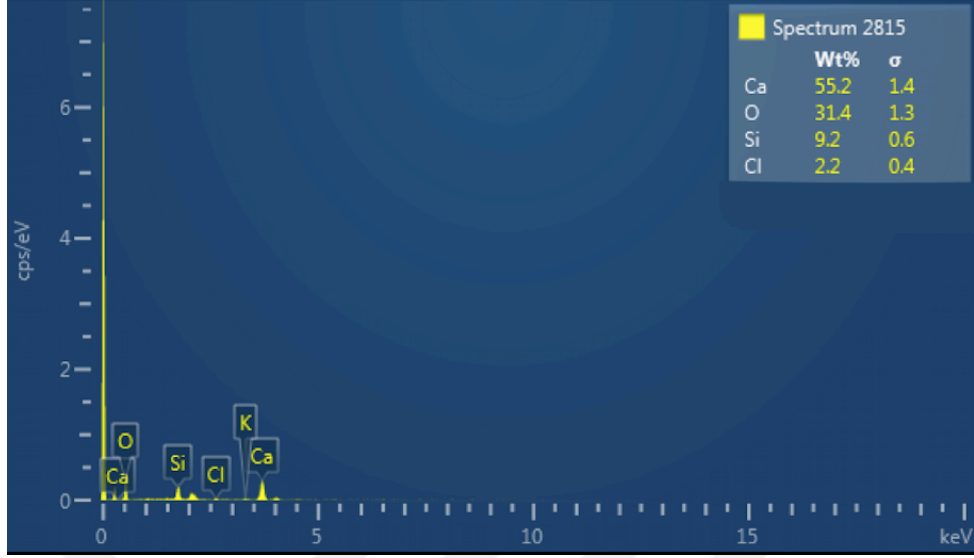
**Tablo 4.3.** Biyoaktif cam materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri



**Şekil 4.3.** Ağırlıkça %1 biyoaktif cam materyali ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları

Elemental İçerik	Ağırlıkça Yüzde (%)
Kalsiyum	61,6
Oksijen	33,3
Silikon	3,1
Klor	1,9

**Tablo 4.4.** Ağırlıkça %1 biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri



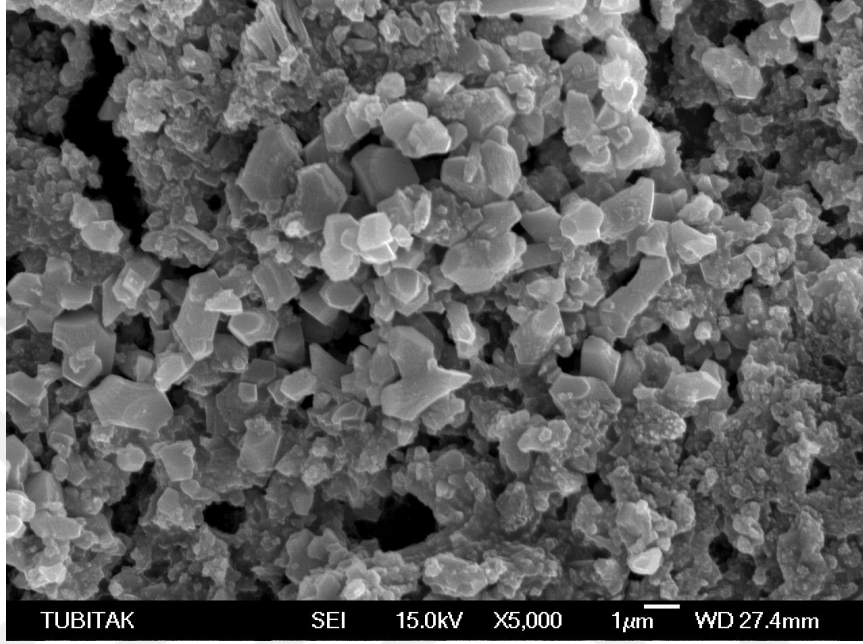
**Şekil 4.4.** Ağırlıkça %2 biyoaktif cam materyali ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX bulguları

Elemental İçerik	Ağırlıkça Yüzde (%)
Kalsiyum	55,2
Oksijen	31,4
Silikon	9,2
Klor	2,2

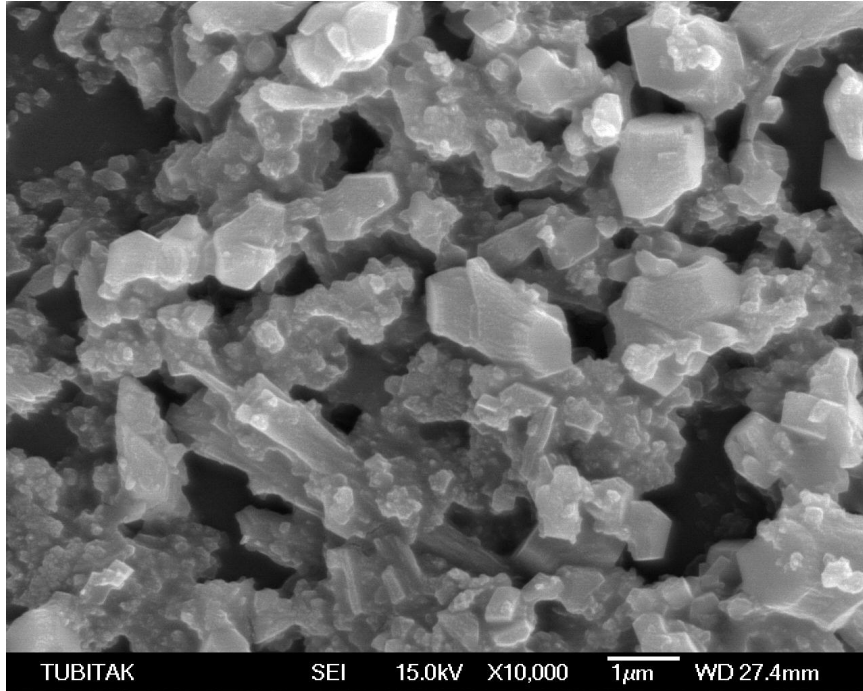
**Tablo 4.5.** Ağırlıkça %2 biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyaline ait SEM-EDX analizi sonucu elde edilen elemental içerik ve yüzdeleri

#### 4.1.2. SEM Analizi Görüntüleri

Biodentine, biyoaktif cam ve ağırlıkça farklı yüzdelerde biyoaktif cam ile modifiye edilmiş Biodentine materyallerinin ait SEM analizi görüntüleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

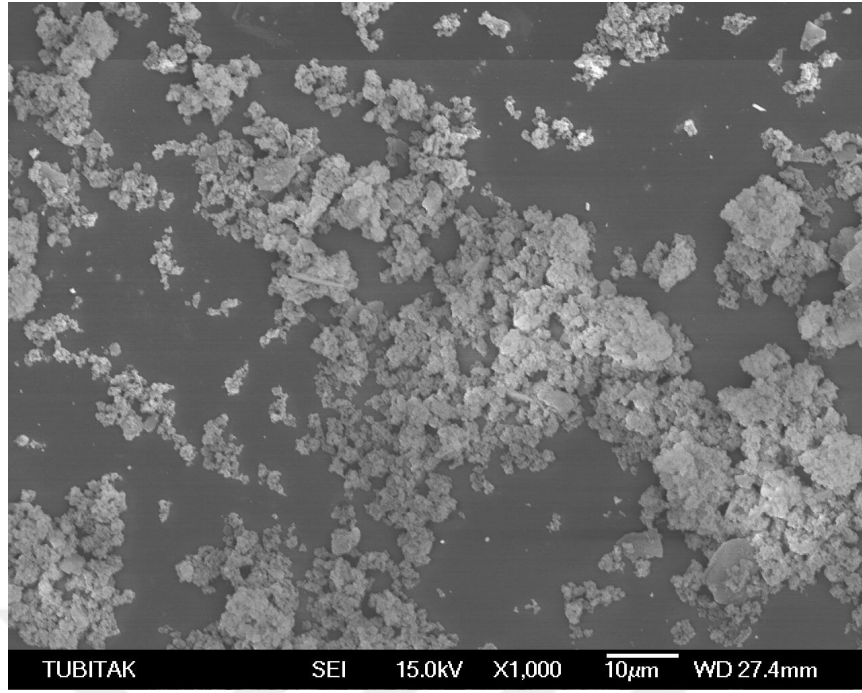


Şekil 4.5. Biodentine materyalinin SEM görüntüsü (X5,000)

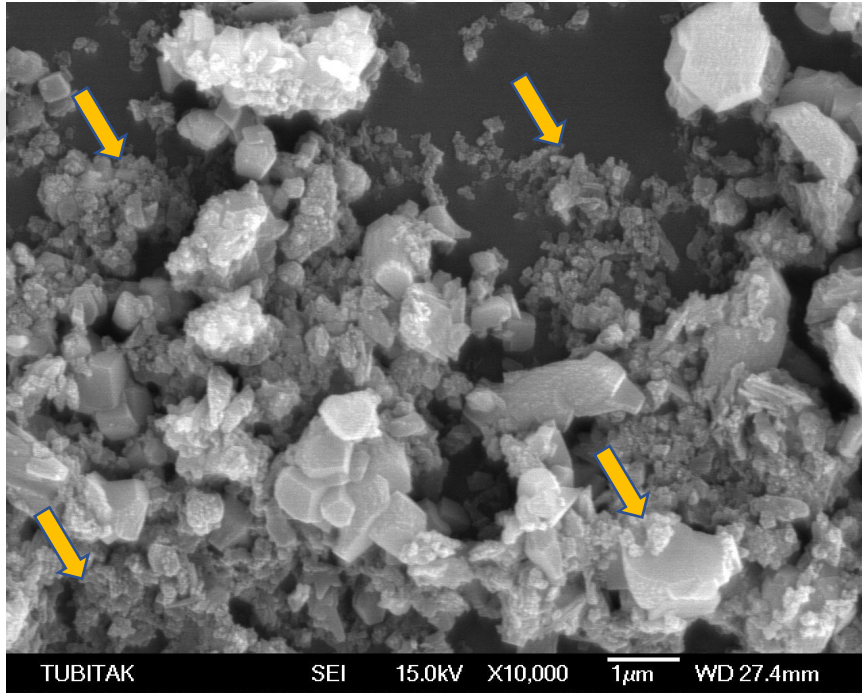


Şekil 4.6. Biodentine materyalinin SEM görüntüsü (X10,000)



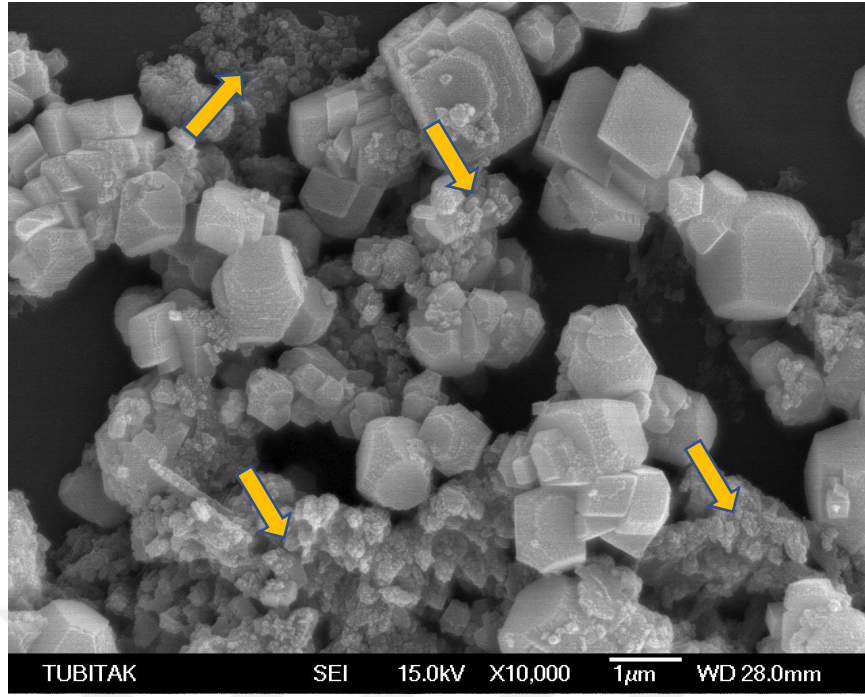


Şekil 4.7. Biyoaktif cam nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (X1,000)



Şekil 4.8. Ağırlıkça %1 biyoaktif cam nanopartikülleriyle modifiye edilmiş Biodentine materyalinin SEM görüntüleri (X10,000)

\*Ok ile işaretli alanlarda biyoaktif cam partikülleri izlenmektedir.

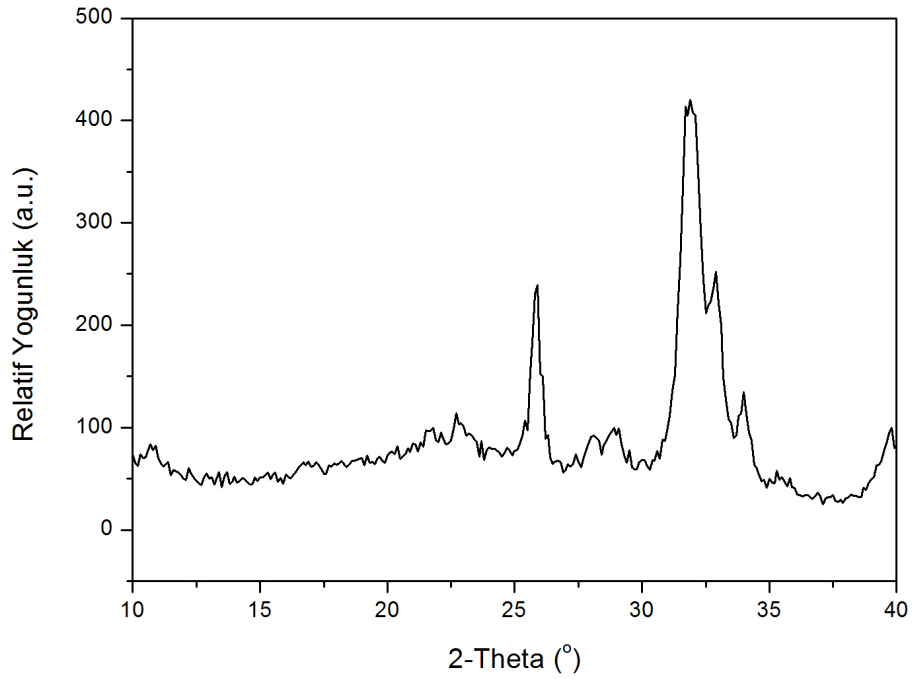


**Şekil 4.9.** Ağırlıkça %2 biyoaktif cam nanopartikülleriyle modifiye edilmiş Biodentine materyalinin SEM görüntüleri (X10,000)

\*Ok ile işaretli alanlarda biyoaktif cam partikülleri izlenmektedir.

### 4.1.3. XRD Analizi Bulguları

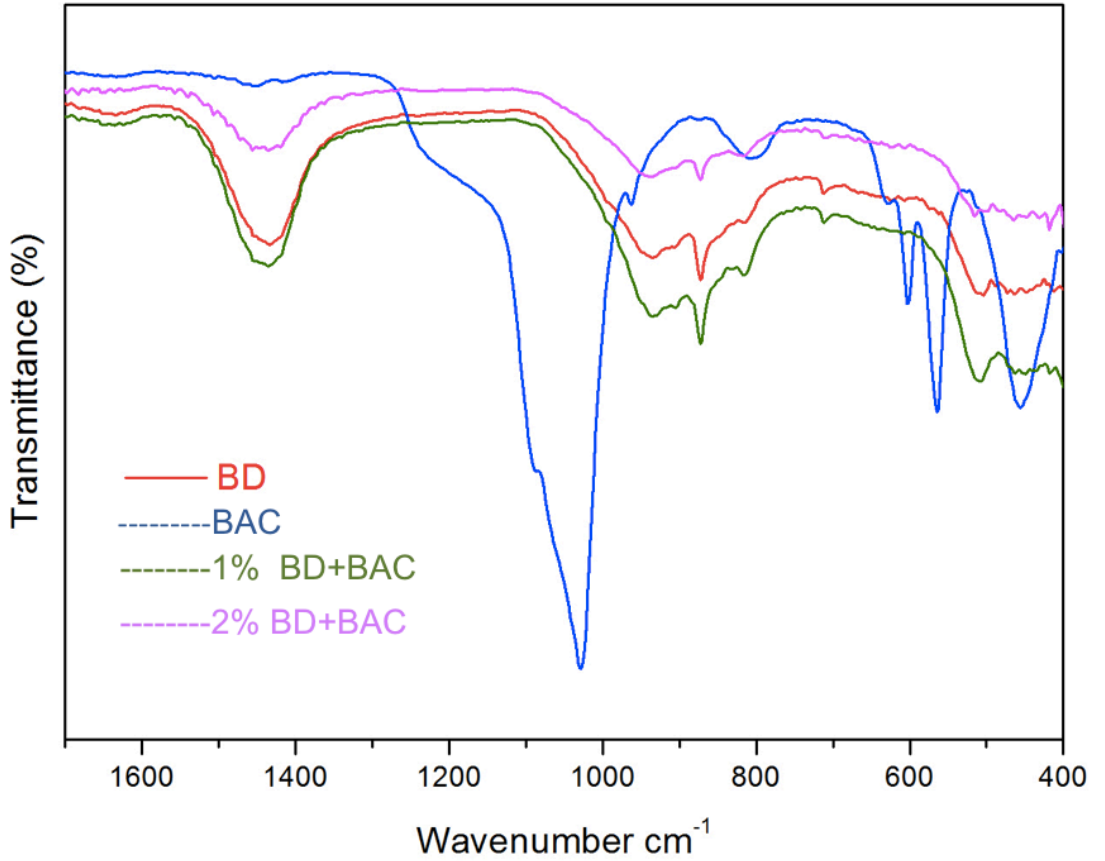
XRD, her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağı olarak X-ışınları karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Elde edilen biyoaktif cam nanomateryalinin X ışını kırınım analizi incelendiğinde (Şekil 4.10) sintigrasyon ile Ca-Si-P atomlarından oluşması beklenen kristale ait kırınım pikleri 25.8, 31.8 ve 32.9 derecelerde karakteristk olarak görülmektedir. Bu analiz ile elde edilen veriler Valenzuela ve ark.'nın çalışmasındaki veriler ile doğrulanmaktadır [119].



Şekil 4.10. Biyoaktif cam materyalinin XRD analizi

#### 4.1.4. FTIR Analizi Bulguları

FTIR; moleküllerin titreşme ve dönme düzeylerinin uyarılması ile meydana gelen soğurma bölgelerinin kayda geçirilmesi ile elde edilir. Çalışmada değerlendirilen materyallerin FTIR analizi Şekil 4.11’ de görülmektedir. Burada yapı içerisinde bulunan Ca, Si, P ve O atomlarının yaptığı bağların soğurma bandları mevcuttur. Buna göre  $1095\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen pik Si-O-Si bağına ait titreşim bandı,  $959\text{ cm}^{-1}$ ’de ise Si-O-Ca bağına ait titreşim bandları gözlenmektedir. Grafikte izlenen  $1028\text{ cm}^{-1}$ ’deki titreşim bandı ve  $602\text{ cm}^{-1}$ ,  $565\text{ cm}^{-1}$ ’deki çift bantlar fosfat gruplarının esneme titreşimleri ile meydana gelmiştir.  $1600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında gösterilmiştir. Biodentine ve modifiye Biodentine materyallerinin (%1 ve %2 biyoaktif cam içeren Biodentine) spektrumları, birbirine yakın pik değerleri gösteren bantlar sunmuştur. Bu veriler Xia ve ark.’nın çalışmasındaki veriler ile örtüşmektedir. [120]



Şekil 4.11. Çalışmada kullanılan materyallerin FTIR analizi

\*(BD: Biodentine, BAC: Biyoaktif cam)

#### 4.2. Farklı Materyal Eluatlarının, Sertleşme Sürelerinin ve Hücre Muamele Sürelerinin Hücrelere Olan Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılmasına ait Bulgular

Farklı materyal eluatlarının sitotoksosite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. ( $p>0,05$ )

Sertleşme sürelerine göre sitotoksosite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. ( $p<0,05$ )

Hücreyle muamele süresine göre sitotoksosite düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. ( $p<0,05$ )

**Tablo 4.6.** Yüzde (%) hücre canlılığı değerlerinin gruplara göre dağılımı

ZAMAN	GRUPLAR					
	BD		BD + %1		BD + %2	
	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT
1. GÜN	46,40 (41,63- 53,39)	58,46 (50,31- 65,68)	46,11 (41,22- 52,09)	57,65 (49,64- 65,56)	45,11 (37,70- 55,12)	54,04 (49,43- 66,78)
3.GÜN	72,58 (64,20- 77,94)	86,33 (80,52- 89,46)	74,04 (65,22- 75,87)	81,69 (76,92- 83,46)	72,12 (66,81- 79,67)	80,99 (75,37- 83,28)
7.GÜN	75,96 (67,76- 81,80)	89,15 (78,05- 95,58)	73,39 (64,80- 80,97)	84,67 (75,61- 91,50)	74,71 (70,24- 76,31)	83,49 (70,32- 94,87)

\*Veriler ortanca (%25-%75) olarak verildi.

**Tablo 4.7.** Hücre canlılığı değerleri için gruplar arası karşılaştırmalar

KARŞILAŞTIRMA	GÜNLER					
	p değeri					
	1.GÜN		3.GÜN		7.GÜN	
	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT
(BD)-(BD+%1)	0,853	0,912	0,912	0,190	0,684	0,280
(BD)-(BD+%2)	0,650	0,880	0,940	0,143	0,912	0,290
(BD+%1)-(BD+%2)	0,545	0,940	0,684	0,529	0,650	0,739

\*:  $p < 0,016$  ise İstatistiksel olarak anlamlı fark var.  
Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi

**Tablo 4.8.** Grup içi günler arası karşılaştırmalar

KARŞILAŞTIRMA	GRUPLAR					
	p değeri					
	BD		BD + %1		BD + %2	
	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	24 SAAT	48 SAAT
1. GÜN-3.GÜN	<b>0,005*</b>	0,037	<b>0,005*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,005*</b>
1.GÜN-7.GÜN	<b>0,007*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,007*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,007*</b>	<b>0,005*</b>
3.GÜN-7.GÜN	0,575	<b>0,005*</b>	0,878	0,386	0,799	0,878

\*:  $p < 0,016$  ise İstatistiksel olarak anlamlı fark var.  
Bonferroni Düzeltmeli Wilcoxon testi

**Tablo 4.9.** Grup içi 24 saat – 48 saatlik hücreyle muamele süreleri arası karşılaştırmalar

ZAMAN	GRUPLAR		
	p değeri		
	BD	BD + %1	BD + %2
1. GÜN	0,019*	0,019*	0,041*
3.GÜN	0,001*	0,034*	0,023*
7.GÜN	0,070	0,052	0,315

\*:  $p < 0,05$  ise İstatistiksel olarak anlamlı fark var.  
Wilcoxon testi istatistiksel olarak anlamlı fark var.

Yukarıda verilen sonuçların detaylı açıklaması aşağıda detaylandırılmıştır;

Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD grubunda farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda, sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Üç gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Hücreyle muamele süresi 48 saat olan BD grubunda farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p < 0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3. gün ve 7. gün gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu deney grubunda da 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD + %1 BAC materyalinde farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3. gün ve 7. günden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). BD grubunda olduğu gibi BD+%1 BAC

grubu içinde 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).

Hücreyle muamele süresi 48 saat olan BD + %1 BAC grubunda farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3. gün ve 7. gün gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Daha önce bahsedilen gruplarda olduğu gibi bu deney grubunda da 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p<0,05$ ).

Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD + %2 BAC grubunda farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3. gün ve 7. günden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sertleşme süresi 3 gün ve 7 gün olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).

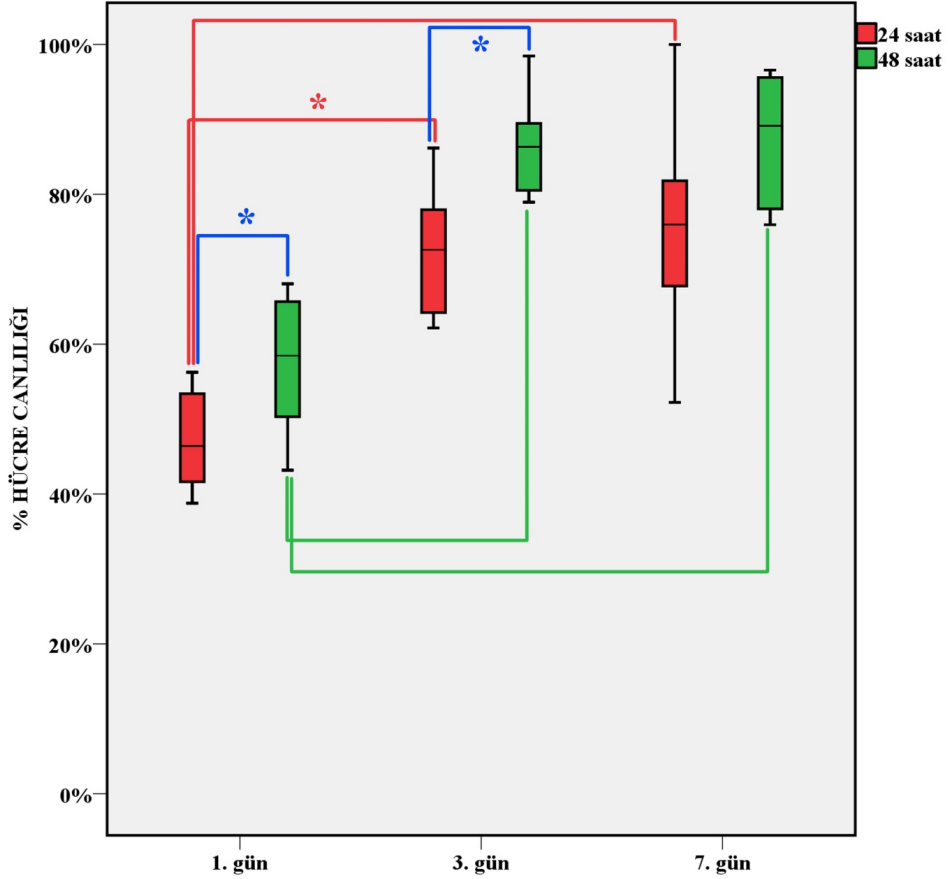
Hücreyle muamele süresi 48 saat olan BD + %2 BAC grubunda farklı sertleşme süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Anlamlılığın hangi günden kaynaklandığının tespiti için yapılan test sonucunda sertleşme süresi 1 gün olan grubun sitotoksisite düzeyi, 3. gün ve 7. gün gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu deney grubu için de sertleşme süresi 3 gün ve 7 gün olan deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sertleşme süresi 1 gün olan BD grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD materyalinin sitotoksisite düzeyi, muamele süresi 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Sertleşme süresi 3 gün olan BD grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD grubunun sitotoksisite düzeyi, muamele süresi 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.



Sertleşme süresi 7 gün olan BD grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).



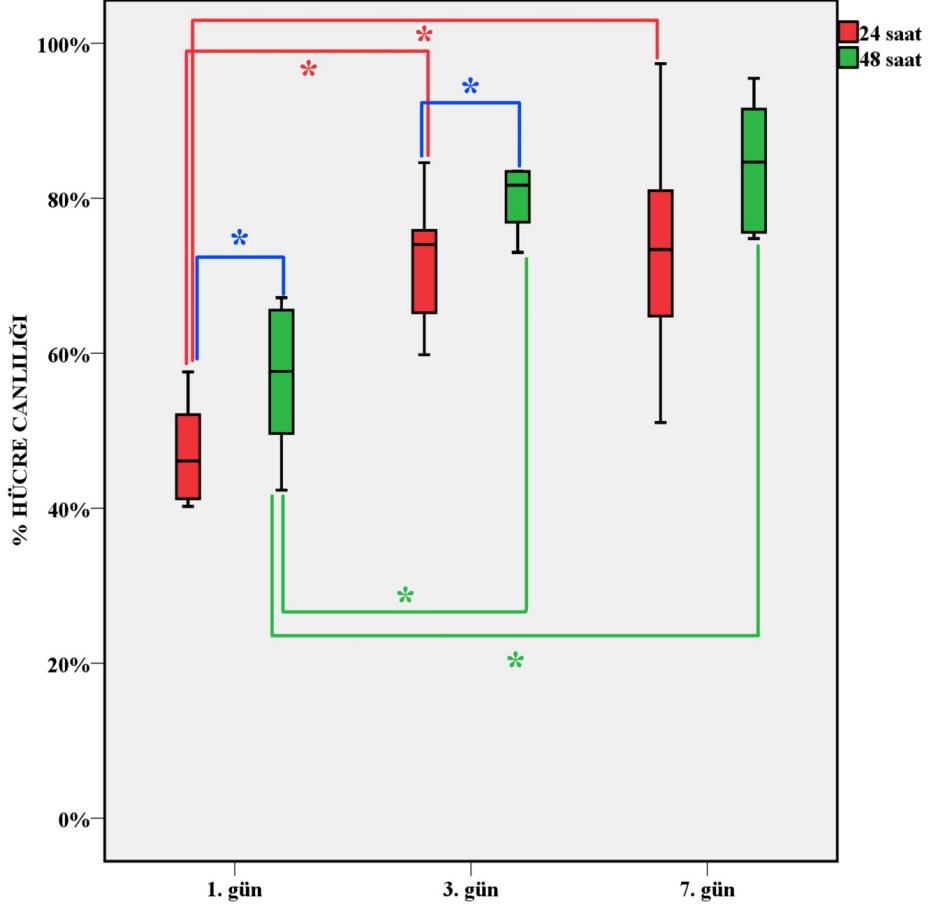
**Şekil 4.12.** Biodentine (BD) materyal grubuna ait kutu grafiği

\*\*\* Blokları birleştiren renkli çizgiler grupları temsil eden bu bloklar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Sertleşme süresi 1 gün olan BD + %1 BAC grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD + %1 BAC grubunun sitotoksosite düzeyi, 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Sertleşme süresi 3 gün olan BD + %1 BAC grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Muamele süresi 24 saat olan BD + %1 BAC grubunun sitotoksosite düzeyi, 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Sertleşme süresi 7 gün olan BD + %1 BAC grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.13.** Ağırlıkça %1 biyoaktif cam içeren Biodentine (BD + %1 BAC) materyal grubuna ait kutu grafiği.

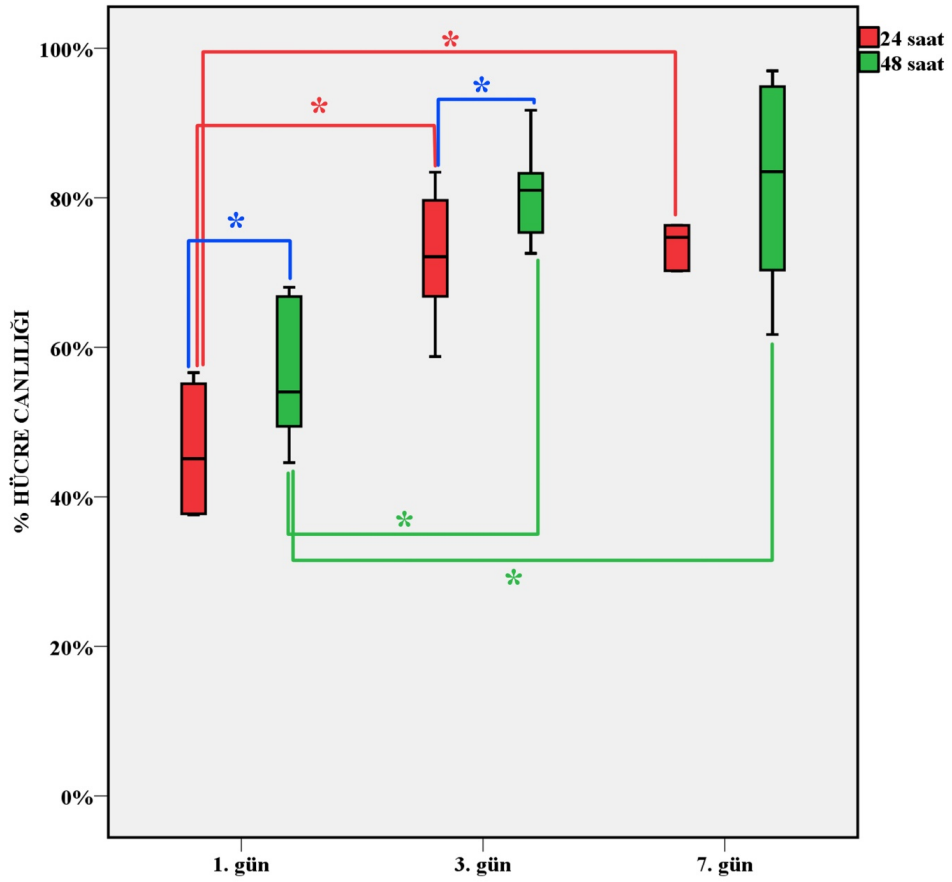
\*\*\* Blokları birleştiren renkli çizgiler grupları temsil eden bu bloklar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Sertleşme süresi 1 gün olan BD + %2 BAC grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD + %2 BAC grubunun sitotoksosite düzeyi, 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sertleşme süresi 3 gün olan BD + %2 BAC grubu için; hücreyle muamele

süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Hücreyle muamele süresi 24 saat olan BD + %2 BAC grubunun sitotoksosite düzeyi, 48 saat olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Sertleşme süresi 7 gün olan BD + %2 BAC grubu için; hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.14.** Ağırlıklıça %2 biyoaktif cam içeren Biodentine (BD + % 2 BAC) grubuna ait kutu grafiği

\*\*\* Blokları birleştiren renkli çizgiler grupları temsil eden bu bloklar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan biyomateryallerin etkilerini daha iyi gösterebilmenin en önemli gerekliliği uygulandıkları alandaki ev sahibi dokuyla biyoyum göstermeleridir [121, 122]. Biyomateryallerin klinik başarısı, gerekli hücre ve doku cevabının üretilmesine olanak sağlama kabiliyetlerine bağlıdır [66].

Apikal cerrahi sonrası yapılan kök ucu dolgusu gibi doku ile temasa izin veren uygulamalarda kesin başarı, kesik kök ucu yüzeyinin üzerini örten fonksiyonel periodontal ataşman bağlantısının rejenerasyonuna dayanır [123]. Bu hedefe ulaşma yolunda tavsiye edilen biyomateryalin, sadece bakteri ve bakteri ürünlerinin geçişini önlemekle kalmayıp, aynı zamanda yüzeyinde normal periodonsiyum gelişimine izin vermesi gerekir [66]. İdeal olarak, biyomateryal neme geçirgen, koroziv, toksik olmamalı; antibakteriyal, manipülasyonu ve adaptasyonu kolay, radyoopak ve en önemlisi biyoyumlu olmalıdır [124, 125].

Dental materyallerin biyoyumluluğu, önemli bir enflamatuar cevaba yol açmadan iyileşmeye olanak sağlaması için gereklidir. Biyoyumlu materyal, herhangi bir enflamatuar cevaba neden olmadan düşük toksisite göstermelidir [126].

Diş hekimliğinde, özellikle dentin, pulpa, periodontal ve periapikal dokular ve oral mukoza gibi canlı dokularla uzun süre temasta kalan materyallerin, klinik uygulamasına geçilmeden evvel çevre dokularda oluşturabileceği zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerekir [127, 128].

Biyolojik testlerin yapılabilmesi için birçok aşama ve bunlarla uyumlu test yöntemleri belirlenmiştir. Başlangıç testleri, *in vitro* olarak toksisite metotlarıyla materyalin toksik karakterini göstermeyi hedeflemektedir. İkincil testlerde, materyalin doku içine implante edilmesi sonrası lokal doku cevabı değerlendirilmektedir. Final aşama ise materyalin esas kullanım alanındaki klinik performans etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır [129, 130].

Başlangıç testlerinden sayılan sitotoksosite testi, biyoyumluluğun değerlendirildiği *in vitro* testlerin sık kullanılan bir çeşididir. Sitotoksosite testi, materyallerin toksik etkisi konusunda değerli bilgiler veren basit, hızlı, yinelenabilir ve ucuz bir test yöntemidir [131, 132].

Son yıllarda tercih edilen yöntemlerden olan hücre kültürü test yöntemleri, diş hekimliği alanında kullanılan materyallerin biyolojik uyumlulukları hakkında bilgi vermektedir [133, 134]. Bu testler, bireysel etkenlerden etkilenmemeleri, yinelenabilir olmaları, kolay kontrol edilebilmeleri, test edilecek materyallerin kıyaslanmasına izin vermeleri sebebiyle tercih edilmektedir [127]. Bu çalışmada da, biyoaktif cam nanoparçacıklarıyla modifiye edilen Biodentine örneklerinin sitotoksiteleri, *in vitro* şartlarda hücre kültürü yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Biyouyumluluk değerlendirme prosedürlerinde tercih edilen değerlendirme yönteminin yanında seçilen hücre tipi de önemli bir yer tutmaktadır. Kullanılabilecek hücreler, primer ve devamlı olarak ikiye ayrılan dokulardan elde edilebilen hücre tipleridir [135]. Devamlı hücre kültürleri; elde edilme kolaylığı, hızlı üremeye olanak verme ve uzun süre yaşatılabilme gibi avantajlara sahiplerdir. Aynı zamanda deney süresince genetik değişim söz konusu olmadığından, sonuçların standardizasyonu rahatlıkla sağlanabilmektedir [135]. Primer hücre kültürüne göre üstünlüklerinden dolayı, çalışmamızda devamlı hücre kültürlerinin kullanımı uygun bulunmuştur.

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, dental materyallerin sitotoksik özelliklerini değerlendirmek amacıyla insan gingival fibroblastları [64, 136-138], fare fibroblastları [65, 139-141] ve osteoblastlar [142-145] kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda, dezavantajları minimuma indirmek amacıyla insan gingival fibroblastları ile fare fibroblastlarının kombine kullanıldığı da göze çarpmaktadır. Eldeniz ve ark., çeşitli kanal patlarının sitotoksik özelliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında insan gingival fibroblastları ve L-929 fare fibroblastlarını kullanmışlardır [146].

Dental materyallerinin biyoyumluğun değerlendirilmesinde, başlangıç sitotoksite incelemelerinde, L-929 ve 3T3 fare fibroblastları çok sık tercih edilmektedir. Bunun sebebi kolay bulunabilmeleri, çoğalmalarının kolay sağlanabilmesi ve biyolojik yanıtlarıdır [147, 148]. Bunun yanında fibroblastlar, bağ dokusunun ana bileşenleri ve periodontal ligamanın baskın hücre tipidir. Materyaller fibroblast bakımından zengin dokular ile yakın temas halinde olacağından, bir fibroblast hücre hattının kullanılması uygundur [139].

Kalsiyum silikat bazlı materyaller ile bazı dental materyallerin

biyoyumluluğunu karşılaştıran bir araştırmada L-929 fibroblast hattı kullanılmıştır. Yüksek elastikiyete sahip MTA ve MTA'nın sitotoksosite ve biyomineralizasyonlarının değerlendirildiği bir araştırmada L-929 hücre türü tercih edilmiştir [149].

MTA ve Biodentine'nin sitotoksitesinin karşılaştırıldığı bir araştırmada, 3T3 fibroblast hattı tercih edilmiştir [65]. Üç boyutlu hücre kültür modeli kullanılarak MTA ve Biodentine'nin biyoyumluluğunu karşılaştıran bir çalışmada, kolay kullanımı ve hızlı gelişimi sebebiyle 3T3 fibroblastları tercih edilmiştir [139].

Bu tez çalışmasında, hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Mosmann tarafından ilk kez uygulanan bu test, hücre canlılığının değerlendirilmesi açısından sık kullanılan pratik bir metottur [147, 150]. Bu testin ana bileşeni olan MTT, hücrelere absorbe olma yeteneği olan, mitokondri ile ilişkili bir tepkime sonucu, suda çözünmeyen ve renkli formazana indirgenen kimyasal bir maddedir [150].

MTT testinin temeli, mitokondriyal dehidrogenaz enziminin canlı hücrelerde, sarı renkli suda çözünebilir bir maddeyi, koyu mavi renkli formazan kristallerine dönüştürme kabiliyetine dayanır [151]. Oluşan formazan kristallerinin miktarı, canlı hücre sayısı ile direkt orantılıdır [152]. Formazan kristallerinin hücre kültür ortamında çözünebilir olması, çözünme prosedürlerinin ekarte edilebilmesine izin verdiği için avantaj olarak sayılır [151]. Aynı zamanda MTT testinin kolay ulaşılabilir, hassas ve basit bir yaklaşım olduğundan bahsedilmiştir [153].

Literatürde hücre canlılığının dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlı olarak MTT testi ile belirlendiği birçok çalışma mevcuttur. Biodentine, MTA ve çinko fosfat simanın biyoyumluluklarını, üç boyutlu kültür modeli kullanarak değerlendiren bir çalışmada, hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT testi tercih edilmiştir [139]. Farklı konsantrasyonlarda Biodentine örneklerinin farklı zamanlardaki hücre çoğalmalarının ve sitotoksitelerinin değerlendirildiği bir araştırmada aynı şekilde MTT metodu kullanılmıştır [69].

Biodentine ve MTA'nın osteoblast benzeri hücreler üzerindeki sitotoksitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, MTT testi kullanılmış ve araştırmacılar yöntemin sitotoksosite ve hücre çoğalmasının ölçümünde hassas ve

kullanışlı olduğundan bahsetmişlerdir [154].

Çeşitli dental materyaller üzerinde, hücre çoğalmasını ölçen farklı test yöntemlerinin hassasiyetini değerlendiren bir araştırmada, MTT testinin hücre canlılığını belirleme çalışmalarında kullanılabilir güvenli, etkili ve ekonomik bir metot olduğundan söz edilmiştir [155].

Bu konuda yapılan başka bir araştırmada, MTT metodunda kullanılan boyar maddenin hücre tarafından kısa bir zamanda parçalanabilmesi; verilerin spektrofotometrede değerlendirilebilmesinden dolayı tekrarlanabilir olması; farklı zamanlardaki araştırmaların karşılaştırılmasına olanak sağlaması sebebiyle bu yöntemin avantajlı olduğundan bahsedilmiştir [156].

Nanoteknolojinin gelişimini takiben, nano boyuttaki materyallerin diş hekimliği alanında kullanılan bazı materyallerin yapısına katılabilmesi fikri doğmuş ve bu durumun materyallerin fiziksel, estetik özellikleri ve biyouyumları üzerinde olumlu etki yapabileceğinden bahsedilmiştir [157].

Nanomateryalleri diğer materyallerden ayıran ve üstün kılan özellikleri; düşük oranlarda dahi yüksek iyon serbestleyebilme kabiliyetleri ve tanecik boyutlarının az, yüzey alanlarının fazla olması sebebiyle, aynı materyalde birden çok nanomateryalin bir arada kullanılabilmesidir [158].

Biyoaktif camlar, son yıllarda diş hekimliğinde oldukça geniş kullanım alanı bulmuş biyoseramik grubu materyallerdir. 1969 yılında Florida Üniversitesi'nde Hench tarafından tanıtılan biyoaktif camlar, silika ve fosfat esaslı olmalarının yanı sıra oldukça biyouyumlu materyallerdir. Ayrıca yapılarındaki silika gruplarının, vücut sıvılarında kalsiyum ve fosfor iyonları ile yer değiştirmesi sayesinde kemik gibi canlı dokularla kimyasal bağlantı oluşturma kabiliyeti olan bir materyal grubudur [6]. Bu kemik bağlantısının, cam yüzeyinde oluşan hidroksiapatit tabakası formasyonunun bir sonucu olduğu söylenebilir [3].

Biyoaktif camın üstün reaktif özelliğe sahip olabilmesi için silika oranının ağırlıkça belli bir oranı geçmemesi (%60) ve yüksek CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oranına sahip olması gerekir [79]. Reaktiflik özelliklerinin artırılmasının bir yolu da cam partiküllerinin tanecik boyutlarının nano seviyelere düşürülmesidir. Bu durumda materyalin

biyoaktivitesi ve aktif iyon salınımı artırılmış olur [93].

Biodentine ve cam iyonomer siman materyallerine biyoaktif cam eklenmek suretiyle, bu materyallerin biyoaktivitesini değerlendiren bir çalışmada, biyoaktif camın Biodentine'nin biyoaktivitesini geliştirdiği ve doku sıvılarıyla temas sonrası materyal yüzeyinde kristalin apatit oluşumunu tetiklediği tespit edilmiştir. Biyoaktif cam ilave edilmiş Biodentine'nin daha geniş bir yüzey alanına sahip olduğu ve dentin tübüllerinin bloke olduğu tespit edilmiştir. Bahsi geçen çalışmada Biodentine'ye ağırlıkça %1 ve %2 oranında sol-jel yöntemiyle üretilmiş biyoaktif cam ilave edilmiştir [9]. Bu tez çalışmasında da bu protokole uygun olarak Biodentine materyaline ağırlıkça %1 ve %2 oranında sol-jel yöntemiyle üretilen, nano boyutlarda biyoaktif cam ilave edilmiştir ve sitotoksikite özellikleri değerlendirilmiştir.

Biyoaktif cam üretiminde klasik yöntem ve sol jel yöntemi olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır [6]. Sol-jel yöntemiyle daha düşük ergime sıcaklığına sahip, daha homojen, daha yüksek saflıkta cam malzemelerin elde edilmesi mümkündür. Ayrıca bu yöntemin, klasik cam ergitmede kullanılan sıcaklıklardan çok daha düşük sıcaklıklarda uygulanabilmesinden dolayı, faz ayrımı ve kristalizasyonun gerçekleşmesi nedeniyle üretilmeyen bileşimler elde edilebilmektedir [87]. Bu tez çalışmasında kullanılan biyoaktif cam materyali, avantajlarından dolayı sol-jel yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında nano boyutlarda (48-96 nm) biyoaktif cam materyali kullanılmıştır. Nano boyuttaki biyoaktif camın mikron boyuttaki materyalden üstünlüğü, reaktifliğin artmış olmasıdır [159]. Nano boyutlara sahip olma durumunda materyalin yeni uygulama alanları kazanabildiği söylenebilir. Bu durumda materyal yüzeyinden daha hızlı iyon salınımı ve daha fazla miktarda protein adsorpsiyonu meydana gelmektedir. Bu etkenlerle biyoaktifliğin artırılması hedeflenmektedir. Nano boyuttaki biyoaktif cam materyalinin bir başka olumlu özelliği, materyalin vücutta dentin tübülleri gibi daha küçük boşluklara giriş sağlayabilmesidir [160].

FDA tarafından verilen onay sonrası, biyoaktif camlar biyomedikal işlemlerde kullanım alanı bulmuştur. Öncelikli olarak kemik dokunun tamiri ve yenilenmesinde kullanılan biyoaktif camlar, yapay kemik greft materyali, koklear implant materyali, doku rejenerasyonu çalışmalarında yapı iskelesi olarak



kullanılmıştır [160]. Biyoaktif camın ilk klinik uygulaması, 1986 yılında duyma kaybını gidermek amacıyla yapılan orta kulak protezinin yapım aşamasında başarılı bir şekilde kullanılmasıdır. Güncel olarak da doku mühendisliği ve rejeneratif tıp sahalarında kullanılmaya devam etmektedir [159].

Biyoaktif camlar, diş hekimliği alanında bugüne kadar yapılan birçok çalışmada yer almışlardır. Biyoaktif camların doku sıvılarında  $Si^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $PO_4^{-3}$  iyonları salınımı sonucunda apatit formasyonunun oluşması, materyalin çevre dokularda mineralizasyonu sağlayan bir araç olarak kullanılabilmesi fikrini oluşturmuştur. Bu durumda biyoaktif camlar, çürük profilaksilerinde mineralize edici ajan olarak ve ayrıca hassasiyet durumlarında açık tübüllerin tıkanması suretiyle desensitize edici ajan olarak tedavi edici değere sahip olabilir [161]. Ayrıca çalışmamızın SEM-EDX bulguları da biyoaktif cam içeriğinde  $O^-$ ,  $Ca^+$ ,  $Si^+$  ve  $P^+$  iyonlarının bulunduğunu doğrulamaktadır.

Biyoaktif cam, yüzeyinde kalsiyum fosfat tabakası oluşturma kabiliyeti ve iyi derecede biyouyumluluğu sebebiyle yüz bölgesinde yer alan kemik dokunun boşluklarının ve defektlerinin yeniden yapılandırılması amacıyla da kullanılabilir. İlaveten, dentoalveoler yapının rehabilitasyonu ve periodontal kemik desteğinin yeniden gelişimi için de kullanım alanı bulmaktadır [162]. Bu konuda yapılan bir çalışmada biyoaktif camın osteokondüktif bir yanıt oluşturduğu, osteoprojenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşümüne ve kemik proliferasyonuna katkıda bulunduğu iddia edilmiştir [163].

Ayrıca, implantoloji alanında, fikstür yüzeyine kaplanan yeterli miktarda biyoaktif cam, mukozal ya da dermal dokuları kemik dokuya bağlanmaya yarayan bir araç olarak hizmet edebilir [163, 164].

Bunun yanında, biyoaktif camlar mineral depozisyonunu indükleyerek kök kanalı içerisinde ve apikal bölgede biyolojik kapatmayı sağlamalarıyla kök kanal tedavileri uygulamalarında yer alabilirler [165].

Biyoaktif camların kemik dokuyla yapabildiği iyi bağlantı, diş sert dokularına etkilerinin araştırılmasını gündeme getirmiştir. Osteokondüktif özelliğinin bulunması diş sert dokularında da mineralizasyona yardımcı olabileceği fikrini ortaya

çıkarmıştır. Biyoaktif camların mineralizasyona katkısını değerlendiren bazı çalışmalar yapılmıştır [79, 99].

Dentin köprüsü oluşumuna katkılarını değerlendirmek amacıyla kalsiyum hidroksit ve biyoaktif cam materyalini karşılaştıran bir *in vivo* çalışmada, biyoaktif cam kullanılan grupta daha üstün bir dentin köprüsü oluşumu sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca kalsiyum hidroksit kullanılan gruba göre daha az enflamasyona sebep olduğu saptanmıştır [97].

Amputasyon materyallerinin karşılaştırıldığı, köpekler üzerinde pulpayı histopatolojik olarak değerlendiren bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, MTA ve biyoaktif cam materyalinin, formokrezol ve hidroksiapatite göre daha elverişli sonuçlar oluşturduğu sonucuna varılmıştır [96].

Bazı araştırmacılar, odontojenik farklılaşma ve dentin oluşumunun bilhassa nano boyutlarda biyoaktif cam tarafından uyarılabildiğinden bahsetmişlerdir. Bu sebeple biyoaktif cam materyalinin pulpanın tamir edilmesinde ve dentin rejenerasyonunda kullanılabileceği fikrini öne sürmüşlerdir [166].

Biyoaktif cam ve distile suyun karışımından elde edilen bir patın kullanıldığı *in vivo* çalışmada, dentin tübüllerinde sağladığı mineralizasyon ve kimyasal değişikliklerle, dişin yapısal bütünlüğüne katkıda bulunduğu söz edilmiştir. Bunun sonucunda biyoaktif camın umut vaat eden bir dolgu materyali olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır [167]. Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında vücut sıcaklığında ve yapay tükürük ortamında, biyoaktif camın apatit tabakası oluşturulabileceği gösterilmiştir [168].

Biyoaktif camların doku sıvılarıyla temasa geçtiğinde yarattığı pH artışının materyale antimikrobiyal özellik katabileceği fikriyle de birçok çalışma yapılmıştır [6, 99]. Biyoaktif camların antimikrobiyal özelliklerinin agar difüzyon testi ile değerlendirildiği bir çalışmada, biyoaktif camın *Streptococcus mutans* üzerinde etkili olduğu görüşü savunulmuştur [169].

Bu sonucun aksine kalsiyum hidroksit ve biyoaktif cam materyalinin *Enterococcus faecalis* üzerindeki etkinliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada,

rezidüel bakteri gelişimini önleme açısından kalsiyum hidroksitin biyoaktif cama göre daha üstün olduğu saptanmıştır [170].

Kompozit rezin materyallere eklenen biyoaktif camın *S. mutans*'a karşı biyofilm içindeki antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiş ve %10 ve %30 biyoaktif cam içeren örneklerde bakteri oranında etkin bir düşüş gözlenmiştir. Bunun sonucunda da biyoaktif camın antimikrobiyal özelliğine dikkat çekilmiştir [171]. 2009 yılında yapılan başka bir çalışmada biyoaktif camın, *Staphylococcus epidermis* ve *Escheria coli* mikroorganizmalarının hücre duvarlarını tahrip ederek antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir.

Biodentine materyalinin sitotoksitesini değerlendiren önceki çalışmalar incelendiğinde elde edilen veriler şu şekildedir;

Perard ve ark. Biodentine ve ProRoot MTA'nın sitotoksite değerlendirmelerinde bu iki materyalin kabul edilebilir biyolojik etkilerinin olduğundan söz etmişlerdir [172].

Biodentine'nin göstermiş olduğu yüksek biyoyum, likit kısmında yer alan kalsiyum kloritin varlığına bağlanmıştır. Bu madde sayesinde materyalden salınan kalsiyumun hücre gelişimini indüklediği savunulmuştur [173].

Bunun yanında Biodentine'nin sahip olduğu biyoyum, içeriğinde bulunan ve kendisine radyopaklık özelliğini kazandıran zirkonyum oksite de bağlanabilir. Yapılan bazı çalışmalarda; zirkonyum oksitin, MTA'nın radyopaklık özelliğini veren bizmut oksite kıyasla daha az sitotoksite gösterdiği bulunmuştur [174, 175].

Akbulut ve ark. son yıllarda üretilen kalsiyum silikat bazlı materyallerin biyoyumluluğunu değerlendirdikleri çalışmada; sitotoksitenin materyalin tipine, sertleşme süresine ve hücreyle muamele edilen eluatın konsantrasyonuna bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca 1:1 dilüsyona sahip eluatların 1:2, 1:4 ve 1:8 dilüsyona sahip eluatlara göre daha sitotoksik olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar, bu tez çalışmasının bulgularının aksine 3 günlük sertleşen Biodentine örneklerinin, 1 günlük sertleşen Biodentine örneklerine göre daha sitotoksik olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu farklılığın sebebi olarak sitotoksite belirleme yöntemi ve kullanılan hücre tipinin farklı olması düşünülebilir. Bahsi geçen çalışmada

sitotoksisite XTT test yöntemi ile belirlenmiş ve insan periodontal ligament (h PDL) hücreleri kullanılmıştır. Çalışmamızda ise MTT test yöntemi ve 3T3 hücre tipi kullanılmıştır. Ayrıca bahsedilen çalışmada hücre ile inkübasyon süreleri 3 gün olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında hücre ile muamele süreleri 24 saat ve 48 saat olarak belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır [176].

Başka bir kalsiyum silikat bazlı materyal olan MTA'nın biyoyumluluğunu değerlendiren bir çalışmada, çalışmamızın bulgularının aksine, 1 günlük sertleşen MTA'nın , 28 gün sertleşen MTA'ya göre daha biyoyumlu olduğu saptanmıştır [177]. Çalışmada osteosarkom hücreleri kullanılmış, biyoyum değerlendirmesi için hücredeki morfolojik değişimler SEM analizi ile incelenmiştir. Bulunan farklı sonuçlar, MTA ve Biodentine'nin içeriklerinin farklı olmasına, test edilen hücre tipinin farklılığına, sertleşme süresinin daha uzun olmasına ve biyoyumluluk değerlendirme yönteminin farklılığına bağlanabilir [177]. Çalışmamızın verilerine göre, 1 gün sertleşme süresine sahip Biodentine materyallerinin, 3.gün ve 7.gün sertleşme sürelerine sahip Biodentine materyallerine göre daha sitotoksik özellikte olmasını Biodentine'nin erken sertleşmesine bağlı olarak ortaya çıkan kalsiyum hidroksit ürünleri ve hidroksil iyonlarının varlığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bortoluzzi ve ark. tarafından yapılan ve pulpa revaskülarizasyon tedavisinde kullanılan Biodentine, TheraCal LC (Bisco Inc., Schamburg, ABD) ve MTA materyallerinin sitotoksisitelerinin değerlendirildiği çalışmada, kalsiyum silikat bazlı materyallerin başlangıç sitotoksisitesinin yüksek pH ile bağlantılı olabileceği savunulmuştur [67].

Küçükaya ve ark. kalsiyum silikat bazlı materyallerin sitotoksisitesini değerlendirdikleri *in vitro* çalışmada, bu tez çalışmasında da olduğu gibi örnekleri; 24, 48 ve 72 saat hücreyle muamele etmişler ve Biodentine'nin 24 saat sonra %73; 48 ve 72 saat sonra %90'nın üzerinde hücre canlılığı gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır. Bu tez çalışmasının sonucunda da bahsedilen çalışmayla paralel olarak, hücreyle muamele süresi 24 saat ve 48 saat olan materyal örnekleri karşılaştırıldığında; 24 saat muamele süresine sahip hücrelerin daha sitotoksik özellikte olduğu saptanmıştır. Bahsedilen çalışmada, Biodentine'nin 24 saat sonrası diğer zaman periyotlarına göre daha sitotoksik olmasının, kalsiyum hidroksitin erken ürününe bağlanabileceği ve ilk etapta

açığa çıkan hidroksil iyonlarının hücre canlılığını azaltabileceği söylenmiştir [66]. Bu çalışmada hPDL fibroblast hücreleri kullanılmış ve WST sitotoksosite yöntemi kullanılmıştır.

Khedmat ve ark. bu tez çalışmasının protokolüne benzer bir şekilde, MTT testi kullanarak, dört farklı kalsiyum silikat bazlı materyalin sitotoksitesini değerlendirmiştir. Çalışmada, karıştırma sonrası 24 saat, 7 gün ve 28 gün bekleme sürelerine sahip örnekler kullanılmış ve inkübasyon süresi 24 saat ve 48 saat olan iki alt grup oluşturulmuştur. Çalışma sonunda inkübasyon süresi önemsenmeksizin saklama süresinin hücre canlılığını artırdığı sonucuna ulaşımlardır. Bu sonuç bu tez çalışmasının sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Bu tez çalışmasında, örnekler 1, 3 ve 7 gün sertleşme sürelerine sahiptir ve 1 gün sertleşmeye bırakılan Biodentine ve modifiye Biodentine örneklerinin, 3. gün ve 7.gün sertleşme zamanına sahip örneklerle göre daha yüksek sitotoksosite düzeyine sahip olduğu saptanmıştır. Khedmat ve ark. bu durumu saklama süresi arttıkça materyalden salınan sitotoksik maddelerin azalmasına bağlamışlardır [178]. Bahsedilen çalışmada insan monosit hücreleri kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında, her bir materyalin 7 gün sertleşme süresine sahip örneklerinde, diğer sertleşme sürelerinden farklı olarak 24 saat ve 48 saat hücre ile muamele sürelerinin ortaya çıkardığı sitotoksik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum, belli bir sertleşme süresine sahip örneklerde hücre ile muamele sürelerinin sitotoksositeyi değiştirmeyebileceği yorumuyla açıklanabilir. Khedmat ve ark. yapmış olduğu yukarıda bahsedilen çalışmada da 7 gün ve 28 gün sertleşme sürelerine sahip Biodentine örneklerinin, 24 ve 48 saat hücre ile muamele sürelerinin ortaya çıkarmış olduğu sitotoksik özellikler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır [178].

Escobar- Garcia ve ark. tarafından yapılan, MTA ve Biodentine'nin çeşitli zamanlardaki biyouyumluluklarının karşılaştırıldığı araştırmada; çalışmamıza benzer şekilde, materyallerin hücreyle muamele sonrası 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sağlanmıştır. Her iki materyalinde 48. saatte en yüksek hücre canlılığını gösterdiği ve 72. saatte bu oranın azaldığı sonucuna ulaşılmıştır [179]. Bu tez çalışmasında da, hücreyle muamele süreleri 24 saat ve 48 saat olarak belirlenmiştir ve deney grupları içerisinde 24 saat inkübasyon süresi olan örneklerin, 48 saat inkübasyon süresine sahip

örneklere göre daha yüksek düzeyde sitotoksosite gösterdiği tespit edilmiştir. Bahsi geçen çalışmada sitotoksosite, periodontal ligament hücreleri kullanılarak, MTS hücresel provizyon testi ile değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasına benzer bir protokolle gerçekleştirilen başka bir çalışmada; MTA, Biodentine ve Bioaggregate materyallerinden elde edilen eluatların, hücre kültürü sonrası 1, 3 ve 7 gün hücre ile inkübasyonları sağlanarak sitotoksosite değerlendirmeleri yapılmıştır [180]. Bu çalışmada periodontal ligament hücreleri kullanılarak XTT sitotoksosite testiyle değerlendirme yapılmıştır. Jang ve ark. tarafından yapılan bu araştırma sonucunda, Biodentine'nin 3 gün hücre muamele süresine sahip örneklerinin, 7 günlük örneklere göre anlamlı derecede daha az hücre canlılığı gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, bu tez çalışmasının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında da hücre ile inkübasyon süresinin artması bazı gruplarda hücre canlılığının artmasına olanak sağlamıştır. 24 saat ve 48 saat olarak belirlenen hücre ile muamele süreleri göz önüne alındığında, 1 gün ve 3 gün sertleşme süresine sahip gruplar için, 24 saat muamele süresine sahip örneklerin, 48 saat muamele süresine sahip örneklere göre daha sitotoksik özellik gösterdiği saptanmıştır.

Samiei ve ark. tarafından yapılan ve çalışmamıza benzer şekilde kalsiyum silikat bazlı bir materyale nanoparçacık katılması fikrini temel alan bir çalışmada, MTA'ya bu materyalin özelliklerini geliştirmek adına titanyum oksit ( $TiO_2$ ) eklenmiştir [136]. Oluşan yeni materyalin sitotoksik özelliklerini araştıran çalışmada bu tez çalışmasının yöntemine benzer olarak MTT testi kullanılmış ve hücrelerle muamele süresi 24 ve 48 saat olarak planlanmıştır. Bahsedilen çalışmada, ağırlıkça %1 titanyum oksit eklenmesi, MTA'nın sitotoksitesini değiştirmemiştir ki, bu durum bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Bu sonuç temel alınarak, kalsiyum silikat bazlı materyallere ağırlıkça düşük yüzdelerde eklenen nanoparçacıkların bu materyallerin sitotoksitesini değiştirmeyebileceği düşünülebilir.

Yine bu çalışmada 48 saat hücreyle muamele edilen MTA materyalinin, içeriğinde  $TiO_2$  varlığı önemsenmeksizin 24 saat hücreyle muamele edilen gruba göre daha fazla sitotoksosite gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bu sonuç, bizim çalışmamızın bulgularıyla uyuşmamaktadır. Bu uyuşmazlığın sebebini, MTA ve Biodentine materyallerinin ve aynı zamanda  $TiO_2$  ve biyoaktif cam

nanoparçacıklarının birbirinden farklı karakteristik özellikler göstermesi olarak açıklayabiliriz. Bilindiği üzere MTA ve Biodentine materyalleri; içerik, sertleşme karakteri vb. birçok alanda birbirinden ayrılmaktadır [43]. Aynı şekilde TiO<sub>2</sub> metal sınıfına ait bir nanoparçacıkken, biyoaktif cam nanoparçacıkları biyoseramik sınıfına aittir.

Çalışmamızda saptanan, 1 gün sertleşme süresine sahip Biodentine ve modifiye Biodentine örneklerinin 3 gün ve 7 gün sertleşme süresine sahip örneklerle göre daha yüksek düzeyde sitotoksosite gösterdiği sonucu yorumlandığında, Biodentine'nin sertleşme reaksiyonunun bir yan ürünü olarak kalsiyum hidroksit oluşumu ve hidroksil iyonları salınımı göze çarpabilir. Ayrıca, Biodentine likiti içeriğinde materyale hızlı sertleşme özelliği kazandıran kalsiyum klorit varlığı söz konusudur [47]. Erken kalsiyum hidroksit üretiminin, 1 gün sertleşme süresine sahip Biodentine'nin daha uzun sertleşme sürelerine göre daha yüksek sitotoksosite gösterdiğini açıklayabileceği bildirilmiştir [181].

*In vitro* çalışmalarda, hidroksil iyonlarının kademeli olarak salınması, hücre canlılığını azaltabilir. Bu duruma klinik uygulamalar yönünden bakıldığında, *in vivo* şartlar altında hidroksil iyonlarının neden olduğu yüksek alkalitenin vücut sıvıları tarafından nötralize edilebilmesi ve hücre canlılığı üzerinde önemli etkilere neden olmaması fikri de göz önünde bulundurulmalıdır [182].

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biodentine ve biyoaktif cam nanoparçacıkları ile modifiye edilen Biodentine materyallerinin biyouyumluluğunun değerlendirildiği bu *in vitro* çalışmanın sınırlılıkları dahilinde aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşmak mümkündür;

- Biodentine'ye ağırlıkça %1 ve %2 oranında biyoaktif cam eklenmesi bu materyalin biyouyumluluğunu etkilememektedir.

- Bu çalışmanın MTT test bulgularına göre, Biodentine ve modifiye Biodentine materyallerinin sitotoksikite düzeyleri sertleşme süreçlerinin erken safhalarında daha yüksektir.

- Çalışmanın bulgularından çıkarılan başka bir sonuç ise, MTT testi sürecinde materyal örneklerinin hücre ile inkübasyon süresinin artmış olması biyouyumluluğu olumlu yönde etkilemektedir. Materyal tipi değişmeksizin, 3 güne kadar sertleşme süresine sahip, 24 saat hücre ile muamele edilmiş örnekler, 48 saat muamele süresine sahip örneklere göre daha yüksek sitotoksik özellik göstermiştir.

- Bu çalışmanın bulguları ışığında Biodentine materyaline biyoaktif cam materyali eklenmesinin biyouyumluluğu değiştirmedeği söylenebilir. Fakat, materyalin diğer özelliklerini olumsuz yönde etkileyip etkilemediğini öğrenmek amacıyla ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 7. ÖZGEÇMİŞ

28 Aralık 1991 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini Aybars Ak İlköğretim Okulu, ortaöğrenimini Özel Kültür Fen Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında girmeye hak kazandığı Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında katıldığı Diş Hekimliğinde Uzmanlık Sınavı ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalında uzmanlık eğitimine başladı.



## 8. KAYNAKLAR

1. Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. (2014) A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*, 2014: 160951.
2. Septodont, *Biodentine Active Biosilicate Technology, Paris, France*
3. Hench LL et al. (1971) Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater*, 5(6): 117-141.
4. Li R, Clark A, Hench LL. (1991) An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater*, 2(4): 231-239.
5. Abbasi Z et al. (2015) Bioactive glasses in dentistry: a review. *J Dent Biomater*, 2(1): 1-9.
6. Jones JR (2015) Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta biomater*, 23: S53-S82.
7. Bellantone M, Coleman NJ, Hench LL. (2000) Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *J Biomed Mater*. 51(3): 484-490.
8. Papadopoulou L et al. (2003) Dental ceramics coated with bioactive glass: Surface changes after exposure in a simulated body fluid under static and dynamic conditions. *Phys Status Solidi*, 198(1): 65-75.
9. Corral Nunez C et al. (2017) Enhanced bioactive properties of Biodentine™ modified with bioactive glass nanoparticles. *J Appl Oral Sci*, 25(2): 177-185.
10. Alaçam T, Endodonti (2000) Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, Ankara.
11. Çalışkan MK, (2006) Endodontide tanı ve tedaviler, Nobel Tıp Kitabevleri.
12. Koçak S et al. (2014) Evaluation of the biocompatibility of experimentally manufactured portland cement: An animal study. *J Clin Exp Dent*, 6(1): e17.

13. Torabinejad M, Parirokh M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*, 36(2): 190-202.
14. Walton RE, Torabinejad M (1996) Principles and practice of endodontics, Saunders.
15. Ng YL et al. (2008) Outcome of primary root canal treatment: Systematic review of the literature—Part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J*, 4 (1) : 6-31.
16. Walker LA et al. (2013) Current trends in pulp therapy: a survey analyzing pulpotomy techniques taught in pediatric dental residency programs. *J Dent Child*, 80(1): 31-35.
17. Torabinejad M, Ford T (1996) Root end filling materials: a review. *Dental Traumatology* 12(4): 161-178.
18. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer P (2017) Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*, 51(2): 177-205
19. Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*, 36(3): 400-413.
20. Dammaschke T et al. (2005) Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater*, 21(8): 731-738.
21. Torabinejad M et al. (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 21(7): 349-353.
22. Camilleri J et al. (2005) The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*, 21(4): 297-303.
23. Camilleri J (2008) *Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate*. *Int Endod J*, 41(5): 408-417.

24. Ferris DM, Baumgartner JC (2004) Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 30(6): 422-424.
25. Asgary S et al. (2005) Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 31(2): 101-103.
26. Asgary S et al. (2009) Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod*, 35(2): 243-250.
27. Tanalp J et al. (2012) The status of mineral trioxide aggregate in endodontics education in dental schools in Turkey. *J Dent Educ*, 76(6): 752-758.
28. Kogan P et al. (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*, 32(6): 569-572.
29. Hutcheson C et al. (2012) Multi-surface composite vs stainless steel crown restorations after mineral trioxide aggregate pulpotomy: a randomized controlled trial. *J Pediatr Dent*, 34(7): 460-467.
30. Vallés M et al. (2013) Color stability of white mineral trioxide aggregate. *Clin Oral Investig*, 17(4): 1155-1159.
31. Berger T, Baratz AZ, Gutmann JL (2014) In vitro investigations into the etiology of mineral trioxide tooth staining. *J Conserv Dent*, 17(6): 526.
32. Marciano MA et al. (2014) Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod* 40(8): 1235-1240.
33. Marciano MA et al. (2013) Analysis of the color alteration and radiopacity promoted by bismuth oxide in calcium silicate cement. *Braz oral Res*, 27(4): 318-323.
34. Lenherr P et al. (2012) Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J*, 45(10): 942-949.
35. Felman D, Parashos P (2013) Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 39(4): 484-487.

36. Marciano MA, Duarte M, Camilleri J (2015) Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig.* 19(9): 2201-2209.
37. Voveraityte V et al. (2017) Spectrophotometric analysis of tooth discolouration induced by mineral trioxide aggregate after final irrigation with sodium hypochlorite: An in vitro study. *Aust Endod J*, 43(1): 11-15.
38. Park JB, Lee JH (2008) Use of mineral trioxide aggregate in the open apex of a maxillary first premolar. *J Oral Sci*, 50(3): 355-358.
39. Mooney GC, North S (2008) The current opinions and use of MTA for apical barrier formation of non-vital immature permanent incisors by consultants in paediatric dentistry in the UK. *Dent Traumatol*, 24(1): 65-69.
40. Srinivasan V, Patchett C, Waterhouse P (2006) Is there life after Buckley's Formocresol? Part I—A narrative review of alternative interventions and materials. *Int J Paediatr Dent*, 16(2): 117-127.
41. Johnson BR (1999) Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod*, 87(4): 398-404.
42. Abedi H, Ingle J (1995) Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. *J Calif Dent Assoc*, 23(12): 36-39.
43. Kaup M, Schafer E, Dammaschke T (2015) An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med*, 11: 16.
44. Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013) Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J*, 46(7): 632-641.

45. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater*, 29(5): 580-593.
46. Camilleri J et al. (2014) Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig*, 18(5): 1437-46.
47. Camilleri J (2013) Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent*, 41(7): 600-10.
48. Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013) Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*, 29(2): e20-e28.
49. Kaur M et al. (2017) MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res*, 11(8): ZG01-ZG05.
50. Kayahan MB et al. (2013) Effect of acid etching procedures on the compressive strength of 4 calcium silicate-based endodontic cements. *J Endod*, 39(12): 1646-8.
51. Rajasekharan S et al. (2014) Biodentine™ material characteristics and clinical applications: A review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent*, 15(3): 147-158.
52. Piconi C, Maccauro G (1999) Zirconia as a ceramic biomaterial. *J Biomater*, 20(1): 1-25.
53. Yoldaş SE et al. (2016) Comparison of the potential discoloration effect of Bioaggregate, Biodentine and white Mineral Trioxide Aggregate on bovine teeth: In vitro research. *J Endod*, 42(12): 1815-1818.
54. Vallés M et al. (2015) Color stability of teeth restored with Biodentine: A 6-month in vitro study. *J Endod*, 41(7): 1157-1160.

55. Kohli MR et al. (2015) Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *J Endod*, 41(11): 1862-1866.
56. Camilleri J (2015) Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod*, 41(7): 1139-45.
57. Keskin C, Demiryurek EO, Ozyurek T (2015) Color Stabilities of Calcium Silicate-based Materials in Contact with Different Irrigation Solutions. *J Endod*, 41(3): 409-411.
58. Koubi S et al. (2012) *Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations.* *Int J Dent*, 2012;105863
59. Raskin A et al. (2012) In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent*, 14(6): 535.
60. Raju VG et al. (2014) Comparative evaluation of shear bond strength and microleakage of tricalcium silicate-based restorative material and radioopaque posterior glass ionomer restorative cement in primary and permanent teeth: an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 32(4): 304.
61. Odabaş ME, Bani M, Tirali RE (2013) Shear bond strengths of different adhesive systems to biodentine. *Sci World J*, 2013; 626103
62. Cantekin K, Serap A (2014) Evaluation of shear bond strength of two resin-based composites and glass ionomer cement to pure tricalcium silicate-based cement (Biodentine®). *J Appl Oral Sci*, 22(4): 302.
63. Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU (2013) Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of biodentine and conventional root perforation repair materials. *J Endod*, 39(3): 380-384.
64. Zhou H et al. (2013) In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*, 39(4): 478-483.

65. Nuñez CM et al. (2014) Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*, 40(3): 406-411.
66. Küçükkaya S et al. (2016) In vitro cytotoxicity of calcium silicate-based endodontic cement as root-end filling materials. *Scientifica*, 2016; 9203932
67. Bortoluzzi EA et al. (2015) Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater*, 31(12): 1510-1522.
68. Jung S et al. (2014) Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: An in vitro study. *Head Face Med*, 10(1): 55.
69. Luo Z et al. (2014) Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*, 42(4): p. 490-497.
70. About I (2016) Biodentine: From biochemical and bioactive properties to clinical applications. *Giornale Italiano di Endodonzia*, 30(2): 81-88.
71. Hulbert S et al. (1986) Ceramics in clinical applications, past, present and future. *High Tech Ceramics*, (Part A): 189-213.
72. Hench LL, Jones J (2005) Biomaterials, artificial organs and tissue engineering, Elsevier.
73. Stoor P, Söderling E, Salonen JI (1998) Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scan*, 56(3): 161-165.
74. Genç Y (2003) Use of Factorial Design of Experiments in the Development of Zirconia Toughened Hydroxyapatite Composites. *Yük. Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi
75. Çelebican Ö (2009) Sol-jel Yöntemiyle Biyoaktif Cam Malzemelerin Üretimi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul Teknik Üniversitesi
76. Kükürtcü B. (2008) Biyoaktif Cam Ve Cam-seramik Malzemelerin Üretimi Ve Yapay Vücut Sıvısı İçerisindeki Davranımlarının İncelenmesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul Teknik Üniversitesi



77. Profeta AC, Huppa C (2016) Bioactive-glass in oral and maxillofacial surgery. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr*, 9(01): 001-014.
78. Burwell A, Litkowski L, Greenspan D (2009) Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin®): Remineralization potential. *Adv Dent Res*, 21(1): 35-39.
79. Alauddin SS (2004) In vitro remineralization of human enamel with bioactive glass containing dentifrice using confocal microscopy and nanoindentation analysis for early caries defense, *University of Florida*.
80. Kaur G et al. (2014) A review of bioactive glasses: their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J Biomed Mater Res Part A*, 102(1):254-274.
81. Hench LL, Paschall H (1973) Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res Part A*, 7(3): 25-42.
82. Hench LL, Polak JM (2002) Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557): 1014-1017.
83. Sanders D, Hench LL (1973) Mechanisms of glass corrosion. *J Am Ceram Soc*, 56(7): 373-377.
84. Hench LL (1991) Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc*, 74(7): 1487-1510.
85. Arcos D, Greenspan D, Vallet-Regí M (2003) A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses. *J Biomed Mater Res Part A*, 65(3): 344-351.
86. Hench LL , West JK (1990) The sol-gel process. *Chem Rev*, 90(1): 33-72.
87. Brinker CJ, Scherer GW (1990) Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing, *Academic press*.
88. Laughlin J et al. (2000) Using Sol-Gel Chemistry to Synthesize a Material with Properties Suited for Chemical Sensing. Development and Implementation of

- a Materials Science Experiment for the Undergraduate Curriculum. *J Chem Educ*, 77(1): 77.
89. Hench LL (1998) Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*, 41(4): 511-518.
90. Lev O et al. (1995) Organically modified sol-gel sensors. *Anal Chem*, 67(1): 22A-30A.
91. Pierre AC (2013) Introduction to sol-gel processing. Vol 1: *Springer Science & Business Media, LLC*.
92. Rabinovich EM (1994) Sol Gel Processing—General Principles in Sol-Gel Optics, *Springer*. 1-37.
93. Brunner TJ, Stark WJ, Boccaccini AR (2007) Nanoscale bioactive silicate glasses in biomedical applications. *Nanotechnologies for the Life Sciences*.
94. Macedo NL et al. (2004) Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. *J Appl Oral Sci*, 12(2): 137-143.
95. Tüter G et al. (1998) Çeşitli kemik greft materyalleri üzerine insan dişeti fibroblast ataçmanının in-vitro değerlendirilmesi. *Acta Odontol Turcica*, 15(1-2-3): 95.
96. Jabbarifar E, Razavi SM, Ahmadi N (2008) Histopathologic responses of dog's dental pulp to mineral trioxide aggregate, bio active glass, formocresol, hydroxyapatite. *Dent Res J*, 4(2): 83~ 87.
97. Haghgoo R, Naderi NJ (2007) Comparison of calcium hydroxide and bioactive glass after direct pulp capping in primary teeth. *J Dent (Tehran)*, 4(4): 155-159.
98. Wang H et al. (2014) Evaluation of borate bioactive glass scaffolds as a controlled delivery system for copper ions in stimulating osteogenesis and angiogenesis in bone healing. *J Mater Chem*, 2(48): 8547-8557.

99. Krishnan V, Lakshmi T (2013) Bioglass: A novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res.* 4(2): 78.
100. Tirapelli C et al. (2010) A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res*, 24(4): 381-387.
101. Lee BS et al. (2007) In vitro study of dentinal tubule occlusion with sol-gel DP-bioglass for treatment of dentin hypersensitivity. *Dent Mater J*, 26(1): 52-61.
102. Oral O et al. (2014) Bioactive glass particulate filler composite: Effect of coupling of fillers and filler loading on some physical properties. *Dent Mater*, 30(5): 570-577.
103. Edgerton M, Levine MJ (1993) Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosth Dent*, 69(4): 406-415.
104. Kenneth J (1996) *Phillips' science of dental materials*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1-31.
105. Wataha JC (2001) Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosth Dent*, 86(2): 203-209.
106. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996) In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater*, 12(3): 186-193.
107. Hensten-Pettersen A (1988) Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*, 21(2): 89-99.
108. Craig R, Powers J, Wataha J (2004) *Dental materials: Properties and manipulation*, Mosby, St. Louis
109. Schmalz G (1998) Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 1(4): 154-162.
110. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method*, 65(1-2): 55-63.

111. Slater T, Sawyer B, Sträuli U (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*, 77: 383-393.
112. Van de Loosdrecht AA et al. (1991) Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay: a methodological study. *J Immunol Methods*, 141(1): 15-22.
113. Sittampalam GS et al. (2004) *HPLC-MS/MS for Hit Generation--Assay Guidance Manual*.
114. Marshall N, Goodwin C, Holt S (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul*, 5(2): 69-84.
115. Cimpan MR et al. (2000) The effect of heat-and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scandinav*, 58(5): 217-228.
116. Ergün G et al. (2006) Metilmetakrilat monomerlerinin primer insan gingival fibroblastları üzerine sitotoksik etkisinin in vitro değerlendirilmesi. *Acta Odontol Turcica*, 23(2): 97.
117. Holst-Hansen C (1998) MTT-cell proliferation assay. *Cell Biology-A Laboratory Handbook*, 1: 16-18.
118. Hong Z, Reis RL, Mano JF (2009) Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *J Biomed Mater Res*, 88(2): 304-313.
119. Valenzuela F et al. (2012) Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part B*: 100(6): 1672-1682.

120. Xia W, Chang J (2007) Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol–gel method. *Mater Lett*, 61(14-15): 3251-3253.
121. Garcia L et al. (2016) Cytotoxic effects of new MTA-based cement formulations on fibroblast-like MDPL-20 cells. *Braz Oral Res*, 30(1).
122. Chang SW et al. (2016) Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontol Scandinav*, 74(4): 298-306.
123. Solanki NP, Venkappa KK, Shah NC (2018) Biocompatibility and sealing ability of mineral trioxide aggregate and biodentine as root-end filling material: A systematic review. *J Conserv Dent*, 21(1): 10.
124. Torabinejad M, Watson T, Ford TP (1993) Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*, 19(12): 591-595.
125. Singh S et al. (2015) Solubility of a new calcium silicate-based root-end filling material. *J Conserv Dent*, 18(2): 149.
126. Mori GG et al. (2014) Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod*, 40(9): 1485-1488.
127. Browne R (1988) The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials—does it have a role? *Int Endod J*, 21(2): 50-58.
128. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F (2007) How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal*, 12(3): 258-266.
129. Stanford J (1980) Recommended standard practices for cytotoxicity testing. FDI World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dent J*, 30: 141-73.
130. Materials and Devices (1972) Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc*, 84(2): 382-387.

131. Torabinejad M et al. (1995) Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod*, 21(10): 489-492.
132. Hirschman WR et al. (2012) Cytotoxicity comparison of three current direct pulp- capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod*, 38(3): 385-388.
133. Wyk CV, Olivier A, Maritz J (2001) Cultured pulp fibroblasts: Are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med*, 30(3): 168-177.
134. Schuster U et al. (2001) Cytotoxicity Testing with Three-Dimensional Cultures of Transfected Pulp-Derived Cells. *J Endod*, 27(4): 259-265.
135. Schmalz G. (1994) *Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations.* *J Dent*, 22: S6-S11.
136. Samiei M et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate with TiO<sub>2</sub> nanoparticles on human gingival fibroblasts. *J Clin Exp Dent*, 2017. 9(2): e182.
137. Saberi EA et al. (2016) Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 10(2): 75.
138. Michel A et al. (2017) In vitro evaluation of different dental materials used for the treatment of extensive cervical root defects using human periodontal cells. *Clin Oral Investig*, 21(3): 753-761.
139. Silva E et al. (2016) Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. *Int Endod J*, 49(6): 574-580.
140. Kim M et al. (2014) Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and Endocem MTA cements. *J Endod*, 40(10): 1649-1653.
141. Sepet E et al. (2009) *Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro.* *Quintessence Int*, 40(8).
142. Jung S et al. (2018) Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PloS One*, 13(3): e0194467.

143. Scelza MZ et al. (2017) *Biodentine™ is cytocompatible with human primary osteoblasts*. *Braz Oral Res*, 28(31); e81
144. Proksch S et al. (2018) Evaluation of the bioactivity of fluoride-enriched mineral trioxide aggregate on osteoblasts. *Int Endod J*. 51(8): 912-923
145. Gomes-Cornélio A et al. (2017) Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J*, 50(1): 39-47.
146. Eldeniz A et al. (2007) Cytotoxicity of new resin, calcium hydroxide-and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J*, 40(5): 329-337.
147. Taira M et al. (2000) Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont*, 13(4); 311-316
148. Cao T et al. (2005) Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol*, 25(2): 101-108.
149. Cintra L et al. (2017) Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*, 43(5): 774-778.
150. Imazato S et al. (2006) Responses of MC3T3-E1 cells to three dental resin-based restorative materials. *J Biomed Mater Res Part A*, 76(4): 765-772.
151. Samiei M et al. (2017) Zeolite-silver-zinc nanoparticles: Biocompatibility and their effect on the compressive strength of mineral trioxide aggregate. *J Clin Exp Dent*, 9(3): e356.
152. Rodríguez-Lozano F et al. (2017) *Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells*. *Int Endod J*, 50(1): 67-76.
153. Ghasemi N et al. (2014) Effect of mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture cement and mineral trioxide aggregate with disodium hydrogen phosphate on BMP-2 production. *Iran Endod J*, 9(3): 220.

154. Attik G et al. (2014) In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *Int Endod J*, 47(12): 1133-1141.
155. Schweikl H, Schmalz G (1996) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Euro J Oral Sci*, 104(3): 292-299.
156. Wataha JC, Craig RG, Hanks C (1992) Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater*. 8(1): 65-70.
157. Mitra SB, Wu D, Holmes BN (2003) An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc*. 134(10): 1382-1390.
158. Melo MA et al. (2013) Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol*, 31(8): 459-467.
159. Kulan M, Ulukapı I (2011) Dişhekimliğinde Biyoaktif Camlar, *J Istanbul Univ Fac Dent* 45(1): 65-70.
160. Kumar C (2009) Nanoscale bioactive silicate glasses in biomedical applications in: *Nanostructured Oxides, Wiley-VCH*.
161. Orchardson R et al. (1994) Consensus report: Dentine hypersensitivity into the 21st century. *Archs Oral Biol*, 39: 635-715.
162. Larmas E et al. (1995) Bioactive glass in periodontal defects, Initial findings of soft tissue and osseous repair. *Bioceramics*, 8: 279-284.
163. Hench LL (1998) Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 41(4): 511-518.
164. Lindhe J, Karring T, Lang NP (2009) Periodontologia clinica e implantologia odontologica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry, Vol 1, *Ed. Médica Panamericana*.
165. Salonen JI et al. (2009) Bioactive glass in dentistry, *J Min Intervent Dent*, 2(4): 208-219.



166. Wang S et al. (2014) Odontogenic differentiation and dentin formation of dental pulp cells under nanobioactive glass induction. *Acta biomater*, 10(6): 2792-2803.
167. Efflandt S et al. (2002) Interaction between bioactive glasses and human dentin. *J Mater Sci*. 13(6): 557-565.
168. Efflandt SE, Cook RF, Francis LF (2000) Apatite growth on bioactive glass in artificial saliva. *Mater Res Soc Symp Proc*, 662.
169. Yli Urpo H, Närhi T, Söderling E (2003) Antimicrobial effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral micro-organisms in vitro. *Acta Odontol Scandinav.*, 61(4): 241-246.
170. Zehnder M et al. (2006) *Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 101(4): 530-535.
171. Korkut E, Torlak E, Altunsoy M (2016) *Antimicrobial and mechanical properties of dental resin composite containing bioactive glass*. *J Appl Biomater Func Mater*, 14(3).
172. Pérard M et al. (2013) Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci*, 24(6): 1527-1534.
173. Gandolfi MG et al. (2008) New Portland cement-based materials for endodontics mixed with Articaine solution: A study of cellular response. *J Endod*, 34(1): 39-44.
174. Cornélio A et al. (2011) *Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study*. *J Endod*, 37(2): 203-210.
175. Silva GF et al. (2014) Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res Part A*, 102(12): 4336-4345.

176. Akbulut MB, Arpaci PU, Eldeniz AU (2018) Effects of four novel root-end filling materials on the viability of periodontal ligament fibroblasts. *Restor Dent Endod*, 43(3): e24
177. Camilleri J et al. (2004) Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate, *Int Endod J*, 37(10): 699-704.
178. Khedmat S et al. (2014) In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay, *Restor Dent Endod*, 39(3): 149-154.
179. Escobar-García DM et al. (2016) Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials. *BioMed Res Int*, 2016:7926961
180. Jang YE et al. (2014) Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic material, *Restor Dent Endod*, 39(2): 89-94.
181. Kim JR, Nosrat A, Fouad AF (2015) Interfacial characteristics of Biodentine and MTA with dentine in simulated body fluid. *J Dent*, 43(2): 241-7.
182. Mozayeni MA et al. (2012) Cytotoxicity of calcium enriched mixture cement compared with mineral trioxide aggregate and intermediate restorative material. *Aust Endod J*, 38(2): 70-75.