



T.C.

**SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ GÜLHANE DİŞ
HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI
BAŐKANLIĐI**

**DERMABOND™, TheraCal LC® VE MTA'NIN
SİTOTOKSİSİTELERİNİN VE
GENOTOKSİSİTELERİNİN İNVİTRO
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

Dt. Murat YILMAZ

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ GÜLHANE DİŞ
HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI
BAŐKANLIĐI**

**DERMABOND™, TheraCal LC® VE MTA'NIN
SİTOTOKSİSİTELERİNİN VE
GENOTOKSİSİTELERİNİN İNVİTRO
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

Dt. Murat YILMAZ

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN

**T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Dekanlığı'na;**

"Dermabond™, Theracal LC® ve MTA'nın Sitotoksitelerinin ve Genotoksitelerinin İn vitro Olarak Karşılaştırılması" konulu bu çalışma jürimiz tarafından Endodonti Anabilim Dalı'nda Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



Üye: Prof. Dr. Özgür UZUN
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



Üye: Doç. Dr. Kadriye DEMİRKAYA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



ONAY: Dt. Murat YILMAZ'ın 16.05.2019 tarihinde savunduğu bu tez, Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serpil KARAOĞLANOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı



ÖZET

. DERMABOND™, TheraCal LC® ve MTA'nın Sitotoksitelerinin ve Genotoksitelerinin İnvitro Olarak Karşılaştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı; fare fibroblast hücre hattında pulpa kaplama materyallerinden Kerr Life, TheraCal LC® ve BioMTA+ ile tıpta doku yapıştırıcı olarak kullanılan DERMABOND™'un oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik etkilerin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada, pulpa kuafaj tedavilerinde kullanılan TheraCal LC®, BioMTA+, Kerr Life ve doku yapıştırıcı olan DERMABOND™'un fare fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile, genotoksik etkileri ise tek hücre jel elektroforezi (Comet) yöntemi ile değerlendirildi. Bunun için 24 kuyucuklu hücre plakalarının içine üretici talimatlarına göre hazırlanan test materyalleri üzerine hücre kültürü medyası ilave edildi. Elde edilen ekstratları uygun dilüsyonlarda hazırlanarak sitotoksikite deneyi için L929 fare fibroblast hücreleri üzerine eklendi. Sitotoksik etkiler 24 saat, yedi gün ve ondört gün sonra değerlendirildi. Tek hücre jel elektroforezi için ise test materyallerine mağruz bırakılan hücreler agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve lising çözeltilisinde bekletildi. Daha sonra elektroforez tankında 25V 300 mA akım yrimi dakika süreyle uygulandı. Lamlar daha sonra floresan mikroskopunda genotoksikite açısından değerlendirildi.

Bulgular: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) sonuçlarına göre hiçbir kuafaj materyali sitotoksik bulunmamakla beraber deney grupları karşılaştırıldığında TheraCal LC®, BioMTA+, Kerr Life ve DERMABOND™ arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). TheraCal LC® 24 saatlik (%86, 21), 1 haftalık (%66, 70) ve 2 haftalık (%88, 20) değerlendirmelerde hücre canlılık oranları karşılaştırıldığında diğer materyallerinden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Buna karşın BioMTA+ ve DERMABOND™'un sitotoksik etkili olmadıkları gözlemlenmiştir. Çalışmanın tek hücre jel elektroforezi (Comet) testi sonuçlarına göre TheraCal LC®'nin 24 saat, 1 hafta ve 2 haftalık maruziyetlerde diğer materyallere daha çok genotoksik özelliklere sahip olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Sonuçlar: Elde edilen verilerle; BioMTA+, Kerr Life, DERMABOND ve vital endodontik tedavilerde kullanılabileceği, DERMABOND™'un ise sitotoksik ve

genotoksik etki göstermediği gözönüne alındığında pulpa kuafaj materyallerine alternatif olabileceği düşünölmektedir. Bunun yanı sıra DERMABOND™'un dentin oluşumunu uyarıp uyardığı ile ilgili ilave çalışmalar yapılmalıdır. Theracal LC® materyali kullanımında ise sitotoksik ve genotoksik etkileri yönünden dikkatli olunmalıdır.

Anahtar kelimeler: Siyanoakrilat, MTA, TheraCal LC®, DERMABOND™, Pulpa Kuafaj Materyalleri, Sitotoksisite, Genotoksisite.



ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to compare cytotoxic and genotoxic effects of various pulp capping materials such as TheraCal LC[®], BioMTA+, DERMABOND[™], and Kerr Life in mouse fibroblast cell lines.

Materials and methods: In this study, the cytotoxic effects of pulp capping materials TheraCal LC[®], BioMTA+, Kerr Life and tissue adhesive DERMABOND[™] were determined in mouse fibroblast cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and genotoxic effects were determined by Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. For this purpose whole test materials were prepared according to manufacturer's instructions and placed into 24-well cell culture plates then incubated with cell culture media. Elutions were then added onto L929 mouse fibroblast cells. Cytotoxicity was evaluated at 24 hours, seven days, and fourteen days, respectively. For the Single cell gel electrophoresis assay, cells were embedded in agarose, lysed and slides were transferred to the electrophoresis tank filled with electrophoresis solution. Electrophoresis was proceeded at 25V 300 mA for twenty minutes. Cells were analyzed with a fluorescence microscope by means of genotoxicity.

Results: None of the test materials showed cytotoxicity. Nevertheless, there were statistically difference among Theracal LC[®], BioMTA+, Kerr Life, and DERMABOND[™] ($p < 0.05$). By means of cell viability rates, TheraCal LC[®] showed more cytotoxic effects than other materials in 24-hour (86.21%), 1-week (66.70%) and 2-weeks (88.20%). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay revealed that TheraCal LC[®] was more genotoxic pulp capping material than the other materials at 24 hours, one week, and two weeks exposures ($p < 0.05$).

Conclusion: With the limitation of this study, although BioMTA +, Kerr Life, DERMABOND, TheraCal LC[®] materials might be used in vital pulp therapies safely, due to its more cytotoxic and genotoxic effect TheraCal should be used precautiously. DERMABOND[™] might be considered to an alternative to pulp capping material, but further studies need to be performed to clarify whether it might be promote dentin formation.

Keywords: Cyanoacrilate, MTA, Theracal LC[®], DERMABOND[™], Pulp Capping

Material, Cytotoxicity, Genotoxicity.



TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim ve tezimin her aşamasında büyük bir sabır ve hoşgörüyle bana yardımcı olan ve yol gösteren danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN**'a

Tezimin laboratuvar aşamasında bana her türlü desteği veren, sabırla zaman ayıran, bilgisiyle çalışmamıza büyük katkısı olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji AD Öğr. Üyesi Sayın **Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ**'a

Uzmanlık eğitimim sırasında bana destek ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım **Uzm. Dt. Ertürk BİLGEÇ**'e, **Uzm. Dt. Mehmet YOLAGİDEN**'e ve **Dt. Numan AYDIN**'a

Hayatım boyunca bana destek olup bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme, babama, tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve beni hep destekleyen yardımını hiç esirgemeyen eşim **Elvan YILMAZ**'e ve canım oğlum **Efe YILMAZ**'a sonsuz teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Murat YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 DENTİN	2
2.1.1 Primer Dentin.....	3
2.1.2 Sekonder Dentin	3
2.1.3 Tersiyer Dentin	3
2.2 PULPA	4
2.2.1 Pulpa histolojisi ve fizyolojisi.....	4
2.2.2 Pulpanın Tabakaları	4
2.2.3 Pulpa hücreleri	5
2.2.4 Pulpa Lifleri	7
2.2.5 Pulpanın kan damarlar	8
2.2.6 Pulpanın sinirleri.....	8
2.3 DENTİN TAMİR MEKANİZMASI.....	9
2.4 VİTAL PULPA TEDAVİLERİ.....	10
2.4.1 İndirekt pulpa kuafajı.....	10
2.4.2 Direkt pulpa kuafajı	10
2.5 PULPA KUAFAJ MATERYALLERİ	13
2.5.1 Pulpa kuafajında kullanılan materyaller ve özellikleri	14
2.6 BİYOUYUMLULUK	21
2.6.1 Biyoyumluluk Testleri	21
2.6.2 Hücre Kültürü	28
2.7 ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER	29
2.7.1 Therecal LC®	29
2.7.2 2-Oktil Siyanoakrilat(DERMABOND™)	31
2.7.3 Bio Mta +.....	31
2.7.4 Kerr Life	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
3.1 Test materyallerinin hazırlanması	33
3.1.1 Bio MTA+ Materyalinin Hazırlanması	34

3.1.2	DERMABOND™ Materyalinin Hazırlanması.....	35
3.1.3	TheraCal LC® Materyalinin Hazırlanması	35
3.1.4	Life Materyalinin Hazırlanması.....	36
3.2	Hücre Kültürü.....	37
3.2.1	Kullanılan cihazlar:.....	37
3.2.2	Kullanılacak malzemelerin hazırlanması:.....	41
3.2.3	L929 hücrelerinin Pasajlanması.....	42
3.2.4	Canlı Hücre Sayımı(Tripan Mavisi Boya Atılım Testi)	43
3.2.5	MTT Testinin Uygulanması.....	43
3.2.6	Comet Testi.....	47
4.	BULGULAR	52
5.	TARTIŞMA.....	61
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	74

KISALTMALAR

μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
ANOVA	: Analysis Of Variance(Varyans Analizi)
Bis-GMA	: Bisphenol a-glicidil metakrilat
Ca(OH)₂	: Kalsiyum hidroksit
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle esansiyel vasatı
FBS	: Fetal sığır serumu
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
IL-1	: İnterlökin-1
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Birliği
Mm	: milimetre
MTA	: Mineral trioksit aggregate
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
pH	: Asit-Baz değeri
rpm	: Rotations per minute
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TEG-DMA	: Trietilen glikol dimetakrilat
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü
UDMA	: Üretan dimetakrilat
ZnOE	: Çinko oksit ojenol

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yaygın olarak kullanılan hücre hatları.....	29
Tablo 2. Çalışmamızda kullanılan malzemelerin içerikleri ve üretici firmaları.	33
Tablo 3. 96 kuyucuklu plakada ekstraktların yerleşim şeması.	45
Tablo 4. Tetrazolyum tuzunun Formazan kristaline indirgenmesi	46
Tablo 5. Kullanılan materyallerin hücre canlılık ve absorban değerleri ortalamaları. p<0.05 One-Way ANOVA.	52
Tablo 6. Ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.....	56



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Comet testinin yapılışı.....	27
Şekil 3. 1 Steril çalışma kabini(Esco Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)	34
Şekil 3. 2 CerKamed BioMTA+	35
Şekil 3. 3 DERMABOND™	35
Şekil 3. 4 TheraCal LC®	36
Şekil 3. 5 Kerr Life.....	36
Şekil 3. 6 Fare fibroblast hücreleri(L929).....	37
Şekil 3. 7 Karbondioksit inkübatörü(Heal Force HF240, Çin	37
Şekil 3. 8 Santrifuj cihazı(Hettrich Rotina 90, Almanya).....	38
Şekil 3. 9 pH metre cihazı(WTW pH 330i, Almanya).....	38
Şekil 3. 10 Hücre sayım cihazı(Bio-Rad TC20, Singapur).....	39
Şekil 3. 11 İnverted Mikroskop(Micros MCX 7600,Avusturya).....	39
Şekil 3. 12 Floresan mikroskop(Leica PM 1000, Almanya).....	40
Şekil 3. 13 Multiplaka okuyucu(Thermo Scienific Mutiskan Co., Finlandiya).....	40
Şekil 3. 14 Plaka çalkalayıcı(Heidolph Titramax 101, Almanya)	41
Şekil 3. 15 a) Sayım Lamı, b) Hücre sayım cihazı TC-20, c) Tripan mavisi.....	43
Şekil 3. 16 96 kuyucuklu plakaya hücrelerin ekimi	44
Şekil 3. 17 Çalkalayıcıda plakaların çalkalanması.....	46
Şekil 3. 18 Plakaların okuyucuda okunması	47
Şekil 3. 19 Hücrelerin lamlara yayılma aşaması	48
Şekil 3. 20 Hücrelerin lising solusyonunda bekletilmesi.	48
Şekil 3. 21 Alkali solusyon elektroforez uygulaması.....	49
Şekil 3. 22 Hasarsız DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.....	49

Şekil 3. 23 Az hasarlı DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.....	50
Şekil 3. 24 Hasarlı DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.....	50
Şekil 4. 1 Seyreltilmemiş ekstraktlara maruz kalan L929 hücrelerinin absorbans ortalamaları. *TheraCal LC® ile kontrol grubu 1 haftalık absorbans ortalamaları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.($p<0.05$, One-Way ANOVA)	53
Şekil 4. 2 Seyreltilmemiş ekstraktlara maruz kalan L929 hücrelerinin 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık hücre canlılıkları.	53
Şekil 4. 3 Seyreltilmemiş ekstraktlara 24 saat maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.....	54
Şekil 4. 4 Seyreltilmemiş ekstraktlara 1 hafta maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.....	55
Şekil 4. 5 Seyreltilmemiş ekstraktlara 2 hafta maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.....	55
Şekil 4. 6 Comet testinde kullanılan negatif kontrol ve pozitif kontrol [Ca(OH) ₂] ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.Negatif ve pozitif kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur($p>0.05$, Repeated Measures ANOVA)...	57
Şekil 4. 7 Comet Testinin toplu sonuçları. *TheraCal LC® 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık maruziyetlerde kuyruk yoğunlukları değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunlukları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır($p>0.05$ Repeated Measures ANOVA).....	58
Şekil 4. 8 DERMABOND™ 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. DERMABOND™'a ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrollere ait kuyruk yoğunlukları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur($p>0.05$, Repeated Measures ANOVA).....	58
Şekil 4. 9 MTA 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri ile elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. MTA'ya ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur($p>0.05$, Repeated Measured ANOVA).	59
Şekil 4. 10 TheraCal LC® 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri ile elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. *TheraCal LC®'ye ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır($p<0.05$, Repeated Measures ANOVA).	60

1. GİRİŞ

Tüm dünyada koruyucu diş hekimliği uygulamaları giderek yaygınlaşmasına rağmen, çürük nedeniyle erken dönemde diş kayıpları oluşmaktadır. Dişlerin erken kaybı, malokluzyonlara, çiğneme fonksiyonlarındaki kayıplar nedeniyle beslenme bozukluklarına, psikolojik problemlere ve konuşma bozukluklarına yol açabilmektedir. Bu nedenlerle, oral dokuların bütünlüğünün korunması amacıyla koruyucu diş hekimliği uygulamalarına gereksinim vardır.

Direkt pulpa kuafajı, enfekte olmamış pulpanın travmayla veya kavite preperasyonu sırasında perfore edilmesi veya yaralanması halinde doku dostu bir kimyasal maddeyle örtülerek canlılığını korumasını sağlamak amacıyla yapılan tedavidir. İşlem, bu yönüyle koruyucu ve rejeneratif bir tedavi yöntemidir.

Tedavide kullanılan kalsiyum hidroksit, Mineral Trioksit Agregat (MTA) ve TheraCal LC® özellikle düşük toksisite nedeniyle tercih edilmektedir; fakat bu materyallerle ilgili olarak literatürde çok sayıda toksisite çalışması mevcut değildir. Ayrıca siyanoakrilatların direkt pulpa kuafajı için kullanımları için çalışmaların çoğunda farklı siyanoakrilat türevleri kullanılmış olmakla birlikte 2-Oktil Siyanoakrilat ile ilgili çalışma yoktur. Bu nedenle bu çalışma 2-Oktil Siyanoakrilatın direkt pulpa kuafajı için kullanımında oluşabilecek sitotoksik ve genotoksik etkilerinin diğer kuafaj materyalleri ile karşılaştırması açısından önemlidir.

Bu çalışmada, CerKamed BioMTA+(CerKamed, Stalowa Wola, Polonya), TheraCal LC® (BISCO, INC., Schaumburg, Illinois, ABD), DERMABOND™ (Ethicon Inc., Somerville, New Jersey, ABD) ve Life (Kerr, California, ABD) sitotoksisite MTT testi ile değerlendirildikten sonra, genotoksik etkileri Comet testi ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pulpa hastalıklarının tedavisinde asıl amaç, travmaya uğrayarak veya çürük sebebiyle açığa çıkmış olan (minimal orandaki (1mm'den \leq)) ve iyileşme yeteneğine sahip pulpa dokusunun canlılığını koruyarak, pulpa-dentin kompleksinin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını sürdürebilmesinin sağlanmasıdır. Direkt pulpa kuafajı, iyatrojenik veya travma gibi sebeplerle açığa çıkan pulpa dokusunun bazı biyomateryallerle kapatılmasıyla yapılan konservatif ve rejeneratif bir tedavi yöntemidir (1).

2.1 DENTİN

Dentin, dişin en fazla alana sahip yapısıdır. Kron kısımda mine ile, kök kısmında sementle kaplı olan dentin iç kısımda pulpa odası ve kanalları çevreler (2). Dentin; hacim olarak %40-45 mineral matriks, %30 organik matriks ve %20-25 sudan oluşan bir dokudur (3).

Gelişimi tamamlanmış bir dentinin ağırlık olarak % 70'i inorganik madde, % 20'si organik madde ve % 10'u sudan oluşmaktadır (3). Dentinin ana inorganik bileşeni kalsiyum hidroksiapatittir ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Organik matriks bölümü ise protein içermektedir ve içerdiği proteinin büyük kısmı Tip I kollajendir. Az miktarda da Tip V kollajen ihtiva etmektedir. Kollajenöz olmayan proteinler ise dentin fosfoprotein (DPP), dentin matriks protein 1 (DMP1), dentin sialoprotein (DSP), osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN) ve kemik sialoprotein (BSP)'dir (4).

Dentin dokusunun mineye oranla daha yumuşak ve esnek olmasının sebebi, inorganik içeriğinin daha az ve hidroksiapatit kristallerinin boyutlarının daha küçük olmasıdır(2). Mine dokusunun mikrosertliği 343 Knoop Sertlik Değeri (KHN) ve elastisite modülü 84 Gigapaskal (Gpa) iken, dentinin mikrosertliği 68 KHN ve elastisite modülü 13-17 GPa'dır (5,6). Dentin içerisindeki hidroksiapatit kristallerinin boyları 200-1000 Angstron (Å), genişlikleri ise 30Å civarındadır (2). Dentinde bulunan hidroksiapatit kristallerinin boyutları sementteki ve kemiktekiyle yakın değerlere sahip olsa da, inorganik yapı oranının farklılığından dolayı dentin bu dokulardan daha serttir (2,7).

Dentin dokusu, oluşumu ve özelliklerinden dolayı üçe ayrılarak incelenebilir: Primer, sekonder ve tersiyer dentin.

2.1.1 Primer Dentin

Dişin gelişiminden dişin sürmesine kadar oluşan dentin tipi primer dentindir (4). İlk oluşan dentine manto dentin denilmektedir. Primer dentinde dentin kanalları oldukça düzgündür. Primer dentin tabakasının en üstünde, altında kalan dentine göre daha az mineralize olan, konumuna göre mine veya sement tabakasının hemen altında yer alan manto dentininin kalınlığı ancak 150 µm kadardır (4,8).

2.1.2 Sekonder Dentin

Dişin gelişimini tamamlamasından sonra, çok daha yavaş bir hız ile hayat boyu yapılan dentindir (4,8). Fizyolojik sekonder dentin, pulpa-dentin sınırı boyunca günde yaklaşık olarak 0,5 µm kalınlığında salgılanır (9). Sekonder dentin, primer dentin ile birincil odontoblastlar tarafından salgılanmaktadır. Oluşma hızı farklıdır; sekonder dentin primer dentine göre, daha yavaş oluşmaktadır (10). Primer ve sekonder dentin arasındaki en büyük fark morfolojileridir ve sekonder dentinin tübüllerinin S-eğriliği daha belirgindir (3). Sekonder dentinin veya henüz oluşmamış ise primer dentinin pulpaya ile komşu olduğu tarafında henüz tam kireçlenmemiş bir tabaka vardır. Bu tabakaya predentin adı verilir (11).

2.1.3 Tersiyer Dentin

Kuttler, dış etkenlere karşı dentinin bölgesel olarak salgılanmasına tersiyer dentin adını vermiştir (12). Ancak bu tersiyer dentin, primer ve sekonder dentinden çok az farkı olan tübüler bir matristen tamamen displastik, hatta atübüler bir yapıya kadar uzanan tüm dokuları kapsayabilmektedir. Tersiyer dentin, kendi içinde tepkisel (reaksiyoner) ve tamir dentini olarak iki alt sınıfta değerlendirilmektedir. Burada ayırım için dış etkenin şiddeti ve ona karşı gelişen biyolojik olaylar etkilidir (10).

Tersiyer dentinin oluşmasıyla, etken ile pulpa dokusu arasındaki mesafe artmaktadır (13). İritasyon oluşturan etken hafif ya da orta şiddette ise primer ve fizyolojik sekonder dentini yapan odontoblastlar hayatta kalır. Odontoblastik aktivite ile dentin oluşumu hızlanır. Reaksiyoner dentin yapım hızı, fizyolojik sekonder dentin yapım hızının yaklaşık üç katı olarak bildirilmiştir. Çok şiddetli iritasyonlarda ise odontoblastlar ölmekte ve pulpadaki farklılaşmamış mezenkimal hücreler yeni sekonder odontoblastlara farklılaşarak daha az tübüler ve daha düzensiz yapıdaki

reparatif tersiyer dentini oluşturmaktadır. Reaksiyoner veya reparatif dentin pulpa-dentin kompleksinin çok önemli bir savunma mekanizmasıdır. Lokal tersiyer dentin; primer ve sekonder dentine göre daha düzensiz, daha az mineralizedir. Ayrıca primer dentine göre daha yüksek bir organik içeriğe sahiptir. Sekonder dentin ile tersiyer dentinin birleşim yerindeki dentin tübülleri yabancı maddelerin pulpaya geçişinde bir bariyer görevi görmektedir (7,14–16).

2.2 PULPA

2.2.1 Pulpa histolojisi ve fizyolojisi

Pulpa, dişin dentinle çevrili olan boşluğunu dolduran hücreler, lifler, damarlar ve sinirlerden oluşan muköz tipte gevşek bir bağ dokusudur. Dekalsifiye edilmiş bir diştan kesit aldığımızda dıştan içe doğru dentin, pre-dentin, odontoblast tabakası, hücreden fakir tabaka (Weil tabakası), hücreden zengin tabaka görülmektedir. Hücresiz tabakada kapiller pleksusları ve sinir lifleri dallara ayrılır. Pulpa dokusunun büyük kısmını hücreli tabaka oluşturmaktadır (13,17).

Pulpa, içerik olarak %25'i organik yapı ve %75'i ise sudan oluşan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Bağ dokularına benzer olarak pulpa dokusunda da kan ve lenf damarları, sinir lifleri, kollajen lifler ve hücrelerin içerisinde bulunduğu bir ana madde mevcuttur (18). Ana maddenin %90'ı sudan, %10'u ise glikoproteinler, mukopolisakkaridler ve diğer proteinlerden oluşur. Pulpaya etki eden olaylarda, kollajen fibrillerle desteklenmiş olan bu ana madde etkili olup, bir iletişim aracı rolü üstlenir(19).

2.2.2 Pulpanın Tabakaları

2.2.2.1 Odontoblast tabakası

Sağlıklı pulpa dokusunda dentine komşu olarak tek sıra halinde dizilmiş ve odontoblast hücreleri tarafından oluşturulmuş bir tabakadır. Odontoblastik tabaka içerisinde hücreden fakir tabakadan uzanan miyelinsiz sinir lifleri de bulunur. Bu liflerin bir kısmı odontoblast uzantıları ile beraber dentin kanalları içerisine ilerler (4).

2.2.2.2 Hücreden fakir tabaka (Weil Zonu)

Odontoblast tabakasının altında yer alır. Bu tabaka subodontoblastik tabaka veya weil tabakası olarak adlandırılır. Genç pulpalarda ve pulpada dentin oluşumu devam ettiği zamanlarda bulunmayan, pulpa yaşlandıkça daha fazla görülen hücreden zengin tabakada, myelinsiz sinirlerin ve kan damarlarının pleksusları ve fibroblastların silindirik şeklindeki sitoplazmik uzantıları bulunur (4,20).

2.2.2.3 Hücreden zengin tabaka

Weil Zonu'nu, hücre yoğunluğunun fazla olduğu hücreden zengin tabaka takip eder. Bu tabakada, fibroblast ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler pulpanın merkezine göre daha yoğun olarak bulunur. Bu hücreler kron pulpasında kök pulpasına göre daha belirgindir. Genel olarak bu tabaka hasar görmüş odontoblast hücrelerinin yerlerine yeni odontoblast hücreleri yapımından ve tersiyer dentin oluşumundan sorumludur (4,21).

2.2.2.4 Santral tabaka

Pulpa dokusunun en iç tabakasıdır. Büyük kan damarları ve sinirler bulunur. Bu tabakada bağ dokusu hücreleri de mevcuttur (4).

2.2.3 Pulpa hücreleri

2.2.3.1 Odontoblastlar

Pulpada odontoblastlar farklılaşma sonucunda bölünme yeteneklerini kaybetmiş özel hücrelerdir. Bu hücrelerin temel görevi dentin matriksi yapımıdır. Odontoblastların morfolojik olarak dişin farklı bölgelerinde yapısı değişiklik göstermektedir. Kronda yüksek silindirik olan odontoblastlar, kökün orta kısmında silindirik, kökün uç kısmında ise kısa ve az çok kübik şekilde bulunmaktadır. Odontoblastlar tam kök ucunda düzleşir ve fibroblastlara benzer bir görünüm kazanırlar. Doku kesitlerinde odontoblastların görünüşü fiksasyon yapılan kısma, boyamaya ve kesit düzlemine göre değişir. Çoğu kez yalnız hücre çekirdeği görülebilir (13,17).

2.2.3.2 Fibroblastlar

Diş pulpasında en yoğun olan hücreler fibroblastlardır. Pulpa içindeki başlıca görevleri Tip I ve Tip III kollajenlerin sentezlenmesidir. Fibroblastlar pulpanın kollajen liflerinin yapımının yanı sıra bu lifleri çözdükleri için kollejenin dönüşümünden sorumludurlar. Pulpanın her tarafında görülürler. En çok hücreden zengin tabakada bulunurlar (13,17) Normal ışık mikroskobunda rutin preparatlarda fibroblast hücrelerinin gövdesi görülmez, yalnız uzun elips şekilde çekirdek görülür. Çekirdeğin uzunluğu 10-12 mikron kadar olup birkaç tane çekirdekçik içerir (22).

2.2.3.3 Makrofajlar

Pulpa bağ dokusunun makrofajları, kapiller dışına çıkmış monositlerdir. Fagositoz yaparlar. Bağ dokusu liflerine tutunarak sabitlenmiş olanlarına histiyosit denir (22). Çeşitli alt popülasyonlara farklılaşmışlardır. Bunlar immunohistokimyasal çalışmalarla antijenik özelliklerine bakılarak gözlenebilmektedir. Makrofajlar iltihabi uyarılarla uyarıldıklarında interlökin 1 (IL-1), tümör nekrozis faktör (TNF), büyüme faktörleri ve diğer sitokinleri içeren geniş çeşitlilikte çözünebilir faktörlerin üretimini sağlayabilirler (23).

2.2.3.4 Dentritik Hücreler

Antijen sunucu olan dentritik hücreler pulpa dokusundaki en fazla görülen immün sistem hücreleridir (24). Langerhans hücrelerine benzer olarak; yabancı antijenleri tutarak T hücrelerine taşırlar (19,23). Normal pulpada genelde koronal pulpanın periferinde predentine yakın yerdedirler, fakat antijenik durumlar sonrası pulpanın merkezine göç ederler (23). Dentritik hücrelerin sayısı makrofajlarından dört kat fazladır. Buna karşın pulpada bulunan makrofaj ve dentritik hücre sayısı pulpanın toplam hücrelerinin %8'ini oluşturur (19).

2.2.3.5 Lenfositler

T lenfositler normal pulpada az sayıdadırlar. Yaralanma veya immün cevap sonucu sayıları artar. B lenfositler uyarıldıklarında antikör üreten plazma hücrelerine (plazmosit) dönüşürler. Sağlıklı pulpada bulunmazlar (22,25).

2.2.3.6 Mast Hücreleri

Genellikle kronik iltihaplı pulpa dokusunda bulunan mast hücreleri sağlıklı dokuda nadir olarak görülür. Bu hücreler enflamatuvar reaksiyonlarda önemli rol

üstlenir (4). Sitoplazmik granülleri enflamasyon esnasında salgılanan histamin ve heparin içerir (22).

2.2.3.7 Nötrofiller

Sağlıklı pulpada bulunmayan nötrofiller pulpa enflamasyonu sırasında en yaygın görülen polimorfonükleer lökositlerdir. Eozinofil ve bazofiller nadir görülür (22).

2.2.3.8 Schwann Hücreleri

Schwann hücreleri pulpadaki sinirlerin aksonlarını sarar ve miyelini oluştururlar. Pulpadaki miyelinli ve miyelinsiz sinirlerin tümünde bulunurlar (22).

2.2.3.9 Perisitler (perivasküler hücreler)

Pulpanın damarlarını saran hücrelerdendir. Bu hücreler Rouget hücreleri, adventisyal hücreler, reserve hücre veya pluripotent hücre olarak da adlandırılır. Aktin ve miyozin filamentlerini barındırırlar. Bu yüzden kasılma özelliklerine sahiptirler. Protein salgısı yapan hücrelerin sahip olduğu organelleri vardır. Pulpadaki doku onarımlarında rolleri vardır (22).

2.2.3.10 Endotelyal Hücreleri

Bu hücreler tek katlı epitel hücrelerdir ve damar lümenini döşerler. Tip IV kollajen üreterek bazal laminaya katkı sağlarlar (22).

2.2.3.11 Farklılaşmamış Mezenkim Hücreleri

Pulpada, bütün bağ dokularında olduğu gibi diferansiye olmamış mezenkim hücreleri vardır ve bu hücreler pulpadaki hücreden zengin tabakanın çoğunu oluşturmaktadır. Bu hücreler yaralanma olduğunda makrofajlara dönüştükleri gibi, fibroblastlara, odontoblastlara ve osteoklastlarda dönüşebilirler (17).

2.2.4 Pulpa Lifleri

2.2.4.1 Kollajen lifler

Pulpada az miktarda kollajen lif bulunur. Bunlar pulpanın apikal bölgesinde, koronal tarafta dizilmiş şekilde, kalın ve yoğun bir görünüme sahiplerdir. Pulpanın

orta ve koronal bölgelerinde ise, rasgele dizilmiş şekilde, ince ve daha az yoğun olarak görülürler (20,26).

2.2.4.2 Retiküler lifler

Kollajenin değişimi ile olan lifler kan damarlarının ve odontoblastların etrafında bulunur. Liflerin büyük bir kısmı yalnız gümüşle boyanan preparatlarda görülebilir. Dentine yakın yerlerde daha sıktır ve bunlara Von Korff lifleri denir. Dentin yapımında rol oynarlar ve mineralize olmamış dentinde bulunurlar. Dentin yapımı devam ettiği müddetçe Von Korff lifleri odontoblast tabakasının hemen altında görülür. Pulpa hücrelerinden ince lifler halinde çıkarak pulpanın çevresinde gittikçe kalınlaşır ve odontoblast hücrelerinin arasından geçerek preentin tabakasına ulaşırlar. Spiral şekilde demetler yaparlar (13).

2.2.4.3 Olgun elastik lifler

Tip IV kollajen içeren ve pulpada damar çevresinde bulunan liflerdir (10).

2.2.4.4 Oksitalan lifler(Sarmal lifler)

Oksitalan lifler Tip VI kollajen olup preentinin odontoblastların farklılaşması aşamasında aralarında bulunur. Bunlarda Von Korff liflerinin kalıntıları olarak tanımlanabilmektedir (10).

2.2.5 Pulpanın kan damarlar

Pulpa kan damarları açısından zengin bir dokudur. Damarlar pulpaya genellikle apikal foramenden girerler. Bazende lateral ve aksesuar kanallardan kök kanalına ulaşırlar. Bir arter ve iki ven vardır. Arter buraya ulaştıktan hemen sonra birçok dala ayrılarak kanı pulpa odasına taşır. Venler de dallara ayrılarak buradan kanı toplayıp foramen apikalede daha geniş venlere taşırlar (27).

2.2.6 Pulpanın sinirleri

Olgunlaşmış bir dişte, miyelinli A_Δ(delta) ve miyelinsiz C olmak üzere iki çeşit duyu siniri vardır. A_Δ lifleri, impulsları C liflerinden daha hızlı ilettikler. A_Δ lifleri hızlı ağrı, C lifleri ise yavaş ağrı ile ilgilidir (28).

2.3 DENTİN TAMİR MEKANİZMASI

Diş pulpası tamir dentini oluşturarak, doğal bir doku onarımı yapabilme yeteneğine sahiptir. Tamir dentinogenezisi sırasında, maruz kalan alanındaki orijinal odontoblastlar yerini yeni farklılaşmış odontoblast benzeri hücrelere bırakırlar (29–32). Pulpa hasarına sebebiyet veren mikrobiyal, fiziksel ve kimyasal uyarılar ortadan kaldırıldıktan sonra, tamir süreci başlar ve bu süreçte kollajen sentezi hızlanır (10).

Dentin köprüsünün oluşumu iki aşamada gerçekleşmektedir. Dentin köprüsü oluşumunda erken dönemde pulpa kuafaj materyaline yakın olan sınırın (demarkasyon hattı) altında öncü hücreler mezenkimal hücre sayısında artışa neden olurlar ve odontoblast hücrelerine farklılaşma sinyalleri gönderilir. İki-üç günde arjirofilik lif sayısındaki artış ile beraber organize olmamış, kalın ve sağlam bağ dokusu lifleri, pulpa kuafaj materyalinin altında, ona paralel olarak uzanırlar (16).

Kollajen sentezindeki artış 3-7. günler arası devam eder. Zamanla arjirofilik lifler organize olup, kollajenin şekillenmesiyle birlikte; mevcut olan hücreden zengin tabakanın altındaki mezenkimal hücreler ve fibroblastların sayısı artar ve zamanla bu tabakadaki hücreler preodontoblastlara ve prizmatik şekilli odontoblastlara dönüşür. Daha alttaki arjirofilik liflerin sayısı artarak demarkasyon hattına dik bir şekilde organize olurlar. Sonrasında Von Korff lifleri adını alan bu lifler, yayılmaya ve kollajenin özelliklerini almaya başlarlar. Von Korff lifleri matriks içinde yayılımına düzensiz kollajen formasyonu ile birlikte devam eder. Yedi gün sonra yüzeysel ve fonksiyonsuz kapillerlerin bir bölümü veya tamamı tıkanmaya başlar. Böylece matriks daha da kalınlaşır (10,33–35).

Predentin oluşumu sonrası dentin köprüsünün kalsifikasyonu meydana gelir. Bazı dişlerde tübüler yapı oluşmaz, bu alanlarda primitif matriks düzensiz dentin şeklinde kalsifiye olur. Fakat daha sonra tübüler dentin şekillenir (30).

Dentin köprüsü oluşumunda bir komplikasyon meydana geldiğinde, bu durum tünel defektleri ve dentin köprüsü oluşumunun tamamlanamaması ile sonuçlanabilir. Bu da bakteriyel mikrosızıntıya ve pulpal nekroza ortam hazırlar. Araştırmacılar bu tür komplikasyonların gelişmemesi ve dentin köprüsü oluşumunun tamamlanması için pulpa kuafaj materyalinin doğru seçilmesi, bu tedavinin sadece

küçük pulpa açılmalarında tercih edilmesi ve kavitedeki debrisin mutlaka uzaklaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir (36).

Bazı araştırmacılar dentin köprüsü oluşumunu direkt pulpa kuafajı için başarı kriteri olarak görürken karşıt görüşlü araştırmacılar sağlıklı pulpa için dentin köprüsü oluşumunun zorunlu olmadığını savunmuşlardır (33,36).

2.4 VİTAL PULPA TEDAVİLERİ

Diş çürüğü, en sık görülen diş hastalığıdır. Diş çürüğünün dentindeki ilerlemesi durdurulamazsa pulpal nekroz meydana gelebilir ve bu nekroz ile diş kayıpları oluşabilir. Bu durum daha ileri tedaviler olan kanal tedavisi veya diş çekimi sonrası yapılacak olan implant tedavisini gerektirebilir. Bu sonuç hasta ve hekim konforunu olumsuz etkiler. Bu sebeple derin dentin çürüklerinin tedavisinde diş vitalitesini korumak önemlidir (37).

Vital pulpa tedavileri;

- İndirekt pulpa kuafajı
- Direkt pulpa kuafajı
- Vital pulpotomi
 - Parsiyel pulpotomi
 - Tam koronal pulpotomi olarak sınıflandırılmaktadır(38).

2.4.1 İndirekt pulpa kuafajı

İndirekt pulpa kuafajı, pulpa odasının açılmadığı derin çürüklü dişlerde dentin yapımını uyarmak için yapılan bir tedavi yöntemidir. Bu tedavinin uygulanabilmesi için klinik olarak pulpa dejenarasyonu ve radyografik olarak patolojik bulgular olmamalıdır (39).

2.4.2 Direkt pulpa kuafajı

Direkt pulpa kuafajı, herhangi bir nedenle pulpa odası açılmış olan dişin canlılığını koruyabilmesi için, dentin oluşturma yeteneğini kaybetmemiş pulpanın üzerinin dentin oluşumunu uyaracak bir madde ile örtülmesini kapsayan bir tedavidir (13). Direkt pulpa kuafajı; travma sonucu veya iyatrojenik olarak oluşan pulpa

perforasyonlarında, kök gelişimini tamamlamış veya tamamlamamış dişlere uygulanabilir (40).

2.4.2.1 Direkt pulpa kuafajı endikasyonları

- Diş vitalite testlerine olumlu yanıt vermelidir.
- Spontan ağrı olmamalıdır.
- Dişteki doku harabiyeti vital pulpa tedavisinden sonra restore edilebilecek düzeyde olmalıdır.
- Perküsyon ve palpasyon uygulamalarında ağrı olmamalıdır.
- İleri düzeyde periodontal doku kaybı olmamalıdır.
- Radyografik muayenede, intraradiküler ve periradiküler dokular normal izlenmelidir.
- Girişim sonucu pulpaya ait kanama 3-5 dakika içinde durmalıdır ve pü içermemelidir (40).

2.4.2.2 Direkt pulpa kuafajı kontrendikasyonları

- Spontan ağrı söz konusu olduğunda,
- Dişte mobilite gözleendiğinde,
- Diş vitalite testlerine geç yanıt verdiğinde veya hiç yanıt vermediğinde,
- Radyografik muayenede periodontal aralığın genişlemiş olduğu, pulpada veya periapikal dokuda yıkımın gözleendiği vakalarda,
- Perforasyon bölgesindeki kanama kontrol altına alınamayacak kadar çok olduğunda,
- Perfore olmuş pulpadan seröz veya pürülen eksüda çıktığında vital pulpa tedavisi endike değildir (40).

2.4.2.3 Direkt pulpa kuafajında dikkat edilmesi gereken faktörler

Direkt pulpa kuafajında başarıyı etkileyen ve dikkat edilmesi gereken faktörler;

- Pulpanın kontamine olmaması

Direkt pulpa kuafajı tedavisinde prognozu etkileyen en önemli faktörlerden biri pulpanın bakteriyel kontaminasyonudur. Bu duruma çürük, tükürük

kontaminasyonu ve dolgu ile diş dokusu arasında çeşitli nedenlerle oluşan mikrosızıntı neden olabilmektedir (40).

- Çevresinde çürük dentinin ya da eski restorasyonun bulunmaması

Direkt pulpa kuafajında kullanılan materyaller açılan pulpayı sızdırmaz bir şekilde örtmelidir. Tamir dentini oluşumunu sağlamalıdır. Direkt pulpa kuafajı yapılırken, perforasyon alanı yakınında çürük dentin varsa temizlenmeli ve eski restorasyon kaldırılmalıdır ki sızıntı olması engellenebilsin (13,41).

- Bireyin yaşı

Genellikle, pulpa kuafajlarında iyileşmenin yaşı insanlara oranla genç bireylerde daha iyi olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmacılar, yaptıkları çalışmalarında bireyin yaşının tedavinin başarısında önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır. Yaşı bireylerde pulpa hücrelerinin azalması, kan damarlarının ve odontoblastların sayısı ve kalitesinde olumsuz etkiler yarattığını belirtmişler (40,42); buna karşılık başka bir araştırmaya göre ise 25-50 yaşları arasında olan bireylerde yapılan klinik bir çalışmanın sonucunda yaşın önemli bir faktör olmadığı bildirilmiştir (43).

- Uygulama yapılan dişin süt ya da sürekli diş olması

Süt dişlerinde direkt pulpa kuafajı önerilmemektedir. Bunun nedeni pulpalarındaki farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin çürüğe ve direkt pulpa kuafajı materyaline karşı yanıt olarak, odontoklastik hücrelere dönüşmeleridir. Bu dönüşüm sonucunda, iç kök rezorpsiyonu, kronik pulpa enflamasyonu veya nekroz meydana gelebilir (44).

- Kanamanın kontrolü

Pulpanın perforasyonu odontoblast tabakasında harabiyete ve altında yer alan pulpa dokusundaki kapillerde kanamaya neden olur. Kanama miktarı açılan kan damarlarının sayısına ve yaranın genişliğine bağlıdır (45). Yapılan bir araştırmada, kanamanın olmadığı tedavilerin kanamanın olduğu tedavilere göre daha başarılı olduğu gösterilmiştir (45).

- Kuafaj materyalinin açılan pulpa yüzeyi ile olan teması

Direkt pulpa kuafajında kullanılan ajanların uygulama bölgesine hafifce yerleştirilmesi pulpa dokusunun içerilere itilmemesi açısından önemlidir. Böylece tamir dentini oluşumu olumsuz etkilenmez (46).

- Özel dentinojenik cevabı uyuracak materyalin seçimi

Direkt pulpa kuafajında kullanılan materyaller tamir dentin köprüsü oluştururken, pulpayı sızdırmaz şekilde kapatarak bakteri kontaminasyonundan korumalıdır. Birçok çalışmada materyallerin tamir dentini oluşturma özellikleri incelenmiştir (17,43).

- Kavite dezenfeksiyonu

Direkt pulpa kuafajının başarısı, tamir dentininin oluşumu ile pulpanın kendisini bakteriyal iritasyondan koruyarak canlılığını devam ettirmesine bağlıdır. Bunun için kavitenin dezenfeksiyonu sağlanmalı ve bakterilerin pulpaya ulaşması engellenmelidir (17).

2.5 PULPA KUAFAJ MATERYALLERİ

İdeal bir pulpa kuafaj materyali şu özelliklere sahip olmalıdır;

- Reperatif dentin formasyonunu stimüle etmeli,
- Pulpa canlılığının idamesini sağlamalı,
- Sekonder çürükleri önlemek için flor salınımı yapmalı,
- Bakterisidal veya bakteriyostatik olmalı,
- Dentine tutunmalı,
- Restoratif materyale tutunmalı,
- Restorasyonun yapım aşamasında ve sonrasında oluşan kuvvetlere karşı dayanıklı olmalı,
- Steril olmalı,
- Radyopak olmalı,
- Bakteriyel sızıntıyı önlemelidir (47).

Geçmişten günümüze kadar açık pulpalı dişlerin tedavisi için çok çeşitli maddeler kullanılmıştır. Uygulandığı bilinen ilk vital tedavi Phillip Pfaff'ın 1756'da, küçük bir altın yaprağını, pulpası açılmış olan vital bir dişe uygulamasıdır (48).

2.5.1 Pulpa kuafajında kullanılan materyaller ve özellikleri

2.5.1.1 Kalsiyum Fosfat Simanı

Kalsiyum fosfat simanı, biyouyumlu olması, yüksek sıkışma direnci ve hidroksiapatite dönüşebilmesi nedeniyle, uygun bir tedavi seçeneği olarak önerilmiştir (47).

2.5.1.2 Kalsiyum hidroksit

Direkt pulpa kuafajında pek çok pulpa kuafaj materyali kullanılmıştır. Kalsiyum hidroksit, uzun yıllardır pulpa kuafaj tedavisinde altın standart olarak kullanılmaktadır (49). İlk kez 1920'li yıllarda kullanılmaya başlayan kalsiyum hidroksit pulpa kuafajında en çok tercih edilen materyal olmuştur (50,51).

Kalsiyum hidroksit, yaklaşık 12,5-12,8 pH'ya sahiptir. Kimyasal olarak güçlü baz olan kalsiyum hidroksit, diş hekimliğinde direkt pulpa kuafajında, indirekt pulpa tedavisinde, apeksogenezisde, apeksifikasyonda, kök rezorpsiyonunda, iyatrojenik kök perforasyonunda, replante edilen dişlerde ve kök kanallarının dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır (52).

Kalsiyum hidroksitin yüksek alkali pH'sı antimikrobiyal özellikler açısından avantaj sağlamaktadır. Bakteriyel ürünlerinin asidik etkilerini nötralize ederek bu özelliğini göstermektedir. Harap olmuş pulpa dokusunun savunma ve tamirini uyarmaktadır. Ayrıca, kalsiyum hidroksitin büyüme faktörlerini ve mineralize dentinden biyoaktif dentin matriks komponentlerini ortaya çıkarması dentin rejenerasyonunu uyarmaktadır (53,54).

Kalsiyum hidroksit patının pulpayla temasıyla üç tabaka oluşur (55);

- Obliterasyon zonu: Uygulama sırasındaki basınç sonucu oluşan bu tabaka kalsiyum hidroksite en yakın tabakadır ve kalsiyum hidroksit parçaları, kan pigmentleri, kan pıhtısı içerir.

- Likefaksiyon(Erime) nekrozu zonu: Kimyasal etkiler sonucu oluşan bu tabakada plazma proteinleri, hidroksil iyonları tarafından parsiyel olarak nötralize edilmiştir. Böylece derin dokularda daha az kimyasal etki gözlenir ve bu tabakanın altında koagülasyon nekrozu zonu oluşur.

- Koagülasyon nekrozu zonu: Kalsiyum hidroksitin etkisi burada iyice azalmış olup, koagülasyon nekrozuyla birlikte tromboz görülür. Distrofik kalsifikasyon oluşumuyla mineralizasyon başlar. Mineral artışı, canlı dokularda yeni kollajen formasyonunu sağlar (56).

Kalsiyum hidroksitin yüksek pH'sı antibakteriyel etki göstermesini sağlar. Bu özelliği yapısından salınan hidroksil iyonlarına bağlıdır. Hidroksil iyonunun bakteriler üzerindeki etkisi bakteriyel sitoplazmik membranın parçalanması, proteinlerin denatürasyonu ve DNA'nın parçalanması şeklinde olur (57).

Kalsiyum hidroksit temas ettiği yüzeyde geçici bir koagülasyon nekroz tabakası oluşturmakta ve pulpa hücrelerini uyararak yeni osteodentin tamir dokusunun oluşumunu sağlamaktadır. Nekroz tabakası altındaki farklılaşmamış mezenkim hücreleri odontoblastlara dönüşmektedir ve 21 gün sonra kalsifiye dentin köprüsü meydana gelmektedir. Köprü oluşumu 12 ay boyunca sürmekte ve pulpa canlı kalmakta, enflamasyon görülmemektedir (56,58,59).

Biyoaktif moleküllerin salınması dentinogenezisi indükler. Dentinogenezis boyunca dentin matrikste çeşitli kompleks proteinler mevcuttur. Burada iki protein önemlidir. Kemik morfojenik protein (BMP) ve Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1) pulpa tamirini uyarır. Dentindeki bu proteinleri dentinden çözmesi ile bilinen kalsiyum hidroksit, bu biyoaktif moleküllerin salınmasını sağlar. Bu moleküller pulpa kuafajının yapılmasından sonra pulpa tamirinde önemli rol oynayan mediatörlerdir. Pulpa tamirini stimüle ederek dentin remineralizasyonunu sağlarlar (37,49).

Kalsiyum hidroksitin vital pulpa tedavi uygulamalarındaki başarısızlık nedenlerinden en önemlisi oluşan dentin köprüsünün genellikle pöröz yapıda olmasından ve dentin yüzeyine bağlanmamasına bağlı olarak uzun vadede mikrosızıntıya direnç gösteremeyip pulpayı yeterince koruyamamasından kaynaklanmaktadır (60,61).

Kalsiyum hidroksitin oluşturduğu reperatif köprü formasyonu 'tünel defektlerle' karakterizedir. Bu defektler, histolojik olarak hücrelerdeki sitotoksiteyi gösterir. Tünel defektlerin meydana gelmesi; sadece kalsiyum hidroksitin varlığıyla ilgili değildir, pulpada oluşan herhangi bir travma perforasyona sebep olur ve kan

gölcükleri görünür. Tünel defektlerde oluşan bu kan gölcükleri nekrotik dokulara kalsiyum sağlar. Nekrotik tabakada bulunan kalsiyum iyonları 'distrofik kalsifikasyonu'sağlar. Ancak sert doku bariyer oluşumundan sonra kalsiyum hidroksitin çözülmesiyle mikrosızıntı gözlenir. Bu durum mikroorganizmaların girişine neden olur ve kalsifiye köprü defekti oluşur (37).

2.5.1.3 Çinko Oksit Öjenol (ZOE) Simanı

Ağız içerisinde hızla bozulduğu, derin kavitelere pulpal iyileşmeyi uyardığı, analjezik ve antiseptik etkisi olduğu bildirilmiştir. Dentin kanallarını iyi tıkama kapasitesine sahiptir. Bakterilerin pulpaya geçişini azalttığı belirtilmiştir. Ancak dokulara direkt temas ettirildiğinde iritan olduğu, düşük dayanıklılığa sahip olduğu, abrazyona karşı düşük direnç gösterdiği ve parçalanma gibi dezavantajları olduğu bildirilmiştir (62).

2.5.1.4 Kortikosteroidler ve Antibiyotikler

Hidrokortizon, klindamisin, kortizon, Ledermix [prednizol eklenmiş $\text{Ca}(\text{OH})_2$], penisilin, neomisin, Keflin (sephalotin sodyum) gibi kortikosteroidler; pulpa enflamasyonunu engellemek ve azaltmak için kalsiyum hidroksit ile beraber uygulanmışlardır (47).

2.5.1.5 Polikarboksilat Siman

Polikarboksilat simanın antibakteriyel etkisinin olmadığı, ayrıca kalsifik köprü oluşturma yeteneğinin olmadığı bildirilmiştir (63).

2.5.1.6 İnert(tepkimeye girmeyen, etkisiz) Materyaller

Bhaskar ve ark., Heys ve ark., isobütil siyanoakrilat ve trikalsiyum fosfat seramiğini direkt pulpa kuafajı materyali olarak araştırmıştır. Pulpal yanıt enflamasyonda azalma, öngörülemeyen dentin köprüsü oluşumu şeklinde olsa da, bu malzemelerin hiçbiri uygulanabilir bir teknik olarak diş hekimliğine tanıtılmamıştır (50,64).

2.5.1.7 Kollajen

Dick ve Carmichael, kollajen liflerin kalsiyum hidroksite göre daha az irritasyon yarattığını ve mineralizasyonu desteklediğini ancak kalın bir dentin köprüsü oluşturmadığını bildirmiştir (47,65,66).

2.5.1.8 Adeziv Rezinler ve Bonding Ajanları

Kalsiyum hidroksit ile kıyaslandığında pulpa kuafaj özelliği zayıf olan adeziv rezinler ve bonding ajanlar ayrıca pulpa hücreleri için sitotoksiktirler. Bakteriyel kontaminasyonu yeterli ölçüde engelleyecek örtünmeyi sağlayamazlar (37).

2.5.1.9 Cam İyonomerler/Rezin Modifiye Cam İyonomerler

Cam iyonomerlerin bakteriyel kontaminasyon ve biyouyumlulukları direkt pulpa üzerine uygulanmadıklarında mükemmeldir. Dentine yakın elastisiteleri ve flor salınımları vardır. Direkt pulpayla temaslarında rezin modifiye cam iyonomerler; cam iyonomerlere göre daha toksiktir, köprü formasyonunda eksikliğe ve kronik inflamasyona sebep olurlar (47).

2.5.1.10 Büyüme Faktörleri

Dokuların yenilenmesini indükleyerek pulpa sağlığının korunmasına yardımcı olurlar. Ancak reperatif dentini uyarmada başarısızdırlar (47).

2.5.1.11 Enzimler, Matriks Komponentleri, Hormonlar

Pulpa hücrelerindeki nitrik oksit (NO) ve inflamatuvar sitokinlere karşı hemoksijenaz-1 ve simvatatin gibi ajanlar koruyucu rol oynarlar. Hücreleri, hidrojen peroksit(H₂O₂) kaynaklı oluşan sitotoksiteden ve oksidatif stresten korurlar. Antienflamatuvar etkilidirler. Anjiogenezisi stimüle ederler. Dentin formasyonunda odontoblast aktivitesini sağlarlar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda pulpada hasara sebep olabilirler (47).

2.5.1.12 Hidroksiapatit

Nötral pH (pH=7)'da biyouyumluluğu iyidir. Mineralize doku formasyonu sağlamak için kullanılabilir. Pulpada orta dereceli inflamasyonla yüzeysel nekroz oluşturur (47).

2.5.1.13 Kalsiyum Silikat Esaslı Materyaller

Kalsiyum silikat esaslı malzemeler son yıllarda popülerlik kazanmıştır ve pulpa kuafajı tedavilerinde kullanılabilir.

1) Biodentin

Mekanik özellikleri dentine benzeyen biyoaktif bir simandır ve bu sayede dentinin yerine kullanılabilir. Canlı pulpa hücreleri üzerinde pozitif etkileri vardır ve direkt ve indirekt pulpa kuafajı sonrası sert doku oluşumunu uyarmaktadır. Bu özellikleriyle kalsiyum hidroksite alternatif olarak gösterilmektedir (67,68). Ayrıca mekanik olarak güçlü olması, daha az çözünmesi ve daha sızdırmaz örtüleme sağlaması kalsiyum hidroksite göre avantajlı özellikleridir (69–71).

Biodentin iki komponentten oluşan bir materyaldir. Tozu trikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve zirkonyum oksit; likidi su, kalsiyum klorid (hızlandırıcı) ve modifiye polikarboksilat içermektedir. Biodentin, geleneksel kalsiyum hidroksit bazlı materyallere alternatif olarak tanıtılmıştır (67).

2) Mineral Trioksit Agregat(MTA)

Mineral Trioksit Agregat (MTA), dişhekimliği alanına 1993 yılında Loma Linda Üniversitesi'nde görev yapan Dr. Mahmoud Torabinejad tarafından lateral perforasyonların tamiri amacıyla üretilmesi ile sunulmuştur. Tip 1 Portland çimentosunun bir çeşidi olan MTA'nın içeriğinde trikalsiyum oksit, silikat oksit, bizmut oksit, trikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, tetrakalsiyum alimunoferrit gibi hidrofilik partiküller bulunmaktadır (72,73).

MTA ilk olarak kök kanal ucu dolgu materyali olarak kullanılmış (74), daha sonra pulpa dokusunun örtülmesi, furkasyondaki perforasyonların tamiri, iyatrojenik perforasyonların kanal içi tamiri, rezorbsiyon tedavisi, apeksifikasyon sırasında bariyer oluşturması gibi çeşitli klinik uygulamalarda da kullanılmıştır (75). Bu uygulamaların temelini MTA biyouyumluluğu, iyi örtme yeteneği, dental pulpa ve periradiküler dokuların yenilenmesini uyarma gibi özellikleri ile sağlamaktadır (76).

Materyalin, ilk olarak gri versiyonu üretilmiş, ancak dişlerde özellikle de ön dişlerde renklenmeye neden olduğu için, daha sonra diş renginde (beyaz) MTA piyasaya sürülmüştür (73). Üreticiye göre beyaz ve gri MTA'ların her ikisi de; trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), dikalsiyum silikat ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), trikalsiyum alüminat ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$), trikalsiyum oksit(Ca_2O_3), silikat oksit(SiO_2), kalsiyum sülfat dihidrat ($\text{CaSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Gypsum) ana bileşenlerinden oluşmaktadır. Materyale radyoopasite kazandırmak için, bizmut oksit (Bi_2O_3) katılmaktadır. İçerik olarak, beyaz renkli MTA'da tetrakalsiyum alüminoferrit ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) gibi demir

içerikli bileşenlerin olmadığı ve beyaz MTA'nın gri renkliye göre daha küçük partiküller içerdiği bildirilmektedir (77,78). Her iki versiyonun da ağırlık açısından kaba formulasyonu %75 Portland çimentosu, % 20 bizmut oksit ve % 5 alçı taşıdır (77).

Karışımın özelliğini etkileyen faktörler; toz/likit oranı, karıştırma metodu, kondanse ederken baskı uygulanması, çevrenin nemli olması, MTA'nın tipi, ortamın özelliği, çevrenin pH'sı, karıştırıcının tipi, karıştırma- kaviteye yerleştirme arasındaki zaman, materyal kalınlığı ve sıcaklıktır (79).

MTA'nın ortalama başlangıç sertleşme zamanı 165 ± 5 dakikadır (79). Ancak materyalin nihai sertleşmesi nemli bir ortamda 96 saat sonra olur (80,81). Sertleşme süresi; amalgam, SuperEBA, geçici restoratif materyalden uzundur (79). Gri MTA'nın başlangıç ve final sertleşme süresi beyaz MTA'ya göre daha uzundur. Cam iyonomer yerleştirilmesi planlanmış ise otoriteler, beyaz MTA'nın uygulamasından 45 dakika sonra cam iyonomer siman yerleştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Çünkü bu süre tamamlandıktan sonra cam iyonomer siman, MTA'nın sertleşme reaksiyonunu etkilemez (79,82). MTA'nın karıştırma süresi uzarsa, karıştırma sonrası dehidratasyon meydana gelir (83). MTA'nın karıştırma süresi diğer materyallere göre daha uzundur. Karıştırma süresinin 4 dakikadan az olması önerilir (83,84). Sodyum fosfat dibazik, kalsiyum klorit gibi bazı hızlandırıcı maddelerin eklenmesinin sertleşme zamanını düşürdüğü savunulur. MTA'ya sertleşme süresince asitle müdahale yapılmamalıdır (83,85). Ayrıca MTA'nın sodyum hipoklorit (NaOCl) jel veya %5'lik kalsiyum klorür (CaCl_2) ile karıştırılması sertleşme süresini kısaltır ancak MTA'nın basma direncini azaltır (86).

Çözünürlüğü çok düşük veya çözünmez olarak değerlendirilir (79). Suda çözünürlüğü; amalgam ve SuperEBA'nın çözünürlüğü ile kıyaslandığında önemli fark gözlenmemiştir (72). Yüksek likit/toz oranı; MTA'nın porözitesini ve çözünürlüğünü artırır. Fazla su kullanımı MTA'dan kalsiyum salınımını artırır. MTA'daki bizmut oksit suda çözünmez ve MTA'nın çözünürlüğünü azaltır. Yapılan çalışmalar beyaz MTA'nın fizyolojik solüsyona batırılmasından yedi gün sonra ağırlığının azaldığını, 30.gün sonunda ağırlığının arttığını göstermiştir. Bu ağırlık

azalmasının kalsiyum hidroksit salınımından, sonradan ağırlığın artmasının da apatit kristal formasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (79).

MTA karıştırıldığında pH değeri 10.2'ye kadar çıktığı, üç saat içinde pH'nın 12.5'e yükseldiği ve bu değerde kaldığı bildirilmiştir (72). MTA ve kalsiyum hidroksit materyallerinin benzer pH derecelerine sahip olması, her iki materyalin de direkt pulpa kuafajı uygulamasından sonra sert doku oluşumunu indükleme özelliğini artırdığını düşündürmektedir (72,87,88).

Kalsiyum hidroksit, SuperEBA, ZOE'den daha düşük antibakteriyel etkiye sahip olan MTA'nın bu etkisi yüksek alkalinite ile bağlantılıdır (89). Bakteriyel sızıntıyı önlemede etkinliği yüksek olan MTA, bazı fakültatif bakterilere karşı etkindir, ancak anaerobik bakterilere karşı etkisizdir (79,83,90). Beyaz MTA ve gri MTA benzer antibakteriyel aktivite gösterir (85).

Kalsiyum hidroksit pulpa dokusu ile temasında kalsit kristallerini oluşturur ve depolanmasını sağlar. MTA'nın kalsiyum hidroksit içermediği, ancak sertleşme reaksiyonundan sonra içerdiği kalsiyum oksit doku sıvılarıyla birleşerek kalsiyum hidroksit oluşturduğu belirtilmiştir. Bu kalsit kristallerinin de hücre adezyonu ve farklılaşmasından sorumlu fibronektini etkilediği bildirilmiştir. Fibronektin oluşumu, sert doku oluşumunda başlangıç aşamasıdır (83,91). MTA'nın osteokalsin ve alkalen fosfatazın; ayrıca interlökin 6 ve 8'in yapımında düzenleyici etkisi olduğu bildirilmiştir. Dentinojenik aktivitesiyle dentin dokusundan büyüme faktörlerinin salınımını sağladığı belirtilmiştir (92).

Faraco ve ark. (93), direkt pulpa kuafajı tedavisinde MTA ve kalsiyum hidroksit materyallerini köpek dişlerinde kullanmış ve MTA kullanılan grubun tamamında perforasyon alanının dentin köprüsü ile örtüldüğünü ve hiçbirinde pulpa iltihabı görülmediğini, ancak kalsiyum hidroksit kullanılan grubun %33'ünde dentin köprüsü izlenirken %75'inde pulpa enflamasyonu saptandığını açıklamışlardır.

Tziafas ve ark.(92), mekanik olarak ekspoz edilen pulpa üzerine direkt temas ettirilen MTA'nın erken dönemde meydana getirdiği pulpa hücre yanıtını ve dentinojenik aktivitesi köpek dişlerinde değerlendirdiklerinde, bu materyalin pulpa hücrelerinde fibrodentin ve daha sonra da reparatif dentin oluşumu ile sonuçlanan sitolojik ve fonksiyonel değişiklikleri uyardıkları görülmüştür. Reparatif dentin üç haftanın sonunda izlenebildiğini bildirmişlerdir.

MTA'nın yüksek maliyetinden dolayı alternatif materyal arayışları devam etmektedir. Bu nedenle MTA'nın ağırlığının yaklaşık olarak %75'ini oluşturan Portland simanı ve MTA ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda etkileyici sonuçlar elde edilmiştir (94–97). MTA'nın ambalajı açıldığı seansta kullanma zorunluluğu (87,97), sertleşmesinin uzun sürmesi, karıştırmadaki güçlüğü, kaviteye taşıma ve yerleştirme zorluğu gibi dezavantajları da olduğu belirtilmiştir (98).

3) Işıkla Sertleşen Trikalsiyum Silikat Siman

Bu simanın içeriğinde %45 mineral materyali (tip III Portland simanı), %10 radyoopak madde, %5 hidrofilik kalınlaştırıcı ajan (dumanlı silika -baryum zirkonat) ve yaklaşık olarak %45 rezin vardır. Resin içeriği, hem hidrofobik monomerlerden (UDMA, BisGMA, TriEDMA/ TEGDMA) hem de hidrofilik monomerlerden (HEMA, PEGDMA) oluşur. Sertleşmeden sonraki üçüncü saat-üçüncü gün arasında pH 10–11 iken, 7-14. günler arasında pH 8–8.5'a düşer (99).

Trikalsiyum silikat bazlı bir materyal olan MTA ve kalsiyum hidroksite göre daha az çözündükleri ve daha fazla kalsiyum saldıkları bildirilmiştir (99).

2.6 BİYOUYUMLULUK

Biyoyumluluk bir maddenin canlı dokularla temasında alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki yapmayan özelliklere sahip olmasını ifade eder (100). Toksikite ise tam tersine bir maddenin kimyasal yollarla biyolojik sistemlerde hasar oluşturabilme yeteneğini göstermektedir. Materyalin DNA yapısında oluşturduğu değişiklik genotoksikite, bunun sonraki nesillere aktarımı ise mutajenite olarak adlanmaktadır (101).

2.6.1 Biyoyumluluk Testleri

Dental materyallerin biyoyumluluk değerlendirmelerinde üç basamak tanımlanmıştır. Bunlar:

1. Başlangıç testleri (*in vitro* testler)

- Sitotoksikite
- Mutajenite-Genotoksikite
- Östrojenite

2. İkincil testler (hayvan testleri)

- Sensitizasyon
- İmplantasyon
- Mukozal irritasyon

3. Kullanım testleri

- Pulpa ve dentin testleri
- Pulpotomi testleri
- Endodontik kullanım testleri(102–104)

2.6.1.1 Başlangıç testleri (in vitro testler)

İn vitro testlerin amacı; maddenin canlı organizma dışında, dokunun üzerine veya içine konulmasıyla oluşabilecek biyolojik reaksiyonları araştırmaktır. Bunun için genellikle hücre kültürü ve bakteriler kullanılmaktadır. Maddelerin bakteriler üzerinde mutasyona neden olup olmadıkları değerlendirilebilir. Hücre kültürü çalışmalarında materyalin etkisini değerlendirirken hücre sayısı, büyüme oranı, metabolik fonksiyonu ve diğer hücresel fonksiyonlarına bakılır (100,105).

İn vitro hücre kültürü testleri uygulaması kolay, hızlı, tekrarlanabilir, kontrol edilebilir ve maliyeti daha düşük olan testlerdir. İn vitro çalışmalarda etik problemler yoktur. Sonuçları in vivo şartlarda oluşan sonuçlar ile karşılaştırıldığında yanıltıcı olabilir. Çünkü materyale karşı organizmada kompleks biyolojik cevaplar gelişir (100,105).

1) Sitotoksisite

Sitotoksisite, çeşitli moleküler olaylar neticesinde makromolekülerin üretiminin engellenmesi ve bunun sonucu olarak hücrenin yapısında ve fonksiyonlarında belirgin hasarlar oluşturmasıdır (106,107).

Sitotoksisite çalışmaları, bir materyalin sitotoksik potansiyelinin varlığının belirlenmesi için yapılır. Hücre temelli sitotoksisite deneyleri, gerek pratikliği, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyumluluğu sebebiyle, hayvan deneylerine alternatif olarak ortaya çıkarak toksikoloji laboratuvarlarında tercih edilir hale gelmiştir (108).

Sitotoksisite testinde; hücre kültürüne direkt veya indirekt temas ettirilen dental materyal veya yapısından salınan bileşenlerin etkileri değerlendirilir. Direkt temas yönteminde, hücreler materyalin üzerinde veya yanında gelişmekte ve biyolojik hücre ölümleri incelenmektedir. Suda çözünebilir materyallerde hücre ile materyalin direkt teması yeterli düzeyde olur. Suda çözünmeyen materyallerin hücre ile teması ekstrakt yoluyla sağlanır. İndirekt temas yönteminde; hücre ile dental materyal arasında agar, agaroz, dentin veya selüloz asetat filtre gibi bariyerler kullanılır. İndirekt yöntemde, bazı bileşenlerin geçişine izin veren ve dentini taklit eden insert sistemler kullanılmaktadır (105,107,109,110).

a) Sitotoksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde dört farklı test yöntemi kullanılmaktadır;

i. Canlılık testleri

Kültür içerisinde canlı kalan hücre oranının belirlenmesi için kolorimetrik ya da floresans ölçüm yapmaya izin veren testlerdir (111). Bu testler membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine giren tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile veya membran bütünlüğünü koruyan canlı sağlam hücrelerin içerisine giren diasetil florasan ya da nötral kırmızı gibi boyaların uygulanmasıyla yapılır (106,112).

ii. Yaşam testleri

Hücrelerin toksik etkiyle karşılaştıkları ilk birkaç gün veya sonrasında görülebilen, sadece ölü hücreleri inceleyen testlerdir (111). Bu sebeple canlılık oranının araştırılmasında, kısa dönemde meydana gelen toksisite reaksiyonlarda geri dönüşüm olabildiğinden uzun dönem testleri çalışılmaktadır (106,112). Hücre yaşamının incelenmesinde, hücrelerin düşük yoğunlukta koloni oluşturma yeteneği araştırılmaktadır (111).

iii. Proliferasyon testleri

Bu yöntem az sayıda örnek varlığında uygulanır. 3H-timidin ve Bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknikleri uygulanır. Materyal

bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisini saptamak için, kültürde bulunan hücrelerin birkaç gün sonra yapılan sayımda bulunan büyüme eğrisinden faydalanılmaktadır (111).

iv. Metabolizma testleri

Metabolizma testleri çoğunlukla daha hassas bir çalışmayı gerektirir. Bu yöntemde, hücrelerin proliferatif veya metabolik kapasiteleri ve enzim aktivite bozulması, mikropkara okuyuculu spektrofotometre vasıtasıyla ölçülerek tayin edilir. Bu yöntem sayesinde uzun dönem toksisite değerlendirilir. En önemlileri; MTT, LDH ve Alamar mavisi testidir (111).

MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi; vital bir boya olan tetrazolium bileşiği olan MTT'nin, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından çözünmez mavi renkli formazan ürününe dönüştürülmesi esasına dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Oluşan mavi renk direkt canlı hücre oranını verir (113,114).

MTT ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, dimetil sulfoksit (DMSO) ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (113,114).

2) Genotoksisite

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsar. DNA veya genomun kopyasının yapılmasında rol oynayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı

değişimlere neden olmasına genotoksik etki denir (114).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar veya mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler (114).

DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktöryal hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle genotoksisite testleri daha da önemli olmaktadır (114).

a) Genotoksisite Testleri

Genotoksisite testleri 1970'li yıllardan beri kullanılmakta olup günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş in vitro ve in vivo testlerden oluşurlar (114).

Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri ise insanda risk tayini için kullanılmaktadır (114).

i. Mutajenite Testleri Sınıflandırılması

- Primer DNA Hasarı Testleri
- Gen Mutasyon Testleri
- Kromozom Değişimlerini Tespit Eden Testler
- Morfolojik Dönüşümleri Tespit Eden Testler (114).

Genotoksik test yöntemleri ile tespit edilebilecek hasar tipleri;

- Direkt DNA hasarı
- Gen mutasyonları
- Yapısal kromozom hasarları
- Sayısal kromozom hasarları (114).

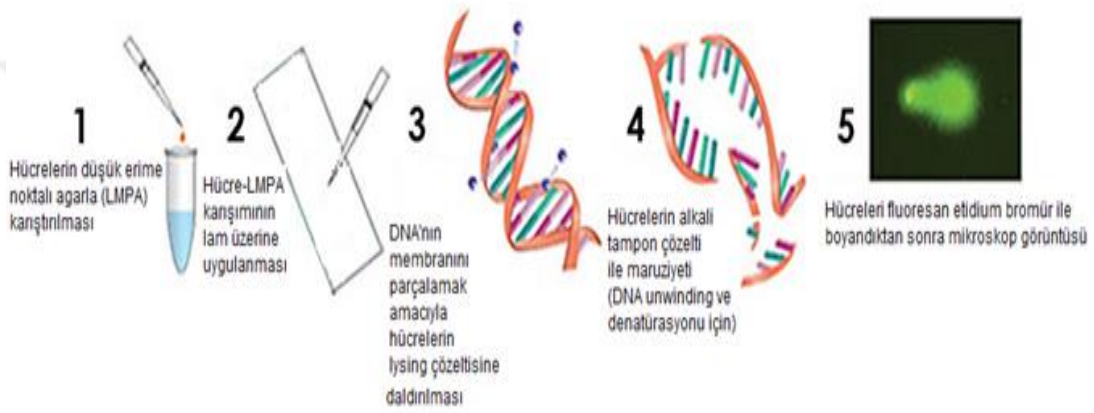
b) Genotoksik etkilerin araştırılması

Genotoksisite testleri genellikle DNA hasarına neden olan kimyasal maddelere maruziyetin biyogöstergesi olarak kullanılır. Alkali ortamda DNA elektroforezinin yapıldığı Comet yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi/ Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)) oldukça sık kullanılan yöntemlerdendir. Comet yönteminden elde edilen sonuçlar ile sağlık riskleri (kanser gibi) arasında bugüne kadar bir ilişki kurulamamış olmasına rağmen, maruz kalınan kimyasal maddenin genetik materyali etkileyebildiğini göstermeleri açısından biyoizleme çalışmalarında oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Comet testi, ökaryotik ve bazı prokaryotik hücreler olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde in vivo ve in vitro uygulanabilen, DNA hasarını ve onarımını belirlemek amacıyla kullanılan oldukça gelişmiş bir yöntemdir. Bu yöntem hızlı, hassas, kolay görülebilen, diğer yöntemlere kıyasla daha ucuzdur. Özellikle genetik toksikolojide ve insan biyoizlemeleri çalışmalarında önem kazanmış ve hızla yaygınlaşmıştır. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet tekniği, ilk olarak Rydberg ve Johanson (1978) tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulmuştur. Daha sonra Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizing ve elektroforez şartlarında uygulanır (115,116).

Comet yönteminde hücreler düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile önceden hazırlanmış lama yayılır. Yüksek tuz konsantrasyonunda bir deterjan madde ile hücreler parçalanır (Lizis). Hasarsız bir DNA, çekirdekdeki matriks proteinlerle oldukça organize bir yapıya sahipken DNA'da bir hasar meydana geldiğinde bu yapı bozular. Hasarlı DNA sarmalındaki zincirler kompakt yapılarını kaybeder ve gevşeyerek agar içindeki boşluklara yayılır. Spesifik bir pH'da DNA sarmalının gevşemesinin ardından elektroforez uygulanır (117).

Farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip negatif yüklü DNA fragmanları (kırık bulunan uçlar) elektroforez sırasında pozitif yüklü anota doğru göç ederler. Nötralizasyon işleminden sonra etidium bromür gibi DNA spesifik floresans boya ile boyanarak mikroskop altında incelenirler. Hasarsız DNA'larda kuyruk oluşmazken, çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift zincir kırığı oluşmuş ise kırılan DNA'lar farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından, DNA

molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda hareket floresan ederek çekirdekten dışarı doğru göçmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadır. Boyanan DNA'lar mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturdukları için bu yönteme kuyruklu yıldız anlamına gelen İngilizce "Comet Assay" adı verilmiştir (Şekil 2.1). Singh ve ark. tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Bu protokol, bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür (117,118).



Şekil 2. 1 Comet testinin yapılışı

Comet testinde DNA hasarının kantitatif saptanmasında; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu parametreleri kullanılır (117).

Alkali koşullarda yapılan Comet testi, DNA hasarlarından çift zincir kırılmaları, tek zincir kırılmaları, alkali işaretli bölgeler (alkali Comette tek zincir kırığına dönüşürler), oksidatif DNA baz hasarı, DNA-DNA/ DNA-protein/ DNA-ilaç çapraz geçişleri tayin edilebilir, DNA onarımı ölçülebilir. Nötral Comet testinde ise DNA'daki çift zincir kırıkları gözlemlenebilir (117).

2.6.1.2 İkincil testler(hayvan testleri)

Hayvan deneyleri, insanlarda oluşabilecek olası toksik etkileri önceden tahmin edilmesine yardımcı olur. Bir dental materyalin klinikte kullanılmasından önce, sistemik ve sitotoksik kapasitelerinin değerlendirilebilmesi amacıyla, laboratuvar hayvanlarının materyale maruz bırakılarak test edilmesi

gerekmektedir(107).

Biyouyumluluk için uygulanan hayvan testleri, araştırılacak materyalin bir hayvan, genellikle memeli, içerisine konulması sebebiyle in vitro testlerden farklılık gösterir. Hayvan testlerinde memeli bir canlının kullanılması, materyal ile biyolojik çevre arasındaki bir çok karmaşık etkileşimin meydana gelmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede, in vitro testlere göre daha uygun ve geniş kapsamlı biyolojik yanıt alınabilmektedir (100).

2.6.1.3 Kullanım testleri

Klinik ile en ilişkili testler kullanım testleridir. Kullanım testleri hayvanlar ve gönüllü insanlar üzerinde uygulanabilir. Anatomisi insana benzeyen, köpek ve maymun gibi daha büyük hayvanlar kullanım testlerine dahil edilmektedir (119).

İnsan sağlığını olası zararlı etkilerden korumak için, ISO yönergelerinde belirtilen biyouyumluluk test kademelerinin ilk 3 bölümünü(in vitro testler, hayvan testleri ve hayvan kullanım testleri) başarıyla tamamlayan materyaller ve tedavi yöntemleri hastalar üzerinde uygulanabilir (107).

Materyalin biyouyumluluğuyla ilgili en doğru bilgilerin edinildiği test türüdür. Ancak zaman gerektirmesi, pahalı olmaları, gönüllülerin klinik dışına çıkıldığında kontrol edilebilme zorluğuna bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya çıkması ve en önemlisi etik ve yasal problemler meydana getirmesi gibi dezavantajlarından dolayı klinik araştırmaların uygulaması güçtür. Kemik içi implant testi, pulpa irritasyon testleri, mukoza ve gingival kullanım testleri klinik araştırmalarda kullanılan yöntemlerdir (100,101,107).

2.6.2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı dokulardan mekanik olarak alınan doku parçalarının proteolitik enzimlerle hücrelerine ayrılarak laboratuvar ortamında kültür kaplarında uygun besi yerinde çoğalmaları esasına dayanır. Besleyici sıvılar; plazma ve serum amino asit ve mineralleri, hayvan embriyo ekstraktları, vitaminleri, şeker tuzları ve antibiyotikleri ihtiva etmektedir. Üreme sonucunda oluşan bu yapıya hücre kültürü denilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında primer, diploid ve devamlı olmak üzere üç çeşit hücre kültürü kullanılır (120).

Primer hücre kültürleri doku ve organlardan alınan hücrelerin 24 saatten fazla kültür edilmesiyle elde edilir. Primer hücre kültürlerinde üreyen hücreler buradan alınıp başka kültürlerle ekilip çoğaltılabilir. Bu yöntemle elde edilen ilk alt kültürlerle diploid hücre kültürleri denir. Bir seri kültür işlemlerinden sonra hücre hatları elde edilir. Devamlı hücre hatları süresiz üreyebilme özelliğine sahip dönüşüme uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir dış görünüme sahiptirler. Devamlı hücreler oluşan transformasyon nedeniyle in vivo özelliklerinin tümünü muhafaza edemezler. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir (106).

Tablo 1. Yaygın olarak kullanılan hücre hatları.

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

Dental materyallerin sitotoksikite testleri için hücre kültür testleri, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, dentin bariyer testi ve hemoliz testi kullanılır(121–123).

2.7 ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER

2.7.1 TheraCal LC®

TheraCal LC®, pulpa kuafaj tedavilerinde kullanılmak için tasarlanmış kalsiyum silikat dolduruculu rezin modifiye ışıkla sertleşen, radyopak bir materyaldir. Kalsiyum salınımı yapma özelliği bulunmaktadır ve restorasyonların altına kalsiyum hidroksit, cam iyonomer siman, çinko oksit öjenol ve diğer pulpa kuafaj materyallerinin yerine kullanılabilir. İçeriğinde polimerize olabilen metakrilat monomerleri (Bis-GMA ve polidimetilakrilat), kalsiyum oksit(CaO), tip

III Portland simanı(kalsiyum silika partikülleri), polietilen glikol dimetakrilat, baryum sülfat ve baryum zirkonat vardır (47,124).

İçerisindeki trikalsiyum silikat parçaları kalsiyum salınımını sağlar. Kalsiyum salınımı; hidroksiapatit ve sekonder dentin köprüsü formasyonunu uyarır. İyi bir örtücüdür ve pulpa perforasyonu olduğunda kullanılabilir. Çözünürlüğü düşüktür, derin dentin dokularına adezyonu iyidir (47).

TheraCal LC[®] ve MTA gibi materyallerin hızlı kalsiyum salınımı yapması, bu materyalleri geleneksel örtücü materyallere göre dentin tamiri ve iyileşmesinde üstün kılmaktadır ve yapılan çalışmalar pulpal iyileşmeyi daha etkin bir şekilde uyardığını ve daha az pulpa nekrozu oluşturduğunu belirtmektedir (125).

Yapılan bir araştırmada TheraCal LC[®], ProRoot MTA ve Dycal materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri karşılaştırılmış TheraCal LC[®]'nin; diğer materyallere oranla daha fazla kalsiyum salınımı yapabildiği ve daha az çözüldüğü bildirilmiştir. TheraCal LC[®]'nin 7 gün sonunda fizyolojik pH'a yakın bir pH oluşturabildiği öne sürülmüştür (99).

TheraCal LC[®], dentin sıvısını geçirebilen bir materyaldir. Bunun yanında, dentin sıvısını kolayca absorbe edebilmesi sonucunda kalsiyum ve hidroksil iyonları salınımı yapar. TheraCal LC[®]'nin alt yüzeyinde, hızla hidroksiapatit oluşumunun, materyalin sızdırmazlığını arttırdığı düşünülmektedir. Hidroksiapatit oluşumuna yardımcı olduğu ve biyoyumluluğu pulpa canlılığının korunmasında önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (99,126).

MTA'ya göre düşük biyoyumluluğa sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Odontoblast ve fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri nedeniyle daha fazla pulpal inflamasyona yol açtığını belirten çalışmalar mevcuttur. Bunun sebebi içeriğinde bulunan UDMA, TEGDMA, BisGMA gibi akrilik rezin monomerlerin olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber yapılan çalışmalarda MTA'nın, TheraCal LC[®]'ye göre yüksek oranda uygun kalsifiye bariyer oluşturduğu gözlenmiştir (127–129). TheraCal LC[®]'yi, MTA ve biyodentinle kıyaslayan başka bir çalışmada; TheraCal LC[®]'nin diğer materyallere göre mineralizasyonun daha düşük olduğu, tamamlanmamış köprü formasyonu gösterdiği bildirilmiştir. İçeriğindeki monomerlerin, dentindeki sialoprotein ve osteonektinlerin salınımını engellemesi mineralizasyonun az olmasının sebebi olarak gösterilmiştir (127).

2.7.2 2-Oktil Siyanoakrilat (DERMABOND™)

Siyanoakrilatlar doku yapıştırıcısı uzunca bir süredir kliniklerde kullanılmaktadırlar. 1951 yılında Coover isimli bir araştırmacı Tennessee Eastman şirketinde çalışırken yapıştırma özelliğini bulmuştur. Firma sonra Kodak şirketi ile anlaşarak ilk metil siyanoakrilatı yapıştırıcı olarak üretilip piyasaya sürmüştür ve Eastman 910 adını almıştır. Coover bu molekülün klinik uygulamalarda kullanmak için araştırma çalışmalarına başlamıştır. 1964 yılında FDA onayı alınan materyal klinik kullanıma sunulmuştur. 1970'lerde birçok ülkede N-butil siyanoakrilatın üretimi yapılmıştır. Histoacryl olan N-butil siyanoakrilat, 1980'lere kadar doku yapıştırıcı olarak kullanılmıştır. 1998 yılında DERMABOND™ üretilip FDA onayıyla klinik kullanıma sunulmuştur (130). 2-oktil siyanoakrilat molekülünden oluşan bir monomer yapıda doku yapıştırıcısıdır. Proteinli yüzeylerde hızlı polimerize olmasıyla güçlü, esnek ve resorbe olabilen bir yapışmaya neden olur. Biokompatibilitesi, içeriğindeki formaldehit ve siyanoasetat bileşenlerinin histotoksik etkileriyle ilgilidir (131).

Uzun zincirli siyanoakrilatlar, orjinal kısa zincirliye göre daha az reaktif yapıdadır. Zincir molekülü uzadıkça yıkım süresi uzamakta bu sayede toksik etkiler daha az oranda görülmektedir. Daha önceden kullanılan N-butil siyanoakrilata oranla kırılma gücü üç kat daha fazladır. Bu kırılma gücü 5/0 naylon sütürlere eşittir (131).

İn vitro çalışmalarda yüksek viskoziteli molekül, film tabaka sağlam kaldığı sürece antimikrobiyal bariyer olarak da etkinliği bildirilmiştir. DERMABOND™ klinik olarak daha çok deriyle ilgili küçük cerrahi işlemlerde sütürlerin yerine kullanılmaktadır. Uygulanacak yüzey materyalin akışını engellemek için horizontal düzlem haline getirilmelidir. Paketin kırılıp yüksek viskoziteli yapıştırıcı maddenin uygulanmasından sonra 30 saniye içerisinde ekzotermik reaksiyon oluşur ve polimerizasyon meydana gelir. Bu zaman zarfı içinde uygulanan bölge üzerine herhangi bir temas olmamalıdır (132).

2.7.3 Bio MTA +

Bio MTA+ Polonya menşeli bir şirket olan PPH CerKamed tarafından piyasaya sürülmüş bir MTA çeşididir. Toz ve likitten oluşmaktadır. Bio MTA+'nın,

toz içeriği kalsiyum oksit, hidroksi apatit, silikon, demir, alüminyum, sodyum, potasyum, bizmut, magnezyum, zirkonyum oksitleri ve kalsiyum fosfattan oluşmaktadır. Likit kısmı ise saf su ve kalsiyum katalizörü içerir (133).

Kök kanallarının dolgu ve remineralasyonu için kullanılır. Bio MTA+ sıvısı ile karıştırıldığında çalışma süresi yaklaşık dört dakikadır ve karışım iki saat içerisinde tamamen sertleşir. Yüksek miktardaki kalsiyum iyonları diş dokusunu remineralize eder. Silikon ve kalsiyum bileşimi perforasyon ve internal kanal rezorbsiyonu sonra doku rejenerasyonunu destekler. Bio MTA+ kemiklerin doğal komponenti olan hidroksi apatit içerir. Bu da karışımı kemik yapıya mükemmel bir şekilde birleştirir. Bio MTA+ şu durumlarda önerilir;

- Kök kanal duvar derforasyonu,
- İnternal kanal rezorbsiyonu,
- Posterior kök apeksinin doldurulması,
- Direkt pulpa kapaması,
- Pulpa amputasyonu,
- Kök gelişimi tamamlanmamış dişlerin tedavisinde kullanılır (133).

Bio MTA+ kök kanal dolgusunda tek başına kullanımı uygun değildir. İki komponenti karıştırıldığında kullanılan el aletinin üzerinde kalan, kolayca ayrılmayan yoğun bir plastik ve yapışkan kıvama sahip olur. Bu da geleneksel MTA ya göre kullanım kolaylığı sağlar. 30 saniye boyunca likit ve toz karıştırılır. Modelleme hamuru kıvamına geldiğinde uygulanır ve sadece kendi likiti ile karıştırılır. 4 dakika içerisinde uygulanmalıdır. Bu sürenin sonunda sertleşmeye başlar (133).

2.7.4 Kerr Life

Kalsiyum hidroksit içeren bir baz ve bir katalizörden oluşan iki tüplü bir paktır. Patların kullanılmadan hemen önce bire bir oranında 10 saniye karıştırıldıktan sonra uygulanması önerilmiştir. Diş pulpasını kullanılan dolgu materyallerinin etkilerine, ısıya karşı koruduğu üretici firma tarafından belirtilmiştir. Ayrıca tedavi esnasında oluşan basınçlara ve asit etching uygulamasına dirençli olduğu ifade edilmiştir (134).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada sitotoksisite ve genotoksisite testi için kullanılan materyallerin içerikleri ve üretici firmaları Tablo 2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmamızda kullanılan malzemelerin içerikleri ve üretici firmaları.

PULPA KUAFAJ MATERYALLERİ	İÇERİK	ÜRETİCİ FİRMA
DERMABOND™	2-Oktil siyanoakrilat-Dengeleyici-Renklandırıcı	Ethicon Inc., ABD
TheraCal LC®	Mineral materyal(Tip III Portland siman) - Radyopak komponent - Hidrofilik yoğunlaştırıcı ajan - Metakrilik rezin	Bisco Inc., ABD
MTA+	Toz: Trikalsiyum silikat - Dikalsiyum silikat Trikalsiyum aluminat - Bizmut oksit - Gypsum Likit: Distile su	Cerkamed Polonya
Life	Kalsiyum hidroksit - Çinko oksit - Çinko Stearat Etil Toluen Sülfonamid - Titanum Baryum Sülfat – Metilsilikat Pigment - Polimetilen salisilik asid	Kerr Inc., ABD

Çalışmada kullanılan materyallerin fare fibroblastları üzerine olan sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

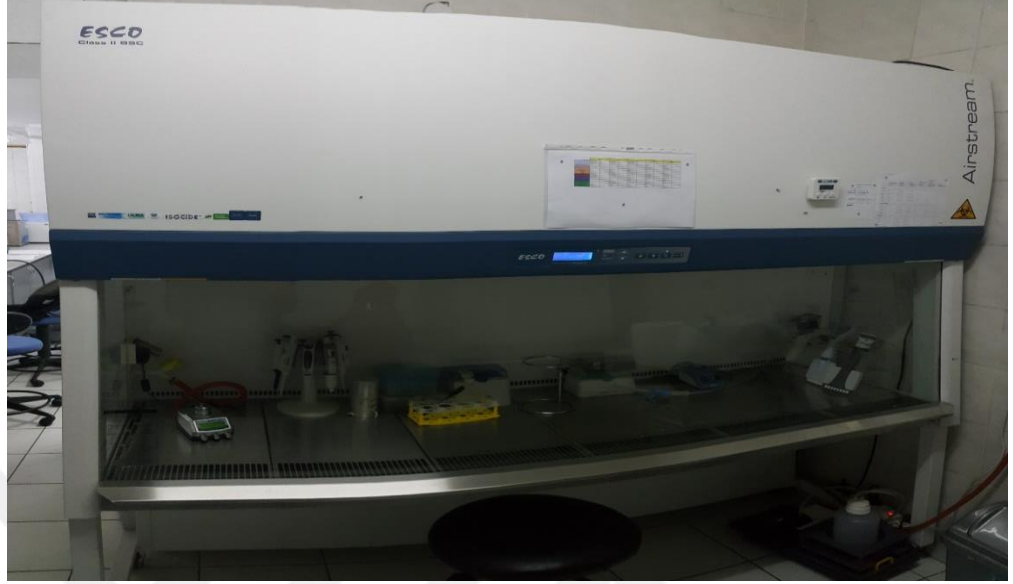
- Test örneklerinin hazırlanması
- Fare fibroblast hücre kültürünün hazırlanması ve stoklanması
- Kullanılacak materyallerin test örneklerinin MTT testi ile fare fibroblast hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi
- Kullanılacak materyallerin fare fibroblast hücre kültürü üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi

3.1 Test materyallerinin hazırlanması

Bu çalışmada pulpa kuafaj materyali olan BioMTA+, DERMABOND™, Well-Root ST, TheraCal LC® ve kontrol grubu olarak da Kerr Life test edildi.

Araştırmada kullanılan bütün materyal örnekleri steril çalışma kabini(Esco, Class II Biological safety Cabinet, Singapur) içerisinde üretici firmaların önerileri dikkate alınarak hazırlandı (Şekil 3.1). Materyallerin örnek boyutları belirlenirken,

yüzey/vasat oranının 0.5-6cm²/ml olması ve salım aşamasında kültür medyumunun örnek yüzeyi ile tamamen teması amaçlandı. Materyaller 24'lük plakaların tabanını tamamen kaplayacak şekilde yerleştirildi.



Şekil 3. 1 Steril çalışma kabini(ESCO Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)

Sitotoksinite testleri için örneklerin başlangıç sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı.

3.1.1 Bio MTA+ Materyalinin Hazırlanması

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda MTA ile distile su steril bir metal spatül ile steril cam üzerinde karıştırıldı. Karışım homojen bir hal alınca kadar bu işleme devam edildi. Steril edilmiş başka bir el aleti ile elde edilen karışım 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve kondanse edildi. Distile su ile nemlendirilen karışımın sertleşmesi için beklendi.(Şekil 3.2)



Şekil 3. 2 Cerkamed BioMTA+

3.1.2 DERMABOND™ Materyalinin Hazırlanması

Bu materyal doğrudan kullanıma hazır bir formülasyona sahiptir. Steril ortamda materyal 24 kuyucuklu plakaların tabanına yerleştirildi.(Şekil 3.3)



Şekil 3. 3 DERMABOND™

3.1.3 TheraCal LC® Materyalinin Hazırlanması

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda materyal 24 kuyucuklu plakaların tabanına eşit ve homojen bir şekilde uygulandı. 1 mm kalınlıkta uygulanan materyal led ışık kaynağı ile (Woodpecker LED-B Işık cihazı, Guilin Woodpecker Medikal Endüstri, Ltd, Guangxi, Çin) 20 saniye boyunca polimerize edildi. Ardından polimerize olmuş tabakanın üzerine materyal tekrar 1 mm kalınlığında uygulandı ve 20 saniye boyunca polimerize edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 TheraCal LC®

3.1.4 Life Materyalinin Hazırlanması

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda bir ölçek baz ile bir ölçek katalizör steril bir metal spatül ile steril cam üzerinde karıştırıldı. Karışım homojen bir hal alınca kadar bu işleme devam edildi. Steril edilmiş başka bir el aleti ile elde edilen karışım 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve kondanse edildi. Distile su ile nemlendirilen karışımın sertleşmesi için beklendi.(Şekil 3.5)



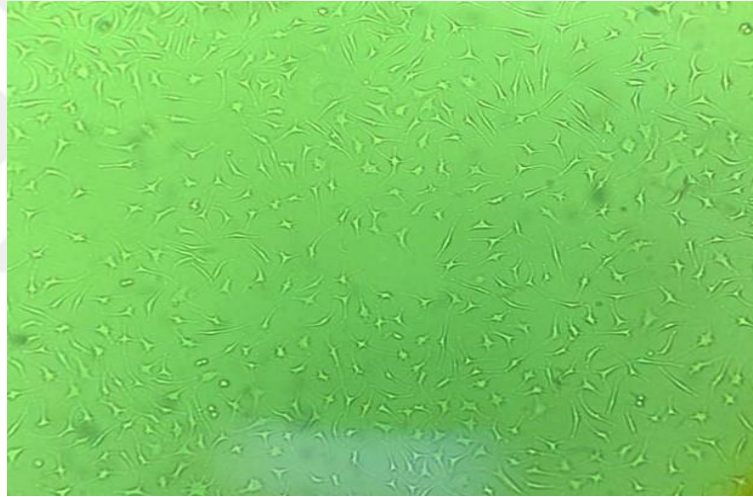
Şekil 3. 5 Kerr Life.

24 kuyucuklu plakalara yerleştirilen tüm örnekler sertleşmesi için 37°C', 95% nemde 24 saat bekletildi. Daha sonra sitotoksisite ve genotoksisitede

kullanılacak ekstraktların elde edilmesi için örneklerin üstüne herbir kuyucuğa 2mL gelecek şekilde DMEM eklendi. Ekstraktların elde edilmesi için 24 kuyucuklu plaka 37°C’de 24 saat, bir hafta ve iki hafta süreyle hücelere uygulama yapılana kadar etüvde bekletildi. Bu aşamadan sonra maruziyet için 24. saatte, birinci haftada ve ikinci haftada kuafaj materyalleri ile maruz bırakılan DMEM, 0.22µm por büyüklüğüne sahip filtrelerden geçirilip toplam 3ml’ye tamamlanarak MTT ve Comet testlerinde hücelere uygulandı.

3.2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü testi; L929 hücreleri (NCTC CLONE 929, ATCC, Almanya) (Şekil 3.6) kullanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.



Şekil 3. 6 Fare fibroblast hücreleri(L929)

3.2.1 Kullanılan cihazlar:

- CO2 inkübatörü (Şekil 3.7)



Şekil 3. 7 Karbondioksit inkübatörü(Heal Force HF240, Çin)

- Santrifuj



Şekil 3. 8 Santrifuj cihazı(Hettrich Rotina 90, Almanya)

- pH metre



Şekil 3. 9 pH metre cihazı(WTW pH 330i, Almanya)

- Hücre sayım cihazı



Şekil 3. 10 Hücre sayım cihazı(Bio-Rad TC20, Singapur)

- İnvrted mikroskop



Şekil 3. 11 İnvrted Mikroskop(Micros MCX 7600,Avusturya)

- Floresan Mikroskop (Comet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)



Şekil 3. 12 Floresan mikroskop(Leica PM 1000, Almanya)

- Multiplaka okuyucu (Spektrofotometre)



Şekil 3. 13 Multiplaka okuyucu(Thermo Scientific Mutiskan Co., Finlandiya)

- Plaka çalkalayıcı



Şekil 3. 14 Plaka çalkalayıcı(Heidolph Titramax 101, Almanya)

- Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
- Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C),(Scancool, Almanya)
- Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
- Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
- Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
- Buz makinası (Hoshizaki ,Avrupa)
- Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)

3.2.2 Kullanılacak malzemelerin hazırlanması:

- DMEM medium: Kültür medyasının içerisine %10 Fetal Calf Serum(FCS), %1 Penisilin-streptomisin (Pen Strep, Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ilave edildi. +4 °C’de saklandı. Deney esnasında 37 °C’ye getirilerek kullanıldı.
- MTT Çözeltisi: 5 mg MTT tartılarak steril PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD) içerisinde çözüldü ve 5 mL’ye tamamlandı. +4 °C’de en fazla 1 ay saklanır.
- Lizing çözeltisi: 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂ EDTA tartıldı

ve distile suda çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve %10 DMSO ilave edilerek +4 °C'de soğuması sağlandı.

- Nötralize lysing çözeltisi: 0,4 M Tris distile suda çözülerek pH:10'a ayarlandı, oda sıcaklığında saklandı.
- Elektroforez çözeltisi: 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH distile suda çözülerek pH>13'e ayarlandı, +4 °C'de saklandı.
- Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltilerden 100 ml hazırlandı, oda sıcaklığında saklandı. Bu stok çözeltilerden boyama esnasında 20 µg/ml hazırlanarak her bir lama 60 µl damlatılarak kullanıldı.
- Düşük erime noktalı agar (LMA): %0,75'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. +4 °C'de saklandı. Deney esnasında çözülerek 37 °C'ye getirilerek kullanıldı.
- Normal erime noktalı agar (NMA): %1'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti henüz sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplandı ve kurutuldu.

Sitotoksitesite testlerinde kullanılmak üzere, içeriğinde Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, ABD), %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biowest, Nuaille, Fransa), %2 NaHCO₃ (%5,5 konsantrasyonunda), 4X penisilin (400 IU/ml)/streptomisin (400 µg/ml) olan hücre besiyeri hazırlandı.

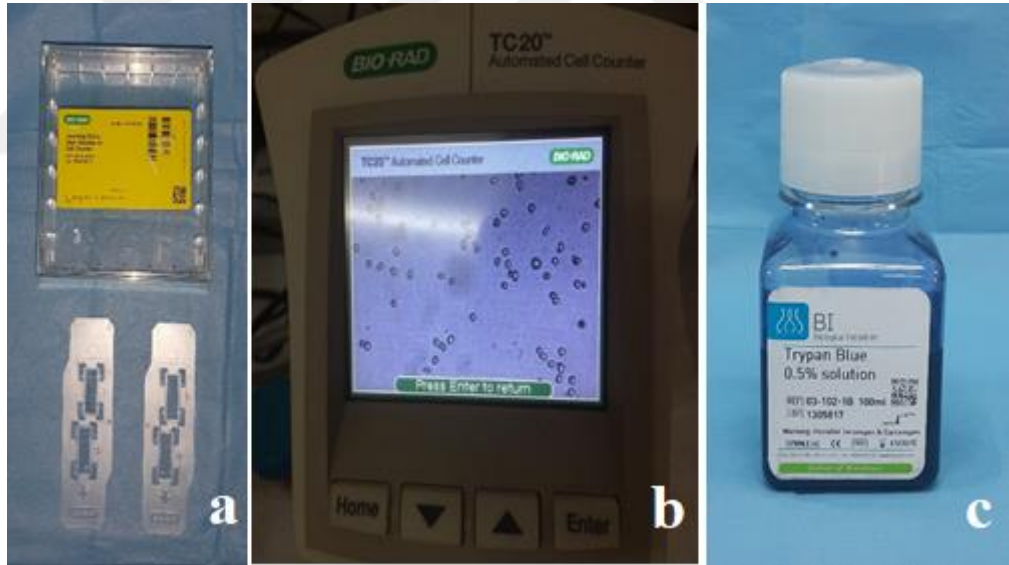
3.2.3 L929 hücrelerinin Pasajlanması

Çalışma süresince kullanılacak L929 hücre serisinin devamının sağlanması ve canlılığının korunması için pasajlar yapıldı. Hücrelerin yapışarak çoğaldığı hücre kültür kabındaki (flask) besi yeri aspire edildi. 2 ml steril PBS (37°C) ile yıkandıktan sonra, PBS aspire edildi. Sonra 2 ml Tripsin/EDTA solüsyonu (%0,05trypsin + %0,02 EDTA, Biological Industries, Beit-Haemek,İsrail) ilave edildi. Tripsin ilavesinden sonra 37° C'de 3 dk inkübatörde bekletilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Daha sonra Tripsinin çalışmasını engellemek için 2 ml Tripsin nötralizasyon çözeltisi (TNS) ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Oluşan bu 4 ml'lik hücre süspansiyonu pastör pipet ile 15ml'lik tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 1000 rpm 6 - 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu tüpün dibinde

görünen pellete dokunmadan üst fazı pastör pipet ile alınıp, atıldı. Pelletin üzerine bir miktar (yaklaşık 2 ml) DMEM medyum ilave edildi. Pastör pipet ile çek-bırak şeklinde karıştırıldı ve hücre sayımı TC-20 cihazında yapıldı. Yeni pasaj için 5ml DMEM medyum içerisinde 500.000 hücre olacak şekilde flaska konuldu. Hücre kültür kaplarındaki hücre çoğalması izlenerek bu işlem tekrarlandı ve hücre kültür serisinin devamlılığı sağlandı.

3.2.4 Canlı Hücre Sayımı (Tripan Mavisi Boya Atılım Testi)

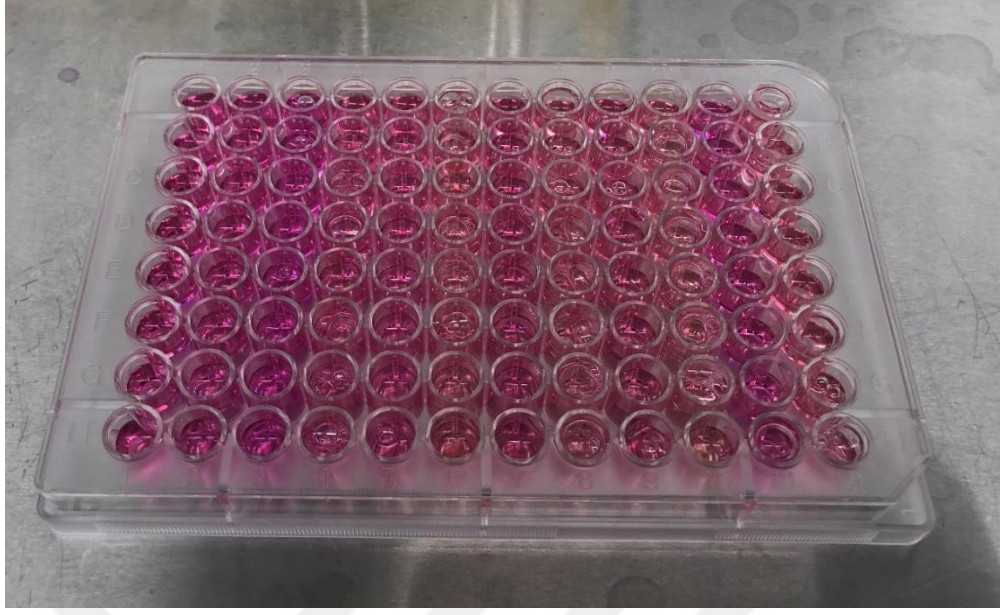
Çalışmamızda kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya atılım yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde; hücre süspansiyonu %0.4'lük tripan mavisi (Biological Industries, Beit-Haemek, İsrail) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, sayım lamı üzerine yüklenerek TC-20 cihazı ile hücre sayımı yapıldı.



Şekil 3. 15 a) Sayım Lamı, b) Hücre sayım cihazı TC-20, c) Tripan mavisi

3.2.5 MTT Testinin Uygulanması

Kuafaj materyallerini besi yerine maruz bıraktıktan 24 saat, bir hafta ve iki hafta sonra, flasklarda çoğalan hücreler sayıldı. Elde edilen L929 hücreleri, her kuyucuk başına 5×10^3 hücre/100 μ l olacak şekilde hazırlanarak 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna ilave edildi. Sitotoksitesinin 2. günü hazırlanan %5 DMEM medyum içerisindeki kuafaj materyalleri hücrelere uygulandı.



Şekil 3. 16 96 kuyucuklu plakaya hücrelerin ekimi

Kuyucuklar içerisindeki % 5 DMEM medyumları aspire edildi. Plakanın 1. ve 2. Sütunlarına hücre içermeyen besi yeri, 3. Sütununa besi yeri (DMEM) içerisinde hücre konuldu. 2. ve 3. sütunların absorbanlarının farkı kontrol olarak kullanıldı. 180 µl DMEM eklendi. Plakanın 4. ve 5. Sütunlarına sırasıyla TheraCal LC® ve TheraCal LC® 1:2 DMEM dilüsyonu konuldu. Plakanın 6. ve 7. Sütunlarına sırasıyla BioMTA+ ve BioMTA+ 1:2 DMEM dilüsyonu konuldu. Plakanın 8. ve 9. Sütunlarına sırasıyla DERMABOND™ ve DERMABOND™ 1:2 DMEM dilüsyonu konuldu. Plakanın 10 ve 11. Sütunlarına sırasıyla CaOH₂ ve CaOH₂ 1:2 DMEM dilüsyonu konuldu. Plakanın 12. sütununa hücre içermeyen besi yeri konuldu (Şekil 3.16). Dilüsyonlar için test edilecek materyallerin maruz bırakıldığı besi yerleri, %5'lik DMEM ile aynı oranda seyreltilerek hazırlandı.

Tablo 3. 96 kuyucuklu plakada ekstraktların yerleşim şeması.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
B	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
C	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
D	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
E	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
F	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
G	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM
H	DMEM	DMEM	Hücre+DMEM	TheraCal	TheraCal 1:2	MTA	MTA 1:2	Dermabond	Dermabond 1:2	CaOH2	CaOH2 1:2	DMEM

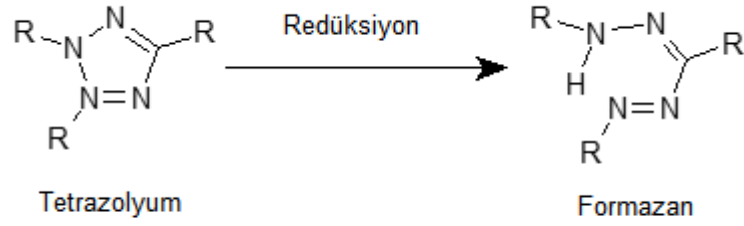
Böylece, test materyallerinin L929 hücreleri üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkilerine ait plak düzeni oluşturuldu. Tüm işlemler, toplamda üç adet mikrolakaya benzer şekilde uygulandı. Hazırlanan üç mikrolak, üç farklı sürede (24 saat, 7 gün ve 14 gün) 37 °C’de, %5 CO₂’li ve %95 nemli ortamda inkübe edilerek, test materyallerinin L929 hücreleri üzerindeki süreye bağlı sitotoksik etkilerine ait çalışma düzeneği oluşturuldu.

İnkübasyonlardan sonra hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı.

Test materyalinin eklenmediği grup, kontrol grubu olarak kullanıldı. Kuyucuklar içerisindeki DMEM aspire edildi. Her bir kuyucuğa 20 µl MTT çözeltisi (5 mg/mL PBS içerisinde) içerecek şekilde toplam 200 µl besi yerleri ilave edildi, çalkalandı ve 37 °C’lik CO₂ inkübatöründe 2-3 saat bekletildi.

MTT solüsyonunun, canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristallerine dönüştürülmesi ve formazan kristallerinin DMSO içinde çözündürülerek absorbans değerlerine bakılması sonucu, hücre canlılığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlandı.

Tablo 4. Tetrazolyum tuzunun Formazan kristaline indirgenmesi



Belirtilen saatin sonunda CO₂ inkübatöründen çıkartılan plakalar içerisindeki medyum aspire edilip kuyucuklara 200 µl DMSO ilave edildi. Homojenliği sağlamak amacıyla plakalar 10 dakika boyunca mikropilaka çalkalayıcısında çalkalandı (Şekil 3.17).



Şekil 3. 17 Çalkalayıcıda plakaların çalkalanması.

Bu sürenin sonunda her bir kuyucuk 570nm’de spektrofotometre ile ölçüldü (Şekil 3.18).



Şekil 3. 18 Plakaların spektrofotometrede okunması

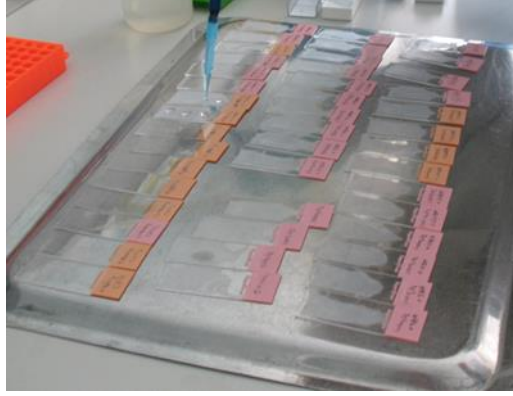
Her bir materyal ve dilusyonları için kullanılan üçer adet plaka kuyucuklarındaki absorbans değerleri, kontrol kuyucukların absorbans değerleriyle karşılaştırıldı ve test materyallerinin ve dilusyonlarının canlılık değerleri yüzde (%) olarak şu şekilde formüle edildi:

$$\text{Canlılık(\%)} = \frac{\text{Absorbans(örnek)}}{\text{Absorbans(kontrol)}} \times 100$$

Test kimyasallarının hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri grafik yardımıyla gösterildi.

3.2.6 Comet Testi

Kuafaj materyallerini besi yerine maruz bıraktıktan 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta sonra, flasklarda çoğalan hücreler sayıldı. 6 kuyucuklu plakalara 10^5 hücre/1 mL olacak şekilde ekildi. Hücreler plakalardan tüplere alındı. Her bir lamda 10.000-20.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak 50 µl hücre süspansiyonu ile 37°C'de eritilmiş 100 µl % 0.5'lik LMPA, karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı (Şekil 3.19).



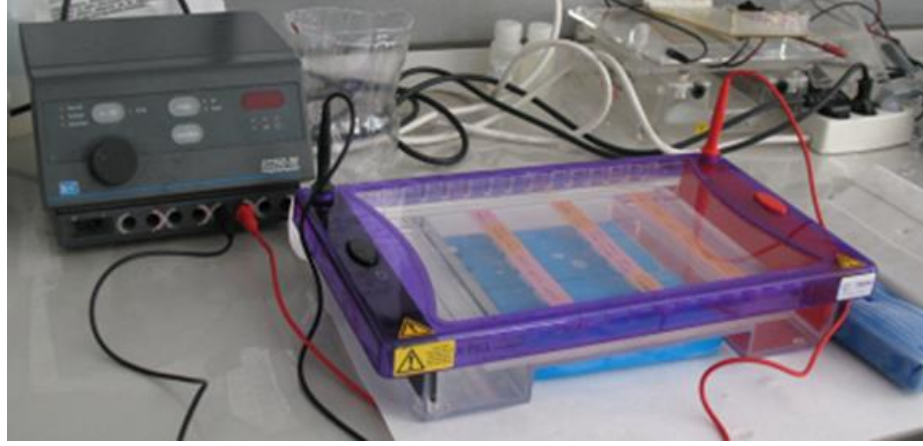
Şekil 3. 19 Hücrelerin lamlara yayılma aşaması

Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lising çözeltilisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi. Lamların üzerini 0,5-1 cm geçecek kadar olması sağlandı (Şekil 3.20). Lising çözeltilisinden çıkarılan lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi



Şekil 3. 20 Hücrelerin lising solusyonunda bekletilmesi.

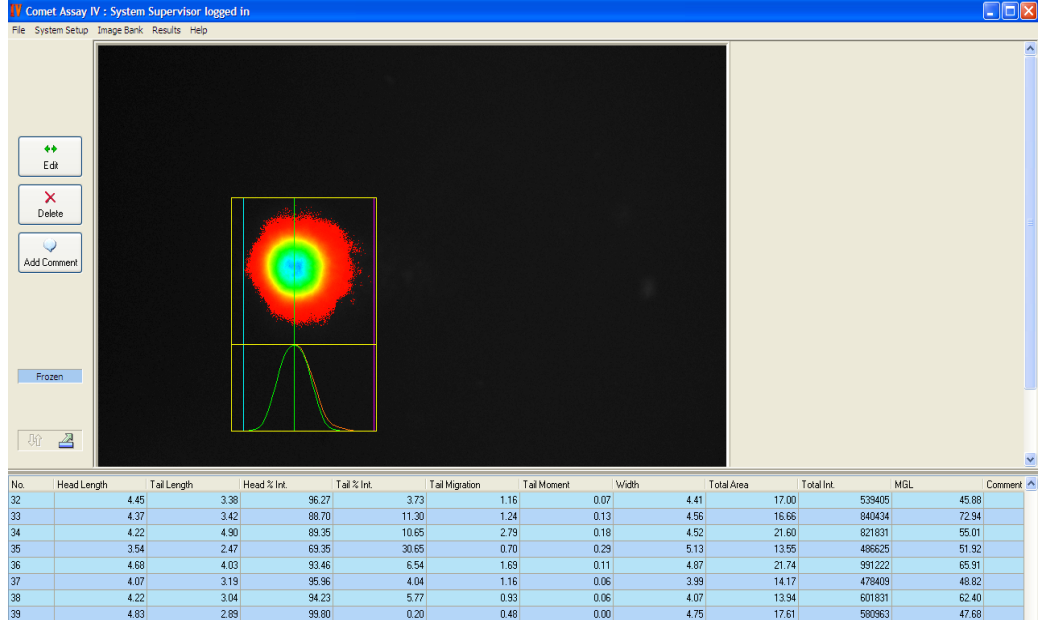
Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltilisi ile uygun miktarda dolduruldu. Lamlar, 20 dakika akım uygulamadan bu çözeltide bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı (Şekil 3.21).



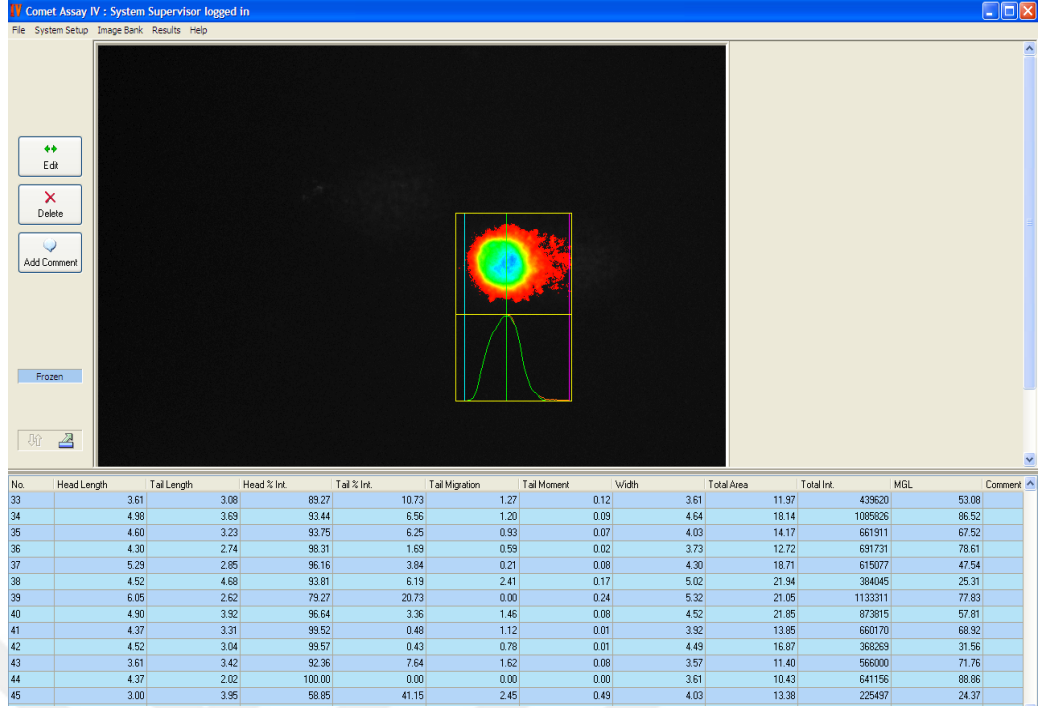
Şekil 3. 21 Alkali solüsyon elektroforez uygulaması.

Elektroforez aşaması bittikten sonra elektroforez tankından çıkarılan lamalar üç kez nötralizasyon çözeltisi ile yıkandı. Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla alkol içerisine daldırılan lamalar okuma yapıncaya kadar nemli ortamda saklandı.

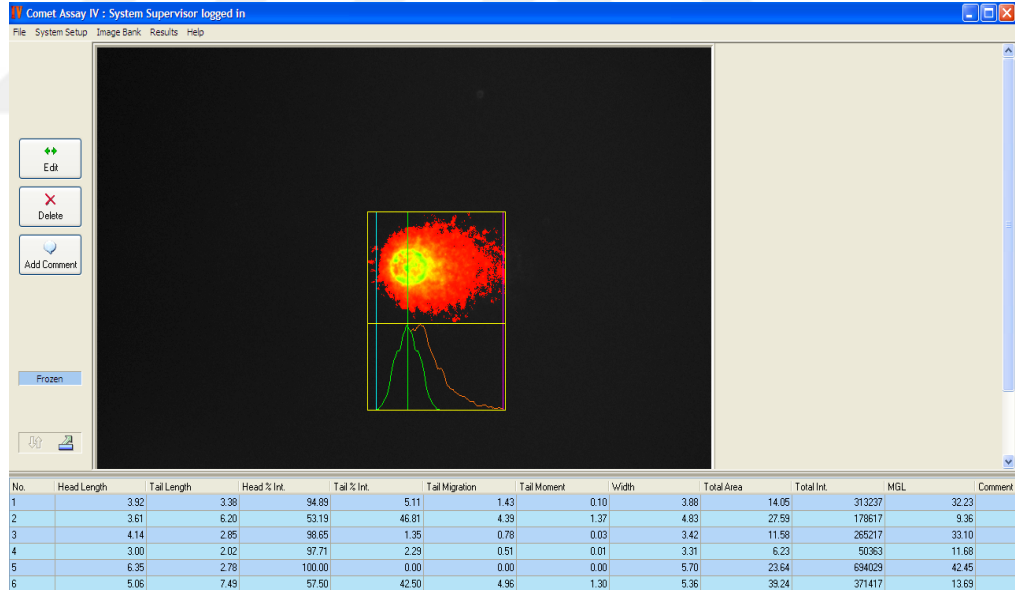
Lamların üzerine 60 μ l (20 μ g/ml) etidium bromür çözeltisi ilave edildi ve en az 10 dakika beklenip mikroskopta okuma yapıldı. Her lamda 100 hücre, floresan mikroskobunda değerlendirildi ve Comet assay IV (Instem, Staffordshire, United Kingdom) programı kullanılarak hücreler sayıldı.



Şekil 3. 22 Hasarsız DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.



Şekil 3. 23 Az hasarlı DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.



Şekil 3. 24 Hasarlı DNA'nın floresan mikroskoptaki görüntüsü.

İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeleri, SPSS 22.0 programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD)) kullanılarak yapılmıştır. MTT testinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde One-Way ANOVA testi kullanıldı. Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir numune için tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanılarak Repeated Measures ANOVA testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak alındı.



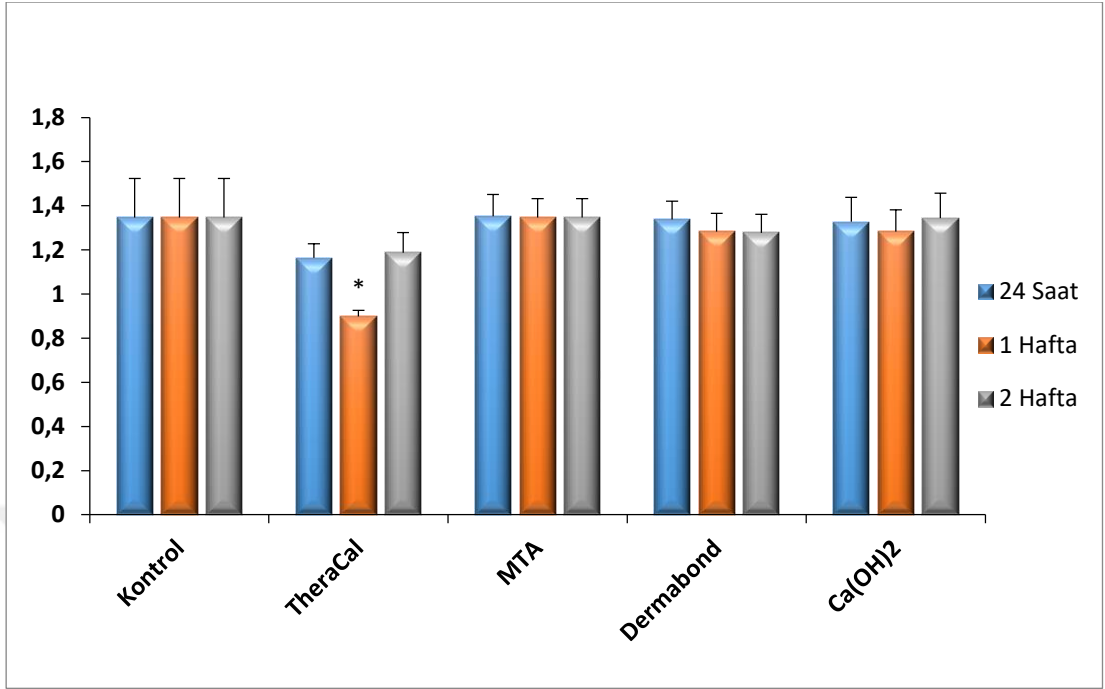
4. BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan DERMABOND™, BioMTA+, TheraCal LC® ve Kerr Life [Ca(OH)₂] materyaller steril ortamda üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Materyaller, sertleşme reaksiyonlarının tamamlanmasının ardından bir gün boyunca medyumda ekstraksiyona maruz bırakıldı. Böylece elde edilen ekstraktlar farklı oranlarda (1:1, 1:2) seyreltildi ve L929 fare fibroblastları ile farklı periyotlarda (24 saat, 7 gün ve 14 gün) inkübe edildi. MTT yöntemi ile analiz yapıldı, yaşayabilen hücre yüzdeleri belirlendi. Fare fibroblast hücrelerinin canlılığı ile ekstraksiyon konsantrasyonları ve inkübasyon süresi arasındaki ilişki değerlendirildi. Kullanılan materyaller ile kültüre edilen L929 hücrelerinin, MTT testi sonucundaki hücre canlılık ve absorbands değerleri ortalamaları Tablo 5’de verilmiştir.

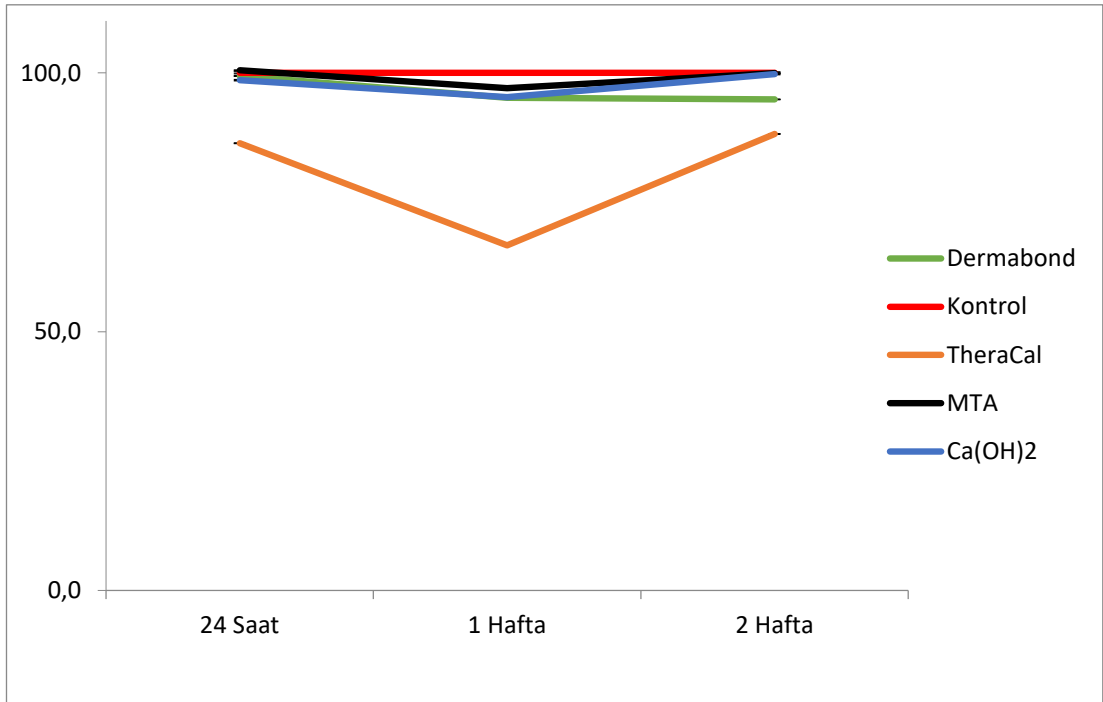
Tablo 5. Kullanılan materyallerin hücre canlılık ve absorbands değerleri ortalamaları. $p < 0.05$ One-Way ANOVA.

	24 saat		1 hafta		2 hafta	
	Canlılık Ort.	Absorbans Değerleri Ort.	Canlılık Ort.	Absorbans Değerleri Ort.	Canlılık Ort.	Absorbans Değerleri Ort.
Kontrol	100	1,3468	100	1,3468	100	1,3468
TheraCal LC®	86,41	1,1638	66,70*	0,8983*	88,20	1,1878
TheraCal LC® 1:2	98,58	1,3276	98,95	1,3327	97,65	1,3151
BioMTA	100,47	1,3531	97,00	1,3463	99,96	1,3463
BioMTA 1:2	97,12	1,3080	97,77	1,3167	96,42	1,2985
DERMABOND™	99,39	1,3385	95,21	1,2823	94,87	1,2777
DERMABOND™ 1:2	100,03	1,3471	99,25	1,3366	99,25	1,3366
Ca(OH)₂	98,59	1,3278	95,30	1,2835	99,76	1,3435
Ca(OH)₂ 1:2	97,97	1,3194	97,16	1,3085	95,52	1,2864

* $p < 0.05$

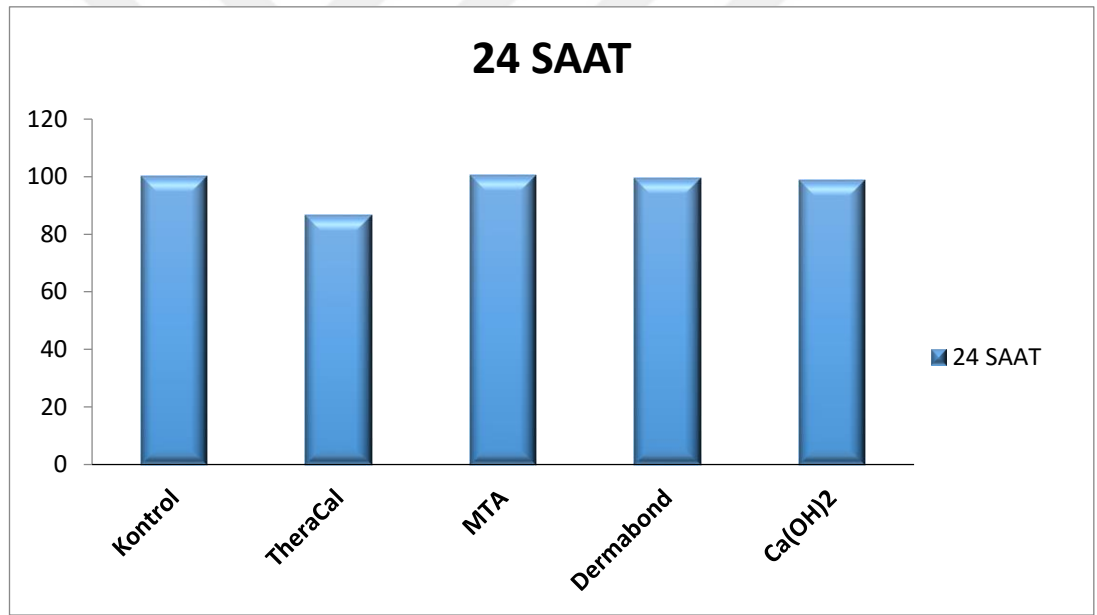


Şekil 4. 1 Seyreltilmemiş ekstraktlara maruz kalan L929 hücrelerinin absorbans ortalamaları. TheraCal LC® ile kontrol grubu 1 haftalık absorbans ortalamaları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (* $p < 0.05$, One-Way ANOVA)



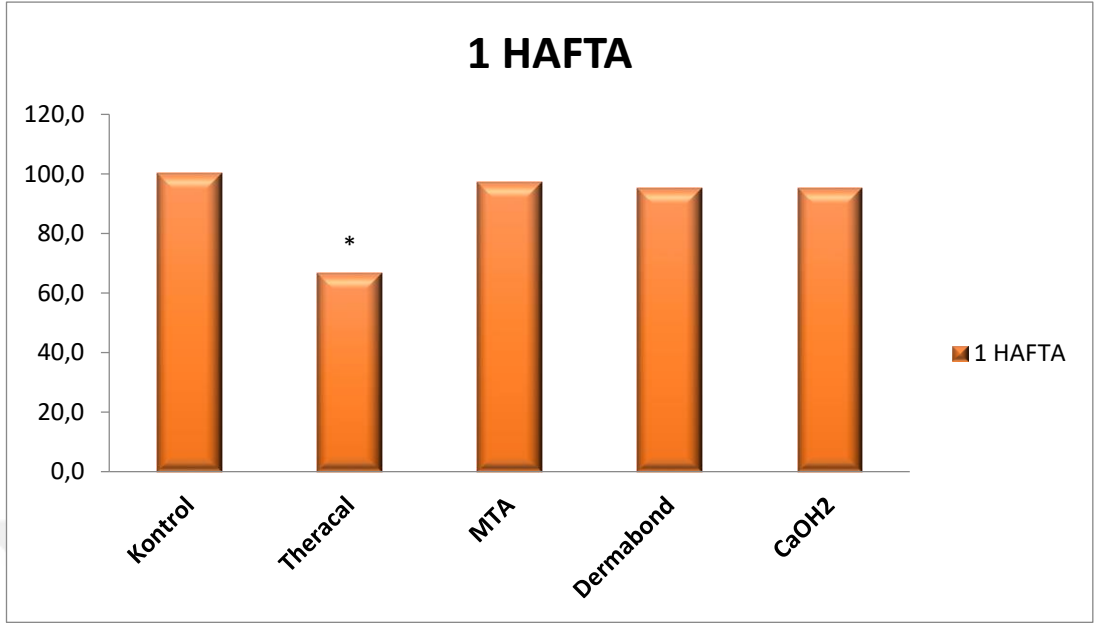
Şekil 4. 2 Seyreltilmemiş ekstraktlara maruz kalan L929 hücrelerinin 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık hücre canlılıkları.

Yapılan analizler sonunda TheraCal LC[®] 1:2, DERMABOND[™], DERMABOND[™] 1:2, BioMTA+, BioMTA+ 1:2, Ca(OH)₂ ve Ca(OH)₂ 1:2'nin hücre canlılığını kontrol ile karşılaştırıldığında etkilemediği görülmüştür. Seyreltilmemiş ekstraktlardan TheraCal LC[®]'nin birinci hafta ekstraktı haricindeki diğer ekstraktlar ile kontrolün hücre canlılığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.(Şekil 4.1) Birinci haftada Theracal LC[®] ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre istatistiksel olarak daha sitotoksik etki gösterdiği belirlendi(p<0,05). TheraCal LC[®]'de ise 24 saatlik maruziyette hücre canlılığının yaklaşık %14 kadar azaldığı, birinci haftada yaklaşık %34 kadar azaldığı, ikinci haftada bu oranın tekrar 24 saatlik maruziyet sonucuna yakın bir sonuç olarak %12 olduğu görülmüştür.



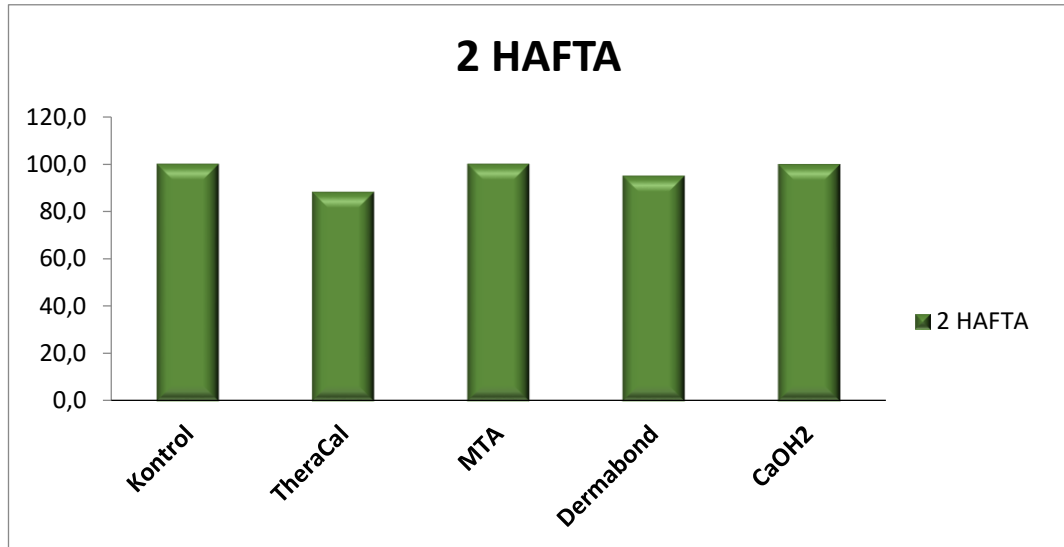
Şekil 4. 3 Seyreltilmemiş ekstraktlara 24 saat maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.

24 saatlik inkübasyon süresinde materyallerin hücre canlılıkları değerlendirildiğinde en yüksek canlılık değeri % 100,47 ile BioMTA+ da, en düşük canlılık değeri ise % 86,41 ile TheraCal LC[®] ekstraktlarında gözlemlendi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında kullanılan ekstraktlarda, TheraCal LC[®] ekstraktı diğer ekstraktlara göre daha sitotoksik etki gösterdi. BioMTA+ ve DERMABOND[™] ekstraktları arasında ise hücre canlılığı açısından fark saptanmadı. Bu üç ekstrakt TheraCal LC[®] ekstraktlarına göre daha yüksek hücre canlılığı gösterdi (Şekil 4.3).



Şekil 4. 4 Seyreltilmemiş ekstraktlara 1 hafta maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. * $p < 0,05$

Yedi günlük inkübasyon süresi sonunda değerlendirilen ekstraktlarda en yüksek canlılık değeri %99,96 ile BioMTA+ ekstraktında gözlemlendi. En düşük canlılık değeri ise %66,70 ile TheraCal LC® ekstraktlarında gözlemlendi.(Şekil 4.4) Theracal LC® ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre istatistiksel olarak daha sitotoksik etki gösterdiği belirlendi($p < 0,05$).



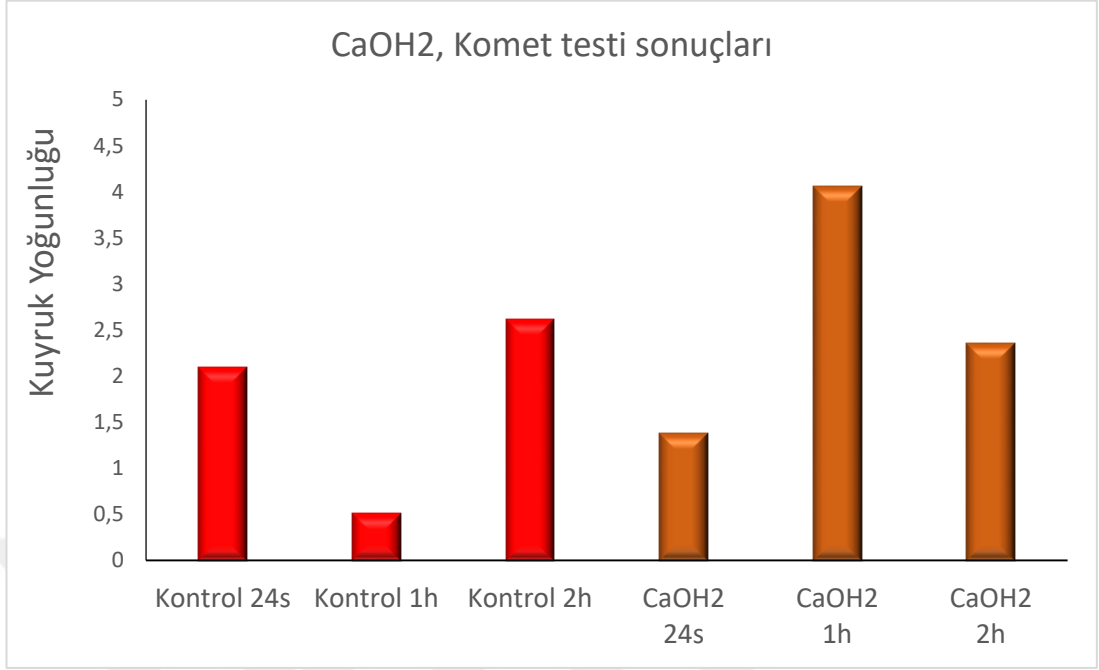
Şekil 4. 5 Seyreltilmemiş ekstraktlara 2 hafta maruz kalan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri.

Ondört günlük inkübasyon süresi sonunda değerlendirilen ekstraktlarda, en yüksek canlılık değeri %99,6 ile BioMTA+, en düşük canlılık değeri %88,20 ile TheraCal LC® ekstraktlarına aittir (Şekil 4.5).

Kontrol ve H₂O₂ ile DERMABOND™, BioMTA+, TheraCal LC®, Ca(OH)₂ ait kuyruk yoğunluğu değerlerinin ortalamaları alınarak Tablo 6’de sunulmuştur.

Tablo 6. Ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.

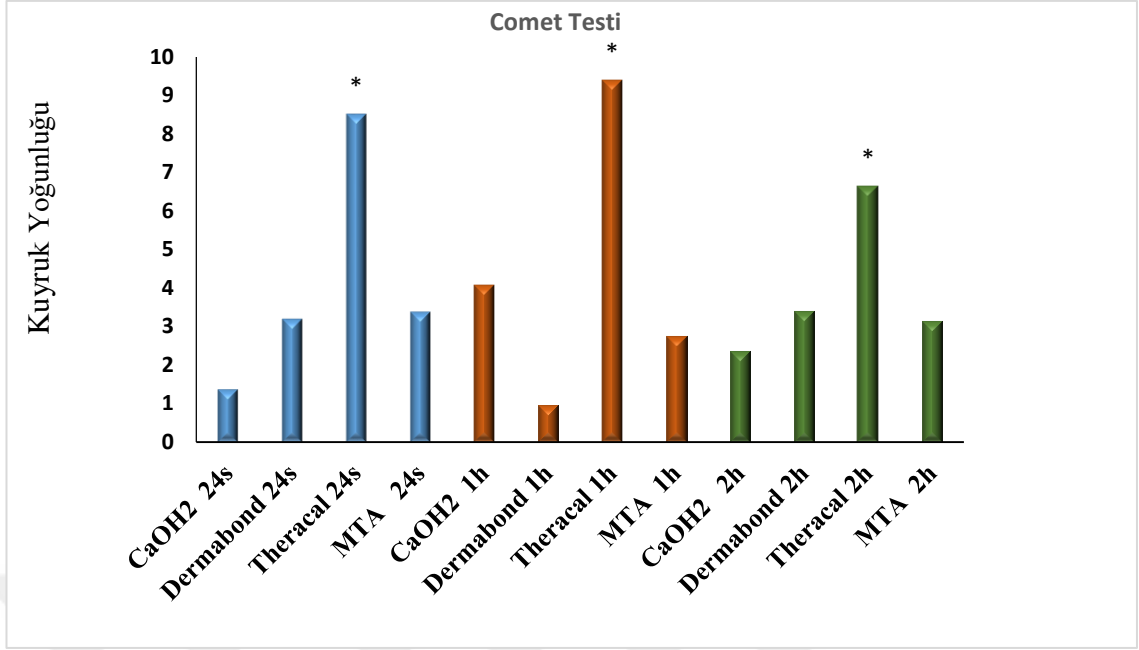
Materyaller	Ort. Kuyruk Yoğunluğu
Control 24s	2,093901813
Control 1h	0,508678419
Control 2h	2,619876228
DERMABOND™ 24s	3,205169403
DERMABOND™ 1h	0,950311154
DERMABOND™ 2h	3,391258784
BioMTA+ 24s	3,391984853
BioMTA+ 1h	2,73297903
BioMTA+ 2h	3,124556281
TheraCal LC® 24s	8,501439315
TheraCal LC® 1h	9,402970074
TheraCal LC® 2h	6,649138941
Ca(OH) ₂ 24s	1,373681976
Ca(OH) ₂ 1h	4,054984868
Ca(OH) ₂ 2h	2,356619832
H ₂ O ₂	44,4831488



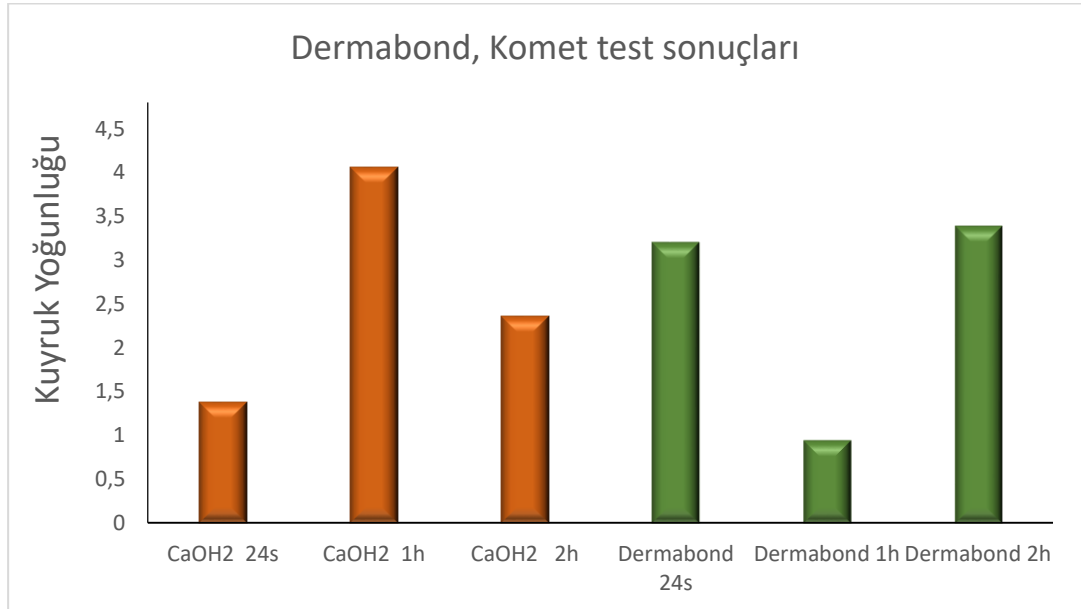
Şekil 4. 6 Comet testinde kullanılan negatif kontrol ve pozitif kontrol [Ca(OH)₂] ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. Negatif ve pozitif kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$, Repeated Measures ANOVA).

Comet testi uygulanarak Ca(OH)₂'in 24 saat, 1 hafta, 2 haftalık maruziyetler ile elde edilen kuyruk yoğunlukları ortalama değerleri Tablo 6'de verilmiştir. Ca(OH)₂ elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri, negatif kontrol ile elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri; Repeated Measures ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Ca(OH)₂, 24 saat, 1 hafta, 2 hafta maruziyetlerinde negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde DNA hasarı yaratmadığı bulunmuştur (Şekil 4.6).

Şekil 4.7'de Comet testinin toplu olarak sonuçları görülmektedir. Buna göre pozitif kontrol olan Ca(OH)₂'nin 24 saat, 1 hafta ve 2 haftalık maruziyetlerde diğer materyallerle elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri; Repeated Measures ANOVA SPSS 22(SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) paket programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. TheraCal LC[®]'nin 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetlerinde pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer materyallerin DNA hasarı yaratmadığı bulunmuştur.

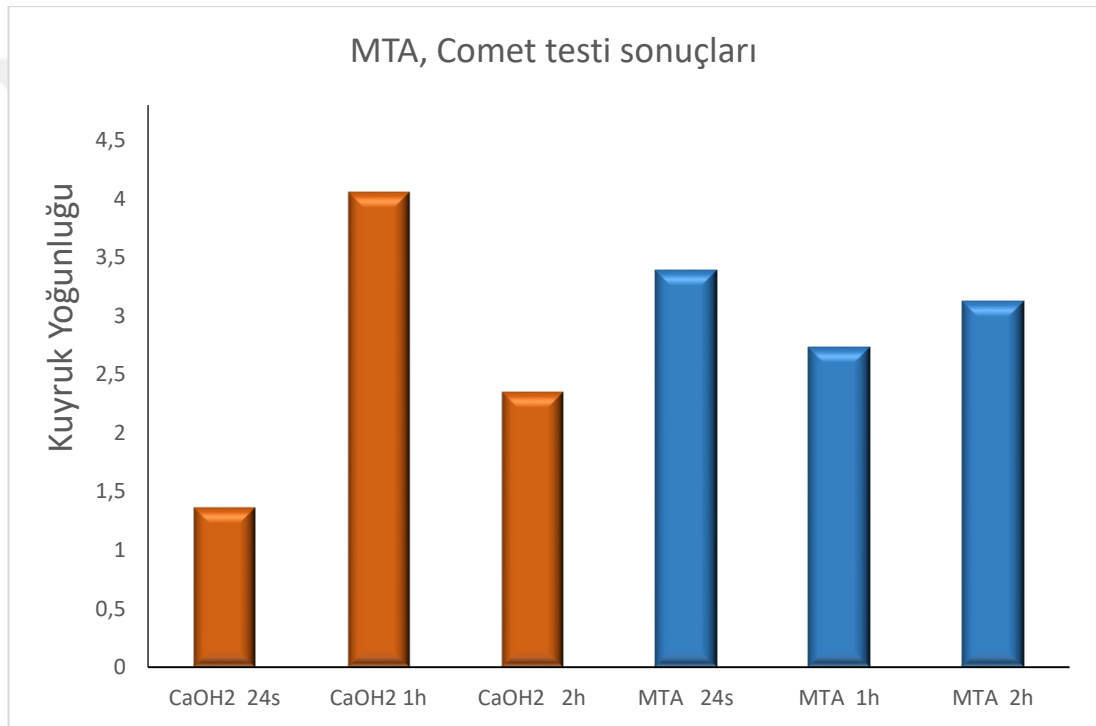


Şekil 4. 7 Comet Testinin toplu sonuçları. *TheraCal LC® 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık maruziyetlerde kuyruk yoğunlukları değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunlukları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p > 0.05$ Repeated Measures ANOVA).



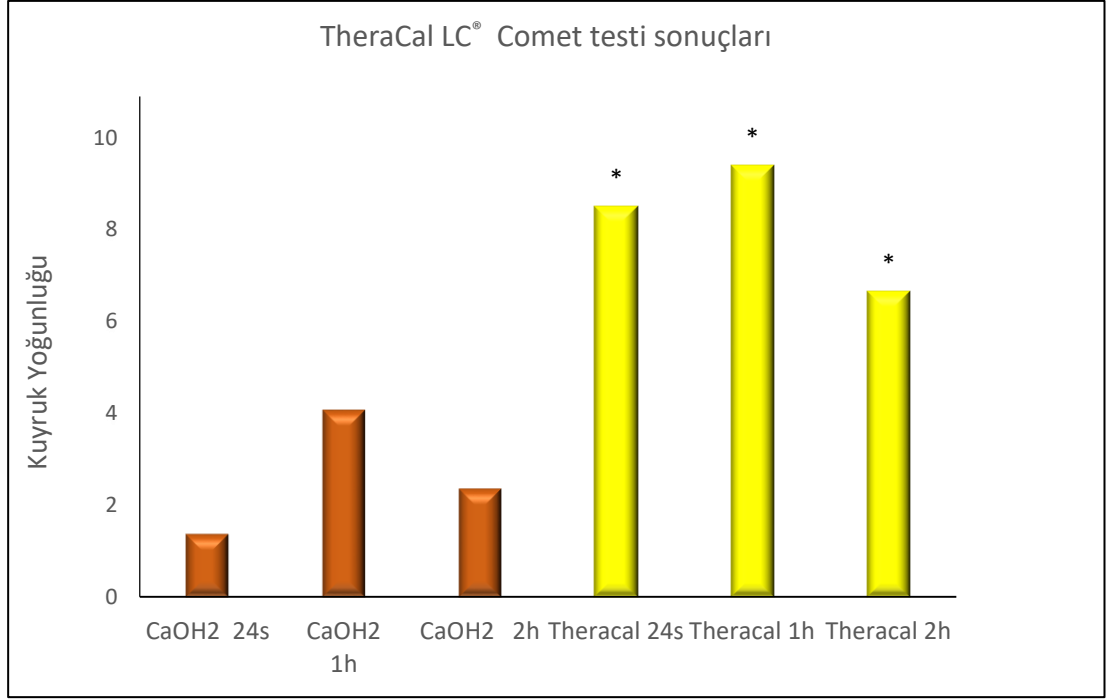
Şekil 4. 8 DERMABOND™ 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. DERMABOND™'a ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrollere ait kuyruk yoğunlukları değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$, Repeated Measures ANOVA).

Şekil 4.8’de Comet testi uygulanarak DERMABOND™’un 24 saat, 1 hafta, 2 haftalık maruziyetler ile elde edilen kuyruk yoğunlukları ortalama değerleri verilmiştir. DERMABOND™ elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri, Comet testinde negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılan Ca(OH)₂ ile elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri Repeated Measures ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, DERMABOND™, 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta pozitif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde DNA hasarı yaratmadığı bulunmuştur.



Şekil 4. 9 MTA 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri ile elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. MTA'ya ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$, Repeated Measured ANOVA).

Şekil 4.9’da Comet testi uygulanarak MTA’nın 24 saat, 1 hafta, 2 haftalık maruziyetler ile elde edilen kuyruk yoğunlukları ortalama değerleri verilmiştir. MTA elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri, Comet testinde negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılan Ca(OH)₂ ile elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri Repeated Measures ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, MTA, 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta pozitif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde DNA hasarı yaratmadığı bulunmuştur.



Şekil 4. 10 TheraCal LC® 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyetleri ile elde edilen ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri. **TheraCal LC®'ye ait kuyruk yoğunluğu değerleri ile pozitif kontrole ait kuyruk yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (*p<0.05, Repeated Measures ANOVA).**

Comet testi uygulanarak TheraCal LC® 24 saat, 1 hafta ve 2 haftalık maruziyetler ile elde edilen kuyruk yoğunlukları ortalama değerleri Şekil 5.10'da verilmiştir. TheraCal LC® elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri, Comet testinde pozitif kontrol olarak kullanılan Ca(OH)₂ ile elde edilen kuyruk yoğunlukları değerleri; Repeated Measures ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, TheraCal LC®, 24 saat, 1 hafta, 2 hafta pozitif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde DNA hasarını artırdığı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Çürük ve travma nedeni ile oluşan diş kayıpları ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Hastalanmış ya da zarar görmüş dişlerin rejenerasyonunun sağlanması en önemli konservatif tedavi seçeneklerinden birini oluşturmaktadır (135).

Pulpa, dişin dentinle çevrili olan boşluğunu dolduran hücreler, lifler, damarlar, ve sinirlerden oluşan ve mineralize doku oluşturabilme yeteneğine sahip gevşek bir bağ dokusudur. Tamir dentinogenezi sırasında, maruz kalan alandaki orijinal odontoblastlar yerini yeni farklılaşmış odontoblast benzeri hücrelere bırakırlar. Geçmişte açılan diş pulpasının kayıp bir organ olarak kabul edildiği ve onarımın olanaksız olduğu düşünülmekteyken, şimdi artık pulpa hasarına sebebiyet veren mikrobiyal, fiziksel ve kimyasal uyaranlar ortadan kaldırıldıktan sonra, tamir süreci başladığı ve bu süreçte kollajen sentezi hızlandığı belirtilmektedir. Bu nedenle patolojik veya mekanik olarak gelişen açılmalarda uygun yöntem ve materyal kullanıldığında iyileşme gösterebileceği belirtilmiştir.

Tarih boyunca pulpa açıklığını kapatmak için altın, kalsiyum hidroksit, kortikosteroidler, inert maddeler, büyüme faktörleri, hidroksiapatitler ve kalsiyum silikat esaslı malzemeler gibi çeşitli materyaller kullanılmıştır. Son zamanlardaki gelişmelerin ışığında uygulanan tedavilerin başarı oranı artmıştır. Dişhekimliğinde pulpa biyolojisi ile ilgili daha fazla bilgi edinilmesi sayesinde yeni materyallerin uygulanmasına ve başarı oranı yüksek tedavi yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlanmıştır.

Pulpa tedavilerinin temel amacı çürük dışındaki nedenlerle açığa çıkan minimal orandaki pulpa dokusunun canlılığının korunmaya çalışılması ve devam ettirilmesidir. Direkt pulpa kuafajı, mekanik olarak veya travma nedeniyle açığa çıkan pulpa dokusunun çeşitli biyomateryallerle örtülmesi esasına dayanır (136).

Kalsiyum hidroksit bilinen en yaygın direkt kuafaj ajanıdır. Uygulandığında dentin köprüsü oluşumunu tetiklediği bildirilmektedir. Kalsiyum hidroksit, çözünmenin ardından hidroksil(OH) ve kalsiyum(Ca) iyonlarını serbest bırakma kabiliyeti verildiğinde, direkt ve indirekt pulpa kuafajı ve pulpa canlılığının korunması için en popüler ajandır (137–139). Hem klinik hem de histolojik olarak,

direkt ve indirekt pulpa kuafajı başlıklarında tatmin edici sonuçlar verdiği bulunmuştur, çünkü pulpa tarafından tersiyer dentin oluşumunu uyarabilmektedir. Bu, direkt pulpa kuafajı için% 80'den fazla rapor edilen başarı oranları ile temel araştırma ve klinik çalışmalarla belgelenmiştir. Şu anda, kalsiyum hidroksit ürünleri direkt pulpa kuafajı için en iyi belgelenmiş ve en güvenilir malzemeler olabileceği ve yeni malzemelerin test edilmesi gereken “altın standart” olarak hizmet edebilecekleri bildirilmiştir (137,140).

Bununla birlikte, kalsiyum hidroksitin bazı sakıncaları vardır. Dentine zayıf bağlanma, malzeme yeniden emilimi, yüksek çözünürlük ve mekanik kararsızlık bunlardandır. Ek olarak, onarıcı dentin oluşumu, materyalin biyolojik olarak indüktif kapasitesine bağlı değil, kalsiyum hidroksitin tahriş edici doğası ile indüklenen pulpa tarafından bir savunma mekanizması nedeniyle olabilir (137,141,142); yüksek pH(12.5) kalsiyum hidroksit süspansiyonları, pulpa ara yüzeyinde nekrotik bir tabaka oluşumu ile pulpa yüzeyinde likefaksiyon nekrozuna neden olur (137).

Pulpanın canlılığının korunduğu tedavilerde kullanılan materyallerin biyoyumlu olmaları materyallerde aranan en önemli özelliklerdendir. Özellikle direkt pulpa kuafajı tedavilerinde uygulanan materyalin canlı pulpa dokusu ile teması uzun süre olmaktadır. Bundan dolayı materyalin dokularla olan uyumu oldukça önemlidir. Biyoyumlu materyaller yaralanma sonrası ekspozite olan dental pulpanın tamirinde ve dişlerin rejenerasyonunun sağlanmasında önemli rol oynamaktadır.

Geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalara birçok geleneksel pulpa kuafajı tamir materyalleri konu olmuştur. Son zamanlarda kalsiyum silikat esaslı materyallerin kullanımındaki artış, bu materyallerle yapılan çalışmalara hız kazandırmıştır. Diş hekimliğinde çeşitli alanlarda kullanılan MTA materyali son yıllarda adından çokça söz ettirmiştir. MTA'nın direkt pulpa kuafajında iyi bir örtücü olmasına karşın uzun sertleşme süresi ve manipülasyon zorluğu gibi dezavantajları nedeniyle vital endodontik tedavilerde çeşitli sorunlar meydana gelmektedir. Bu nedenle sertleşme süresi kısa olan kalsiyum silikat esaslı materyallerin kullanımı daha da artmıştır. Son zamanlarda piyasada bulunan TheraCal LC® ve Cerkamed BioMTA+ materyallerinin biyoyumluluğu ile ilgili de literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca DERMABOND™ tıbbın çeşitli alanlarında ve diş hekimliğinde kullanılmışlar fakat biyoyumlulukları ile ilgili fazla bir çalışma

bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada; TheraCal LC®, DERMABOND™ ve BioMTA+ materyalleri ile kalsiyum hidroksit esaslı Kerr Life'in biyouyumluluğunun in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Uygun maliyetli ve basit olan in vitro çalışmalar bize değerli bilgiler sağlar. Deneysel koşulları kontrol altındadır. Malzemelerin sitotoksikite mekanizmasını dahi açıklayabilirler (143,144). Deneysel koşullarda ve aynı koşullarda tekrar edilebilmesi, sonuçların olabildiğince standart hale getirmektedir. Ayrıca bu yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında deneysel koşulların tekrarlanabilmesi önemli bir etkidir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar in vivo çalışmalardaki toksisitenin belirlenmesinde yol gösterici olmaktadır (102,145). Sitotoksikite ve genotoksikitenin değerlendirilmesinde hücre kültürü çalışmaları sıklıkla kullanılır (146).

In vitro sitotoksikite testlerinde, materyal ve test hücreleri olabilecekleri en fazla yakınlıkta olmalarından dolayı klinik olarak kullanımına göre gereğinden daha çok sitotoksik sonuçlar verebilmektedir. Ancak in vitro metodlar, klinik olarak uygunluğu aynı olmasa da tarama ve değerlendirme testleri olarak kabul edilmektedirler (103).

MTT testinin, in vitro koşullar altında sitotoksikite ve hücre canlılığının belirlenmesi için doğru ve etkili bir test olduğu bildirilmiştir (147,148). MTT testi kolorimetrik bir testtir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enziminin suda çözünür sarı tetrazolium tuzunu mor formazan kristallerine dönüştürebilme kabiliyetine göre sonuçlar vermektedir. Üretilen formazan kristallerinin miktarı canlı hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkilidir (144). Başka bir deyişle, bu test, hücrelerin mitokondriyal aktivitesine dayanan canlı hücre sayısını ölçer (149). Uygulama kolaylığı, yüksek hassasiyeti, ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle öne çıkan MTT testinde; hücre canlılığı mikropalak okuyuculu spektrofotometre ile tespit edilmektedir (150).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksikite testlerinin incelenmesi için bugüne kadar pek çok in vitro hücre kültür çalışması yapılmıştır. In vitro sitotoksikite testleri planlanırken, test edilecek materyallerin pratikteki kullanımının (direkt ve indirekt temas) taklit edilmesi amaçlanmalıdır. İndirekt temasın oluşturulmasında materyaller ve hücreler arasında milipor filtre, dentin bariyer veya agar overlay gibi

sert bir bölüm konulması önerilmektedir (151). Direkt temas yönteminde ise materyallerden elde edilen ekstraktların hücrelere uygulanması veya materyallerin doğrudan hücre üzerine yerleştirilmesi ile yapılmaktadır (151,152). Bu tez çalışmasında ekstraksiyon metodu kullanılarak materyallerin pratikteki kullanımının taklit edilmesi amaçlanmıştır.

Farklı ekstraksiyon süreleri hücre kültürü çalışmalarında materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında önemlidir (153). ISO 10993-5 numaralı “Sitotoksikite testleri-in vitro yöntemler” bölümünde inkübasyon için en az 37°C’de 24 saatlik süre önerilmektedir. Bazı çalışmalarda hücresel adezyonun daha iyi olması için inkübasyon süresinin uzatılmasının avantaj sağlayabileceğini bildirilmiştir (154,155). Camilleri ve arkadaşları (156) çalışmalarında beyaz ve gri MTA’nın 1 günlük inkübasyon süresi sonundaki ile 28 günlük inkübasyon süresi sonundaki biyoyumluluğun farklı olduğunu bildirmişlerdir. 1 günlük inkübasyon süresi sonunda biyoyumluluğun yüksek olduğunu, 28 günlük inkübasyon süresi sonunda ise biyoyumluluk değerlerinde düşüş görüldüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızda materyallerin L929 fibroblast hücreleriyle olan inkübasyon süresi 1 gün, 7 gün ve 14 gün olarak seçilmiştir.

Çalışmamızdaki test materyallerine ait kontrol grubu örneklerinin hücre canlılık ortalaması %100 olarak belirlenmiştir ve buna göre diğer örneklerin canlılık oranları yüzdelik değer olarak hesaplanmıştır.

Devamlı hücre hatları (HeLa, 3T3 veya L929 hücreleri) ve insan hücreleri sitotoksikite deneylerinde kullanılmaktadır (157). Fibroblastlar bağ dokunun temel hücreleridir. Devamlı hücre hatlarının tercih edilmelerinin sebebi sonuçların tekrarlanabilmesidir (158).

L929 devamlı hücre kültür hatları; dental malzemelerin sitotoksikite testlerinde standart olarak kullanılan fibroblast hücre kültürleridir (159,160).

Schedle ve arkadaşları (161) ve Taira ve arkadaşları (159) dental materyallerin sitotoksikite testlerinin belirlenmesinde hücre tipleri içerisinde en duyarlı ve güvenilir şekilde kullanılacak hücre kültürü ortamının L-929 fare fibroblastları olduğunu belirtmişlerdir. ISO 10993-5 sitotoksikite testleri, in vitro yöntemler standartlarına göre; in vitro çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin

araştırılmasında standart olarak L-929 ya da Balbc 3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılmasını önermektedir.

Saw ve arkadaşları (162) yaptıkları sitotoksosite çalışmalarında geçerliliği ve in vitro koşullarda çoğalabilmesi sebebiyle L929 hücrelerini tercih etmişlerdir. Biz de bu nedenlerden dolayı çalışmamızda hücre grubu olarak L929 hücrelerini kullandık.

Yıllardır araştırmacılar, kaybolan veya zarar gören diş dokularının tamirini anlamak için çalışma yapmaktadır. Bir çalışmada pulpa amputasyonu tedavisinde kalsiyum hidroksit kullanılması, rejeneratif tedaviye ait ilk girişim olarak ifade edilmiştir (163). Kalsiyum hidroksit esaslı patlar pulpanın açığa çıktığı durumlarda, fibröz dokuyu uyararak, odontoblast hücreleri tarafından dentin oluşumunu sağlamaktaydı. Kuafaj tedavileri esnasında pulpa dokusu üzerine sıklıkla kalsiyum hidroksit içeren patlar yerleştirilmektedir. Fakat kalsiyum hidroksit içeren patların dentin yüzeyi ile bağları zayıf olduğu, mikrosızıntıyı önleyemedikleri ve zamanla restorasyon altında çözünmeleri gibi dezavantajları görülmüştür (164,165). Ayrıca, dentin köprüleri oluşurken tünel defektleri olabileceği de belirtilmiştir (166).

Bu nedenlerle kalsiyum hidroksite alternatif olabilecek materyaller araştırılmaya başlanmıştır. Araştırmacılar ideal bir pulpa kuafaj materyalinin yaralanmış pulpanın reperatif dentin oluşumunu teşvik edici dentinojenik özelliğinin bulunması ve bakteriyel kontaminasyonunu önleyebilmesi gerektiğini belirtmektedirler (167).

Siyanoakrilatlar tıpta ve diş hekimliğinde artan bir popülerlikte kullanılmaktadır. Siyanoakrilatlar bakteriosititik etki, hemostatik etki, biyodegradasyon ve biyoyumluluk gibi özelliklerinden dolayı yara kapatmasında cerrahi kullanımları kabul görmüştür. Siyanoakrilatlar güçlü etki gösteren, solvent içermeyen ve doku adeziv olarak tıpta ve diş hekimliğinde geniş olarak kullanılan maddelerdir. İnsan dokularında kullanılan adezivlerin ilk sentetik organik bileşimleridir. Farklı kimyasal formlarda bulunabilirler. Diş hekimliğinde diş çekim sonrası pansumanlarda, aftöz ülserler üzerindeki koruyucu kaplamalar ve biyopsi alanlarını örtmek için kullanılırlar. Ayrıca periodontal fleplerin yaklaştırılması, immobilizasyonu için kullanılırlar. Diş eti greftleme işlemlerinde, dentin ve sementin hassasiyetini azaltmada ve bir pulpa kapatma malzemesi olarak kullanılır (168).

Siyanoakrilatlar, formaldehitin alkil siyanoasetat ile reaksiyona sokulması suretiyle sentezlenebilir, ısıtılarak, bir sıvı monomer içinde depolimerize olan bir prepolimer elde edilir. Siyanoakrilatlar metallerle reaksiyona gireceği için genellikle polietilen plastik tüpler kullanılır. Siyanoakrilat neme maruz bırakıldığında monomerler repolimerize olurlar ve sertleşme gerçekleşir. Siyanoakrilatlar su, deri, kan, mukoza ve kemik ile temaslarında birkaç saniye içinde polimerize olur. Hızlı sertleşir ve 2 saat içinde tam sertliğine ulaşır (168).

Siyanoakrilatlar genel cerrahide cerrahi yara tamiri, kanama kontrolü, cilt greft fiksasyonu; acil tıbbi ve genel uygulama travmatik yara tamiri, tırnak onarımı; endoskopi varis kanamasının kontrolü ve özofagogastrik varisteki obliterasyon; oftalmoloji kornea perforasyonlarının güncel tamiri; göğüs cerrahisi pulmoner sızıntıların kapatılması gibi birçok bölümde çok fazla kullanım alanı bulmaktadır (168).

Daha iyi biyouyumluluk özelliği nedeniyle, siyanoakrilatlar diş hekimliği alanında geniş bir uygulama alanı bulmuşlardır. Reatzke(12) 1985'te palatal bağ dokusu greftinde zarf tekniği ile siyanoakrilat yapıştırıcı kullanmıştır (168,169).

Ağız, çene ve yüz cerrahisi alanında, tek taraflı ve bilateral yarık tedavisinde, pansuman olarak kullanılırlar. Çekim bölgeleri için kullanımında, hemen hemostaz sağladığı için, gıda artıklarının çekim boşluğuna girmesini engeller, sekonder enflamasyonu önler (168). Ortodonti alanında, ortodontik braketlerin yapıştırılmasında kullanılan siyanoakrilat doku yapıştırıcıları kullanılır (170).Siyanoakrilat yapıştırıcı malzemeleri protez onarmak için kullanılır (171).

Endodontide, siyanoakrilatlar, pulpanın kapatma maddesi olarak, retrograd bir dolgu maddesi ve fissur sealent gibi kullanılır. Dentin hassasiyeti için kullanılırlar. Endodontik tedavi görmüş dişlerde dentin, diş restorasyon arayüzünde oral sıvının mikro sızıntısını kontrol etmek için kullanılır (172).

Bu çalışmalar ışığında biz de bu tez çalışmamızda 2-Oktil siyanoakrilat bazlı DERMABOND™'un L929 fare fibroblast hücrelerine olan sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırdık.

Tavşan fibroblastları ile yapılan bir çalışmada, siyanoakrilatların farklı formları kullanılmıştır. Nötral kırmızı yönteminin kullanıldığı maruziyetin ekstrakt yoluyla yapıldığı bu çalışmada 2-Oktil siyanoakrilatın diğer siyanoakrilatlara oranla

daha yüksek hücre canlılığını sağladığı gözlenmiştir. Bu çalışma da uzun zincirli siyanoakrilatlar hücre canlılığı korumada kısa zincirli olanlara göre daha etkili olduğunu göstermiştir(173). Biz de bu nedenle çalışmamızda uzun zincirli bir siyanoakrilat olan 2-Oktil siyanoakrilat bazlı DERMABOND™'u kullandık.

Mizrahi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada alkoksietil siyanoakrilatların sitotoksitesini in vitro ve biyoyumluluğunu in vivo olarak araştırmışlardır. Sitotoksite için MTT testi ile direkt temas yöntemi kullanılarak HeLa hücrelerinin materyalin üzerine yerleştirilmesiyle değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda artan karbon zincir molekül ağırlığıyla hücre canlılığının arttığını görmüşlerdir. İndirekt testte de benzer bulgular elde etmişlerdir. DERMABOND™'un da uzun zincirli olmasından dolayı bu çalışmadaki siyanoakrilatlar arasında hücre canlılığını yüksek oranda koruduğu görülmüştür. İn vivo testlerde de zincir kısaltıkça nekroz alanlarının oluştuğunu ve enflamasyon alanları genişlediğini belirtmişlerdir. DERMABOND™'un in vivo çalışmada enflamasyon hafif ve nekroz alanı görülmediğini bildirmişlerdir (174).

Bhatia ve arkadaşları(175) yaptıkları in vitro sitotoksite çalışmasında 2-Oktil siyanoakrilatin 3T3 fibroblastlara karşı yüksek oranda sitotoksik etkileri olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada direkt temas yöntemini uygulamışlar; hücreler ile materyaller birebir maruz bırakmışlardır. Bhatia ve arkadaşları(176) tarafından yapılan diğer bir çalışmada da yine 2-Oktil siyanoakrilatin sitotoksitesi 3T3 fibroblastlara uygulanarak değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada da siyanoakrilatin 3T3 hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı etkilerinin olduğu sonucuna varmışlardır. Her iki çalışmada da hücreler materyaller ile direkt temas yöntemi kullanılarak maruz bırakılmışlardır. Bizim çalışmamızda 2-Oktil siyanoakrilat bazlı DERMABOND™ L929 hücrelerine uygulanırken ekstrakt temas yöntemi kullanıldı. Bu çalışmaya göre farklı sonuçların çıkmasının nedeni bahsi geçen çalışmalarda ekstrakt yerine, direkt temas yönteminin uygulanması ve hücre hattı olarak 3T3 hücreleri kullanılması olabilir.

Prepolimerize allil siyanoakrilat(PACA) ile 2-Oktil siyanoakrilatin L929 fibroblast hücrelerinde oluşturabilecekleri hücre canlılığının karşılaştırıldığı bir çalışmada araştırmacılar WST testi ile direkt temas yöntemi ve indirekt temas yöntemi kullanmışlardır. Direkt temas metodu ile hücre canlılığını 24, 48, 72 saatlik

periyotlarda kontrol etmişler ve canlılıkta zamanla artış gözlemlemişlerdir. İndirekt temas yöntemi ile her iki materyalde de hücre canlılığı %80'in üzerinde bulunmuştur(177). Bu çalışmada da ekstrakt temas yöntemi ile 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık değerlendirmeler yapılmış olup canlılık oranları benzer şekilde sırasıyla %99.39, %95.21 ve %94.87 olarak bulunmuştur.

Siyanoakrilat bazlı doku yapıştırıcıların sitotoksitesisi ve kısa dönemde abdominal fitik tedavisinde in vivo uyumluluğunun araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Siyonoakrilatlarda moleküler ağırlığı arttıkça formaldehit salınımı azalmaktadır. Oktıl siyonoakrilat uzun zincirli olmasına rağmen polimerize olmamış durumda en yüksek sitotoksiteyi göstermiştir. Fakat polimerizasyon sonrası diğer siyonoakrilatlara göre daha iyi sonuçlar vermiştir (178).

Abtahi ve arkadaşları 2-Oktıl siyonoakrilatin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında H9C2 kardiyomyoblast hücrelerini kullanmışlardır. Bu çalışmada polimerize oktil siyonoakrilatların H9C2 hücrelerine sitotoksik olmadığını kantitatif tetrazolyum bazlı kolorimetrik MTT testi ile göstermişlerdir. 24, 48, 72 saatlik periyotlarla tekrarladıkları deneylerinde 1:1, 1:2, 1:4 dilusyonlar hazırlamışlardır. İndirekt temas testi uygulanmıştır. Oktıl siyonoakrilatların kullanımındaki en büyük kaygı insan vücuduna zararlı olabilecek maddelerin salınması olduğunu belirten araştırmacılar bununla birlikte oktil siyonoakrilatların yüksek viskoziteleri nedeniyle direkt temas testi yapmayı da olanaksız kıldığını savunmuşlardır. Bu yüzden oktil siyonoakrilattan salınan maddelerin sitotoksik etkilerini ekstrakt dilusyon testi ile değerlendirmişlerdir. Polimerize siyonoakrilat ile temas halindeki hücrelerde 72 saat sonunda %70 canlılık görmüşlerdir. Sonuçlara göre ekstrakt konsantrasyonundaki artışla hücre canlılığında azalma görmüşlerse de örneklerin hiçbirinin H9C2 hücrelerine tamamen sitotoksik etki göstermediğini belirtmişlerdir (179).

Araştırmacılar uzun alkil siyonoakrilat polimerlerinin in vitro sitotoksitesilerini araştırmak için beş çeşit siyonoakrilat sentezlemişlerdir. Bu çalışmada düşük alkil homologları yüksek alkil homologlarından daha fazla doku sitotoksitesisi gösterdiğini değerlendirmişlerdir. Oktıl siyonoakrilatların deneyler sonunda düşük formaldehit salınımı yaptığı ve yüksek hücre canlılığı gösterdiğini ifade etmişlerdir (173).

DERMABOND™un MTT testinin direkt temas yöntemiyle L929 hücrelerine uygulanması sonucu sitotoksitesini kısa zincirli 2-Etil siyanoakrilatin ki ile karşılaştırıldığı bir çalışmada DERMABOND™un L929 hücrelerine daha fazla toksik etki yarattığını belirtmişlerdir. Klinik uygulamada hastalarda herhangi bir rahatsızlık oluşmadığını gözlemlemişlerdir (180).

Aljandan ve arkadaşları tarafından yapılan tavşan dişleri kullanılarak Diprogenta ve kalsiyum hidroksit, siyanoakrilat, diprogenta ve siyanoakrilat, kalsiyum hidroksitin değerlendirildiği bir çalışmada dört grupta pulpa nekrozuna rastlanmadığı ifade edilmiştir. Patolojik reaksiyonlar gruplar arasında belirgin farklılıklar gösterse de kullanılan tüm materyallerin biyouyumlu olduğu değerlendirilmiştir (70).

DERMABOND™ ile tıbbın çeşitli alanlarında yapılan klinik çalışmalar başarılı sonuçlar vermiştir. Bir çalışmada 2-Oktil siyanoakrilat yedi hastanın akciğer ameliyatında hava sızıntısını engellemek için kullanılmış. Beş hastada başarılı sonuçlar elde edilmiş , diğer iki hastadan biri 24 gün sonra kaybedilmiş fakat bunun siyanoakrilatla ilgili olmadığı değerlendirilmiş. Bir diğerinde ise yara yüzeyini çok geniş olduğu ve başka bir alternatif olmadığı için kullanıldığı belirtilen DERMABOND™'dan istenen sonuç sağlanamamış ve tek başarısız sonuç bu hastanın tedavisinde görülmüştür (181).

iRoot SP, AH Plus ve ProRoot mineral trioksit agregatının(MTA) numuneleri, Millipore filtre difüzyon testi ve MTT testinde ekstraktlar kullanılarak doğrudan temas yöntemi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada toksisite değerlendirilmeleri için fare fibroblastları (L929) kullanmışlardır. Filtre difüzyon testinde AH Plus'ın, iRoot SP ve MTA'dan anlamlı derecede daha toksik , iRoot SP'de MTA'dan anlamlı derecede daha toksik olduğunu gözlemlemişlerdir. MTT tahlilinde ise, MTA ekstraktları sitotoksik değilken, AH Plus ekstraktları hafif sitotoksik olarak değerlendirmişlerdir(182). Bu çalışmada kullandığımız L929 fare fibroblast hücrelerinde MTT testi ile CerKamed MTA materyalinin sitotoksitesini değerlendirdiğimizde, BioMTA+'ın sonuçları ile uyumlu olduğunu bulduk.

Bosio ve arkadaşlarının wister sıçanlarına tüplerle implante ettikleri iRoot SP, MTA Fillapex, DiaRoot Bioaggregate, beyaz MTA'nın bağ dokusu reaksiyonlarını in vivo olarak araştırdıkları çalışmalarında 7, 15, 30 ve 90 günlük periyotlarla

değerlendirmeler yapmışlardır. Bu çalışmada en iyi sonuçları MTA ve DiaRoot Bioaggregate vermiştir. MTA'nın düşük sitotoksitesini ve biyouyumluluğunun sebebinin içerisindeki çoğu kalsiyum bileşeni olan komponentlere bağlı olduğu düşünülmüştür. MTA Fillapex de her ne kadar MTA bileşenleri içerse de içerisindeki ana komponenti rezin bazlı olması nedeniyle iRoot SP, beyaz MTA ve DiaRoot Bioaggregate'ten daha kötü doku yanıtını gösterdiği de bu çalışmanın sonuçlarındadır (183).

Başak ve arkadaşları tarafından 3T3 fibroblastlarda kalsiyum silikat bazlı ürünlerin sitotoksitesini değerlendirilmek için yapılan bir çalışmada hücrelere 3T3 fibroblastlar direkt olarak Ortho MTA, BioAggregate, Biodentin, MTA Plus, MTA Angelus ve CerKamed MTA ile 24 saat ve 7 gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Sitotoksitesite MTT testi ile değerlendirildi. 24 saat sonunda CerKamed MTA'nın, MTA materyalleri arasında en yüksek hücre canlılığını gösterdiği ifade edilmiştir. 7. Gün sonunda ise en yüksek hücre canlılığı BioAggregat, MTA Angelus ve CerKamed MTA'da görülmüştür (184). Deney materyallerimizden olan BioMTA+ bu çalışmamızda 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta maruziyette hücre canlılığı sonuçları sırasıyla % 100.47, %97 ve %99,96 olarak elde edilmiştir

Karypidou ve arkadaşları tarafından MTA CAPS, MTA Angelus White, CerKamed MTA+, Masterdent MTA, Biodentin ve Proroot MTA'nın sitotoksitesini değerlendirmek için yapılan çalışmada MRC5 hücreleri kullanılmıştır. Sulforhodamine-B deneyiyle yapılan değerlendirmede 24 saat sonunda MTA Angelus White'in diğerlerinden daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. CerKamed MTA+ 24 saat sonunda MTA Angelus hariç diğer materyallerin tümü ile yakın sonuçlar göstermiştir. 72 saat sonunda tüm simanlar hücre canlılığı açısından benzer sonuçlar göstermiştir (185).

MTA, NeoMTA Plus ve Biodentin'in sitotoksitesilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 3T3 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. MTT ve sulforhodamine B testleri yapılmış ve sertleşme sonunda tüm materyaller kontrol grubuna göre daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Sertleşme öncesinde sulforhodamine B deneyinde MTA ve Biodentin kontrol grubu ve NeoMTA Plus dan düşük canlılık göstermiştir. MTT de sadece biodentin kontrol grubundan daha düşük canlılık göstermiştir. (186).

Tomas-Catala ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro bir çalışmada MTA Repair HP , NeoMTA Plus ve Biodentinin sitotoksitesi değerlendirilmiştir. İnsan diş pulpa kök hücreleri kullanılmıştır. Direkt temas yöntemi yapılan bu çalışmada 24 ve 48 saatlerde MTA Repair HP ve NeoMTA Plus varlığında ortalama hücre canlılığı görülürken, 48 saat ve 72 saatte Biodentinde diğerlerine göre daha yüksek hücre canlılığı gözlemlendiği bildirilmiştir. Sonuçta MTA Repair HP, NeoMTA Plus ve Biodentin sitouyumluluk göstermişlerdir (187).

MTT testi kullanılarak insan dental pulpa hücreleri üzerinde MTA ve MTA Plus'ın sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki materyalin de sitotoksik etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir(188). Biz de yaptığımız çalışmada BioMTA+'nın L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığını gördük.

Yapılan bir çalışmada MTA ve beyaz MTA'nın sitotoksikite ve genotoksikite değerlendirmesi için sırasıyla tripan mavisi ve Comet testi kullanılmış. Fare lenfoma hücreleri her iki materyalinde farklı konsantrasyonlarıyla maruz bırakılmışlardır. Sonuçlar her iki materyalde hiçbir konsantrasyonda genotoksikite ve sitotoksikite göstermemiş ve hücre canlılığını etkilememiştir (143). Bu çalışmada da kullandığımız BioMTA+ 1:1 ve 1:2 dilüsyonlarda benzer sonuçlar göstermiştir

Zakerzadeh ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada biodentin, ProRoot MTA ve TheraCal LC®'nin insan diş pulpa fibroblastlarındaki sitotoksikite ve genotoksikite değerlendirmesinde MTT ve Comet testleri kullanmıştır. MTT testi ile yapılan sitotoksikite değerlendirmesinde farklı konsantrasyonlarda üç grubun arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Comet testinde de yine gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir (146). Bizim TheraCal LC® ile yaptığımız sitotoksikite testinde ve Comet testinde 1:1 dilüsyonda diğer materyallerle belirgin bir fark bulunmuştur. TheraCal LC® ile maruziyette yaklaşık olarak 24 saatlik %14, 1 haftada %34 ve 2 haftada ise %12 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür. Comet testi ile yapılan genotoksikite sonuçlarında ise TheraCal LC®'nin her üç maruziyette de DNA hasarı oluşturduğu görülmüştür. Bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki sonuçların uyumsuzluğu uygulama yolu ve maruziyet koşullarındaki farklılıktan kaynaklanabilir.

Poggio ve arkadaşları tarafından yedi farklı pulpa kapama materyallerinden Dycal, Calsicur, Calcimol LC, TheraCal LC®, ProRoot MTA, MTA Angelus ve Biodentin'in sitotoksitesini in vitro olarak değerlendirmişlerdir. Alamar blue testi kullanılarak yapılan çalışmada murin odontoblast hücrelerini(MDPC-23) kullanmışlardır. 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda incelemişlerdir. Ayrıca 72 saatte MTT deneyi ile de sonuçları desteklemişlerdir. Alamar blue testi ile yapılan 24 saatlik değerlendirme sonuçlarına göre hücre canlılığı en yüksek Biodentine ve MTA Angelus materyallerinde, en düşük Dycal materyalinde olduğu görülmüştür. 48 saatlik değerlendirme sonuçlarına göre hücre canlılığı en yüksek Biodentine ve MTA Angelus materyallerinde, en düşük Dycal ve TheraCal LC® materyallerinde tespit edilmiştir. 72 saatlik değerlendirme sonuçlarına göre hücre canlılığı en yüksek Biodentine materyalinde, en düşük hücre canlılığı ise TheraCal LC®, Dycal, Calcimol LC materyallerinde izlenmiştir. MTA Angelus ve ProRoot MTA 72 saatte diğer zaman periyotlarına göre daha az biyouyumluluk göstermiş. TheraCal LC® ve Calcimol LC 72 saatte sitotoksik olarak değerlendirilmiş ayrıca bu MTT testi ile sonuçları doğrulamışlardır (189).

Sıçanlara üç kalsiyum silikat bazlı pulpa kuafaj materyalleri subkutan olarak implante etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ProRoot MTA, TheraCal LC® ve prototip bir trikalsiyum silikat simanı kullanmışlardır. bu materyallerin oluşturduğu kalsiyum ve fosfor kalınlıklarını değerlendirmişler. Çalışma tamamının biyoaktif olduğunu ve bio mineralizasyonu sağladığını göstermiştir. ProRoot MTA en yüksek, TheraCal LC® en düşük kalınlıklar elde edilmiş (129). Camilleri ve arkadaşlarının pulpa kuafaj materyallerinin kalsiyum hidroksit salınımı üzerine yaptıkları bir çalışmada TheraCal LC®'nin yüksek miktarda kalsiyum iyonu açığa çıkartabilmesine rağmen kalsiyum hidroksit oluşturmadığını ifade etmişlerdir. Bunun sebebinin TheraCal LC®'nin çevre ile iyon transferinin kısıtlı olduğu rezin modifiye bir materyal olması olarak değerlendirmişlerdir (190).

Beyaz mineral trioksit agregatının (MTA) ve % 15 bizmut oksitli beyaz Portland simanının genetik hasara neden olup olmadığının değerlendirildiği in vitro bir çalışmada murin fibroblastları kullanılmıştır. Comet testinin uygulandığı çalışmanın sonucunda MTA ve %15 bizmut oksitli beyaz Portland simanı genetik etki üretmemiştir (191). MTA ve Portland simanının genotoksitesilerinin araştırıldığı

bir diğer bir çalışmada Çin hamster yumurtalık huceleri kullanılmıştır. Comet testi uygulanan çalışmada test edilen tüm konsantrasyonlardaki MTA ve Portland simanları, DNA'da iplik kopmasına neden olmadı görülmüştür (192). Başka bir çalışmada da, MTA ve Portland simanlarının genotoksik etkileri 10 gönüllüden alınan periferel lenfositlerde değerlendirilmiş. Comet deneyi kullanılmış ve MTA ve Portland simanlarının insan periferel lenfositlerindeki DNA lezyonlarının seviyesini artıran bir faktör olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (193). Comet testinin uygulandığı ve L929 fare fibroblastlarını kullandığımız bu çalışmada BioMTA+'ın genotoksik bir etkisi görülmemiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, pulpa kuafajında kullanılan ve kullanılması muhtemel olan materyallerin MTT testi ile sitotoksik etkilerinin ve Comet yöntemiyle genotoksik etkilerinin sonuçları incelenerek değerlendirildi. Bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Hücre canlılığını değerlendirdiğimiz çalışmamızın birinci bölümünde BioMTA+ ve DERMABOND™ gruplarının 24 saatlik maruziyetlerinde elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. TheraCal LC®'nin ise 24 saatlik hücre canlılığı sonuçları kontrol ile karşılaştırıldığında %14'lük bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bir fark değildir.

Grupların 1 haftalık maruziyet değerlendirmelerin TheraCal LC®'nin hücre canlılığını %34'e yakın bir oranda azalttığı gözlenmiştir. Negatif ve pozitif kontrol gruplarının 1 haftalık maruziyetlerine göre TheraCal LC®'nin 1 haftalık maruziyeti değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır($p < 0.05$). 1 haftalık maruziyette DERMABOND™ ve BioMTA+ ekstraktlarından elde edilen sonuçlarda ise hücre canlılığı değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

2 haftalık maruziyet değerlendirmelerinde ise TheraCal LC®'nin hücre canlılık oranı %88'e çıkmış, TheraCal LC® için testlerdeki en yüksek değer gözlenmiştir. BioMTA+ ve DERMABOND™'un hücre canlılık oranları sırasıyla %99,96 ve %94,87 olarak gözlenmiştir.

2. Çalışmamızın ikinci bölümünde materyallerin Comet testi ile genotoksik etkilerinin inceledik. DERMABOND™ ve BioMTA+ 24 saatlik, 1 haftalık ve 2 haftalık maruziyetlerde hücrelerde DNA hasarı oluşturmamışlardır. TheraCal LC® ise tüm maruziyetlerde DNA hasarı oluşturmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı fark vardır($p < 0.05$).

3. Elde edilen sonuçlara göre; BioMTA+ vital pulpa tedavilerinde kullanılabilir bir materyal olarak değerlendirmekteyiz. Bu çalışmada sitotoksik ve genotoksik etkisi görülen TheraCal LC®'nin klinik olarak geniş pulpa ekspozyu olmayan dişlerde kullanılmasını uygun olabilir.

4. Sitotoksikite ve genotoksikite testlerinde BioMTA+ ve Kerr Life ile yakın değerler elde edilen DERMABOND™'un ise pulpa kuafaj materyallerine alternatif olarak kullanılabilmesinin değerlendirilmesi için ilave in vitro ve in vivo

linik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Böylelikle dentin yapımını indükleyip indklemediği ve tam bir iyileşme sağlayıp sağlamadığı ortaya çıkarılacaktır.



KAYNAKLAR

1. Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, vd. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J.* Mart 2010;55(1):59-64.
2. Roberson TM, Heymann HO, Swift EJ. *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry - 6th Edition.* Fourth Edition bs. St. Louis: Mosby Inc; 2011. 13-62 s.
3. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci(Elite Ed).* 2012;3:711-35.
4. Structure and functions of the dentin-pulp complex. İçinde: *Cohen's Pathways of the Pulp.* Eleventh Editions. USA: Elsevier Inc.; 2016. s. 532-72.
5. Addy M, Embery G, Edgar W, Orchardson R. *Tooth Wear and Sensitivity.* London: Martin Dunitz Ltd; 2000. 3-18 s.
6. Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res.* Haziran 1994;73(6):1205-11.
7. Avery J, Chiego DJ. *Essentials of Oral Histology and Embryology - 3rd Edition [Internet].* St. Louis: Mosby Elsevier; 2006 [a.yer 22 Ocak 2019]. 107-19 s. Erişim adresi: <https://www.elsevier.com/books/essentials-of-oral-histology-and-embryology/avery/978-0-323-03339-8>
8. Sumikawa DA, Marshall GW, Gee L, Marshall SJ. Microstructure of primary tooth dentin. *Pediatr Dent.* Aralık 1999;21(7):439-44.
9. Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent.* Mayıs 2000;28(4):277-85.
10. Pulp as a Connetive Tissue. İçinde: *Seltzer and Bender's Dental Pulp.* Chicago: Quintessence Publishing; 2012. s. 67-89.
11. Mjör IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int.* Haziran 2001;32(6):427-46.
12. Kuttler Y. Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* Ağustos 1959;12(8):996-9.
13. Mjör IA. *Pulp-Dentin Biology in Restorative Dentistry.* 1st edition. Chicago: Quintessence Pub Co; 2002.
14. Bertassoni LE, Orgel JPR, Antipova O, Swain MV. The dentin organic matrix

- limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. *Acta Biomater.* Temmuz 2012;8(7):2419-33.
15. Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC. Dental mineralization. *IntJDevBiol.* 1995;(39):93-110.
 16. Formation and Repair of Dentin in the Adult. İçinde: Seltzer and Bender's Dental Pulp. Chicago: Quintessence Publishing; 2012. s. 27-65.
 17. Repair of pulpal injury by dental materials. İçinde: Seltzer and Bender's Dental Pulp. Chicago: Quintessence Publishing; 2002.
 18. Biologic Considerations. İçinde: Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach. Fourth Edition. Illinois(IL): Quintessence Publishing Co,Inc; 2013. s. 1-26.
 19. Alaçam T. Pulpa ve periapikal dokuların biyolojisi. İçinde: Endodonti. İkinci Baskı. Ankara: Barış Yayınları; 2000. s. 17-44.
 20. Endodontic Treatment of Primary Tooth. İçinde: Essential endodontology Prevention and treatment of apical periodontitis. Madlen: Blackwell Pub; 2002. s. 308-30.
 21. Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol.* 1990;35(9):707-15.
 22. Aşçı SK. Pulpa Histolojisi. İçinde: Endodonti. İstanbul: Quintessence Publishing Co,Inc; 2014. s. 17-25.
 23. Hargreaves KM, Cohen S. Cohen's Pathways of the Pulp Expert Consult - 10th Edition. Tenth Edition. St. Louis: Mosby Company; 2011.
 24. Torabinejad M, Walton RE. Endodonti Temel İlkeler ve Uygulamalar.(R. Erişen, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.; 2011.
 25. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. Ingle's Endodontics. USA: 6PMPH; 2008.
 26. Dentin-Pulp Complex. İçinde: Oral histology : development, structure, and function. 5th bs Missouri.: Mosby.; 1998. s. 150-96.
 27. Rodd HD, Boissonade FM. Vascular status in human primary and permanent teeth in health and disease. *Eur J Oral Sci.* 2005;(113):128-34.
 28. Paediatric endodontics. İçinde: Paediatric Dentistry. Oxford University Press; 2001. s. 139-69.
 29. Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J.* Mart 1994;27(2):61-74.

30. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 01 Ocak 2004;15(1):13-27.
31. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res*. Nisan 1985;64 Spec No:530-40.
32. Okiji T, Yoshida K. Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate: A Review from the Biological and Physicochemical Points of View [Internet]. *International Journal of Dentistry*. 2009 [a.yer 29 Ocak 2019]. Erişim adresi: <https://www.hindawi.com/journals/ijd/2009/464280/>
33. Repair of Pulpal Injury with Dental Materials. İçinde: Seltzer and Bender's Dental Pulp. Chicago: Quintessence Publish Co,Inc; 2012. s. 301-21.
34. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):104-33.
35. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*. Şubat 2000;28(2):77-92.
36. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):509-20.
37. Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent*. Ekim 2009;34(5):615-25.
38. Ward J. Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Aust Endod J*. Nisan 2002;28(1):29-37.
39. Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *J Endod*. Temmuz 2008;34(7 Suppl):S18-24.
40. Çalışkan MK. Dentin hastalıklarının pulpaya etkisi ve vital endodontik tedaviler. İçinde: Endodontide tanı ve tedaviler. 3.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Tic.Ltd.Şti.; 2014. s. 31-82.
41. Christensen GJ. Pulp capping 1998. *J Am Dent Assoc*. Eylül 1998;129(9):1297-9.
42. Horsted P, Sandergaard B, Thylstrup A, El Attar K, Fejerskov O. A retrospective study of direct pulp capping with calcium hydroxide compounds. *Endod Dent Traumatol*. Şubat 1985;1(1):29-34.
43. Heitmann T, Unterbrink G. Direct pulp capping with a dentinal adhesive resin system: a pilot study. *Quintessence Int*. Kasım 1995;26(11):765-70.

44. Kopel HM. Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. *ASDC J Dent Child*. Nisan 1992;59(2):141-9.
45. Marzouk MA, Van Huysen G. Pulp exposure without hemorrhage. *J Dent Res*. 1966;(45):405.
46. Stockton LW. Vital pulp capping: a worthwhile procedure. *J Can Dent Assoc*. Haziran 1999;65(6):328-31.
47. Qureshi A, E. S, Nandakumar, Pratapkumar, Sambashivarao. Recent Advances in Pulp Capping Materials: An Overview. *J Clin Diagn Res*. Ocak 2014;8(1):316-21.
48. Stanley HR. Pulp capping: conserving the dental pulp--can it be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. Kasım 1989;68(5):628-39.
49. Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L, Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry(NWP). Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *J Dent Res*. Temmuz 2013;92(7 Suppl):16S-22S.
50. Heys DR, Cox CF, Heys RJ, Avery JK. Histological considerations of direct pulp capping agents. *J Dent Res*. Temmuz 1981;60(7):1371-9.
51. Hasheminia SM, Feizi G, Razavi SM, Feizianfard M, Gutknecht N, Mir M. A comparative study of three treatment methods of direct pulp capping in canine teeth of cats: a histologic evaluation. *Lasers Med Sci*. Ocak 2010;25(1):9-15.
52. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J*. Ekim 2005;55(5):293-301.
53. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci*. Aralık 2003;11(4):269-82.
54. Weiner R. Liners, bases, and cements: material selection and clinical applications. *Dent Today*. Haziran 2005;24(6):64, 66-72; quiz 73.
55. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res*. Nisan 1985;64 Spec No:541-8.
56. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*. Ekim 1999;25(10):676-82.
57. Khan S, Inamdar NK, Akask K, Singh MP, Chaurasia H. Calcium Hydroxide – A Great Calcific Wall. *Journal of Orofacial Research*. 2011;(1):26-30.
58. Kitasako Y, Inokoshi S, Fujitani M, Otsuki M, Tagami J. Short-term reaction of exposed monkey pulp beneath adhesive resins. *Oper Dent*. Aralık 1998;23(6):308-17.

59. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* Temmuz 1993;38(7):571-6.
60. Cox CF, Bergenholtz G, Fitzgerald M, Heys DR, Heys RJ, Avery JK, vd. Capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral microflora -- a 5 week observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol.* Ağustos 1982;11(4):327-39.
61. Holland R, de Souza V, de Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. *J Am Dent Assoc.* Eylül 1979;99(3):472-5.
62. Koroğlu AGDA, Ekren DDO, Kurtoğlu DDC. Geleneksel Ve Adeziv Dental Simanlar Hakkında Bir Derleme Çalışması. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 21 Nisan 2014;2012(2):205-16.
63. McWalter GM, el-Kafrawy AH, Mitchell DF. Long-term study of pulp capping in monkeys with three agents. *J Am Dent Assoc.* Temmuz 1976;93(1):105-10.
64. Bhaskar SN, Beasley JD, Ward JP, Cutright DE. Human pulp capping with isobutyl cyanoacrylate. *J Dent Res.* Şubat 1972;51(1):58-61.
65. Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. New Approaches in Vital Pulp Therapy in Permanent Teeth. *Iran Endod J.* 2014;9(1):15-22.
66. Dick HM, Carmichael DJ. Reconstituted antigen-poor collagen preparations as potential pulp-capping agents. *J Endod.* Temmuz 1980;6(7):641-4.
67. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater.* Kasım 2008;24(11):1486-94.
68. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, vd. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Haziran 2013;39(6):743-7.
69. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* Eylül 2013;46(9):808-14.
70. Aljandan B, AlHassan H, Saghah A, Rasheed M, Ali AA. The effectiveness of using different pulp-capping agents on the healing response of the pulp. *Indian J Dent Res.* Ekim 2012;23(5):633-7.
71. Foreman PC, Barnes IE. Review of calcium hydroxide. *Int Endod J.* Kasım 1990;23(6):283-97.
72. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* Temmuz

1995;21(7):349-53.

73. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* Nisan 2005;21(4):297-303.
74. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* Aralık 1993;19(12):591-5.
75. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Mart 1999;25(3):197-205.
76. Abdullah D, Ford TRP, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials.* Ekim 2002;23(19):4001-10.
77. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Haziran 2004;30(6):422-4.
78. Tselnik M, Baumgartner JC, Marshall JG. Bacterial leakage with mineral trioxide aggregate or a resin-modified glass ionomer used as a coronal barrier. *J Endod.* Kasım 2004;30(11):782-4.
79. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* Ocak 2010;36(1):16-27.
80. Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST, vd. The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* Şubat 2008;41(2):108-16.
81. Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandağ M, Canpolat C, Malkondu O, Kaptan F, vd. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* Kasım 2009;42(11):1004-14.
82. Ajami A-A, Bahari M, Hassanpour-Kashani A, Abed-Kahnamoui M, Savadi-Oskoe A, Azadi-Oskoe F. Shear bond strengths of composite resin and giomer to mineral trioxide aggregate at different time intervals. *J Clin Exp Dent.* 01 Temmuz 2017;9(7):e906-11.
83. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate--a review. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;34(1):1-7.
84. Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod.* Kasım 1998;24(11):768-71.
85. Srinivasan V, Waterhouse P, Whitworth J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. *Int J Paediatr Dent.* Ocak 2009;19(1):34-47.

86. Alaçam T. Dentin ve pulpa tedavileri. İçinde: Endodonti. 2. Baskı. Ankara: Barış Yayınları; 2000. s. 107-57.
87. Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent*. Ağustos 2001;23(4):326-30.
88. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*. Temmuz 1999;130(7):967-75.
89. Yamamoto S, Han L, Noiri Y, Okiji T. Evaluation of the Ca ion release, pH and surface apatite formation of a prototype tricalcium silicate cement. *Int Endod J*. Aralık 2017;50 Suppl 2:e73-82.
90. Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *J Endod*. Temmuz 2008;34(7 Suppl):S25-28.
91. Queiroz AM de, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LAB da. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci*. Haziran 2005;13(2):126-30.
92. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate(MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J*. Mart 2002;35(3):245-54.
93. Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol*. Ağustos 2001;17(4):163-6.
94. Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Decoloration of 1% methylene blue solution in contact with dental filling materials. *J Dent*. Eylül 1998;26(7):585-9.
95. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000;11(1):3-9.
96. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, vd. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2001;12(1):3-8.
97. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LSW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Nisan 2003;95(4):483-9.
98. Joffe E. Preserving tooth vitality. *Oper Dent*. Ağustos 2003;28(4):465-8.
99. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical–physical properties of TheraCal, a

- novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *International Endodontic Journal*. 2012;45(6):571-9.
100. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. Ağustos 2001;86(2):203-9.
 101. Basic Aspects. İçinde: *Biocompatibility of Dental Materials* [Internet]. 1st Edition. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2009 [a.yer 05 Şubat 2019]. s. 1-12. Erişim adresi: <https://www.springer.com/gp/book/9783540777816>
 102. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*. Mart 1988;21(2):89-99.
 103. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22 Suppl 2:S6-11.
 104. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*. Aralık 1997;1(4):154-62.
 105. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials(Basel)*. 28 Nisan 2009;2(2):514-48.
 106. Tuncer DS, Demirci PDM. DENTAL MATERYALLERDE BIYOUYUMLULUK DEĞERLENDİRMELERİ. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 21 Nisan 2014;2011(2):141-9.
 107. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 01 Mayıs 2007;12(3):E258-266.
 108. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*. Şubat 2004;2(1):51-62.
 109. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*. 2005;25(2):101-8.
 110. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, vd. In vitro biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2006;22(12):1081-5.
 111. Yıldırım ZS, Bakır EP, Bakır Ş, Aydın MS. Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri. *Selcuk Dental Journal*. 01 Aralık 2017;4(3):162-9.
 112. Freshney FI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Fifth Edition. John Wiley & Sons; 2005. 359-73 s.

113. Karaaslan C, Duydu Y, Ustundag A, Yalcin CO, Kaskatepe B, Goker H. Synthesis & Anticancer Evaluation of New Substituted 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)benzazoles. Med Chem. 11 Temmuz 2018;
114. Curtis D. Klaassen, John B. Watkins Iii. Lange: Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, Second Edition. Second Edition. Mc Graw Hill Lange; 109-135 s.
115. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 30 Ağustos 1984;123(1):291-8.
116. Rydberg B, Johanson KJ. ESTIMATION OF DNA STRAND BREAKS IN SINGLE MAMMALIAN CELLS. İçinde: DNA Repair Mechanisms [Internet]. Elsevier; 1978 [a.yer 20 Şubat 2019]. s. 465-8. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123226501500904>
117. Üstündağ A, Behm C, Föllmann W, Duydu Y, Degen GH. Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. Archives of Toxicology. Haziran 2014;88(6):1281-9.
118. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. Mart 1988;175(1):184-91.
119. Biocompatibility. İçinde: Phillips' Science of Dental Materials [Internet]. St. Louis: Elsevier Inc.; 2013 [a.yer 09 Şubat 2019]. s. 111-47. Erişim adresi: <https://www.elsevier.com/books/phillips-science-of-dental-materials/anusavice/978-1-4377-2418-9>
120. Çiçek C, Bilgiç A. Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model. İnfeksiyon Dergisi(Turkish Journal of Infection). 2006;(20(3)):231-41.
121. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. J Endod. Ocak 2001;27(1):23-30.
122. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. J Endod. Şubat 2001;27(2):96-102.
123. Pişkin B, Avsever H, Gündüz K. Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumluluk değerlendirme yöntemleri. Ondokuz Mayıs Univ Dis Hekim Fak Ders 2009; 10(2):41-49
124. Griffin JD. Utilizing bioactive liners. Stimulating post-traumatic dentin formation. Dent Today. Ekim 2012;31(10):132, 134-6.
125. Dickens SH, Flaim GM, Schumacher GE, Eichmiller FC, Schafer DR,

- Rutherford RB. Preclinical effectiveness of a novel pulp capping material. *J Endod.* Temmuz 2010;36(7):1222-5.
126. Hebling J, Lessa FCR, Nogueira I, Carvalho RM, Costa CAS. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *Am J Dent.* Haziran 2009;22(3):137-42.
 127. Bakhtiar H, Nekoofar MH, Aminishakib P, Abedi F, Naghi Moosavi F, Esnaashari E, vd. Human Pulp Responses to Partial Pulpotomy Treatment with TheraCal as Compared with Biodentine and ProRoot MTA: A Clinical Trial. *J Endod.* Kasım 2017;43(11):1786-91.
 128. Lee H, Shin Y, Kim S-O, Lee H-S, Choi H-J, Song JS. Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. *J Endod.* Ağustos 2015;41(8):1317-24.
 129. Hinata G, Yoshida K, Han L, Edanami N, Yoshida N, Okiji T. Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. *Int Endod J.* Aralık 2017;50 Suppl 2:e40-51.
 130. Mattamal GJ. US FDA perspective on the regulations of medical-grade polymers: cyanoacrylate polymer medical device tissue adhesives. *Expert Rev Med Devices.* Ocak 2008;5(1):41-9.
 131. Hallock GG. Expanded applications for octyl-2-cyanoacrylate as a tissue adhesive. *Ann Plast Surg.* Şubat 2001;46(2):185-9.
 132. "DERMABOND™ topical skin adhesive". Product prospectus. Ethicon. Summerville, New Jersey.
 133. "Bio MTA+ ". Product prospectus. PPH CerKamed. Stalowa Wola, Poland.
 134. "Life" . Product prospectus. Kerr Corporation. Michigan, USA.
 135. Morszeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* Haziran 2008;12(2):113-8.
 136. Kidd EA. A caries control programme for adult patients. *Dent Update.* Eylül 1997;24(7):296-301.
 137. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol(Roma).* 18 Haziran 2014;5(2):69-76.
 138. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* Nisan 2009;35(4):475-80.
 139. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* Ağustos 2011;44(8):697-730.

140. Hörsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Kasım 2003;96(5):591-600.
141. Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues J-J, Salih E, Tompkins K, vd. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent.* Şubat 2003;16(1):66-76.
142. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* Nisan 2006;13(7):611-20.
143. Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Brazilian oral research.* 2005;19(3):183-7.
144. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J.* 2014;33(1):64-9.
145. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* Mayıs 1996;12(3):186-93.
146. Zakerzadeh A, Esnaashari E, Dadfar S. In Vitro Comparison of Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Vital Pulp Capping Materials. *Iran Endod J.* 2017;12(4):419-25.
147. Camilleri J. The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J.* Aralık 2008;41(12):1107-14.
148. Chiang T-Y, Ding S-J. Comparative physicochemical and biocompatible properties of radiopaque dicalcium silicate cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Ekim 2010;36(10):1683-7.
149. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, vd. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* Nisan 2012;38(4):495-500.
150. Ulreich JB, Chvapil M. A quantitative microassay for in-vitro toxicity testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res.* Kasım 1981;15(6):913-22.
151. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent.* Ağustos 2000;84(2):229-36.
152. Lönnroth E-C, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* Şubat 2003;61(1):52-6.
153. Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on

- human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Eylül 2002;94(3):361-5.
154. Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T. Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthop Scand.* Nisan 1994;65(2):147-53.
 155. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil.* Ağustos 1999;26(8):666-71.
 156. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* Ekim 2004;37(10):699-704.
 157. Mp R, Ai K. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic materials. 2003;15:7.
 158. Kangarloo A, Sattari M, Rabiee F, Dianat SO. Evaluation of cytotoxicity of different root canal sealers and their effect on cytokine production. *Iran Endod J.* 2009;4(1):31-4.
 159. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont.* Ağustos 2000;13(4):311-5.
 160. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dental Materials.* Ocak 1992;8(1):65-70.
 161. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Füreder W, Sperr WR, vd. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res.* Ağustos 1995;74(8):1513-20.
 162. Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro.* Şubat 2005;19(1):145-54.
 163. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* Nisan 2007;33(4):377-90.
 164. Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc.* Temmuz 1994;125(7):823-31.
 165. Hwas M, Sandrik JL. Acid and water solubility and strength of calcium hydroxide bases. *J Am Dent Assoc.* Ocak 1984;108(1):46-8.
 166. Modena KC da S, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA de S, Hebling J, Sipert CR, vd. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* Aralık 2009;17(6):544-54.

167. Yoshimine Y, Maeda K. Histologic evaluation of tetracalcium phosphate-based cement as a direct pulp-capping agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Mart 1995;79(3):351-8.
168. Balaji DVR, Manikandan DD, Abirami DG, Joe DJN. Cyanocrylates - Stick Instead Of Stitch. 2019;2(2):8.
169. Raetzke PB. Covering localized areas of root exposure employing the “envelope” technique. *J Periodontol.* Temmuz 1985;56(7):397-402.
170. Bishara SE, VonWald L, Laffoon JF, Warren JJ. Effect of using a new cyanoacrylate adhesive on the shear bond strength of orthodontic brackets. *Angle Orthod.* Aralık 2001;71(6):466-9.
171. Clancy JMS, Dixon DL. Cyanoacrylate home denture repair: The problem and a solution. *Journal of Prosthetic Dentistry.* 01 Ekim 1989;62(4):487-9.
172. Lage-Marques JL, Conti R, Antoniazzi JH. The use of Histoacryl in endodontics. *Braz Dent J.* 1993;3(2):95-8.
173. Hee Park D, Kim S, Ahn K-D, Yong Kim E, Kim Y, Keun Han D. In vitro degradation and cytotoxicity of alkyl 2-cyanoacrylate polymers for application to tissue adhesives. *Journal of Applied Polymer Science.* 19 Eylül 2003;89:3272-8.
174. Mizrahi B, Stefanescu CF, Yang C, Lawlor MW, Ko D, Langer R, vd. Elasticity and safety of alkoxyethyl cyanoacrylate tissue adhesives. *Acta Biomaterialia.* 01 Ağustos 2011;7(8):3150-7.
175. Bhatia SK, Arthur SD, Chenault HK, Kodokian GK. Interactions of polysaccharide-based tissue adhesives with clinically relevant fibroblast and macrophage cell lines. *Biotechnol Lett.* 01 Kasım 2007;29(11):1645-9.
176. Bhatia SK, Arthur SD. Poly(vinyl alcohol) acetoacetate-based tissue adhesives are non-cytotoxic and non-inflammatory. *Biotechnol Lett.* 01 Ağustos 2008;30(8):1339-45.
177. Lee YJ, Jung GB, Choi S, Lee G, Kim JH, Son HS, vd. Biocompatibility of a novel cyanoacrylate based tissue adhesive: cytotoxicity and biochemical property evaluation. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e79761.
178. Pascual G, Sotomayor S, Rodríguez M, Pérez-Köhler B, Kühnhardt A, Fernández-Gutiérrez M, vd. Cytotoxicity of Cyanoacrylate-Based Tissue Adhesives and Short-Term Preclinical In Vivo Biocompatibility in Abdominal Hernia Repair. *PLoS ONE.* 2016;11(6):e0157920.
179. Abtahi S, Behravan J, Ehtesham M, Aghasizadeh M, Vafaey Z, Afsharnezhad S. Evaluation of the Cytotoxic Effect of Tissue Glue(Octyl 2-Cyanoacrylate) on H9C2 Cardiomyoblast Cells Using Extract Dilution Assay. *Razavi International Journal of Medicine.* 29 Kasım 2015;3.

180. Nitsch A, Pabyk A, Honig JF, Verheggen R, Merten H-A. Cellular, Histomorphologic, and Clinical Characteristics of a New Octyl-2-Cyanoacrylate Skin Adhesive. *Aesth Plast Surg.* 01 Ocak 2005;29(1):53-8.
181. Carr JA. The intracorporeal use of 2-octyl cyanoacrylate resin to control air leaks after lung resection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 01 Nisan 2011;39(4):579-83.
182. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* Eylül 2010;43(9):769-74.
183. Bósio CC, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MCS, Felipe WT, Rivero ERC. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate(MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *International Endodontic Journal.* 2014;47(7):667-74.
184. Basak V, Bahar TE, Emine K, Yelda K, Mine K, Figen S, vd. Evaluation of cytotoxicity and gelatinases activity in 3T3 fibroblast cell by root repair materials. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 02 Eylül 2016;30(5):984-90.
185. Karypidou A, Trikas E, Dimosiari G, Koulaouzidou E, Economides N. Cytotoxicity and Metal Content of Tricalcium Silicate-Based Endodontic Cements. *International Journal of Dentistry and Oral Health.* 2018;4(2):7.
186. Pinheiro LS, Iglesias JE, Bojink D, Mestieri LB, Kopper PMP, Figueiredo JA de P, vd. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study. *Journal of Endodontics.* 01 Temmuz 2018;44(7):1140-5.
187. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, vd. Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics.* 01 Ocak 2018;44(1):126-32.
188. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, vd. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate(MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *International Endodontic Journal.* 2017;50(8):780-9.
189. Poggio C, Ceci M, Dagna A, Beltrami R, Colombo M, Chiesa M. In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Arh Hig Rada Toksikol.* 01 Eylül 2015;66(3):181-8.
190. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC®, and a Prototype Tricalcium Silicate-based Dentin Replacement Material after Pulp Capping in Entire Tooth Cultures. *Journal of Endodontics.* 01 Kasım 2014;40(11):1846-54.
191. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of

genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J.* 2010;43:843–8.

192. Ribeiro D A, Sugui M M, Matsumoto M K, Duarte M A, Marques M E, Salvadori D M: Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular portland cements on chinese hamster ovary (cho) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101: 258–261 (2006).
193. Braz MG, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA (2006) Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *Journal of Oral Rehabilitation* 33, 234–9.