



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**LİZOZİM, LAKTOFERRİN VE TAŞIYICI OLARAK
POLOKSAMER 407 İÇEREN YENİ
FORMULASYONLARIN BİYOUYUMLULUKLARININ İN
VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

DİLŞAD ŞENÖZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. NÜKET SANDALLI

İSTANBUL 2014

DOKTORA TEZ SAVUNMASI

Doktora öğrencisi Dt. Dilşad ŞENÖZ'ün çalışması jürimiz tarafından Pedodonti Anabilim Dalı doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

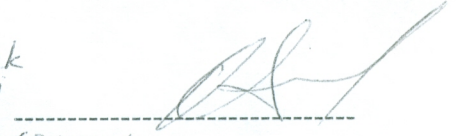
Üye : Prof..Dr. Nüket SANDALLI(Danışman)
Üniversite : Yeditepe Üniversitesi



.....

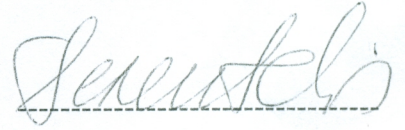
Üye : Prof. Dr. İlknur TANBOĞA yerine 1.yedek
Üniversite : Marmara Üniversitesi
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Fiğen SEYMEN



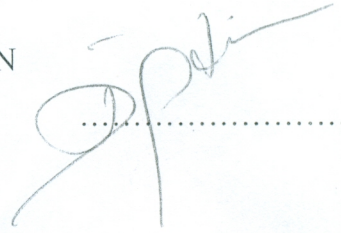
.....

Üye : Doç. Dr. Senem SELVİ KUVVETLİ
Üniversite : Yeditepe Üniversitesi




.....

Üye : Doç. Dr. Didem ÖZDEMİR ÖZENEN
Üniversite : Yeditepe Üniversitesi



.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hande SİPAHİ
Üniversite : Yeditepe Üniversitesi

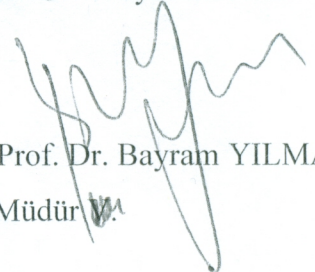


.....

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 1.8.2019 tarih ve ...18-3... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Müdür



İMZA

ÖZET

Üç yaşın altındaki çocuklarda, gelişmekte olan sürekli dişlerde fluorozis riski oluşturması nedeniyle floridli diş macunu ve uzun süre kullanımındaki yan etkileri ve sitotoksitesi nedeniyle klorheksidinin kullanımı önerilmemektedir. Tükürük proteinlerinden Lizozim ve Laktoferrin içeren bir preparatın küçük çocuklarda diş çürüklerinin önlenmesi için bir çözüm getirebileceği düşünülmüş, poloksamer taşıyıcı sistemler kullanılarak geliştirilen yeni bir formülasyonun topikal uygulamalarının ağız hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu görülmüştür.

Bu nedenle, Lizozim, Laktoferrin ve taşıyıcı sistem olarak Pluronic F-127 isimli Poloksamer kullanılan, diş çürüğüne neden olduğu bilinen *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri kanıtlanmış farklı formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, yeni geliştirilmiş bu formülasyonların biyouyumluluklarının klorheksidin jel ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* koşullarda değerlendirilmesidir.

Çalışmamızda kullanılan formülasyonlar: (1) pH:5.0 Sorensen's Tampon Çözeltisi, (2) %20 a/h Poloksamer 407 jel, (3) %10 a/h Poloksamer 407 jel, (4) Lizozim ve Laktoferrinin %20 konsantrasyondaki poloksamer 407 ile birleştirilmesiyle, (5) 4. grubun MİK değeri olacak şekilde Lizozim ve Laktoferrinin %10 konsantrasyondaki poloksamer 407 ile birleştirilmesiyle, (6) Sorensen's Çözeltisi (pH:7.0) negatif kontrol olarak, (7) Lizozim ve Laktoferrin tamponda (Sorensen's Çözeltisi pH:5.0) çözdürülerek yedi grup olarak hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak % 0.2'lik klorheksidin gargara kullanılmıştır. Mukozal membran iritasyonunun değerlendirildiği birinci bölümde, HET-CAM yöntemi kullanılarak tavuk embriyosu içeren yumurtalar üzerinde formülasyonların iritasyon skorları belirlenmiştir. İkinci bölümde ise, MTT test yöntemi kullanılarak formülasyonların L 929 hücre kültürü üzerine sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Mukozal iritasyon testi iki farklı deney şeklinde yürütülmüş, her iki deneyde de gruplar zayıf ve orta derecede iritasyon göstermiş, grupların hiç birinde mukoza üzerine

ciddi derecede iritasyon gözlenmemiştir. Kontrol grubu olan klorheksidin gargaranın iritasyon seviyesi ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Sitotoksisite deneyinde ise, klorheksidin gargara en düşük hücre canlılık oranlarının görüldüğü grup olarak saptanmıştır. pH değeri 7.0 olan Sorensen's Çözeltisi en düşük sitotoksisite değerlerini gösteren, biyouyumluluk seviyesi en yüksek grup olarak belirlenirken, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, deney gruplarından hiç biri ciddi derecede sitotoksisite veya mukozal iritasyon göstermemiştir. Ancak, maddelerin daha uzun süreli etkilerinin anlaşılabilmesi için, ileriki çalışmalarda bu maddelerin etkinliğinin kinetik olarak değerlendirilmesi ve hayvan deneylerinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lizozim, Laktoferrin, Poloksamer 407, HET-CAM, sitotoksisite*

SUMMARY

In children that under three years old are not suggested to use fluoridated toothpaste because of the risk of fluorosis in developing permanent teeth or chlorhexidine for a long period resulting adverse effects and cytotoxicity. New formulations containing saliva proteins such as lysozyme and lactoferrin might be effective on preventing tooth decay in younger children. Topical application of antimicrobial agents with the drug delivery system poloxamer is thought to be effective in the treatment of oral diseases.

Therefore, formulations containing lysozyme, lactoferrin and drug delivery system poloxamer 407 with the trade name of Pluronic F-127 were produced and it has been proven that these formulations are effective on cariogenic bacteria such as *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. The aim of this study was to determine the biocompatibility of these new formulations in comparison with 0.2 % chlorhexidine in vitro conditions.

Formulations for our study were prepared and divided into seven different groups as follows: (1) Sorensen's solution (pH: 5.0) as buffer, (2) %20 gel formulation containing only poloxamer 407, (3) %10 gel formulation containing only poloxamer 407, (4) Lysozyme and Lactoferrin with %20 concentration of poloxamer 407, (5) Lysozyme and Lactoferrin with %10 concentration of poloxamer 407 as MIC value of group 4, (6) Sorensen's Solution (pH:7.0) as negative control group and (7) dissolved Lysozyme and Lactoferrin in buffer (Sorensen's Solution pH:5.0). %0.2 chlorhexidine mouthwash was used as the control group. In mucosal irritation study, irritation levels of formulations were identified using HET-CAM test method on eggs containing chicken embriyos. In the cytotoxicity test, the MTT test method was used on L 929 cell culture in order to access the cytotoxic effects of the formulations.

Mucosal irritation test was performed as two different experiments. Both test groups showed low and moderate irritation levels, none of them showed serious

irritation levels. There was no statistical significance between the chlorhexidine control group and other groups.

The cytotoxicity experiment (MTT), chlorhexidine mouthwash showed lowest cell viability rates. Sorensen's Solution pH:7.0 group showed lowest cytotoxicity and highest biocompatibility levels. There is no statistical significance between other groups.

In this study, none of the experimental groups showed severe cytotoxicity or mucosal irritation. However, more in vitro studies should be carried out to test these materials' kinetic efficiency and also animal studies should be conducted.

Keywords: *Lysozyme, Lactoferrin, Poloxamer 407, HET-CAM, cytotoxicity*

TEŞEKKÜR

Tüm ömrüm boyunca mesleki disiplinini örnek alacağım, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim, pedodonti eğitimimde çok büyük emeği olan değerli danışman hocam Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Nüket SANDALLI**'ya,

Böylesine geniş imkanları olan bir fakültede bize çalışma imkanı sunan değerli hocam, dekanımız Sayın **Prof. Dr. Türker SANDALLI**'ya,

Tezimizdeki formülasyonların hazırlanmasında yardımlarından ve katkılarından dolayı Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ve Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Yrd. Doç. Dr. Güleğül DUMAN**'a,

Tezimizin mukozal iritasyon deneyleri kısmında görüş, öneri ve sonsuz yardımlarını esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın **Prof. Dr. Ahmet Aydın** ve Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Yrd. Doç. Dr. Hande SİPAHİ**' ye,

Tezimizin sitotoksisite deneyleri bölümünde aldığı eğitimini, zamanını ve ilgisini esirgemeksizin çalışmamıza katkıda bulunan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Sayın **Ezgi BOYLU**' ya,

Tezimdeki ve pedodonti eğitimimdeki değerli yardımları ve katkılarından dolayı Sayın hocam **Doç. Dr. Senem SELVİ KUVVETLİ**'ye,

Eğitimim boyunca bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini yanımda hissettiğim değerli hocalarım **Doç. Dr. Didem ÖZDEMİR ÖZENEN** ve **Yrd. Doç. Dr. Elif SUNGURTEKİN EKÇİ**'ye,

İki yıldır aramızda bulunmasa da manevi desteğini eksik etmeyen, tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın hocalarım **Doç. Dr. Özgür Önder KUŞÇU** ve **Doç. Dr. N. Eşber ÇAĞLAR**'a,

Beraber klinikte çalışmayı keyifli hale getirdiğimiz, hastane içerisinde ve dışarısında güzel paylaşımlarımız olan **tüm asistan arkadaşlarıma**,

Doğduğum günden beri sevgi, destek ve anlayışlarını her an hissettiğim, aldığım bütün kararlarda arkamda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan annem **Serap ŞENÖZ** ve babam **Uzm. Dr. Ali İhsan ŞENÖZ**'e,

Canım kardeşim **Dilara ŞENÖZ**'e,

Doktora eğitimim boyunca her türlü sıkıntımı paylaşan ve desteğini hiç eksik etmeyen nişanlım **Dt. Özgür ARICAN**'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	I
ÖZET	II
SUMMARY	IV
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VIII
KISALTMALAR	XII
TABLolar LİSTESİ	XVIII
GRAFİKLER LİSTESİ	XX
ŞEMA VE ŞEKİLLER LİSTESİ	XXI
RESİMLER LİSTESİ	XXII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tükürük	5
2.1.1. Tükürüğün Fizyolojisi.....	5
2.1.2. Tükürüğün Görevleri.....	7
2.1.2.1. Sindirimdeki rolü.....	8
2.1.2.2. Lokmanın oluşmasına etkisi.....	8
2.1.2.3. Tat almadaki rolü.....	8
2.1.2.4. Konuşmaya yardımcı etkisi.....	9
2.1.2.5. Su regülasyonunda rolü.....	9
2.1.2.6. Oral flora ve dişler üzerine etkisi.....	9
2.1.2.7. Tükürüğün koruyucu fonksiyonları.....	10
2.1.2.7.1. Laktoferrin.....	12
2.1.2.7.2. Lizozim.....	14
2.2. Ağız Sağlığı ve Antimikrobiyal Ajanlar.....	15

2.2.1. Antimikrobiyal Ajanlar.....	16
2.2.1.1. Fluorid.....	16
2.2.1.2. Esansiyel Yağ Gargaraları.....	19
2.2.1.3. Triklosan.....	20
2.2.1.4. Povidon İyodin.....	21
2.2.1.5. Kitosan.....	22
2.2.1.6. Klorheksidin.....	23
2.2.1.6.1. Klorheksidin antimikrobiyal etkisi.....	24
2.2.1.6.2. Piyasada bulunan klorheksidin preparatları.....	26
2.2.1.6.3. Klorheksidin güvenilirliği.....	27
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	28
2.3.1. Oral Bölgeye Uygulanan İlaç Sistemleri.....	29
2.3.1.1. Adeziv Olmayan Sistemler.....	29
2.3.1.2. Adeziv Sistemler.....	30
2.3.1.2.1. Adeziv tabletler.....	32
2.3.1.2.2. Adeziv filmler ve yamalar	32
2.3.1.2.3. Adeziv yarı katı preparatlar (merhemler – jeller).....	33
2.3.1.2.3.1. Poloxamer (Pluronic)	33
2.3.1.2.4. Tozlar.....	35
2.4. Biyouyumluluk.....	36
2.4.1. Sitotoksosite.....	42
2.4.1.1. Sitotoksosite Değerlendirmelerinde Kullanılan Test Yöntemleri.....	42
2.4.1.1.1. Direkt temas ve ekstrat testi.....	43
2.4.1.1.2. Agar difüzyon testi.....	44
2.4.1.1.3. Filtre difüzyon testi.....	44
2.4.1.1.4. Dentin bariyer testi.....	44
2.4.1.1.5. Diş kesit modeli.....	45
2.4.1.2. Sitotoksosite Testlerinin Değerlendirme Yöntemleri.....	46
2.4.1.2.1. Canlılık değerlendirme testleri	46
2.4.1.2.2. Yaşam değerlendirme testleri.....	47
2.4.1.2.3. Proliferasyon değerlendirme testleri.....	48

2.4.1.2.4. Metabolizma değerlendirme testleri.....	49
2.4.2. Glutasyon Tespiti.....	51
2.4.3. Mutajenite Testleri.....	51
2.4.4. Hayvan Testleri.....	52
2.4.5. Kullanım Testleri.....	53
2.4.6. Mukoza İrritasyon Testleri (HET-CAM).....	54
2.4.6.1. HET-CAM Prosedürü.....	56
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Çalışmada kullanılacak formülasyonların hazırlanması.....	61
3.1.1. Sorensen's fosfat çözeltisinin hazırlanması (Fosfat ile sodyum tuzları karışımı)..	62
3.1.2. Pluronic® F-127 (Poloksamer) hazırlanması.....	63
3.1.3. Lizozim ve laktoferrinin Pluronic® F-127 ile hazırlanması.....	64
3.2. Mukozal iritasyonun değerlendirilmesi.....	65
3.2.1. Kullanılan materyaller.....	68
3.2.2. Kontrol grupları.....	68
3.2.3. Yumurtaların hazırlanması.....	69
3.2.4. HET-CAM testi.....	70
3.3. Sitotoksisite değerlendirmesi.....	72
3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması.....	74
3.3.2. MTT testinin uygulanması.....	75
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	79
4. BULGULAR.....	80
4.1. HET-CAM deneyinin bulguları.....	80
4.2. Sitotoksisite deneyinin bulguları.....	84
5. TARTIŞMA.....	92
5.1. Etken maddelerin (Laktoferrin ve Lizozimin) antibakteriyel etki ve biyoyumluluklarının değerlendirilmesi.....	94
5.2. Klorheksidinin antibakteriyel etki ve biyoyumluluğunun değerlendirilmesi....	96
5.3. Poloksamer 407 taşıyıcı sistemlerinin tartışılması.....	98

5.4. Biyouyumluluk testlerinin tartişılması.....	100
5.4.1. HET-CAM yontemi.....	100
5.4.2. MTT yontemi.....	102
5.5. İritasyon deneyi bulgularının tartişılması.....	105
5.6. Sitotoksisite deneyi bulgularının tartişılması.....	107
6. SONUÇLAR.....	109
7. KAYNAKLAR.....	111
8. ÖZGEÇMİŞ.....	130



KISALTMALAR

μg	: mikrogram
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
3T3	: fibroblast (fare)
AD	: Anabilim Dalı
APF	: Asidule fosfatfluorid
ark.	: Arkadaşları
ASTM	: American Society for Testing and Materials
atm	: Atmosfer
BHK21	: Fibroblast (hamster)
Ca	: Kalsiyum
CAM	: Chorioallantoic Membran
CHO	: Over (hamster)
CHX	: Klorheksidin
Cl	: Klor
cm^2	: Santimetrekare
CO_2	: Karbondioksit

COS	: Böbrek (maymun)
CPP-ACP	: Kazein fosfopeptit amorfoz kalsiyum fosfat
DLD	: Dondurularak kurutulan lipozomal DOTAP
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribonkleikasit
DOTAP	: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DT40	: Lenfoma hücresi (civciv)
E14,1	: Embriyonik kök hücreler (fare)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	: Ekstrasellüler polisakkarit sentezi
FDA	: Food and Drug Administration
Fe ⁺³	: Demir iyonu
g/l	: Gram/litre
gr	: Gram
GRAS	: Generally Recognised as Safe
H1, H9	: Embriyonik kök hücreler (insan)

HEK293	: Böbrek epitel hücresi (insan)
HeLa	: Epitel hücresi (insan)
HepG2	: Karaciğer epitel hücresi (insan)
HET-CAM	: Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membran
HGF	: Human primer gingival fibroblast
HL60	: Lösemi hücresi (insan)
IgA	: İmmunoglobulin A
IgG	: İmmunoglobulin G
IgM	: İmmunoglobulin M
ISO	: International Organization for Standardization
İPS	: İntrasellüler polisakkarit sentezi
K	: Potasyum
kg	: Kilogram
Lps	: Lipopolisakkarit
L 929	: Fibroblast (fare)
<i>L. acidophilus</i>	: <i>Lactobcillus acidophilus</i>
L6	: Myoblast (sıçan)

LD50	: Lethal Dose 50
M	: Mol
MDCK	: Epitel hücresi (köpek)
MDP	: Mikrobiyal Dental Plak
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MTA	: Mineral Trioksit Aggregate
MTT	: (3-(4,5-dimetihylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolyumbromide) testi
MS	: Mutans Streptokokları
N	: Normal
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre

P	: Fosfor
PEO	: Polyoxyethylene-A
pH	: Power of hydrogen
ppm	: Parts per million
PPO	: Polyoxypropylene-B
PtK1	: Epitel hücresi (sıçan)
PVP-I	: Povidon-iyodin
Qs	: Herhangi bir en yüksek değerin belirlenemediği, ancak istenen etkinin sağlanabildiği en küçük miktar.
R1	: Embriyonik kök hücre (fare)
RNA	: Ribonukleikasit
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
rpm	: Revolutions per minute
S. mutans	: Streptococcus mutans
S. sobrinus	: Streptococcus sobrinus
sa	: Saat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH-SY5Y	: Nöroblastoma hücresi (insan)

sn : Saniye

SP2 : Plazma hücresi (fare)

T24 : Mesane epitel hücresi (insan)



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Tükürüğün başlıca organik ve inorganik bileşenleri.....	6
Tablo 2. Tükürüğün fonksiyonları ve içeriğindeki maddeler ile ilişkisi.....	7
Tablo 3. Gram pozitif bakteriler üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri.....	24
Tablo 4. Gram negatif bakteriler üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri.....	25
Tablo 5. Mantarlar üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri.....	26
Tablo 6. Biyoyumluluk test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.....	38
Tablo 7. Hücre serileri ve kökenleri.....	41
Tablo 8. HET-CAM yöntemi ile iritasyon testi skorumlama değerleri.....	58
Tablo 9. HET-CAM yöntemi ile iritasyon testi değerlendirme.....	59
Tablo 10. Formulasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları ve üretici firmaları.....	62
Tablo 11. Çalışmada biyoyumluluğu değerlendirilecek formulasyonlar, içerikleri ve kodları.....	66
Tablo 12. Her grup için üç farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorları.....	81
Tablo 13. Her grup için beş farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorları.....	83
Tablo 14. Deney gruplarının tüm günlerde gözlenen % canlılık değerleri.....	85

Tablo 15. Günler arası hücre canlılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p<0.05$) gruplar.....87

Tablo 16. Tüm günler için deney gruplarının ikişerli olarak karşılaştırılarak canlılık yüzdelерinin değerlendirilmesi.....89



GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. Her grup için üç farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorlarının dağılımı.....82

Grafik 2. Her grup için beş farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorlarının dağılımı.....84

Grafik 3. Sitotoksisite deneyi gruplar arası hücre canlılık yüzdelerinin tüm günler için değerlendirilmesi.....86

ŞEMA VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Laktoferrinin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri.....	13
Şekil 2. Klorheksidinin yapısal formülü (1-1 Hexamethylenebis [5-(4-chlorophenyl) biguanide]).....	23
Şekil 3. PEO-PPO-PEO (poloksamer) yapısı.....	33
Şema 1. Çalışmanın Akış Şeması (HET-CAM deneyi).....	67
Şema 2. Çalışmanın Akış Şeması (MTT deneyi).....	73

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1.** Dölllenmiş tavuk yumurtası gelişimi.....55
- Resim 2.** A: 0.1 M sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu (pozitif kontrol); B: %0.9 salin solüsyonu (negatif kontrol).....57
- Resim 3.** Pluronic[®] F-127 (SIGMA[®] - ALDRICH, BASF Corp, USA).....63
- Resim 4.** Tavuk yumurtasından elde edilen Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®] - ALDRICH, USA) ve insan sütünden elde edilen Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®] - ALDRICH, USA).....64
- Resim 5.** Çözeltilerin vortekslenmesi (yellowline TTS 2).....65
- Resim 6.** HET-CAM testinde kullanılan negatif ve pozitif kontrol grupları.....69
- Resim 7.** Eforstar dijital ısı ve nem sistemi ile kuluçka makinesi.....70
- Resim 8.** Hava boşlukları işaretlenmiş yumurtaların tur motoru ve separe ile kesilmesi.....71
- Resim 9.** Solda embriyo gelişimi devam etmekte olan döllenmiş yumurta, sağ tarafta çalışma dışı bırakılan ve damar gelişimi izlenemeyen yumurta.....72
- Resim 10.** %5 CO₂, %95 hava içeren inkübasyon makinesi (NuAire AutoFlow NU-8700 Dual Chamber Water Jacket CO₂ Incubator).....74
- Resim 11.** Çalışmada kullanılan Tripsin-EDTA, DMEM ve DPBS solüsyonları.....75
- Resim 12.** Santrifüj cihazı (Sigma, UK).....76
- Resim 13.** Santrifüjden sonra tüpün dibine çökmüş olan hücreler.....77

Resim 14. MTT testinde kullanılan plate.....77

Resim 15. Otomatik petri okuyucu (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum).....78



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız boşluğu, organizmanın en kompleks, en yoğun ve en çeşitli mikroorganizma popülasyonunu içinde barındıran ve kendine özgü ekosisteme sahip organıdır. Ağız florası başta bakteriler olmak üzere çok sayıda mantar, protozoa ve virüs içermektedir (1,2). Buna ek olarak ağız florası, farklı bireylerin aynı ağız bölgelerinde değiştiği gibi, bir bireyin farklı dişlerinden alınan plak örneklerinde de sayısal ve niteliksel değişiklikler göstermektedir (3). Tükürük bezlerinden salgılanan tükürüğün ağız mikroflorası üzerine etkisi büyüktür. Sindirim, tat alma, su regülasyonu, ağız boşluğunda bulunan maddeleri sulandırma ve tüm ağız boşluğuna dağılmasını sağlama gibi sayısız işlevinin yanında birçok fonksiyonel immün madde içermekte, ağız mukozası ve dişler üzerinde koruyucu etkisi bulunmaktadır (4). Ağız boşluğunu örten mukoza üzerinde ilaç uygulaması farmasötik teknoloji alanında ilgi çeken bir konudur. Adeziv tabletlerde biyoadezyon, sentetik ya da doğal makromolekülün istenen süre boyunca biyolojik dokuya tutunmasını sağlamaktadır. Tutunulan doku mukoza ise biyoadeziv sistem mukus tabakasıyla temas etmekte ve bu nedenle bu sistem mukoadeziv sistem olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli ilaçların daha uzun süre ağız içerisinde kalmasını sağlayarak etki süresini uzatmaya yönelik çalışmaların artmasıyla adeziv sistemler de geliştirilmiş ve bu konuda araştırmalar yaygınlaşmıştır. Cila, merhem, film, sakız, pastil, tablet ve jel kullanımı gibi birçok seçenek ortaya çıkmıştır. Doğal veya sentetik biyoadeziv polimerler kullanılarak farklı ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır (5,6).

Doğada mikroorganizmaların, tıbbi aletler, diş minesi, kalp kapakçığı, akciğer ve orta kulak gibi canlı/cansız yüzeylere yapışıp, orada büyüyerek yaşadıkları bilinmektedir. Yapışarak büyüyen hücrelerin oluşturduğu bu yapı, genel olarak biofilm olarak isimlendirilmektedir (7). Biyofilmin güncel tanımı ise, 'mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı

fenotip gösterebilen ve oluşturan, mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks' olarak yapılmaktadır (8).

Mikrobiyal dental plak (MDP), ağızda sert ve yumuşak dokular üzerinde birçok mikroorganizma tarafından oluşturulmuş bir biyofilmdir. Mikroorganizma toplulukları bu yapı ile savunma mekanizmalarından, kuruluktan, antimikrobiyal ajanlardan korunmakta ve bu ortamda besin maddelerinin yoğunluğu artmaktadır. MDP'nin, minenin demineralizasyonu ile başlayan çürük ve klinik olarak diş etlerinde kırmızı renk, kanama, ödem ve büyüme ile karakterize gingivitis oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (9).

MDP'nin etkin bir şekilde uzaklaştırılması ağız sağlığının sürdürülmesinde ve beyaz nokta lezyonlarının önlenmesinde temel yöntem olarak kabul edilmektedir. Diyetin düzenlenmesi, florid içerikli diş macunları ile günlük diş fırçalama ve diş ipi kullanımı supragingival plağı uzaklaştırmada en sık önerilen yöntemdir (10). Bu yöntemle antibakteriyel ağız gargaraları eklendiğinde ağız hijyeninin önemli derecede iyileştiği gösterilmiştir (11,12). Kazein fosfopeptit amorfoz kalsiyum fosfat (CPP-ACP) uygulamaları ve sistemik ve/veya yerel florid uygulamaları gibi yöntemlerle de çürük insidansı ve dişeti hastalıklarının azaltılabildiği belirtilmektedir (13,14).

Özellikle son yıllarda MDP eliminasyonunda yaygın olarak kullanılan florid ve klorheksidine alternatif olabilecek uygulamalar üzerine yapılan araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Remineralizasyon ajanları ile ilgili son dönem çalışmalar kazein fosfopeptit-amorfoz kalsiyum fosfat, sodyum kalsiyumfosfosilikat (biyoaktif cam), ksilitol, nano hidroksiapatit gibi ajanlar ile birlikte antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış tükürük proteinlerini ön plana çıkarmaktadır (15–17).

Konu ile ilgili yapılmış güncel çalışmalardan biri, Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda 2012 yılında tamamlanmış 'Lizozim ve Laktoferrin İçeren Yeni Formülasyonların Geliştirilmesi ve Mutans Streptokokları ile Laktobasiller Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi'

konulu doktora tezidir. Çalışmanın sonucunda lizozim (tavuk yumurtasından elde edilen), laktoferrin (insan sütünden elde edilen) ve taşıyıcı sistem olarak poloxamer ve/veya fosfolipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) kullanılan formülasyonların *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı farklı oranlarda antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, formülasyonların uzun dönem kullanımının biyolojik uyumluluk açısından değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (18).

Biyoyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi olarak tanımlanmaktadır (19). Diş hekimliğinde kullanılan antimikrobiyal ajanların, mukoza hücrelerine olası toksik ve/veya iritan etkileri, materyallerin biyoyumluluk çalışmalarının önemini artırmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar, klinikte uygulanmaya başlanmadan önce bu materyallerin ağız dokuları üzerindeki olası zararlı etkileri *in vitro* testler ile incelenmeli, ardından hayvan çalışmalarından elde edilecek bulgular göz önünde bulundurularak materyalin toksisite derecesi ve/veya iritasyon etkisi hakkında fikir sahibi olunmalı, bu çalışmaların sonuçlarına bağlı olarak klinik kullanımları önerilmeli ya da gerekli düzenlemeler yapılmalıdır (20). Bu nedenle diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyoyumlulukları *in vitro* testlerin ardından, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile değerlendirilmektedir (21). Birinci fazda uygulanan *in vitro* biyoyumluluk testlerinin amacı, vücut dokuları üzerine veya içine yerleştirildiklerinde, materyallere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonun test ortamında oluşturulmasıdır (22). Materyal ve bileşenlerinin, hücrelerle moleküler düzeyde gözlenen etkileşiminin, inflamasyon, nekroz, immünolojik değişiklikler, genotoksisite ve apoptozis gibi doku reaksiyonlarından sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bir materyalin sitotoksitesi, bu materyal ya da ekstraktının hücre kültürü üzerindeki toksikolojik riski olarak tanımlanmaktadır (21). Sitotoksite testleri, test materyallerinin uygun hücre kültüründeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği *in vitro* testlerdir (23).

Her yeni geliştirilmiş maddenin veya formülasyonun, kısa ve uzun dönemde biyolojik uyumunun ne olduğu, yani temasta olduğu dokulara gösterdiği tepki, bu tepkinin derecesi ve dokuların buna karşı gösterdikleri yanıtın ne olduğu belirlenmelidir (23).

Diş hekimliği literatüründe Lizozim ve/veya Laktoferrin içeren, diş macunları dışında farklı taşıyıcı sistemlerin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırıldığı ilk çalışma 'Lizozim ve Laktoferrin İçeren Yeni Formülasyonların Geliştirilmesi ve Mutans Streptokokları ile Laktobasiller Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi' konulu doktora tezidir. Çalışmanın sonucunda yeni geliştirilmiş Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonların, ağızdaki plakta bulunan ve çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerinde etkili olduğu gözlenmiş, antimikrobiyal/antiplak ajan olarak ilaç piyasasında yer alabileceği düşünülmüştür. Bunun için ilk aşama ise biyoyumluluk testlerinin yapılmasıdır (18).

Bu çalışmanın amacı, Lizozim ve Laktoferrin içeren ve taşıyıcı sistem olarak Pluronic F-127 isimli Poloksamer 407 polimeri içeren antibakteriyel etkileri kanıtlanmış farklı formülasyonların ve taşıyıcı sistemlerin biyoyumluluklarının %0.2'lik klorheksidin gargara ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* koşullarda değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürük

Tükürük; parotis, submandibular ve sublingual gibi 3 çift major ve ağız mukozasının dudaklar, yanaklar ve sert damak gibi değişik yerlerine yerleşmiş pek çok minör tükürük bezi tarafından salgılanan karışık bir sekresyondur. Major tükürük bezleri tükürük üretiminde ana role sahiptir. Ağız içerisinde, solunum ve sindirim sisteminin üst kısmında, trakea ve paranazal sinüslere yerleşik yaklaşık 600-1000 kadar minör tükürük bezinin de tükürük üretimine katkısı vardır (24).

2.1.1. Tükürüğün Fizyolojisi

Tükürük, renksiz, kokusuz, tatsız, hafif bulanık ve yoğunluğu az bir sıvıdır. 1003-1010 özgül ağırlığındadır. Donma noktası $-0.2-0.4^{\circ}\text{C}$ arasındadır. Tükürük çok spesifik olmayan bir savunma sistemine sahiptir. Bu doğal savunma sistemi; lizozim, laktoferrin, peroksidaz sistemleri, histatinler, müsünler ve diğer basit çevresel zincirli polipeptitleri içermektedir. Bu savunma sisteminin bazı proteinleri, oral bakterilerin kümelenmesini sağlayarak ağız içinden temizlenebilirliklerini artıran bir takım bakteriyostatik ve bakterisidal etkilere sahiptir (25).

Tükürük sıvısına, tükürük bezlerinin salgıları dışında oral mukoza transuda hücreleri, bakteriler, virüsler, üst solunum yolu sekresyonları, gastrointestinal reflü sıvısı, ekstrasellüler sıvı ve dişeti oluşu sıvısı da katılmaktadır. Tükürükte besin kalıntıları, kandan aktif veya pasif olarak geçen proteinler, eritrositler, mukozal lezyonlar veya enfeksiyon varlığında görülen lökositler gibi bileşenler de mevcuttur. Organik bileşenlerin büyük çoğunluğunu proteinler, glikoproteinler, enzimler, aminoasitler, karbonhidratlar, hormonlar

ve lipitler oluşturmaktadır. İnorganik bileşenler ise; kalsiyum (Ca), fosfor (P), sodyum (Na), potasyum (K), magnezyum (Mg), klor (Cl) ve tiosiyanattır (Tablo 1) (26–28).

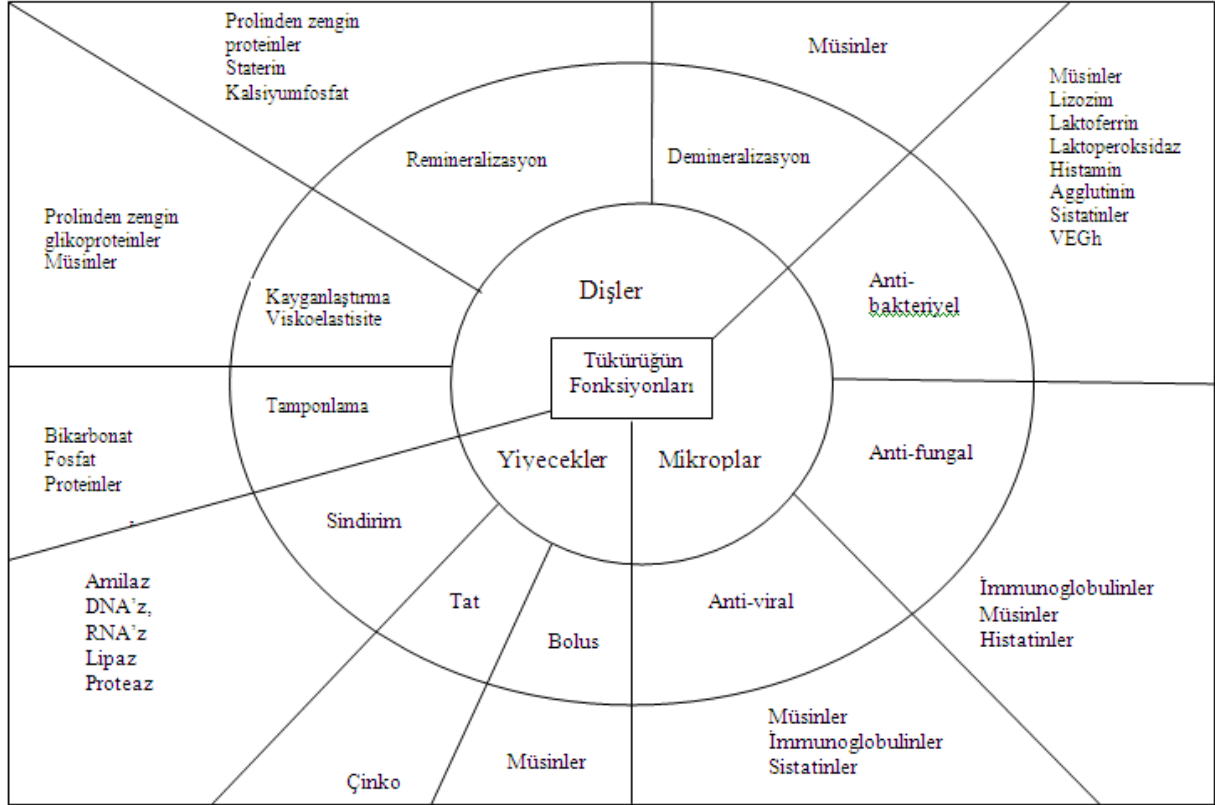
Tablo 1. Tükürüğün başlıca organik ve inorganik bileşenleri (29).

Organik bileşenler		İnorganik bileşenler
Proteinler	Küçük organik moleküller	Elektrolitler
Albumin	Kreatin	Amonyak
Amilaz	Glukoz	Bikarbonat
B-glukronidaz	Lipidler	Kalsiyum
Sistatinler	Azot	Klorür
Epidermal büyüme faktörü	Sialik asit	Florür
Esterazlar	Üre	İyodür
Fibronektin	Ürik asit	Magnezyum
Gustin		Fosfatlar
Histatinler		Potasyum
IgA, IgM, IgG		Sodyum
Kallikrein		Sülfatlar
Laktoferrin		Tiyosiyanatlar
Lipaz		
Laktatdehidrogenaz		
Lizozim		
Musinler		
Sinir büyüme faktörü		
Peptidazlar		
Fosfatazlar		
Prolince zengin proteinler		
Ribonükleazlar		
Tükürük peroksidazları		
Salgısal komponent		
Salgısal IgA		
Serum proteinleri (eser)		
Tiroince zengin proteinler		
Vitamin bağlayıcı proteinler		

2.1.2. Tükürüğün görevleri

Tükürük insan organizmasında önemli birçok görevi üstlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Tükürüğün fonksiyonları ve içeriğindeki maddeler ile ilişkisi (30).



2.1.2.1. Sindirimdeki rolü

Sindirim işlemi ağızda başlamaktadır. Tükürüğün ana görevi yiyeceklerin sindirilmesine yardım etmek ve sindirim kanalının giriş bölgesini korumaktır. Gıdaların ufalanması ve kimyasal parçalanmasında, lokmanın özofagusa taşınmasında yardımcıdır. Kuru yiyecekler tükürük yardımı ile sulandırılarak hem ağız mukozasının ıslatılması ile çiğneme hem de yutma işlemi kolaylaştırılmış olmaktadır. Tükürük yapısında bulunan pityalin veya α -amilaz, karbonhidrat sindiriminde önemli rol oynamaktadır. İnsan tükürüğünün amilolitik aktivitesi α -amilaza bağlıdır. Amilolitik aktivite karbonhidrattan zengin diyet ile belirgin oranda artmaktadır. Dilin posterior kısmındaki von-Ebner bezlerinden salgılanan lipaz da trigliseritlerin parçalanmasında görev almaktadır. Fazla miktarda alınacak yağlı diyet sonrası pankreatik lipaz ile birlikte salgı miktarında artış görülmektedir (31–33).

2.1.2.2. Lokmanın oluşmasına etkisi

Ağızda çiğnenerek ufalmış besinler tükürük musini yardımı ile yumuşak kıvamlı bir kitle şekline dönüşmektedirler. Tükürük müsini düşük erime, yüksek viskozite ve elastisite gibi özelliklere sahiptir. Ağız mukoza yüzeylerinde bol miktarda bulunmakta ve dokuların su kaybını önleyici bir bariyer görevi yapmaktadır. Müsini sayesinde gıdalar sulandırılıp kaygan hale geldiklerinden yutma işlemi de kolaylaşmış olmaktadır. Tükürükteki musin, ufalanan parçaları birbirine yapıştırarak yutulabilir hale getirmektedir. Ağız kuruluğu olan kişilerde yutmanın zorlaştığı bilinmektedir (31–33).

2.1.2.3. Tat almadaki rolü

Tat alma hissi, beslenmenin ilk evresinde aktive olup yiyeceğin temel besin öğelerinin ve zararlı ya da toksik olabilecek karışımların tanımlanmasına izin vermektedir. Tat, tükürük formasyonu için ana stimulan faktördür. Diğer yandan, ağız içinde tükürük varlığı, tat hissinin oluşması için zorunludur. Lingual papilladaki tat tomurcuklarının

içindeki tat reseptör hücrelerinin stimüle edilebilmeleri için yemek parçalarının bir solüsyon içinde olmaları gerekmektedir. Ayrıca, tat hassasiyeti tükürük içeriği kadar ağız içi sıvılarla temas eden reseptör hücreler ile de ilgilidir. Örneğin tuzlu tat dilin arka tarafında bulunan uyum sağlamış tat hücrelerinin stimüle edilmemiş tükürük içindeki tuz konsantrasyonunu tespit etmeleri ile oluşmaktadır. Tükürük hem yiyeceklerin eritilmesinde hem de tat cisimciklerine taşınmasında görev almaktadır. Ayrıca dildeki tat cisimcikleri tükürükle temizlenerek yeni uyarılara hazır duruma getirilir (31–33).

2.1.2.4. Konuşmaya yardımcı etkisi

Tükürüğün organizmanın su gereksiniminin sağlanmasında önemli etkileri mevcuttur. Ağız ve boğaz mukozasının kurumaması susuzluk hissine neden olmakta ve su içilmesini sağlamaktadır. Sağlıklı organizmada bu durum geçerlidir. Bukkal ve faringeal mukozanın yeterince ıslatılması koruyucu yönünün yanında konuşma açısından da gereklidir. (31–34).

2.1.2.5. Su regülasyonunda rolü

Tükürük organizmada termoregülatör rol oynamaktadır. Ter, poliüri, hemoraji gibi nedenler ile fazla su kaybedilmesi gibi organizmanın suya ihtiyaç duyduğu durumlarda afferent sinirler uyarılmakta ve tükürük miktarı azalmaktadır. Bol su içmekle susuzluk hissi giderilerek tükürük salgısı fazlalaşmakta, suya gereksinme azalmaktadır. Korku, heyecan, sıcak ve kuru hava ve dehidratasyon ağız kuruluğu yaparak su alma ihtiyacını doğurmaktadır (4).

2.1.2.6. Oral flora ve dişler üzerine etkisi

Tükürük, ağız temizliği ve diş sağlığında önemli rol oynamaktadır. Ağız boşluğunda optimum düzeyde tükürük salgısı olmalıdır. Tükürük bakteriler üzerine bakteriyostatik ve bakterisidal etki gösterdiğinden ağız kokusuna neden olan bakterilerin

üremesini engellemektedir. Tükürük, dişler arasındaki yemek kırıntılarının erimesini ve uzaklaşmasını kolaylaştırarak ağız temizliğine katkı sağlamaktadır. Tükürük ve diş çürükleri arasındaki ilişki uzun yıllardır bilinmektedir.

Tükürük salgılanma hızının diş yüzeylerinin mekanik olarak temizlenmesindeki payı büyüktür. Tükürük yapısındaki glikoproteinler dişin mine tabakası üzerinde bir ağ oluşturmaktadır. Çürük yapıcı mikroorganizmalar karbonhidratları fermante ederek asit ve dekstranları ortaya çıkarır, asitler mine tabakasında demineralizasyona neden olarak diş çürüğünü başlatırlar. Dekstran, bakteriler için besin kaynağıdır. Ağızda asidik pH oluşmasında diyet, tamponlama kapasitesi, amonyak ve üre miktarları rol oynamaktadır. Tükürükle salgılanan bikarbonat tamponlama görevi ile çürük oluşumunu engellemektedir. Tükürükteki karbonik asit-bikarbonat sistemi ve fosfat ile proteinler tamponlama görevlerini sağlamaktadır. Tükürükteki amonyak ve ürenin de çürük oluşumunda etkisi olduğu bilinmektedir. Tükürük kalsiyumunun yüksek düzeylerde bulunması diş çürüklerini engellemektedir. İnorganik fosfat ise, çürük oranı fazla olan bireylerde daha yüksek bulunmuştur. Tükürükte Ca/P oranının dişlerin remineralizasyonunda dolayısıyla çürüğün önlenmesinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (31,32,35).

2.1.2.7. Tükürüğün Koruyucu Fonksiyonları

Fiziksel, kimyasal ve antibakteriyel özellikleri sayesinde tükürüğün ağız sağlığı üzerine koruyucu etkisi vardır. Fiziksel etkileri esas olarak tükürük akış hızı ve sulu içeriği ile ilişkilidir. Tükürük, dişleri ve oral mukozayı yıkayarak; temizleyici bir solüsyon, iyon kaynağı, tampon ve bir bariyer olarak görev yapmaktadır. Tükürük diş yüzeyinde bulunduğu tamponlama kapasitesiyle plak asitlerinin demineralizasyona sebep olmasına engel olmaktadır. Ayrıca, tükürük vücudumuza yiyecek, içecek veya inhalasyon yoluyla giren yabancı maddelerin karşılaştığı ilk biyolojik ajandır (36). Yutkunmadan sonra bile tükürüğün gastrointestinal yol boyunca mukozayı koruyucu etkisi vardır (37).

Tükürük, yumuşak doku tamirinde etkili olan birçok biyokimyasal sistem ve antibakteriyel bileşik içermektedir. Tükürük proteinleri plazmanın yaklaşık %3'ü kadardır ve çoğunun antibakteriyel özelliği vardır (26).

Tükürük yapısında mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen ve mukozayı enfeksiyondan koruyan birçok madde yer almaktadır. Bunlardan birisi, asiner hücrelerden salgılanan peroksidaz ve duktal sistemden salgılanan iyodittir. Tükürükteki diğer antibakteriyel protein, lizozimdir. Lizozim, bakteriyel hücre membranının polisakkaritlerini hidrolize ederek etki gösterir. Birçok mikroorganizmanın destrüksiyonunda ve inhibisyonunda önemli göreve sahiptir (33,38).

Diğer bir savunma elemanı tükürük immunoglobulinleridir. Bezlerin stromasındaki bağ dokusunda yer alan plazma hücrelerinden salgılanan IgA mukozanın dış yüzeylerini mikroorganizmalara karşı korumaktadır. Tükürükte IgG ve IgM immunoglobulinleri de görülmektedir (33).

Tükürükte bulunan bir diğer koruyucu ajan olan laktoferrin, demire bağlı bir protein olup antibakteriyel özellik göstermektedir. Parotis ve submandibuler bezlerin seröz hücrelerinde immunofloresan yöntemlerle lokalize edilebilmiştir. Spesifik antikor varlığında demire satüre olmayan laktoferrin mikroorganizmalara inhibitor etki göstermektedir (33,38).

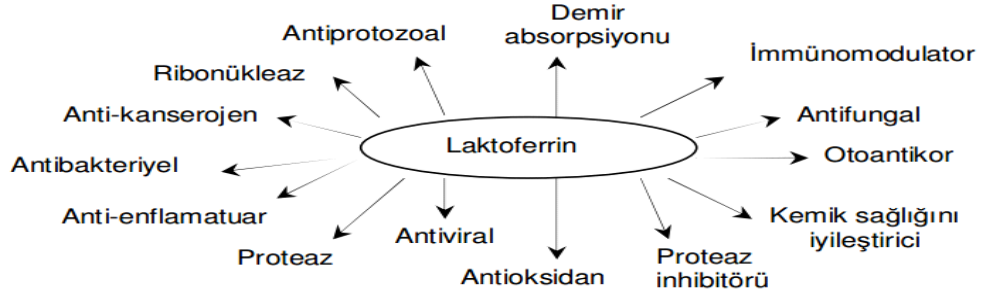
Tükürük proteinleri; sekretuar antikorlar -özellikle IgA-, lizozim, laktoferrin, peroksidaz, prolinden zengin proteinler, histatin, musin gibi non-immunoglobulinlerden oluşmaktadır. Tükürükte total protein konsantrasyonu değişkenlik göstermektedir. Parotis bezinin protein konsantrasyonu submandibular beze göre daha yüksektir. Bu proteinler nötralizasyon, yiyeceklerin sindirimi ve oral floranın düzenlenmesi gibi tükürüğün bir çok fonksiyonuna eşlik etmektedirler (37,39).

2.1.2.7.1. Laktoferrin

Laktoferrin inek, insan, kısrak, keçi, fare gibi birçok memeli türünün sütünde bulunan ve demir bağlayan bir glikoproteindir. Laktoferrin aynı zamanda gözyaşı, tükürük, burun salgısı, polimorfonükleer lökositler, bronşiyal bezlerin epitel hücreleri, seminal vasiküller, nötrofil granülleri ve eklem sıvısında da bulunmaktadır (10,11).

Diğer sıvılarla karşılaştırıldığında sütte daha yüksek oranda laktoferrin bulunmaktadır. Ancak laktoferrin düzeyi süt türleri arasında da büyük farklılıklar göstermektedir. İnsan, domuz ve fare gibi canlıların sütünde laktoferrin seviyesi yüksek olmasına karşın, inek ve diğer geviş getiren hayvanların sütünde daha düşüktür (12,40). Laktoferrin endüstriyel olarak yağsız süttten veya peyniraltı suyu tozundan üretilmektedir (41). İnek ve insan sütünden elde edilen laktoferrinler birbirlerine çok benzemektedir. Her iki süt türündeki laktoferrinler, demiri bağlama kapasiteleri ve aminoasit bileşimi açısından büyük bir farklılık göstermezler. Yapılan hayvan çalışmalarında biyoaktivitelerinin oldukça benzer olduğu saptanmıştır (42).

Laktoferrin doğal bağışıklıkta rol oynadığı gibi antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioksidan, antikanserojen, kemik sağlığını iyileştirici, bağırsakta demir absorpsiyonunu düzenleyici, antiinflamatuvar, immünomodulasyon ve hücre gelişiminin kontrolü özelliklerine de sahiptir. Ayrıca lipopolisakkarit ve glikozaminoglukan gibi bazı biyoaktif bileşikler bağlama ve inhibe etme de dahil olmak üzere oldukça fazla ve çeşitli biyolojik aktivite göstermektedir (43–45).



Şekil 1. Laktoferrinin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri (46).

Laktoferrin gıda katkı maddesi olarak güvenli kabul edilmektedir. İnsanlar yüzyıllardır süt ve peynir gibi ürünleri tüketerek laktoferrini (insan sütü için yaklaşık 2mg/ml, inek sütü için yaklaşık 0.1mg/ml) doğal yollardan almaktadırlar (47). Ayrıca AMES, kromozom anormalite ve mikronukleus testleri sonucunda peyniraltı suyundan elde edilen saf laktoferrinin herhangi bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir (48).

Dört-on üç hafta süresince tek doz şeklinde ve maksimum 2 mg/kg/gün olacak şekilde farelere uygulanan oral doz toksisite testi sonucunda da herhangi bir olumsuzluğa rastlanmamıştır (24). İnsanlarda yapılan çalışmalarda da 1 haftadan 1 yıla kadar değişen sürelerde 100mg/gün-3.6g/gün aralığında değişen dozlarda uygulamalar yapılmış ve herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır. Hamile kadınlar üzerinde yapılan en yüksek dozda çalışmada 90 gün süresince 200 mg/gün inek sütünden elde edilmiş laktoferrin kullanılmış ve sonuç olarak laktoferrinin güvenli olduğu kabul edilmiştir. İnek sütü laktoferrininin gıda katkısı olarak kullanımının güvenli (GRAS) olduğu Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (United States Food and Drug Administration- FDA) tarafından da kabul edilmektedir (47).

2.1.2.7.2. Lizozim

Lizozim, virüsler ve bütün canlı organizmaların dokularından, salgılarından ve hücrelerinden saflaştırılarak elde edilen hidrolitik bir enzimdir. Sütteki çözünür lizozim konsantrasyonu mevsim, hayvanın cinsi, meme sağlığı, beslenme, doğum, laktasyon evresi gibi çeşitli değişkenlere bağlı olarak aynı tür içerisinde ve bir türden diğerine büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (49).

Lizozimin 3 temel fonksiyonu vardır.

1) Gram pozitif bakterilerde bakteriyel hücre peptidoglikanlarını ve polisakkaritleri parçalayan direkt enzimatik etki,

2) Peptidoglikan muramildipeptide ayrılıp ve immün uyarısı yaratıldığında indirekt bir enzimatik etki,

3) Pozitif yüklü lizozim bakteriyel hücre membranlarındaki negatif yüklü grupları nötralize etme etkisidir (50).

Ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim olan lizozim, hücre zarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakadaki β -1,4 glikozidik bağları hidrolize etmesi sebebiyle özellikle gram pozitif bakterilere karşı çok etkilidir. Hücre zarının hidrolize olması, hücre zarının yapısal bütünlüğünün bozulması ve dolayısıyla bakteri hücresinin zarar görmesine neden olmaktadır (51). Lizozim gram pozitif bakterilerin yanı sıra termofilik spor oluşturan bakterilere karşı da kullanılabilir (52).

Lizozimin genel olarak *Clostridium botulinum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Listeria monocytogenes* gibi gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu, ancak kalın peptidoglikan dış zara sahip gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmadığı bilinmektedir (53). Yapılan alışmalarda EDTA, aprotinin, organik asitler gibi bileşikler ile birlikte veya karbonhidratlara bağlı olarak kullanıldığında lizozimin gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olabildiği gözlemlenmiştir (54).

Lizozim, süt ve yumurta gibi gıdalarla uzun yıllardır bolca tüketildiğinden toksikolojik açıdan tehlikesiz kabul edilmektedir. İnsan sütündeki lizozim seviyeleri 0.03g/l- 3.0g/l arasında değişmektedir. Tavuk yumurtasındaki lizozim de insan sütündeki ile aynı enzimatik özellikler ve benzer aminoasit dizilimine sahiptir. İnsan sütünden elde edilen lizozimden daha kolay ulaşılabilir ve daha ucuz olması nedeniyle çalışmalarda genelde tavuk yumurtasından elde edilen lizozim kullanılmaktadır (55).

2.2. Ağız Sağlığı ve antimikrobiyal ajanlar

Diş rğ, diş sert dokularının yıkımıyla karakterize bir hastalıktır. Mikroorganizmalar, diyetle alınan karbonhidratlar ve diş yapısı arasında zamanla meydana gelen etkileşimler gibi birçok nedene bağlı olarak oluşabilmektedir (13,14).

Ağızda bulunan mikroorganizmaların çoğu, biyofilm olarak adlandırılan yzeeye yapışık mikroorganizma topluluklarına aittir. Mikroorganizma toplulukları bu yapı ile savunma mekanizmalarından, kuruluktan, antimikrobiyal ajanlardan korunur ve bu ortamda besin maddelerinin yoğunluğu artar. Günümüzde periodontal hastalıkların ve diş rğnn asıl sebebi mikrobiyal dental plak olarak kabul edilmektedir (56).

Diyet şeklinin değiştirilmesi, yerel veya sistemik florid ve kazein fosfopeptit uygulamaları, dental plağın mikroorganizma bileşeninin kimyasal ajanlar kullanılarak

elimine edilmesi gibi yöntemlerle çürük prevalansı ve dişeti hastalıklarının azaltılabildiği belirtilmektedir (13,14).

Özellikle son yıllarda plak eliminasyonunda yaygın olarak kullanılan florid ve klorheksidine alternatif olabilecek materyaller üzerine yapılan araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Remineralizasyon ajanları üzerine yapılan son çalışmalar kazein fosfopeptit-amorfoz kalsiyum fosfat, sodyum kalsiyumfosfosilikat (biyoaktif cam), ksilitol, nano hidroksiapatit gibi ajanlar ile birlikte antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış tükürük proteinlerini ön plana çıkarmaktadır (15–17).

Konu ile ilgili yapılmış güncel çalışmalardan biri, 2012 yılında tamamlanmış 'Lizozim ve Laktoferrin İçeren Yeni Formülasyonların Geliştirilmesi ve Mutans Streptokokları ile Laktobasiller Üzerindeki Antibakteriyel Etkilerinin *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi' konulu doktora tezidir. Çalışma sonucunda tavuk yumurtasından elde edilen lizozim, insan sütünden elde edilen laktoferrin ve taşıyıcı sistem olarak poloxamer ve/veya fosfolipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) kullanılan formülasyonların *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı farklı oranlarda antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, formülasyonların uzun dönem kullanımının biyolojik uyumluluk açısından değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (18).

2.2.1. Antimikrobiyal ajanlar

2.2.1.1. Fluorid

Fluorid, hem ekonomik hem de etkili bir antimikrobiyal ajan olması nedeniyle elli yıldan uzun bir süredir diş çürüğünün önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (57). Tükürük ve plakta konsantre olmuş fluorid minenin demineralizasyonunu önlemektedir. Demineralize mine tarafından kalsiyum ve fosfatla birlikte alınan fluorid mine kristal yapısının bakteriyel asit üretimine karşı daha dirençli olmasını sağlamaktadır (58).

Fluoridin bakteriyel metabolizmayı inhibe ederek asit üretimini ve bakteriyel polisakkarid yapımını engellediği gösterilmiştir (59).

Fluoridler yüksek konsantrasyonda patojen plak bakterileri üzerinde bakterisid etki meydana getirirler. Özellikle yerel florid uygulamalarının bu bakteriler üzerindeki spesifik etkileri dişeti sağlığını da olumlu etkilemektedir (60).

Mikrobiyal dental plak oluşumunda hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine proteinlerin yapışmasının etkili olduğu görüşü giderek ağırlık kazanmaktadır. Yüzeyde bulunan pozitif yüklü kalsiyumlar ve negatif yüklü fosfat grupları proteinlerle etkileşerek onları tutarlar. Proteinlerin karboksilik grupları kalsiyumla, amino grupları ise fosfatlarla elektrostatik bağlar yaparak hidrokstapatite yapışırlar. Fluorid bu bağlanmayı kalsiyuma olan affinitesi nedeni ile engeller. Fluorid, bunun dışında diş yüzeyinin nemliliğini etkiler ve serbest yüzey enerjisini azaltır. Nemlenen yüzeye plak tabakalarının yapışması da zorlaşmaktadır (61,62).

Fluorid; streptokok, çomak ve Neisseria suşlarında peptidoglikan oluşumunu azaltarak hücre içerisinde bu makromolekül miktarının azalmasına neden olmaktadır. Bu durum basil ve Neisseria gibi aktif otolitik sisteme sahip olan bakterilerde hücre yıkımına neden olmaktadır (63).

Ağız bakterileri, diyet karbonhidratı fazla olduğunda intrasellüler (İPS) ve ekstrasellüler polisakkarid (EPS) sentezi yaparlar. İPS, glikojene benzer yapıda olup, bakteriler tarafından dış kaynaklı enerji kaynağı olmadığı zaman kullanılmaktadır. Fluorid, İPS yapımı üzerine etkiyi glukoz-6-P oluşumunu engelleyerek sağlamaktadır (64).

Ulukapı ve ark. (1994), APF jelinin yerel uygulamasından sonra tükürük ve plak mikroorganizma koloni sayılarında belirgin bir farklılık görülmemesine karşılık plak indekslerindeki düşüşün nedeninin mine yüzey enerjisindeki değişim olduğunu belirtmişlerdir (65).

Fluorid, çeşitli florid tuzları ve bakır, kalay, alüminyum, titanyum gibi katyonlarla beraber kullanıldığı zaman antimikrobiyal etkisinde artış gözlenmektedir. Metal iyonları içeren katyonik florid bileşikleri kısa dönemde plak oluşumunu azaltabilmektedir. Bu etki floridden çok katyona bağlıdır (66).

Optimal dozlarda uzun süreli florid alımı, vücutta sistemik herhangi bir zarara yol açmazken, tek seferde ve yüksek dozda florid alımı ile 'akut florid toksisitesi' ve optimal dozdan biraz daha yüksek fakat uzun süre boyunca florid alınması ile de, 'kronik florid toksisitesi' tabloları ortaya çıkmaktadır (67).

Akut florid toksisitesi nadir rastlanan ve karın ağrısı, kusma, diyare, hipersalivasyon, hipokalsemi, pupiller dilatasyon, kas spazmları ve konvülsiyonlarla karakterize ağır bir tablodur. Solunum felci, ventriküler fibrilasyon ve kardiyak areste yol açarak, genellikle ölüme sebebiyet verebilmektedir. Tedavisi, Ca, Mg veya Al tuzlarının uygulanması ve gastrik lavaj şeklindedir. Kronik florid toksisitesi ise floridin optimum günlük dozun üzerinde, değişik dozlarda uzun süre alınması ile ortaya çıkmaktadır. Floridin esas kronik toksik etkileri; dental fluorozis ve iskeletsel fluorozis şeklinde gözlenmektedir (68).

Varner (1998), sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada, kronik olarak 1 ppm florid içeren su tüketen hayvanlarda nikotinic asit reseptörlerinde ve lipid içeriğinde azalma, antioksidan savunma sisteminde zayıflama, hipokampus ve purkinje hücrelerinde hasar, alüminyum emiliminde artış, beta amiloid plak şekillenmesi (Alzheimer hastalığının temel beyin bulgusu), iyot eksikliği ile tetiklenen lezyonlar, pineal glandda florid birikimi belirlemiştir (69).

Endemik bir fluorozis bölgesinde, abortus sonucu incelenen 5-8 aylık on beş fetus, endemik olmayan bölgeler ile kıyaslandığında, farklılaşmamış nöroblast sayısında artış gözlendiği, ortalama nöron hacmi ve mitokondri yoğunluğunda azalma olduğu

saptanmıştır. Sonuçlar, kronik fluorozisin intrauterin fetal dönemde, fetusun beyin gelişimi üzerine zararlı etkileri olabileceğini göstermektedir (70).

Olgar ve ark. (2008), çocuklarda süregelen fluorozisin kalp üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, Türkiye'de endemik fluorozis bölgelerinden biri olan Isparta'da, dişlerinde fluorozis belirlenen 35 çocukta, ağır fluorozisli grupta daha belirgin olmak üzere, hipokalsemi, hipernatremi, düşük T₄ düzeyi, elektrokardiyografide uzamış QT değerleri belirlenmiştir (71).

2.2.1.2. Esansiyel yağ gargaraları

Fenoller ve esansiyel yağlar, gargaralar ve pastillerde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Yapılan kısa ve uzun süreli çalışmalarda, klorheksidin kadar olmasa da antiplak ajan olarak yüksek etkinlik gösterdikleri saptanmıştır. Bakteriyel enzimleri inhibe ederek, hücre membran lipitlerine bağlanarak ve transmembran transportta değişiklik yaparak fonksiyon gösterirler. Prostaglandin ve lökotrien oluşumunu önleyerek antienflamatuvar etki gösterirler. Kısa dönem çalışmalar plak ve gingiviti %35 oranında, uzun dönem çalışmalar ise plağı %13.8-56.3 arasında, gingiviti ise %14-35.9 arasında azalttığını göstermiştir. Yan etkileri, yanma hissi, acı tat ve dişlerde renkleşmedir (72).

Esansiyel yağlar gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile mayaları etkileyecek şekilde geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptirler. Esansiyel yağlar gram pozitif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki gösterir, gram negatif patojenlerden gelen endotoksinleri ise ortamdaki uzaklaştırır. Esansiyel yağların bakteriyel mekanizması, hücre duvarında yırtılmalara ve enzimatik aktivitede düşümlere sebep olmaktadır (73).

Oyanagi ve ark. (2012), piyasada bulunan ağız gargalarının karyojenik bakteriler ve biyofilm üzerindeki etkilerini ve devamında çürük inhibisyon potansiyellerini karşılaştırmışlardır. Klorheksidin glukonat (%0.0005), benzethonium klorid (%0.01), bir esansiyel yağ (Listerin®) ve povidon-iyodin (PVP-I) (%0.035) gargaları karyojenik bakteri,

biyofilmler ve ex-vivo çürük modelleri üzerinde test edilmiştir. Karyojenik bakteri ve biyofilm içine gömülü bakteriler üzerine oldukça etkili olan Listerin® ve PVP-I ile tedavi sonrası neredeyse hiç bakteriyal kolonizasyon izlenmemiştir. Bu çalışma, yerinde ve doğru kullanıldığında Listerin®'in çürük ve ikincil çürüklerin önlenmesinde kullanışlı olduğunu ispatlamıştır (74).

Park ve ark. (2014), klorheksidin ve esansiyel yağ içeren (Listerin®) ağız gargaralarının kök hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkilerini incelemişler, her iki antimikrobiyal ajanın da 30 sn'den itibaren hücrelerin canlılık oranlarını düşürdüklerini bildirmişlerdir (75).

2.2.1.3. Triklosan

Triklosan (2,2,4'trihidrokloro-2'-hidroksidifenileter), sentetik, iyonize olmayan, geniş spektrumlu, 40 yıldan uzun süredir kullanımda olan, bakterilerin sitoplazmik membranları üzerine etki eden bir antimikrobiyal ajandır. Ancak; suda çözünürlüğünün düşük olması ve ağız boşluğunda retansiyonunun zayıf olması gibi dezavantajları, diş çürüklerinin tedavisi ile önlenmesinde etkinliğini ve uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu sebeple; triklosanın diş ve ağız yumuşak dokularının yüzeyinde tutunabilmesi için kopolimerler kullanılmıştır. Plak ve tükürükte en yüksek triklosan salınımı, kopolimer eklenmiş triklosan içeren diş macunları ile ölçülmüştür. Triklosanın en büyük avantajı, klorheksidin gibi diğer kimyasal ajanların aksine diş yüzeylerinde içsel renkleşme, tat almada bozukluk ya da yanak epitelinde deskuamasyon gibi yan etkiler ortaya çıkartmamasıdır (76).

Triklosan, sağlık ürünleri içinde ilk olarak mikrobiyal dental plak birikimini azaltmak için dental ürünlerin içinde ve cerrahi alan boyamasında kullanılmıştır. Triklosan bugün el sabunları, cerrahi alan temizliği, duş jeli, deodorant, sağlık bakım personeli el temizliği, el losyonu, el kremleri, diş macunları içinde bulunmaktadır. FDA triklosanın insan sağlığı üzerinde bilinen zararlı bir etkisi olmadığı şeklinde görüş bildirmiştir (77,78).

Triklosan bakterinin sitoplazmik membran, RNA, lipid ve protein sentezini engelleyerek etki eder. Vücuttan uzaklaştırılması ise idrar ve gayta ile konjuge edilerek olur. Triklosan kullanımı sonrası yapılan akut toksisite çalışmalarında LD50 değerleri 2000-5000mg/kg olarak saptanmış ve toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Subkronik toksisite serilerinde güvenlik aralığında kalarak göreceli toksik olmayan grupta yer almıştır. Kronik toksisite çalışmalarında ise kanser ile sonuçlanan bir çalışma bildirilmemiştir (77).

Barbolt (2002), tarafından yapılan bir çalışmada sutur materyalini kaplamakta kullanılan triklosanın toksik, iritan, sitotoksik ya da pirojen olmadığı ve vücutta birikim oranlarının da gıda sektöründe kullanılan herhangi bir antimikrobiyal maddeden fazla olmadığı belirtilmektedir (79).

2.2.1.4. Povidon İyodin

Povidon-iyodin (PVP-I) en güçlü ve en geniş kullanım alanına sahip antiseptiktir. Çok hızlı bakterisidal etkiye sahiptir. Tıpta, deri dezenfektanı ve yaraların iyileşmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ağız içi topikal uygulamalarda %10'luk solüsyonu kullanılmaktadır ve *in vitro* olarak periodontal patojenler üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. PVP-I aynı zamanda bakteriyel direnç gelişimine de izin vermez; düşük sistemik toksisiteye ve düşük maliyete sahiptir. PVP-I kronik periodontitisin tedavisinde umut verici sonuçları ile yardımcı olarak kullanılmaktadır.

Hoang ve ark. (2003), her bir yarım çenede en az bir adet ≥ 6 mm derinliğinde periodontal cep olan 60 yetişkin hasta üzerinde yaptıkları çalışmada küretaj ve kök yüzeyi düzleştirme işlemlerine ek olarak %10'luk PVP-I ve kontrol grubunda steril salin solüsyonu kullanmışlar, molar supgingival PVP-I irigasyonunun geleneksel mekanik terapilere oranla patojen sayısında çok daha yüksek oranda azalma sağladığını ispatlamışlardır (80).

Cep irigasyonunda %0.005'lik povidon iyodinin, %0.2'lik klorheksidine göre daha uzun süre antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (81). PVP-I'nin yüksek

antimikrobiyal etki göstermesine karşın, çürük önleyici etkileri üzerinde ortak bir karar olmayışı ve deri iritasyonu ve ciddi alerjik reaksiyonlara yol açabildiği gibi nedenler ile kullanımına sınırlama getirilmiştir (82).

2.2.1.5. Kitosan

Kitosan; yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan polimer olan kitinin (β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin) alkali deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir (83).

İkinci ve ark. (2002), kitosanın klorheksidin (%0.1 ve %0.2'lik) içeren/içermeyen jel ve film formülasyonlarını hazırlayarak biyoadeziv özelliklerini ve periodontal patojen *Porphyromonas gingivalis*'e karşı antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Hem biyoadeziv özelliği hem de antimikrobiyal etkisi nedeniyle kitosan içeren formüllerin periodontal hastalıkların lokal tedavisinde gelecek vaadeden sistemler olduğu, klorheksidin varlığından bağımsız olarak bakteriler üzerine etkili bulunduğu ve klorheksidinin antimikrobiyal etkisini azaltmadığı gösterilmiştir (84).

Şenel ve ark. (2000), kitosanın klorheksidin içeren/içermeyen jel ve film formülasyonlarını hazırlayarak *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesini ve klorheksidinin *in vitro* salınımını incelemişlerdir. En yüksek antifungal aktivitenin % 0.1 klorheksidin glukonat içeren % 2 konsantrasyona sahip kitosan jel ile elde edildiği bildirilmiştir. *In vitro* salınım çalışmaları klorheksidin glukonatin film formülasyonundan daha yavaş ve daha uzun süre salındığını göstermiştir (85).

Ataç ve ark. (2005), klorheksidin içeren ve içermeyen kitosan film formülasyonları geliştirmiş, yalnızca kitosan içeren film ve klorheksidin ile birlikte kitosan içeren filmi antimikrobiyal özellikleri açısından karşılaştırmışlardır. Kitosan film formülasyonlarının antimikrobiyal ajanlar için iyi bir taşıyıcı olmasının yanı sıra tek başına

da cerrahi operasyonlar sonrası ağız yaralarının iyileşmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (86).

Yapılan çalışmalarda farklı hücre kültürleri üzerinde kitosanın doza ve maruz kalma süresine bağlı olarak artan seviyelerde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (87,88).

2.2.1.6. Klorheksidin

Katyonik, bis-biguanide biyosit olup, birçok mikroorganizmaya karşı etkilidir. Düşük toksisitesi ve geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptir (89).



Şekil 2. Klorheksidin yapısı (1-1 Hexamethylenebis [5-(4-chlorophenyl) biguanide])

Klorheksidin, 50 yılı aşkın süredir bilinen ve üzerinde en çok çalışılan antimikrobiktir. %0.2'lik konsantrasyonu en çok incelenmiş, en etkili antiplak ve anti gingivitis ajandır. Ağız gargaralarında genellikle %0.12'lik konsantrasyonu kullanılmaktadır. Sıvı formunda mikroorganizmaları yaklaşık 30 sn ve daha kısa sürede öldürürken, jel formunda bu süre 22 sn (%2'lik jel) ile 2 sa (%0.2'lik jel) arasında değişmektedir (90,91).

2.2.1.6.1. Klorheksidin antimikrobiyal etkisi

Bu katyonik bileşik, gram pozitif bakterilerin negatif yüklü yüzeylerine bağlanarak hücre membranını parçalayarak etki etmektedir. Pelikula bağlanarak uzun süre yavaş yavaş salınması etkisini artırmaktadır. Klorheksidin güçlü bir baziktir ve en stabil hali tuz formunda, 5-8 arasında değişen pH seviyelerindedir. Klorheksidin antimikrobiyal etkinliği pH'ya bağlıdır, vücut yüzeyi ve doku pH'sı klorheksidin optimum pH aralığı olan 5.5 ile 7.0 arasında değişmektedir (89). Bir katyonik bisguanidin olan klorheksidin bakterilerin hücre duvarını yıkar ve sitoplazmada presipitasyona yol açar. Antimikrobiyal spektrumu geniştir.

Gram pozitif bakteriler: Klorheksidin, bu sınıftaki çoğu bakterilere karşı etkilidir. Etki gösterdiği ortalama Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri 1-10 µg/ml arasındadır. Tipik MİK değerleri:

Tablo 3. Gram pozitif bakteriler üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri

Mikroorganizma	MİK(µg/ml)
Bacillus spp.	1.0-3
Clostridium spp.	1.8-70
Corynebacterium spp.	5.0-10
Staphylococcus spp.	0.5-6
Streptococcus spp.	0.1-7

Gram negatif bakteriler: Klorheksidin, gram (+) bakterilere nazaran gram (-) bakterilere karşı daha az aktiftir. Yaklaşık MİK değeri 1-15 µg/ml değerleri arasındadır. Fakat Pseudomonas grubu özellikle de *Pseudomonas aeruginosa* daha dirençlidir. Tipik MİK değerleri aşağıda verilmiştir:

Tablo 4. Gram negatif bakteriler üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri

Mikroorganizma	MİK (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	2.5-7.5
Klebsiella spp.	1.5-12.5
Proteus spp.	3-100
Pseudomonas spp.	3-60
<i>Serratia marcescens</i>	3-75
Salmonella spp.	1.6-15

Mantarlar: Klorheksidin tuzları küfe ve mantara karşı yavaş etkilidirler. Bazı mantarlar için MİK değerleri aşağıda verilmiştir:

Tablo 5. Mantarlar üzerine etkili klorheksidin MİK değerleri

Mikroorganizma	MİK (µg/ml)
<i>Aspergillus</i> spp.	75-500
<i>Candida albicans</i>	7-15
<i>Microsporum</i> spp.	12-18
<i>Penicillium</i> spp.	150-200
<i>Saccharomyces</i> spp.	50-125
<i>Trichophyton</i> spp.	2.5-14

Sporlar: Normal oda sıcaklığında klorheksidin tuzları bakteri sporlarına karşı etkisizdirler. 98-100°C sıcaklıkta mezofilik sporlara karşı hafif aktivitesi vardır (92).

2.2.1.6.2. Piyasada bulunan klorheksidin preparatları

- Ağız gargaraları: %0.2 ve %0.12 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda, alkol içeren ve içermeyen gargara formları olarak bulunmaktadır.
- Jel: %1'lik formu bulunmaktadır. Ancak son zamanlarda %0.2 ve %0.12'lik konsantrasyonları da piyasada mevcuttur.
- Spreyler: %0.1 ve %0.2 olmak üzere iki farklı konsantrasyonu mevcuttur.
- Diş macunları: Fluorid içeren ve içermeyen %1'lik konsantrasyonda klorhekdisinli diş macunları piyasada mevcuttur. Bu diş macunlarının, plak oluşumunun önlenmesi ve 6 ay süresince gingivitisin kontrol altına alınmasında etkili olduğu saptanmıştır.

- Verniler: Çoğunlukla kök çürüklerinin önlenmesinde ve diş çürüğü açısından yüksek risk grubunda bulunan çocuklarda florid uygulamaları ile birlikte uygulanmaktadır.
- Yavaş salınım aygıtları: Küretaj ve kök yüzeyi temizliğine destek olmak amacıyla dişeti cebine yerleştirilmek üzere üretilmiş klorheksidin apareyleridir (93).

2.2.1.6.3. Klorheksidin Güvenilirliği

Klorheksidin en önemli yan etkileri, dişlerde ve restorasyonlarda renklenmeye ve tat alma duyusunda değişikliklere yol açmasıdır (94). Klorheksidin, boyama etkisinin pelikül proteinlerinin denaturasyonu ile metalik sülfidlerin oluşmasına bağlı olduğunu savunan araştırmacılar vardır (95). Bunun yanı sıra çoğu araştırmacıya göre renklenmenin asıl nedeni diyetle alınan kromojenlerle absorbe edilmiş klorheksidin arasındaki reaksiyondur. İn-vitro ortamda pelikül yokluğunda klorheksidin ve diyet kromojenleri ile renklenmenin oluşturulması bu düşüncelerini desteklemektedir. Klorheksidin tek başına kullanımı sonrası renklenme görülmezken, klorheksidin çay ile beraber kullanımı sonrası en fazla renklenme saptanmıştır (96).

Hayvan deneylerinde saptanan, gastrointestinal bölgeden çok az ya da hiç absorbe olmaması özelliğiyle akut oral toksisitesi çok düşüktür. Klorheksidin, insanlarda bir hafta boyunca oral yolla günde 2 gr alınması belirgin semptomlara neden olmasa da, oral yolla alınan ilaçların formülasyonlarına genel olarak katılan bir madde değildir. Klorheksidin oral yolla alınımından sonra birtakım semptomların görülebileceğini bildirmişlerdir (97). Benzer şekilde klorheksidin ve tuzlarının perkütanöz olarak uygulanmasıyla, klorheksidin absorbe edildiği ancak emilen miktarın sistemik etki yaratacak kadar büyük olmadığı bildirilmiştir. Klorheksidin topikal uygulamalarından sonra anaflaktik şoku da içerecek şekilde hipersensitif reaksiyonlar görülebileceği bildirilmiştir. Bu reaksiyonlar geniş kullanım alanı bulan bu ürün için çok küçük miktarda kalmaktadır. Klorheksidin orta kulağa direkt olarak yüklenmesi ototoksisiteye neden olur. Klorheksidin beyin ya da meninkslere direkt uygulanması çok sakıncalı olabilmektedir (98).

Giannelli ve ark. (2007), osteoblastik, endotelial ve fibroblastik hücre dizilerini farklı konsantrasyonlarda ve farklı süreler boyunca klorheksidine maruz bırakmış ve klorheksidinin sitotoksitesinin yüksek seviyede olduğunu ve kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiğini bildirmişlerdir (99).

Flemingson ve ark. (2008), üç farklı gargaranın (Klorheksidin, Listerin, Povidon iyodin) insan dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak incelemiş, her üç gargaranın da fibroblast hücrelerinin çoğalmasında doza bağlı olarak farklı seviyelerde baskılandığını gözlemlemişlerdir (100).

Ghabanchi ve ark. (2012), yaptıkları *in vitro* çalışmada Klorheksidin, Persica (misvak, civanperçemi ve nane içeren *Salvadora persica* özütünden elde edilen), Irsha (alkolsüz ağız gargarası) gargaralarının epitel hücreleri üzerine etkilerini incelemişler, her üç gargaranın da doza bağlı sitotoksite gösterdiğini, içlerinden en etkili olanın Irsha olduğunu ve gargaraların klinik kullanımının kısıtlanması gerektiğini belirtmişlerdir (101).

Lee ve ark. (2010), insan osteoblast hücrelerinden oluşmuş kültür üzerinde yaptıkları çalışmada klorheksidinin hücre büyümesi, hücre çoğalması ve kollajen sentezini doza bağlı olarak baskılandığını bildirmişlerdir (102).

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler 'bir bileşenin bir başka kimyasal ile, bir ilaç uygulama cihazıyla veya ilaç uygulama zamanı ile salım hızını, dokulara salımı veya her ikisini de kontrol eden sistemler' olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel ürünlerin veya yeni moleküllerin güvenlik ve etkinliğini artırmak için, yan ve istenmeyen etkileri azaltıp, biyoyararlanım ve terapötik indeksi artırarak, daha iyi bir hasta uyumu elde etmek, ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar yapılmasının en önemli nedenlerindedir. Günümüze kadar pek çok ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Lipozomlar, niozomlar, sfingozomlar, miseller, mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller, katı-lipit nanopartiküller,

mikrosüngerler üzerlerinde en fazla çalışma yapılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Bu yaklaşımlar, mikro/nanopartiküler (hareketli taşıyıcılar) ve vücudun belirli bölgelerine yerleştiren polimerik sistemler (statik sistemler) olarak sınıflandırılmaktadır (103).

İlaçların *in vivo* davranışları, taşıyıcı sistemlerle birleştirmek suretiyle değiştirebilmektedir. İlaçların taşıyıcı sistemlerdeki enkapsülasyonu ile dokudaki dağılımı, metabolizması, kinetik parametreleri kısmen veya tamamen değişebilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasında taşıyıcıların, ilgili hücre ve organ sistemleri ile ilişkisinin detaylı bir şekilde bilinmesi gerekmektedir. İlaç taşıyıcı sistemler, partikül büyüklüklerine göre değişik doku veya organlara hedeflendirilmektedirler. Bu sayede yan etki ve istenmeyen reaksiyonların azaltılması bu sistemlerin en büyük avantajıdır (103).

2.3.1. Oral Bölgeye Uygulanan İlaç Sistemleri

Oral bölgeye uygulanan ilaçlar adeziv olanlar ve olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.3.1.1. Adeziv olmayan sistemler

Adeziv olmayan sistemlerde ilaç ağız boşluğu içerisinde serbest olarak bulunmakta, sistemden salınan ilaç ağız mukozası ile temas etmektedir (104).

A. Hızlı çözünen dozaj şekilleri: En basit yöntemdir. Ağızda kalış sürelerinin çok az olması ve biyoyararlanım farkının hem birey içi hem de bireylerarası çok yüksek olması etkinliği azaltan bir nedendir (104).

B. Sakızlar: Temel absorpsiyon bölgesi dilaltı mukozasıdır. Formülasyonunda temel madde selüloz ve akrilik türevi polimerlerdir. Piyasada nikotin içeren sakızlar

mevcuttur. Salımı, çiğneme hızı ve şiddeti ile kontrol edilir. Yapılan araştırmalar nikotin içeren sakızların sigarayı bırakmada etkili olduğunu göstermiştir (105).

C. Pastiller: Emilerek kullanılan ve etken maddenin ağız içinde ya da farinkste tutulmasını ngren bir sistemdir (104).

D. Mikroporz boş fiberler: Ağız içine uzun süreli ilaç salımı sağlamak için gözenekli polimer yapı içine ilaçların hapsedilmesi ile hazırlanan sistemlerdir. Periodontal hastalıkların tedavisinde antibiyotik uygulanması için periodontal cep içine yerleştirilmek üzere hazırlanmış sistemler mevcuttur (104).

E. Çözeltiler: Ağızdaki çeşitli rahatsızlıklar için pek çok antibakteriyel madde gargara olarak denenmiştir. Bu amaçla en çok %0.2 konsantrasyonunda klorheksidin diğlukonat kullanılmış ve pek çok araştırma yapılmıştır. Tetrasiklin zeltisi ile yapılan periodontal cep irrigasyonu ile elde edilen etki süresi, sistemik uygulama ile beklenenden daha uzun bulunmuştur. Bu yıkama sıklığı, ilacın hemen antibakteriyel etki göstermesi veya diş ve yumuşak dokulara bağlanarak zamanla aktif forma geçmesi ile açıklanmıştır (106).

2.3.1.2. Adeziv sistemler

İlacın daha uzun süre ağız içerisinde tutularak uzun süreli etki elde etmeye yönelik çalışmaların artmasıyla adeziv sistemler bulunmuş ve araştırmalar yaygınlaşmıştır. İlaç taşıyıcı sistemin sabitlenmesi ve kontrollü salımın sağlanması adeziv sistemin en önemli konularıdır (5).

Adezyon iki farklı yüzeyin ara yüzey kuvvetleriyle bir arada tutulmasıdır. Bu iki yüzeyden biri biyolojik bir yapıya oluşan adezyon, biyoadezyon olarak tanımlanmaktadır. Biyoadeziv madde ise biyolojik yüzeyle uygun süre boyunca adezyon yapabilen maddedir. Adeziv tabletlerde, biyoadezyon sentetik ya da doğal makromolekülün istenen süre

boyunca biyolojik dokuya tutunmasını sağlar. Tutunan doku mukoza ise biyoadeziv sistem mukus tabakasıyla temas eder. Bu sistem mukoadeziv sistem olarak tanımlanmaktadır (5).

Kontrollü salınım yapabilen bir ilaç sistemi oluşturulurken en çok hidrofilik ve termoplastik polimerler ve hidrojeller kullanılmaktadır. Hidrofilik polimerler suda çözünebilen polimerlerdir ve su ile temasla su emerek şişme ve bozulma gösterirler. Metilselüloz, hidroksietil selüloz ve kitosan örnek olarak verilebilir. Hidrojeller de su emme yeteneğine sahiptir. Çapraz bağlı polimer eklendiğinde ise su emme kapasitesi sınırlanmaktadır. Poliakrilik asit, bu asitin kopolimerleri ve sodyum aljinat hidrojellere örnektir. Termoplastik polimerler bozunmayan doğal polistiren ve yarı kristal biyobozunumlu polimerleri içerirler. Polivinil alkol, poliamidler, polikarbonatlar, polimetakrilik asitler sentetik polimerlere örnektir. Biyoyumlu polimerlere örnek olarak selüloz tabanlı polimerler, polivinil asetat gösterilebilir. Biyobozunumlu polimere örnek olarak ise polilaktikler, polikaprolaktonlar, polianhidratlardır. Bütün bu polimerler arasında en çok kullanılan adeziv polimerler karbomerler, sodyum karboksimetilselüloz, sodyum aljinat, maleik anhidrit kopolimerleri, hidroksimetilselüloz, sodyum aljinat, maleik anhidrit kopolimerleri, hidroksipropil metil selüloz, hidroksipropil selüloz, metilselüloz, polietilenoksit, polivinil alkol, nişasta, kitosan ve dietilaminoetil dekstrandır (107,108).

Ağız boşluğunda bukkal sulkusa uygulanacak adeziv ilaç sistemi, yanak hareketlerini kısıtlamamak için yeterince esnek olmalıdır. İstenen süre boyunca mukozaya tutunmayı sağlamalı ancak mukozaya zarar vermemelidir. Biyolojik olarak uyumlu olmalı ve iritasyona neden olmamalıdır. Ağız içine hem lokal hem de sistemik uygulama için geliştirilen biyoadeziv dozaj formundaki ilaç salımı sisteminde tek veya çift yönlü salım olabilmektedir. Biyoadeziv sistemin, mukoza ile dozaj formu arasında sıkı bağlantı sağlanması, absorpsiyon yüzeyinde uzun süreli yüksek ilaç konsantrasyonu sağlanması, dozaj şeklinin mukozanın herhangi bir yerine tutturulabilmesi ve taşıyıcı sistemin ilacı enzimatik degradasyon veya hidroliz gibi çevresel etkenlerden koruyabilmesi gibi avantajları vardır (6).

2.3.1.2.1. Adeziv tabletler

Adeziv tabletler monolitik, kısmen kaplı veya tabakalı matriksler şeklinde olabilir. Sistemik tedavi istendiğinde tabletten tek yönlü ilaç salımı sağlamak ve mukoza ile temas etmeyen yüzeyi korumak için kısmi kaplama yapılmaktadır. Tek yönlü salınım için ilaç adeziv tabaka içine konulmakta ve mukoza ile teması sağlanmaktadır. Ağız boşluğuna bakan inert tabaka sayesinde tükürük ve enzimlerden korunabilmektedir. Ağız içi lezyonların tedavisinde olduğu gibi, ağız boşluğunun içine salınım istendiğinde de ilaç üstteki adeziv olmayan tabaka içine hapsedilebilir. Bukkoadeziv tabletler kullanılarak oral bölgeye antiseptik ve antibiyotiklerin salınımının değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (109,110).

Adeziv tabletler, içme ve konuşmayı engelleyecek derecede güçlük yaratmamakta, ancak mukoza ile temas ettikleri alanın küçük olması, sistemin esnek olmaması, bazı ilaçlar için gerekli hızlı ilaç salımının elde edilmesinin güç olması, kronik uygulamada bukkal veya sublingual mukozada kalış süresi ve uygulama sıklığına bağlı olarak iritasyon riskinin olması sakıncaları arasında sayılabilmektedir (6).

2.3.1.2.2. Adeziv filmler ve yamalar

Özellikle oral tabletler şeklinde verilemeyen veya verilişinde fazla miktarda kayıplar yaşanan etkin maddelerin verilişi amacıyla geliştirilen sistemlerdir. Bu sistemlerin en önemli avantajları arasında uzun süreli etki elde edilmesi ve etki veya yan etkinin istendiği anda sonlandırılabilmesi yer almaktadır Adeziv tabletlerin sakıncalarını ortadan kaldırmak için esnek ve yüzey alanı geniş adeziv film ve yamalar geliştirilmiştir. Yama sistemleri ağız mukozasına yapıştırılarak ilaçların taşınmasını sağlamaktadır (111).

İnce şerit halinde dizayn edilmiş polimerik filmler, 20 mg kadar ilaç yüklenebilmekte ve 30 sn'den daha kısa bir zaman içinde dil üzerinde çözünebilmektedir.

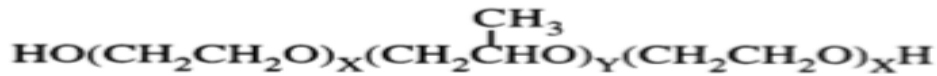
Bu ilaçlar doğrudan kan dolaşımına geçerek hızlı tedavi gerektiren durumlarda etkili olmaktadır (112).

2.3.1.2.3. Adeziv yarı katı preparatlar (merhemler-jeller)

Krem veya merhemlerle medikament uygulandığında mukoza yüzeyine yeterince bağlanamaz ve ilacın etki göstermeden tükürükle yikanma sonucu yutularak uzaklaşma olasılığı yüksektir. Polimerlerle hazırlanan adeziv merhem ve jeller sayesinde ilacın ağız boşluğunda kalış süresi uzatılarak etkinliği artırılmıştır. Mukoza ülserlerinin tedavisinde steroidler sıklıkla uygulanmaktadır (108).

2.3.1.2.3.1. Poloksamer (Pluronic® F-127)

Poloksamerler (piyasada bulunan ismiyle Pluronic®), 30 çeşitten fazla farklı non iyonik yüzey aktif ajanlardan oluşmaktadır. Bu polimerler, PEO (polyoxyethylene-A) ve PPO (polyoxypropylene -B) ünitelerinden oluşan ABA tipi üçlü blok kopolimerlerdir. Bu polimerler içinde en sık kullanılanı, moleküler ağırlığı 12500 olan, ağırlık olarak 2:1 oranında PEO/PPO içeren Poloksamer 407- piyasada bulunan ismiyle Pluronic F127®'dir.



Şekil 3. PEO-PPO-PEO (poloksamer) yapısı

Poloksamerlerin konsantre sulu çözeltileri termoreversible (ısı ile dönüşebilen) jelleri oluşturur. Poloksamerlerin jelleşme mekanizmaları detaylı şekilde araştırılmasına rağmen halen tartışmalıdır. Poloksamer 407 (Pluronic F127®) %20'lik konsantrasyonda 25°C'de jel halinde bulunmaktadır. %15-50 konsantrasyonlarında ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. Solüsyon, oda sıcaklığında (25°C) akışkan yoğun bir sıvı iken, vücut sıcaklığında (37°C) yarı katı (jel), transparan bir jel halini almaktadır. Ön

toksikoloji çalışmaları, bu kopolimerin iyi tolere edilebilir olduğunu göstermektedir (113). Bu sonuçlar ele alındığında poloksamer 407 medikal, farmasotik ve kozmetik alanlarda kullanım için oldukça uygun bir materyal olarak görülmektedir. Poloksamer, uzun yıllardır yanık tedavilerinde, topikal antikanser ajanlarda ve parenteral ilaç uygulamalarında kontrollü salınım için kullanılmaktadır (114,115). Diş macunu ve ağız gargaralarının büyük çoğunluğu taşıyıcı olarak farklı konsantrasyonlarda poloksamer içermektedir (116).

Parenteral enjeksiyon sonrası poloksamer jeller, ilaç salınım süresini solüsyon formundaki taşıyıcılardan daha fazla uzatabilmektedir. Ancak salınım süresi nadiren birkaç günü geçmektedir. Bu özellik, poloksamer jelleri ağrı kontrolü, enfeksiyon tedavisi ve doğum kontrolü gibi alanlarda öne çıkarmaktadır (117).

Poloksamer 407 genellikle non-toksik kabul edilmektedir. Tavşanlara intramuskuler enjeksiyon sonrası Poloksamer 238 ve 407, salin solüsyonu gibi geleneksel taşıyıcılarla benzer şekilde kas iritasyonu/toksisite göstermiştir (118). Ancak, bazı çalışmalar sistemik yan etkiler rapor etmiştir.

Blonder ve ark. (1999), klinikte etkili olabilecek en düşük dozlarda bile poloksamer 407'nin tavşanlarda hiperlipidemiye neden olabileceğini bildirmiştir. Yüksek dozda (137.5 mg/kg) uygulanan poloksamer 407, cinsiyet farkı gözetmeksizin hem dişi hem de erkek tavşanlarda serum trigliserit ve kolesterol seviyelerini anlamlı derecede artırmış, en yüksek değerler enjeksiyondan iki gün sonra gözlenmiştir. Düşük doz uygulamalar (5.5-27.5 mg/kg) ise serum lipid değerlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (119). Bunun yanında, poloksamer 407 öncelikli olarak böbrek yerine karaciğerden emilime uğramaktadır ve uzun süre ortamda kalmaktadır. Bu durum, lipid metabolizmasındaki değişiklikleri açıklamaktadır ve poloksamer biyoyumlu kabul edilmektedir (120).

2.3.1.2.4. Tozlar

Yaygın ağız ülserlerinin tedavisinde hidrokispropil selüloz ile beklametazon dipropiyonat içeren mukoadeziv toz formülasyonu hazırlanmıştır. Elde edilen toz özel bir spreyle enfekte bölgeye püskürtülmüştür. Mukoadeziv özelliği nedeniyle çözeltiye oranla tozun mukoza üzerinde kalış süresinin uzadığı, beklametazonun oral mukozaya penetrasyonunun arttığı ve tozun enfekte bölgenin üzerini kaplayarak fiziksel koruma sağladığı saptanmıştır (121).

Diğer uygulamalar: Ağız boşluğuna lokal uygulamalarla yüksek ve sabit düzeyde florid konsantrasyonu sağlayacak kontrollü salım sağlayan sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerden bir tanesi, dişlere tutturulan ve doğrudan tükürük içine istenen düzeyde salınım yapan camdan oluşan bir depo aygıttır. Aygıt 30 gün boyunca 0.5 mg/gün salım yapacak şekilde tasarlanmıştır. Sistemin uygulanması ile tükürük florid düzeyinin yükseldiği ve 5 haftalık tedavi süresi boyunca aynı dozda floridin topikal uygulanmasına göre daha başarılı olduğu görülmüştür (122).

Bu yöntemlerin yanısıra, diş iplerine florid emdirilmesi ile ağız hijyeninin daha etkili şekilde gerçekleştirilebileceği düşünülmüştür (123). Bir başka yöntemde ise; ortodontik plak %10 NaF içeren etanol ve etilselüloz karışımı içinde bekletilerek kaplanmıştır. Bu sistemle 4 gün boyunca tükürük florid konsantrasyonunda artış sağlanmış ve beşinci günden itibaren azalma görülmüştür (124).

Adeziv olmayan sistemlerde ilacın tükürük içine salınarak yutma sonucu oral ağız boşluğundan hızla uzaklaşması, ilaç konsantrasyonunun sürekli olarak salınan tükürükle seyrelerek azalması, ilacın fizyolojik çevreden korunamaması gibi dezavantajları vardır. Sakız şeklindeki formülasyonlarda ilaç salımının hastanın çiğneme ve emme hareketinden önemli derecede etkilenmesi, sistem ağız boşluğunda bulunduğu sürece içme, yeme ve konuşmada güçlük yaratması gibi zorlukları vardır. Bu nedenle uzun süreli kontrollü salım istendiği durumlarda adeziv sistemler daha üstün görünmektedir (104).

2.4. Biyoyumluluk

Diş hekimliğinde kullanılacak her malzeme bir biyolojik değerlendirme programına tabi tutulmaktadır. Bir materyalin ağız ortamında uzun süreli kullanılması için biyolojik olarak uyumlu olması gerekmektedir. Biyoyumlu, yani 'vücutla uyuşabilir' bir biyomateryal, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb.) meydana getirmeyen malzeme olarak tanımlanmaktadır (23,125).

Biyolojik cevabı ölçerken gözönünde bulundurulması gereken bir çok faktör vardır. İlk olarak, materyalin lokasyonu, biyolojik cevabın tümü üzerinde etkilidir. Materyalin yumuşak veya mineralize dokuya yerleştirilmesi, oral epitele doğrudan veya dental implantlar gibi kısıtlı temasta olması, kemik, doku sıvıları, kan ve tükürük ile doğrudan ya da dentin ve mine bariyeri gibi herhangi bir bariyer yoluyla temasta olması gibi bir çok faktör, materyale karşı gelişen biyolojik cevapta etkin rol oynamaktadır. Materyalin vücutta kalma süresi de biyolojik cevabı yakından etkilemektedir. Ölçü maddeleri gibi ağızda kısa süre kalan materyallerin biyolojik etkileri, ağızda çok daha uzun kalan materyallere göre farklılık göstermektedir. Ölçü maddeleri, ağızda kaldıkları kısa süre içinde alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Oysa bu kısa süre, toksik ve mutajenik etkilerin görülmesi için yeterli değildir. Kullanım süresi aynı zamanda vücutla materyal arasındaki karşılıklı etkileşimlerin ortaya çıkmasını da doğrudan etkilemektedir. Uzun kullanım süreleri, karmaşık yollarla materyalin vücudu etkilemesi için gerekli zamanı sağlamaktadır (126).

Oral ve maksillofasiyal bölge karmaşık ve değişken bir yapıya sahiptir. Protetik materyaller, doku içine yerleştirilen materyallerden farklı olarak tükürük, yiyecek, bakteriler ile çevresel elemanlar arasında gelişen reaksiyon ürünleriyle de etkileşim halindedir. Bu etkileşimlerin tümü, materyal ve/veya protez üzerinde ciddi etkilere sahiptir. Ağızdan farklı vücut bölgelerine yerleştirilen biyomateryaller, uygun sıcaklık ve sabit kimyasal yapıda kaldığı halde ağız ortamı, aşırı sıcaklık ve pH değişimleri ile ve farklı

kimyasal yapıdaki besinlere maruz kalmaktadır. Diş çürüğüne neden olan bakterilerin çevresindeki ortamda, pH değeri 2.2'ye kadar düşebilmektedir. Gastrik salgıların pH değeri, 1.0-3.5, mide asitlerinininki ise 0.8'dir. Ağız ortamında kullanılacak materyallerin, reflü ve kusma gibi rahatsızlıklar sonucu gastrik içeriğe maruz kalması, rutin fizyolojik koşullarda olmayan özel biyouyumluluk yaklaşımını gerekli kılmaktadır (127).

Diş çürüğünün uzaklaştırılmasıyla ortaya çıkan kavite, dental materyallerin kimyasal bileşenlerinin veya aşınma ürünlerinin, pulpa odasına migrasyonu için bir yol haline gelmektedir. Bu durum materyalin kan, kapiller damarlar ve nöronlar üzerindeki ve diğer ağız dokuları ile ilgili muhtemel toksik etkilerinin oluşmasıyla ilişkilidir. Eğer belli materyallerin pulpa odası ile temas etmesinde sakınca varsa bu durumda materyal uygulanmadan önce liner gibi restorasyon materyalini izole edecek önlemler alınmalıdır (127).

Yaygın klinik kullanıma geçilmeden önce materyallerin ve/veya içeriğinin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyouyumluluk testleri genel olarak üç sınıfta incelenmektedir:

1. Başlangıç testleri (sitotoksosite, hemoliz, sistemik toksisite, karsinogenesiz ve teratojeniteyi araştıran bir dizi test)

2. İkincil testler (Test edilecek materyal, fare, sıçan, koyun, kedi, köpek ve domuz gibi bazı deney hayvanlarına implante edilmektedir)

3. Kullanım testleri (Hayvan veya insanlar üzerinde yapılabilmektedir) (46-48).

Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine ilk olarak hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* test yöntemleri ile başlanılmaktadır. Değerlendirmelere daha pahalı ve uzun zaman gerektiren hayvan testleri ile devam edilir. Bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde kullanım testleri (*in vivo* değerlendirme) gibi daha kapsamlı çalışmalar

yapılmaktadır (128). Uygulanan testlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 6' da gösterilmektedir.

Tablo 6. Biyouyumluluk test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (129).

Test	Avantaj	Dezavantaj
<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hızlı uygulama • Ucuz • Standardize edilebilir • Deney ortamının kontrolü kolaydır • Geniş bir skalada değerlendirme yapılır 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> ortamla ilişkisi tartışmalıdır
Hayvan testleri	<ul style="list-style-type: none"> • Karmaşık sistemik etkileşimler tespit edilebilir • <i>In vitro</i> testlere göre daha geniş kapsamlı ve daha gerçekçidir 	<ul style="list-style-type: none"> • Kullanılan materyalle ilişkisi tartışmalıdır • Pahalı • Etik açıdan tartışmalıdır • Kontrolü zor • Sonuçların değerlendirilmesi zordur
Kullanım testleri	<ul style="list-style-type: none"> • Kullanılan materyalin dokularla ilişkisi belirlenir 	<ul style="list-style-type: none"> • Çok pahalıdır • Daha fazla zaman gerektirir • Etik açıdan daha fazla tartışmalıdır • Kontrolü zor olabilir • Sonuçların değerlendirilmesi zordur

Biyolojik uyumluluğun değerlendirilmesi için uygulanan *in vitro* testler bir test tüpü içinde, hücre kültürünün bulunduğu bir kap içinde ve canlı organizmanın dışında yapılmaktadır. Memeli hücreleri, organeller, dokular, bakteri veya bazı enzim türleri, biyolojik sistem olarak kullanılabilir. Bu testler değerlendirilecek materyalin bileşenlerinin bir hücre, enzim ya da diğer izole edilmiş biyolojik sistemlerle temas ettirilmesini gerektirir. Bu test yönteminde, arada herhangi bir bariyer olmaksızın materyal hücre ile temas ettirilerek direkt olarak uygulanabildiği gibi, materyal ile hücre arasında küçük bir bariyer yerleştirilerek indirekt bir şekilde de uygulanabilmektedir. Bu tür *in vitro* testlerde materyallere temas ettirilen hücrelerin sayıca canlılık oranı, büyüme oranı, metabolik fonksiyonları ya da diğer hücresel fonksiyonları ölçülerek materyalin etkisi saptanmaktadır (130).

Dış hekimliğinde kullanılan materyallerin *in vitro* olarak sitotoksitesini belirlemede en yaygın kullanılan sistemler hücre kültürleridir. Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Canlı dokular, tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılmaktadır. Bu amaçla önce çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) parçalanarak tek tek hücrelere ayrılmaktadır. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler, dana serum içeren besleyici sıvılarda süspansiyon ederek steril tüp veya şişelere konulmaktadır. Bu hücre süspansiyonu 36 °C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak üremekte ve üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denilmektedir (131,132).

Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılmaktadır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan alınan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilmektedir. Dış eti ve pulpa fibroblastları, primer kültür hücrelerine örnektir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürler ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültürler sekonder hücre kültürleri denilmekte ve bir seri kültür işleminden sonra

hücre hatları elde edilmektedir. Primer hücrelerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel olarak farklı etkiler gözlenebilmektedir. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptirler. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı *in vivo* özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilmektedir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitel hücreleridir (HeLa). Ayrıca çalışmalarda insan ve hayvan pulpa hücreleri, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatları da kullanılmaktadır (128,129,131,133). Yaygın olarak kullanılmakta olan hücre serileri ve köken aldıkları dokular Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hücre serileri ve kökenleri (134)

Hücre Serisi	Hücre tipi ve kökeni
L 929	fibroblast (fare)
3T3	fibroblast (fare)
BHK21	fibroblast (hamster)
MDCK	epitel hücresi (köpek)
HeLa	epitel hücresi (insan)
PtK1	epitel hücresi (sıçan)
L6	myoblast (sıçan)
SP2	plazma hücresi (fare)
COS	böbrek (maymun)
DT40	lenfoma hücresi (civciv)
R1	embriyonik kök hücre (fare)
HepG2	karaciğer epitel hücresi (insan)
HEK293	böbrek epitel hücresi (insan)
HL60	lösemi hücresi (insan)
SH-SY5Y	nöroblastoma hücresi (insan)
H1, H9	embriyonik kök hücreler (insan)
CHO	over (hamster)
E14,1	embriyonik kök hücreler (fare)
T24	mesane epitel hücresi (insan)

2.4.1. Sitotoksisite

Biyouyumluluğu belirleyici etken, uygulanan materyalin hücre yaşamına olan etkisidir. Sitotoksisite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır (135).

Sitotoksisite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in-vitro olarak değerlendirilmektedir. Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önemlidir. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile gerçekleşebilmektedir (136).

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için ISO, bazı kriterler belirlemiştir. ISO 7405, diş hekimliğinde kullanılan medikal materyallerin klinik öncesi biyouyumluluk değerlendirmesi için önerilen test protokollerinden bir tanesidir (23).

2.4.1.1. Sitotoksisite değerlendirmelerinde kullanılan test yöntemleri

İn vitro sitotoksisite değerlendirmelerinde ISO standartlarında geçen test yöntemleri şunlardır:

- 1) Direkt temas ve ekstrakt testleri
- 2) Agar difüzyon testi
- 3) Filtre difüzyon testi
- 4) Dentin bariyer testi
- 5) Diş kesiti modeli (23).

2.4.1.1.1. Direkt temas testi ve ekstrakt testi

Direkt temas testi, dental materyal veya bileşenlerinin doğrudan kültür içerisindeki hücrelerin üzerine (> 24 saat) uygulanmasıdır. Materyal hücreler ile veya kültür medyumunu ile fiziksel bir temas halindedir. Suda çözünebilir materyaller medyum içerisinde çözünebilir ve böylece daha iyi bir materyal-hücre teması sağlanır. Suda çözünmeyen materyallerde ise birkaç yolla hücreler ile direkt temas sağlanabilir. Bu temas:

1. Test örneğinin hücrelere mümkün olduğunca yakın yerleştirilmesi ile,
2. Test örneğinin kullanılan hücrelerin tam üzerine uygulanması ile,
3. Test örneğinin hücre kültür kabının tabanına yerleştirilmesi ve hücre süspansiyonunun örnek üzerine uygulanması ile,
4. Hücrelerin direkt olarak örnekler üzerine yerleştirilerek kültür edilmesi yöntemleri ile kullanılmaktadır (137).

Ekstrakt yolu ile temas testinde bir sıvı çözücü içerisinde materyalden çözünen bileşenlerin hücreler ile temas ettirilerek sitotoksitesi incelenmektedir. Ekstraksiyon sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı çözücüler serum içeren medyum, serum içermeyen medyum, fizyolojik tuz solusyonu veya diğer uygun çözücülerden biri olabilmektedir. Ekstraksiyon ortamı, materyalin toksikolojik riskinin doğru belirlenebilmesi için materyalin klinik kullanım ortamını taklit etmesi ve bu ortamın materyalin kimyasal yapısında önemli değişiklikler yapmaması gerekmektedir. Ekstrakt içinde maddelerin konsantrasyonu ve hücrelere temas edecek materyalden salınacak bileşenlerin oranı ekstraktı alınan materyalin; yüzey alanına, ekstraksiyon sıvısının hacmine, materyalin pH'sına, kimyasal çözülebilirliğine, difüzyon oranına, osmolaritesine, ısıya, zamana ve diğer faktörlere bağlıdır (138).

2.4.1.1.2. Agar Difüzyon Testi

Agar difüzyon testi, toksisite deneylerinde en uzun süredir kullanılan bariyer test yöntemidir. Bu yöntem ile fare fibroblast (L929) hücrelerinin üzerini örten agar besiyerinden difüze olan test materyalleri bileşenlerinin toksisitesi incelenmektedir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucu nötral kırmızı boyanın, hücre membranındaki geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikme miktarına göre hücre aktivitesini değerlendiren bir test yöntemidir. Hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı gelişen yanıtlar incelenir. Basit ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen agarda çözünemeyen veya difüze olamayan test materyali veya bileşenleri hücreler üzerinde herhangi bir etki gösterememektedir (135,138).

2.4.1.1.3. Filtre Difüzyon Testi

Filtre difüzyon test yönteminde filtre olarak selüloz asetat kullanılmaktadır. Filtrenin bir tarafına primer hücreler yerleştirilirken diğer tarafına test materyali yerleştirilir. Hücrelerde meydana gelen hasarlar dekolorizasyon alanının ölçülmesi ile veya boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile tespit edilir. Test materyallerin, hücre üzerinde sitotoksik etki göstermesi için test materyalinden salınan bileşenlerin 0.45 µm filtreden difüze olmaları gerekmektedir (138,139).

2.4.1.1.4. Dentin Bariyer Testi

Sitotoksikite testlerinde bariyer olarak farklı materyaller kullanılmıştır. Dentin bariyer test yöntemi, restoratif materyallerin pulpa üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (138).

Outhwaite ve ark. (1974), geliştirdikleri bölümlü oda (split chamber) aleti ile dentinin geçirgenlik özelliğini incelemişler ve materyallerin biyolojik uyumluluklarının değerlendirilmesinde dentinin geçirgenlik özelliğinden yararlanılması fikrini ortaya

atmışlardır. Kullanılan dentin diski insan veya sığır dişlerinden kesilerek hazırlanmış farklı kalınlıklardaki dentin disklerinden oluşabilmektedir. Bu dentin diskinin pulpaya bakan tarafı asitle dağlanmıştır. Dentin diski bölümlü odaya biyolojik olarak uyumlu paslanmaz çelik bir tutucu ile yerleştirilmektedir. Böylece bu oda dentin diski ile iki bölüme ayrılır. Hücreler dentin diskinin asitle dağlanmış tarafında üretilir ve hücrelerin üretildiği bu kısım pulpa tarafı (alt oda) olarak tanımlanır. Uygulanacak test materyali silikon bir tüp içinde dentin diskinin üst kısmına uygulanır. Materyalin uygulandığı bu kısım kavite bölümü olarak tanımlanır. Cihazın pulpa bölümü bir taraftan medyum şişesine bağlı diğer tarafı ise peristaltik pompa ve atık medyumun toplandığı şişeye bağlıdır. Çalışmacılar bu yöntem ile dentinin geçirgenlik özelliğini kullanarak diş modelinin taklit edilebileceğini bildirmiştir (140).

Ülker ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada kendinden bağlanabilen yeni bir akışkan kompozitin (Vertise Flow) sitotoksitesini, sığır dişi pulpasından elde edilmiş hücrelerin üç-boyutlu kültürlerinin kullanıldığı bir dentin bariyer test düzeneği ile değerlendirmiş, materyalin negatif kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiğini, toksik bulunmadığını bildirmişlerdir (141).

2.4.1.1.5. Diş kesiti modeli

Diş kesiti modeli, direkt hücre kültürü test yöntemlerine göre klinik duruma daha benzer fizyolojik bir ortam sağlamaktadır. Bu test yöntemi için kullanılacak dentin kesitleri çürüksüz, yeni çekilmiş insan azı dişleri veya sığır kesici dişlerinden elde edilebilmektedir (20,138).

Saw ve ark. (2005), diş kesiti modeli ile direkt hücre kültürü test yöntemlerinin dental materyallerin sitotoksik özelliklerinin belirlenmesinde kullanımını karşılaştırmış, diş kesiti modelinin en güvenilir toksikolojik sonuçları verdiğini bildirmişlerdir (20).

2.4.1.2. Sitotoksisite testlerinin değerlendirme yöntemleri

Sitotoksisite testlerinin değerlendirme yöntemleri ise dört başlık altında incelenebilmektedir. Bunlar:

1. Canlılık (viability) değerlendirme testleri: kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
2. Yaşam (survival) değerlendirme testleri: uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
3. Hücre proliferasyonu değerlendirme testleri
4. Metabolik sitotoksisite değerlendirme testlerdir (131).

2.4.1.2.1. Canlılık değerlendirme testleri

Canlılık testleri, toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesidir. Bu testler, membran bütünlüğü bozulduğunda hücrelerin içine penetre olan tripan mavisi, eritrosin, naftalin siyahı gibi boyalar ile veya membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil floresan ve nötral kırmızı gibi boyaların kullanılması ile yapılmaktadır (131).

Nötral kırmızı testi: Nötral kırmızı canlı hücrelerin içerisinde birikir ve bu sayede yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu hemositometre adı verilen bölümlenmiş cam üzerine yerleştirilir. Daha sonra optik mikroskop altında hemositometredeki canlı hücrelerin yüzde oranı tespit edilir (131).

dos Santos ve ark. (2013), farklı polimerizasyon (ışıkla polimerizasyon/kimyasal polimerizasyon) ve cila (mekanik cila, kimyasal cila, hiç cila yapılmadan) işlemlerinin akrilik rezin materyalleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek için fare fibroblast (L-

929) hücre kültürü ve nötral kırmızı canlılık değerlendirme yöntemini kullanmışlar, kimyasal cilalama ve ışıkla polimerizasyon yöntemlerinin diğer alternatiflere oranla daha toksik etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir (142).

Tripan mavisi testi: Tripan mavisi membran bütünlüğü bozulmuş, canlı olmayan hücrelerde biriken bir boyadır. Hemositometre yardımı ile tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilebilmektedir (129).

Floresan metodu: Diasetil floresan canlı hücre içerisine girebilen bir boyadır. Propidium iodide boyası ise membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine girerek ve DNA ile RNA' yı da etkilemektedir. Floresan boyalar ile boyanmış hücreler flow sitometri veya ışık kaynağı ve filtrelere sahip floresan mikroskobu ile değerlendirilirler. Bu değerlendirme yönteminde floresan görüntü veren hücreler ölü hücre anlamına gelmektedir (131).

Frese ve ark. (2013), beş farklı fiberle güçlendirilmiş kompozit içindeki rezinle doyurulmuş ve doyurulmamış materyallerin sitotoksitesini karşılaştırmışlardır. İnsan primer gingival fibroblast (HGF) hücrelerinin canlılığı ve büyümesi MTT ve LIVE/DEAD floresan boyası kullanılarak değerlendirilmiş, rezinle doyurulmasından bağımsız olarak tüm fiberle güçlendirilmiş kompozit materyallerinin minör sitotoksik potansiyel gösterdiği bildirilmiştir (143).

2.4.1.2.2. Yaşam Değerlendirme Testleri

Hücre yaşamı (survival) seyreltilmiş tek tip hücre süspansiyonundan hücrelerin ayrı ayrı koloni oluşturabilme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi hücre yaşamının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (131).

2.4.1.2.3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri

Kültür içerisindeki hücrelerin bir kaç gün sonraki sayımı materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak test süresi içinde belirli bir anda yapılan hücre sayımı belirgin bir sonuç vermediğinden testin erken aşamalarında bir büyüme eğrisinin elde edilmesi gereklidir. Hücre sayımında büyüme eğrisi analizleri az sayıda örnek varsa kullanılabilir ancak sayı artarsa bu analizler çok kullanışlı değildir. Birçok örneğın incelendiğı durumlarda belirli bir anda hücre sayımı (3 günden 5 güne kadar etkiye maruz kalan hücrelerin sayısı) yapılarak bu analiz uygulanır. Büyüme eğrisinde kontrol hücrelerinin log fazı (üreme fazı) tercihen de mid-log fazı içinde yer aldığı an seçilmelidir. Herhangi anlamlı bir etki sonucu elde edilen gelişme eğrisinin ikinci bir gelişme eğrisi ile desteklenmesi gerekir ya da diğer değerlendirme yöntemleri kullanılmalıdır (131). Bu testte kullanılan yöntemler şunlardır:

³H-timidin testi: Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bir radyoizotop olan ³H-timidin proliferasyon sırasında maddenin radyoaktivite ölçümü ile yeni DNA sentezi tespit edilerek proliferasyon üzerindeki etkisi ölçülmektedir (131).

Bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik: İmmunohistokimya yöntemi ile işaretlenmiş antikolar kullanılarak hücre ve doku antijenlerinin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine); DNA sentezini tayin etmek için kullanılan timidin testine eşdeğer bir yöntemdir. BrdU timidin benzeri bir maddedir ve DNA içine girer. BrdU uygulanan proliferasyon evresindeki canlı hücreler Anti- BrdU monoklonal antikor ile boyanarak sayımları yapılabilir veya değerlendirmede ELİSA (enzyme-linked immunosorbent assay) kiti de kullanılabilir (137).

2.4.1.2.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri

Örnek sayısı fazla olduğu durumlarda yaşam belirleme testlerinin hazırlık aşamaları ile analizleri zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca bazı düşük yoğunlukta hücre hatlarının özellikle yeni izole edilmiş hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri zayıftır. Bu nedenle yüksek yoğunluğa sahip hücrelerin değerlendirilmesi için bazı alternatif test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testler ile doğrudan hücre yaşam (survival) değerlendirilmesi yapılamamaktadır. Ancak yapılan bu testlerde hücre sayısındaki net artış, total protein miktarı veya DNA artışı belirlenebilmektedir (131).

Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksisiteden çok uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler. Metabolizma testlerinde hücrelerin canlılıkları mikropilaka okuyuculu spektrofotometre yardımı ile tespit edilmektedir. Ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu gruba giren testler:

MTT testi: Kolorimetrik MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testi, dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu test MTT'yi çözünmeyen mavi formazan bileşiğine dönüşürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir (137).

MTT yöntemi ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyası ile inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak

ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Optik yoğunluk ölçülerek formazan oluşumu saptanabilmektedir. Alternatif olarak test örneği çevresindeki formazan ışık veya elektron mikroskobu ile belirlenebilmektedir (131,144).

Attik ve ark. (2014), insan osteosarkom hücrelerinden elde edilmiş MG63-osteoblast benzeri hücreler üzerinde MTT boyası ile hücre canlılığı ve Bradford boyası ile de protein değerlendirme yöntemi kullanarak, bir trikalsiyum silikat simanı olan Biodentine™ ile mineral trioksit agregatın (MTA-White ProRoot) biyouyumluluğunu değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, Biodentin™'in kemik hücreleri üzerine MTA ile benzer etki gösterdiğini ve her iki materyalin de biyouyumlu olduğunu bildirmişlerdir (145).

Hashemipour ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada, Irsha, Oral B, Biotene, PVP-I, Benzidamin ve papatya içerikli ağız gargaralarının antimikrobiyal etkinlik ve sitotoksitelerini incelemişlerdir. Irsha, PVP-I ve Benzidamin antifungal etki göstermemiş, antimikrobiyal özellikler açısından en başarılı gargaranın kontrol grubu olan klorheksidin olduğu, tüm hücre kültürü dizileri değerlendirildiğinde, klorheksidin en düşük sitotoksik etki gösteren gargara olarak saptandığı bildirilmiştir (146).

Alamar mavisi testi: Alamar mavisi boyası ile metabolik aktivitenin belirlendiği dolayısıyla hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği florometrik (floresan ölçümü ile)/kolorimetrik bir test yöntemidir. MTT testine göre daha pahalı bir yöntemdir ancak renk değişiklikleri bu yöntemde hem florometrik hem de spektrofotometrik olarak tespit edilmektedir. Ayrıca bu boya toksik olmadığından hücre canlılığı değerlendirmelerinde birden fazla boyama imkanı sağlamaktadır (137).

LDH testi: Kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemi olan laktat dehidrogenaz (LDH) test yönteminde ise, hücrede membran hasarı veya sitolizis durumunda açığa çıkan sitolizik bir enzim olan laktat dehidrogenazın ölçümü yapılarak sitotoksite belirlenmektedir (147).

2.4.2. Glutasyon Tespiti

Glutasyon (γ -glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. Glutasyonun, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutasyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korumaktadır. Glutasyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. Reaktif Oksijen Ürünleri'nin (ROS) oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. Bazı floresan ajanlar intraselüler GSH ile reaksiyona girerek glutasyonun hücresel miktarının tespitine olanak sağlamaktadır. Hücrede glutasyon düzeyinin belirlenmesine olanak sağlayan floresan özellikli maddeler hücre içerisindeki GSH ile reaksiyona girerler. Monobromobimane insan hücrelerinde GSH'ın ölçümü için kullanılan maddelere bir örnektir (148–150).

2.4.3. Mutajenite Testleri

Biyomateryallerin hücre genetik materyalinde değişiklikler oluşturması genotoksisite olarak tanımlanmaktadır. Hücreler sahip oldukları bazı mekanizmalarla meydana gelen genotoksik hasarı onarabilirler. Hücrelerde genetik hasarın bir sonraki nesle aktarılması programlanmış hücre ölümleri ile engellenebilmektedir. Ancak genetik hasar bir sonraki nesle aktarılırsa bu etkiye mutajenite denir. Bir materyalin bakteri veya memeli hücre DNA'sına olan etkisi bazı test yöntemleri ile incelenmektedir. AMES testi en sık kullanılan test yöntemidir. Genetik yapısı değiştirilmiş bakteriler AMES test yönteminde kullanılmaktadır. Bu bakterilerin özel agar kültüründe çoğalmadıkları ve koloni oluşturmadıkları, ancak mutajenik bir etken ile karşılaşırlarsa çoğaldıkları bildirilmektedir. Bu nedenle, oluşan koloni sayısının mutajenite için bir gösterge olduğu bildirilmektedir (128).

2.4.4. Hayvan Testleri

Genellikle memeli hayvanların kullanıldığı bu tür biyouyumluluk testlerinde test materyali fare, sıçan, köpek, kedi, koyun, keçi veya maymun gibi hayvanlara implante edilmektedir. Hayvan deneylerinde değişkenleri kontrol etmek zordur, etik açıdan tartışmalı olan bu testlerin uzun sürmeleri ve pahalı olmaları da diğer dezavantajlarıdır (130).

Hayvan testlerinde biyolojik uyumluluğu test edilecek materyalin piyasaya sürülmeden önceki deneysel formu kullanılmaktadır. Bu nedenle hayvan testleri kullanım testlerinden (bazı testlerde hayvanlar da kullanılmaktadır) farklıdır (129,130). Dental materyallerin spesifik olmayan lokal toksik etkilerinin incelenebilmesi için bu materyaller laboratuvar hayvanlarının dokularının içerisine yerleştirilebilmektedir (151).

İmplantasyon testlerinde test materyalleri deney hayvanlarının deri altı, kas içi veya kemik içine yerleştirilmektedir. Materyallerin dokulara farklı periyotlarda implantasyonundan (1 hafta ile bir kaç ay arası) sonra dokular makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmektedir. Muköz membran iritasyon testinde test edilecek materyalin mukozada veya aşındırılmış deri üzerinde meydana getirdiği enfeksiyon değerlendirilir. Deney hayvanı olarak sık kullanılan türler fare, sıçan, tavşan, köpek, kedi, domuz ve koyundur (152).

Fare: En yaygın olarak kullanılan ev faresi ya da laboratuvar faresi olarak da adlandırılan *Mus musculus*'tur. Üçüncü azı dişleri hem alt hem de üst çenede küçük şekillidir. Kesici dişler sürekli büyür, çiğnemeyle aşınırlar. Kesici dişlerin dudağa bakan yüzleri kalın bir diş minesi ile kaplanmıştır (153).

Sıçan: Farelerden sonra araştırmalarda en çok kullanılan omurgalı hayvanlardır. Diş hekimliği çalışmalarında iyi bir deney modeli oluşturduğundan önemli bir yer tutmaktadırlar. Diş hekimliği araştırmalarında kullanılan beyaz sıçan (*rattus norvegicus*) yabani boz sıçanın değişik bir tipidir. Diş hekimliği çalışmalarında 250 gr ağırlığındaki

sıçanlar tercih edilir. Genel anatomik özellikleri farelere benzemektedir (154). Sıçanlarla çalışırken araştırmacının, leptospiralar, streptobasillus moniliformis kaynaklı enfeksiyonlara karşı koruyucu tüm önlemleri alması gerekmektedir (155).

Tavşan: Laboratuvar hayvanı olarak Beyaz Yeni Zellanda soyu “Oryctolagus cuniculus” tercih edilir. Biyomedikal araştırmalarda kullanılan tavşan sayısı fare ve sıçanlara kıyasla oldukça düşüktür. Tavşanlar; toksisite, antiserum üretimi, biyolojik etkinliği olan maddelerin ölçümlendirilmesi, göz ve deri iritasyon testleri ve damar sertliği ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (152).

Köpek: İskelet ve kas yapısı genellikle insaninkine benzer. Doğumun 3. haftasında başlayıp 5. haftasına kadar sürmeye devam eden 28 adet süt dişi vardır. Süt dişleri küçük fakat çok keskindir. Tüm dişler mine ile kaplıdır, orta kesici dişler baş başa kapanışa gelirler, kaninler ve küçük azılar arasında diastemalar mevcuttur (156).

Koyun da geniş deneysel çalışma alanına sahipken günümüzde maymun, domuz ve kedi hayvan modellerini kullanarak yapılan çalışmalar kısıtlıdır (154).

2.4.5. Kullanım Testleri

Kullanım testleri hayvanlar ve gönüllü insanlar üzerinde yapılmaktadır. Kullanım testleri materyalin klinik kullanımını her açıdan taklit etmelidir. Hayvanların kullanıldığı kullanım testlerinde köpek ve maymun gibi büyük hayvanlar kullanılmaktadır. İnsanlar üzerinde kullanım testlerinin yapılması test materyalinin biyouyumluluk değerlendirmesinde klinik deney aşamasıdır (129). Pulpa iritasyon testleri, ortodontik amaçla çekilecek insan dişlerinde veya maymun ya da diğer uygun hayvanların sağlam, çürüksüz dişlerinde açılan sınıf V kavitelere test materyalinin uygulanması ile yapılmaktadır. Test materyali 1 hafta ile birkaç ay arası dişlerde bekletilir ve dişlerin çekimi yapılır. Daha sonra bu dişler histolojik inceleme için hazırlanır ve pulpada meydana gelen akut veya kronik iltihap ve odontoblast reaksiyonları değerlendirilmektedir (128,129).

Diş hekimliğinde kullanılan bazı materyaller mukoza ve dişeti ile sürekli bir temas halindedir. Bu nedenle gingival mukoza testinde dişeti altına uzanan kavitelere test materyalleri uygulanır, 7 ile 30 gün arasında meydana gelen reaksiyonlar tespit edilir. Ancak bakteri plağı varlığı, yapılan restorasyon yüzeyinin düzgün olmaması veya taşkın olması gibi nedenlerle dişeti bölgesinde oluşan iltihap test edilen materyalin oluşturduğu etkiyi değiştirebilmektedir (129). Endodontik materyal kullanım ve periapikal doku hasarı testleri ise deney hayvanlarında yapılmaktadır. Bu yöntemde test materyalleri kanal tedavisi için hazırlanmış diş kök kanallarının içerisine yerleştirilir ve daha sonra histolojik değerlendirme yapılır. Deri hassasiyet testi ile test edilecek materyallerin klinik öncesi alerjik özellikleri de deney hayvanlarında saptanır. Maksimizasyon testi ve Buhler testi alerjik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan test yöntemleridir (128).

2.5.6. Mukoza İrritasyon Testleri- HET-CAM

“Hen’s Egg Test on Chorioallantoic Membrane” in kısaltması “Het-Cam” testi, aynı zamanda tavuk yumurtası testi olarak da bilinen ve kimyasalların zararsızlığını araştırmakta, hayvan deneylerine alternatif ve güvenilir bir yol olarak kabul edilen test yöntemidir. Bu test, materyalin embriyo zarındaki etkilerini ölçerek, doku üzerindeki potansiyel iritasyon derecesini tanımlamakta kullanılmaktadır (157).

HET-CAM, Luepke tarafından 1985 yılında, embriyolu tavuk yumurtalarının membranları üzerinde katı ya da likit test materyallerinin doğrudan etkilerini ve iritasyon potansiyellerini tahlil etmeye ve kayıt altına almaya izin veren bir çalışma olarak tanımlanmıştır (158). Bu yöntemin uluslararası geçerliliğe sahip olduğu bildirilmiştir (159).

Korioallantoik membran (Chorioallantoic membran (CAM)) arterler, venler ve kılcal damarlar içeren tam bir dokudur. Tavuk CAM’i ekstraembriyonik dokunun bir parçasıdır, kuluçkanın başlamasından 7 gün sonra korion ve allantoisin füzyonu ile oluşmaktadır. Olgun bir tavuk CAM’i (20-100 µm) kalınlık olarak insan retinasına (yaklaşık 100-300 µm) benzerdir (160). Teknik olarak CAM üzerinde çalışılması kolaydır. CAM,

yaralanmalara, tıpkı tavşan konjunktivasında olduğu gibi (Draize Testi), enflamatuvar bir süreç ile cevap vermektedir. Bu iyi gelişmiş vaskülarizasyon, gözle görülebilir iritasyon çalışmaları için ideal bir model sağlamaktadır (161).

Yöntemin esasının, döllenmiş yumurtanın korioallantoik membran (gelişiminin 9.-10. günlerinde) içindeki test materyali (0.3g katı ve 0.1-0.3ml sıvı) ve iritasyonun tipine göre (liziz, kanama, koagülasyon) değerlendirilen sonuçlara dayalı olduğu bildirilmektedir (159).



Resim 1. Döllenmiş tavuk yumurtası gelişimi (162).

Döllenmiş tavuk yumurtası gelişiminde (Resim 1): 1. gün: doku gelişimi; 2. gün: doku gelişimi belirgin, kan damarları belirmeye başlar; 3. gün: Kan damarları görünür halde, kalp atışı; 4. gün: Allontoik kesenin oluşumu: Kalsiyumun kan dolaşımına karışması, solunum ve atıkların depolanmasında ana rolü oynar; 5. gün: Embriyo 'C' şeklini alır: baş kuyruk kısmına yakınlaşır. Uzuvları büyümeye başlar; 6. gün: Gaga oluşumu, istemli hareketler görülmeye başlar; 7. gün: Beyin kademeli olarak kendisi için ayrılmış bölüme girmeye başlar; 8. gün: alt ve üst gaga eşit uzunluğa gelir, dış işitme kanalı açılmaya başlar;

9. gün: Allantoisin büyür ve yumurta sarısındaki damarlaşma artar; 10. gün: Tüy folikülleri alt kısımdaki uzuvları kaplamıştır; 11. gün: Embriyo civciv görünümüne sahiptir; 12. gün: Tüy folikülleri kulak kanalını sarmış üst göz kapağını kaplamıştır; 13. gün: Allantois küçülerek Korioallantoik membran (chorioallantoic membrane) halini almaya başlar; 14. gün: Yumuşak tüyler neredeyse tüm vücudu kaplamıştır; 15 ve 16. gün: Kademeli olarak yumurta akı kaybolmaktadır. Baş, kabuğu delme pozisyonuna doğru hareket eder ve sağ kanatın altındadır; 17. gün: Amniyotik sıvı azalır, böbrek sistemi çalışmaya başlar; 18. gün: Embriyonun gelişimi neredeyse tamamlanır; 19. gün: Yumurta sarısı vücut boşluğuna doğru çekilir, amniyotik sıvı tamamen bitmiştir; 20. gün: Kabuk delinmeye başlar. Civciv yumurtadan çıkmaya hazırdır. 21. günde civciv yönünü bulmak için kanatlarını, etrafında dönmek için ise bacaklarını kullanmaktadır. Yumurta kabuğunu deler.

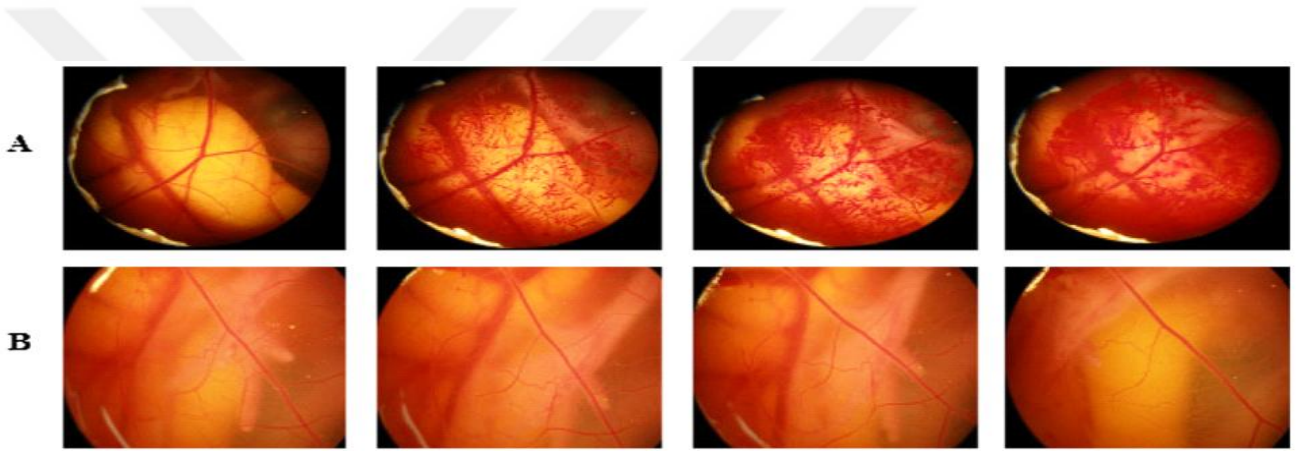
2.5.6.1. HET-CAM Prosedürü

HET-CAM test prosedürü, 5 aşamadan oluşmaktadır:

- Yumurtanın hazırlanması
- Örnek, negatif ve pozitif kontrol çözeltilerinin hazırlanması
- Deney prosedürü
- Yumurtaların değerlendirilmesi
- Değerlerin oluşan iritasyona göre hesaplanması (163).

1. Aşamada döllenmiş tavuk yumurtaları (0 günlük) hasar kontrolü yapıldıktan sonra deneye dahil edilmektedir. Nem ve ısı kontrollü ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) bir kuluçka makinesine yerleştirilir.

2. Aşamada Sodyum Dodenyl Sülfat (SLS) 0.01M suda seyreltilerek pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Deneyin ideal koşullarda gerçekleştirildiğini ve deney sonucunun çevresel etkenlerden etkilenmediğini gözlemlemek amacıyla negatif kontrol olarak %0.9'luk NaCl kullanılmaktadır (163).



Resim 2. A: 0.1 M sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu (pozitif kontrol); 2.B: %0.9 salin solüsyonu (negatif kontrol) (164).

3. Aşamada dokuz günlük yumurtalar kuluçka makinesinden çıkarılır, el feneri ile deneyin yapılabileceği alan tespiti ve damarsal hasar için incelenir. Bu hasar; lizis, kanama ya da koagülasyon olabilir. Yumurtalar, hasarın şiddetini ölçebilmek için 1- 5 dakika kadar izlenir. Her gruptaki her bir yumurta için gözlenen tüm etkiler kayıt edilir. Herhangi bir damarsal değişiklik gözlenir ise, sonuçlar pozitif olarak kabul edilir.

4. Aşamada damarsal etkiler sınıflandırılır. Lizis, kanama ve koagülasyon kriterlerinde zamana bağlı oluşan iritasyon değerlerini saptamak için sayısal olarak maksimum değer 21 olacak şekilde skorlar verilmiştir.

Kanama Zamanı: Kanamanın görüldüğü ilk saniye

Lizis Zamanı: Damar lizisinin görüldüğü ilk saniye

Koagülasyon Zamanı: Protein koagülasyonunun görüldüğü ilk saniye

Tablo 8. HET-CAM yöntemi ile iritasyon testi skorumlama değerleri (163).

Etki	Skor		
	0.5 dk	2 dk	5 dk
Lizis	5	3	1
Kanama	7	5	3
Koagülasyon	9	7	5

5. Aşamada, iritasyon değerleri aşağıdaki tablo kullanılarak hesaplanır (Tablo 9) (157,159):

Tablo 9. HET-CAM yöntemi ile iritasyon testi değerlendirme (157)

HET-CAM Skorları	İritasyon Kategorisi
0 – 0.9	İritan Değil ya da Pratikte İritasyon Yok.
1 – 4.9	Zayıf ya da Önemsiz İritasyon
5 – 8.9	Orta Seviye İritasyon
9 – 21	Güçlü ya da Ciddi İritasyon

Dahl 1999 yılında yaptığı çalışmada HET-CAM yöntemi ile farklı dental adeziv sistemlerin mukozal iritasyon seviyesini incelemiş, 35 grup içinde sadece üç bonding sisteminin mukozal iritasyona neden olmadığını bildirmiştir. (165).

Ardlin ve ark. (2005), metal destekli seramik sabit protezlerde kullanılan metal elementlerden 6 tanesini (Co^{+2} , Ce^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ti^{+4}) HET-CAM yöntemi kullanarak incelemişler, elementlerden sadece kobaltın mukoza üzerine hafif derece iritan olduğunu belirtmişlerdir (166).

Dahl ve ark. (2006), 11 farklı protez besleme materyalinin sitotoksosite ve iritasyon derecelerini inceledikleri çalışmalarında, filtre difüzyon test yöntemi ile 6, MTT yöntemi ile 9 materyalin sitotoksik özellik gösterdiğini, HET-CAM yöntemi ile ise 3 materyalin mukoza üzerine iritan etki gösterdiğini bildirmişler, yöntemler arasında görülen farkın MTT testinde hücrelerle direk temas mevcutken, filtre difüzyon test yönteminde arada filtre bariyeri olmasından kaynaklandığını, iritasyon test yöntemi ile aralarındaki farkın ise materyallere maruz kalım süresinden (sitotoksosite yöntemleri için 24 saat, HET-CAM için 5 dakika) kaynaklandığını belirtmişlerdir (167).

Dahl 2007 yılında yaptığı çalışmada HET-CAM yöntemi ile dental adeziv sistemlerin mukoza üzerine iritan etkilerini incelemiş, 36 farklı adeziv ürünün 34 tanesinin farklı seviyelerde iritasyon gösterdiğini, oral mukoza ile temas sonucu dental adeziv sistemlerin iritasyona neden olabileceğini ve bu konuda dikkatli olunması gerektiğini bildirmiştir (168).

Hjortsjö ve ark. (2009), HET-CAM yöntemi ile ve fareler üzerinde hidroflorik asit içeren florid bileşiklerinin mukoza üzerine etkilerini araştırmış, *in vitro* ve *in vivo* olarak yürütülen her iki deneyin sonucunda da asidik florid bileşiklerinin doza bağlı olarak değişen derecelerde mukozal iritasyona sebep olduğunu, %0.2'den daha yüksek oranlarda hidroflorik asit içeren florid bileşiklerinin yumuşak dokularda hasara neden olabileceğini bildirmişlerdir (169).

Hao ve ark. (2014), taşıyıcı olarak poloksamer 407 ve poloksamer 118 polimeri içeren yeni geliştirilmiş bir göz damlasının mukoza üzerine iritasyon değerlerini HET-CAM yöntemi kullanarak ve hayvan deneyi (Yeni Zelanda albino tavşanı) ile incelemişler, iki çalışmanın sonuçlarını kombine ederek polimer sisteminin mukoza üzerine iritan olmadığını bildirmişlerdir (164).

Hjörtsjö ve ark. (2005), beş farklı protez yapıştırma materyalinin (toz, band ve üç farklı krem formunda) iritasyon (HET-CAM) ve L929 hücre kültürü üzerinde sitotoksik potansiyellerini (filtre difüzyon, agar difüzyon ve MTT yöntemleri ile) değerlendirdikleri çalışmada materyallerden hiçbirinin HET-CAM yönteminde akut iritasyon ve filtre difüzyon testinde sitotoksikite göstermediğini, ancak krem formlarından bir tanesinin MTT ve agar difüzyon testinde ciddi sitotoksik reaksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun MTT ve agar difüzyon yöntemlerinde inkübasyon süresi 24 saatken filtre difüzyon yönteminde 2 saat olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılacak Formülasyonların Hazırlanması

Çalışmada biyoyumluluğu değerlendirilecek olan, lizozim, laktoferrin ve Poloksamer 407 içeren jel formülasyonları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ve Farmakognazi ABD Laboratuvar'ında hazırlanmıştır. Formülasyonların içeriğinde yer alan materyaller ve üretici firma isimleri Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 10. Formülasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları ve üretici firmaları

MATERYAL	TOPLAM MİKTAR	FONKSİYON	ÜRETİCİ FİRMA
Lizozim	4 mg/2 ml	Antibakteriyel	SIGMA [®] -ALDRICH, USA
Laktoferrin	2 mg/2 ml	Antibakteriyel	SIGMA [®] -ALDRICH, USA
Sorensen's Çözeltisi (pH 5.0)	Qs	Tamponlayıcı ve stabilize edici ajan	NaH ₂ PO ₄ (SIGMA [®]) NaH ₂ PO ₄ (SIGMA [®])
Pluronic F-127 (Poloksamer)	20 a/h	Taşıyıcı ve çözücü ajan	SIGMA [®] -ALDRICH, USA

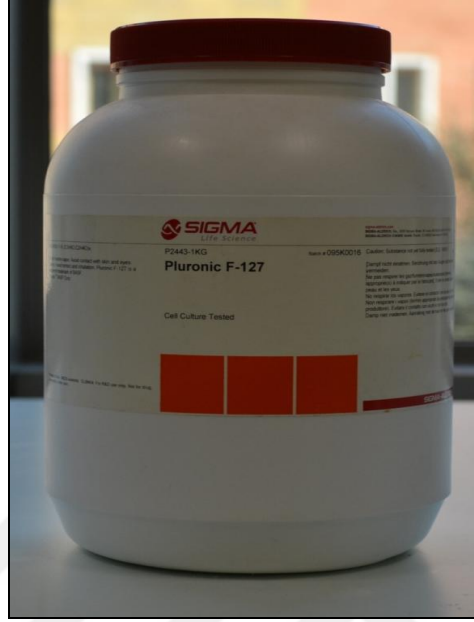
3.1.1. Sorensen's Fosfat Çözeltisinin Hazırlanması

0.8 g/100 ml Sodyum Fosfat dibazik, Anhidroz ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (SIGMA[®], ACS reagent grade, USA) ve 0.947 g/100 ml Sodyum Fosfat monobazik, Monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (SIGMA[®], ACS reagent grade, USA) distile su ile ayrı ayrı karıştırıldıktan sonra, 0.2 M pH'sı 5.0 olan bu çözelti sodyum klorür (SIGMA[®], ultra pure grade, USA) ile birleştirilmiştir. 100 ml pH 5.0 'da Sorensen's Fosfat Çözeltisi (tampon çözeltisi) elde edilmiştir.

3.1.2. Pluronic[®] F-127 (Poloksamer 407) Jelin Hazırlanması

20 g Pluronic[®] F-127 (SIGMA[®] - ALDRICH, BASF Corp, USA) (Resim 3) ilk önce 20 ml tampon çözeltisi ile çözülüp +4°C'de birkaç saat bekletildikten sonra geri kalan tampon çözeltisi ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanmış ve %20 a/h Poloksamer polimeri (Pluronic[®] F-127-Poloksamer) jel formülasyonu elde edilmiştir.

Formülasyonun MİK konsantrasyonu hazırlanırken, daha önceden hazırlanmış %20 Pluronic[®] F-127 (Poloksamer) jel formülasyonu a/h oranında Sorensen's Fosfat Çözeltisi (tampon çözeltisi) ile karıştırılmış ve vortekslenmiştir.



Resim 3. Pluronic® F-127 (SIGMA®- ALDRICH, BASF Corp, USA)

3.1.3. Lizozim ve Laktoferrin İçeren Jel Formulasyonlarının Hazırlanması

4 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA®- ALDRICH, USA) ve 2 mg Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA®- ALDRICH, USA), 2 ml tampon solüsyonu içerisinde çözdürüldükten sonra % 20 a/h Poloksamer 407 polimeri (SIGMA®- ALDRICH, BASF Corp, USA) ile karıştırılarak hazırlanmış ve vortekslenmiştir.

Formulasyonun MİK konsantrasyonu hazırlanırken, 2 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA®- ALDRICH, USA) ve 1 mg Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA®- ALDRICH, USA), 2 ml tampon solüsyonu içerisinde çözdürüldükten sonra % 10 a/h Poloksamer 407 polimeri (SIGMA®- ALDRICH, BASF Corp, USA) ile karıştırılarak hazırlanmış ve vortekslenmiştir .



Resim 4. Tavuk yumurtasından elde edilen Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®] - ALDRICH, USA) ve insan sütünden elde edilen Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®] - ALDRICH, USA)



Resim 5. Çözeltilerin vortekslenmesinde kullanılan yellowline TTS 2 cihazı

3.2. Mukozal İritasyonun Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların mukoza üzerindeki iritasyon değerleri Has Tavuk Gıda Tarım Hayvancılık Sanayii ve Ticaret Anonim Şirketi/Sivrihisar Kertek Şubesi'nden temin edilen beyaz Leghorn cinsi dölllenmiş tavuk yumurtaları üzerinde HET-CAM test yöntemi kullanılarak Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Bölümü Laboratuvarı'nda değerlendirilmiştir.

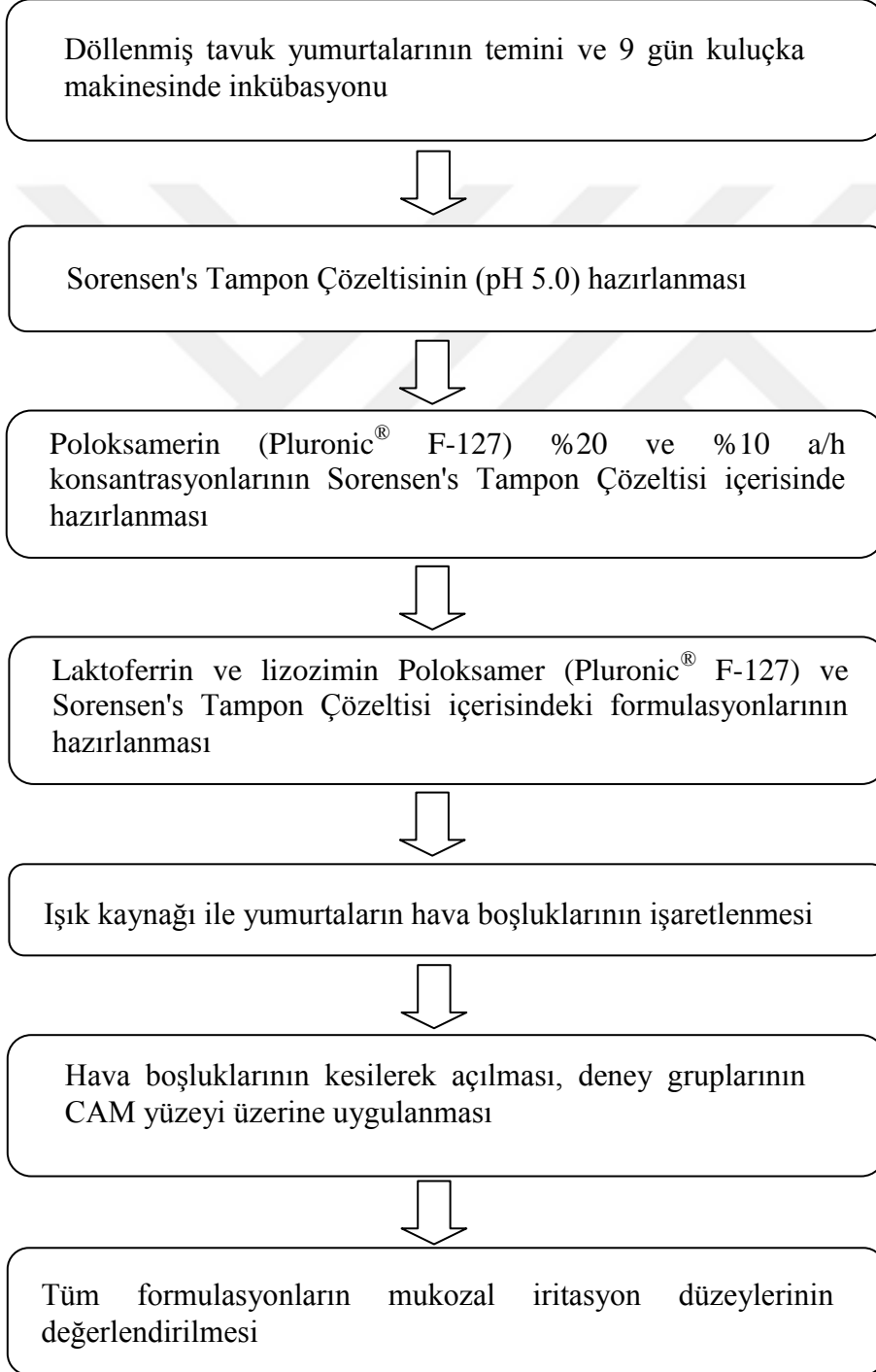
Mukozal iritasyon testinde kullanılacak formülasyonların tablosu aşağıdaki gibidir:

Tablo 11. Çalışmada biyoyuymulluğu değerdendirilecek formülasyonlar, içerikleri ve kodları

KODLAR	FORMULASYONLAR	İÇERİKLERİ
1. Grup	pH:5.0 Sorensen's Tampon Çözeltisi	0.8 g/100 mL NaH ₂ PO ₄ 0.947 g/100 mL Na ₂ HPO ₄
2. Grup	Pluronic [®] F-127 (Jel)	%20 a/h Poloksamer 407 polimer tampon solüsyonu içerisinde (20 g polimer/ 100 mL a/h)
3. Grup	Pluronic [®] F-127 (Jel)	%10 a/h Poloksamer 407 polimer tampon solüsyonu içerisinde (10 g polimer/ 100 mL a/h)
4. Grup	Lizozim+Laktoferrin+ Pluronic [®] F-127 (Jel)	Lizozim (4mg/2mL) + Laktoferrin (2mg/2 mL) pH:5.0 Sorensen's tampon solüsyonu içerisinde çözdürülür. Poloksamer 407 polimeri ile karıştırılır (%20 a/h)
5. Grup	Lizozim+Laktoferrin+ Pluronic [®] F-127 (Jel)	Lizozim (2mg/2mL) + Laktoferrin (1mg/2 mL) pH:5.0 Sorensen's tampon solüsyonu içerisinde çözdürülür. Poloksamer 407 polimeri ile karıştırılır (%10 a/h)
6. Grup	Klorheksidin (CHX) Gargara Kontrol Grubu	%0.2 klorheksidin glukonat
7. Grup	pH:7.0 Sorensen's Tampon Çözeltisi	0.8 g/100 mL NaH ₂ PO ₄ 0.947 g/100 mL Na ₂ HPO ₄
8. Grup	Lizozim+Laktoferrin+ pH:5.0 Sorensen's Çözeltisi	Lizozim (4mg/2mL) + Laktoferrin (2mg/2 mL) tampon solüsyonu içerisinde çözdürülür.

Şema 1. Çalışmanın Akış Şeması (HET-CAM deneyi)

Çalışma basamakları aşağıdaki akış şemasında belirtilmiştir (Şema 1)



3.2.1. Kullanılan Materyaller

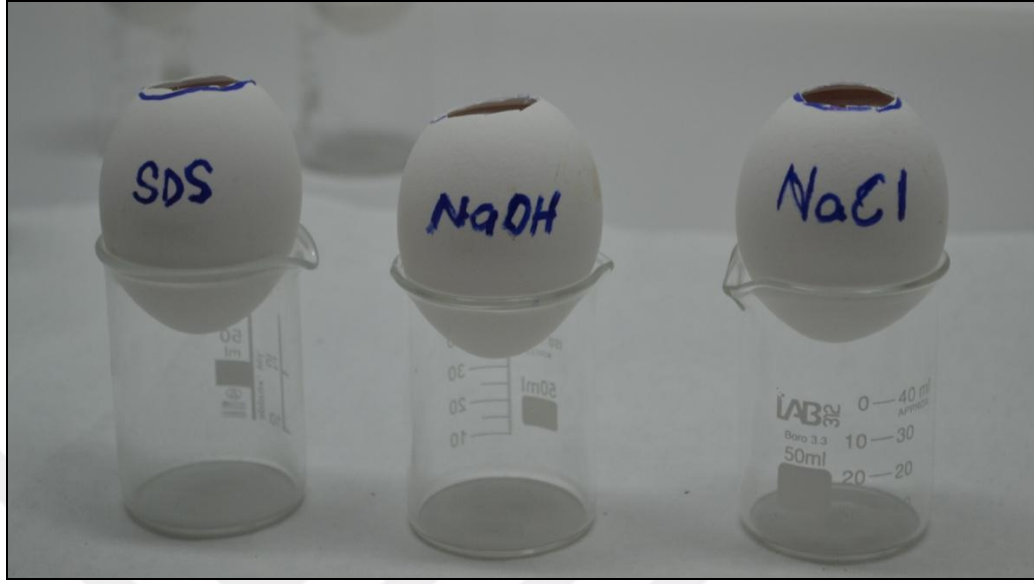
- Otomatik çevirme tablası bulunan kuluçka makinesi
- Işık kaynağı
- Tur motoru ve separe
- Presel
- Çeker ocak
- Mikropipetler ve belirlenen hacimlerde tek kullanımlık uçlar
- Kronometre

3.2.2. Kontrol Grupları

Standart HET-CAM prosedürü için kullanılacak distile su ile hazırlanmış pozitif ve negatif kontrol grupları:

- Negatif kontrol grubu olarak, % 0.9'luk sodyum klorür (NaCl)
- Pozitif kontrol grubu olarak, %1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
- Pozitif kontrol grubu olarak, 1 N sodyum hidroksit (NaOH)'tir.

Çalışmamızda uygunsuz koşullar nedeniyle iritan yanıt oluşmayacağını kontrolü amacıyla negatif kontrol grubu olarak NaCl, uygun cevabın oluşacağını doğrulamak amacıyla da göz ve mukoza üzerine iritan olduğu kesin olarak bilinen SDS ve NaOH pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Resim 6).



Resim 6. HET-CAM testinde kullanılan negatif ve pozitif kontrol grupları

3.2.3. Yumurtaların Hazırlanması

Taze (1-2 günlük), 50-60 gr ağırlığında beyaz Leghorn cinsi döllenmiş tavuk yumurtaları seçilmiş, kırık/çatlak/hasar görmüş, şekil bozukluğu görülen ve normalden daha ince kabuklu yumurtalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Seçilen yumurtalar embriyoların canlılık ve gelişimlerini etkilemeyecek şekilde taşınmıştır.

Yumurtalar $37.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ve $\%58 \pm 2$ nem oranında otomatik ısıtma/çevirme/nemlendirme sistemi bulunan kuluçka makinesine (Resim 7) yerleştirilmiş, 8 gün süresince inkübe edilmiştir. 8. gün yumurtalar kontrol edilmiş, ancak yeterli gelişim için 9. gün beklenmiştir.



Resim 7. Eforstar dijital ısı ve nem sistemi ile kuluçka makinesi

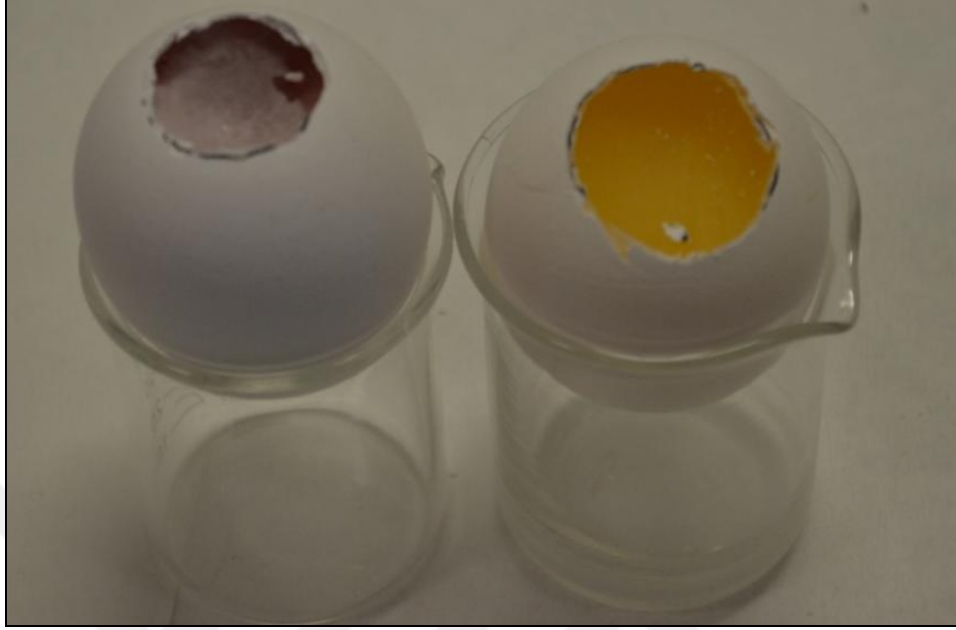
3.2.4. HET-CAM testi

9. gün yumurtalar kuluçka makinesinden çıkarılarak karanlık bir odada ışık kaynağı ile incelenmiş, embriyo gelişimi gözlenmeyen veya hasar görmüş olan yumurtalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Canlılık ve embriyo gelişimi açısından sorun saptanmayan yumurtaların hava boşlukları ışık kaynağı altında saptanarak işaretlenmiştir. İşaretli kısımlar, çeker ocak altında bir tur motoru ve separe ile, korioallantoik membrana (CAM) zarar verilmeden kesilmiş ve presel ile tutularak açılmıştır (Resim 8).



Resim 8. Hava boşlukları işaretlenmiş yumurtaların tur motoru ve separe ile kesilmesi

Hava boşlukları açılan yumurtaların embriyo gelişimleri tekrar kontrol edilmiş (Resim 9) ve gelişim sağlanamayan yumurtalar çalışmaya dahil edilmemiştir.



Resim 9. Solda embriyo gelişimi devam etmekte olan döllenmiş yumurta, sağ tarafta çalışma dışı bırakılan ve damar gelişimi izlenemeyen yumurta

Tüm yumurtalar hazırlandıktan sonra CAM yüzeylerine mukozal iritasyonu değerlendirilecek formülasyonların her biri için 0.3 ml uygulama yapılmıştır. CAM yüzeyi büyüteç altında beş dakika süresince izlenmiş ve 30. sn, 2. dk ve 5. dk'daki damarsal değişiklikler Tablo 8'e göre skorlanmıştır.

3.3. Sitotoksisite Değerlendirmesi

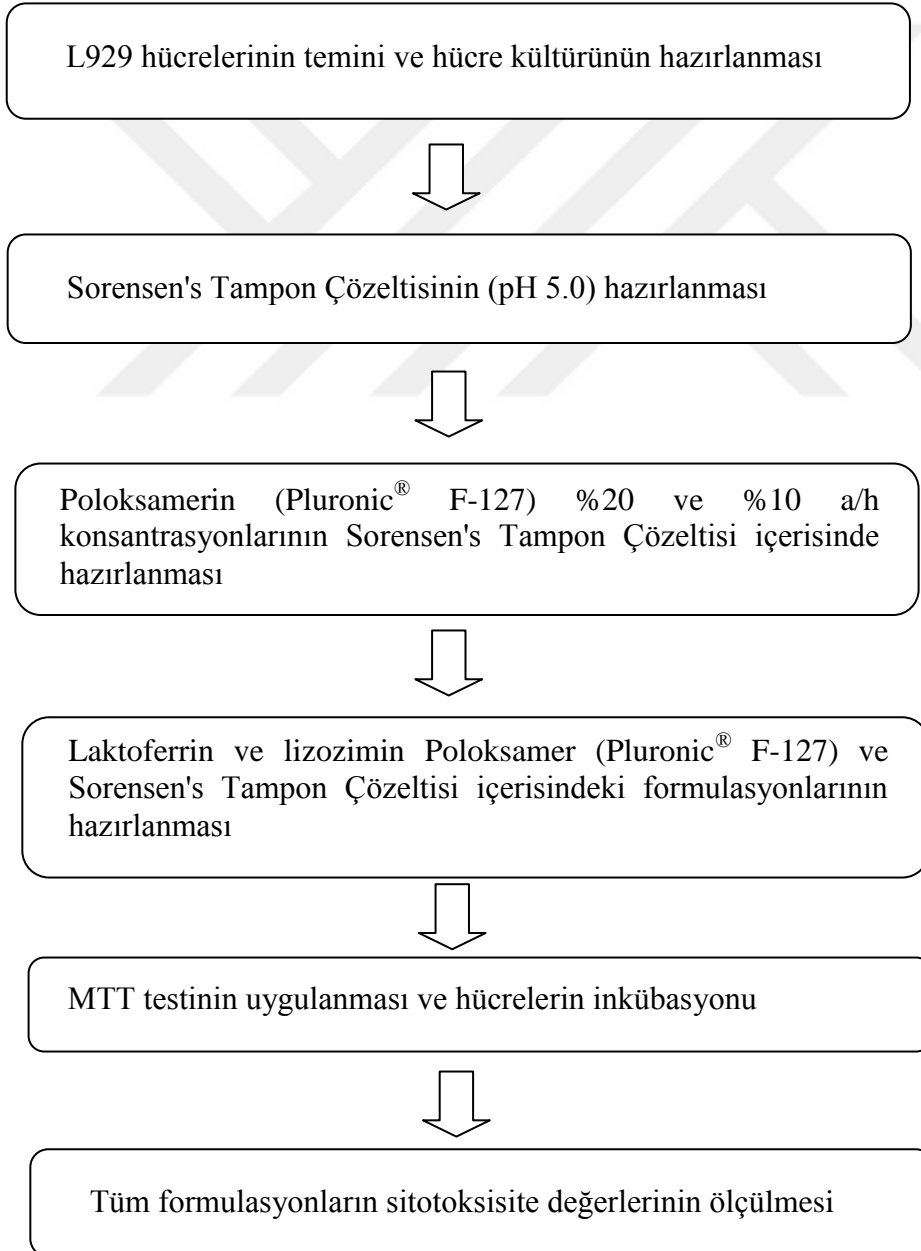
Hazırlanan formülasyonların L-929 fare fibroblast hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkileri MTT test yöntemi kullanılarak Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik ABD Laboratuvarı'nda incelenmiştir.

Sitotoksisite testinde kullanılacak formülasyonlar Tablo 11 ile aynı şekilde hazırlanmıştır. Ancak 3. Grup, formülasyonun MİK değeri olduğu, MTT test yönteminde sitotoksisitesi değerlendirilecek formülasyonlar besi ortamları ile eşit oranda (a/a)

karıştırılarak seyreltileceği ve bu oran MİK değerinin altına düşeceğinden MTT testi için Grup 3'teki formülasyon çalışmanın bu kısmına dahil edilmemiştir.

Şema 2.Çalışmanın Akış Şeması (MTT deneyi)

Çalışma basamakları aşağıdaki akış şemasında belirtilmiştir (Şema 2)



3.3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada L-929 fare fibroblast (ATCC® CCL-1™-American Type Culture Collection, CCL 1 fibroblast, NCTC clone 929) hücre kültürü kullanılmıştır. L-929 hücreleri saklama ortamı olan -196°C'deki azot tankından çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda çözdürülmüştür. Monolayer L-929 hücre kültürü, 25 cm² lik kültür kabında-T-25 flasklarda (Costar, Cambridge, MA, USA /Cellstar Tissue Culture Flask, Grenier bio-one, Austria), Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium High Glucose (DMEM, Biochrom KG, Germany) hücre kültür medyumu içerisinde % 10 oranında fetal bovine serum (FBS, Biochrom AG, Germany) ve % 1 oranında antibiyotik solüsyonu (100 IU/MI penicillin, 100 µg/mL streptomisin ve amfoterisin, Biochrom, Germany) ilave edilerek 37°C' de 1 atm basınç altında % 5 CO₂, % 95 hava içeren % 80 bağıl nemli ortamda inkübe edilerek üretilmiştir (Resim 10). Kültür kaplarının kapakları inkübatör havasının gireceği şekilde aralık bırakılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler pasajlanmadan önce kültür kabı yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları ve üremeleri mikroskop ile kontrol edilmiştir.



Resim 10. %5 CO₂, %95 hava içeren inkübasyon makinesi (NuAire AutoFlow NU-8700 Dual Chamber Water Jacket CO₂ Incubator)

3.3.2. MTT testinin uygulanması

Hücreler tek tabaka olarak üretildikten ve kültür kabının tabanında yeterli miktarda çoğaldıktan sonra (%80-85 yoğunluk) kültür kabındaki besi yeri aspire edilmiştir. Kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla Dulbecco' s phosphate buffer salin solüsyonu (PBS, PAN Biotech, Germany) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Trypsin-EDTA solüsyonu (Gibco[®], USA) (Resim 11) kültür kabına ilave edilmiş ve 37°C'de hücreler zeminden ayrılincaya kadar kültür kabı bekletilmiştir. Trypsin-EDTA' nın proteolitik etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla kültür kabına %10 serum içeren aynı miktarda DMEM medyum ilave edilmiştir. Mikroskop kullanılarak hücrelerin zeminden ve birbirlerinden ayrıldıklarından emin olunduktan sonra, hücreler serolojik pipet yardımıyla kültür kaplarından konik tabanlı 15 ml hacimli steril plastik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir (Sigma, UK) (Resim 12).

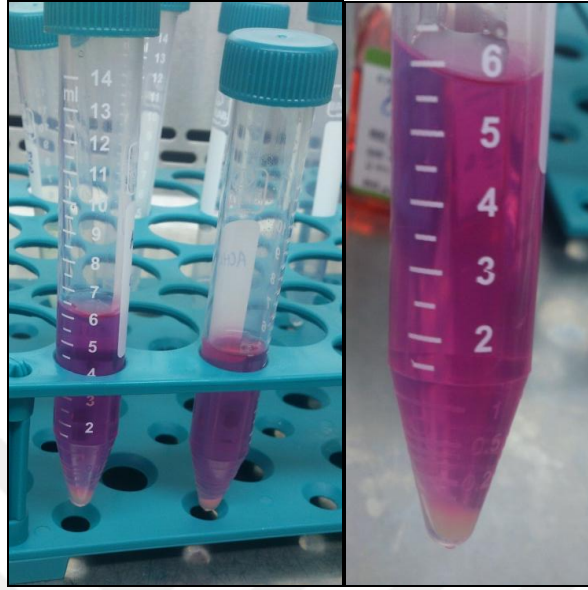


Resim 11. Çalışmada kullanılan Tripsin-EDTA, DMEM ve DPBS solüsyonları



Resim 12. Santrifüj cihazı (Sigma, UK)

Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra tüpün dibine çöken hücrelerin (Resim 13) üzerine 1 ml medyum ilave edilerek hücreler süspansiyon haline getirilmiştir. Mililitresinde 75.000 hücre olacak şekilde süspansiyon haline getirilen hücreler 96 kuyucuklu hücre üretme kaplarına 100 µl/göz (kuyucuk) olacak şekilde (Resim 14) eklenmiş ve % 5 CO₂' li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 96 kuyucuklu hücre üretme kaplarındaki hücreler inverted doku kültürü mikroskopunda (Olympus CK40, Japonya) üremeleri ve ortamın sterilitesi kontrol edildikten sonra kültür ortamındaki DMEM besi ortamı aspire edilerek uzaklaştırılmış ve yerine taze olarak hazırlanmış ve besi ortamları ile eşit oranda (a/a) karıştırılmış formülasyonlar mikropipet ile kuyucuklara koyularak tekrar %5 CO₂' li inkübatörde 24-48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 13. Santrifüj sonrası süpernatant ve tüpün dibine çökmüş olan hücreler



Resim 14. MTT testinde kullanılan plate

Hücreler aynı şartlarda %20 DMSO içeren besiyerine maruz bırakılmıştır (pozitif kontrol). Negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri bittiğinde kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve içerisine MTT solüsyonu (her 1 ml DMEM üzerine 100 µl MTT) olacak şekilde 110 µl besiyeri bu kuyucuklara eklenmiştir. MTT'ye maruz bırakılan hücreler 2 s inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında hücre canlılığı 490 nm'de otomatik petri okuyucu ile (Resim 15) ölçülmüş ve çıkan değerler kontrol gözleri ile karşılaştırılmıştır. Materyallerin hazırlanışından bu aşamaya kadar, deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.



Resim 15. Otomatik petri okuyucu (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum)

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma) yanı sıra çoklu grupların tekrarlayan ölçümlerinde Friedman testi, gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, alt grup karşılaştırmalarında Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Sonuçlar, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde olacak şekilde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

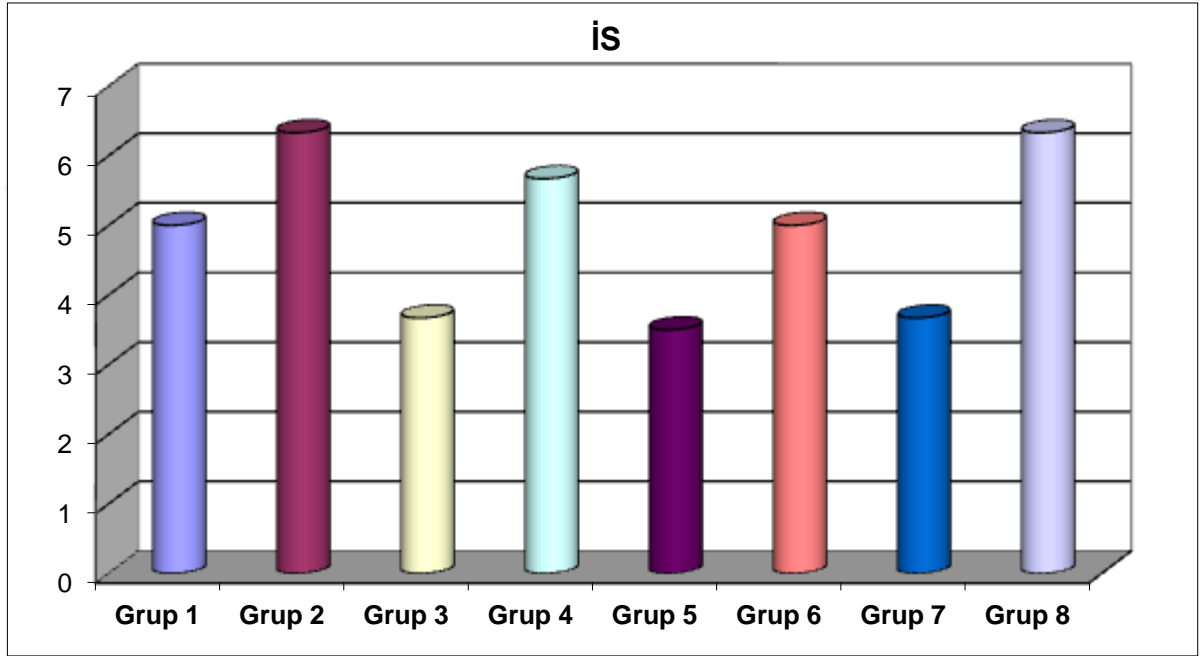
4.1. HET-CAM deneyinin bulguları

Çalışmanın birinci bölümünde 7 farklı deney grubu ve CHX kontrol grubunun iritasyon skorlarının belirlenmesi amacıyla iki farklı deney yürütülmüştür. Birinci HET-CAM deneyinde her bir grup için 3 adet döllenmiş beyaz Leghorn cinsi tavuk yumurtası kullanılırken ikinci deney için örnek sayısı 5 yumurta olarak belirlenmiştir.

Tablo 12. Her grup için üç farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorları

	İS (iritasyon skoru) Toplam Skor	
	Ort±SS (3 Tekrar)	Median (IQR)
Grup 1		
(Sorensen's Çözeltisi pH:5.0)	5±0	5 (5-5)
Grup 2		
(%20 Pluronic® F-127)	6,33±1,16	7 (5-7)
Grup 3		
(%10 Pluronic® F-127)	3,67±2,31	5 (1-5)
Grup 4		
(2mg/ml Lizozim+1mg/ml Laktoferrin+ % 20 Pluronic® F-127)	5,67±1,16	5 (5-7)
Grup 5		
(1mg/ml Lizozim+0.5mg/ml Laktoferrin+ % 10 Pluronic® F-127)	3,5±1,92	4 (1,5-5)
Grup 6		
(%0.2 klorheksidin glukonat)	5±0	5 (3,75-4,5)
Grup 7		
(Sorensen's Çözeltisi pH:7.0)	3,67±2,31	5 (1-5)
Grup 8		
(2mg/ml Lizozim+1mg/ml Laktoferrin+ Sorensen's Çözeltisi)	6,33±1,16	7 (5-7)
p (KW)	0,106	

Tablo 12'de her grup için 3 adet yumurta üzerinde yapılan HET-CAM deneyinin sonucunda kontrol grubu olan klorheksidin ve deney gruplarının 30 sn, 2 dk ve 5 dk sonra elde edilen toplam skorların ortalama, standart sapma ve median değerleri görülmektedir.



Grafik 1. Her grup için üç farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorlarının dağılımı

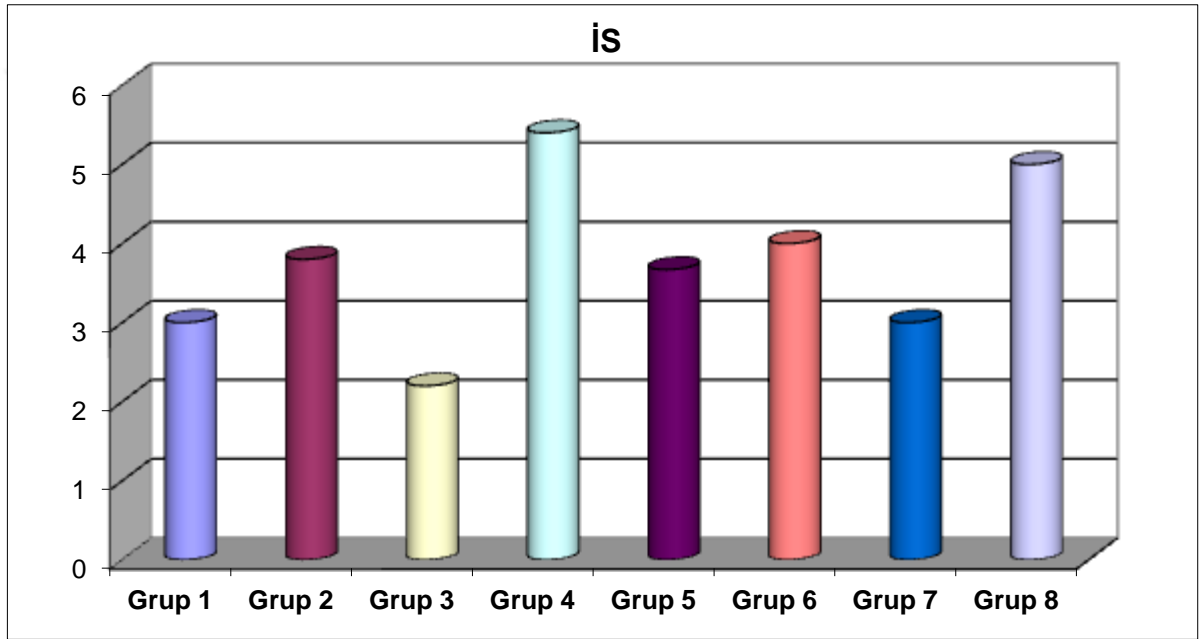
En yüksek İS ortalaması Grup 2 ve Grup 8'de gözlenirken, en düşük skor ortalamasının Grup 5'de olduğu belirlenmiştir. Tüm grupların toplam İS değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.106$).

5 adet döllenmiş beyaz Leghorn cinsi tavuk yumurtası kullanılarak yapılan HET-CAM deneyinin sonuçları ise Tablo 13' de verilmektedir.

Tablo 13. Her grup için beş farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorları

	IS Toplam Skor (5)	
	Ort±SS	Median (IQR)
	(5 Tekrar)	
Grup 1		
(Sorensen's Çözeltisi pH:5.0)	3±2,74	5 (0-5)
Grup 2		
(%20 Pluronic [®] F-127)	3,8±3,56	5 (0-7)
Grup 3		
(%10 Pluronic [®] F-127)	2,2±2,59	1 (0-5)
Grup 4		
(2mg/ml Lizozim+1mg/ml Laktoferrin+ % 20 Pluronic [®] F-127)	5,4±0,89	5 (5-6)
Grup 5		
(1mg/ml Lizozim+0.5mg/ml Laktoferrin+ % 10 Pluronic [®] F-127)	3,67±1,63	4 (2,5-5)
Grup 6		
(%0.2 klorheksidin glukonat)	4±1,16	4 (3-5)
Grup 7		
(Sorensen's Çözeltisi pH:7.0)	3±2	3 (1-5)
Grup 8		
(2mg/ml Lizozim+1mg/ml Laktoferrin+ Sorensen's Çözeltisi)	5±2	5 (3-7)
P (KW)	0,066	

En yüksek ortalama iritasyon değerleri Grup 4'de gözlenirken, en düşük iritasyon değerleri Grup 3'de gözlenmiştir. Tüm yumurtalar değerlendirildiğinde, Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'in İS Toplam Skor değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.066$).



Grafik 2. Her grup için beş farklı tavuk yumurtası kullanılan HET-CAM deneyinin ortalama iritasyon skorlarının dağılımı

4.2. Sitotoksisite deneyinin bulguları

Çalışmada kullandığımız deney gruplarının L 929 hücreleri üzerine direkt temas test metodu kullanılarak yapılan sitotoksik değerlendirmelerinde, MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluklara ait değerler (OD) üzerinden yola çıkılarak, uygulandıkları hücreler üzerindeki canlılık oranları % olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{İncelenen Grup (OD)} - \text{Pozitif Kontrol Grubu (OD)}}{\text{Negatif Kontrol Grubu (OD)} - \text{Pozitif Kontrol Grubu (OD)}} \times 100$$

Hesaplanan değerler 1, 2 ve 3. gün için değerlendirilmiş ve Tablo 14'te gösterilmiştir.

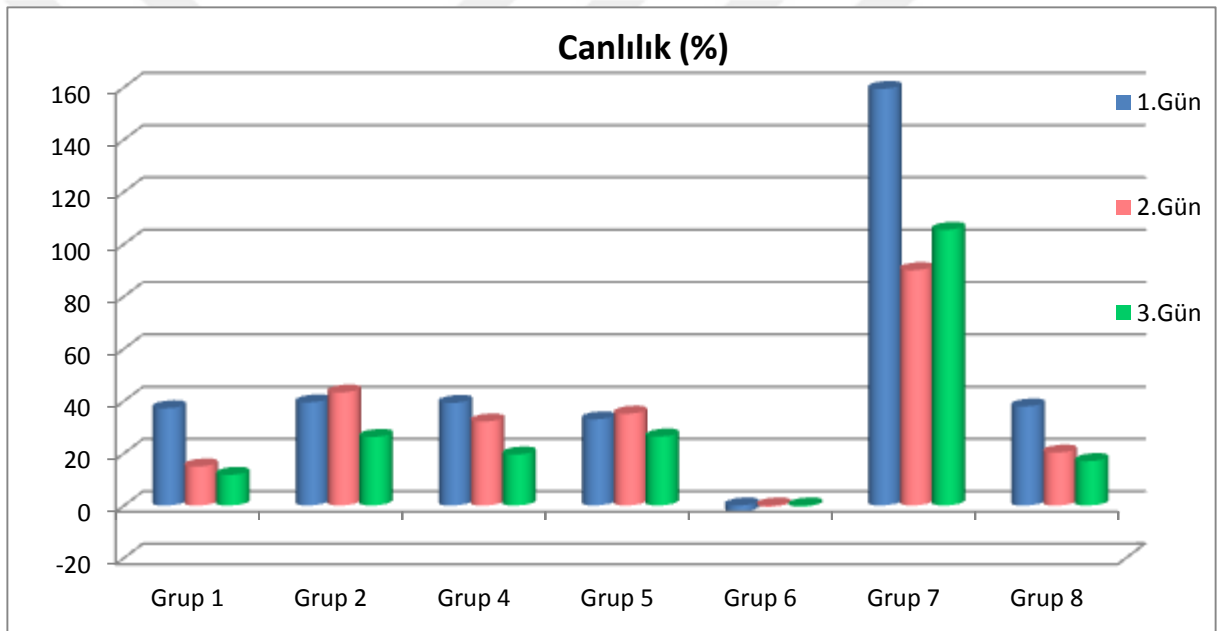
Tablo 14. Deney gruplarının tüm günlerde gözlenen % canlılık değerleri

Canlılık (%)	1.Gün	2.Gün	3.Gün	p (F)
Grup 1	37,159±4,109	14,893±1,566	11,712±2,052	0,0001**
Grup 2	39,421±10,457	43,232±13,973	26,177±5,687	0,338
Grup 4	39,229±8,04	32,084±8,731	19,468±6,692	0,129
Grup 5	32,937±3,756	35,071±7,644	26,349±0,485	0,251
Grup 6	-2,447±0,962	-0,468±0,692	-0,436±0,264	0,046**
Grup 7	159,309±13,383	89,994±17,002	105,408±12,623	0,016**
Grup 8	37,854±2,557	20,205±5,208	16,929±2,251	0,005**
p (KW)	0,035*	0,006*	0,007*	

* Kruskal Wallis Testi (p<0.05)

** Friedman Testi (p<0.05)

MTT testinde hücre canlılık (%) değerleri incelendiğinde tüm günlerde en fazla hücre ölümü Grup 6'da gözlenirken, en yüksek canlılık oranları Grup 7'de gözlenmiştir. Grup 2 ($p=0.338$), Grup 4 ($p=0.129$) ve Grup 5'in ($p=0.251$) 1. Gün, 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri karşılaştırıldığında, günler arasında grupların canlılık oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir.



Grafik 3. Sitotoksosite deneyi gruplar arası hücre canlılık yüzdelerinin tüm günler için değerlendirilmesi

Günler arası hücre canlılık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p<0.05$) grupların ikili karşılaştırmaları Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi ile incelenmiş ve değerler Tablo 15'de verilmiştir.

Tüm grupların canlılık değerleri 1. (0.035), 2. (0.006) ve 3. (0.007) günler için incelendiğinde değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. 1,

2, ve 3. günler için deney grupları ikişerli olarak karşılaştırılıp canlılık yüzdeleri Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiş, veriler Tablo 15'de gösterilmiştir.

Tablo 15. Günler arası hücre canlılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p<0.05$) gruplar

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi	Grup 1	Grup 6	Grup 7	Grup 8
1.Gün / 2.Gün	0,015	0,045	0,025	0,042
1.Gün / 3.Gün	0,008	0,041	0,048	0,017
2.Gün / 3.Gün	0,267	0,910	0,407	0,232

Grup 1'in 1.Gün, 2.Gün ve 3.Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.0001$) (Tablo 14). 1. Gün canlılık değerleri 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.015$, $p=0.008$), 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.267$) (Tablo 15).

Grup 6'nın 1. Gün, 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.046$) (Tablo 14). 1. Gün canlılık değerleri 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p=0.045$, $p=0.041$), 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.910$) (Tablo 15).

Grup 7'nin 1. Gün, 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.016$) (Tablo 14). 1. Gün canlılık değerleri 2. Gün ve 3.

Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.025$, $p=0.048$), 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.407$) (Tablo 15).

Grup 8'in 1. Gün, 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.005$) (Tablo 14). 1. Gün canlılık değerleri 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.042$, $p=0.017$), 2. Gün ve 3. Gün canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.232$) (Tablo 15).

Tablo 16. Tüm günler için deney gruplarının ikişerli olarak karşılaştırılarak canlılık yüzdelerinin değerlendirilmesi

Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi	1.Gün	2.Gün	3.Gün
Grup 1 / Grup 2	0,998	0,036	0,105
Grup 1 / Grup 4	0,998	0,360	0,684
Grup 1 / Grup 5	0,991	0,208	0,099
Grup 1 / Grup 6	0,0001	0,481	0,227
Grup 1 / Grup 7	0,0001	0,0001	0,0001
Grup 1 / Grup 8	0,998	0,992	0,925
Grup 2 / Grup 4	0,998	0,784	0,801
Grup 2 / Grup 5	0,929	0,936	0,998
Grup 2 / Grup 6	0,0001	0,001	0,001
Grup 2 / Grup 7	0,0001	0,001	0,0001
Grup 2 / Grup 8	0,998	0,116	0,505
Grup 4 / Grup 5	0,938	0,998	0,782
Grup 4 / Grup 6	0,0001	0,013	0,014
Grup 4 / Grup 7	0,0001	0,0001	0,0001
Grup 4 / Grup 8	0,998	0,735	0,998

Grup 5 / Grup 6	0,001	0,007	0,001
Grup 5 / Grup 7	0,0001	0,0001	0,0001
Grup 5 / Grup 8	0,980	0,516	0,485
Grup 6 / Grup 7	0,0001	0,0001	0,0001
Grup 6 / Grup 8	0,0001	0,189	0,037
Grup 7 / Grup 8	0,0001	0,0001	0,0001

1.günde Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'in canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p=0.035$) (Tablo 14). Grup 6'nın canlılık değerleri Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 7 ve Grup 8'in 1.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p=0.0001$, $p=0.001$), Grup 7'nin canlılık değerleri Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6 ve Grup 8'in 1.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.0001$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 16).

2. günde Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8'in canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p=0.006$) (Tablo 14). Grup 6'nın canlılık değerleri Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 7'nin 2.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p=0.013$, $p=0.0001$, $p=0.001$, $p=0.07$), Grup 7'nin canlılık değerleri Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6 ve Grup 8'in 1.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.0001$, $p=0.001$), Grup 1'in canlılık değerleri Grup 2'nin 2.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p=0.036$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 16).

3. günde Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7 ve Grup 8' in canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p=0.007$) (Tablo 14). Grup 6'nın canlılık değerleri Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 7'nin 2.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p=0.014$, $p=0.0001$, $p=0.001$), Grup 7'nin canlılık değerleri Grup 1, Grup 2, Grup 4, Grup 5, Grup 6 ve Grup 8'in 1.Gün canlılık değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0.0001$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 16).



5. TARTIŞMA

Antibiyotikler ve antimikrobiyaller, günümüzde diş hekimliği uygulamalarının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bu ilaçların kullanımı konusunda doğru stratejilere ve kurallara yüksek düzeyde gereksinim duyulmaktadır. Günümüzde bu amaçla kullanılmakta olan antimikrobiyallerin plak formasyonunun yavaşlaması ve gerilemesi ile gingivitis ve diş çürüğünün önlenmesi üzerine olan etki ve aktiviteleri kapsamlı olarak çalışılmıştır (171–174). Aynı zamanda subgingival floradaki Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerine etkilerine dair de pek çok çalışma yapılmıştır (175,176).

Diş hekimliğinde en sık kullanılan antimikrobiyallerden bir tanesi de florid içeren preparatlardır. 3 yaşın altındaki çocuklarda yutma refleksinin gelişmemiş olması nedeniyle floridli diş macunu kullanımı gelişmekte olan sürekli dişlerde fluorozis riskini doğurmakta ve sistemik florid toksisitesine neden olabilmektedir (177). Diğer taraftan, antimikrobiyal etkinliği yapılan çalışmalarda görülmüş olan CHX'in jel veya verni formu çocuklarda kullanılabilir. Ancak, CHX'in uzun süre kullanımının ağız mukozasında lokal olarak olumsuz yan etkiler bırakması, dişlerde renkleşmeye neden olması ve sitotoksik etkileri nedeniyle, çocuklarda erken dönemde görülen çürüklerin önlenmesinde etkili olabilecek ve antibakteriyel etkiye sahip yeni ürünlerin geliştirilmesi sonucunu ortaya çıkarmıştır (178,179). Bu nedenle, bu dönemde antibakteriyel etkileri kanıtlanmış tükürük proteinlerinden Lizozim ve Laktoferrin içeren bir preparat kullanımının erken çocukluk dönemi çürüklerinin önüne geçilmesi için bir çözüm getirebileceği düşünülmektedir (18).

Piyasada içeriğine tükürük proteinlerinin eklendiği çeşitli ticari ürünler bulunmaktadır. Lizozim ve Laktoferrin gibi antimikrobiyal proteinler, ağız ve diş sağlığı için üretilen diş macunları ve ağız gargalarına ilave edilmektedir. Günümüzde, bu proteinlerin bulunduğu bazı ticari ürünler piyasaya sunulmuştur (Biotene®, BioXtra® ve Zendium Saliva®). Ancak, bu ürünlerin etkileri incelendiğinde diş çürüğünün oluşumunda

rol oynayan temel patojen suşlar üzerine etkilerinin yetersiz kaldığı yapılan çalışmalarda görülmüş, bu nedenle daha çok geliştirilmeleri gerektiği düşünülmüştür (180). Son yıllarda yeni bir yaklaşım olarak antimikrobiyal ajanların ilaç taşıyıcı sistemler ile uygulanması gündeme gelmiştir (48). Bu konuda diş hekimliği literatüründe yayımlanmış çok sayıda çalışma olmamakla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda topikal olarak uygulanan poloksamer ve lipozom gibi taşıyıcı sistemlerin periodontal hastalıkların ve ağız boşluğunda görülen enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Bu sistemlerin en önemli avantajı, biyoaktif ajanı direkt olarak gerekli bölgeye taşınmaları ve uzun süre o bölgede ihtiyaç olan konsantrasyonu koruyabilmeleri olarak bildirilmektedir (181).

Günümüzde, diş hekimliği literatüründe Lizozim ve/veya Laktoferrin içeren, diş macunları dışında farklı taşıyıcı sistemlerin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırıldığı yayımlanmış bir çalışma bulunamaması nedeniyle, 2012 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda Lizozim ve Laktoferrin içeren ve taşıyıcı sistem olarak Pluronic F-127 isimli Poloksamer 407 polimeri ve/veya lipozomun (DLD) kullanıldığı farklı formülasyonların, mikrobiyal dental plakta bulunan ve diş çürüğüne neden olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkilerinin %0.2'lik klorheksidin jel/gargara ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* koşullarda değerlendirildiği bir doktora tezi sunulmuştur (18).

Çalışma sonucunda, *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* bakteri suşları üzerine %0.2'lik klorheksidin glukonat gargaranın (Klorhex®, Drogosan) çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu, Sorensen's Çözeltisi ile hazırlanan tampon solüsyonu ile Lizozim ve Laktoferrin içeren tampon solüsyonunun bakteri suşları üzerine etkili olmadığı görülmüştür. Poloksamer 407 polimeri ile hazırlanan tüm formülasyonların, Lizozim ve Laktoferrin içeriğinden bağımsız olarak bakteri suşları üzerine inhibitör etki gösterdiği, DLD' nin yalnızca Poloksamer 407 polimeri ile birleştiğinde bakteri suşları üzerine inhibisyon gösterdiği, tek başına veya Lizozim ve Laktoferrin ile birlikte kullanıldığında inhibisyon görülmediği bildirilmiştir (18).

Çalışmada kullanılan Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonların, ağızdaki MDP' de bulunan ve çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* bakteri suşları üzerinde etkinliği, piyasada bulunan klorheksidin preparatı ile karşılaştırıldığında klorheksidinden daha üstün olmamakla birlikte daha güvenilir olabileceği, diş hekimliğinde antimikrobiyal/antiplak ajan olarak klinikte etkin şekilde kullanılabilmesi ve yeni bir formülasyon olarak ilaç piyasasında yer alabileceği ileri sürülmüştür. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, ağız içerisinde kullanılması planlanan bu formülasyonların biyoyumluluğunun değerlendirildiği bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonların biyoyumluluğu değerlendirilmiş, DLD'nin antimikrobiyal etkinliği artırmadığı bildirildiğinden, taşıyıcı sistem olarak sadece Poloksamer 407 kullanılmıştır. Antimikrobiyal etkisi ve doza bağlı sitotoksikite gösterdiği bilinen (75) klorheksidin gargara (Klorhex®, Drogan) pozitif kontrol, Sorensen's Çözeltisi ile hazırlanan tampon solüsyonu ise negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Etken maddelerin (Laktoferrin ve Lizozimin) antibakteriyel etki ve biyoyumluluklarının değerlendirilmesi

Gonzalez ve ark. (2009), Laktoferrinin bakteriyostatik fonksiyonunun, mikroorganizmaların üremesini inhibe ederek ve enfeksiyon bölgesindeki bakteriler tarafından besin kullanımını sınırlayarak Fe^{+3} iyonunu bağlama yeteneğinden kaynaklandığını, LF'nin bakterisidal fonksiyonunun ise bakteri yüzeyleri ile direkt etkileşimine dayandığını bildirmişlerdir (182).

1988'de, LF'nin, lipopolisakarit (Lps) ile etkileşim yoluyla gram negatif bakterilerin dış membranını hasara uğrattığı kanıtlanmıştır (183). LF'nin pozitif yüklü N-ucu, hücre zarının geçirgenliğini artırıp, hücre duvarından Lps'nin salınmasına sebep olarak bakteriyel katyonlar (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) ve Lps arasındaki etkileşimi önlemektedir. LF ve Lps arasındaki interaksiyonun yüksek konsantrasyonlarda mukozadan salgılanan lizozim gibi doğal antibakteriyellerin etkisini de artırdığı bildirilmiştir (182).

İn vitro ve *in vivo* çalışmalar, LF'nin konak hücreye bazı bakterilerin bağlanmasını önleme kabiliyetine de sahip olduğunu göstermiştir (182).

Laktoferrinin, insan ve hayvanlarda görülebilen RNA ve DNA virüslerinin birçoğuna karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, adenovirüsler ve enterovirüsler gibi kılıfsız virüslere karşı da aynı etkiyi göstermektedir (182).

Laktoferrin, antimikrobiyal ve prebiyotik özelliklerinden dolayı çok fonksiyonlu gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir. Laktoferrinin gıdalarda, bebek mamalarında, sporcu beslenmesinde kullanılan gıdalarda, sakızlarda ve ağız bakım ürünlerinde (diş macunu, ağız yıkama gargaralarında ve kozmetikte) katkı maddesi olarak kullanılması önerilmektedir (184–186). Laktoferrinin et ürünlerinde kullanılmasına Amerika Birleşik Devletleri'nde izin verilmiştir (187).

Severin ve ark. (2007), ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim olan lizozimin, hücre zarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakadaki β -1,4 glikozidik bağları hidrolize etmesi sebebiyle özellikle gram pozitiflere karşı çok etkili olduğunu bildirmişlerdir. Hücre zarının hidrolize olması, hücre zarının yapısal bütünlüğünün bozulması ve dolayısıyla bakteri hücresinin zarar görmesine neden olmaktadır (51).

Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (2011) Ek 12-Bölüm C (diğer koruyucular) de E 1105 koduyla yer alan lizozimin maksimum kullanım limiti şarapta 500 mg/l, olgunlaştırılmış peynirlerde ise QS (herhangi bir en yüksek düzeyin belirtilmediği, ancak istenilen etkinin sağlanabildiği en küçük miktar) olarak belirlenmiştir (188).

Proteinler üzerinde yapılan biyoyoumluluk çalışmalarının genellikle bir enzim preparatına ait bir enzim parçasının potansiyel toksisitesi ve allerjenitesi üzerine olduğu görülmektedir (189). Yumurta beyazı, tarih boyunca hiçbir toksisite raporu olmaksızın

insanlar tarafından güvenle tüketilmiş olduğundan yumurta beyazından elde edilen proteinler toksisite endişelerini artırmamaktadır. Ancak, bir çok benzer gıda gibi, yumurta beyazının bazı bireylerde, özellikle çocuklarda, allerjik reaksiyonlar oluşturduğuna dair raporlar bulunduğundan, yumurta beyazından elde edilen proteinler allerji endişelerini yükseltmektedir (190). Bu nedenle, FDA yumurta beyazının lizozim komponentinin alerjenik olup olmadığı sorusunu değerlendirmektedir.

Bu konunun değerlendirilmesinde FDA, yumurta alerjisi olduğu bilinen hastaların serumundan alınan antikoların spesifik yumurta proteinlerine bağlandığını gösteren *in vitro* bir çalışmayı dikkate almaktadır. Bu rapor lizozimin yumurta beyazına karşı hassas olan bazı katılımcılar için alerjen olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, Lizozim içeren ticari ürünler eser miktarda da olsa diğer yumurta beyazı proteinlerini içerebilmektedir. Bu nedenle FDA, yumurta beyazında bulunan lizozime karşı duyarlı olan insanları bilinçlendirmek için ürünlere uyarı etiketleri eklenmesini önermektedir (191).

5.2. Klorheksidin antibakteriyel etki ve biyoyumluluğunun değerlendirilmesi

Günümüzde pek çok yeni ürün üzerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda klorheksidin, pozitif kontrol ve hatta “altın standart” olarak kullanılmaktadır. Diş yüzeyindeki klorheksidin konsantrasyonunun zamanla azalması bakteriyostatik etkisinin yüksek olmasına neden olmakta, bu uzun süreli bakteriyostatik etki ise klorheksidine altın standart olma özelliğini vermektedir. Ağızdaki farklı yüzeylere tutunabilme özelliği ve geniş bir pH aralığında yüksek antimikrobiyal etki göstermesi nedeniyle CHX'in kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir (192).

Klorheksidin yüksek seviyedeki antiplak aktivitesi ağız boşluğunda tutunma özelliğine, yani substantivitesine bağlanmıştır. Klorheksidin ağız içinde de farklı yüzeylere, mukoza ve dişlerin yanı sıra tükürük ve pelikula da bağlanabildiğinden, antibakteriyel etkinliğini saatlerce sürdürebilmektedir (192).

Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar klorheksidin ile günde 2 kez gargara yapmanın, plak oluşumunu inhibe ettiğini, gingiviti ve diş çürüklerini engellemede yardımcı olduğunu göstermiştir (193–195). Yapılan çalışmalarda, günlük diş fırçalama işlemlerine ek olarak klorheksidin gargara kullanımının, tek başına fırçalamaya göre daha yararlı olduğu gösterilmiştir (196,197).

Aktaş ve ark (2008), 20 gönüllü denek üzerinde yaptıkları çalışmada 10 kişiye %0.2 klorheksidin diglukonat gargara, 10 kişiye ise %0.9 izotonik sodyum klorür içeren plasebo gargarayı üç gün boyunca günde iki sefer olmak üzere kullandırmış, deneklerden 4 gün boyunca mikrobiyolojik örnek alınmıştır. Sonuç olarak düzenli klorheksidin gargara kullanımının patojen bakteriler de dahil olmak üzere ağızdaki bakteri oranında azalma sağladığı, bu durumun da ağız boşluğunda yara iyileşmesine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (198).

Klorheksidinin ağız boşluğundaki Mutans streptokoklarının (MS) ortamdan uzaklaştırılmasında etkili topikal antimikrobiyal bir ajan olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, CHX'in MS sayılarında azalmaya neden olduğu görülse de, CHX gargara kullanımında 2 hafta içinde, jel uygulandığında 4 hafta içinde, verni uygulandığında ise 12 hafta içinde bu sayılarda başlangıç değerlerine geri dönüş olduğu görülmüştür. Bu sonucun, dental biyofilmdeki MS'lerin antimikrobiyal ajanlara direnç göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (178). Ancak klorheksidin preparatlarının en önemli dezavantajının doza bağlı olarak artan sitotoksikite değerleri olduğu düşünülmektedir (75).

İz ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada, L929 hücreleri üzerine, ticari olarak mevcut olduğu şekilde %0.2 konsantrasyonda CHX içeren, on kat seyreltilmiş %0.02 konsantrasyonda ve yüz kat seyreltilmiş %0.002 konsantrasyonlarda CHX içeren gargaraları 1 saat, 3 saat ve 24 saat boyunca uygulanmış ve hücre canlılıkları MTT test sistemi ile belirlenmiştir. Hücre canlılık sonuçlarına göre, negatif kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 kabul edildiğinde %0.2 konsantrasyonda CHX içeren ve on kat seyreltilmiş %0.02 konsantrasyonda CHX içeren gruplarda hücre canlılık oranı %20

civarında iken yüz kat seyreltilmiş %0.002 konsantrasyonda CHX içeren gruplarda, hücre canlılık oranları %50'nin üzerinde bulunmuştur. Sonuç olarak, CHX'in *in vitro* ortamda hücrelere sitotoksik etki gösterdiği, klinik kullanımda daha düşük konsantrasyonlarda CHX'in kullanılması ve bu ajanın sitotoksik özelliklerinin canlı dokularda da daha detaylı bir şekilde belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir (199).

Bu çalışmada da biyouyumluluğu değerlendirilecek formülasyonların sitotoksitesisi, doz ve maruz kalınan süreye bağlı olarak sitotoksosite değerlerinin arttığı kanıtlanmış klorheksidin glukonat gargara (Klorhex®, DrogSan) ile karşılaştırılmıştır.

5.3. Poloksamer 407 Taşıyıcı Polimer Sistemlerinin Tartışılması

İlaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasının kolay olması ve uygulandığı alanda iyi tutunması istenmektedir. Çeşitli ilaçların kontrollü olarak vücuda verilmesinde ilacın aktivitesinin korunması, organizma tarafından iyi tolere edilmesi, uygulamanın kolay olması gibi nedenlerle taşıyıcı sistem olarak termoreversible özelliğe sahip Poloxamer 407 polimerinin kullanılması önerilmektedir (200).

Jones ve ark. (2009), yaptıkları çalışmalarında termoreversible Poloksamer 407 polimerinin viskoelastik, mekanik ve mukoadeziv özelliklerini incelemişler, %20 a/a konsantrasyondaki polimerin ağız boşluğunda, vücut sıcaklığında ilaçların kontrollü olarak verilmesi için potansiyel olarak uygun olduğunu bildirmişlerdir (201).

FDA kılavuzu Poloksamer 407 polimerinin preparatlarda (iv, inhalasyon, oral solüsyon, süspansiyon, oftalmik veya topikal formülasyonlar gibi) kullanılabilir 'inaktif' bir içerik olduğunu bildirmiştir (202). Poloksamer 407 solüsyonları, ilaç formülasyonlarının optimizasyonunda önemli rol oynayan termoreversible özellik göstermektedir. ABD'de, www.uspto.gov web sitesinde, Poloksamer 407 ile ilişkili çok sayıda patent tescil edildiği görülmektedir.

Bu çalışmada da Poloxamer 407 polimeri % 20 a/a konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu oranda uygulanan Poloxamer 407 polimeri çalışmamız sırasında, oda sıcaklığında sol, vücut sıcaklığında (37°C'de) jel formuna (termoreversible) dönüşmüştür. % 20 a/a konsantrasyonundaki Poloxamer 407, 37°C'de deformasyona dayanıklı bir haldedir. Yani yüksek elastisiteye sahiptir ve viskoelastik bir özellik göstermesi beklenmektedir.

Nilse ve ark. (1999), soğukla aktive olan lizozim benzeri enzim yapısındaki Chlamysin'in gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, bu enzimin düşük pH'da (4.5-6.2) ve düşük sıcaklıkta (4-35 °C'de) bakterileri inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (203).

Poloksamer 407'nin, protein içeren ilaçlarda stabilizasyonu desteklediği bildirilmiştir (204). Proteinlerin üç boyutlu yapısı Poloksamer 407 varlığında daha başarılı bir şekilde korunabilmektedir (205).

Poloxamer 407 polimeri ile hazırlanan jel sistemine Lizozim ve LF entegre edilerek hazırlanan jel formulasyonları çalışmamızda, ağız mukozasının pH'sının 7.4 olmasına karşın, etken maddelerden Lizozimin enzim yapısında olması ve asidik pH'da daha yüksek etki göstermesi nedeniyle pH 5.0'da hazırlanmıştır.

Poloksamer 407, oftalmik mukoza üzerine inert etki göstermektedir. **Kwon ve ark. (2005)**, Yeni Zelanda beyaz tavşanları üzerinde yaptıkları çalışmada %25 Poloksamer 407 içeren enjekte edilebilir bir lens formulasyonu geliştirmişler, yeni geliştirilmiş formulasyonun konjunktiva, iris, camsı tabaka ve retina tabakalarının hiçbirinde inflamatuvar cevap veya toksisiteye neden olmadığını bildirmişlerdir (206).

Hokett ve ark. (2000), düşük konsantrasyonlarda Poloksamer 188 ve Poloksamer 407'nin insan dişeti fibroblast hücrelerinin yapışma ve büyümesinde artış sağladığını, bu nedenle operasyon sonrası erken yara iyileşmesini hızlandırabileceğini bildirmişlerdir (207).

Yapılan hayvan çalışmalarında yüksek dozlarda Poloksamer 407 uygulamalarının serum trigliserit ve kolesterol seviyelerini artırdığı görülmekle birlikte, bu konuda henüz bir görüş birliğine varılamamıştır. Bu metabolik değişimi aydınlatmak için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu bildirilmiştir (119).

Johnson ve ark. (2001), fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, düşük dozlarda uzun dönem (1 yıl) Poloksamer 407 uygulamalarının hepatik total kolesterol konsantrasyonu ve alanin/aspartat aktivitesi üzerine etkilerini incelemişler, sonuç olarak kontrol grubundaki fareler ile anlamlı bir fark görülmediğini bildirmişlerdir (208).

Abe ve ark. (1990), yüksek dozlarda Poloksamer 407'ye (LD50 farelerde 1.7-5.0 g/kg vücut ağırlığı) maruz kalan fare ve tavşanlarda ciddi renal toksisite gözlendiğini bildirmiştir (209). Ancak, *Pec ve ark. (1992)*, intramuskular ve subkutan Poloksamer 407 enjekte edilmiş insanlarda böbrek fonksiyonlarında ve protein metabolizmasında bir değişiklik görülmediğini rapor etmişlerdir (204).

5.4. Biyoyumluluk test yöntemlerinin tartışılması

5.4.1. HET-CAM yöntemi

Tavuk-embriyo modellemeleri virologlar tarafından uzun süredir embriyotoksisite modelleri olarak kullanılmaktadırlar (158,210). CAM, iki üç hücre kalınlığında epitelden oluşan ektodermal tabaka, bağ dokusu içeren mezodermal tabaka, ara madde ve kan damarları ile bir endodermal tabakadan meydana gelmektedir (211). CAM'in mezodermal tabakasında bulunan kan damarları embriyo-allantoik arter ve venlerin dallarıdır. Bu damarlar dışardan gelen stimulusların ardından gelişen enflamatuvar yanıtı neden olduklarına inanılan eritrosit ve lökositleri barındırmaktadırlar. Protein denatürasyonu (HET-CAM testinde koagülasyon olarak görülmektedir) CAM içindeki epitel hücreleri üzerindeki etkilerin bir belirtisi olarak kabul edilmektedir. Bu etkilerin, göz korneası üzerindeki olumsuz etkiler ile aynı olduğu bildirilmektedir. CAM üzerindeki kan

damarlarında oluşan değişiklikler, genel toksisite ve gözde konjunktival hasarın habercisi olarak kabul edilmektedir (210).

HET-CAM test yönteminde, ergimiş chorion ve bitişik allantois duvarından oluşan vaskülarize fetüs membranı olan CAM kullanılmaktadır. Chorion embriyoyu taşıyan en dış katmandır. Sıklıkla üst seviye vertebralarda ve tavuklarda amnion ve yumurta sıvısını saklamak için bulunur. CAM üç tabakadan oluşmaktadır. Yumurta kabuğu açıldığında ilk görülen tabaka, iki üç hücre kalınlığında olan ektodermal tabakadır. İkinci tabaka; kan damarları, bağ dokusu ve çevre malzemesinden oluşan mezodermal tabakadır. En içerdeki tabaka; skuamoz hücrelerden oluşan endodermal tabakadır (210).

Allantois gelişimi inkübasyonunun yaklaşık 60. saatlerinde, kuyruk sokumunda bir fazlalık olarak görülmeye başlamakta, kuluçkanın 4. veya 5. günlerinde kuyruk sokumundan dışarı doğru itilmektedir (212). Endoderm ve mezodermden meydana gelmektedir. Allantois boyutlarını artırırken, kuluçkanın 4. ve 10. günleri arasında, embriyo etrafından yırtılarak chorion ile kaynaşarak CAM formunu alırlar (212). İki membranın birleşmesi dış ortam ile embriyo arasında serbest gaz geçişine izin verir (213). CAM formasyonundan sonra, kuluçkanın 9. gününe kadar yüzey bölgesinde hızlı bir büyüme görülür (212).

CAM içinde iritasyona oluşan yanıt, embriyonun immün sisteminin gelişmişliği ile sınırlıdır (211). Çalışmalar tavuk embriyosunun az sayıda heterofil (tavuklarda bulunan nötrofil) ve makrofaj içerdiğini göstermiştir. Buna ek olarak; embriyo içinde mevcut olan makrofajlar, memelilerde olduğu gibi hasar görmüş dokularda birikmemektedir. CAM üzerinde görünen lezyonların test malzemesinin uygulandığı alandaki nekrozdan kaynaklandığı bildirilmektedir (210).

HET-CAM yöntemi, hayvan deneylerine bir alternatif olarak geliştirilmiştir. Hızlı, hassas ve ucuz bir yöntemdir. HET-CAM yönteminin dezavantajlarından bir tanesi, test materyalinin iritasyonunun sadece kısa süreli incelenebilmesidir. Tedavi sonrası materyalin

iritasyon etkisinin izlenebilme süresi 5 dakikadır. Bu nedenle geç dönemde görülebilecek komplikasyonlar veya oluşan etkinin geri dönüşümlü olabileceği durumlar bu test yöntemi ile incelenememektedir. Hatalı pozitif yanıt gelişmesi riskini doğuracağından işlem sırasında CAM' e hasar verilmediğinden emin olunmalıdır.

Bu çalışma, 'Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Ocular Toxicity Working Group (OTWG)'un 2010 yılında yayınlanan protokolleri rehber alınarak yapılmıştır (163).

Yayınlanmış çalışmalar incelendiğinde, HET-CAM deneylerinin genellikle her deney grubu için üç yumurta kullanılarak gerçekleştirildiği görülmektedir (168,214,215). Bununla birlikte her deney grubu için dört yumurta (164) ve beş yumurta (216) kullanan çalışmalar da bulunmaktadır. HET-CAM protokolünde her bir deney grubu için minimum üç yumurta üzerinde tekrar önerilmektedir (ICCVAM). Çalışmalar embriyo üzerinde gerçekleştirildiğinden kullanılan yumurta sayısı genellikle kısıtlı tutulmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada da farklı günlerde her deney grubu için üçer ve beşer adet yumurta olacak şekilde iki farklı deney yürütülmüştür.

5.4.2. MTT yöntemi

In vitro biyouyumluluk testlerinin amacı, materyaller vücut dokularının içine veya üzerine uygulandığında bu materyale karşı gelişebilecek biyolojik reaksiyonların taklit edilerek sitotoksitelerinin laboratuvar şartlarında belirlenmesidir (217).

Günümüze kadar, biyomateryallerin sitotoksik özelliklerinin incelenmesi için birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Materyalin bariyer olmadan, direkt hücrelerle temas edebileceği direkt kontakt testleri (218,219), materyal ve hücreler arasında agar tabakası, milipor filtre veya diş dokusu gibi bir bariyerin bulunduğu indirekt kontakt testleri (220), kompozit materyalden salınan bazı maddelerin hücrelerle ekspoz olduğu ekstrakt testleri (221) bu testlerden bazılarıdır.

Kullanılan testleri standardize etmek için önemli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte teknoloji, standart oluşturma işleminden daha hızlı geliştiği için standartların geliştirilmesi zor ve devamlılık isteyen bir süreç haline gelmiştir. Materyallerin test edilmeleri sırasında izlenecek yolları standart hale getirmeye çalışan American Society for Testing and Materials (ASTM), International Organization for Standardisation (ISO), Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Association gibi bazı kuruluşlar bulunmaktadır. Bu çalışmanın sitotoksosite değerlendirme testleri geçerliliği daha fazla kabul görmüş olan ISO'nun 2008 yılında belirlediği standartlara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (23).

Diş hekimliğinin pek çok dalında, özellikle koruyucu diş hekimliğinde, dental materyallerin biyoyumluluk değerlendirmeleri yapılırken hücre kültürü kullanılması giderek önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan *in vitro* sitotoksosite belirleme testlerinde biyoyumluluk, hücre kültürü işlemi yapılarak değerlendirilmektedir (222–224).

In vitro koşullarda çalışmanın, deneye etki eden faktörleri daha kolay kontrol edebilme gibi büyük bir avantajı bulunmaktadır. Bu yöntemler basit, tekrarlanabilir, verimli ve diş hekimliğinde kullanılan materyallerin değerlendirilmesi için uygundur (224).

In vitro çalışmalarla materyallerin biyoyumluluğu belirlenirken kullanılan test yöntemlerinin yanı sıra, üzerinde materyalin etkisinin inceleneceği hücre tipi de önem taşımaktadır. Literatürde dental materyallerin sitotoksitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda fare fibroblast hücreleri (L 929), pulpa fibroblastları, 3T3, gingival fibroblastlar, sığır dental papillasından elde edilen immortalize hücreleri ve fareden elde edilen odontoblast benzeri hücrelerin (MDPC-23) kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (225–227) *In vitro* şartlarda gerçekleştirilen çalışmamızda kullandığımız L 929 hücreleri, ISO standartları (ISO) tarafından Balb/3T3 ve WI38 gibi hücre tipleriyle birlikte kullanılması önerilen hücrelerden birisidir. L 929 hücre tipleri homojen morfolojileri ve büyüme karakterleri nedeniyle *in vitro* sitotoksosite görüntülenmesinde, tekrarlama imkanı

vermektedirler. Ayrıca, kolay bulunabilmeleri ve *in vitro* hücre kültürü koşullarında güçlü üreme karakterleriyle de sıklıkla tercih edilen hücrelerdir (21).

Diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin çeşitli özelliklerinin araştırılmasında farklı yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen bulguların değerlendirilmesi ve birbiri ile karşılaştırılmasında problemler ortaya çıkmaktadır. Dental malzemelerin özelliklerinin incelendiği özel raporlar hazırlanması bu zorlukların büyük oranda ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bu nedenle bu çalışmanın sitotoksosite değerlendirme bölümünde, ISO tarafından 7405 no'lu protokolün 'Diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyallerin biyouyumluluk değerlendirme yöntemleri' bölümü rehber alınmıştır (23).

Kimyasal toksisitenin belirlenmesinde hayvan deneylerinin kullanımı, bir ya da birkaç deneğe pek çok işlemin bir arada uygulanmasını gerektirmektedir. Ancak bu testler biyolojik etkileşimler nedeni ile anlamlı sonuçlar vermemektedir. Hayvan deneklerin kullanımı, işlem sayısının azaltılabildiği durumlarda yararlı olmaktadır. Son yıllarda bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımı toplumlar tarafından sorgulanmaktadır. Aynı şekilde bu aşamada insan deneklerin kullanımı da belirgin etik sorunları beraberinde getirmektedir. Bu nedenlerle sitotoksitenin belirlenmesinde hücre kültür test yöntemlerinin kullanılması öncelik kazanmıştır (217).

Bu çalışmada, L 929 hücre serisi kullanılarak bu problemlerle karşılaşma olasılığı elimine edilmeye çalışılmıştır. Test edilecek materyallerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin hücre canlılıklarıyla değerlendirildiği çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Canlı kalan hücrelerin sayılması, proliferasyon oranlarının hesaplanması, hücresel makromoleküllerin sentezi veya enzim aktivitesinin belirlenmesi bu yöntemlerden bazılarıdır (228).

Tam bir risk değerlendirilmesi yapılabilmesi için, *in vitro* test modeli klinik koşulları mümkün olabildiği kadarıyla taklit edebilmelidir. İlk olarak, komponentlerin hücreler üzerindeki etkileri doza bağlı olarak incelenebilmeli ve *in vivo* şartlardaki olası

sitotoksik potansiyelleri tahmin edilebilmelidir. Sıklıkla kullanılan sitotoksisite testlerinde, hücre canlılığı en önemli değerlendirme kriteri olarak görülmektedir. Yapılmış çalışmaların büyük kısmında sitotoksisite, süksinik dehidrogenaz (SDH) isimli mitokondriyal enzimin aktivitesinin genellikle MTT testi kullanılarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir (229,230).

Bean ve ark. (1995), aynı anda çok sayıda örneğin test edilebilmesi, hücre içi biyokimyasal değişiklikleri göstermesi ve tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılması nedeniyle sitotoksisite testlerinde MTT testinin tercih edilen yöntem olması gerektiğini vurgulamışlardır (231).

Hücre canlılığını belirlemeye yönelik MTT kolorimetrik testinin aynı anda çok sayıda örneğin değerlendirilmesine olanak tanıyan iyi bir ayırıcı yöntemi olduğu bildirilmiştir (232). MTT test yöntemi, dental malzemelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir (23). Bu nedenle sitotoksisitenin değerlendirilmesinde bu çalışmada MTT yönteminin kullanılması tercih edilmiştir.

5.5. İritasyon Deneyi Bulgularının Tartışılması

Bu çalışmada yeni geliştirilmiş yedi farklı deney grubu ve kontrol grubu olarak değerlendirilen %0.2'lik klorheksidin glukonat gargaranın mukoza üzerindeki iritan etkileri HET-CAM test yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu deney iki aşamalı yürütülmüş, ancak iki deney arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Örnek sayısı her bir grup için 3 yumurta olan deneyde, Grup 1 (Sorensen's Çözeltisi pH:5.0), Grup 2 (%20 Pluronic® F-127), Grup 4 (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+%20 Pluronic® F-127) , Grup 6 (%0.2 klorheksidin glukonat), Grup 8 (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+ Sorensen's Çözeltisi pH: 5.0) orta dereceli iritasyon gösterirken, diğer gruplar mukoza üzerine zayıf iritasyon göstermiştir. Örnek sayısı her bir grup için 5 yumurta olan deneyde ise Grup 4 (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+%20 Pluronic® F-127) ve Grup 8 (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+ Sorensen's Çözeltisi pH: 5.0) orta dereceli iritasyon göstermiş, diğer gruplar mukoza üzerine zayıf iritan bulunmuştur. **Her iki deneyde de deney grupların hiç**

birinin iritasyon skoru 9'dan yüksek bulunmamış, yani mukoza üzerine ciddi derecede iritasyon gözlenmemiştir (Tablo 9).

Gruplar içinde pH değerleri daha yüksek olan Grup 7 (Sorensen's Çözeltisi pH:7.0) her iki deneyde de daha düşük iritasyon skorları göstermiştir. Ağız mukozasının pH'sının 7.4 olmasına karşın, etken maddelerden Lizozimin enzim yapısında olması ve asidik pH'da daha yüksek etki göstermesi nedeniyle çalışmada kullanılan formülasyonlar pH 5.0'da hazırlanmıştır. Bu durumun da mukoza üzerinde oluşan iritasyon seviyesini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Her iki deney için de koagülasyona sadece birkaç grupta çok nadir şekilde rastlanmıştır. Şiddetli koagülasyon deneyin pozitif kontrol grubu olan SDS ve NaOH'da gözlenmiştir. En sık rastlanan bulgular daha hafif iritasyon durumunda gözlenen lizis ve kanama olarak kaydedilmiştir.

Hagino ve ark. (1999), HET-CAM test yöntemini kullanarak %20, %2 ve %0.2'lik Klorheksidin glukonatu da içecek şekilde kozmetik sanayinde kullanılan 39 farklı kimyasalın iritasyon düzeyini incelemişler, aynı zamanda bu çalışmayı beş farklı laboratuvar da yürüterek çalışmanın güvenilirliğini de değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda beş farklı laboratuvar sonucu gözönüne alındığında, %20 ve %2'lik klorheksidin bileşiklerinin iritasyon skorları 13.55 ± 4.32 ve 13.85 ± 3.85 bulunurken, %0.2'lik klorheksidin içeren grubun iritasyon skoru 4.70 ± 3.73 bulunmuş, laboratuvarlar arası güvenilirlik değerlendirildiğinde, en güvenilir grubun %0.02'lik klorheksidin içeren grup olduğu saptanmıştır (233).

Hao ve ark. (2014), oftalmik bölgede kullanılmak üzere geliştirilmiş yeni bir formülasyon geliştirmişler, taşıyıcı sistemlerden biri olarak da %25'lik Poloksamer 407 polimerini seçmişlerdir. Geliştirilmiş formülasyonun biyouyumluluğunu HET-CAM yöntemi ve hayvan deneyi ile değerlendirmişler, deneylerin hiç birinde iritasyona rastlamamışlardır (164).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonlar üzerinde HET-CAM testinin uygulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.6. Sitotoksisite Deneyi Bulgularının Tartışılması

Bu çalışmada yeni geliştirilmiş yedi farklı deney grubu ve kontrol grubu olarak değerlendirilen Klorheksidin glukonat gargaranın L 929 hücre kültürü üzerine etkileri MTT test yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Güvenilirlik açısından deney üç tekrar şeklinde yapılmış ve sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur. 1, 2 ve 3. günler değerlendirildiğinde, her üç gün ve tüm deney tekrarlarında, Grup 7'nin (Sorensen's Çözeltisi pH:7.0) hücrelerin canlılığı üzerinde herhangi bir risk oluşturmadığı, aksine bu grupta deneyin negatif kontrol grubundan daha fazla hücre proliferasyonuna rastlandığı saptanmıştır. pH değerinin yüksek olmasının hücre proliferasyonunu desteklediği düşünülmektedir.

1,2 ve 3. günler değerlendirildiğinde, her üç gün ve tüm deney tekrarlarında, Grup 6'nın (% 0.2 klorheksidin glukonat) L 929 hücreleri üzerine en yüksek sitotoksik özellikleri gösteren grup olduğu saptanmıştır. Grup 6'nın sitotoksisite değeri, ISO standartları göz önüne alınarak hesaplandığında (0-4 arası değerlerde) hücrelerin %25'inden azı canlı kalabildiği için en yüksek değer olan 4 olarak belirlenmiştir (23).

Giannelli ve ark. (2007), Flemingson ve ark. (2008), Ghabanchi ve ark. (2012), Lee ve ark. (2010) farklı hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda klorheksidinin doz ve temas süresine bağlı olarak artan seviyelerde sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (99–102).

Bu çalışmanın deney grupları olan Grup 1 (Sorensen's Çözeltisi pH:5.0), Grup 2 (%20 Pluronic® F-127), Grup 4 (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+%20 Pluronic® F-127), Grup 5 (1 mg/ml Lizozim+ 0.5mg/ml Laktoferrin+%10 Pluronic® F-127) ve Grup 8'in (2 mg/ml Lizozim+ 1mg/ml Laktoferrin+ Sorensen's Çözeltisi pH: 5.0) sitotoksisite

değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu grupların hepsinde hücre canlılığı %25-50 arasında olduğu için sitotoksosite değerleri ISO standartlarına göre 3 olarak belirlenmiştir. Bu durumun formülasyonların pH değerlerine ve Poloksamer içeriğine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir.

Poloksamer 407 vücut sıcaklığında (37°C) yarı katı-jel halini alarak hücre kültürü üzerine örtücü özellik göstermektedir. Bu durum ise sitotoksosite testlerinde Poloksamer polimerlerinin hatalı pozitif yanıt geliştirmesine neden olmaktadır. Bu sorunu aşabilmek için Poloksamer yapısı modifiye edilebilmekte, bileşikler farklı formlarda uygulanabilmektedir (234).

Gariepy ve Leroux (2004) ve *Escobar ve ark. (2006)*, yaptıkları çalışmalarda sıvı halde vücuda enjekte edilen Pluronic® F-127'nin akut veya kronik herhangi bir toksik belirti vermeden enjekte edildiği alanda jel haline dönüşeceğini bildirmişlerdir (235,236). Pluronic® F-127'nin insan vücuduna enjekte edilebilir bir materyal olduğu FDA tarafından da kanıtlanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, tüm deney gruplarının L 929 hücre kültürü üzerine % 0.2'lik klorheksidin glukonat gargaradan daha az sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte, formülasyonların uzun dönem kullanımının değerlendirilmesi açısından hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

- 1) Mukozal iritasyon deneyinde kullanılan HET-CAM yöntemi iki farklı zamanda ve farklı yumurta sayıları üzerinde yürütülmüş, bulgular değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.
- 2) HET-CAM deneyi bulgularına göre, kontrol grubu olarak kullanılan klorheksidin ve deney gruplarından hiç biri mukoza üzerinde şiddetli iritasyona neden olmamıştır. CAM yüzeyinde sadece hafif ve orta şiddette iritasyon gözlenmiştir.
- 3) MTT yöntemi kullanılarak L 929 hücre kültürü üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite deneyinde hücre canlılık oranları en düşük olan grubun %0.2'lik klorheksidin glukonat grubu olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0.0001).
- 4) Sitotoksisitesi değerlendirilen gruplardan pH değeri 7.0 olan Sorensen's Çözeltilisi'nin hücrelerin canlılığının korunduğu ve devamlılığının sağlanabildiği biyoyoumlu bir formül olduğu saptanmıştır.
- 5) MTT testinde, Poloksamer 407 içeren formulasyonların, bu polimerin hücre kültürü üzerindeki örtücü özelliğine bağlı olarak hücrelerin yarısından fazlasının ölmesine neden olduğu görülmüştür.
- 6) Lizozim ve Laktoferrinin varlığı diğer gruplar ile karşılaştırıldığında mukozal iritasyon ve sitotoksisite değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır (p=0.998).

- 7) Lizozim ve Laktoferrin içeren, taşıyıcı sistem olarak Poloksamer 407'nin kullanıldığı antibakteriyel etkisi kanıtlanmış formülasyonların biyouyumlulukları genel olarak incelendiğinde diş hekimliğinde antimikrobiyal/antiplak ajan olarak klinikte etkin şekilde kullanılabilceği ve yeni bir formülasyon olarak ilaç piyasasında yer alabileceği düşünölmüştür.
- 8) Çalışmada kullanılan formülasyonlarda yer alan maddelerin daha uzun süreli etkilerinin belirlenmesi için, bunu izleyen çalışmalarda bu maddelerin stabilitesi ve etkinliğinin kinetik olarak değeriendirilmesi, ayrıca, biyouyumluluk çalışmalarının bir sonraki basamağı olan hayvan deneylerinin de yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Mısırlıgil A. Mikrop florası ve oral mikrofloralar. In: T. C, editor. Tıp ve dişhekimliği genel ve özel mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitapevi, pp 137–46, 2004.
2. Samaranayake LP. Essential microbiology for dentistry. Churchill Livingstone, 2002.
3. Nolte AW. Oral microflora. In: Nolte AW., editor. Oral Microbiol. with basic Microbiol. Immunol. ABD, Mosby Company, pp 193–222, 1982.
4. Kaya S. Tükürük bezi hastalıkları. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 1997.
5. Mortazvi SA. An *in vitro* assesment of mucus/mucoadhesive interactions. Int J Pharm. 124: 173–82, 1995.
6. İkinci G Şumnu M, Şenel S. Oral kaviteye uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler. Hact. Üniv. Ecz. Fak. Derg. 21: 99–115, 2001.
7. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 54: 49–79, 2000.
8. Donlan MR, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 15: 167–93, 2002.
9. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 9: 34–9, 2001.
10. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: A general review. Haematologica. 80: 252–67, 1995.
11. Ward PP, Paz E, Conneely OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. Cell Mol Life Sci. 62: 2540–8, 2005.
12. Steijns, J.M, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. Br J Nutr. 84: 11–7, 2000.
13. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. Community Dent Oral Epidemiol. 32: 319–21, 2004.

14. Tüzüner E. Çocuklarda Fluoridli sütün biyoyararlanımı ve remineralizasyona etkisi. Gazi Üniversitesi, 2008.
15. Goswami M, Saha S, Chaitra TR. Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. Jour Ind Soc Pedod. Prev Dent. 30(1): 2–5, 2012.
16. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion *in vitro*. Biomed Mater. 2009.
17. Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface. The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. J Am Dent Assoc. 139: 25–34, 2008.
18. Tonguç K. Lizozim ve laktoferrin içeren yeni formülasyonların geliştirilmesi ve mutans streptokokları ile laktobasiller üzerindeki antibakteriyel etkilerinin *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi. Yeditepe Üni, 2012.
19. Wataha J, Hanks C. Biocompatibility testing- what can we anticipate? Trans Acad Dent Mater. 109–20, 1997.
20. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. Toxicol In Vitro. 19: 145–54, 2005.
21. 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. J Appl Toxicol. 25: 101–8, 2005.
22. Huang FM, Tai KW, Chou, MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. Int Endod J. 35 (2): 153–8, 2002.
23. ISO 7405. Dentistry- Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. 2008.
24. Ellis H. Anatomy of the salivary glands. Surg. (United Kingdom). 30(11): 569–72, 2012.
25. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, Zwierz K. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part II. Defense mechanisms. Wiad. Lek. 60(5-6): 253–7, 2007.
26. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br. Dent. J. 172(8): 305–12, 1992.

27. Jenkins GN. Theories on the mode of action of fluoride in reducing dental decay. *J Dent Res.* 2: 444–52, 1963.
28. Özer F. Sindirim Fizyolojisi. Ankara, Ankara Üniversitesi Basım Evi, pp 17–27, 1981.
29. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta.* 383: 30–40, 2007.
30. Amerongen NAV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 38(3): 247–53, 2004.
31. Amerongen NAV, Veerman FC. Saliva the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 8: 12–22, 2002.
32. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 85: 162–9, 2001.
33. Pedersen AM. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* 8: 117–29, 2002.
34. User DA. Ağızda Sindirimin Kimyasal Safhalarının Araştırılması ve İncelenmesi E.Ü. Diş Hekimliği Fak. Fizyoloji Bölümü Yan Dal Çalışması Semineri.
35. Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent.* 88: 337–43, 2002.
36. Suddick R, Hyde R, Reller R. Salivary water and electrolytes and oral health. *Biologic Basis Dent. Caries.* Hagerstown, Harper and Row, pp 132–43, 1980.
37. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 29: 189–94, 2002.
38. Jowman RA, Schaefer SJ, Fitzgerald RJ. Specificity of utilization of human salivary proteins for growth by oral streptococci. *Caries Res.* 13: 181–9, 1979.
39. Karaoğlanoğlu S. Tükürüğün çeşitli biyokimyasal ve mikrobiyolojik parametrelerinin yaş, cinsiyet, DMFT ve DMFS indeksi ile ilişkisinin incelenmesi. Erzurum Atatürk Üni, 2002.
40. Connely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr* 20(5): 389–95, 2001.

41. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40: 395–405, 2003.
42. Wally J, Buchanan SK. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *BioMetals.* 18(76-83): 2007.
43. Ila, AO, Brock JH. Lactoferrin: Antimicrobial and diagnostic properties. *Biotechnol Apl.* 18: 76–83, 2001.
44. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Dairy J.* 16: 1241–51, 2006.
45. Naot D, Chhana A, Matthews BG, Callon KE, Tong PC, Lin JM, Costa JL, Watson M, Grey AB, Cornish J Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in osteoblasts. *Bone.* 49: 217–24, 2011.
46. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol.* 80: 1–6, 2002.
47. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/GRN000464.pdf.
48. Yamauchi, K, Toida T, Nishimura S, Nagano E, Kusuoka O, Teraguchi S. et al. 2000b. week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem Toxicol.* 38: 503–12, 2000.
49. Benkerroum N. Antimicrobial Activity of Lysozyme With Special Relevance to Milk. *African J. Biotechnol.* 7: 4856–67, 2008.
50. Vasavada P ve Cousin M. *Dairy Science and Technology. Handbook.* 9th ed. John Wiley & Sons,.
51. Séverin S, Wenshui X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45(7-8): 645–56, 2007.
52. Meyer AS, Suhr KI, Nielsen P, Holm F. Naturel Food Preservatives”. In: In Ohlsson, T. And Bengtsson N, editor. *Minimal Process. Technol. Food Ind.* Boca Raton, CRC Press, 2002.
53. Davidson PM, Juneja VK, Branen JK, ‘Antimicrobial Agents’ In: Branen AL, Davidson, P. M., Salminen, S. And Thorngate III JH, editors. *Food Addit.* 2th ed. 2002.
54. Losso JN, Nakai S, Charter EA. *Lysozyme. Nat. Food Antimicrob. Syst.* Boca Raton, CRC Press, 2000.

55. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn0064.pdf.
56. Peterson SN, Snesrud E, Liu J, Ong AC, Kilian M, Schork NJ, Bretz W. The Dental Plaque Microbiome in Health and Disease. *PLoS One*. 8, 2013.
57. Warren JJ, Levy SM. Systemic fluoride: sources, amounts and effect of ingestion. *Dent Clin North Am*. 43: 695–711, 1999.
58. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 27: 31–40, 1999.
59. Hamilton IR, Bowden GHW. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*. 69(S): 660–7, 1990.
60. Tatevossian A. Fluoride in dental plaque and its effects. *Dent. Res*. 69: 645–52, 1990.
61. Dawes C, Veatherell JA. Kinetics of fluoride in the oral fluids. *J Dent Res*. 69: 638–44, 1990.
62. Yotis WW, Brennan PC. Binding of fluoride by oral bacteria. *Car Res*. 17: 444–54, 1983.
63. Külekçi G. Ağız mikroorganizmaları üzerine florürün etkisi. *İÜ Diş Hek Fak Derg*. 34: 1–6, 2000.
64. Hamilton IR, Bowden GHW. Fluoride effects on oral bacteria. In: Fejerskov O; Ekstrand J BB, editor. *Fluoride In Dent*. 2th ed. Munksgard, Copenhagen, pp 230–51, 1996.
65. Ulukapı I, Külekçi G , Akıncı T, Demirel K. APF jeli uygulamasının plak oluşumu ve plak mikroorganizmaları üzerine etkisi. *İÜ Diş Hek Fak Der*. 28: 49–52, 1994.
66. Skartveit L, Selvig KA, Myklebust S, Tveit B. Effect of TiF₄ solutions on bacterial growth *in vitro* and on tooth surfaces. *Acta Odontol Scand*. 48: 169–74, 1990.
67. Mellberg JR, Ripa LW, Leske GS. *Fluoride in Preventive Dentistry-theory and Clinical Applications*. Chicago, Berlin, Rio de Janeiro and Tokyo. Quintessence Publishing Co. Inc., pp 123–45, 1983.
68. Whitford GM. Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res*. 71: 1249–54, 1992.

69. Varner JA. Chronic administration of aluminium fluoride and NaF to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res.* 784: 284–98, 1998.
70. Du L. The effect of fluorine on the developing human brain. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 21(4), 218–20, 1992.
71. Olgar Ş, Kuybulu AE, Karademir S, Sipahi T, Örmeci AR, Köşker ME. Çocukluk çağında kronik florozisin kardiyak etkileri. *Çocuk Derg.* 8: 204, 2008.
72. Krayner JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 54: 13–33, 2010.
73. Oyanagi T, Tagami J, Matin K. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. *Braz Oral Res.* 23: 39–48, 2009.
74. Oyanagi T, Tagami J, Matin K. Potentials of mouthwashes in disinfecting cariogenic bacteria and biofilms leading to inhibition of caries. *Open Dent J.* 6: 23–30, 2012.
75. Park JB, Lee G, Yun BG, Kim CH, Ko Y. Comparative effects of chlorhexidine and essential oils containing mouth rinse on stem cells cultured on a titanium surface. *Mol Med Rep.* 2014.
76. Chen F, Rice KC, Liu XM, Reinhardt RA, Bayles KW, Wang D. Triclosan-loaded tooth-binding micelles for prevention and treatment of dental biofilm. *Pharm Res.* 27: 2314–64, 2010.
77. FDA Triclosan: What Consumers Should Know. [Internet]. Washington, DC: U.S., 2010. Available from: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm205999.htm>
78. Cao C, Sha Y, and Meng H. A four-day study to evaluate the anti-plaque efficacy of an experimental triclosan-containing dentifrice. *J. Clin. Dent.* 12, 87–91, 2001.
79. Barbolt T. Chemistry and safety of triclosan, and its use as an antimicrobial coating on Coated VICRYL* Plus Antibacterial Suture (coated polyglactin 910 suture with triclosan). *Surg Infect (Larchmt).* 3, 2002.
80. Hoang T, Jorgensen MG, Keim RG, Pattison AM, Slots J. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodont Res.* 38: 311–7, 2003.

81. Von Ohle C, Weiger R, Decker E, Schlagenhauf U, Brex M. The efficacy of a single pocket irrigation on subgingival microbial vitality. *Clin Oral Investig.* 2(2) Von Ohle C, Weiger R, Decker E, Schlagenhauf U, Brex M. 84–90, 1998.
82. Young DA, Fontana M, Wolff MS. Current concepts in cariology. *Dent Clin North Am.* 54(3): 423–40, 2010.
83. Majeti NV, Rami Kumar. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 46(1): 1–27, 2000.
84. İkinci G, Şenel S, Akıncıbay H, Kaş S, Ercis S, Wilson C. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm.* 235(1-2): 121–7, 2002.
85. Şenel S, İkinci G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm.* 193(2): 197–203, 2000.
86. Ataç M.S, Şenel S, Eren A, Kustimur S, Güngör N. Application of chitosan films in sulcoplasty operations. *Adv. Chitin Sci.* 8: 270–4, 2005.
87. Hu B, Ting Y, Zeng X. Cellular uptake and cytotoxicity of chitosan–caseinophosphopeptides nanocomplexes loaded with epigallocatechin gallate. *Carbohydr. Polym.* 89(2), 362–70, 2012.
88. Loh JW, Saunders M, Lim LY. Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 262(3): 372–82, 2012.
89. Denton G. Chlorhexidine. In: SS Block, editor. “Disinfection, Steriliz. Preserv. 4. ed. Philadelphia, Le and Febiger, pp 274–89, 1991.
90. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: An *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol.* 30: 307–14, 2003.
91. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 18: 294–8, 2004.
92. Weller PJ. Chlorhexidine. In: AH. K, editor. “handb. pharmaceutical excipients.” 3th ed. Washington, DC: U.S., Pharmaceutical Press, pp 121–5, 2000.
93. Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry Vol 2.* 5th ed. 2008.

94. Turgut S, Bagis B, Ayaz EA, Ulusoy KU, Altintas SH, Korkmaz FM, Bagis N. Discoloration of provisional restorations after oral rinses. *Int J Med Sci.* 10(11): 1503–9, 2013.
95. Nordbo H, Eriksen HM, Rolla G, Attramadal A, Solheim N. Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine: preliminary report. *Scand J Dent Res.* 90: 117–23, 1982.
96. Addy M, Moran J, Griffiths AA, Wills-Wood NJ. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine I: Surface protein denaturation or dietary precipitation. *Br Dent J.* 159: 281–185, 1985.
97. Massano G, Ciocatto E, Rosabianca C, Vercelli D, Actis GC, Verme G. Striking aminotransferase rise after chlorhexidine self poisoning. *Lancet.* 1: 289, 1982.
98. Evans RJ. Acute anaphylaxis due to topikal chlorhexidine acetate. *Br Med.* 304: 686, 1992.
99. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorheksidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol. Vitr.* 22: 308–17, 2008.
100. Flemingson Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an *in vitro* study. *Indian J. Dent. Res.* 19(1): 29–35, 2008.
101. Ghabanchi J, Moattari A, Tadbir AA, Mardani M, Shakib M. Effect of Three Commercial Mouth Rinses on Epithelial Cells: an *in Vitro* Study. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 6(7): 318–20, 2012.
102. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int. Endod. J.* 43: 430-435, 2010.
103. Juliano R.L. *Controlled Drug Delivery.* 2th. ed. Robinson J.R. LVHL, editor. New York, Marcel Dekker Inc, pp 555–81, 1986.
104. Ranade VV, Cannon JB. *Drug Delivery Systems.* 3th ed. New York, CRC Press, pp 169–74, 2011.
105. Çelik Y. Nikotin ve Sinir Sistemi, Sigarayı Bırakmaya Yönelik İlaç Uygulamaları. *Türkiye Klin J Neurol-Special Top.* 3(1): 179–84, 2013.

106. Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol.* 2000. 10(1): 139–59, 1996.
107. Peppas NA, Sahlin JJ. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials.* 17: 1553–61, 1996.
108. Smart DJ. Drug delivery using buccal-adhesive systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 11: 253–70, 1993.
109. Giunchedi P, Juliano C, Gavini E, Cossu M., Sorrenti M. Formulation and *in vivo* evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug loaded chitosan microspheres. *Eur J Pharm Biopharm.* 53: 233–9, 2002.
110. Coessens P, Herrebout F, DeBoever JA, Voorspoels J, Remon JP. Plaque inhibiting effect of bioadhesive mucosal tablets containing chlorhexidine in a 4 day plaque regrowth model. *Clin Oral Invest.* 6: 217–22, 2002.
111. Medlicott NJ, Holborow DW, Rathbone MJ, Jones DS, Tucker IG. Local delivery of chlorhexidine using a tooth-bonded delivery system. *J Cont Rel.* 61: 337–43, 1999.
112. Medlicott NJ, Holborow DW, Rathbone MJ, Jones DS, Tucker IG. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. *J Control Release.* 140(1): 2–11, 2009.
113. Schmolka IR. Artificial skin 1. Preparation and properties of Pluronic F 127® gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* 6: 571–82, 1972.
114. Miyazaki S, Takeuchi S, Yokouchi CMT. Pluronic F-127® gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. *Chem Pharm Bull.* 32:4205–8, 2002.
115. Johnston TP, Miller SC. Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix. *J Parent Sci. Technol.* 43: 279–86, 1989.
116. van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, Geertsema-Doornbusch GI, Busscher HJ. Surface thermodynamic homeostasis of salivary conditioning films through polar-apolar layering. *Clin Oral Invest.* 16(1): 109–15, 2012.
117. Zhang L, Parsons DL, Navarre C, Kompella UB. Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J. Control. Release.* 85: 73–81, 2002.
118. Johnston TP, Miller SC. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J Parent Sci Technol.* 39: 83–8, 1985.

119. Blonder JM, Baird L, Fulfs JC, Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *Life Sci.* 65: 261–6, 1999.
120. Ricci EJ, Lunardi LO, Nanclares DMA, Marchetti JM. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.* 288: 235–44, 2005.
121. Yamamoto M, Okabe K, Kubo J, Naruchi T, Ikura H, Suzuki Y, Nagai. The bioadhesive and residence properties and drug penetration effect of powder preparations for the oral cavity containing hydroxypropyl cellulose. *STP Pharma.* 5: 878–85, 1989.
122. Toumba KJ, Curzon MEJ. A clinical trial of a slow-releasing fluoride device in children. *Caries Res.* 39: 195–200, 2005.
123. Flatt CC, Warren-Morris D, Turner SD, Chan JT. Effects of a stannous fluoride-impregnated dental floss on *in vivo* salivary fluoride levels. *J Dent Hyg.* 82(2): 19, 2008.
124. Harary D, Friedman M. Enhancement of fluoride concentration in saliva after topical application of fluoride sustained release dosage form on orthodontic plates. *J Pharm Sci.* 73: 135–6, 1984.
125. Terzi ÜT, Kansu G. Diş Hekimliği ve Biyouyumluluk. *Dicle Dişhekimliği Derg.* 11(1): 66, 2010.
126. Wataha JC. Biocompatibility of Dental Materials. KJ. A, editor. Missouri, Elsevier Science, pp 171–202, 2003.
127. Kenneth RSJ. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am.* 51: 747–61, 2007.
128. Schmalz G, Bindsvlev DA. Biocompatibility of Dental Materials. 1th ed. Berlin, Springer, pp 13–40, 2009.
129. Powers JM, Sakaguchi RL. Craig's restorative dental materials. 12. ed. Mosby Elsevier, editor. St. Louis, pp 97–125, 2006.
130. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 86 (2): 203–9, 2001.
131. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Haboken, John Wiley & Sons, pp 1–216, 2005.

132. Candan Ç, Bilgiç A. Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model. *İnfeksiyon Derg.* (Turkish J. Infect. 20(3): 231–41, 2006.
133. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*. Tatowa, Humana Press, pp 1–12, 2005.
134. ATCC. American Type Culture Collection [Internet]. [cited 2014 Feb 12]. Available from: <http://www.atcc.org>
135. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 12: 258–266, 2007.
136. Nicholson JW. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. R Soc Chem. 186–95, 2002.
137. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Clin Mater*. 16: 21–60, 1994.
138. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 2009.
139. Wennberg A, Hasselgren G, Tronslad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore filters. *J Biomed Mater Res*. 13: 109–20, 1979.
140. Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. Versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res*. 53(6): 1503, 1974.
141. Ülker HA, Ülker M, Özcan E. Kendinden bağlanabilen yeni bir akışkan kompozitin sitotoksitesinin dentin bariyer testi ile değerlendirilmesi. *Acta Odontol Turc*. 30(3): 140–4, 2013.
142. Dos Santos RL, Pithon MM, Carvalho FG, Ramos AA, Romanos MTV. Mechanical and Biological Properties of Acrylic Resins Manipulated and Polished by Different Methods *Braz Dent J*. 24(5): 492–7, 2013.
143. Frese C, Wolff D, Zingler S, Krueger T, Stucke K, Lux Cj, Staehle HJ, Erbe R. Cytotoxicity of coated and uncoated fibre-reinforced composites. *Acta Odontol Scand Early Onli*, 1–10, 2013.
144. Mc Gahan AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Gren DR. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods cell Biol. cell death*. Academic Press, pp 150–81, 1995.

145. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosogeat B. *In vitro* biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. 2014.
146. Hashemipour MA, Mosavi SAA, Honarmand HM, Azizi M, Aghasi H. Comparison of antimicrobial and cytotoxicity of IRsha, Oral B, Biothene, Povidone Iodine, Benzidamine and camomile mouthwashes with control groups *in vitro*. J Dent Shiraz Univ Med Sci. Supplement: 456–64, 2012.
147. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. pp 514–9, 2009.
148. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. Turkiye Klin. J Med Sci Med Sci. 22(4): 442–8, 2002.
149. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L.. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. Biomaterials. 26: 5130–7, 2005.
150. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA modulates glutathionetransferase P1 activity in gingival fibroblasts. J Dent Res. 83: 914–9, 2004.
151. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. *In Vitro* Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol. Toxicol Lett. 114, 143–53, 2000.
152. Frankild S, Volund A, Wahlberg JE, Andersen KE. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. Acta Derm Venereol. 80: 256–62, 2000.
153. Kopaladze RA. The experiments with laboratory animals from a bioethical point of view- history, modern time, perspectives. Usp Fiziol Nauk. 35: 95–109, 2004.
154. Guide for the care and use of laboratory animals. Natl Acad Sci, 2003.
155. Dikmen S, Petek M, Oğan M, Onbaşılar E. Laboratuvar hayvanları yetiştirme ve sağlığı. Anadolu Üniv Eskişehir. 2013.
156. Uysal T, Ustdal A, Sonmez MF, Ozturk F. Stimulation of bone formation by dietary boron in an orthopedically expanded suture in rabbits. Angle Orthod. 79: 984–90, 2009.
157. CAMVA. Canadian Council on Animal Care. 2008. Available from: <http://www.iivs.org/pages/methods/CAMVAsummarysheet.pdf>

158. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol.* 23 (2): 287–91, 1985.
159. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257 (5067): 201-206, 1992.
160. Leng T1, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina.* 24 (3): 427–34, 2004.
161. Cardoso CD, Bunato PS. Enantioselective metabolism of hydroxychloroquine employing rats and mice hepatic microsomes *Brazilian J. Pharm Sci.* 45(4), 2009.
162. http://www.poultryhub.org/wp-content/uploads/2012/07/chick_embryo_development1.jpg.
163. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test. Chorioallantoic Membr Test Method, 2010.
164. Hao J, Wang X, Bi Y, Teng Y, Wang J, Li F, Li Q, Zhang J, Guo F, Liu J. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 114: 111–20, 2014.
165. Dahl JE. Irritation of dental adhesive agents evaluated by the HET-CAM test. *Toxicol Vitr.* 13: 259–64, 1999.
166. Ardlin BI, Dahl JE, Tibballs JE. Static immersion and irritation tests of dental metal-ceramic alloys. *Eur J Oral Sci.* 113: 83–9, 2005.
167. Dahl JE, Polyzois MJF, Polyzois GL. *In vitro* biocompatibility of denture relining materials. *Gorodontology.* 23: 17–22, 2006.
168. Dahl JE. Potential of dental adhesives to induce mucosal irritation evaluated by the HET-CAM method. *Acta Odont Scand.* 65: 275–83, 2007.
169. Hjortsjö C, Saxegaard E, Young A DJ. *In vivo* and *in vitro* irrigation testing of low concentrations of hydrofluoric acid. *Acta Odont Scand.* 67, 360–5, 2009.
170. Hjortsjö C, Saxegaard E, Young A, Dahl JE. Irritation and cytotoxic potential of denture adhesives. *Gerodontology.* 22: 177–83, 2005.

171. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. *In vitro* antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. J Periodontol. 68(8): 729–33, 1997.
172. Ciancio SG. Use of mouthrinses for professional indications. J Periodontol. 15(8): 520–3, 1988.
173. Overholser CD. Longitudinal clinical studies with antimicrobial mouthrinses. J Clin Periodontol. 15(8): 517–9, 1988.
174. Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE, Niehaus C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. J Clin Periodontol. 17(8): 575–9, 1990.
175. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J. Dent. Res. 71(7): 1431–8, 1992.
176. Walker CB. Microbiological effects of mouthrinses containing antimicrobials. J Clin Periodontol. 15(8): 499–505, 1988.
177. Levy SM, Maurice TJ, Jakobsen JR. Feeding patterns, water sources and fluoride exposures of infants and 1-year-olds. J Am Dent Assoc. 124(4): 65–9, 1993.
178. Pienihäkkinen K, Söderling E, Ostela I, Leskelä I, Tenovuo J. Comparison of the efficacy of 40% chlorhexidine varnish and 1% chlorhexidine-fluoride gel in decreasing the level of salivary mutans streptococci. Caries Res. 29(1): 62–7, 1995.
179. Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. *In vivo* substantivity of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. Clin Oral Investig. 14(4): 397–402, 2010.
180. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. Oral Dis. 8(1): 23–9, 2002.
181. Yamauchi, K., Toida, T., Kawai, A., Nishimura, S., Teraguchi, S., Hayasawa H 2000a. Mutagenicity of bovine lactoferrin in reverse mutation test. J Toxicol Sci. 24: 63–66, 2000.
182. Gonzalez-Chavez S, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, Function and Applications. Int J Antimicrob Agents. 33: 301.e1–301.e8, 2009.

183. Ellison III LT, Giehl TJ, LaForce FM. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun.* 56: 2774-2781, 1988.
184. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J.* 16: 1241-1251, 2006.
185. Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki. Twenty-five Years of Research on Bovine Lactoferrin Applications. *Biochim.* 91: 56(3), 40-5, 2002.
186. Naidu AS. Activated lactoferrin - A new approach to meat safety. *Food Technol.* 56(3): 40-5, 2002.
187. Naidu AS. Lactoferrin. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu A., editor. Boca Raton, CRC Press, pp p19-p102, 2000.
188. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği. Türkiye, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, pp Ek 12, bölüm C, 2011.
189. Besler M, Tanabe S, et al. Allergen Data Collection - Update: Rice. *Internet Symp. Food Allergens.* pp 1-17, 2001.
190. Teuber S, Beyer K. Food allergy diagnostic: scientific and unproven procedures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 5: 261-6, 2005.
191. Ebbehøj K, Dahl AM et al. Purification of egg-white allergens. *Allergy.* 50: 131-41, 1995.
192. Moran J, Addy M. The effect of surface adsorption and staining reactions on the antimicrobial properties of some cationic antiseptic mouthwashes. *J Periodontol.* 55: 278-82, 1984.
193. Keijser JA, Verkade H, Timmerman MF, Van der Weijden A. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Periodontol.* 74(2): 214-8, 2003.
194. Leyes Borrajo JL, Garcia VL, Lopez CG, Rodriguez-Nuñez I, Garcia FM, Gallas TM. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Periodontol.* 73(3): 317-21, 2002.
195. Moeintaghavi A, Arab H, Khajekaramodini M, Hosseini R, Danesteh H, Niknami H. *In vitro* antimicrobial comparison of chlorhexidine, persica mouthwash and miswak extract. *J Contemp Dent Pr.* 13(2): 147-52, 2012.

196. Axelsson P, Lindhe J. Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol*. 14(4): 205–12, 1987.
197. Brex M, Macdonald LL, Legary K, Cheang M, Forgay MGE. Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality. *J. Dent. Res.* 72(8): 1194–7, 1993.
198. Aktaş A, Giray B, Menemenlioğlu D, Hayran M. %0.2 Klorheksidin Diglukonat Gargara Kullanımının Oral Flora Üzerine Kısa Dönem Etkileri. *Hacettepe Diş Hek Fakültesi Derg.* 32(4): 81–93, 2008.
199. İz SG, Ertuğrul F, Eden E, Gürhan SİD. *In Vitro* Cytotoxicities of Mouthwashes Including Chlorhexidine *Dent Sci.* 18(3): 277–82, 2012.
200. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, Faurisson F, Rouveix B. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int J Pharm.* 192(2): 183–93, 1999.
201. Jones DS, Bruschi ML, de Freitas O, Gremião MP, Lara EH, Andrews GP Rheological. Mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int J Pharm.* 372(1-2): 49–58, 2009.
202. R Rowe, P Sheskey SO. *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 5th ed. Washington USA, London UK, Pharmaceutical, American Pharmaceutical Association. Washington, 2005.
203. Nilsen IW, Overbo K, Sandsdalen E, Sandaker E, Sletten K, Myrnes B. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Lett.* 464(3): 153–8, 1999.
204. Pec EA, Wout ZG, Johnston TP. Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat. *J Pharm Sci.* 81(7): 626–30, 1992.
205. Bromberg LE. Interactions among proteins and hydrophob cally modified polyelectrolytes. *J Pharm Pharmacol.* 53(4): 541–7, 2001.
206. Kwon JW, Han YK, Lee WJ, Cho CS, Paik SJ, Cho DI, Lee JH, Wee WR. Biocompatibility of poloxamer hydrogel as an injectable intraocular lens: a pilot study. *J Cataract Refract Surg.* 31(3): 607–13, 2005.

207. Hokett SD, Cuenin MF, Neal RBO, Brennan WA, Strong SL, Runner RR, McPherson JC, Van Dyke TE. Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth. *J Periodontol.* 71(5): 803–9, 2000.
208. Johnston TP, Nguyen LB, Chu WA, Shefer S. Potency of select statin drugs in a new mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Int J Pharm.* 229(2): 75–86, 2001.
209. Abe T, Sasaki M, Nakajima H, Ogita M, Naitou H, Nagase A, Taguchi K, Miyazaki S. Evaluation of pluronic F127 as a base for gradual release of anticancer drug. *Gan To Kagaku Ryoho.* 17(8): 15546–15550, 1990.
210. Parish W. Ability of *in vitro* (corneal injury-eye organ-and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. *Food Chem Toxic.* 23: 215–27, 1985.
211. Bruner L. Ocular irritation. In: J. F, editor. *Vitr Toxicol Test.* New York, Marcel Dekker, Inc, pp 149–190, 1992.
212. Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL. A chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion, and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 5: 249–66, 2005.
213. Sinn-Harlon J.
http://chickscope.itg.uiuc.edu/explore/embryology/day04/4Focuson_1.html. 2014.
214. Simões SMN, Veiga F, Ribeiro ACF, Figueiras AR, Taboada P, Concheiro A, Lorenzo CA. Supramolecular gels of poly- α -cyclodextrin and PEO-based copolymers for controlled drug release. *Eur J Pharm. Biopharm.* 2014.
215. Ying Y, Xingfen Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, Xiaohua T, Xiaoping X, Xikun X, Junming H, Xiang G. Combined *In Vitro* Tests as an Alternative to *In Vivo* Eye Irritation Tests. *ATLA.* 38: 303–314, 2010.
216. Dehelean CA, Alexa E, Feflea Ş, Pop G, Ochrotoxin ACP A. Toxicologic Evaluation Using *In Vitro* And *In Vivo* Bioassays. *Tom.* 18(2): 99–103, 2011.
217. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: A review. *Dent Mater.* 12: 186–93, 1996.
218. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* 14: 429–40, 1998.

219. Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated portland cement as a restorative material, *Biomaterials*. *Biomaterials*. 23: 4001–10, 2002.
220. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramic assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *J Prosthet Dent*. 84: 229–36, 2000.
221. Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 57: 316–22, 1999.
222. Van Wyk CW, Oliver A MJ. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for *in vitro* cytotoxicity testing?. *J Oral Pathol Med*. 30: 168–77, 2001.
223. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod*. 28: 188–92, 2002.
224. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O' Sullivan MI. *In vitro* cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int End J*. 35: 47–55, 2002.
225. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int End J*. 35: 905-909, 2002.
226. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts *in vitro*. *Dent Mater*. 20: 12–20, 2003.
227. Vajrabhaya L, Passauk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent*. 28: 440–444, 2003.
228. Schmalz G, Bindsvlev DA. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent*. 22: 6–11, 1994.
229. Sengun A, Buyukbas S, Hakkı SS. Cytotoxic effects of dental desentizers on human gingival fibroblast. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 78(B): 131–7, 2006.
230. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after *in vitro* exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater*. 22: 630–40, 2006.
231. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater*. 11: 327–31, 1995.

232. Boullaget S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, Krejci I. Long term cytotoxicity of resin based dental restorative materials. *J Oral Rehabil.* 29: 7–13, 2002.
233. Hagino S, Kinoshita S, Tani N, Nakamura T, Ono N, Konishi K, Iimura H, Kojima H, Ohno Y. Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol. Vitro.* 13: 99–113, 1999.
234. Lippens E, Swennen I, Girone`s J, Declercq H, Vertenten G, Vlaminck L, Gasthuys F, Schacht E, Cornelissen R. Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic F127 hydrogel. *J Biomater Appl.* 27(7): 828–839, 2011.
235. Garipey R.E and Leroux JC. In situ-forming hydro gels - review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 58: 409–426, 2004.
236. Escobar-Chavez JJ, Lopez-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D and Ganem-Quintanar A. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci.* 9: 339–358, 2006.

8. ÖZGEÇMİŞ

Dilşad Şenöz 14.03.1986 tarihinde Ankara'da doğmuştur. İlköğrenimini sırasıyla Aksaray Zafer İlkokulu ve Aksaray Hazım Kulak Anadolu Lisesi'nde, lise öğrenimini ise Aksaray Fen Lisesi'nde tamamlamıştır. 2004 yılında girmiş olduğu Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2010 yılında onur belgesi ile mezun olmuştur. Aynı yıl Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başlamıştır.