

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ DEĞİŞİK PULPA KAPLAMA MADDESİNİN ETKİNLİKLERİNİN
HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE VE PULPALARI EKSPÖZ EDİLEN
3. MOLARLARDA HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ
ENDODONTİ (DİŞ) PROGRAMI

Dr. Esen ŞAHER

ANKARA — 1983

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>SAYFA NO:</u>
I- GİRİŞ	1
II- GENEL BİLGİLER	3
III- GEREÇ VE YÖNTEM	17
1- Hücre Kültürü Çalışmaları	21
A. Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar	21
B. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar	24
2- Klinik Çalışmalar	24
IV- BULGULAR	27
1- Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları	27
A. Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların bulguları	27
B. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların bulguları	31
2- Klinik Çalışma Bulguları	34
A. Radyolojik bulgular	34
B. Histopatolojik bulgular	34
V- TARTIŞMA	51
VI- SONUÇ	60
VII- ÖZET	61
VIII- KAYNAKLAR	62

I - G İ R İ Ő

Dişhekimliğinde temel araştırmalar çoğunlukla 20. yuzyılın başlangıcında yapılmıştır. Tamamiyle mekanik tedavi giriŐimleri yanısıra biyokimyasal, mikrobiyolojik ve patolojik çalışmaların ışığında özellikle pulpa ve yumuŐak dokular için yararlı olan biyokimyasal preparatlar geliştirilmiştir.

Kural olarak derin kavitelerde pulpayı koruyucu kaplama maddelerine ihtiyaç vardır. Örneğin amalgam dolguların polisajında meydana gelen ısı pulpanın ölümüne neden olabilmektedir. Ayrıca dolgunun dişe iyi adapte olmaması nedeniyle ağız ortamındaki sıvılar ve toksinler dentin kanallarına ulaŐabilmektedir. Bundan başka kavitedeki dentin artıklarında yaŐamlarını sürdüren bakteriler de pulpa için iritatan olabilir. Belirtildiğine göre rk tabakasındaki bakterilerin %99 u st kısımlarda bulunmakta ve az bir miktarı dentin kanallarına geçebilmekte, sadece asitler kanallar yoluyla ilerlemektedir⁽¹⁾.

Derin rklerde pulpitis ağrıları ortaya çıktığında genellikle akut veya kronik iltihabi hadiselerin varlığı söz konusu olmaktadır. rk dentinin uzaklaŐtırılmasıyla veya iltihaba karşı ilaçlarla pulpa kaplanmaya elveriŐli duruma getirilse bile akut belirtilerin ortadan kalkmasına rağmen pulpa artık iltihabsız değildir. Bu nedenle pulpa canlı olarak korunmak isteniyorsa iltihabi veya dejeneratif olarak deęiŐmiŐ pulpallı dişlerin de genellikle belirti vermediği göz önünde bulundurulmalıdır⁽²⁾.

Klinik olarak sıhhatli olup akut travma nedeniyle yaralanmıŐ veya iatrogenik olarak açılmış ya da derin rgn ekskavatrle temizlenmesi esnasında ekspoz olan pulpanın tedavisi, pulpitis belirtisi olmıyan canlı bir pulpanın tedavisi anlamına gelmektedir.

Tedavi amacıyla pulpa koruyucusu olarak simanlar, plastik maddeler, parlak ve foli gibi çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Konservatif diş tedavisinde esas hedef pulpayı bakteriyel, termik ve kimyasal etkenlerden korumaktır. Ancak pulpa kaplama maddelerinden pulpaya zarar veriŐi veya pulpa dostu oluŐu konusunda bir kısıtlama yapmadan söz edilemez. Özellikle dolgu ve kaplama maddelerinin kimyasal bileşikleri pulpa üzerine toksik etki yapabilmektedir.

Bu nedenle biz de çalışmamızda üç değişik pulpa kaplama maddesi olan saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik, çinkooksit öjenol (Alganol) ve çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımının etkinliklerini fare embriyonik fibroblast (MEF), insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast (HEL) hücre kültürlerinde yani biyolojik invitro sistemde ayrıca pulpaları ekspoz edilen 3. molarlarda radyolojik ve histopatolojik olarak incelemeyi amaçladık.

II - GENEL B İ L G İ L E R

Dişhekimliğinde en önemli amaçlardan biri de canlı pulpayı sağlıklı olarak koruyabilmektir. Pulpa dokusunu bakteriyel, termik, kimyasal etkenlerden koruyarak canlı kalmasını sağlayan bazı tedavi edici yöntemler vardır ki bunlara indirekt ve direkt pulpa kaplaması denir.

Ekspoz olan pulpanın direkt kaplama işlemi ile korunması mümkündür. Direkt pulpa kaplaması, steril aletlerle doku dostu yara bandajı kullanarak hafif yaralı sağlıklı pulpaya fonksiyon ve canlılığını koruma olanağı veren bir tedavi şekli olarak tanımlanabilir. Diğer bir deyimle dentin yapma gücünü yitirmemiş ve enfekte olmadan açılmış bir pulpanın açılan kısmının dentin yapımını engellemeyecek, daha iyi başlatacak bir madde ile örtülmesi anlamına gelir^(3,4).

Pulpa kaplamasının başarısı doğru bir teşhise, doku dostu yara örtücü maddenin özelliğine ve uygulama tekniğine bağlıdır.

Harty⁽⁵⁾ pulpa kaplamasının başarısı için şu noktalara dikkati çekmiştir:

- 1- Pulpa açıklığı 1 mm² den fazla olmamalıdır.
- 2- Çürük nedeniyle açılmış pulpada ekspoz bölgesi kaçınılmaz şekilde ve ileri derecede enfektedir.
- 3- Pulpa enfeksiyonunu önlemek için kavite, pulpanın iyileşmesini geciktirecek tükrük kontaminasyonundan uzak tutulmalıdır.
- 4- Yaş uygulamanın başarısında önemli bir rol oynar. Pulpanın zengin damar desteği ve daha iyi onarım olanakları dolayısıyla direkt pulpa kaplaması genç hastaların daimi dişlerinde daha başarılı olmaktadır.
- 5- Semptomsuz bir dişin direkt kaplaması belli semptomları olan bir diştekinden daha fazla başarı şansına sahiptir.

Genellikle anamnez, klinik muayene ve radyolojik tetkiklerle dişin ve çevre dokularının sıhhatli olup olmadığını saptamak mümkün iken pulpanın açılması esnasında enfeksiyona maruz kalıp kalmadığını anlamak kolay değildir, hatta imkansızdır. Klinik olarak pulpanın açığa çıkması engellenememiş semptomsuz veya soğukta ağrılı derin çürüklerde pulpanın canlı olarak korunması sınırlıdır. Ancak pul-

panın kapalı veya açık oluşunun önemi olmayan sıcakta ağırlı derin çürüklerde ise pulpanın canlı olarak korunması mümkün değildir⁽²⁾.

Diğer yandan pulpanın büyükçe açılması ve açıklık yerinde aşırı kanama olması kaplama açısından uygun değildir. Kaplama maddesi pulpa dokusuyla direkt temas halinde bulunmazsa pulpa yarası üzerinde kan pıhtısı kalmakta bu da kolaylıkla enfekte olmaktadır^(6,7).

Daimi olarak kullanılabilen ve pulpa ile dengeli ilişkide olabilecek kaplama maddelerine her zaman gereksinim vardır. Pulpa dokusu üzerinde etkileri bilimsel bir araştırmaya tabi tutulmadan sayısız ilaç pulpa kaplaması için yıllarca tavsiye edilmiştir. Fakat bunların çok azı zamanımıza kadar gelmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda pulpa kaplama maddelerinden beklenen bazı özellikler saptanmıştır.

Harty⁽⁵⁾ ye göre ideal pulpa kaplama maddelerinin özellikleri şunlardır:

- 1- Sedatif, irrite etmeyen ve antiseptik
- 2- İyi bir ısı yalıtkanı
- 3- Ekspoz pulpaya çok az basınçla veya hiç basınçsız uygulanabilmeli
- 4- Büzülmeden veya genişmeden çabukça sertleşmeli
- 5- Pulpanın fizyolojik cevabında madde ile canlı pulpa arasında kalsifiye yapı oluşmalıdır.

Demmel⁽⁸⁾ ve Brauer⁽⁹⁾ isimli araştırmacılara göre de kaplama maddeleri kimyasal etkenlere, termik etkilere ve bakterilere karşı izolasyon sağlamalıdır.

Massler⁽¹⁰⁾ derin çürüklerdeki pulpa reaksiyonlarının doğrudan bir bakteri işgali ile değil de bakterilerin ürettiği toksinler sonucu olduğu fikrini ortaya atmıştır. Bilindiği gibi çürükte mevcut bakteriler asit tesiriyle genişlemiş olan dentin kanalları yoluyla pulpa içerisine kadar geçebilmektedir.

Shovelton⁽¹¹⁾ ise pulpa ile çürük kavitesinin arasındaki dentin kalınlığı çok azalınca kadar bile pulpanın sağlığını koruduğunu öne sürmüştür.

Fisher^(12,13) mikroorganizmaların dentinde uzun süreler canlı kalabildiğini fakat çürük küçük ve kaviteye yeterli dolgu yapılmışsa çürüğü ilerletecek aktiviteyi gösteremediklerini ortaya koymuştur.

Kakehashi^(14,15) ve arkadaşları ekspoz pulpanın cevabını etkilemesi yönünden bakteriyel kontaminasyonun önemini göstermişlerdir. Bu çalışmada mikroorga-

nizmalardan arındırılmış sıçanlar kullanılarak pulpa yarasının, üzerine uygulanan kaplama maddesinden bağımsız olarak iyileştiği gösterilmiştir.

Ancak yine de pulpanın canlılığının korunmasını sağlamak ve zedelenmesini önlemek kolay değildir. Çünkü bazı durumlarda kaplama maddelerinin kimyasal özellikleri de pulpa için zararlı olmaktadır.

Seltzer ve Bender⁽¹⁶⁾ e göre mikroorganizmaları öldürmeyi amaçlıyan pulpa kaplaması ve amputasyonda kullanılan ilaçların çoğu doku hücrelerini de öldürmektedir. Bu maddeler kanama meydana getirerek pulpada önemli yıkımlara yol açmaktadır.

Kaplama maddelerinin arzu edilen önemli etkilerinden bir tanesi de ekspoz pulpa alanında madde ile canlı pulpa dokusu arasında cevap olarak tersiyer yapı oluşturabilmesidir. Kalsiyum hidroksit gibi uygun bir kaplama maddesi pulpadaki enzimleri bloke etmekte ve bunu takiben oluşan nekrobiyotik yara kabuğunun altındaki mezenşim hücreleri önce fibroblastlara sonra da odontoblastlara dönüşerek yeni dentin köprüsü meydana getirmektedir. Demekki mezenşimal hücrelerin ve onlardan oluşan fibroblastların odontoblastlara dönüşmesini sağlayan endüksiyon embriyolojik fazlar dışında nekrobiyotik alanlarda da meydana gelmektedir⁽⁴⁾.

Bu bilgilerin ışığında tersiyer yapıların kendi içinde organik bir özellik içerdiğini ve pulpadaki tamir yapılarının fibroblast hücrelerinden kaynaklanan organik matriksler üzerine kurulduğunu söyleyebiliriz.

Kullanılan kaplama maddelerinin insan pulpa dokusunu oluşturan fibroblast hücreleri üzerindeki etkinliklerini mikroskobik ve makroskobik düzeyde incelemek ancak yine invitro hücre kültürleriyle mümkün olabilecektir. Hücre kültürleriyle yapılan testler genel anlamda toksisite ve eliminasyon testleri grubuna dahil olup akut lokal toksisite konusunda bilgi vermektedir^(17,18).

Gerek hayvan kaynaklı gerekse insan kaynaklı birçok hücre kültür modelleri maddelerin toksisitesini ya da varsa uyarıcı etkisini belirlemek amacıyla geliştirilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde ve fare fibroblast hücre kültürlerinin devamlı "L" serisinde dişhekimliği ile ilgili maddeler biyolojik olarak teste tabi tutulmuştur^(19, 20,21,22).

1971 yılında maymun embriyo ekstraktlarından pulpa elemanlarının doku kültürü yapıldığında odontoblast hücrelerinin yüksek aktivitesi kanıtlanmıştır⁽²³⁾.

Ayrıca insan kaynaklı devamlı hücre kültürleri olarak da genellikle serviks karsinom hücreleri içeren HeLa hücre kültürleri ve larinks epiteliom hücreleri içeren Hep2 hücre kültürleri biyolojik invitro araştırmalarda kullanılmaktadır (19,24,25,26,27,28).

Bunlara ilaveten Mittermayer ve arkadaşları⁽²⁹⁾ 2-90 yaş grubları arasındaki hastalardan alınan gingiva parçalarından insan gingiva fibroblast hücre kültürleri üretmişlerdir. Daha sonra üretilmiş olan insan gingiva fibroblast hücre kültürlerinde çeşitli kanal dolgu maddelerinin etkileri araştırılmıştır⁽³⁰⁾.

1979 yılında Klaiber ve arkadaşları⁽³¹⁾ tarafından 13-18 yaş grubları arasındaki hastaların kök teşekkülü tamamlanmamış gömülü 3.molarlarından 8.pasaja kadar varan pulpa fibroblast hücre kültürleri yapılmıştır.

Yine bir başka araştırmada kollagenin, hidroksil apatitin ve Gelastyp-S in etkileri 3.-6. pasajlar arasındaki insan pulpa fibroblast hücre kültürlerinde ve ayrıca iki farklı fibroblast hücre kültürlerinde incelenmiştir⁽³²⁾.

Hücre kültürlerindeki madde testinde, test maddesi çözülmüş bir formda veya direkt kontakt halinde açıklanan hücre topluluğuna uygulanır. Sonuçta da morfolojik hücre değişiklikleri, hücre yıkımı, hücre çoğalmasının engellenmesi gibi çeşitli biyolojik parametreler değerlendirilmeye katılmaktadır^(20,30).

Hücre çoğalması, hücre büyümesi, hücre yıkımı gibi biyolojik değişiklikler ya agar-kat yöntemindeki zon ve erime indeksleriyle ya da mitoz hücrelerinin, bağımsız hücrelerin sayımıyla veya RNA, DNA sentezlerinin ve total hücre proteinlerinin tesbitiyle tayin edilebilmektedir^(21,31,33,34,35).

Özetle genel veya lokal, akut veya kronik toksisite, aşırı duyarlılık veya malignansi oluşturabilecek doku reaksiyonlarıyla ilgili maddelerin biyolojik özelliklerinin denenmesi ya hayvan deneyleriyle ya da invitro olarak hayvan veya insan hücre topluluklarında yapılmaktadır⁽²¹⁾.

Pulpa kaplama maddelerinin biyolojik etkinlikleri konusunda yukarıda açıklanan test yöntemleri kullanılmadan sadece klinik gözlemlere dayanarak kesin bir karar verilemez. Ayrıca pulpa kaplama maddelerine karşı pulpal cevapların değerlendirilmesiyle ilgili emin bir karara varmada insan diş dokusunun histopatolojik incelenmesi gerekli bir araştırmadır.

Halen uygulamada aşağıdaki pulpa kaplama maddeleri kullanılmaktadır⁽⁵⁾:

- 1- Kalsiyum hidroksit
- 2- Kortikosteroid-antibiyotik bileşikleri
- 3- Çinkooksit preparasyonları
- 4- Siyano akrilatlar

Bir başka araştırmacı da direkt kaplama maddesi olarak sadece saf kalsiyum hidroksit preparatlarını (calxyl, dycal gibi) ve siyanoakrilatları (bucaryl) benimsemiş, geniş pulpa ekspozlarında ise kalsiyum hidroksit tozu ve ledermix partı kombinasyonunu tavsiye etmiştir⁽²⁾.

Grossman⁽³⁶⁾ da kalsiyum hidroksite antibiyotik katılmasının gereksiz olduğunu, alkali yapısı nedeniyle antibiyotiği etkisiz kıldığını belirtmiştir.

Bugün hem indirekt hemde direkt pulpa kaplamalarında kullanılan kalsiyum hidroksit geniş şekilde incelenmiş olup henüz araştırma safhasında olan diğer maddeler için bir kontroldür. Kalsiyum hidroksit preparatı olan Calxyl deki hidrojen iyonu konsantrasyonu 11,5-12,5 arasında değişmekte ve çürük asitini nötralize ederek tesir etmektedir. Kalsiyum hidroksitin bazik etkisi var deniyorsa da bununla aynı pH da olan amonyum hidroksit açık pulpa üzerine yerleştirildiğinde likefaksiyon nekrozu meydana getirmektedir. Kalsiyum hidroksit alkali olduğu için bölgeyi bazik formda tutar, bu da kemik ve dentin formasyonu için gerekli bir ortamdır^(3,16).

Aseptik şartlar altında açılıp kalsiyum hidroksit ile kapatılmış köpek dişlerinin pulpal cevapları ile ilgili çalışmada, iki vak'ada pulpa dejenerasyonu ile birlikte dentin köprüsünün olduğu görülmüştür. Diğer üç vak'ada ise direkt kaplama sahasına komşu radyoopak bir zon bulunmuş ve bu zon yeni bir sert doku teşekkülü olarak değil de hücre dejenerasyonun bazofil zonu olarak yorumlanmıştır⁽³⁷⁾.

Stanley ve Lundy⁽³⁸⁾ tarafından 1972 yılında dycal ile direkt kaplamadan sonra yeni oluşan dentin köprüleri gösterilmiştir.

Dycal ile kalsiyum hidroksit ve su karışımından oluşmuş patların etkinlikleri pulpalari ekspoz edilmiş maymun dişlerinde incelendiğinde kalsiyum hidroksitin pulpa yarasını nekrotize ettiği ve 82 gün sonra da bu nekrotik zon altında dentin oluştuğu gösterilmiştir. Ancak dycal altındaki doku, granülositli ve maddeyi fagosite edici makrofajlı, sınırlı bir iltihab ile cevap vermiştir. Yani dycal ile direkt kaplamadan sonra doku nekrozu gözlenmemiştir. Bu iltihabi infiltratif doku 30 gün sonra reorganize olmakta ve 82 gün sonra da dycal altında dentin

köprüsü oluşmaktadır. Gerek dycal gerekse kalsiyum hidroksit ile oluşan dentin köprüsünün mükemmel olmadığı tesbit edilmiştir⁽³⁹⁾.

Berk, Krakow ve Stanley⁽⁴⁰⁾, açık pulpa üzerine kalsiyum hidroksitin konulmasıyla 0,2-0,5 mm derinliğinde kimyasal bir nekrotizasyonun oluştuğunu ve bu zonun dentin köprüsünün oluşumuyla komşu olduğunu belirtmişlerdir.

Dycal, kortikosteroid-antibiyotik karışımı ve etoksi benzoik asit si-man örneği, ratların mikroorganizmlerden arındırılmış molar dişlerinde direkt kaplama maddesi olarak teste tabi tutulduğunda dycal ve etoksi benzoik asit si-man ile iyi neticeler elde edilmiş ancak ledermix hiçbir durumda direkt kaplama maddesi olarak tavsiye edilmemiştir⁽⁴¹⁾.

Hamilton ve arkadaşları⁽⁴²⁾ da direkt pulpa kaplamasında kalsiyum hidroksiti önermişler ve yeni dentin yapısının pulpa odasının obliterasyonuna neden olmadığını vurgulamışlardır.

Ancak kalsiyum hidroksitin internal rezorbsiyona ve kök kanalı pulpa dokusunun kalsifikasyonuna neden olabileceği tesbit edilmiştir⁽¹⁶⁾.

Kesin etki şekli hala anlaşılamayan kalsiyum hidroksit ile ilgili bir diğer görüşe göre de bu madde çıplak pulpa üzerine konulduğunda yeni oluşan dentinin kireci örtü maddesinden gelmemektedir. Çıplak pulpa üzerine kalsiyum hidroksit patının konulmasıyla bütün enzimatik aktivite kaybolmakta ve pulpa hücrelerinde yeni bir enzimatik aktivite ancak 7 gün sonra başlamaktadır⁽⁴⁾.

Kalsiyum hidroksit pulpa için dentinogenetik aktivite ifade eden limitli bir nekroz oluşturmakta ve daha sonra da nekroze saha sert doku ile kapsüle olmaktadır. Ayrıca maddenin yüksek alkali özelliği nedeniyle ortamdaki bütün bakteriler ve onların vejetatif olmayan formları proteoliz yoluyla yok olmaktadır^(7,43).

Bugün için genelde birleşilen nokta kalsiyum hidroksit ve çinkooksit öjenol gibi kaplama maddelerinin en azından bakteri üremesini durduracak aktivite gösterdikleridir^(13,44,45).

Bhaskar ve arkadaşları⁽⁴⁶⁾ hayvan dişlerinde yaptıkları araştırma sonucunda kaplama maddelerine karşı reperatif dentin yapımının odontoblastik bozulma ve iltihabi infiltrasyon derecesi ile orantılı olduğunu göstermişlerdir.

Direkt olarak insan pulpa dokusu üzerine uygulanan çinkooksit öjenolün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada pulpayı tahriş edip kronik iltihaba neden olduğu, perforasyon yerinde granülasyon dokusunun bulunduğu, üç hafta sonra da

kronik iltihabın pulpanın derin tabakalarına uzanarak perforasyon yerinin kapanmadan kaldığı açıklanmıştır⁽⁴⁷⁾.

Başka araştırmacılar tarafından da çinkooksit öjenolün altındaki ekspoz pulpa bölgesinde dentin köprüsü oluşumunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Ancak derin kavitelerdeki indirekt uygulamalarda çinkooksit öjenolün pulpa açısından tehlikesizce kullanılabilmesi belirtilmiştir^(48,49,50).

Massler⁽⁵¹⁾ çinkooksitin pulpa kaplama maddesi olarak kullanıldığında başarısızlık nedeninin madde içinde bulunan kurşun olduğunu ileri sürmüştür. Kurşunun pulpayı zedelediğini ve böylece köprü oluşumunu engellediğini de eklemiştir.

Kvapilova ve arkadaşları⁽⁵²⁾ tarafından Caryosan'ın (çinkooksit öjenol siman) sentetik vasat içerisinde üretilmiş HeLa hücreleri üzerindeki etkinliği incelenmiş ve mitozun değerlendirilmesiyle de doğrulanan hücre zararları gösterilmiştir. Pat hazırlandıktan sonra ne kadar geç kaviteye konursa zarar nicel olarak o kadar az meydana gelmekte, fakat nitel olarak ise aynı kalmaktadır.

Yine invitro ortamda üç çeşit polikarboksilat simanın ve iki çeşit çinkooksit öjenol simanın (çinkooksit öjenol ve intermediat restoratif madde "IRM") HeLa hücreleri üzerine olan toksisitelerinin incelendiği bir diğer araştırmada ise gerek taze hazırlanmış, gerekse 4 haftalık çinkooksit öjenol ve IRM nin bütün HeLa hücrelerini tahrip ettiği gösterilmiştir⁽⁵³⁾.

Harsanji ve arkadaşları⁽⁵⁴⁾ köpeklerin bağ dokusu reaksiyonları ile ilgili bir çalışmada çinkooksit öjenol simanın kompozitlere göre daha toksik ve iritan olduğunu tesbit etmişlerdir.

Brännström ve Nyborg⁽⁵⁵⁾, yaptıkları histolojik araştırmada çinkooksit öjenolün bakterilerin yaşamına mani olduğu ve pulpadaki iltihabi cevabın yapısındaki öjenole bağlı olarak geliştiği sonucuna varmışlardır. Bu nedenle derin kavitelerde ve kron kesimlerinde çinkooksit öjenolden önce kalsiyum hidroksit kullanmayı tavsiye etmektedirler.

Fibroblast hücre kültürleriyle yapılan bir diğer invitro araştırmada fosfat simanın "Agatos" özellikle toksik etki yaparken, "endomethasone" kanal dolgu patınının az, çinkooksit öjenolün ise en az derecede toksik olduğu gösterilmiştir⁽⁵⁶⁾.

Goerig ve arkadaşlarının⁽⁵⁷⁾ yaptıkları çalışmada, pulpanın ekspoz edilmesini takiben kullanılan çinkooksit öjenolün saf olmıyan formuyla saflaştırılmış formuna karşı farelerin molar dişlerinin pulpal cevapları araştırılmıştır. İşlemden sonraki 1. ve 3. günlerde ön planda olan polimorfonükleer lökositlerin yanı sıra 3. günde başlayan fokal nekrozun 7. ve 21. günlerde iltihab ile birlikte artış gösterdiği ancak bu günlerde pulpanın tamirine ait bir bulgu mevcut olmadığı açıklanmıştır. Sadece 21. günde tek bir dişte tamir edici dentin köprüsü görülmüştür. Saf olmıyan öjenolün ihtiva ettiği kirliliğin biyolojik olarak aktif olmasına rağmen bu kirliliğin miktarının klinik olarak önemli bir rol oynamadığı bu çalışma sonucunda gösterilmiştir.

Hannah⁽⁵⁸⁾ yaptığı çalışmada, 1. gruptaki çürük veya fraktür nedeniyle pulparı ekspoz 60 insan dişine amputasyonu takiben kalsiyum hidroksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı, 2. gruptaki çürüksüz 5 insan dişine amputasyonu takiben yine kalsiyum hidroksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı, son olarakta 3. gruptaki çürüğe bağlı olarak pulparı ekspoz olmuş 15 insan dişine de amputasyon sonrası bu kez çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı tatbik etmiştir. Yapılan histolojik incelemeler sonucunda tam bir sağlıklı reperatif yapı oluşumu kalsiyum hidroksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile elde edilmiştir. Ancak karışımda glutaraldehitin rolü tam olarak bilinmemektedir. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı kullanılan dişlerden sadece bir tanesinde reperatif yapı görülmüştür. Çoğu vaka da pulpa yalnız kısmi olarak reperatif yapı ile kaplı olup kronik iltihab gelişmiştir. Ayrıca klinik deneyimler % 5 lik glutaraldehit solusyonunun etkili bir hemostatik olduğunu göstermiştir.

Mikroorganizmaların proteinlerini çapraz bağlama özelliği glutaraldehitin kuvvetli antiseptik etkisini izah eder⁽⁵⁸⁾. Bazı koşullarda glutaraldehitte proteinler arasında öylesine stabil bağlantılar elde edilir ki bu durum ancak glutaraldehitin dialdehit şeklindeki reaksiyonuyla açıklanabilir⁽⁵⁹⁾. Nelson ve arkadaşları⁽⁶⁰⁾ da formaldehit ve formokrezol ile karşılaştırıldığında glutaraldehitin büyük baş hayvanların pulpa dokularının proteinleri üzerinde eşit veya daha büyük etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Wemes ve s-Gravenmade'de⁽⁶¹⁾ periapikal dokuda kimyasal irritasyona yolaçması nedeniyle formaldehit yerine yeni bir fiksatif olarak glutaraldehiti önermişlerdir. Yapılan invivo deneyler sonucunda bu fiksatifin uygulanmasından sonra iltihab görülmemiştir.

Pulpa dokusunun otolizisi ve mikroorganizmlerden çıkan proteolitik enzimlerin etkisi toksik üretimle sonuçlanmakta ve periapikal dokuda kimyasal

irritasyona sebep olmaktadır. İrritasyon faktörünün önlenmesi için biyolojik madde fikse edilebilir fikrinden hareket edilerek yapılan iki çalışmada, kök kanalına benzer şekilde hazırlanan iki ucu kapalı, duvarlarında dört delik bulunan polietilen tüpler tedavi edilmemiş homolog nekrotik kas dokusu, formaldehit ve glutaraldehit fikse edilen homolog nekrotik kas dokuları ile doldurularak farelerin deri altına implante edilmiştir. Sonuçta tedavi edilmemiş nekrotik homolog dokuya karşı ihtihabi cevabın en az şiddette olduğu görülmüştür. Glutaraldehit ve formaldehit fikse kas fragmanlarının bariz bir cevap oluşturma nedeni olarak kas dokusundaki maddenin fiksatiflerle birleştikten sonra organizma için yabancılaştığı fikrini öne sürmüşlerdir^(62,63).

Hoyer ve arkadaşları⁽⁶⁴⁾ tarafından akciğer fibroblast ve Hep2 hücre kültürlerinde yapılmış bir başka araştırma sonucunda toksisitenin glutaraldehit, tubulisit ve klor hekzidin şeklinde azaldığı tesbit edilmiştir.

Direkt olarak uygulanan çeşitli kaplama maddelerine karşı fare molar dişlerinin pulpa cevaplarının incelendiği bir başka çalışmada, çinkooksit + distile su karışımının kusursuz sonuçlar verdiği görülmüştür. Çinkooksit + distile su karışımıyla 24 diştten 20 sinde dentin köprüsü oluşumu gözlenmiş, çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımıyla 23 diştten 18 inde, kalsiyum hidroksit/metil sellüloz + % 5 lik glutaraldehit karışımıyla da 19 diştten 7 sinde dentin köprüsü oluşumu elde edilmiştir⁽⁶⁵⁾.

Farklı kaplama maddelerinin fare pulpa dokusu üzerindeki etkinliklerinin incelendiği bir çalışmada, calxyl ve çinkooksit öjenolün olumsuz sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Öjenolü olmayan çinkooksit, pulpanın tersiyer dentin teşekkülünün daha iyi olmasını sağlamıştır. Calxyl ile bir dişte sert doku oluşumu gelişirken, çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile dişlerin yarısında sert doku oluşumu elde edilmiştir. Yani glutaraldehitin kullanılması iltihabın az miktarda yayılmasına neden olmakta böylelikle vak'aların yarısında sert dokunun yeniden oluşumu sağlanmaktadır⁽⁶⁶⁾.

Tedavi edici amaçlarla doku fiksasyonu, diş hekimliğinin yanısıra kardiyovasküler cerrahide de uygulanmaktadır⁽⁶⁷⁾.

Yapılan çalışmalardan anlaşılacağı gibi bazen aynı madde bile çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar vermektedir. İster rutin kullanılan bir kaplama madesi olsun isterse yeni araştırılmakta olan bir madde olsun önemli unsurlardan biride kullanılan maddenin kimyasal yapısının hücre için sitotoksik etkisinin olup olmadığının saptanmasıdır. Ayrıca bu etkinin saptanması ideal kaplama maddesine yaklaşım yönünden de önem taşımaktadır.

Toksisiteleri saptanmış kaplama maddeleriyle çeşitli deney ortamında yapılan çalışmaların histopatolojik bulguları olarak aynı başlangıç reaksiyonları ortaya çıksa bile sonuçta başarıda kriter olmak üzere yeni fibroblastik ve odontoblastik hücre aktivitesi, granülasyon dokusu oluşumu ve özellikle ekspoz sahayı kapatıcı karakterde yeni dentin yapımı aranmaktadır.

Bizde bu gayeye yönelik olarak üç değişik kaplama maddesi olan çinkooksit öjenol, saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik ve çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımlarının etkinliklerini incelemek amacıyla, insan ve hayvan kaynaklı hücre kültürlerinde agar-kat ve canlı hücre sayımı yöntemi ve de hücre DNA sentezine etkilerini, biyolojik invitro sistemde, ayrıca aynı kaplama maddelerinin pulpada meydana getirebileceği doku reaksiyonlarını 3.molarlarda histopatolojik, yine aynı dişlerde yeni dentin yapımı ve periapikal dokularda patolojik bir oluşumun gelişip gelişmediğini radyolojik olarak araştırmayı planladık.

Çalışmalarımıza geçmeden önce konumuzla ilgili olarak araştırmamızda kullandığımız kalsiyum hidroksit, çinkooksit öjenol ve glutaraldehitin özellikleri ve yapısı hakkında bilgi vermeyi uygun gördük.

Dişhekimliğinde kalsiyum hidroksitin fiziksel ve kimyasal özellikler içeren özel durumu diffüzyon deneylerinde görüldüğü gibi sadece su ihtiva eden patlarında vardır. Organik sertleşmeyle katılaştıran kalsiyum hidroksit esaslı preparatlar bu özelliğe sahip değildir. Bunlar kalsiyum hidroksitin su ihtiva eden patları yerine geçemezler. Kalsiyum hidroksitin özellikleri şu şekilde sıralanabilir⁽⁴³⁾:

- 1- Kalsiyum hidroksit suda eriyerek yapısındaki hidroksil iyonlarını suya vermekte ve 20°C de pH sı 13 olmaktadır. Bu ortamda bütün bakteriler ve onların vejetatif olmıyan formları proteoliz yoluyla yok olmaktadır. Çok yönlü bakterisit etki yapmaktadır.
- 2- Hidroksil iyonlarına katyon olarak eşlik eden kalsiyum iyonları fizyolojik olarak sakıncalı değildir.
- 3- Bu pH nın verdiği dağlayıcı ve dezenfekte edici tesir kanayan dokular karşısında derin doku tahripleri yapmaz. Zira kanın bikarbonat tamponuyla birlikte kalsiyum hidroksitin etrafını çeviren kalsit den (CaCO₃) yapılmış bir membran oluşur. Kalsit kristalleri bulut formundadır ve bunların gelişimi çözülmüş kalsiyum hidroksitden alınım yoluyla olmaktadır. Bu membranın kalınlığı diffüzyon kanunlarında olduğu gibi zamanın kare köküyle orantılıdır ve pH sı 8,8 dir. Kal-

siyum hidroksitin tesir sahası ve tesir zamanı CaCO_3 oluşumu nedeniyle sınırlandırıldığından kalsiyum hidroksit bakır hidroksit ile kombine edilmiştir. Ayrıca uzun zaman açık bırakılarak havadan CO_2 alımıyla yapısında CaCO_3 oluşmuş preparatın pH sı değişmez ve bu pat henüz içinde kalsiyum hidroksit ihtiva etmektedir.

Schröder'e⁽⁷⁾ göre de kalsiyum hidroksit tozu uzun süre saklanamaz, saklandığında ekserisi kalsiyum oksitdir. Kalsiyum hidroksit tozu ve kalsiyum oksitin son etkileri aynıdır.

Ayrıca fosforik asit etkisiyle bazik kalsiyum hidroksitin oluşabilecek nötralizasyonuna engel olmak için, çinkooksit öjenol esaslı simanlar tercih edilir⁽⁷⁾. Ancak elektron mikroskobu araştırmalarında çinkooksit öjenol simanların kompozitler karşısında yıkılma potansiyeli gösterdiği ispatlanmıştır⁽⁴²⁾.

Çinkooksit öjenol ağı kesici, bakteriostatik ve antiseptik olduğu için hastalar tarafından iyi bir şekilde tolere edilir. Çinkooksit öjenol ve EBA simanlarının pH değerleri 5,8-8 arasındadır, çinkooksit ise nötraldir. Çinkooksit öjenol orta derecede antibakteriyel etkiye sahip olmakla beraber aynı zamanda higroskopiktir. Çürükten nemi çekerek mikroorganizmaların gelişmeleri için daha az uygun bir çevre oluşturmaktadır. Gerçekten de çinkooksit öjenol ve EBA simanlarının altında kalsiyum hidroksite göre daha az aktif mikroorganizma bulunmuştur^(9,16,65,68).

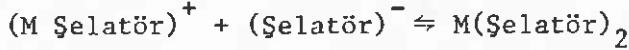
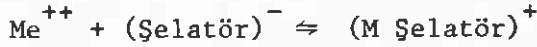
Çinkooksit öjenol siman; çinkooksit, çinkoasetat ve öjenol içermektedir. Ayrıca öjenolün saf olup olmamasının klinik olarak önemli bir rol oynamadığı yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda gösterilmiştir^(47,57).

Çinkooksit öjenolün dişhekimliğindeki kullanılma sahaları şöylece sıralanabilir⁽⁹⁾:

- 1- Geçici kapatmada
- 2- Klinik kalış süresi 18-24 ay arasında değişen uzun süreli geçici kapatmada (intermedier dolgu maddesi)
- 3- Alt dolgu maddesi olarak
- 4- İndirekt kaplama maddesi olarak
- 5- Pulpa hiperemisinin tedavisinde
- 6- Kesilmiş canlı dişlerin korunmasında
- 7- Kanal dolgu maddesi olarak

Bir çinkooksit öjenol kompleksinin oluşumunda öjenol (Şelatör) ile Me^{++} iyonları içeren çinko tuzu solüsyonlarının reaksiyonu yer almaktadır. Douglas⁽⁶⁹⁾

titre eğrileri yardımıyla şelat oluşum değeri "K"yı belirlemiştir. Aşağıda verilen formül Şelat oluşumunun açık ifadesidir⁽⁹⁾.



$$\text{Şelat oluşum değeri} \rightarrow K = \frac{\text{Kons. } M(\text{Şelatör})_2}{(\text{Kons. } Me^{++}) \text{ Kons.}(\text{Şelatör}^{-})^2}$$

Çinkooksit öjenol simanların sertleşme süresi şunlara bağlıdır⁽⁹⁾:

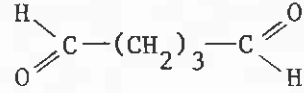
- 1- Toz ve likitin kimyasal terkiğine
- 2- Çinkooksitin elde edilmesine
- 3- Tozun çekirdek büyüklüğüne ve çekirdek büyüklüğünün kısımlarına
- 4- Su konsantrasyonuna
- 5- Akselatörlerin durumuna
- 6- Toz-likit oranına
- 7- Karışımın pH sına
- 8- Karıştırma yöntemine
- 9- Isıya. Çinkooksit öjenolün sertleşme ısısı yoluyla meydana gelen negatif etki pratikte pulpa üzerinde elimine olmaktadır. Çinkooksit öjenol pulpa ve periodontiumda az bir irritasyona neden olmaktadır.

Glutaraldehit 187-189°C kaynama noktasında dekompozisyon ile renksiz bir yağ şeklinde oluşur. Suda orta derecede asidik solüsyon vererek erir. Ticari hazırlanışı çoğunlukla % 25 lik solüsyon şeklindedir⁽⁷⁰⁾.

Temiz, hafif kokulu, renksiz bir likit olup oda sıcaklığında bir yıl kadar muhafaza edilebilen glutaraldehit esas olarak elektron mikroskobu çalışmaları ve sitokimya için bir fiksatif olarak tanıtılmıştır. Glutaraldehit formaldehitin fiksatif özelliklerinin çoğunu taklit eder ve diğer fiksatiflerden daha gelişmiştir. Bu nedenle amputasyon ajanı olarak glutaraldehit ile gelecekteki çalışmalarda arzu edilen sonuçlar elde edilebilir^(60,71).

Enzimleri immobilize etmek için birçok yöntemin yanı sıra bir dialdehit den yani glutaraldehitden çok yararlanılmaktadır. Glutaraldehit iki fonksiyonel aldehit grubuna sahiptir, proteinlerle daha fazla stabil bağ oluşturur^(59,72).

Glutaraldehitin açık formülü aşağıda gösterilmiştir:



Habeeb ve Hiramoto⁽⁷³⁾ tarafından glutaraldehitin amino asitler, peptitler ve proteinler gibi örnek tiplerle reaksiyonu incelenmiştir.

Richards ve Knowles⁽⁷⁴⁾ RMN spektrometresi ile glutaraldehitin ticari solüsyonlarında, glutaraldehit moleküllerinin polimerize formlarının varlığını saptamıştır. Polimerler lineer ya da siklik bir yapı göstermekteydiler. Yine monomerik glutaraldehitin proteinler ile reaksiyona girip onları irreversibl olarak değiştirmedigini fakat çeşitli polimerik formların özellikle de α -w- doymamış zincirleri olanlarının bu işi yaptığını ortaya çıkarmışlardır. Reaksiyonlardaki farklılıkların çapraz bağlama özelliğine sahip glutaraldehitin olağanüstü etkisiyle açıklanabileceğini savunmuşlardır.

Glutaraldehitin ticari solüsyonlarının pH sı 3,1 dir. Glutaraldehitin reaktivitesi ve amino asitlerle reaksiyonu sonucu elde edilen maddenin stabilitesi pH ile değişmektedir. Gerçekten de bazik ortamda reaksiyonun etkinliği artmaktadır. Bu solüsyon pH 8,5 iken mikroorganizmaları en yüksek seviyede öldürmeyi sağlar. Bunun üzerindeki pH da glutaraldehit polimerize olduğundan kalsiyum hidroksit ile kombine kullanıldığında pulpayla temas eden inaktif polimerdir. Glutaraldehitin stabilitesini arttırmak için normal olarak asit solüsyonda depo edilmesi gereklidir. Fakat asit solüsyonda antibakteriyel aktivitesi sınırlıdır. Glutaraldehit bakterisit etkilidir ve mikroorganizmaların proteinlerini çapraz bağlaması onun kuvvetli antiseptik etkisini açıklar. Ayrıca klinik deneyimler % 5 lik glutaraldehit solüsyonunun etkili bir hemostatik olduğunu göstermiştir. % 2 lik glutaraldehit solüsyonu dezenfeksiyon ve sterilizasyon amacıyla kullanılmış, ilaveten glutaraldehitin dentinin yüzeyel tabakasından 0,3 mm derinliğe kadar inen yaklaşık 1 saat kadar süren geçici bir yumuşamaya neden olduğu tesbit edilmiştir (58,59,65,70,71).

Çeşitli maddelerin hücre kültürlerindeki etkilerini araştırmak için gerek hücre kültürlerinin üretilmesinde gerekse deneylerin uygulanmasında aşağıdaki solüsyon ve vasatlara gereksinme duyulmaktadır^(75,76).

PBS Solüsyonu (Phosphate Buffered Saline):

NaCl	4,00 gr.
KCl	0,10 gr.
KH ₂ PO ₄	0,06 gr.
Na ₂ HPO ₄	0,455gr.
İyonsuz su	500 cc.

Yukarıda adları ve miktarları verilen tuzlar iyonsuz suda eritildikten sonra 120°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilir ve buzdolabında saklanır.

Tripsin :

% 0,25 lik tripsin solüsyonundan 1 gram 400 ml PBS içerisinde çözülerek hazırlanır ve içerisine 0,5 ml %1 lik fenol kırmızısı ilave edilir. Zeitz filtresinden süzülerek sterilize edilir.

MEM üretme vasatı :

Minimal essential medium "MEM" toz olarak piyasada bulunmaktadır. 1 lt. iyonsuz suya 9,36 gr. toz "MEM" ilave edilerek eritilir. Böylece elde edilen sıvı vasat Zeitz filtresinden süzülüp steril şişelere konularak buzdolabında saklanır. Üretim vasatı hazırlamak için "MEM" vasatınının 100 ml. sine 10 ml. fetal dana serumu (FDS), 1 ml. SP solüsyonu eklenir.

SP (Streptomisin-penisilin) :

10⁶ ünit kristalize penisilin, 1 mgr. streptomisin 100 ml. steril iyonsuz su içerisinde çözülerek hazırlanır. Gereken miktarlarda vasat ve çözeltilere ilave edilerek kullanılır.

³H-Timidin:

Radyoaktif timidin (Methyl-³H Thymidine 5-Triphosphate ın amonyum tuzu) in özgül aktivitesi 49 Ci/m mol dür.

% 10 luk formol:

Formol solüsyonu % 10 oranında PBS içerisinde sulandırılarak hazırlanır.

% 5 lik trikloro asetik asit (TCA):

Trikloro asetik asit % 5 oranında iyonsuz su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Radyoaktif Sayım Solüsyonu :

Sayım solüsyonu 1 lt. toluen e 7,5 gr. 2,5- Diphenyloxazolyl (PPO) 0,3 gr. 1,4-di-2-(5-phenyloxazolyl) benzene (POPOP) ilave edilerek ve 4 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak hazırlanır.

Agar-kat vasatı:

Agar-kat vasatı aşağıda verilen formüle göre hazırlanır.

% 1,3 iyonsuz su içerisinde eritilmiş Noble agar	50 ml.
2 x MEM	50 ml.
FDS	5 ml.
SP	1 ml.

Karışım kaynatılarak eritilen Noble agara ilave edilir, + 44°C ye soğutulduktan sonra agar-kat yöntemi için kullanılır.

III - G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Çalışmamızda kullandığımız pulpa kaplama maddeleri şunlardır :

- Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımı
- Çinkooksit öjenol (Alganol)
- Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı

Hücre kültürü çalışmalarımızda yukarıda sözü edilen pulpa kaplama maddelerini direkt ya da ayrışım solüsyonları halinde kullandık.

Çalışmamızda kullandığımız kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları şu şekilde hazırlandı:

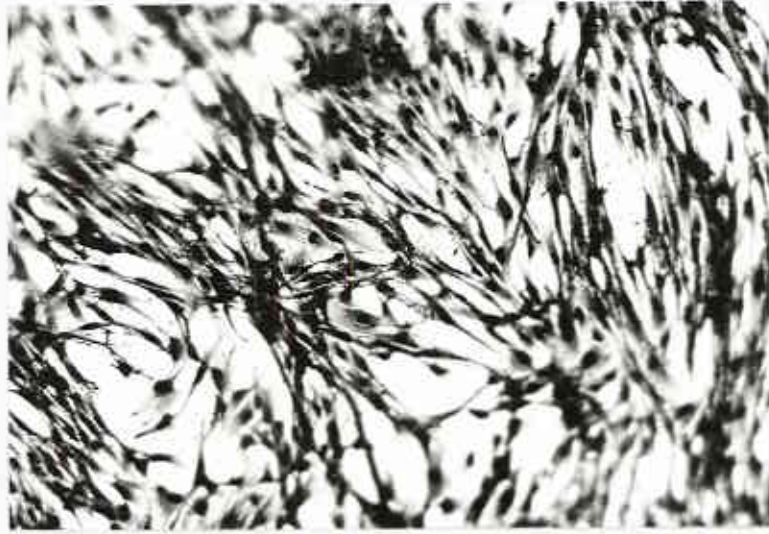
Kaplama maddelerinin invitro sitotoksik etkilerini gerek canlı hücre sayımı ile göstermede gerekse hücre DNA sentezine etkisini saptamada kullanılan ayrışım solüsyonlarını elde etmek gayesiyle karıştırılan maddeler 10 cm. çapındaki "polystyrene" petri kutularının ortasına daha önceden cetvelle çizilerek belirlenen 4 cm² lik alana spatül yardımıyla yayıldı. Kontrol olarak da serum fizyolojik alındıktan sonra her bir petri kutusuna 25 ml. vasat ilave edildi. Bu alana yayılan madde kalınlığı yaklaşık 2-3 mm. civarındaydı. İçlerinde kaplama maddeleri örnekleri ve 25 er ml. % 5 FDS içeren MEM vasatları bulunan petri kutuları 37°C lik etüvde 24 saat ayrışma için inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda ayrışma sıvıları 10 ml. lik pipet yardımıyla tüplere toplanarak gerektiğinde IN-HCl ve % 7,8 NaHCO₃ ile nötral pH ya ayarlandı. Toksik olabilecek partiküllerden arıtmak gayesiyle her ayrışan madde solüsyonu "Zeitz" filtresinden pozitif hava basıncı yardımıyla süzüldü. Daha sonra süzülen bu ayrışım solüsyonları belirtilen miktarlarda hücre kültürlerine ilave edilerek araştırıldı.

Araştırmamızda kullandığımız hücre kültürleri de aşağıda açıklanan şekilde hazırlanmışlardır.

Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre kültürü :

Fare embriyosu fibroblast hücre kültürü, Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesinden sağlanan 14 günlük gebe albino (Swiss mice) fareden hazırlandı. Bunun için gebe fare eter ile uyutulduktan sonra aseptik şartlarda embri-

yonlar steril pens ve makas yardımıyla çıkartılıp petri kutusuna alındılar. Embriyonlar (ortalama 8-10 adet) amniyotik zardan ve plasentadan ayrılarak ve kıkırdak dokusu içermesi nedeniyle başları kesilerek yeni steril bir petri kutusuna aktarıldılar. Bu embriyonlar bağırsak ve dalakları temizlendikten sonra SP içeren (200 ünite penisilin + 200 mgr. streptomisin) PBS içerisine konuldular ve 3 defa aynı PBS ile yıkandılar. Daha sonra embriyonlar 50 ml. lik kalın ezme tüpüne alınarak steril makas yardımıyla 2-3 mm. boyutunda doku fragmentleri halinde parçalandılar. Parçalanan dokular yine PBS ile üst sıvı berraklaşana kadar yıkandılar. Genellikle bu yıkama dokuların kan elemanlarından temizlenmesi için uygulandı. Bir defada % 0,25 lik tripsin solüsyonu ile yıkanan dokular 100 ml. lik kapaklı şişe içerisine aktarıldı ve hücrelerin dokulardan tek tek ayrılması amacıyla 25 ml. % 0,25 lik tripsin ilavesi ile 37°C lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Her 10 dakikada bir tripsinizasyonun kolaylaşması için şişe çalkalanarak inkübasyon 1 saat içerisinde tamamlandı. Tripsinize olan fare embriyosu hücrelerinin mevcut doku fragmentlerinden ayrılması için iki kat gazlı bez sarıllı steril huni yardımıyla süzülerek yeni bir şişeye alındı. Tripsinin hücreler üzerindeki etkisini kaldırmak için % 5 oranında dana serumu ilave edildi. Hücre süspansiyonu ağzı kapaklı 20 ml. lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 devir/dakikada 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra hücre çökeleği üretme vasatında sulandırılarak 20 ml. lik hacimlerde doku kültürü şişelerine (her şişeye ortalama 10^7 hücre düşecek şekilde) konuldu ve 37°C lik etüvde inkübe edilerek 3-4 gün içerisinde tek tabaka hücre kültürü elde edildi. (Resim 1)



Resim 1: İnvitro olarak üretilmiş fare embriyonik fibroblast hücreleri.

Böylece elde edilen primer fare embriyosu hücre kültürü % 0,25 lik tripsin yardımıyla tripsinize edilerek deneyine göre doku kültürü tüplerine veya doku kültürü petri kutularına üretme vasatı içerisinde konuldu. Uygulanan bütün deneylerde fare hücreleri bu ilk pasajda kullanıldı.

İnsan diş pulpası hücre kültürü :

İnsan pulpa dokusu, 13-16 yaşları arasındaki hastaların kök ucu kapanmamış (immatur) 3.molarlarından elde edildi. Çekim endikasyonu konulan gömülü diş cerrahi yolla çıkarıldıktan sonra nemli bir ortamda aerotörle kesilerek içerisinde pulpa dokusu alındı ve aseptik şartlarda doku transport vasatına (Minimal Essential Medium "MEM" + % 2 fetal dana serum + 400 ünite penisilin + 400 mgr. streptomisin) konularak hücre kültürü yapımı için laboratuvara nakledildi.

İnsan diş pulpası hücre kültürü doku alındıktan sonra en geç 4 saat içerisinde fragment doku kültürü yöntemi ile çalışılarak elde edildi. Bunun için pulpa dokusu üç defa PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanarak steril bir petri kutusuna konuldu. Doku bistüri yardımıyla 1-2 mm. büyüklüğünde fragmentlere parçalandı, küçük parçalara ayrılan bu fragmentler ağız geniş 10 ml. lik pipet yardımıyla % 10 fetal dana serumu (FDS) içeren vasata alınarak 200 ml. lik (jena glass) doku kültürü şişelerine aktarıldı. Böylece doku kültürü şişesinde pulpa doku fragmentleri 10 ml. üretme vasatı içinde 37°C lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyona bırakılan hücreler her gün hücre kültürü mikroskopunda kontrol edilerek doku fragmentleri etrafında fibroblastik üremenin olup olmadığı gözlemlendi. Inkübasyondan sonraki 3. hafta içerisinde fragment kültüründe en fazla üreme saptandığı zaman hücreler tripsinizasyon yöntemi ile pasaja alındılar. Fragment kültürünün üremesi sırasında her beş günde bir vasat değiştirildi ve pH'nın 7,2 civarında kalması için ayarlanma % 7,8 lik NaHCO₃ yardımıyla yapıldı. Fragment kültüründe üreyen pulpa hücrelerinin pasajı için önce doku kültürü vasatı dökülerek hücreler PBS ile bir defa yıkandı. Daha sonra % 0,25 lik tripsin solüsyonu ile iki defa yıkamadan sonra 2 ml. tripsin şişede bırakılarak 37°C de inkübasyon sağlandı. Inkübasyon sırasında üremiş olan hücreler tripsin yardımıyla genellikle 10 dakika içerisinde tek hücre halinde elde edildiler. Ayrılan pulpa hücreleri 10 ml. lik pipet yardımıyla iyice pipetlenerek 5 ml. % 10 FDS içeren MEM ilavesi ile kapaklı santrifüj tüpüne aktarıldı. Tripsinize edilen bu süspansiyon 1200 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Daha sonra üst sıvı atılarak hücre çökeleği 5 ml. lik pipet yardımıyla ve % 10 FDS içeren MEM ilavesi ile süspansiyon haline getirilerek yeni doku kültürü şişelerine aktarıldı. Pulpa hücrelerinin üretimi için yine 200 ml. lik doku kültürü şişeleri kullanıldı. Ancak bu defa her şişeye 20 ml. üretme vasatı ilave edildi. Böylece 1. pasajı yapılan pulpa

hücreleri 37°C de inkübe edilerek tek tabaka oluşana kadar bekletildi. Daha sonra yine tripsinizasyon yöntemi ile yaklaşık birer hafta arayla hücrelerin 2., 3., 4., vs. pasajları yapıldı. (Resim 2)



Resim 2: İnvitro olarak üretilmiş insan diş pulpası hücreleri.

İnsan embriyonik akciğer fibroblast (HEL) hücre kültürü :

Hacettepe Üniversitesi Kadın Doğum kliniğinde spontan düşük yoluyla sağlanan 3-4 aylık insan embriyonunundan akciğer dokusu aseptik şartlarda alınarak HEL hücre kültürü daha önce pulpa için tarif edilen fragment doku kültürü yöntemi ile hazırlandı. Genellikle 7-10 gün içerisinde tek tabaka hücre kültürü sağlandığından tripsinizasyon yöntemi ile pasajlar yapılarak çoğaltıldı.

Deneylerde HEL hücre kültürü 7-12. pasajlar arasında kullanıldı.

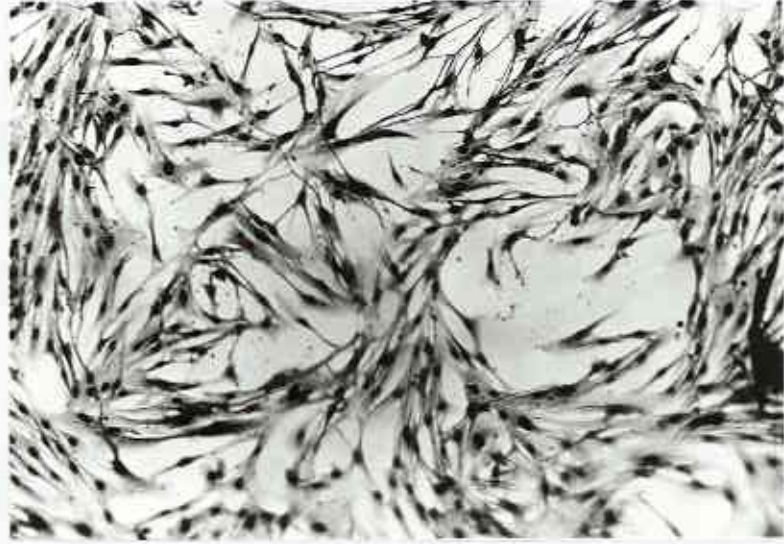
(Resim 3)

Üç değişik pulpa kaplama maddesine karşı hücre ve doku cevaplarını araştırdığımız çalışmamızı iki grup altında topladık :

1- Hücre Kültürü Çalışmaları

A. Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar.

- MEF hücre kültürlerinde agar-kat yöntemi ile kaplama maddelerinin etkinliğinin araştırılması.
- MEF hücre kültürlerinde canlı hücre sayımı yöntemi ile kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının etkinliğinin saptanması



Resim 3: İnvitro olarak üretilmiş insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri.

- Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının MEF hücrelerinin DNA sentezine olan etkinliğinin araştırılması

B. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer (HEL) hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar (canlı hücre sayımı yöntemi ile).

2- Klinik Çalışmalar

Aynı kaplama maddeleriyle çürüksüz, canlı ve pulpaları tarafımızdan ekspoz edilen 3.molarlara direkt kaplama uyguladığımızda oluşan doku cevaplarının histopatolojik, yine aynı dişlerde yeni dentin yapımının ve periapikal dokularda patolojik bir oluşumun gelişip gelişmediğinin radyolojik olarak incelenmesi.

1- Hücre Kültürü Çalışmaları :

A. Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar.

- MEF hücre kültürlerinde agar-kat yöntemi ile kaplama maddelerinin etkinliğinin araştırılması.

Fare embriyonik fibroblast hücreleri 1. pasajda tripsinize edilip üretme vasatı içerisinde sulandırılarak "polystyrene" 50 mm. çapındaki doku kültürü petri kutularına 4 er ml. ekildi. Her petri kutusuna ortalama $1,5 \times 10^6$ hücre

yoğunluğu düşmekteydi. Petri kutularında hazırlanan MEF hücre kültürü 37°C de 48 saat bekletilerek tek tabaka hücre kültürü elde edildi. Böylece elde edilen hücre kültürleri iki defa PBS ile yıkandı ve üzerlerine agar-kat vasatından her petri kutusuna 4 ml. ilave edildi. Agar-kat vasatı dökülmüş petri kutularının orta üst agar yüzeyine 1 cm² alanında kesilmiş ve üzerlerine kaplama maddesi örnekleri yayılmış steril diskler yine steril bir pens yardımıyla yerleştirildi. Kontrol olarak serum fizyolojik emdirilmiş 1 cm² alanındaki disk agar yüzeyine ayrıca yerleştirildi. Her kaplama maddesi örneği için 1. ve 22. saatlerde okunmak üzere ikişer petri kutusu kullanıldı. Böylece hazırlanan ve üzerlerine kaplama maddesi örnekleri konulan kültürler 37°C lik etüve konularak inkübe edildiler.

İnkübasyonun 1. ve 22. saatlerinde örnekler alınarak petri kutularına % 10 luk formol solüsyonundan 3 ml. ilave edildi. Oda sıcaklığında bekletilen kültürdeki hücreler böylece tesbit edilmiş oldu. Daha sonra petri kutularındaki agar alınarak tesbit edilmiş hücreler iki defa PBS ile yıkandı ve Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak zon çapı cetvelle ölçüldü. Ayrıca mikroskopik gözlemlerle zon sahasındaki hücre erime (lysis) oranı kaydedildi. Sonuçlar cevap indeksi formülünde değerlendirildi.

- MEF hücre kültürlerinde canlı hücre sayımı yöntemi ile kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının etkinliğinin saptanması.

Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının sitotoksik etkilerinin saptanacağı MEF hücreleri % 0,25 lik tripsin ile tripsinize edildiler. Ayrışan bu hücreler % 10 FDS içeren MEM vasatında sulandırıldı ve 16x1,5 cm. büyüklüğündeki lastik tıpalı doku kültürü tüplerine hücreler eşit yoğunluklarda 2 ml. vasat içerisinde ekildiler. Hücreler 37°C de 24-48 saat inkübe edilerek tek tabaka oluşumuna yakın iken üretme vasatları dökülüp yerine 2 şer ml. sitotoksik etkileri incelenecek kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları ilave edildi. Ancak kaplama maddelerinden kalsiyum hidroksit ayrışım solüsyonu elde edildiğinde fazlaca bazık olduğu görüldü. Bu bazık ortamın hücreler için kimyasal yönden değil de pH yönünden toksik olabileceği düşünülerek kalsiyum hidroksit ayrışım solüsyonu iki kısma ayrıldı. Bir kısmı deneyde aynen kullanılırken (kalsiyum hidroksit bazık), diğer kısmı ise 1N HCl ile nötralize (kalsiyum hidroksit nötralize) edilmek suretiyle kullanıldı.

Kullanılan her ayrışım solüsyonu için değişik zamanlarda (0,24.,48. ve 72. saatlerde) alınacak örneklerde daima çift tüp kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan hücre kültürlerine ise % 5 FDS içeren vasatdan ilave edildi. Daha sonra 37°C de inkübasyona bırakılan ayrışım maddeleri ile muamele edilmiş MEF

hücreleri belirtilen zamanlarda canlı hücre sayımına alındılar. Bu nedenle hücre sayımı yapılacak kültürlerden her zaman dilimi için ikişer tüp alınarak vasatları döküldü, bir defa PBS ile, iki defada 2 ml. tripsin solüsyonu ile yıkanarak 37°C de hücreler tek tek ayrışana kadar tripsinize edildiler. Her tüpte ayrışan bu fare fibroblast hücreleri 1 ml. PBS içerisinde sulandırıldı. Yine PBS içerisinde % 1 lik hazırlanmış tripan mavisi (trypan blue) solüsyonundan her tüpe 0,1 ml. ilave edildi. Canlı hücre sayımı "Thoma" kamarasında mikroskop altında yapıldı. Bu yöntemle boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildiler. Anlaşılacağı gibi bu yöntemde yalnız tüp camına yapışık kalan canlı hücreler sayılmaktadır.

Sayım, kamarada her örnek için her defasında iki alan olmak üzere ikişer kere yapıldı. Böylece her zaman dilimindeki her örnek için elde edilen dört sayımın ortalaması alınarak 10^4 ile çarpıldı ve bu sayı her tüpte kalan canlı yapışık hücre sayısını ifade etmekteydi. Dolayısıyla bizim elimizdeki her bir tüpte deneyin başlangıcında (0.saatte) 11.75×10^4 hücre bulunmaktaydı.

- Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının MEF hücrelerinin DNA sentezine olan etkinliğinin araştırılması.

Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının hücre DNA sentezine olan etkileri fare embriyonik fibroblast hücrelerinde incelendi. Bunun için içerisine lamel yerleştirilmiş "leighton" tüplerine fare hücrelerinin 1. pasajından 1,5 ml MEM üretme vasatında sulandırılmış 5×10^4 hücre ekildi. Lameller üzerindeki hücrelerin tek tabakaya yakın üremesi sağlandığında vasatlar dökülerek yerine kaplama maddesi ayrışım solüsyonlarından ve kontrol vasatından birer buçuk ml. konuldu. Ancak bu deneyde de bir önceki deneyde olduğu gibi kalsiyum hidroksit ayrışım solüsyonu bazik ve nötral diye ikiye ayrılarak uygulandı. Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları ile muamele edilen hücre kültürlerinde 3., 6. ve 22. saat dilimlerinde bir saat süreyle ^3H -timidin ile hücre DNA ları işaretlendi. Bunun için her leighton tüpünde bulunan hücre grubuna etanolde sulandırılmış ^3H -timidin den 20 $\mu\text{ci/ml}$. ilave edilerek bir saat 37°C de işaretlenme "pulse label" yapıldı. Radyoaktif işaretleme sonucunda tüplerdeki vasat döküldü üç defa PBS ile yıkanarak % 10 luk formol solüsyonu ilave edildi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Böylece lameller üzerinde üremiş olan hücreler tesbit edilmiş oldu. Tekrar üç defa PBS ile yıkanan tesbit edilmiş hücreler üzerine bu defa buz derecesinde soğutulmuş % 5 lik trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi. Bu ilave ile hücre DNA sına girmiş olan radyoaktif timidin presipite edilmiş oldu. Bu aşamadan sonra tüpler üç defa soğuk destile su ile yıkanarak presipite olmamış radyoaktivite ortamdan uzaklaştırıldı. Son olarak tüpler etanol ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya terk edildi.

Kaplama maddeleri ayrışım: solüsyonları ile muamele sırasında üzerlerinde hücre üretilerek DNA işaretlenmesi yapılan lamel kültürleri leighton tüplerinden alınarak radyoaktif sayımın yapılacağı şişeler içerisine kondu. İçlerinde birer örnek bulunan şişelere sıvı sayım solüsyonundan (POPOP + PPO + toluen) 20 ml. ilave edildi. Böylece hazırlanan örnekler Packard TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer (model 544) de 5 dakika sayılarak her örnekteki radyoaktivite cpm (count per minute = dakikada sayım) olarak hesaplandı.

B. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar.

Kaplama maddelerinin insan kaynaklı olan fibroblastik hücre tipleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürleri deneye dahil edilmiştir.

Kaplama maddelerinin gerek insan diş pulpası gerekse insan embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürleri üzerindeki etkilerini incelemek gayesiyle kullandığımız yöntem MEF hücre kültürleriyle yaptığımız deneyde etraflıca anlatılmış olan canlı hücre sayımı yöntemidir.

İnsan diş pulpası hücre kültürlerindeki deneyler 4. pasajda yapılmış olup inkübasyondan sonraki 0, 3., 24., 48. ve 72. saat dilimlerinde canlı hücre sayımı ile değerlendirilmiştir. Ayrıca deneyin başlangıcında (0. saatte) her bir tüpte 8×10^4 hücre bulunmaktadır.

İnsan embriyonik akciğer fibroblast hücrelerinin ise 7 ila 9. pasajlar arasındaki kültürleri bu deneyde kullanılmış olup inkübasyondan sonraki 0., 24., 48. ve 72. saat dilimlerinde yine canlı hücre sayımı ile değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Deneyin başlangıcında (0. saatte) her bir tüpte 13×10^4 hücre bulunmaktadır.

2- Klinik Çalışmalar :

Çalışmamızda kullandığımız pulpa kaplama maddeleri 19-29 yaş grubundaki genç hastaların, pulparları tarafımızdan ekspoz edilen 36 adet çürüksüz ve canlı 3. molarlarına uygulanmıştır. Böylelikle her bir pulpa kaplama maddesi örneği ile toplam 12 dişe direkt kaplama yapılmış olup bunlarda deney sürelerine bağlı olarak kendi aralarında 2, 7, 14, ve 28. günde üçer diş olmak üzere gruplara ayrılmışlardır. Kontrol grubu olarak da hiç bir işlem uygulanmamış 6 adet çürüksüz ve canlı 3. molar dişleri alınmıştır. (Tablo 1).

	<u>Sıra No</u>	<u>Protokol No.</u>	<u>Yaş</u>	<u>Diş No.</u>	<u>Hastanın alındığı tarih</u>	<u>Deney Süresi</u>
Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımı uygulanan grub.	1	38531(M.I.)	27	8	3.6.1981	2 gün
	2	9960 (M.K.)	26	8	13.5.1981	2 gün
	3	23636(H.Ü.)	24	8	7.4.1981	2 gün
	4	6006 (A.G.)	23	8	22.4.1981	7 gün
	5	36395(S.A.)	24	8	8.4.1981	7 gün
	6	36038(S.G.)	23	8	31.3.1981	7 gün
	7	6006 (A.G.)	23	8	29.4.1981	14 gün
	8	36466(A.T.)	24	8	8.4.1981	14 gün
	9	24227(H.N.)	23	8	3.4.1981	14 gün
	10	35156(A.Ç.)	24	8	2.4.1981	28 gün
	11	35991(I.K.)	19	8	30.3.1981	28 gün
	12	36170(O.E.)	24	8	2.4.1981	28 gün
Çinkooksit öjenol uygulanan grub.	13	38165(C.E.)	24	8	2.6.1981	2 gün
	14	37515(A.S.)	19	8	11.5.1981	2 gün
	15	1368 (H.S.)	29	8	27.4.1981	2 gün
	16	21224(S.B.)	23	8	6.4.1981	7 gün
	17	36523(S.E.)	23	8	9.4.1981	7 gün
	18	36861(G.B.)	23	8	20.4.1981	7 gün
	19	9960 (M.K.)	26	8	16.4.1981	14 gün
	20	13225(N.Ç.)	25	8	26.3.1981	14 gün
	21	35945(M.B.)	23	8	27.3.1981	14 gün
	22	36215(M.I.)	22	8	3.4.1981	28 gün
	23	23084(A.D.)	23	8	30.3.1981	28 gün
	24	10673(A.Ö.)	24	8	30.3.1981	28 gün
Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı uygulanan grub.	25	36799(N.B.)	26	8	25.5.1981	2 gün
	26	38165(C.E.)	24	8	25.5.1981	2 gün
	27	36861(G.B.)	23	8	20.5.1981	2 gün
	28	37288(A.A.)	26	8	1.5.1981	7 gün
	29	37372(Ü.T.)	28	8	28.4.1981	7 gün
	30	36466(A.T.)	24	8	30.4.1981	7 gün
	31	36799(N.B.)	26	8	17.4.1981	14 gün
	32	36395(S.A.)	24	8	20.4.1981	14 gün
	33	24277(H.N.)	23	8	10.4.1981	14 gün
	34	36156(A.Ç.)	24	8	15.4.1981	28 gün
	35	35991(I.K.)	19	8	17.4.1981	28 gün
	36	36320(A.G.)	26	8	7.4.1981	28 gün

Tablo 1: Hastaların yaşa ve 3.molarların deney sürelerine göre dağılımı.

Direkt pulpa kaplaması yapılacak dişlerin çürüksüz ve canlı oldukları radyolojik ve klinik kontrollerle belirlendi. Bunu takiben aerotörle dişlerin okluzal yüzlerinden mine tabakası kaldırıldı. Dişlerin rulo pamuklarla izole edilmesinden sonra sakşında kullanılarak tura takılan steril bir rond frez yardımıyla pulpa üzerinde ince bir dentin tabakası kalana kadar kavite preparasyonuna devam edildi. Kavite bu şekilde hazırlandıktan sonra lokal anestezi uygulanarak, 1 mm. çapında steril bir rond frez ile pulpalar tek noktadan ekspoz edildi. Bu işlemden sonra klinikte öngörüldüğü şekilde karıştırılan pulpa kaplama maddeleri steril şartlar altında kavitelere özellikle ekspoz sahalara konuldu. Kavitelere tükruk sızıntısı olmamasına özen gösterilerek, siman kaide ve amalgam dolgu ile dişler kapatıldı. Direkt kaplama yapılan dişlerin dolgudan önce hemen sonra ve çekimden önce radyolojik inceleme için açi ortay yöntem ile fimleri alındı.

Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik, çinkooksit öjenol, ve çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı uygulanan 3.molarlar üçerlik grublar halinde direkt kaplamadan sonraki 2., 7., 14. ve 28. günlerde çekildiler.

Çekilen bu dişler su altında iyice yıkandıktan sonra yaklaşık 30 gün formol içerisinde fiksasyon amacıyla bekletildi. 2,7,14, 28 günlük grublardaki toplam 36 diş ve kontrol grubundaki 6 diş bu süre içerisinde fikse olduktan sonra Merck firmasının formik asiti ile % 5 lik konsantrasyonda hacimlerinin 40 misli şişelerde dekalsifikasyona bırakıldı. Üç günde bir şişelerdeki formik asit dökülerek yerine taze hazırlanmış olanları kondu. Dekalsifikasyon işlemine başladıktan 24 gün sonra toplu iğne batırılarak dişlerin dekalsifiye olduğu saptandı. Bundan sonra dişler uzun eksenleri boyunca ortadan bir bistüri ile iki parçaya bölündü, numaralanarak kasetlere konup dereceli alkol serisinde dehidrate edildikten sonra parafin bloklara alındı. Mikrotomda 6-8 µ kalınlığında kesitler alınarak preparatlar elde edildi ve hematoksilen + eozin ile boyandı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda çeşitli büyütmelerde değerlendirildi ve siyah beyaz fotoğrafları çekildi.

IV - B U L G U L A R

1- Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları :

A. Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların bulguları :

Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde açar kat yöntemi ile elde edilen sonuçlar, cevap indeksi yardımıyla aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.

$$\text{Cevap indeksi} = \frac{\text{Oluşan zon indeksi (1)}}{\text{Erime indeksi (2)}}$$

(1) Zon indeksi

Zon oluşumunun mikroskobik ifadesi :

- 0 → Örneğin altında ve etrafında görülebilir bir zon mevcut değil
- 1 → Örneğin yalnız alt kısmında bir zon mevcut
- 2 → Örneğ yayılımını 0,5 cm.ye kadar geçebilen bir zon mevcut
- 3 → Örneğ yayılımını 1 cm.ye kadar geçebilen bir zon mevcut
- 4 → Örneğ yayılımını 1 cm.den fazla geçebilen bir zon mevcut
- 5 → Zon bütün petriye yayılmış

(2) Erime indeksi

Erimenin mikroskobik ifadesi :

- 0 → Tesbit edilen bir erime mevcut değil
- 1 → Zon daki erime % 20 den az
- 2 → Zon daki erime % 40 dan az
- 3 → Zon daki erime % 60 dan az
- 4 → Zon daki erime % 80 den az
- 5 → Zon daki erime % 80 den fazla.

Kaplama maddelerinin agar kat yöntemi ile MEF hücreleri üzerindeki etkinliğinin cevap indeksi Tablo 2 de gösterilmiştir.

Madde	Zon indeksi	Zon indeksi
	Erime indeksi	Erime indeksi
	1. saat	22. saat
Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımı	3/5	3/5
Çinkooksit öjenol	2/2	2/2
Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı	0/0	0/0

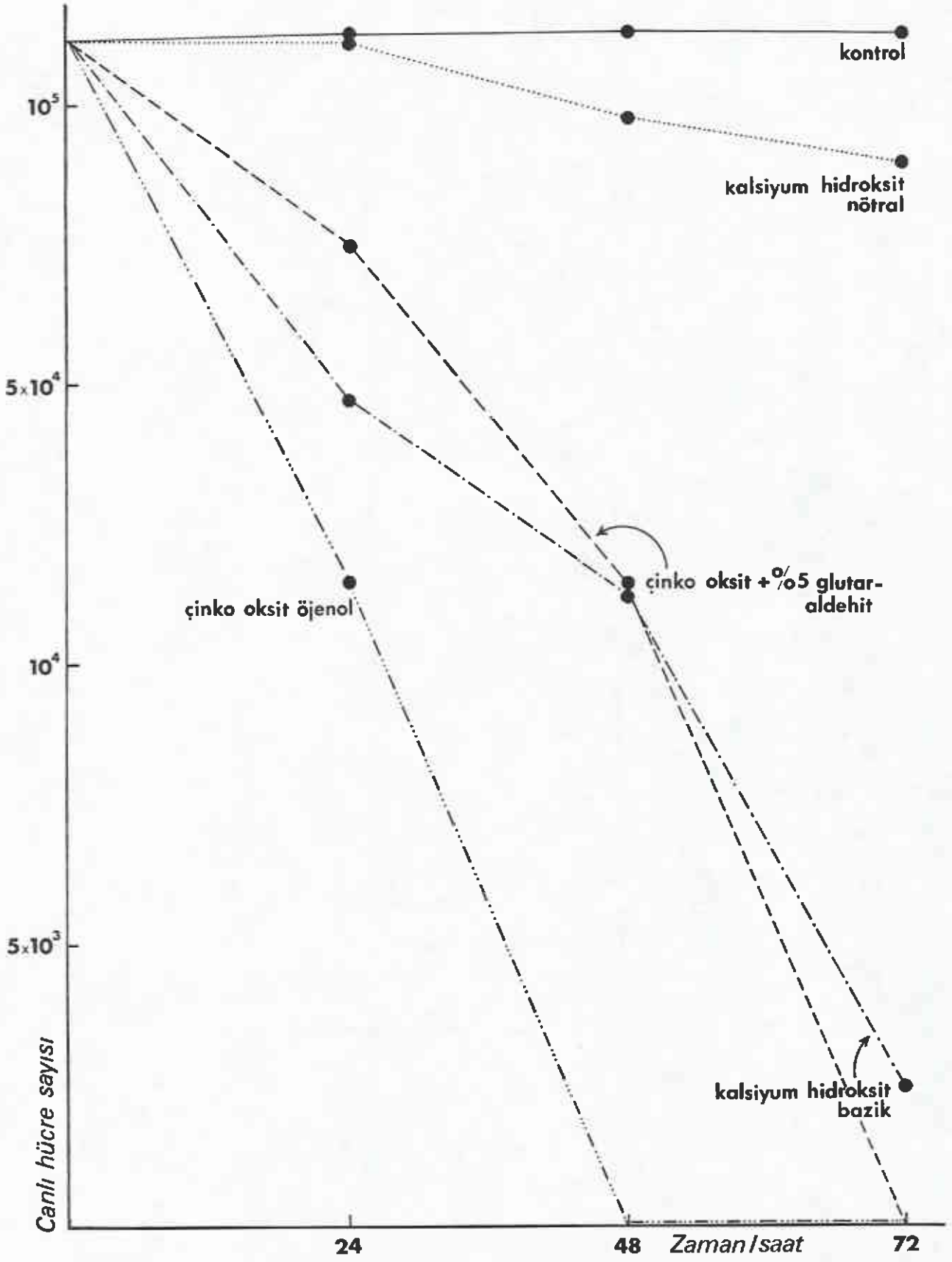
Tablo 2: Kaplama maddelerinin agar kat yöntemi ile MEF hücreleri üzerindeki etkinliğinin cevap indeksi.

Tablo 2 de de görüleceği gibi çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı kullanıldığında cevap indeksinde fazla etkinlik görülmemektedir. Çinkooksit öjenol karışımı ise toksik etki yönünden ikinci sırayı almakla beraber cevap indeksinde zon oluşumu ve erime indeksi yönünden en toksik etkili maddenin kalsiyum hidroksit olduğu saptanmıştır. Kontrol olarak alınan grublarda ise üreme normal şekilde devam etmiştir.

Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde kaplama maddeleri ayırışım solüsyonlarının etkinlikleri canlı hücre sayımı ile saptandığında elde edilen sonuçlar Şekil 1 de grafik halinde gösterilmektedir.

Şekilde de görüleceği gibi normal kontrol hücre sayımı 24, 48 ve 72. saatlerde hemen hemen aynı düzeyde kalmaktadır. Kontrol hücre sayımına en yakın sayım veren ve hücre canlılığına en az toksik etki yapan madde nötralize edilen kalsiyum hidroksit ayırışım solüsyonu bulunmuştur. Buna karşın nötralize edilmemiş bazı kalsiyum hidroksit ayırışım solüsyonu 72 saat içerisinde canlı hücre sayısını hemen hemen 2 log. (logaritma) azaltmaktadır. Ayrıca çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımından elde edilen solüsyon ile 48 saatte yaklaşık 1 log. luk azalma görülmekle beraber 48 saatten sonra hücreler tamamıyla canlılığını yitirmektedir. Çinkooksit öjenol ayırışım solüsyonu ise hücrelerin canlılığı üzerinde en fazla toksik etkiye neden olmaktadır.

Fare embriyosu fibroblast hücrelerinin DNA sına giren radyoaktif ³H-timidin miktarının sayılarak kaplama maddeleri ayırışım solüsyonlarının etkinliklerinin incelendiği deneyin sonuçları Tablo 3 de ifade edilmektedir.



Şekil 1: Kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının MEF hücreleri üzerindeki etkinliğinin canlı hücre sayımı ile saptanması.

Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları	3. saat	6. saat	22. saat
Kalsiyum hidroksit nötrelize	0,29	0,52	0,51
Kalsiyum hidroksit bazik	0,18	0,12	0,65
Çinkooksit öjenol	0,0096	0,015	0,18
Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit	0,16	0,29	0,35

Tablo 3: Kaplama maddeleri ayrışım solüsyonlarının MEF hücrelerinin DNA sentezine olan etkinliğinin gösterilmesi. (Tablo da verilen değerler kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları ile muamele edilmiş hücrelerdeki radyoaktivite sayımının kontrol hücrelerindeki sayıma oranının ifadesidir.)

Tabloda görüleceği gibi 3. saatte kaplama maddeleri ayrışım solüsyonları ile muamele edilmiş hücre DNA sentezleri kontrol ile karşılaştırıldığında nötrelize kalsiyum hidroksitin diğer maddelerden daha az oranda DNA sentezini inhibe ettiği görülmektedir. Bunu bazik kalsiyum hidroksit ve çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit ayrışım solüsyonları takip etmektedir. Ancak çinkooksit öjenolün DNA sentezi üzerine olumsuz etkisi diğer üç maddeye oranla oldukça fazladır.

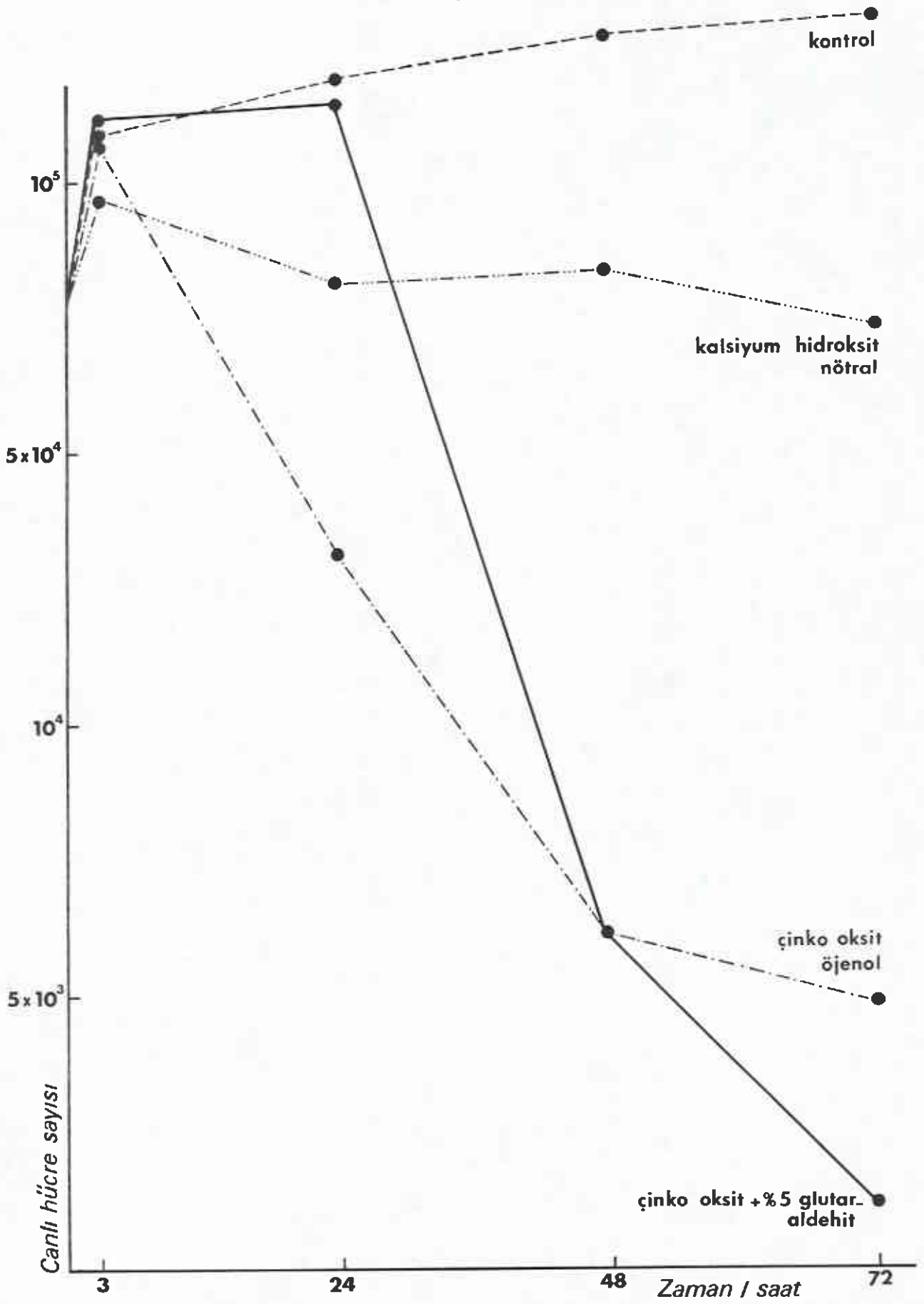
6. saat sonuçları incelendiğinde yine nötrelize kalsiyum hidroksit DNA sentezini olumsuz yönde diğer üç örnekten daha az etkilemektedir. Bu maddeyi daha sonra çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit ayrışım solüsyonu takip etmektedir. Yine 6. saatte çinkooksit öjenolün kontrol ile oranlandığında DNA sentezini önemli derecede engellediği görülmektedir.

22. saatte bazik kalsiyum hidroksit ve nötrelize kalsiyum hidroksit arasında DNA sentezini inhibisyon yönünden fazla fark olmamakla beraber diğer iki örneğe oranla daha iyi sonuçlar vermişlerdir. Genel olarak değerlendirildiğinde nötrelize kalsiyum hidroksitin diğer üç örneğe oranla DNA sentezini en az inhibe ettiği söylenebilir. Bunu sırayla çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit, bazik kalsiyum hidroksit ve çinkooksit öjenol ayrışım solüsyonları takip etmektedir.

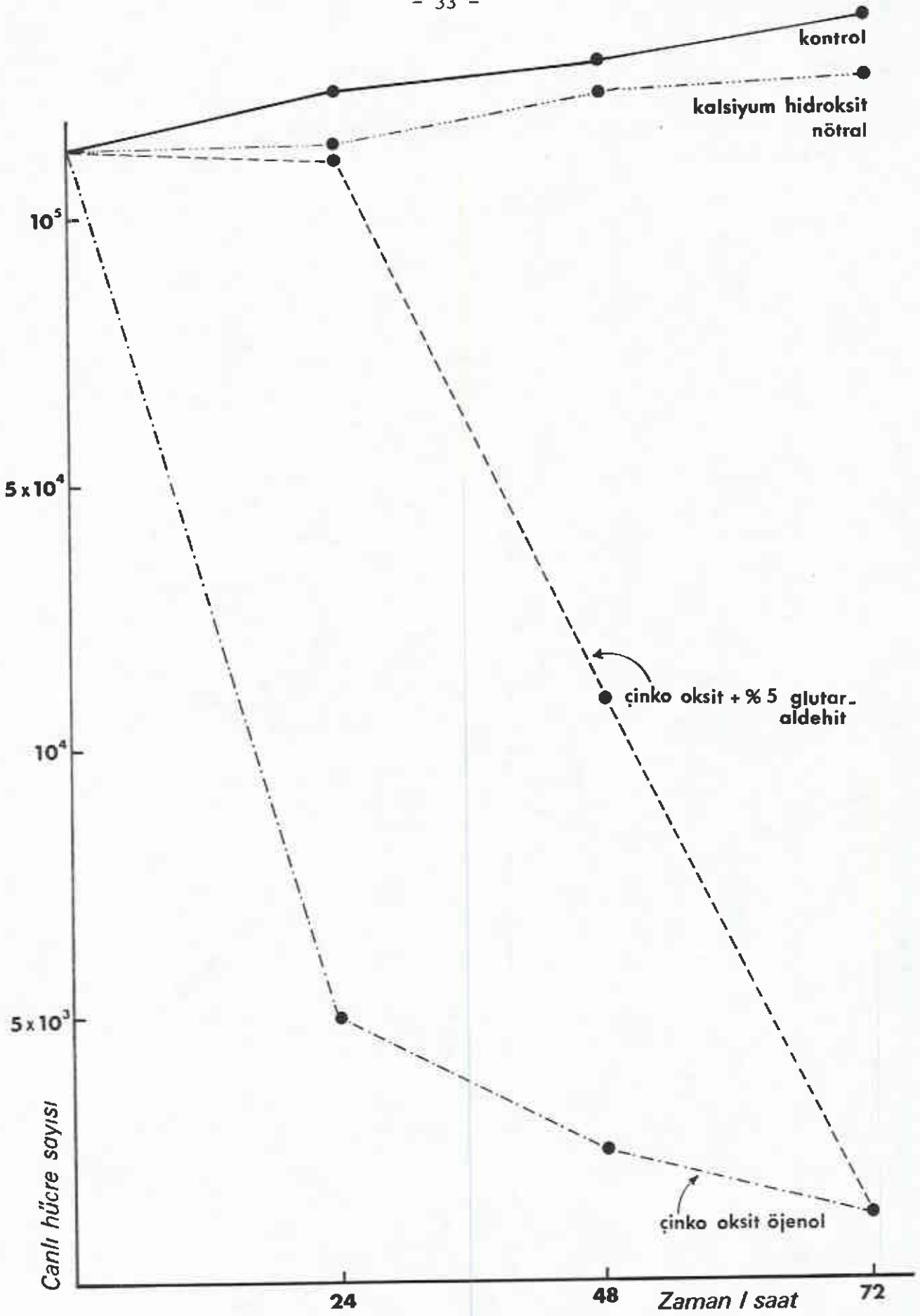
B. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer (HEL) fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların bulguları:

Canlı hücre sayımı yöntemi ile kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının insan pulpa hücreleri üzerindeki etkinliklerini incelediğimiz araştırmanın sonuçları Şekil 2 de grafik halinde görülmektedir. Şekilden de görüleceği gibi nötralize ettiğimiz kalsiyum hidroksit ayrışım solusyonu ile muamele edilmiş hücreler 72 saatlik inkübasyon süresince kontrol hücrelerine en yakın şekilde canlı olarak varlıklarını sürdürmektedirler. Çinkooksit öjenol ise 48 saat içerisinde canlı hücre sayısında 2 log. a yakın azalmaya neden olmaktadır. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit ayrışım solusyonu ise yine ilk 24 saat içerisinde kesinlikle hücreler için toksik etki göstermemekte ancak ondan sonraki 48 saat içerisinde 2 log. canlı hücre azalmasına neden olmaktadır. 72 saatlik periyoda yaklaştıkça gerek çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit gerekse çinkooksit öjenol ayrışım solusyonlarının nötralize kalsiyum hidroksite oranla bariz bir şekilde hücreler için daha toksik olduğu tesbit edilmiştir.

Kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının canlı hücre sayımı yöntemi ile insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri üzerindeki etkinliklerini araştırdığımız çalışmanın sonuçları grafik halinde şekil 3 de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi canlı hücre sayımı yönünden kontrole en yakın sonuç veren madde nötralize ettiğimiz kalsiyum hidroksitdir. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit ayrışım solusyonu hücre canlılığını ilk 24 saat içinde engellemekte ancak 72 saatlik inkübasyon sonucunda 2 log. azalmaya neden olmaktadır. Çinkooksit öjenol ise ilk 24 saatte canlı hücre sayısını süratle 1,5 log. azaltmakta ve bu etkinlik 72 saatte 2 log. a erişmektedir. Deney canlı hücre sayımı yönünden değerlendirildiğinde kalsiyum hidroksitin diğer iki kaplama maddesine oranla üstünlük taşıdığı görülmektedir.



Şekil 2: Kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının insan pulpa hücreleri üzerindeki etkinliğinin canlı hücre sayımı ile saptanması.



Şekil 3: Kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının insan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri üzerindeki etkinliğinin canlı hücre sayımı ile saptanması.

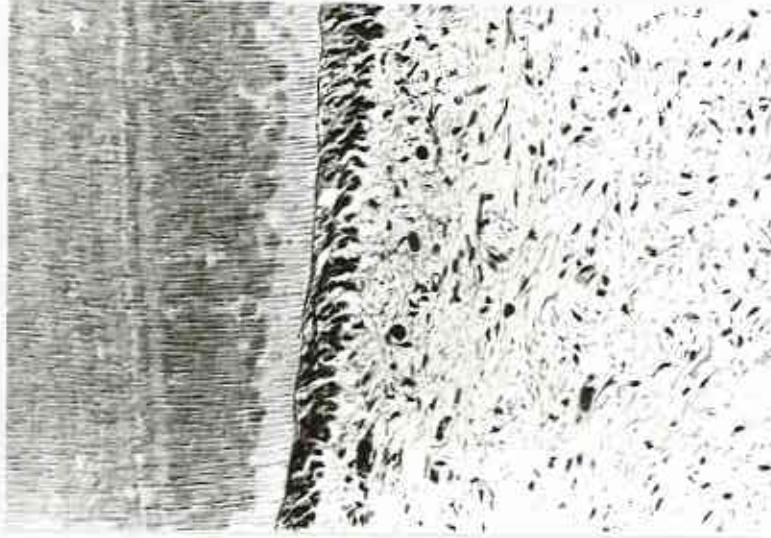
2- Klinik Çalışma Bulguları:

A- Radyolojik Bulgular:

Deney süremizi en fazla 28 gün ile kısıtladığımızdan açığa ortaya çıkan yöntemle elde ettiğimiz filmlerde radyolojik olarak yeni dentin yapımı ve periapikal dokularda patolojik bir oluşum tesbit edilmemiştir.

B- Histopatolojik Bulgular:

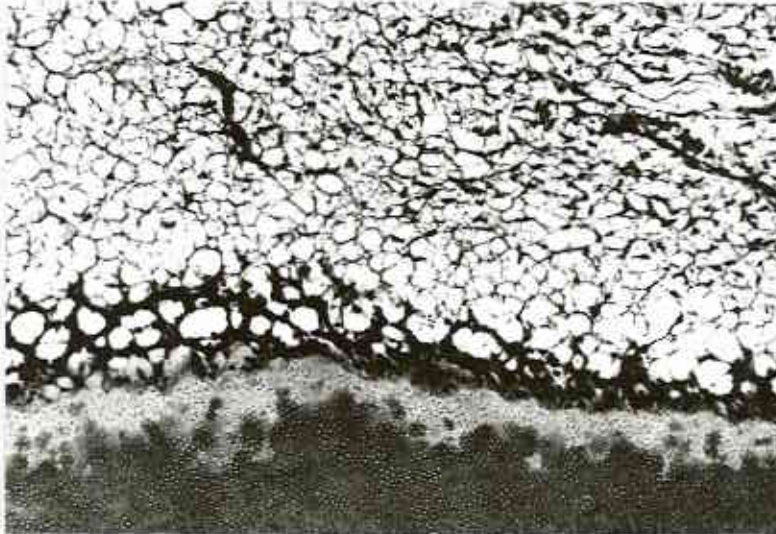
Kontrol Grubu: Hiçbir işlem uygulanmamış çürüksüz, canlı 3. molarlardan alınan örneklerin ışık mikroskopunda yapılan incelemesinde normal pulpa, dentin dokusu ve odontoblast hücreleri görülmektedir (Resim 4).



Resim 4: Normal pulpa, dentin dokusu ve odontoblast hücreleri. H.E.X200

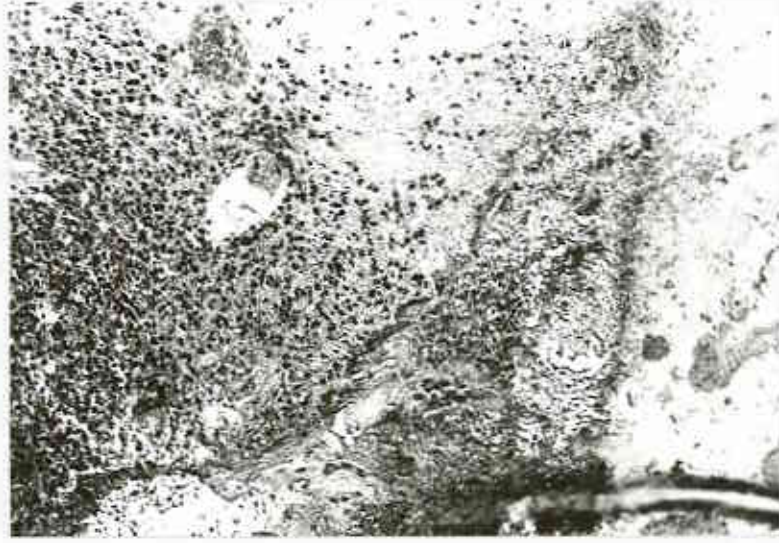
Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımı ile ilgili histopatolojik bulgular:

Direkt kaplama işleminden 2 gün sonra alınan örneklerde ekspoz pulpa bölgesinde harab olan dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa ve odontoblastlar görülmektedir (Resim 5).



Resim 5: Dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa ve odontoblastlar H.E.X 200

Dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa dokusu içinde dağılma kanama, pulpayı oluşturan mezensimal hücrelerde piknotik çekirdekler ve sitoplazmalarında geniş vakuoller tesbit edilmiştir. Bu bölgede kapillerler konjesyone yani eritrositlerle doludur. İlaveten pulpaya komşu koagülasyon nekrozu ve fibrin gözlenmiştir. Nekroz sahası yanında miks ve mononükleer iltihap hücrelerinden oluşmuş hücre toplulukları mevcuttur. (Resim 6).

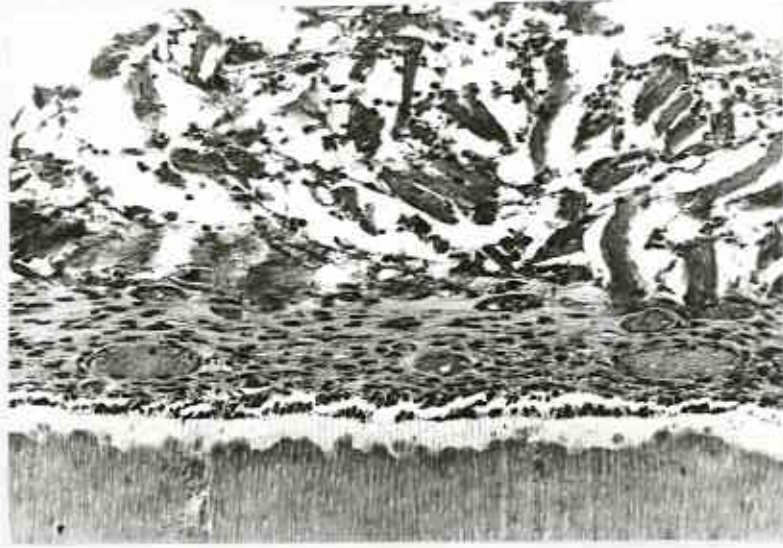


Resim 6: Nekroz sahası yanındaki lökosit ve mononükleer hücre toplulukları H.E. X 200.

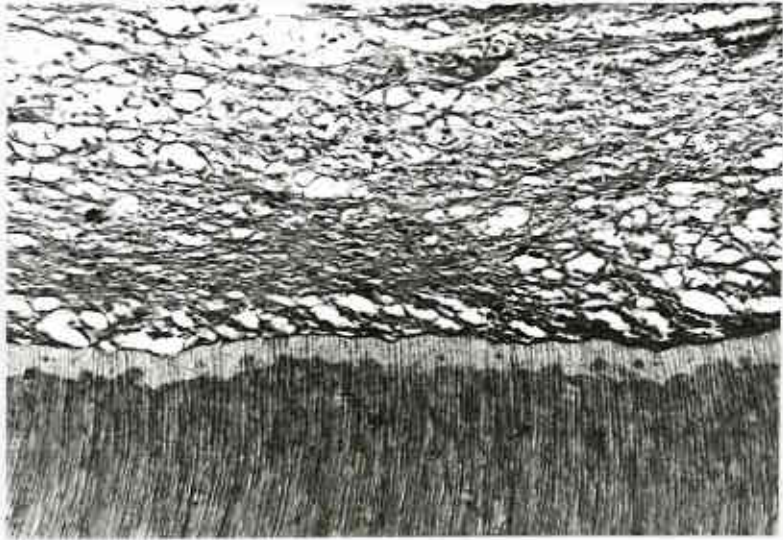
Ayrıca odontoblast hücrelerinin sitoplazmalarında büzölmeler ve dejeneratif değişikliklerde tesbit edilmiştir.

İşlemden 7 gün sonra alınan örneklerde ise kronal pulpa dokusunun ortadan kalktığı görölmekte, bölgede kırıntı halinde ölü hücre parçacıkları bulunmaktadır. Pulpaya komşu oldukça geniş bir sahayı ince bir şerit halinde işgal eden fibroblastlardan ve kapillerden meydana gelmiş granülasyon dokusu tesbit edilmiştir. Granülasyon dokusunun bir tarafında nekrotik madde diğer tarafında ise dentin vardır. Pulpa artıklarından oluşmuş olan nekrotik maddenin yanında kısmen organize olmuş fibrin kitlesi gözlenmektedir. Bundan başka granülasyon dokusunun dentine komşu bölgesinde yeni oluştuğu düşünölen odontoblast hücreleri mevcuttur (Resim 7)

Ancak bazı sahalarda hücreden fakir gevşek bağ dokusunun pulpayı örttüğü görölmektedir. Bu bölgede odontoblast hücreleri tamamen ortadan kalkmıştır (Resim 8).



Resim 7: Pulpaya komşu ince bir granülasyon dokusu. Granülasyon dokusunun bir tarafında pulpa artıklarından oluşmuş nekrotik madde diğer tarafında ise dentin mevcut. Ayrıca granülasyon dokusunun dentine komşu bölgesinde yeni oluştuğu düşünülen odontoblast hücreleri görülmekte H.E. X 200.



Resim 8: Odontoblast hücrelerinin ortadan kalktığı hücreden fakir gevşek bağ dokusu. H.E. X 200.

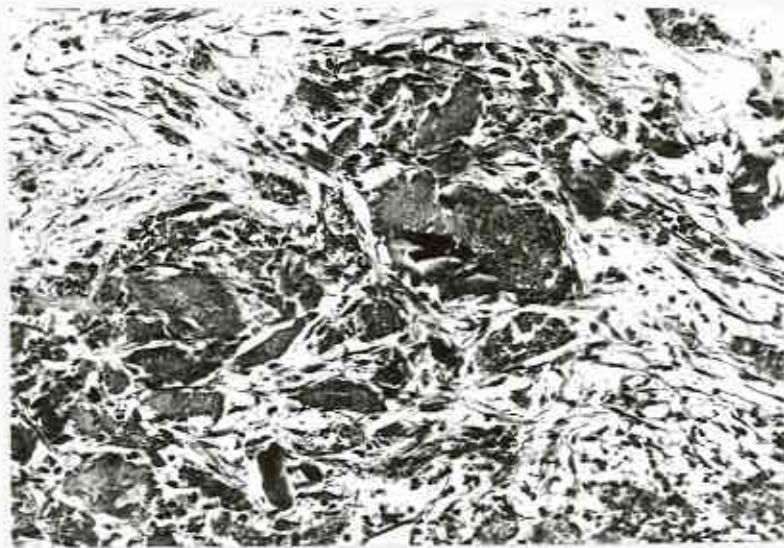
Ayrıca pulpayla komşu fibrin ve nekrotik odontoblast hücreleride sahada mevcuttur.

Direkt kaplama işleminden 14 gün sonra alınan örneklerde pulpa içinde harap olan bölgede gevşek bağ dokusu ve onların arasında dentin parçacıkları görülmektedir. (Resim 9).



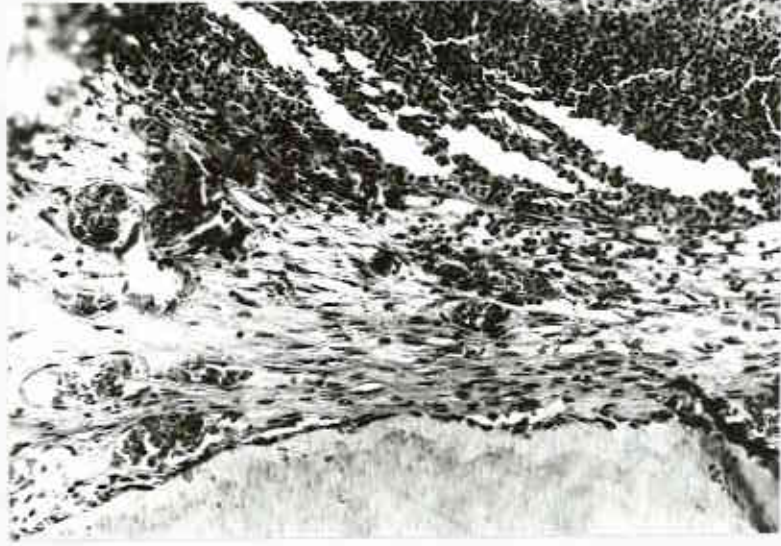
Resim 9: Gevşek bağ dokusu, dentin artıkları ve konjesyone kapiller.
H.E. X 75

Dentin parçacıkları etrafında az oranda iri fibroblasta benzer hücre aktivitesi tesbit edilmiştir. (Resim 10).



Resim 10: Fibroblasta benzer hücre aktivitesi. H.E. X 200.

Ayrıca nekroz ve doku artıkları ile komşu pulpa dokusu arasında ve ekspoz pulpa bölgesinin hemen dibinde kollajen ile kapillerden zengin granülasyon dokusu karakterinde ince bir fibröz bant görülmektedir. (Resim 11)



Resim 11: Nekroz ve doku artıkları ile komşu pulpa arasındaki kollajenden zengin ince fibröz bant. H.E. X 200.

Granülasyon dokusu bazı bölgelerde fibroblast hücrelerinden zengin iken bazı bölgelerde ise hücreden fakirdir. Buna ilaveten nekroz sahasına komşu bölgede polimorf çekirdekli lökositlerden ve mononükleer hücrelerden zengin iltihabi hücre toplulukları gözlenmiştir. Ayrıca konjesyone kapillerler ve az oranda damar dışı eritrositlerde mevcuttur.

İşlemden 28 gün sonra alınan örneklerde kavitenin açıldığı bölgeye komşu pulpa dokusunda hücre artıkları ve nekrozun etrafında mononükleer hücrelerden zengin topluluklar, konjesyone kapillerler ve bazı alanlarda geniş yer kaplıyan kanama belirtisi olan damar dışı eritrositler görülmektedir. (Resim 12).

Daha alt bölgelerde ise dentine komşu sahada yeni oluşan granülasyon dokusu ve yeni teşekkül etmekte olan odontoblast hücreleri sahaya hakimdir (Resim 13)

Ayrıca ekspoz pulpa bölgesinde görülen ve nekrotik madde içeren geniş boşluklar komşu pulpa dokusu içinde de tesbit edilmiştir. (Resim 14).



Resim 12: Ekspoz bölgesinde yerini koruyan nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyone kapillerler. H.E. X 75



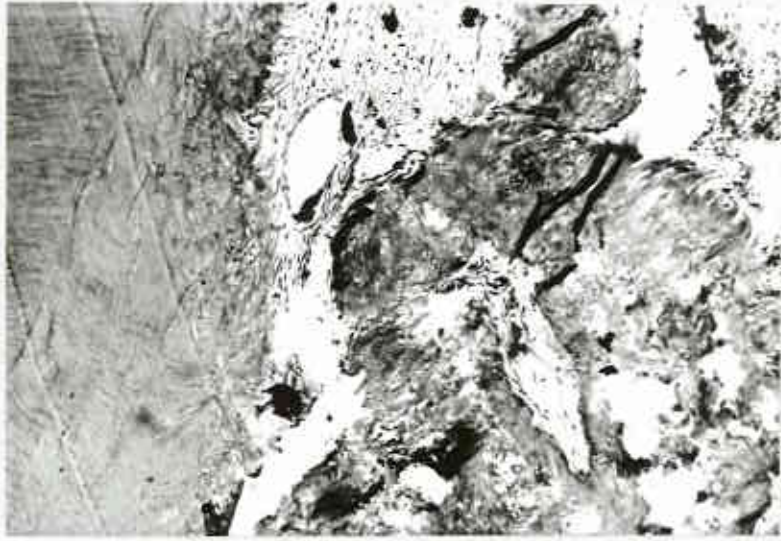
Resim 13: Yeni oluşan granülasyon dokusu ve odontoblast hücreleri. H.E. X 75



Resim 14: Sahada pulpa dokusu içindeki boşluklar. H.E. X 75

Çinkooksit öjenol ile ilgili histopatolojik bulgular:

Direkt kaplama işleminden 2 gün sonra alınan örneklerde ekspoz pulpa bölgesinde nekroz,dejenere dentin parçacıkları ve dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa mevcuttur. (Resim 15).



Resim 15: Nekroz, dejenere dentin parçacıkları ve dejeneratif pulpa. H.E. X 75.

Kronal pulpa dokusunun koagule olup nekroze olduğu ve sahanın bol miktarda damar dışı eritrositle dolduğu görülmektedir. Hadisenin özellikle dentinle komşu olan bölgelerde belirgin olmak üzere daha derinlere indiği tesbit edilmiştir. Bazı kesitlerde ise sahada dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa karşı tarafda fibrin ve aralarında mononükleer hücre bandı görülmektedir, kapillerler konjesyonedir. (Resim 16).



Resim 16: Dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa, fibrin, mononükleer hücre bandı ve konjesyone kapillerler. H.E. X 75.

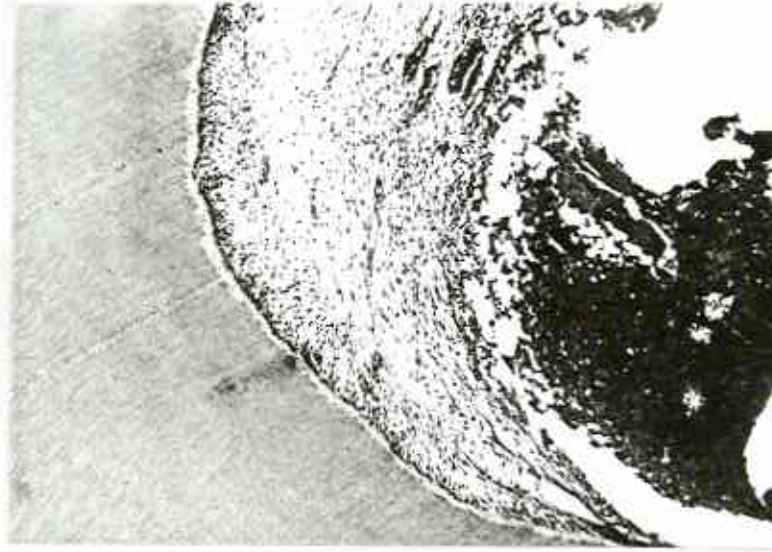
İlave olarak normal pulpa ile nekrotik saha arasında monosit ve lökositlerden oluşan hücre grublaşması vardır.

İşlemden 7 gün sonra alınan örneklerde özellikle nekrotik sahanın büyük oranda temizlendiği ve yerine boşluk bıraktığı gözlenmiştir. Ancak sağlam kalan pulpaya komşu bölgede az oranda nekrotik madde tesbit edilmiştir. Ayrıca ekspoz pulpa bölgesinde parçalanmış dentin, dejeneratif değişiklikler gösteren pulpa, fibrin, miks ve mononükleer iltihabi hücre toplulukları görülmektedir. (Resim 17)



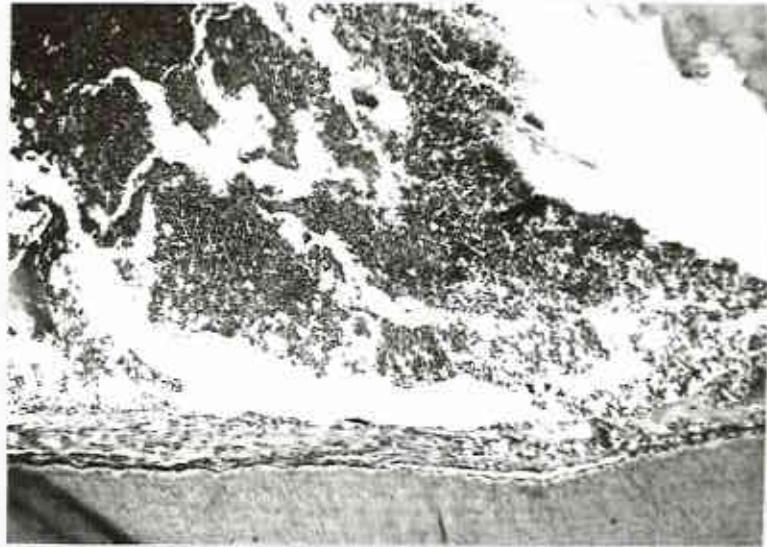
Resim 17: Parçalanmış dentin, dejeneratif pulpa, fibrin ve mononükleer hücre toplulukları. H.E. X 75.

Bundan başka ekspoz pulpa bölgesinin başka bir sahasında kısmen normal pulpa ve orta bölgede nekroz tesbit edilmiştir. (Resim 18).



Resim 18: Kısmen normal pulpa ve nekroz. H.E. X 75.

Direkt kaplamadan 14 gün sonra alınan örneklerde pulpa boşluğunun orta kısımlarında geniş nekroz ile birlikte mononükleer hücrelerden meydana gelmiş iltihabi hücre toplulukları görülmektedir. Diğer tarafta dentine komşu bölgede ince şerit halinde yeni oluşan granülasyon dokusu tesbit edilmiştir. (Resim 19).



Resim 19: Geniş nekroz, mononükleer hücreler ve granülasyon dokusu. H.E. X 75.

Bundan başka sahada dentin parçacıkları ve hiperemik kapillerler bulunmaktadır, ancak odontoblastik hücre aktivitesi mevcut değildir. (Resim 20).

Ayrıca normal pulpaya komşu nekrotik artıklar ve fibrin tesbit edilmiştir.

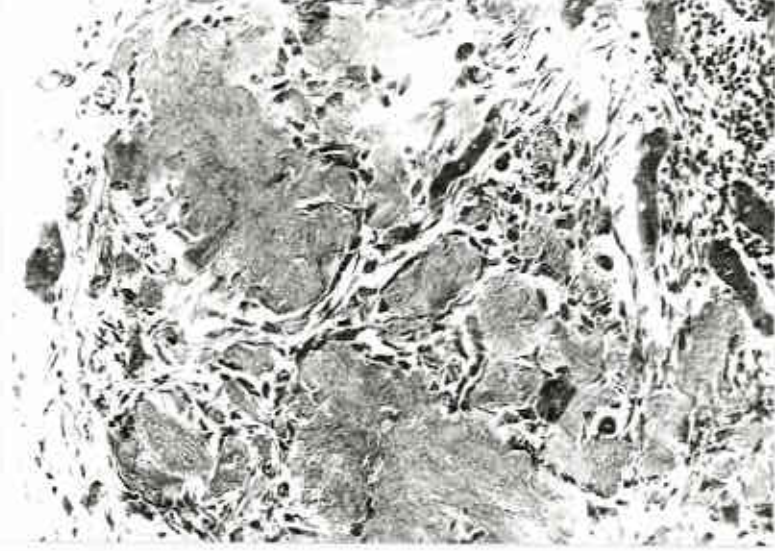


Resim 20: Granülasyon dokusu, nekroz ve dentin parçacıkları. H.E.X 200.

İşlemden 28 gün sonra alınan örneklerde kronal pulpa dokusundan başlayıp daha derinlere doğru giden kapillerden zengin mononükleer iltihabi hücre toplulukları nekroz ve fibrosis görülmektedir. Ayrıca ekspoz pulpa sahasında yeni oluşmuş iki geniş amorf dentinoid karakterde yapı ve etrafında onu oluşturan mezşimal hücre aktivitesi tesbit edilmiştir. (Resim 21, 22).



Resim 21: Hücre infiltrasyonu, fibrosis ve pulpa bölgesinde iki geniş dentinoid yapı. H.E. X 30.



Resim 22: Yeni oluşmuş dentinoid yapı ve mezensimal hücre aktivitesi.
H.E. X 200.

Bazı bölgelerde ise predentinde kalınlaşma şeklinde dentine ilave kom-
şu yeni amorf dentinoid yapı gözlenmiştir. (Resim 23).

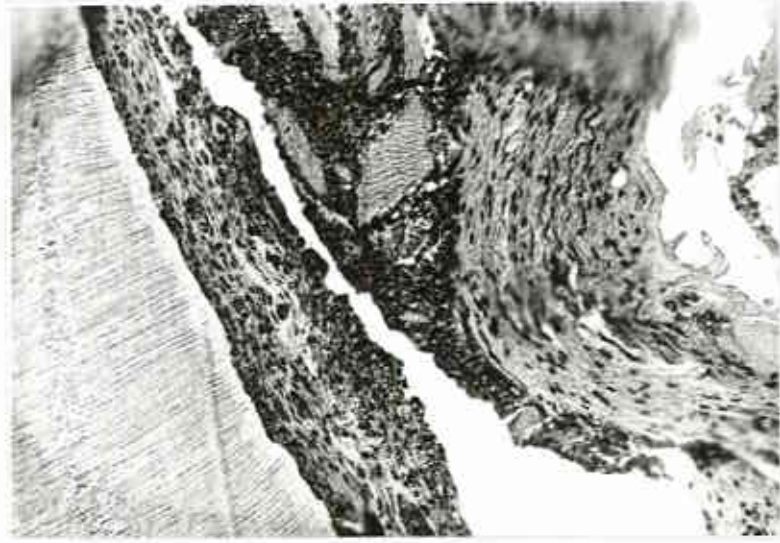


Resim 23: Dentine ilave komşu yeni dentin yapımı. H.E. X 200.

Yani yukarıda sözü edilen dentinoid yapı dentin üzerinde de oluşmuştur.
Bu odakların etrafında fibroblastlardan zengin kapillerleri hiperemik granülasyon
dokusu mevcuttur.

Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile ilgili histopatolojik bulgular :

Direkt kaplamadan 2 gün sonra alınan örneklerde sahada az oranda nekroz, buna eşlik eden iltihap hücreleri, kanama, fibrin, dentin kırıntıları ve dentinin kendisi görülmektedir. (Resim 24).



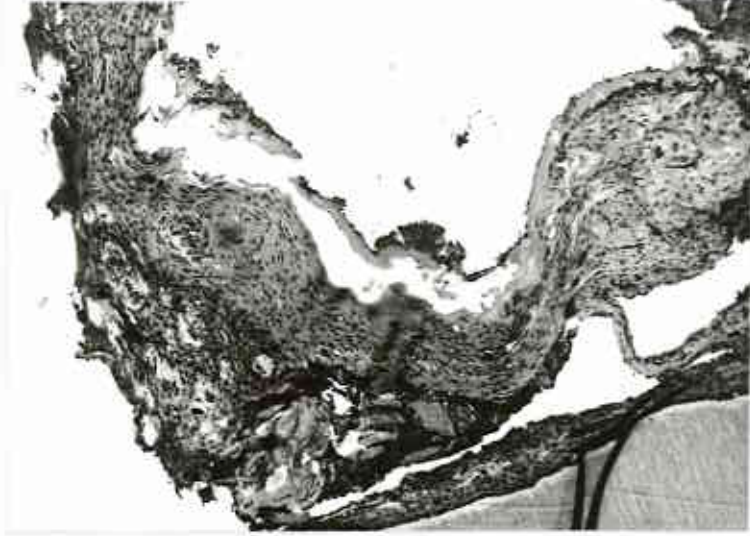
Resim 24: Dentin kırıntıları, dentinin kendisi ve granülasyon dokusu. H.E. X 200.

Kanama, pulpanın derinlerine inmekte ve damarlar konjesyone görünümündedir. Nekroz ve harab bölge ile normal pulpa arasında fibroblastik aktivite tespit edilmiştir. (Resim 25).



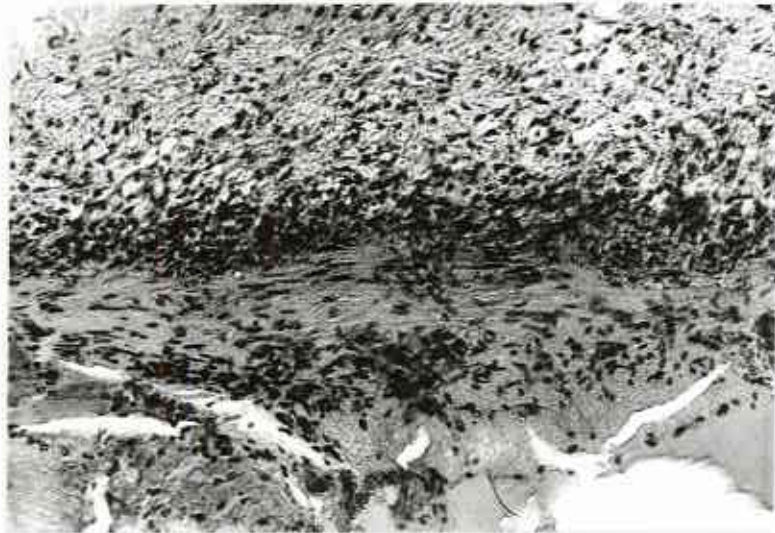
Resim 25: Sahadaki fibroblastik aktivite. H.E. X 200.

Ayrıca ekspoz pulpa bölgesinde kollagen ve fibroblastlardan meydana gelmiş yer yer geniş ve ince şeritler halinde sahayı kaplıyan yeni oluşmuş granülasyon dokusu mevcuttur. İlaveten granülasyon dokusu hücreleri yavaş yavaş odontoblastlara dönüşmektedir. (Resim 26).



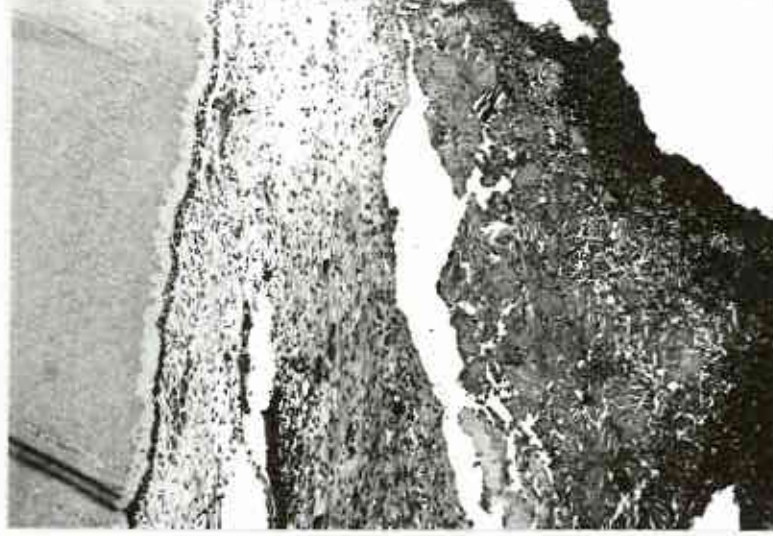
Resim 26: Yer yer geniş ve ince şeritler halinde yeni oluşmuş granülasyon dokusu. H.E. X 75.

İşlemden 7 gün sonra alınan örneklerde normal pulpa dokusuna komşu kanama ve fibrin görülmektedir. Bu fibrin ile normal pulpa dokusu arasında fibroblast hücrelerinden meydana gelmiş ince bir organizasyon sahası ve mononükleer hücre infiltrasyonu tesbit edilmiştir. (Resim 27).



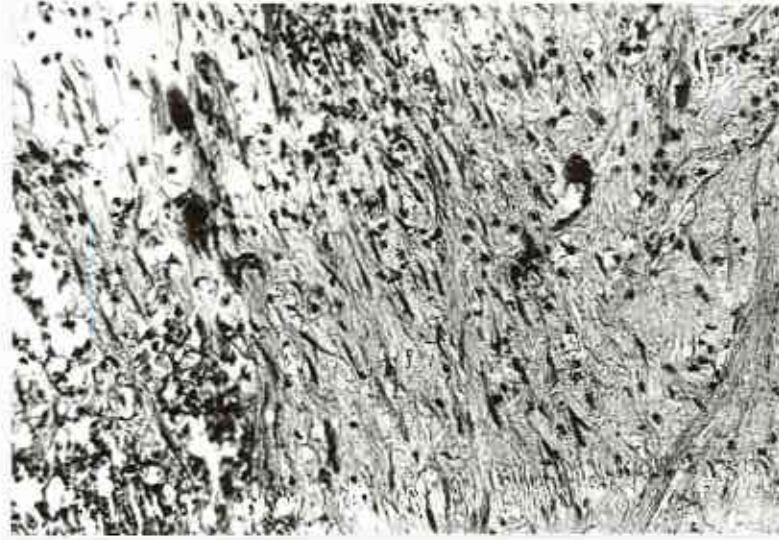
Resim 27: Organizasyon sahası ve mononükleer hücre infiltrasyonu. H.E. X 200.

Lenfoplazmositer hücre alanları, az orandaki nekrozun yanında geniş saha işgal etmekte ve nekroz ile dentin arasında kapillerden zengin yeni oluşmuş belirgin bir granülasyon dokusu görülmektedir. (Resim 28).



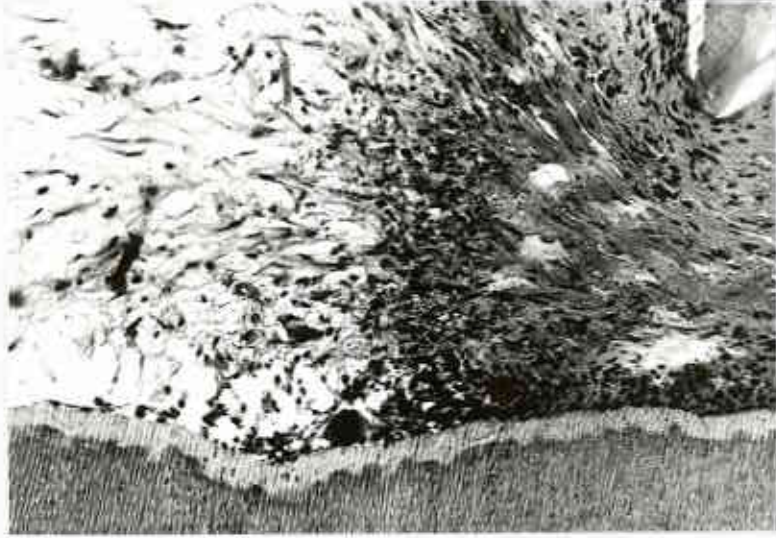
Resim 28: Yeni oluşmuş granülasyon dokusu. H.E. X 75.

İşlemden 14 gün sonra alınan örneklerde az oranda kanama, nekroz lenfoplazmositer hücre toplulukları ve bunların yanında oldukça geniş saha işgal ederek ekspoz pulpa bölgesine doğru ilerliyen genç fibroblast hücrelerinden zengin granülasyon dokusu görülmektedir. (Resim 29).

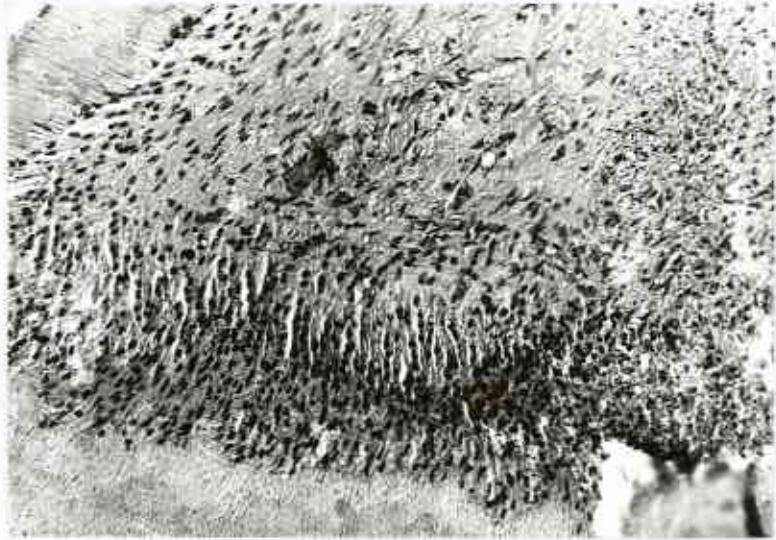


Resim 29: Granülasyon dokusu ve pulpa. H.E. X 200.

Granülasyon dokusu hücreleri yavaş yavaş pulpa dokusu hücrelerine dönüşmekte ve ekspoz pulpa bölgesine doğru uzanmaktadır. Ayrıca sahada yeni oluşmuş odontoblastlarda görülmektedir. İlaveten pulpa odasının orta kısımlarında fibrin tesbit edilmiştir. (Resim 30, 31).



Resim 30: Dentin, pulpa ve granülasyon dokusu ilişkisi. Ayrıca yeni oluşmuş odontoblast hücreleri. H.E. X 200.



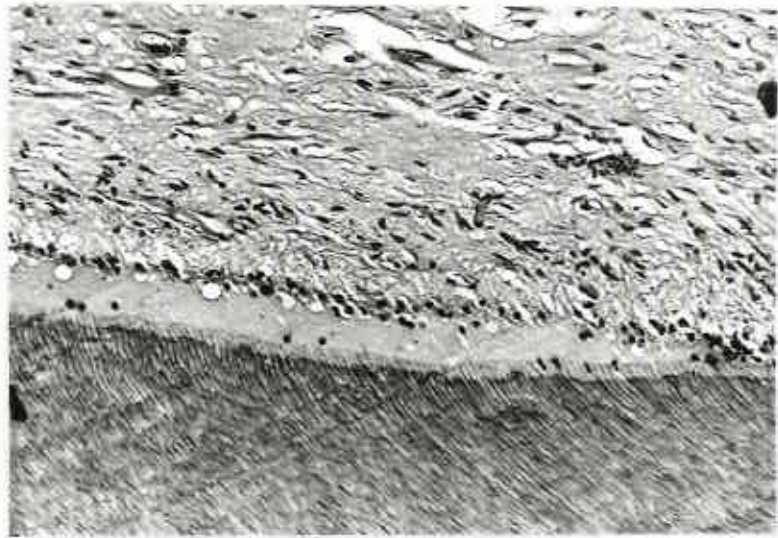
Resim 31: Granülasyon dokusu ve yeni oluşmuş odontoblast hücreleri. H.E. X 200.

Direkt kaplamadan 28 gün sonra alınan örneklerde hala mevcut olan fibrinin yanında mononükleer hücre grublarının çevrelediği kapillerden zengin granülasyon dokusu pulpayla komşu olarak görülmektedir. (Resim 32).

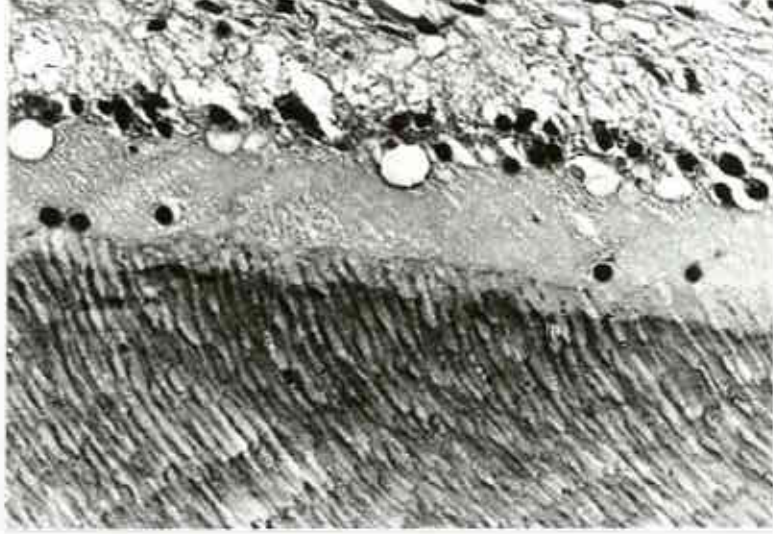


Resim 32: Kapillerden zengin granülasyon dokusu. H.E. X 200.

Granülasyon dokusu hücreleri hem pulpa dokusu hücrelerine hem de odontoblast hücrelerine dönüşmektedir. Bunun sonucunda sahada granülasyon dokusundan kaynaklanan strüktüre olmuş yeni tamir dentin yapımı gelişmiştir. (Resim 33,34).

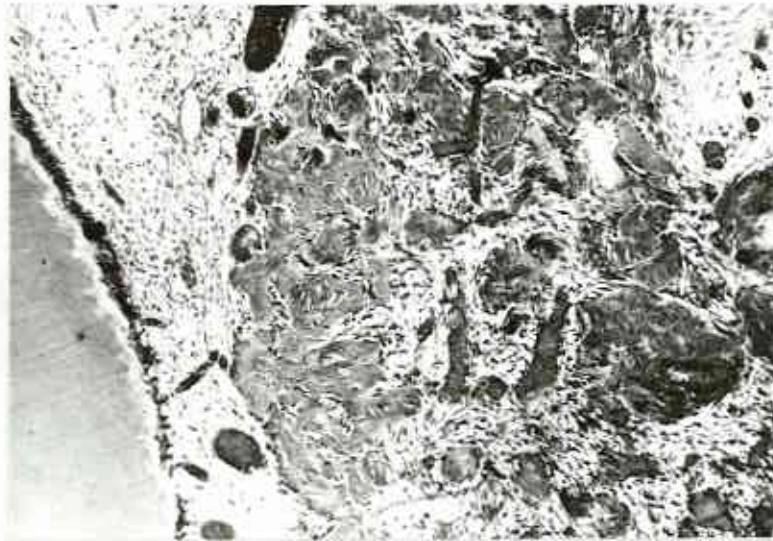


Resim 33: Kısmen strüktüre olmuş yeni tamir dentini (Tersiyer dentin) ve odontoblast hücreleri. H.E. X 200.



Resim 34: Resim 33 deki bölgenin büyütülmüş hali. H.E. X 480.

Ayrıca granülasyon dokusunun ortasında muhtemelen harab olmuş bölgeye dökülmüş olan dentin kırıntılarındaki hücresel aktiviteden kaynağını almış dentinoid karakterde yeni dentin adacıkları görülmektedir. (Resim 35).



Resim 35: Yeni hücresel aktivite ve yeni dentinoid yapı. H.E. X 75.

V - T A R T I Ő M A

Bugünkü bilgilerimize göre çürük, dentin içerisine girdikten sonra esas olarak iki problemle karşı karşıya bulunmaktayız. Şöyleki pulpanın etkilenmeyen bir madde ile kaplanması (maddenin biyolojik olarak kabul edilebilir reaksiyonu) ve pulpa-dentin sistemi üzerindeki bakteriyel toksik etkileri önlemek için koruyucu izolasyonun yapılmasıdır⁽⁶⁶⁾.

Bizim çalışmamızda da üç değişik pulpa kaplama maddesinin etkileri hem hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulguların hemde klinik deneyleri takiben elde edilen radyolojik ve histopatolojik bulguların ışığında incelenmiştir.

Dişhekimliği maddelerinin biyolojik ölçütler içerisinde çok önemli yöntemlerden biri olan invitro araştırılması doku kültür yöntemlerinin devamlı gelişmesi nedeniyle ön plana çıkmıştır. İnvitro olarak doku kültürlerinde uygulanan yöntemler invivo deneylere göre daha kolay kontrol edilebilen test şartlarına ve daha büyük istatistiksel doğruluklara imkan vermektedir⁽⁷⁷⁾.

Araştırmamızda agar-kat yönteminde olduğu gibi üç değişik pulpa kaplama maddesini fare embriyonik fibroblast hücreleri ile direkt münasebet halinde bıraktığımızda en toksik etkiyi pH 5 tarafımızdan düzeltilmemiş bazik kalsiyum hidroksit kaplama maddesi göstermiştir. Gängler'de⁽⁷⁸⁾ kalsiyum hidroksitin primer etkisinin çinkooksit öjenole kıyasla daha fazla olduğunu belirtmekte bu da bizim elde ettiğimiz sonuç ile paralellik göstermektedir. Agar-kat yöntemiyle yapılan deney sonucunda en fazla hücre dostu olarak çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı tesbit edilmiştir.

Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde gerek canlı hücre sayımı gerekse hücre DNA sentezi yönünden kaplama maddelerinin etkinliğini incelediğimizde çinkooksit öjenol en olumsuz sonucu vermiştir. pH 5 tarafımızdan düzeltilmemiş bazik kalsiyum hidroksit ile çinkooksit öjenolünkine yakın toksik etki gözlenirken nötrale ettiğimiz kalsiyum hidroksit ile kontrole yakın olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Gerçekten yapılmış birçok araştırma biyolojik doku cevapları yönünden incelendiğinde her zaman çinkooksit öjenolün daha fazla yıkıcı potansiyele sahip olduğu görülmüştür^(36,55,79).

Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde bazik kalsiyum hidroksit hücre metabolik faaliyetleri için gerekli olan nötral pH yı bozmakta bu da hücreler üzerine tıpkı asidik pH da olduğu gibi toksik etki yapmaktadır. Kawahara ve arkadaşlarına⁽⁷⁷⁾ göre asidik değerlerin ifadesi olan pH değerlerinin yerinden oynaması ile maddeler sitotoksik etkiye neden olmaktadır. Hücrelerin uzun süre kuvvetli asit etkisi altında kalması hücrenin zarara uğramasının esas faktörüdür. Gene aynı araştırmacılar tarafından, karıştırmadan 24 saat sonraki kalsiyum hidroksitin hücre kültürlerine tatbikinden sonraki 20 dakika içinde hücrelerde büyük sitoplazmik kabarcıklara ve dejenerasyonlara neden olduğu tesbit edilmiştir. Kalsiyum hidroksit patı varken pH değerleri alkali tarafa doğru değişmektedir. Gerçekten pH nın etkisi deneylerimizin sonuçlarında da açıkça görülmektedir. Kalsiyum hidroksitin pH sını nötral duruma getirdiğimizde fare embriyonik fibroblast, insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürlerinde kontrole yakın en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Ancak kalsiyum hidroksitin bu alkali etkisi doku cevabı yönünden incelendiğinde nasıl bir gelişme takib etmektedir ? Kalsiyum hidroksit ekspoz pulpa üzerine direkt konduğunda pH sı kısa sürede nötral tarafa doğru kaymaktadır. Çünkü kalsiyum hidroksit kanın bikarbonat tamponlarıyla reaksiyona girmekte ve böylelikle etrafında kalsitden (CaCO_3) yapılmış ve pH sı 8,8 olan bir membran oluşmaktadır. Bu bulut formundaki yapı kalsiyum hidroksitin tesir gücünü ve tesir sahasını azaltmaktadır. Bu yapı zamanın kare köküyle orantılı bir biçimde gelişmektedir⁽⁴³⁾. Ayrıca kalsiyum hidroksitin kanamayı durdurucu özelliği yoktur⁽⁷⁸⁾. Bu nedenle böyle bir birleşmenin oluşması her zaman beklenebilir.

Çinkooksit öjenolün fare embriyonik fibroblast hücrelerinde olduğu gibi insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücreleri üzerinde de toksik etkiye sahip olduğu yaptığımız çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde Spangberg ve arkadaşları da⁽⁵³⁾ gerek taze hazırlanmış gerekse 4 haftalık çinkooksit öjenolün invitro sistemde bütün HeLa hücrelerini tahrib ettiğini göstermişlerdir.

Fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile bazik kalsiyum hidroksitten daha iyi sonuçlar alınmıştır. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ortak komponentleri olmasına rağmen çinkooksit öjenol kadar sitotoksik etki göstermemektedir. Bunun sonucunda da öjenolün toksik etkiye neden olduğu söylenebilir. Öjenolün pulpa ve paradontal dokuyla direkt kontakt halinde bırakıldığında koagüle edici ve hafif iltihab oluşturuucu etki yaptığı tesbit edilmiştir⁽⁸⁰⁾. Ayrıca Klaiber ve arkadaşları⁽⁸¹⁾ tarafından

insan yanak mukozası fibroblast hücre kültüründe yapılan deneyler sonucunda öjenolün kuvvetli bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İnsan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücrelerinde yaptığımız deneylerde de çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımının çinkooksit öjenol kadar yıkıcı bir potansiyele sahip olmadığı görülmüştür. Gene fare embriyonik fibroblast hücre kültürlerinde kaplama maddelerinin hücre DNA sentezi üzerine olan etkinliklerini incelediğimiz çalışmada kontrole en yakın sonucu nötralize edilmiş kalsiyum hidroksitten sonra çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı vermiştir.

Özetle fare embriyonik fibroblast, insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast hücre kültürlerinde elde ettiğimiz sonuçlar arasında bir paralellik gözlenmekte ve çinkooksit öjenol sitotoksik etki açısından birinci sırada yer almaktadır. Ayrıca kaplama maddeleri ayrışım solusyonlarının hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde kontrol grublarını aşacak şekilde arttırıcı etki yapmadıkları tesbit edilmiştir.

Ancak en genel anlamda düşünüldüğünde hücre kültürü testleriyle az veya çok sitotoksik görülen bir kanal dolgu maddesi, bir kaplama maddesi ya da bir dolgu maddesi klinik uygulamalarda iyi sonuçlar verebilmektedir. Demek ki bir diş tedavisinin başarısında kullanılan maddenin doku uygunluğu tek başına sonuç üzerinde tamamıyla etkili değildir. En başta belirttiğimiz gibi başarıyı birçok sayıda önemli faktör tayin etmektedir. Ancak hücre kültürü çalışmalarıyla maddenin doku uygunluğu ve akut lokal toksisitesi ortaya çıkacağından bunların anlamı da küçük görülemez.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise aynı kaplama maddelerine karşı pulpa dentin sisteminin bir bütün halinde reaksiyonları incelenmiştir.

Araştırmamızda kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde kanama, konjesyone kapillerler damar dışı eritrositler ve iltihabi hücre infiltrasyonları tesbit edilmiştir. Benzer şekilde Kolimetschkowa'da⁽⁸²⁾ pulpalari ekspoz edilip kalsiyum hidroksit tatbik edilen köpek dişlerinde damar genişlemesi ve hücre infiltrasyonu gibi primer reaksiyonlar gözlemiştir. Diğer yandan pulpalari ekspoz edildikten sonra ağız sıvısıyla 3-5,5 saat kadar ilişkide bırakılmış maymun dişlerine dycal ile direkt kaplama yapılmış benzer iki araştırmada ise histolojik olarak iltihap gözlenmediği gibi bir baştan bir başa uzanan dentin köprüleri tesbit edilmiştir^(83,84).

Gene kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde polimorf çekirdekli lökositlere ve mononükleer hücrelere komşu nekroz sahaları mevcuttur.

1974 yılında yapılmış bir araştırma sonucunda kalsiyum hidroksitin pulpa yarasını nekrotize ettiği ancak dycal ile direkt kaplamadan sonra böyle bir durumun oluşmadığı tesbit edilmiştir⁽³⁹⁾. Kalsiyum hidroksitin pulpalari ekspoz dişlere tatbik edilmesiyle nekrotik zon oluşturduğu başka araştırmalarla da gösterilmiştir^(40,85). Ledermix ve Calxyl (kalsiyum hidroksit preparatı) ile normal insan dişlerinde yapılmış amputasyondan sonra dentin köprülerinin altında kısmen iltihabi infiltrasyon ve nekroz ile birlikte normal pulpa dokusu bulunmuştur⁽⁸⁶⁾.

Çalışmamızda kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız 2 günlük örneklerde pulpayı oluşturan mezensimal hücrelerinin sitoplazmalarında geniş vakuoller, odontoblast hücrelerinin sitoplazmalarında büzülme ve dejeneratif değişiklikler görülmüştür. Kawahara ve arkadaşları⁽⁷⁷⁾ tarafından da kalsiyum hidroksitin etkinliği hücre kültürlerinde incelendiğinde hücrelerde büyük sitoplazmik boşluklar ve dejenerasyonlar tesbit edilmiştir.

Operatif işlemleri takiben pulpanın rejenerasyonunu radyoaktif ³H-timidin ile inceleyen bir araştırmanın sonuçlarına göre odontoblast hücrelerinin tahrib olmasından sonra öncelikle fibroblast hücrelerinin meydana getirdiği kollagen gözlenmiştir ve mitoz aktivitesi en erken 2. günde başlamakta ve 8. günde en yüksek seviyeye erişmekle birlikte bu zaman içinde odontoblast hücrelerinin yeniden oluşumu gerçekleşmemektedir⁽⁸⁷⁾. Bilindiği gibi bir yaranın iyileşmesinde fibroblast hücreleri kollagen liflerin yapımcısı olarak önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmalar bu hücrelerin göç etmiş kan monositlerinden ve makrofajlardan meydana gelebileceğini ortaya koymuştur⁽⁸⁸⁾.

Gerçekten de kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde 7. günden başlamak üzere nekroz ve doku artıkları ile komşu pulpa dokusu arasında ve ekspoz pulpa bölgesinin hemen dibinde kollajenden, kapillerden zengin fibroblast hücrelerinden meydana gelmiş bir granülasyon dokusu tesbit edilmiştir. Ayrıca yeni olduğu düşünülen odontoblast hücreleri mevcuttur. Gängler'de⁽⁷⁸⁾ nekrozu, canlı pulpa dokusundan ayıran üç değişik yapıdan bir tanesinin bağ dokusu özelliğindeki nedbe dokusu olduğunu belirtmiştir.

Harrop ve Mackay⁽⁸⁹⁾ fare dişlerine kalsiyum hidroksit ile direkt kaplamadan sonra yaranın altındaki pulpa hücrelerinin mitozla çoğaldığını yaraya doğru ilerlediğini ve bu hücreler arasında kollagen fibril ağlarının meydana geldiğini tesbit etmişlerdir. Ayrıca 3. günde dekalsifiye olmamış bölgelerde kollagen fibrillerini hatırlatan kristal parçacıkları görülmekte ve bu kristallerin aşırı derecede depozisyonu kalsifiye maddeyi meydana getirmektedir. Meydana gelen bu matriks ise uygun dentini anımsatacak şekilde kollajenle dolmaktadır. Seltzer ve Bender'e⁽¹⁶⁾

göre kalsiyum hidroksitin altındaki bölgede kalsiyum iyonlarıyla dolu koagülasyon nekrozu sahası mevcuttur. Bunun altındaki pulpa dokusundaki hücreler odontoblastlara dönüşerek matriks yapımını sağlamaktadır. Matriksde toplanan kalsiyum iyonları sistemik sirkülasyondan gelmektedir⁽⁹⁰⁾. Stark ve arkadaşları⁽⁹¹⁾ ise köprü dentinindeki kalsiyum iyonlarının kalsiyum hidroksitten geldiğini ileri sürmüşlerdir. Grossman'da⁽³⁶⁾ dentinal köprü oluşumu konusunda pulpanın konnektif doku hücrelerinden yeni odontoblast hücrelerinin meydana gelmesi fikrini daha akla yatkın bulmaktadır.

Sonuç olarak denebilir ki kalsiyum hidroksit pulpada yüzeysel nekroza neden olan zaman ile sınırlı bir hasar oluşturmaktadır. Nekroze zon, canlı pulpa dokusunun sınırlandırılması ile ilgili bir bağ dokusu reaksiyonuna neden olmaktadır⁽⁷⁸⁾. Bizim kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde de bu durum gözlenmiştir. 28 günlük örneklerimizde dentine komşu bölgede yeni oluşmuş granülasyon dokusunun ve yeni odontoblast hücrelerinin sahaya hakim olduğu görülmüştür. Hess'de⁽⁹²⁾ amputasyon histopatolojisiyle ilgili sonuçları grublandırırken odontoblast hücrelerinin yara yüzeyine yerleşerek pulpayı koruyabileceğini vurgulamıştır.

Rowe⁽⁷⁹⁾ kalsiyum hidroksit tozunun güvenilir sonuçlar verdiğini ve bazı oluşan yeni dentin köprülerinin zayıf kalitede olduğunu göstermiştir. Backer ve Lockett⁽³⁷⁾ ise bazı durumlarda pulpa dejenerasyonu ile birlikte dentin köprüsünün meydana gelebileceğini belirtmişlerdir. Tronstad'da⁽³⁹⁾ gerek dycal gerekse kalsiyum hidroksit tatbikinden 82 gün sonra oluşan dentin köprüsünün mükemmel olmadığını tesbit etmiştir.

Bizim çalışmamızda kalsiyum hidroksit ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde istenen bütün bağ dokusu elemanları Hess'in⁽⁹²⁾, Harrop ve Mackay'ın⁽⁸⁹⁾, Seltzer ve Bender'in⁽¹⁶⁾ belirttikleri şekilde meydana gelmesine rağmen nekroz ile canlı pulpa dokusu arasında tersiyer yapı oluşmamıştır. Yani oluşan organik yapı üzerine kalsiyum iyonları yerleşmemiştir. Deney süremiz 28 gün ile kalmayıp daha uzun tutulmuş olsaydı kalsiyum hidroksit tatbik ettiğimiz örneklerde organik yapıyı takiben belki de yeni dentin yapımı gözleyebilirdik. Pisanti ve Sciaky'de⁽⁹⁰⁾ kalsiyum hidroksitin kalsiyum muhtevası ile etki etmediğini diğer özellikleriyle etki ettiğini söylemiştir. Seltzer ve Bender'de⁽¹⁶⁾ kalsiyum hidroksitin lokal olarak buradaki rolünün açık pulpa üzerinde toplanan dentin parçacıklarıyla aynı olduğunu belirtmişlerdir.

Masterton⁽⁹³⁾ tam bir reperatif bariyerin sürekli iyileşme ile eşdeğer olduğuna inanmıştır. Ancak bazı çalışmacılar yeni dentin köprüsü oluşumuna rağmen

pulpal dejenerasyonun olabileceğine inanırlar⁽⁵⁸⁾. Gängler ve arkadaşları⁽⁶⁶⁾ pulpalari ekspoz fare molar dişlerine uygulanan Calxyl ile en kötü sonuçları elde etmişlerdir. Paterson'da⁽⁶⁵⁾ kalsiyum hidroksit ile kötü sonuçlar elde etmiştir. Tüm bunlara rağmen kalsiyum hidroksit pulpa kaplamasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Çinkooksit öjenolün pulpa kaplama maddesi olarak kullanılması çelişkili bir konudur. Çeşitli çalışmalar kalsiyum hidroksitin daha başarılı olduğunu göstermiştir^(11,48).

Weiss ve Bjorvatn⁽⁴⁹⁾ histolojik olarak çinkooksit öjenolün kalsiyum hidroksit kadar başarılı bir pulpa kaplama maddesi olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılara göre çok az veya hiç kalsifik köprü oluşmamasına rağmen çinkooksit öjenol pulpa ile direkt temas ettiği zaman bile yapı canlı kalmaktadır. Tronstad ve Mjör'de⁽⁹⁴⁾ deneysel olarak kalsiyum hidroksitin ekspoz ve iltihablı pulpaların iyileşmesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olmadığını ancak çinkooksit öjenol ile sonuçların daha tatmin edici olduğunu belirtmişlerdir. Gene aynı araştırmacılar tarafından 1974 yılında yapılmış çalışma sonuçlarına göre deneysel olarak başkalaşmış iltihabi pulpalarda gerek çinkooksit öjenol gerekse kalsiyum hidroksit indirekt kaplama maddesi olarak uygundur ve bir iyileşme elde edilebilir⁽⁹⁵⁾.

Çinkooksit öjenol uygulanan fare molar dişlerinin 24 saatlik pulpa cevabının ekspoz bölgesindeki dentin parçacıklarının varlığı ile karakterize olduğu bir başka araştırma sonucunda tesbit edilmiştir. Ayrıca burada ekspoz pulpaya yakın iltihabi infiltrasyonun öncelikle polimorfonükleer lökositler olduğu, 7. ve 21. günlerde nekrozun ve iltihabın arttığı gösterilmiştir⁽⁵⁷⁾.

Bizim çalışmamızda da çinkooksit öjenol ile direkt kaplama yaptığımız dişlerde ekspoz pulpa bölgesinde dejenere dentin parçacıklarının varlığı tesbit edilmiştir. Ayrıca aynı bölgede mononükleer hücre bandı monosit ve lokositlerden ibaret hücre grublaşması görülmüştür. Çinkooksit öjenol kullandığımız örneklerde 2.günden itibaren gelişen bir nekroz mevcuttur. 28 günlük örneklere yaklaştıkça kronal pulpa dokusundan başlayıp daha derinlere doğru giden kapillerden zengin mononükleer iltihabi hücre toplulukları, nekroz ve fibrosis dikkati çekmektedir.

Gängler'de⁽⁷⁸⁾ çinkooksit öjenol ile kaplanmış ekspoz diş pulpası iltihabının irreversibl olduğunu gözlemiştir. Aynı araştırmacıya göre çinkooksit öjenol polimeri pulpanın kan sirkülasyonu bozukluklarını ilerletmekte, durumu korumakta ve kronal pulpadaki bağ dokusu direnci sitimüle olmaksızın nekroz yayılmaya

devam etmektedir. Bu madde sekonder etki olarak damarın reorganizasyonuna ve yeniden teşekkülüne imkan vermez, aksine trombosa ve damar yokluğuna neden olmaktadır. Yani çinkooksit öjenol pulpada yayılan bir nekroza neden olan sürekli bir hasar oluşturmaktadır.

Veverka ve Zahlavova'ya⁽⁴⁷⁾ göre çinkooksit öjenol kullanımına bağlı olarak oluşan kronik iltihap üç hafta sonra pulpanın derin tabakalarına doğru uzanmaktadır. Perforasyon yüzeyinde granülasyon dokusu gelişmekte ve bu yer kapanmadan kalmaktadır.

Araştırmamızda da çinkooksit öjenol ile direkt kaplama yaptığımız 14 ve 28 günlük örneklerde dentine komşu bölgede ince şerit halinde yeni oluşan granülasyon dokusu tesbit edilmiştir. Derinlere doğru inen iltihabi hücre topluluklarının ve nekrozun zamanla birlikte gelişmesine rağmen 28 günlük örneklerimizde pre-dentinde kalınlaşma şeklinde dentine ilave komşu yeni amorf dentinoid yapı gözlenmiştir. Ancak bu istenen düzeyde bir tersiyer yapı değildir. Hess⁽⁹²⁾ ve Gängler'de⁽⁷⁸⁾ pulpa cevabı olarak tam strüktüre olmamış böyle bir yapının gelişebileceğini belirtmişlerdir.

Goerig ve arkadaşları'da⁽⁵⁷⁾ bir pulpada tamir edici dentin köprüsü tesbit etmelerine rağmen hadisenin şiddetinde zaman ile birlikte bariz bir artış gözlemişlerdir. Bu araştırma sonuçları Nixon ve Hannah'ın⁽⁴⁸⁾ ve diğer araştırmacıların⁽⁹⁶⁾ elde etmiş oldukları sonuçları desteklemektedir. Bunlara göre çinkooksit öjenol pulpa kaplama işlemi için uygun değildir. Bazı çalışmacılar yeni dentin köprüsü oluşumuna rağmen pulpal dejenerasyonun olabileceğine inanırlar⁽⁵⁸⁾. Bizim çinkooksit öjenol ile elde ettiğimiz sonuçta aynen bu duruma uymaktadır. Bir taraftan hadise olumsuz yönde şiddetlenirken diğer taraftan yeni dentin yapımı gözlenmektedir.

Çinkooksit öjenol ile direkt pulpa kaplaması yaptığımız örneklerde diğer iki kaplama maddesine oranla daha fazla nekrotik alanlar görülmesine rağmen hiçbir kesitte abse ve granülom gibi patolojik oluşumlar tesbit edilmemiştir.

Gängler ve arkadaşları⁽⁶⁶⁾ tarafından pulparı ekspoz fare molar dişlerinde çinkooksit öjenole bağlı olarak az da olsa yeni dentin köprü oluşumu elde edilmesine rağmen iltihablanma belirtisi tüm pulpa bağ dokusunda tesbit edilmiştir. Ayrıca hemen hemen bütün vakalarda nekroz sahalarının kron ve kök pulpasına kadar uzandığı görülmüştür. Çinkooksit öjenol kullanılarak alınan kötü sonuçlar birçok kez başka histolojik araştırmalarla da ispatlanmıştır^(9,41,68,79).

Pulpa iltihabının uzun süre devam etmesi öjenolün varlığından ileri gelmektedir⁽⁶⁶⁾. Gerçekten öjenol olmaksızın çinkooksit tozu kullanılarak yapılan çalışmalardan iyi sonuçlar elde edilmiştir^(65,79). Yani öjenol ihtiva eden dolgu maddeleri pulpaya iritatan etki yapmakta ve bundan dolayı da kalsiyum hidroksit preparatlarından oluşan koruyucu bir taban gerekli olmaktadır⁽⁵⁵⁾.

Öjenolün iritatan etkisi nedeniyle öjenolsüz çinkooksit birleşimlerinin daha iyi sonuçlar vermesi beklenebilir. Gängler ve arkadaşları⁽⁶⁶⁾ pulpalari ekspoz edilen fare molar dişlerine çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımını uyguladıklarında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımıyla direkt kaplama yapılmış dişlerde az oranda nekroz ve buna eşlik eden iltihab hücreleri tesbit edilmiştir. Gängler ve arkadaşları'da⁽⁶⁶⁾ söz konusu karışımı kullandıklarında iltihap ve nekroz gibi başlangıç reaksiyonları gözlemişlerdir.

Bir başka araştırmada çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile amputasyon yapılmış insan dişleri histopatolojik olarak incelendiğinde fikse pulpanın kalın bir zon gösterdiği ve bu nekrotik pulpa zonuna piknotik ve karyorek-sik pulpa hücrelerinin ve iltihap hücrelerinin uzandığı tesbit edilmiştir. Ayrıca etkili doku fiksatifi olarak glutaraldehit, kalsiyum hidroksitin yalnız olarak ortaya çıkardığı yüzeysel nekroz tipinden ziyade fikse pulpa dokusunda yüzeysel zon oluşturmaktadır. Fikse edilmiş doku altında reperatif yapı daha kolaylıkla oluşabilmektedir⁽⁵⁸⁾.

Bizimde çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımıyla direkt kaplama yaptığımız dişlerde daha 2. günden itibaren fibroblastik aktivite, ayrıca geniş saha işgal ederek açık pulpaya doğru ilerliyen kollagen ve genç fibroblast hücrelerinden meydana gelmiş kapillerden zengin yeni oluşmuş granülasyon dokusu tesbit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda 2. günden itibaren granülasyon dokusu hücrelerinin hem pulpa dokusu hücrelerine hemde odontoblast hücrelerine dönüştüğü fark edilmiştir. Bunun sonucunda 28 günlük örneklerimizde granülasyon dokusundan kaynaklanan yeni strüktüre olmuş tersiyer dentin yapımı gözlenmiştir. İlâveten granülasyon dokusunun ortasında dentin kırıntılarının stimüle ettiği hücrelerden gelişimini alan dentinoid karakterde yeni dentin adacıkları mevcuttur.

Hannah'da⁽⁵⁸⁾ nekrotik fikse pulpa dokusunun amputasyon yarasını desteklediğini derinde yine dens fibröz doku ve aktif olarak osteoid yapı olduğunu belirlemiştir. Paterson'da⁽⁶⁵⁾ aynı maddeyi kullanarak yaptığı çalışma sonucunda dişlerin büyük bir kısmında yeni dentin köprüsü oluşumu tesbit etmiştir. Gängler

ve arkadaşları da⁽⁶⁶⁾ alifatik dialdehid olan ve bakterisit özelliklere sahip glutaraldehiti çinkooksit tozu ile birlikte kullandıklarında dişlerin yarısında amorf osteoid dokudan strüktür dentine kadar sert doku birikintileri gözlemişlerdir.

Çalışmamızda pulpa kaplama maddesi olarak glutaraldehit, az oranda nekroz oluşturmaması, erkenden granülasyon dokusu oluşumunu başlatması ve kalsifik bariyerin gelişmesini sağlaması nedeniyle ön plana çıkmıştır.

Dişlerde yapılmış invivo deneyler sonucunda glutaraldehite karşı iltihabi cevap gözlenmemiş ve tedavi edici amaçlarla doku fiksasyonu istenmesi halinde glutaraldehitin formaldehite tercih edileceği sonucuna varılmıştır^(61,72,97). Daha önce belirttiğimiz gibi glutaraldehit fiksatif olarak kardiovasküler cerrahide de kullanılmaktadır. Mitral kapakcığın glutaraldehit ile fikse domuz heterogrefti konarak düzeltilmesiyle ilgili bir çalışmada komplikasyon olarak şiddetli bir kalsifikasyon ortaya çıkmıştır⁽⁶⁷⁾. Bu çalışmadan çıkan sonuç, Hannah⁽⁵⁸⁾, Paterson⁽⁶⁵⁾, Gängler ve arkadaşlarının⁽⁶⁶⁾ çalışmalarından çıkan sonuçlarla birlikte bizim bulgularımızla karşılaştırıldığında glutaraldehitin kalsifikasyonu hızlandırıcı yönü olduğu düşünülebilir.

Araştırmamızın sonuçlarına göre çinkooksit öjenolün toksik bir direkt pulpa kaplama maddesi olduğu kalsiyum hidroksitin ise her zaman olduğu gibi canlı pulpa dokusuyla dengeli bir ilişkide olabileceği kanısındayız. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımının olumlu sonuçlar vermesine rağmen ileri çalışmalarda bundan sonra da araştırılabileceği görüşündeyiz.

VI - S O N U Ç

Çalışmamızda fare embriyonik fibroblast (MEF), insan diş pulpası ve embriyonik akciğer (HEL) hücre kültürlerinde saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik, çinkooksit öjenol ve çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı teste tabi tutulmuş ve sonuçta çinkooksit öjenolun en fazla sitotoksik etkiye neden olduğu görülmüştür. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile pH sı düzeltilmemiş bazik kalsiyum hidroksite kıyasla daha iyi sonuçlar alınmış ancak gene de bu karışım pH sınını nötral hale getirdiğimiz kalsiyum hidroksite göre biraz daha toksik bulunmuştur.

Aynı kaplama maddelerine karşı pulpa dokusunun cevabını incelediğimizde çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı ile direkt kaplama yapılmış 2 günlük örneklerde yeni oluşmuş granülasyon dokusu gözlenmiştir. Ancak saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımı kullanıldığında böyle bir granülasyon dokusu oluşumu 7 günlük örneklerde tesbit edilmiştir. Çinkooksit öjenol ile direkt kaplama yapıldığında granülasyon dokusu oluşumu daha da gecikmekte ve bu yapı 14 günlük örneklerde fark edilmektedir.

Çinkooksit öjenol uyguladığımız dişlerde iltihabi hadisenin daha derinlere doğru uzanmasına rağmen madde ile canlı pulpa dokusu arasında amorf dentinoid karakterde bir sert doku oluşumu gözlenmiştir. Çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımı uyguladığımız dişlerde ise strüktüre olmuş bir tersiyer yapı tesbit edilmiştir. Saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımına bağlı olarak istenen düzeyde bir granülasyon dokusu oluşmasına rağmen süremiz içerisinde bir tersiyer yapı gelişmemiştir.

VII - ÖZET

Fare embriyonik fibroblast (MEF), insan diş pulpası ve embriyonik akciğer fibroblast (HEL) hücre kültürlerinde yaptığımız araştırma sonucunda çinkooksit öjenolun, çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit ve saf kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik karışımlarına kıyasla daha fazla sitotoksik olduğu tesbit edilmiştir. Aynı kaplama maddelerinin insan pulpa dokusu üzerindeki etkilerini araştırdığımızda çinkooksit + % 5 lik glutaraldehit karışımının özellikle çinkooksit öjenol ve kalsiyum hidroksite göre sınırlı bir hasar ve yeni dentin köprüsü oluşturması nedeniyle ideale yakın özelliklere sahip bir pulpa kaplama maddesi olabileceği fikrine varılmıştır.

VIII - K A Y N A K L A R

- 1- Massler, M.: Kariologie und restaurative Behandlung. SMfZ/RMSO., 86(11):1238-1244, 1976.
- 2- Heinrich, E.: Querschnitt durch die deutschsprachige Fachpresse. Aus der konservierenden Zahnheilkunde. Die Quintessenz., 29(4): 43-48, 1978.
- 3- Hess, W. Die Pulpabehandlung. Herausgegeben von Meyer, W.: Die Zahn, Mund und Kieferheilkunde. 2. Band, Verlag von Urban und Schwarzenberg, S.488-490, München Berlin, 1955.
- 4- Cengiz, T.: Endodonti. Ege Üniversitesi Matbaası, S. 147-149, Bornova İzmir, 1979.
- 5- Harty, F.J.: Endodontics in clinical practice. John Wright and Sons Ltd., S.49-51, Bristol, 1976.
- 6- Hotz, P.: Synopsis der Endodontie im Milchgebiss. SMfZ/RMSO., 89: 912-920, 1979.
- 7- Schröder, A.: Möglichkeiten der Vitalerhaltung der durch Caries profunda gefährdeten Pulpa. SMfZ/RMSO., 89: 850-855, 1979.
- 8- Demmel, H.J.: Untersuchungen von Unterfüllungswerkstoffen. Dtsch. zahnärztl. Z., 26(2): 235-240, 1971.
- 9- Brauer, G.M.: Zinkoxid-Eugenol als zahnärztlicher Werkstoff (Teil.1). Dtsch. zahnärztl. Z., 31:824-834, 1976.
10. Massler, M.: Preventive Endodontics: Vital Pulp Therapy. Dent. Clin. North Am., 11:663-673, 1967.
- 11- Shovelton, D.S.: The maintenance of pulp vitality. Brit. dent. J., 133:95-101, 1972.
- 12- Fisher, F.J.: The viability of micro-organisms in carious dentine beneath amalgam restorations. Brit.dent. J., 121: 413-416, 1966.
- 13- Fisher, F.J.: The effect of a calcium hydroxide/water paste on micro-organisms in carious dentine. Brit.dent.J., 133:19-21, 1972.
- 14- Kakehashi, S., Stanley, H.R., Fitzgerald, R.J.: The effects of surgical exposures of dental pulp in germ-free and conventional laboratory rats. O.S., O.M., and O.P., 20(3): 340-349, 1965.

- 15- Kakehashi, S., Stanley, H.R., Fitzgerald, R.J.: The exposed germ-free pulp: Effects of topical corticosteroid medication and restoration. O.S., O.M. and O.P., 27(1): 60-67, 1969.
- 16- Seltzer, S., Bender, I.B.: The Dental Pulp. 2. edition, J.B. Lippincott Co., S. 169-170, 260-261 Philadelphia and Toronto, 1975.
- 17- Harndt, R.: Biologische Testmethoden. Dtsch. zahnärztl. Z., 26(2): 316-326, 1971.
- 18- Klötzer, W.T.: Prüfung der biologischen Reaktionen der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe. Dtsch. zahnärztl. Z., 30: 126-131, 1975.
- 19- Puza, V., Novak, L.: Zellkulturen als Mittel für Toxizitätsteste zahnärztlicher Materialien. SMfZ/RMSO., 81(1): 75-84, 1971.
20. Welker, D., Neupert, G.: Vergleichender biologischer Test von Polyakrylat- und Phosphatzement an Monolayer-Kulturen. Stomat. DDR., 24(9): 602-610, 1974.
- 21- Neupert, G., Welker, D.: Bestimmung der Gewebsverträglichkeit stomatologische Werkstoffe and Zellkulturen. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 63(2): 134-141, 1975.
- 22- Heidemann, D., Geurtsen, W.: Biologische Verträglichkeit von Socketol, untersucht an Hand zweier verschiedener Zellkultursysteme. Dtsch. zahnärztl. Z., 36: 667-672, 1981.
- 23- Gerstner, R.: Tissue cultures of pulpal elements. O.S., O.M. and O.P., 32(3): 473-486, 1971.
- 24- Engström, B., Spangberg, L.: Studies on root canal medicaments I. Cytotoxic effect of root canal antiseptics. Acta. Odont. Scand., 25: 77-84: 1967.
- 25- Spangberg, L., Isaksson, B.: Cytotoxic effect of Carbocain and Marcain. Acta. Odont. Scand., 28: 417-424, 1970.
- 26- Spangberg, L., Langeland, K.: Biologic effects of dental materials I. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. O.S., O.M. and O.P., 35(3): 402-414, 1973.
- 27- Spangberg, L., Rodrigues, H., Langeland, L. and Langeland, K.: Biologic effects of dental materials 2. Toxicity of anterior tooth restorative materials on HeLa cells in vitro. O.S., O.M. and O.P., 36(5): 713-724, 1973.
- 28- Novak, L., Puza, V.: Die Toxizität von Histoakryl-blau, verfolgt an lebenden Zellen. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 68(5): 446-451, 1980.
- 29- Mittermayer, Ch., Kaden, P., Härle, F.: Alterung von menschlichen Gingivafibroblasten in der Zellkultur. Dtsch. zahnärztl. Z., 33: 777-780, 1978.
- 30- Heidemann, D., Lampert, F.: Die Prüfung von Wurzelfüllmaterialien in der Zellkultur. Dtsch. zahnärztl. Z., 35: 349-353, 1980.
- 31- Klaiber, B., Mittermayer, Ch., Kaden, P. und Joos, U.: Charakteristik menschlicher Pulpazellen in der Zellkultur. Dtsch. zahnärztl. Z., 34(11): 846-850, 1979.

- 32- Joos, U., Mittermayer, Ch., Schilli, W. und Kaden, A.: Der Einfluss von Kollagen, Hydroxylapatit und Gelastypt S auf die Zellkultur. Dtsch. zahnärztl. Z., 37: 22-24, 1982.
- 33- Neupert, G., Welker, D.: Vergleichende Untersuchungen der zytotoxischen Wirkung von Composite-Füllungsmaterial und Silikatzement. Dtsch. zahnärztl. Z., 31: 919-923, 1976.
- 34- Mohammad, A.R., Mincer, H.H., Younis, O., Dillingham, E. and Siskin, M.: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. O.S., O.M. and O.P., 45(5): 768-773, 1978.
- 35- Schmalz, G.: Der Einfluss von Methly.Methakrylat-Monomer auf den Stoffwechsel von L-Zellen. Dtsch. zahnärztl. Z., 34: 193-195, 1979.
- 36- Grossman, L.I.: Endodontic Practice. 9. edition, Lea and Febiger, S. 107-108, Philadelphia, 1978.
- 37- Barker, B.C.W., Lockett, B.C.: An unusual response by dog pulp to calcium hydroxide. O.S., O.M. and O.P., 32(5): 785-794, 1971.
- 38- Stanley, H.R., Lundy, T.: Dycal therapy for pulp exposures. O.S., O.M. and O.P., 34(5): 818-827, 1972.
- 39- Tronstad, L.: Reaction of the exposed pulp to Dycal treatment. O.S., O.M. and O.P., 38(6):945-953, 1974.
40. Berk, H., Krakow, A.A., Stanley, H.R.: Clinical situations in which amputation is preferred to pulp capping because of biologic considerations. JADA., 90: 801-805, 1975.
- 41- Paterson, R.C.: Bacterial contamination and the exposed pulp. Brit. dent. J., 140: 231-236, 1976.
- 42- Hamilton, A.I., Schuchard, A.S., Christensen, G.J., Phillips, R.W., Howard, W.W. und Gilmore, W.H.: Fortschritte in der konservierenden Zahnheilkunde. Die Quintessenz., 28(6):27-30, 1977.
- 43- Knappwost, A., Wüstefeld, B.: Zur Wirkung des Calciumhydroxids und modifizierter Präparate. Dtsch. zahnärztl. Z., 34: 473-476, 1979.
- 44- King, J.B., Crawford, J.J., Lindahl, R.L.: Indirect pulp capping: A bacteriologic study of deep carious dentine in human teeth. O.S., O.M. and O.P., 20(5):663-671, 1965.
- 45- Aponte, A.J., Hartsook, J.T., Growley, M.C.: Indirect pulp capping success verified. J.dent. Child., 33:164-166, 1966.
- 46- Bhaskar, S.N., Cutright, D.E., Beasley, J.D. and Boyers, R.C.: Pulpal response to four restorative materials. O.S., O.M. and O.P., 28(1):126-133, 1969.
- 47- Veverka, J., Zahlavova, E.: Erfahrungen mit Cp-Cap. Die Quintessenz., 22(1): 1-5, 1971.
- 48- Nixon, G.S., Hannah, C.McD.: N-butyl cyanoacrylate as a pulp capping agent. Brit.dent.J., 133:14-18, 1972.

- 49- Weiss, M.B., Bjorvatn K.: Pulp capping in deciduous and newlyerupted permanent teeth of monkeys. O.S., O.M. and O.P., 29(5):769-775, 1970.
- 50- Gülzow, H.J., Strübig, W.: Zinkoxid-Nelkenol oder Zinkoxid-Eugenol? Dtsch. zahnärztl. Z., 36:475-477, 1981.
- 51- Massler, M.: Therapy conducive to healing of the human pulp. O.S., O.M. and O.P., 34(1): 122-130, 1972.
- 52- Kvapilova, J., Puza, V., Novak, L.: Die biologische Wirkung eines Zinkoxid-Eugenol-Zements. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 62(4):392, 1974.
- 53- Spangberg, L., Rodrigues, H., Langeland, K.: Biologic effects of dental materials 4.Effect of polycarboxylate cements on HeLa cells in vitro. O.S., O.M. and O.P., 37(1): 113-117, 1974.
- 54- Harsanji, B.B., Angelopoulos, A.P., Gourley, J.M.: Subcutaneous tissue response to composite resins in dogs. O.S., O.M. and O.P., 37(2):308.319, 1974.
- 55- Brännström, M., Nyborg, H.: Pulp reaction to a temporary zincoxide/eugenol cement. J.Prosthet.Dent., 35(2):185-191, 1976.
- 56- Kralisz, W.: Zytotoxische Eigenschaften einiger in der Endodontie verwendeten Materialien. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 67(3):285, 1979.
- 57- Goerig, A.C., Payne, T.F., del Rio, C.E.: The pulpal response to ZOE with stock eugenol versus ZOE with purified eugenol. O.S., O.M. and O.P., 50(6): 557-562, 1980.
- 58- Hannah, D.R.: Glutaraldehyde and calcium hydroxide. Brit.dent.J., 132:227-231, 1972.
- 59- Monsan, P., Puzo, G., Mazarguil, H. Etude du mecanisme d'action du glutaraldehyde. Cited in Thomas, D., Kervenez, J.P.: Analysis and control of immobilized enzyme systems. North-Holland Publishing. Co., S.275-282, Amsterdam, 1976.
60. Nelson, J.R., Lazzari, E.P., Ranly, D.M. and Madden, R.M.: Biochemical effects of tissue fixatives on bovine pulp. J.Endod., 5(5): 139-144, 1979.
- 61- Wemes, J.C., s'Gravenmade, E.J.: Glutaraldehyde: A new fixative in Endodontics. J.dent.Res., 52(3): 601, Abst.No: 48, 1973.
- 62- Makkes, P.Ch., Thoden van Velzen, S.K., van den Hooff, A.: Response of the living organism to dead and fixed dead, enclosed isologous tissue. O.S., O.M. and O.P., 46(1): 131-144, 1978.
- 63- Makkes, P.Ch., Thoden van Velzen, S.K., van den Hooff, A.: The response of the living organism to dead and fixed dead enclosed homologous tissue. O.S., O.M. and O.P., 46(2):296-306, 1978.
- 64- Hoyer, I., Gängler, P., Krehan, F. und Schweizer, H.: Zytotoxizitätstest bakterizider endodontischer Medikamente an Lungenfibroblasten und Hep2-Zellkulturen. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 69(2): 110-116, 1981.

- 65- Paterson, R.C.: The reaction of the rat molar pulp to various materials. Brit. dent. J., 140:93-96, 1976.
- 66- Gängler, P., Hoyer, I., Krehan, F.: Biologische Prüfung von Pulpaschutzmitteln an der Molarenpulpa der Ratte. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 65(8):851-858, 1977.
- 67- Rose, A.G., Forman, R., Bowen, R.M.: Calcification of glutaraldehyde-fixed porcine xenograft. Thorax., 33:111-114, 1978.
- 68- Brauer, G.M.: Zinkoxid-Eugenol als zahnärztlicher Werkstoff (Teil2). Dtsch. zahnärztl. Z., 31:890-894, 1976.
- 69- Douglas, W.H.: The metal oxide/eugenol materials. Brit.dent.J., 132:65-67, 1972.
- 70- Council on Dental Therapeutics.: Council accepts glutaraldehyde (Cidex). JADA., 86:1368, 1973.
- 71- s'Gravenmade, E.J.: Some biochemical considerations of fixation in endodontics. J.Endod., 1(7):233-237, 1975.
- 72- s'Gravenmade, E.J., Wemes, J.C.: Interaction of glutaraldehyde with biologic materials in endodontics. J.dent.Res., 52(3): 601, Abst.No:47, 1973.
- 73- Habeeb, A.F., Hiramoto, R.: Reaction of proteins with glutaraldehyde. Arch. Biochem., 126:16-26, 1968.
- 74- Richards, F.M., Knowles, J.R.: Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. J.Mol.Biol., 37:231-233, 1968.
- 75- Ustaçelebi, Ş.: Induction of Interferon in chick embryo cells infected by adenovirus type 5 and polyoma virus. Ph. D.thesis. Glasgow University, 1973.
- 76- Ustaçelebi, Ş., Williams, J.F.: Depression of interferon production in chick embryo cells by rifampicin. J.gen.Virol., 15:139-148, 1972.
- 77- Kawahara, H., Yamagami, A., Nakamura, M.: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. Int.dent.J., 18:443-467, 1968.
- 78- Gängler, P.: Vergleichende vitalmikroskopische und histologische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Pulpaüberkappungsmittel Kalziumhydroxid und Zinkoxid-Eugenol. Zahn, Mund u.Kieferheilkd., 65(4):376-391, 1977.
- 79- Rowe, A.H.R.: Reaction of the rat molar pulp to various materials. Brit. dent. J., 122(7): 291-300, 1967.
- 80- Ehmer, D., Welker, D.: Untersuchungen der abdichtenden bakteriostatischen hämolytischen und eiweissfällenden Eigenschaften von Phosphat, EBA und Polyakrylatzementen. Dtsch. Stomat., 22(5): 328-338, 1972.
- 81 -Klaiber, B., Mittermayer, Ch., Kaden, P. und Schwechten, I.: Toxizitätsbestimmung von Wurzelfüllmaterialien und deren einzelnen Komponenten in der Zellkultur. Dtsch.zahnärztl. Z., 36:212-216, 1981.
- 82- Kolimetschkowa, Z.: Experimentelle Untersuchungen zur Erhaltung der traumatisch freigelegten Pulpa. Stomat.DDR., 24(12):808-812, 1974.

- 83- Mc Walter, G.M., El-Kafrawy, A.H., Mitchell, D.F.: Pulp capping in monkeys with a calcium hydroxide compound an antibiotic and a polycarboxylate cement. O.S., O.M. and O.P., 36(1):90-100, 1973.
- 84- Mc Walter, G.M., El-Kafrawy, A.H., Mitchell, D.F.: Long-term study of pulp capping in monkeys with three agents. JADA., 93:105-110, 1976.
- 85- Bhaskar, S.N., Cutright, D.E., Boyers, R.C. and Margetis, P.M.: Pulp capping with isobutyl cyanoacrylate. JADA., 79:640-644, 1969.
- 86- Ulmansky, M., Sela, J., Langer, M. and Yaari, A.: Response of pulpotomy wounds in normal human teeth to successively applied Ledermix and Calxyl. Archs oral Biol., 16:1393-1397, 1971.
- 87- Zach, L., Topal, R., Cohen, G.: Pulpal repair following operative procedures. O.S., O.M. and O.P., 28(4):587-597, 1969.
- 88- Leder, L.D.: Herkunft und Funktion der Entzündungs und Granulations gewebiszellen. Dtsch.zahnärztl. Z., 22(8):958-973, 1967.
- 89- Harrop, T.J., Mackay, B.: Electron microscopic observations on healing in dental pulp in the rat. Archs oral Biol., 13:365-374, 1968.
- 90- Pisanti, S., Sciaky, I.: Origin of calcium in the repair wall after pulp exposure in the dog. J.dent.Res., 43(5):641-644, 1964.
- 91- Stark, M.M., Myers, H.M., Morris, M. and Gardner, R.: The localization of radioactive calcium hydroxide Ca⁴⁵ over exposed pulps in rhesus monkey teeth: A preliminary report. J.Oral Ther. and Pharmacol., 1(3):290-297, 1964.
- 92- Hess, W.: Die Pulpaüberkappung, die Vital amputation und die Mortalamputation der Pulpa als Faktoren der Prophylaxe der dentalen Herdinfection. Zahnärztl. Rdsch., 47(4):149-160, 1938.
- 93- Masterton, J.B.: The healing of wounds of dental pulp of man. Brit.dent. J., 120(5):213-224, 1966.
- 94- Tronstad, L., Mjör, I.A.: Capping of the inflamed pulp. O.S., O.M. and O.P., 34(3):477-485, 1972.
- 95- Mjör, I.A., Tronstad, L.: The healing of experimentally induced pulpitis. O.S., O.M. and O.P., 38(1):115-121, 1974.
- 96- Sela, J., Ulmansky, M.: Reaction of normal and inflamed dental pulp to Calxyl and zinc oxide and eugenol in rats. O.S., O.M. and O.P., 30(3):425-430, 1970.
- 97- Thoden van Velzen, S.K., van den Hooff, A.: Long-term results of the implantation of glutaraldehyde-fixed tissue. O.S., O.M. and O.P., 44(5):792-798, 1977.