



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI**

**ENDODONTİDE KULLANILAN FARKLI İRRİGASYON
AJANLARININ HUMAN OSTEOLAST VE HUMAN GİNGİVAL
FİBROBLAST HÜCRELERİNE SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRMESİ**

Dt. Zeliha UĞUR

SİVAS

2016



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI**

**ENDODONTİDE KULLANILAN FARKLI İRRİGASYON
AJANLARININ HUMAN OSTEOLAST VE HUMAN GİNGİVAL
FİBROBLAST HÜCRELERİNE SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRMESİ**

Dt. Zeliha UĞUR

**Doç. Dr. Kerem Engin AKPINAR
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

SİVAS

2016

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Endodonti Anabilim Dalında uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Başkan:

Üye:

Üye:

Bu tez, tarih vesayılı Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan Hübbezoğlu

Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinin yanısıra, uzmanlık sürecim boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen; iyi bir akademisyen olmadan önce, iyi bir insan olabilmeyi hedeflemenin önemini bana öğreten çok değerli danışmanım Sn. Doç. Dr. Kerem Engin AKPINAR'a şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, bana yol gösteren Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sn. Yrd. Doç. Dr. Demet Altunbaş, Sn. Yrd. Doç. Dr. Recai Zan'a

Tezimi planlamamda ve gerçekleştirmemde yardım sağlayan Sn. Yrd. Doç. Dr. Ceylan Hepokur'a,

Tez çalışmam süresince yanımda olan, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Nazan Özdemir, Seval Bayrak, Melike Koraltan, Tansu Doğan'a,

Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'nın bir parçası olduğum süre boyunca, hayatımın acı tatlı her anını paylaştığım ve dostluğunu kaybetmeyeceğimi bildiğim, Fatma Kanmaz'a,

Uzmanlık hayatım boyunca hep yanımda olan, her türlü sabrı ve desteği gösteren Yusuf Bahri Aydın'a,

Sahip olduğum herşey için hergün teşekkür etmeme sebep babam Sait Uğur, annem Mürşidiye Uğur ve kardeşlerime,

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

ENDODONTİDE KULLANILAN FARKLI İRRİGASYON AJANLARININ HUMAN OSTEOLAST VE HUMAN GİNGİVAL FİBROBLAST HÜCRELERİNE SİTOTOKSİSİTE VE GENOTOKSİSİTE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRMESİ

Dt. Zeliha UĞUR

Endodonti Anabilim Dalı

Sivas

2016

Endodontik tedavide kullanılan irrigasyon solüsyonları periapikal dokularla temas halindedir. Bu maddelerin olası sitotoksik ve genotoksik etkileri ile periapikal dokulara verecekleri hasar açısından değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, endodontik tedavide irrigasyon solüsyonu olarak kullanılan çeşitli materyallerin XTT testi yöntemi ile human gingival fibroblast hücre hattı ve human osteoblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek, olabilecek olası genotoksik etkiyi ise 8-OHdG kiti kullanarak tespit etmektir. Çalışmamızda, 4 farklı irrigasyon solüsyonunun sitotoksik ve genotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Bu materyaller NaOCl, kitosan, propolis ve humik asit'tir. Çalışmada kullanılan her bir kimyasal için hazırlanan örnekler 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilmiş ve üzerine 1 ml (mililitre) kültür ortamı DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ilave edilmiştir. Elde edilen örnekler 4. ve 24. saatlerde toplanmış, hücre canlılık testi için spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde XTT test yöntemi, genotoksitenin değerlendirilmesinde ise 8-OHdG test yöntemi kullanılmıştır.

Human gingival fibroblast hücreleri ve human osteoblast hücreleri üzerine uygulanan her bir solüsyonun kendi içerisinde 4 ve 24 saatlik uygulama sonrası oluşan sitotoksite karşılaştırılmasında kontrol grubu hariç uygulama süresi

arttığında sitotoksik etki de anlamlı derecede artmıştır. İki hücre hattı üzerinde de en sitotoksik materyal NaOCl olmuştur.

Human gingival fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan genotoksisite karşılaştırılmasında dört solüsyonun oluşturduğu etki arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Yapılan genotoksik hasar sıralamasında NaOCl>Humik asit> Kontrol>Propolis>Kitosan şeklinde bir sıralama oluşmuştur. Bu sonuca göre NaOCl en genotoksik solüsyon olarak bulunurken kitosan ve propolis kontrol grubundan da düşük etki göstererek antigenotoksik bulunmuştur. (p<0.05)

Human osteoblast hücre hattı üzerinde yapılan genotoksisite karşılaştırılmasında dört solüsyonun oluşturduğu etki arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Sözcükler: Fibroblast, Humik Asit, Kitosan, Osteoblast, Propolis, Sitotoksisite.

ABSTRACT

THE ASSESSMENT OF CTYOTOXIC AND GENOTOXICITY ACTIVITY OF DIFFERENT IRRIGATION AGENTS USING IN ENDODONTICS ON HUMAN OSTEOBLAST AND HUMAN FIBROBLAST CELL AS IN VITRO

Dt. Zeliha UĞUR

Department of Endodontics

Sivas

2016

Root canal irrigation solutions using in endodontic treatments are in close contact with periapical tissues. It is worth to examine the probable cytotoxic and genotoxic effects of these materials to periapical living tissues.

The aim of this study is to evaluate the cytotoxic effects of various materials used as irrigation solutions in endodontic treatment on the human gingival and human overblast cell line with the help of XTT method and diagnosing probable genotoxic effect of 8-OHdG kit. These solutions were NaOCl, Chitosan, Propolis and Humic acid. 4 samples from each solution were taken and put into sterile cylindrical polyethelene containers in aseptic conditions as per the instructions by the producer. The discs prepared for each tested chemical were placed in 24 chamber cell culture plates and 1 ml culture medium, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), was added on each of them. The obtained samples were collected after 4. and 24. hours and spectrophotometric measurement for cell vitality was conducted. XTT test method was used for the evaluation of the cytotoxicities.

The purpose of this study is to examine the cytotoxic effect of different irrigation solutions with XTT assay on human gingival fibroblast cell line and human osteoblast cell line and to determine the probable genotoxic effect on same cells lines using 8-OHdG methods.

In the genotoxicity comparison of the human gingival fibroblast cells line statistically meaningful differences were found among the effects of these four solutions. In the

genotoxic damage grading such a sequence as NaOCl >Humic Acid >Control> Propolis> Citosan was obtained.

According to this result NaOCl was found as the most genotoxic solution while it was found antigenotoxic for it showed less effect than citosan and propolis group.

In the genotoxicity comparison done on the human osteblast cells line any statistically meaningful difference wasn't found among the effects of these four solutions.

Keywords: Fibroblasts, Humic Acid, Chitosan, Osteoblasts, Propolis, Cytotoxicity.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Endodontide İrrigasyon	2
2.1.1. İrrigasyon Solüsyonlarının Sınıflandırılması	6
2.1.1.1 Kimyasal Ajanlar	6
2.1.1.1.1. Doku Çözücü Ajanlar.....	6
2.1.1.1.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)	6
2.1.1.1.1.2. Klorin Dioksit (ClO ₂)	9
2.1.1.1.2. Asitler ve Şelasyon Ajanları	9
2.1.1.1.2.1. Etilen Diamin Tetraasetik asit (EDTA)	9
2.1.1.1.2.2. REDTA (EDTA-SETREMİT).....	10
2.1.1.1.2.3. EDTA-T.....	10
2.1.1.1.2.4. Sitrik Asit.....	10
2.1.1.1.2.5. HEBP (Etidronik Asit)	10
2.1.1.1.3. Antimikrobiyel ajanlar	10
2.1.1.1.3.1.Klorheksidin (CHX)	10
2.1.1.1.3.2.Mineral Trioksit Aggregate (MTAD).....	11
2.1.1.1.3.3Tetraclean	11
2.1.1.1.4. Oksitleyici Solüsyonlar	11
2.1.1.1.4.1. Elektromekanik Olarak Aktive Edilmiş Solüsyonlar (ECA)	11
2.1.1.1.4.2. Ozonlu Su	12
2.1.1.1.5. Doğal Ajanlar	12

2.1.1.1.5.1. Kitosan.....	13
2.1.1.1.5.2. Propolis.....	17
2.1.1.1.5.3. Humik asit	19
2.2. Biyouyumluluk.....	20
2.2.1. Dental materyallerde biyouyumluluk.....	21
2.3. Hücre Kültürü.....	27
2.3.1. Hücre Kültürü Çeşitleri	27
2.3.1.1. Primer hücre kültürleri.....	27
2.3.1.2. Diploid Hücre Kültürleri:.....	27
2.3.1.3. Devamlı Hücre Kültürleri:	28
2.3.2. Hücre kültürü test yöntemleri.....	29
2.4. Sitotoksisite	32
2.5. Genotoksisite	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Hücre kültürü.....	35
3.1.1. Hücre Çözdürme Protokolü.....	36
3.1.2. Hücrelerin yıkanması	36
3.1.3. Hücrelerin pasajlanması	37
3.1.4. Hücrelerin 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi.....	37
3.1.5. Hücrelere Solüsyon Uygulanması	38
3.1.6. Hücrelere XTT Uygulanması	39
3.1.7. Genotoksisite için 8-OHdG ELISA kiti uygulanması.....	40
3.1.8. Sonuçların İstatistiksel Yöntemlerle Değerlendirilmesi	41
4.BULGULAR	42
4.1. Sitotoksisite Test Sonuçlarına Ait Bulgular	42
4.1.1. Human gingival fibroblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların sitotoksik etkinliğine ait bulgular	42
4.1.2. Human osteoblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların sitotoksisite etkinliğine ait bulgular	43
4.2.Genotoksisite Test Sonuçlarına Ait Bulgular	44
4.2.1. Human gingival fibroblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların genotoksik etkinliğine ait bulgular	44

4.2.2. Osteoblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların genotoksik etkinliğine ait bulgular	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	98



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

Ark:	Arkadaşları
CHX:	Klorheksidin glukonat
ClO₂:	Klorin Dioksit
DMEM:	Dulbecco's modified media
ECA:	Elektrokimyasal Aktive Edilmiş Su
EDTA:	Etilendiamintetraasetik Asit
FBS:	Fetal bovin serum
HEBP:	Etidronik Asit
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HOCl:	Hipokloröz Asit
MTAD:	Mineral Trioksit Aggregate
NaOCl:	Sodyum Hipoklorit
NaOH:	Sodyum Hidroksit
REDTA:	EDTA-SETREMİT
XTT:	2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
8-OHdG:	8-hidroksi-2'- deoksiguanozin

SİMGELER

°C	Santigrat
dk	Dakika
mL	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Revolutions per minute
µL	Mikrolitre
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Sırasıyla selüloz, kitosan ve kitinin kimyasal yapıları.	14
Şekil 2. 2: Kitinin deasetilizasyonu.	15
Şekil 2. 3: Hümik asit modeli	20
Şekil 2. 4: XTT' nin formazana dönüşümü.	33
Şekil 3.1: Deneyde kullanılan soğutmalı santrifüj	36
Şekil 3. 2: Deneyde kullanılan inkübatör.	37
Şekil 3. 3: Deneyde kullanılan Laminar Flow.	38
Şekil 3. 4: XTT uygulamasının ardından platelerde renk değişimi.	39
Şekil 3. 5: Platelerin eliza okuyucuya yerleştirilmesi.....	40
Şekil 3. 6: Durdurucu (stop) Materyalinin Uygulanmasının Ardından Sarıdan Maviye Renk Değişimi.....	41

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2. 1: Humik maddelerin sınıflandırılması ve kimyasal özellikleri.....	19
Tablo 2. 2: Biyouyumluluk çalışmalarında uygulanan test yöntemleri.	23
Tablo 4. 1: Human Gingival Fibroblast Hücre Hattı üzerinde gruplar arasında zamana göre absorbans düzeylerinin dağılımı	42
Tablo 4. 2: Human Osteoblast Hücre Hattı üzerinde gruplar arasında zamana göre absorbans düzeylerinin dağılımı.	43
Tablo 4. 3: Human gingival fibroblast hücre hattı üzerinde solüsyonların genotoksik etkisinin değerlendirilmesi	45
Tablo 4. 4: Human osteoblast hücre hattı üzerinde solüsyonların genotoksik etkisinin değerlendirilmesi.....	46

1. GİRİŞ

Endodontik tedavinin hedefi; periapikal bölgede patoloji oluşumunu önlemek ya da oluşan problemin tedavisi olup, daha da önemlisi kök kanal sisteminde gözlenen mikrobiyal bir enfeksiyonu elimine etmek veya enfeksiyondan korumaktır. Bu nedenle nihai başarı daima iyi bir enfeksiyon kontrolüne bağlıdır (1).

Endodontik tedavinin en önemli safhalarından birisi kök kanallarının temizlenmesi ve şekillendirilmesidir. Kök kanal sisteminin karmaşık anatomisi nedeniyle sadece mekanik şekillendirme ile kök kanalı tamamen temizlenememektedir. Bu nedenle kök kanallarının irrigasyonu tedavinin vazgeçilemez bir parçası haline gelmiştir (2, 3).

Kök kanalının preparasyon öncesi ve preparasyon sırasında, sık aralıklarla nekrotik ve vital dokuyu çözücü, antimikrobiyal özellikli bir veya daha fazla irrigasyon solüsyonu ile yıkanması gerekmektedir (4, 5). Kök kanal tedavisinde kullanılan bu solüsyonlar yıkama işlemi sırasında apikal foramen yolu ile periapikal dokularla temas edebilmektedir. Endodontik tedavinin başarısındaki en önemli kriter tedavi sonrası periapikal dokuların normal sağlıklı durumlarını korumasıdır. Bu nedenle irrigasyon solüsyonlarının periapikal dokular ile temas ettiğinde, biyoyumlu olmaları büyük önem taşımaktadır (6, 7).

Günümüze kadar irrigasyon solüsyonları ile ilgili yapılan çalışmalar bu solüsyonların smear tabakasının kaldırılmasındaki etkinlikleri ve antibakteriyel özelliklerini inceleme yönünde yoğunlaşmıştır. Fakat bunun yanında endodontik tedavinin başarısına büyük ölçüde etkili olan materyalin biyoyumluluğu üzerine yapılmış araştırma sınırlı sayıda bulunmaktadır.

Bu sebeple çalışmamızda; kök kanal irrigasyonu amacıyla önerilen, ancak sitotoksitelerinin ve genotoksitesinin hücre kültürü yöntemiyle birbirleriyle karşılaştırıldıkları çalışma bulunmayan Kitosan, Propolis, Humik asit ve NaOC'in biyoyumluluklarını in vitro olarak incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

Kök kanal tedavisinde güncel görüş, kök kanallarının mekanik olarak temizlenmesinin ardından biyouyumlu bakterisit ilaçlarla yıkanması ve toksik olmayan dolgu patları ile tıkanmasıdır (8).

Kök kanal sistemini etkileyerek enfekte eden mikroorganizmalar iltihapsal bir süreç olan apikal periodontitisin oluşumuna ya da mevcut iltihabi durumun ilerlemesine neden olabilmektedir. Bu nedenle kök kanal tedavisi sırasında, etken mikroorganizmaların, toksinlerin ve enfekte dentinin uzaklaştırılarak dezenfeksiyonun etkin bir biçimde yapılması, apikal periodontitisin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde önemli bir role sahiptir (9, 10).

Kök kanal sistemi ana kök kanalı, dentin kanalları, aksesuar kanallar, kanal ramifikasyonları, apikal deltalar ve transvers anostomozlar gibi mikroorganizmaların kolayca barınabileceği ve mekanik temizlemenin tek başına ulaşmakta sınırlı kaldığı anatomik yapılara sahip olabilmektedir. Kök kanal anatomisinin bu karmaşık yapısı, mekanik preparasyonu tek başına kök kanalının üç boyutlu olarak temizlenmesinde ve dezenfekte edilmesinde yetersiz kılmaktadır. Bu nedenle mekanik preparasyon ile kimyasal irrigasyonun eş zamanlı kullanımı gereklidir (11).

2.1. Endodontide İrrigasyon

Kök kanallarının temizlenip şekillendirilmesinde kanal aletlerinin tek başına mekanik kullanımının yetersiz kalması nedeniyle işlemin tamamlayıcı bir bölümü olan irrigasyon işlemi de yapılmaktadır (8). Araştırmacılar mekanik preparasyonun mikroorganizma sayısını belirgin ölçüde azalttığını, ancak tek başına tamamen steril bir kök kanalı elde etmek için yetersiz olduğunu bildirmişlerdir (9). Bu nedenle mekanik preparasyona ilave olarak irriganlar ve diğer kanal içi ilaçlar kullanılmaktadır (1).

Endodontide kök kanal tedavisinin ayrılmaz bir parçası olan irrigasyon solüsyonları büyük önem taşımaktadır. İrrigasyon solüsyonlarının endodontide kullanım amaçları genel olarak şu şekilde sıralanabilir (12, 13);

-Kök kanallarından organik ve inorganik debrisleri, enfekte materyalleri, yumuşak ve sert doku artıklarını hem fiziksel hem de kimyasal olarak uzaklaştırmak, bu sayede bu materyallerin apikal bölümde birikmesi, apikali tıkanması ve bu bölgenin ulaşılamaz hale gelmesine engel olmak,

-Antibakteriyel özellikleri sayesinde kök kanalındaki mikroorganizmaları uzaklaştırmak,

- Kök kanallarını ıslatıp kayganlaştırarak mekanik preparasyonunun daha rahat yapılmasına olanak sağlamak,

- Kanal aletlerinin ulaşamadığı bölgeleri temizlemek ve dezenfekte etmek,

- Kök kanal dezenfeksiyonu için ara seanslarda kullanılan medikamentlerin etkisini arttırmak,

-Smear takasını uzaklaştırmak,

- Ağartıcı özellik taşıyarak renkleşmiş dişlerin beyazlatılmasına yardımcı olmaktır.

Bu amaçlara ulaşabilmek için kullanılacak ideal bir irrigasyon solüsyonunda bulunması gereken özellikler ise şu şekilde sıralanabilir (13-15) ;

-Kök kanalındaki artık organik, inorganik doku ve debrisleri eritebilmeli,

-Dişin çevre dokularına antijenik, toksik ve karsinojenik etki göstermemeli,

- Düşük yüzey gerilimi göstererek mekanik preparasyonla ulaşılamayan kök kanal yüzeylerine etki edebilmeli,

-Lubrikasyon özelliği ile kanal aletlerinin kanalda rahat çalışmasını sağlamalı,

- Mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterebilmeli ve bu özelliğini kullanım sonrası kök kanallarında bir süre daha devam ettirebilmeli,
- Endotoksinleri etkisiz hale getirebilmeli,
- Smear tabakasını kaldırabilmeli,
- Dentin dokusuna olumsuz etkisi olmamalı,
- Kanalda kolay nötralize olmamalı,
- Kanal dolgu maddesine olumsuz etkisi olmamalı,
- Daimi restorasyonların pulpa odası duvarına bağlanma kuvvetine olumsuz etkisi olmamalı,
- Dişin rengini değiştirmemeli,
- Kolay elde edilebilmeli,
- Maliyeti düşük olmalı,
- Raf ömrü uzun olmalı.

Kök kanal sisteminin şekillendirilmesinde kullanılan kanal aletlerinin devamlı olarak geliştirilmesine karşın, kök kanal sisteminin kompleks anatomik yapısı nedeniyle kanal aletleri kanal yüzeyinin tamamına temas edememekte ve mekanik preparasyon esnasında şekillendirilip temizlenmemiş alanlar kalabilmektedir (9). Yapılan bir çalışmada kök kanalının yaklaşık olarak %35' inin mekanik preparasyon ile şekillendirilmeden bırakıldığı belirtilmiştir (16). Bu konu üzerine yapılmış diğer çalışmalarda ise tek başına yapılan mekanik temizleme ile kanal duvarlarında geniş alanların, apikal üçlünün bir kısmının ve oval kanalların yeterli düzeyde temizlenemediğini ve mikroorganizmaların bu dokunulmamış alanlarda yaşamlarını sürdürmeye devam ettiği belirtilmiştir (16-18). Bununla birlikte mekanik preparasyon ile irrigasyon solüsyonlarının eş zamanlı kullanılması, dentin tübüllerine ve kök kanal sisteminde bulunan isthmuslara, ramifikasyonlara ve apikal delta gibi bölgelerde yaşayan bakteri veya mantarlara solüsyonun ulaşarak etki etmesi ile kanal

tedavisinin başarısını artırmaktadır (19). İrrigasyonun kök kanal tedavisinin başarısına olan etkisini değerlendirmek için yapılan çeşitli çalışmalarda ise irrigan olarak serum fizyolojik solüsyonu kullanıldığında bile bakteri sayısında belirgin bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (19, 20). Kök kanallarının yalnızca mekanik şekillendirme ile istenilen ölçüde temizlenememesi, irrigasyon solüsyonlarına olan ilginin artmasını sağlamıştır ve ideal irrigasyon solüsyonu arayışını hep gündemde tutmuştur (8, 9, 21).

Farklı özelliklerde ve farklı irrigasyon amacı için kullanılan mevcut irrigasyon materyallerinin hiçbiri tek başına ideal bir irrigasyon materyalinden beklenen tüm bu özellikleri sağlayamamaktadır. Bu nedenle bir yandan ideal solüsyona ulaşma çabaları devam ederken bir yandan da mevcut irrigasyon solüsyonlarında ideal özelliklere ulaşma adına farklı irrigasyon uygulama metotları (elektro-kimyasal olarak aktive edilmiş su, ultrasoniklerle kullanım, ozonlu su, lazerler, oksidatif potansiyelli su, fotodinamik terapi, Endox sistemi gibi) geliştirilmektedir (15, 22-24).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan irriganlar şu şekilde sıralanabilir (25);

- Sodyum hipoklorit (NaOCl)
- İyodin solüsyonları
- Klorheksidin glukonat (CHX)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)
- Sitrik asit
- MTAD
- Elektrokimyasal aktive edilmiş su (ECA)
- Işıkla aktive olan dezenfeksiyon

2.1.1. İrrigasyon Solüsyonlarının Sınıflandırılması

2.1.1.1 Kimyasal Ajanlar

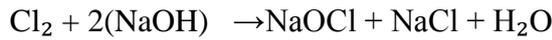
2.1.1.1.1. Doku Çözücü Ajanlar

2.1.1.1.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

Sodyum hipoklorit'in (NaOCl) tıp alanında uzun bir geçmişi vardır. NaOCl'in 'Dakin solüsyonu' olarak bilinen tamponlanmış % 0.5'lik konsantrasyonu ilk kez I. Dünya Savaşı sırasında kimyager Henry Drysdale Dakin ve Alexis Carrel tarafından kontamine olmuş yaraların temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır (12). NaOCl'in endodontide kullanımı ise, ilk defa Walker tarafından 1936 yılında önerilmiştir (26). Özellikle antibakteriyel etkinliği, nekrotik dokuları çözebilmesi ve kanal aletlerine kayganlaştırıcı etki göstermesi sebebiyle endodontik tedavide farklı konsantrasyonları uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

Sodyum Hipoklorit'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri:

NaOCl yeşilimsi sarı bir solüsyondur, geleneksel olarak klor gazı (Cl₂) ile sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonunun, tuz (NaCl) ve su (H₂O) açığa çıkarmak amacıyla reaksiyona girmesi ile oluşur.



NaOCl'ye su ilave edildiğinde hipokloröz asit (HOCl) meydana gelir. HOCl aktif klor içeren güçlü bir okside edici ajandır. Hipokloröz asit mikroorganizmaların hücresel fonksiyonlarını bozarak hücre ölümüne neden olur ve solüsyonun antibakteriyel etkinliğinde önemli bir rol oynar (21).

Ortaya çıkan aktif klor, bakteri hücreesindeki önemli enzimlerin sülfidril gruplarında irreversibl oksidasyona neden olarak hücrenin metabolik fonksiyonlarını bozmaktadır (27).



NaOCl güçlü bir antimikrobiyal ajan olup, direkt teması çoğu bakterinin ani ölümüne neden olmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda vejetatif bakterilere, spor formulu bakterilere, funguslara, protozoa ve virüslere karşı da oldukça etkili olduğu bulunmuştur (28) .

Ayrıca NaOCl'nin, organik ve yağ çözücü olduğu, yağ asitlerini yüzey gerilimini azaltan sabun ve alkole dönüştürdüğü, aminoasitleri de nötralize ederek su ve tuza dönüştürdüğü bildirilmiştir (29).

NaOCl smear tabakasının sadece organik kısmına etki eder ve tek başına smear tabakasını ortadan kaldırmakta yetersizdir. Bu nedenle smear tabakasını kaldırmak için ilave olarak Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ya da sitrik asit gibi inorganik dokuları çözecek ek solüsyonlara ihtiyaç vardır (26). NaOCl, ideal bir irriganın tüm gereksinimlerini karşılayamasa da, günümüzde en iyi proteolitik etkiye sahip irrigasyon solüsyonudur (26). Organik artıklara karşı iyi bir çözücü olması, düşük yüzey gerilimi sayesinde dentin tübüllerine nüfuz edebilmesi, kolay temin edilebilmesi ve ucuz olması nedeni ile günümüzde en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonu haline gelmiştir (30).

Fakat keratinize epitelyum dışında tüm canlı dokulara toksik etki göstermesi, metaller üzerinde korozif (aşındırıcı) etkiye sahip olması, organik maddelere bağlı olarak stabilitesini kaybetmesi ve kötü tadı önemli olumsuz özellikleridir (31).

NaOCl'nin endodontik tedavide kullanılan konsantrasyonu üzerine bir fikir birliği bulunmamaktadır. NaOCl diş hekimliğinde yaygın olarak %0,5 ve %6'lık konsantrasyonlarda kullanılmaktadır (21). Klinisyenler genellikle ticari olarak satılan %5,25'lik NaOCl solüsyonunu su ya da salinle dilue ederek kök kanal irrigasyonunda kullanmaktadır.

Konsantrasyon artışı NaOCl'nin doku çözücü ve antibakteriyel özelliğinin artmasına neden olmakta ancak solüsyonu daha toksik hale getirmektedir. NaOCl solüsyonlarına borik asit, asetik asit gibi spesifik asitler ekleyerek pH'ı 6.75 yapır

antimikrobiyal etkinlik artırabilmektedir. Bu durum solüsyonun doku çözücü etkinliğini azaltabilmektedir (32).

Pashley ve ark.(33) %5.25 NaOCl'nin 1:1000 oranında seyreltilmiş halinin bile kırmızı kan hücrelerini %100'ünde hemoliz yaptığı; 1:100'lük solüsyonun ise kırmızı kan hücrelerinden dışarı çıkan hemoglobini de tahrip ettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın in vivo kısmında deney hayvanlarına uyguladıklarında ise ciddi derecede enflamatuvar reaksiyonlar geliştiğini bildirmişlerdir. Bu durum NaOCl solüsyonunun osmotik basıncının serum fizyolojik ile yakın olmasına karşın hemoliz meydana getirmesini solüsyonun oksidatif özelliklerine bağlanmıştır (33, 34).

Ayrıca NaOCl'nin toksisitesi ile ilgili çeşitli klinik olgu bildirimleri de vardır. Solüsyonun periapikal dokular, göz, maksiller sinüs gibi çevre doku ve organlarla teması sonucu gelişen, dayanılmaz ağrılarla karakterize şiddetli doku yıkımları rapor edilmiştir (30, 35-38).

NaOCl kullanımı sırasında enjektöre aşırı basınç uygulanması ve irrigasyon iğnesinin kanal içerisinde sıkışması sonucu solüsyonun periapikal dokulara taşması ile çevre bağ dokusuna yayılan ödem meydana gelebilmektedir (39). Bunu takiben periapikal dokularda şiddetli bir kanama ve ağrı oluşmaktadır. Bağ dokusu içerisine yayılan kanama sebebiyle ekimoz oluşabilir. Şiddetli ağrı, yanma hissi, ödem, hematoma, periapikal dokularda nekroz ve abse oluşumu en sık gözlenen klinik bulgulardır (35, 40, 41).

Çeşitli araştırmacılar NaOCl solüsyonuna karşı alerjik reaksiyonların da gelişebileceğini bildirmişlerdir (42, 43). Oluşan doku cevabının, iritanın hacmine ve konsantrasyonuna bağlı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (30, 44, 45).

Araştırmacılar, istenmeyen bu etkileri en aza indirme çabası ile solüsyonun etkili olduğu bilinen % 2,6 -% 5.25 arasındaki konsantrasyonları yerine çok daha küçük konsantrasyonlarını kullanmışlardır (21). Ancak düşük konsantrasyonlarda sitotoksik ve irrite edici özellikleri yanında, kendisinden beklenen doku çözücü ve antibakteriyel etkilerinin de belirgin biçimde azaldığı gözlenmiştir (46).

NaOCl'nin belirtilen tüm bu dezavantajları yeni irrigasyon solüsyonu arayışına neden olmaktadır (47, 48).

2.1.1.1.2. Klorin Dioksit (ClO₂)

ClO₂ bileşiğinin gaz formu ilk olarak Humphrey Davy tarafından 1811 yılında hidroklorik asit ile potasyum klorat'ın reaksiyonu ile üretilmiş ve ürün "euklorin" olarak isimlendirilmiştir. ClO₂, NaOCl'e benzeyen ve içme suyu dezenfeksiyon işleminde, veterinerlikte ve yüzey dezenfeksiyonunda kullanılan antibakteriyel özelliğe sahip bir materyaldir (49, 50). NaOCl ve ClO₂'nin organik doku çözme kapasitesini araştıran bir çalışmanın sonucunda her iki solüsyonunda organik doku çözme yeteneğinin eşit olduğu gösterilmiştir (51).

2.1.1.1.2. Asitler ve Şelasyon Ajanları

Asitler ve şelasyon ajanları 1790'lerden sonra demineralizasyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (12). Şelasyon yapıcı ajanlar, dentini kostik ajanlardan daha fazla yumuşatmakta ve yumuşak dokulara daha az zarar vermektedir. Şelasyon ajanları, dentindeki Ca⁺² iyonlarıyla birleşerek şelat tuzları oluşturmaktadır. Bu etkileşimin kanal duvarlarının enstrümantasyona daha az direnç göstermesini sağlayacağı düşünülmüştür (30).

2.1.1.1.2.1. Etilendiamin Tetraasetik asit (EDTA)

1957 yılında Nygaard-Østby tarafından endodontide kullanılmaya başlanmıştır. EDTA, dentin yapısındaki Ca⁺² ile şelasyon yaparak kök kanalında bulunan inorganik dokunun uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır. Dentinin inorganik komponentinin ana bileşenleri olan fosfat ve kalsiyum suda çözünebilmektedir. Çözünmüş halde bulunan kalsiyum iyonları EDTA'ya bağlanarak çözümlenerek uzaklaşmakta ve dentinden yeni kalsiyum iyonlarının çözünmesine neden olmaktadır. Bu süreç dentinin demineralizasyonu ile sonuçlanmaktadır (52). EDTA'nın % 10 - % 17 arası konsantrasyonlarda kullanılabildiği bildirilse de en sıklıkla kullanılan konsantrasyonunun % 17 olduğu belirtilmiştir (8, 53).

2.1.1.1.2.2. REDTA (EDTA-SETREMİT)

EDTA'ya setremit eklenerek yüzey gerilimini azaltmak ve solüsyonun penetrasyonunu arttırmak amacıyla kullanılan irrigasyon solüsyonudur (54).

2.1.1.1.2.3. EDTA-T

EDTA ile katyonik bir deterjan olan %0,2'lik lauryl sodyum sülfatın kombinasyonudur. İçeriğindeki deterjan dentin tübüllerine difüzyonunu ve etkinliğini arttırmaktadır (55).

2.1.1.1.2.4. Sitrik Asit

Sitrik asit EDTA'dan daha güçlü bir şelasyon ajanıdır. EDTA gibi serbest klorin miktarını azaltarak NaOCl'in etkinliğini azaltır. Endodontide smear tabakasını kaldırmak için EDTA'dan sonra gelen en iyi ajan olarak bilinmektedir. Ayrıca antimikrobiyal etkinliği de mevcuttur. Fakat endodontide tek başına kullanımı yetersiz bulunmuştur (56, 57).

2.1.1.1.2.5. HEBP (Etidronik Asit)

HEBP etidronik asit veya etidrona olarak bilinmektedir. NaOCl ile çok kısa süreli bir reaksiyona girdiği için ve toksik olmadığı için EDTA ve sitrik asite alternatiftir (12, 49).

2.1.1.1.3. Antimikrobiyal ajanlar

2.1.1.1.3.1. Klorheksidin (CHX)

Dişhekimliğinde birçok çalışmaya konu olan klorheksidin (CHX), ilk olarak 1954 yılında antiviral bir ajan üretmek için çalışan bilim adamları tarafından katyonik polimerlerin aktivitesini araştırmak için polibisguanidlerden sentez edilip tanımlanmıştır (58).

CHX, aerop ve anaeroplarda dâhil olmak üzere gram (+) ve gram (-) bakterilere, mantarlara, dermofitlere ve bazı lipofilik virüslere karşı etkili geniş antimikrobiyal etkinliğe sahiptir(59).

2.1.1.1.3.2. Mixture Of Tetracycline, Acid, Detergent (MTAD)

Torabinejad ve ark.(60) tarafından şelasyon ve antibakteriyel özellikleri olan bir irrigasyon solüsyonu elde etmek için geliştirilmiştir. MTAD'nin içeriği doksisisiklin, sitrik asit ve yüzey aktif bir deterjan olan Tween-80 den oluşmaktadır ve pH'ı yaklaşık 2.15'tir. Dentini dezenfekte ettiği ve smear tabakasını uzaklaştırdığı belirtilmiştir (61).

2.1.1.1.3.3. Tetraclean

Tetraclean demineralizasyon işleminde kullanılan ajanlardan biridir. Bu solüsyon bakteriyostatik özelliklere sahip asidik bir solüsyon olması bakımından endodontik irrigan olarak da düşünülmüştür (62). Tetraclean MTAD gibi antibiyotik, asit ve deterjan karışımı bir solüsyondur. MTAD'den farklı olan tarafı içeriğindeki antibiyotik konsantrasyonu ve deterjanın tipidir. 50 mg/ml doksisisiklin ve poliprolen glikol içermektedir. Oldukça düşük yüzey gerilimine sahiptir ve biyofilm tabakasına karşı yüksek derecede etkiye sahiptir (63).

2.1.1.1.4. Oksitleyici Solüsyonlar

2.1.1.1.4.1. Elektromekanik Olarak Aktive Edilmiş Solüsyonlar (ECA)

Elektromekanik olarak aktive edilmiş solüsyonlar Rus bilim adamları tarafından geliştirilmiştir. ECA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Musluk suyu ve düşük konsantrasyonda tuz çözeltisinden üretilmektedir (64). İki çeşit solüsyon üretilmektedir;

Anolit solüsyon; yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir, antimikrobiyal etki gösterir. Katolit solüsyon; alkalidir, güçlü temizleme ve deterjan etkisine sahiptir. Her iki solüsyon da üretilmelerinden sonra sadece 48 saat aktif kalırlar (65).

2.1.1.1.4.2. Ozonlu Su

Ozon üç oksijen atomunun döngüsel yapıda bir araya gelmesiyle oluşan ve doğal olarak bulunan bir gaz bileşiktir (66). Bakterisit etki, debridman (yıkama) etkisi, anjiyogenez stimülasyon kapasitesi ve yüksek oksitleme gücü gibi biyolojik özellikleri ile ozonun endodontide irrigasyon solüsyonu olarak kullanımı gündeme gelmiştir (67).

2.1.1.1.5. Doğal Ajanlar

Endodontide irrigasyon solüsyonu olarak kullanılan doğal ajanlar arasında herbal, yeşil çay, morinda sitrifolia, kitosan, propolis, humik asit yer almaktadır.

Endodontik tedavide geçmişten bugüne irrigasyon solüsyonu olarak salin gibi inert maddelerden, son derece toksik ve alerjik özellik taşıyan maddelere kadar çeşitlilik gösteren birçok bileşik kullanılmıştır. Fizyolojik tuzlu su (FTS), çeşitli anestetik solüsyonlar, sodyum hipoklorit (NaOCl), klorheksidin (CHX), MTAD, Tetraclean, klorindioksit (ClO₂), hidrojen peroksit (H₂O₂), doksisisiklin, ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), REDTA, Rc-Prep, SmearClear (SC) gibi şelasyon ajanları, asitler ve lubrikantlar farklı özellikleriyle tek başlarına veya birkaçı bir arada kullanılmış olan önemli solüsyonlar arasında sayılabilir (68-70) .

Fakat bu solüsyonların hiçbiri tam anlamıyla ideal solüsyon özelliklerini taşımadığından yeni solüsyon arayışları da devam etmektedir.

Son yıllarda sağlık sektöründe sentetik kimyasal ürünler yerine doğal ürünlerin tercih edilmesi yönünde bir yaklaşım giderek artmakta ve doğal ürünleri kullanmak aranan özelliklerden biri haline gelmektedir. Dolayısıyla tıpta ve diş hekimliğinin diğer alanlarında olduğu gibi endodontide de yeni irrigasyon solüsyonu üzerine yapılan çalışmalarda bu yönde bir arayış söz konusudur.

Çalışmamızda doğal materyaller grubunda bulunan antimikrobiyal antiinflamatuvar ve rejeneratif etkilerinin yanı sıra immünomodülatör, antioksidan antimutajenik, karsinojenik etkilere ve düşük toksisiteye sahip olduğu bilinen, kolay bulunabilen propolis, kitosan ve humik asit solüsyonunun endodontide yaygın

kullanılan fakat toksik olduğu bilinen NaOCl'ye alternatif bir tedavi seçeneği olup olamayacağı sorusuna ışık tutmak istenmiştir. Bu doğal materyallerin daha iyi bir tedavi seçeneği sunacağının kanıtlanması durumunda tıbbi ve akademik faydaların yanında, ulusal kazanımların da sağlanabileceği düşünölmektedir.

2.1.1.1.5.1. Kitosan

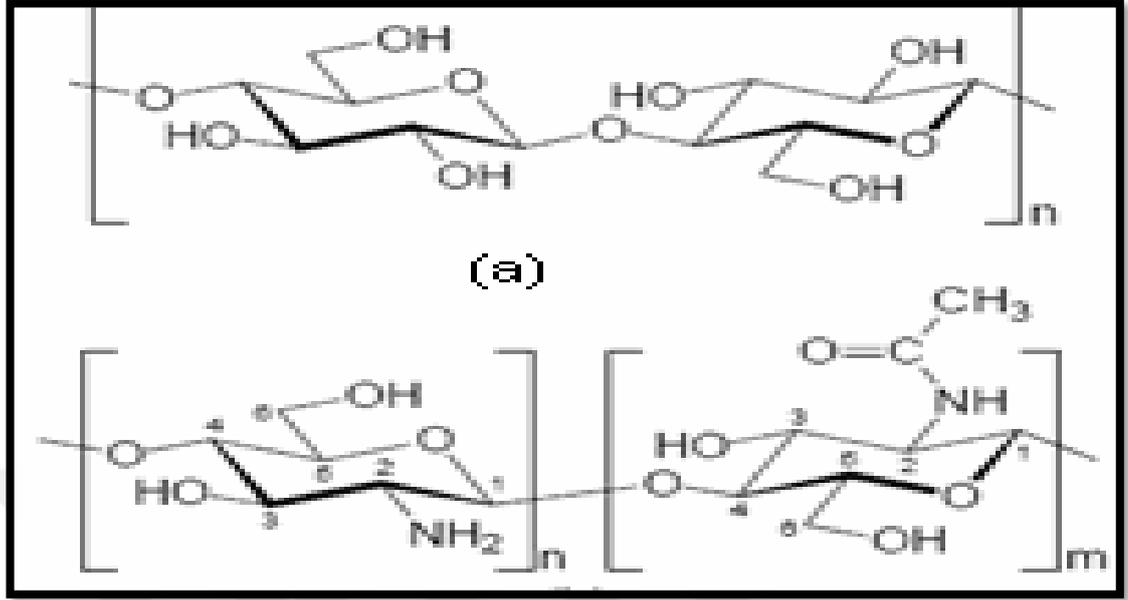
Kitosan, ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfirik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C'de işleme girmiş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan "kitosan"ı elde etmiştir (71, 72).

Kitosanın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir (73). Kabuklu hayvanların dış iskeletindeki kuru ağırlığın yaklaşık %15-20'sini kitin oluşturmaktadır (74).

Kitosan beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partiköl veya toz halinde bir maddedir. Sadece asidik çözücülerde (<6.0 pH) çözüner. Çözme işleminde asetik asit, formik asit, laktik asit gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (%1 hidroklorik asitte çözüner; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozular. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza edilmesi kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir (75).

Bir biyopolimer olan kitin, esas olarak poli-[β-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] yapısında olup çok düşük oranda 2-amino-2-deoksi-β-glukopiranoz monomerlerini de içermektedir (72).

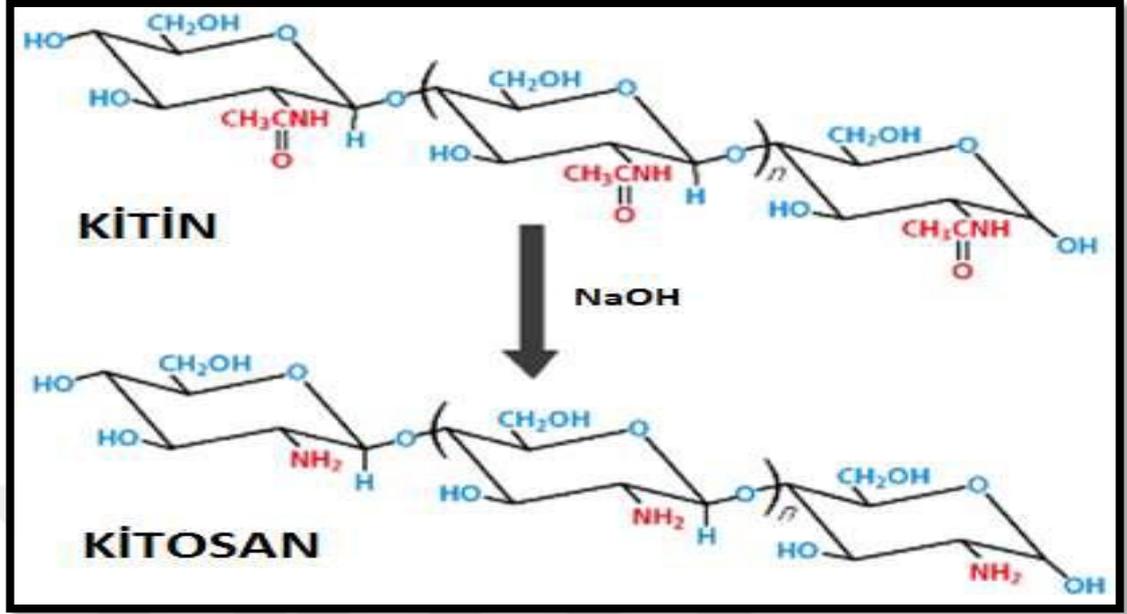


Şekil 2. 1: Sırasıyla selüloz, kitosan ve kitinin kimyasal yapıları.

Kitosanın kimyasal yapısı ise poli- $[\beta\text{-(1,4)-2-amino-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$ şeklindedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır (72).

Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), sekonder (C-3) hidroksil grupları ve amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir (71).

Kitinin düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan (1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin) olarak da bilinmektedir (73).



Şekil 2. 2: Kitinin deasetilizasyonu.

Kitinin elde edildiği kaynağa göre 3 değişik kristal formu (α -, β -, γ -) bulunmaktadır. En çok α - formu kullanılmaktadır ve kolay elde edilebilir olmasından dolayı kitosan çoğunlukla α - kitinden hazırlanmaktadır. β - kitin, zayıf molekül içi kuvvetlere sahiptir. α - kitine göre çözücülere daha hassastır ve yüksek reaktiviteye sahiptir. Bununla birlikte kitosanın kitinden daha reaktif bir materyal olması toz, jel, fiber, film gibi değişik formlarda elde edilmesine olanak sağlamaktadır (76).

Kitin ve Kitosanın Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları:

Geçmişten günümüze teknolojinin ilerlemesi, kitin ve kitosanın kullanım alanlarını artırmıştır. Kitosan günümüzde tıptan gıdaya, ziraatten kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilir (77-79). Özellikle yumuşak ve sert doku iyileşmelerinde, kolesterol kontrolünde, oftalmolojide, yanık tedavisinde, kolesterolün kontrolünde, fazla lipitlerin atılımında kullanımı yaygındır (77, 80, 81).

Diş hekimliğinde ise hem kitin hem de kitosan birçok alanda kullanılmaktadır (82, 83). Diş çürüğüne karşı koruma ve ağız kokusunu önlemek bu kullanım alanları arasındadır. Kitosan tuzları ayrıca diş macunlarına silikon oksitinin kötü tadını

maskelemek için, kitosan tozları ise granüler yapısını korumak amacıyla eklenmektedir. Kitin dolgu materyali olarak da kullanılabilir. Kitin ve kitosan, protezlerde mantar enfeksiyonlarına karşı geliştirilen temizleme ürünlerine ilave edilebilmektedir (77). Van der Mei ve ark. (84) tarafından yapılan çalışmada kitosanın dental plak üzerinde etkisinin olabileceği belirtilmiştir. Jel formundaki kitosan bu nedenle, periodontal ceplerin azaltılması ile ilgili cerrahi işlemlerde de kullanılmaktadır (85-87). Kitosan çeşitli çalışmalarda smear tabakasını kaldırmak için de kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (88-91).

Kitin türevlerinin yapısal özellikleri glikozaminoglikana benzediği için yara iyileşmesinde de kullanılmaktadır (92, 93). Kitin türevlerinin yara iyileşmesini etkileyebilecekleri düşünülen mekanizma makrofajlarla ilgilidir. Kitin türevleri in vivo şartlarda oligomerlere hidrolize olurlar ve bu oligomerler makrofajların interferon, tümör nekrotize edici faktör ve interlekin-1 oluşturmasını aktive ederler. Bu mekanizmalarla kitosan ve türevlerinin; doku rejenerasyonu ve reorganizasyonu sırasında iyileşmeyi hızlandırıcı ve bakterisidal etkileri olduğu da gösterilmiştir. Bu özelliği ile diş hekimliğinde yara iyileşmesinde kullanılarak başarılı sonuçların elde edildiği çalışmalar mevcuttur (77, 94).

Kitosan, oral yumuşak dokuları organik asitlerin zararlı etkilerinden koruması ve belirli patojenlere karşı bakterisit etki göstermesi nedeniyle de önem taşımaktadır (85).

Kitosan ayrıca hemostatik özellikte bir polimerdir. Hemostatik mekanizması klasik pıhtılaşmadan bağımsız olup eritrosit hücre membranı ile kitosan arasındaki etkileşmeye bağlıdır. Yapılan bir çalışmada tavşanların dillerinde yapılan kesiklerde kitosan içeren çözelti uygulanan grupta, kitosan içermeyen çözelti uygulanan gruba göre kanama zamanında azalma olduğu gösterilmiştir. Kitosana sülfat ve karboksil grupları eklenmiş kitosan sülfat türevlerinin ise heparine benzer yapı göstermeleri nedeniyle koagulan özellikte olan kitosanın aksine antikoagulan etkisi bulunmaktadır (72, 95, 96).

2.1.1.1.5.2. Propolis

Propolis bal arılarının bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden topladığı reçineleri, bal mumu ve tükürük salgıları ile karıştırarak elde ettikleri bir üründür (97).

Propolis üretimi için arılar tarafından kullanılan materyal, bitkilerin yara bölgelerinden salgılanan maddeler olabildiği gibi, yapraklardaki lipofilik materyaller ile reçine, bal mumu, müsilaj, zank gibi maddeler de olabilmektedir. Arılar bu salgyıya daha sonra çeşitli enzimler ile polen kaynaklı maddeler de katmaktadırlar (98). Yıllar boyunca propolis insanlar tarafından değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır.

Çeşitli çalışmalarla propolisin etanolik özütünün antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antienflamatuar, antikarsinojenik, antioksidan lokal anestetik ve immünostimülatör özellikler gösterdiği tespit edilmiştir(99-101). Farklı orijine sahip propolis örneklerinin biyolojik aktiviteleri ile ilgili olarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. Günümüze değin, Türk propolisinin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antikarsinojenik gibi çok sayıda biyolojik aktivitesi gösterilmiştir (99, 102-104).

Propolis kimyasal içerik bakımından zengindir. İçerisinde flavonoidler ve cinnamic (hidroksil) asit gibi bileşiklerin olduğu düşünülmektedir (105). Propolisin içerdiği mineral maddeler şunlardır; mangan, çinko, barit, titan, bakır, kurşun, nikel, kobalt, vanadyum, krom, kalay, kalsiyum, fosfor, potasyum, kükürt, sodyum, klor, demir, magnezyum, molibden, alüminyum, silisyum, civa, selen, zirkonyum, flor ve antimondur. Mangan ve çinkonun miktarlarının başka elementlerle karşılaştırıldığında çok daha yüksek miktarlarda olduğu ifade edilmiştir. Propoliste vitaminlerin miktarları düşüktür ve bulunduğu yere göre değişkenlik gösterirler. Propolis B1, B2, B6, C, E, nikotinik ve pantotenik asit vitaminlerini içermektedir (106).

Propolisin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Propolis genel olarak %50 reçine, %30 bal mumu, %10 uçucu yağ, %5 polen ve %5 diğer organik bileşiklerden oluşmaktadır. Propolisin kimyasal bileşimi ve

fiziksel özellikleri toplandığı bölgenin coğrafik yapısına, iklimine bağlı olarak değişim gösterir. Genel olarak propolis koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengiye doğru değişen renklerde bulunabilir. Ayrıca zamana bağlı olarak propolis rengi koyulaşmaktadır.

Yaklaşık olarak 60–70°C arasında erime noktasına sahip olan propolis düşük sıcaklıklarda sert veya donmuş olarak bulunabilir, 0°C’de ise kırılğan özelliğe sahiptir (107). Son yıllarda propolisin biyoaktif özelliklerinden daha iyi yararlanabilmek için kritik ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak sulu çözeltileri elde edilebilmektedir (107).

Propolisin Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları

Propolisin antimikrobiyal etkinliğine ve diş hekimliği malzemelerine seçenek olabileme ihtimaline bağlı olarak ülkemizde ve yurt dışında birçok çalışma yapılmıştır.

Cerrahi yaraların tamirinde Magro-Filho ve de Carvalho (108) propolis içerikli gargarayı kullanmış ve çalışma sonucunda cerrahi yaranın epitelizasyonuna katkı sağladığı tespit edilmiştir.

Moradi ve ark. (109) direkt pulpa kaplaması için kullanılan biyolojik bileşiklerin sayısını artırmak amacıyla propolis solüsyonunu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda propolisli solüsyonun sekonder dentin oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Kayaoğlu ve ark. (110) iki farklı bölgeden alınan propolis özünün *E. faecalis* ile enfekte olmuş dentin tübüllerindeki antibakteriyel etkinliğini kalsiyum hidroksit ve klorheksidinle karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda her iki propolis özünün de kalsiyum hidroksit ve klorheksidine benzer antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Toker ve ark. (111) propolisin dentin hassasiyetini önlemedeki etkinliğini floridile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Propolisle tedavi edilen deney grubu ile

fluoridle tedavi edilen deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığını bildirerek propolisin flouora alternatif başka bir seçenek olduğunu savunmuşlardır.

2.1.1.1.5.3. Humik asit

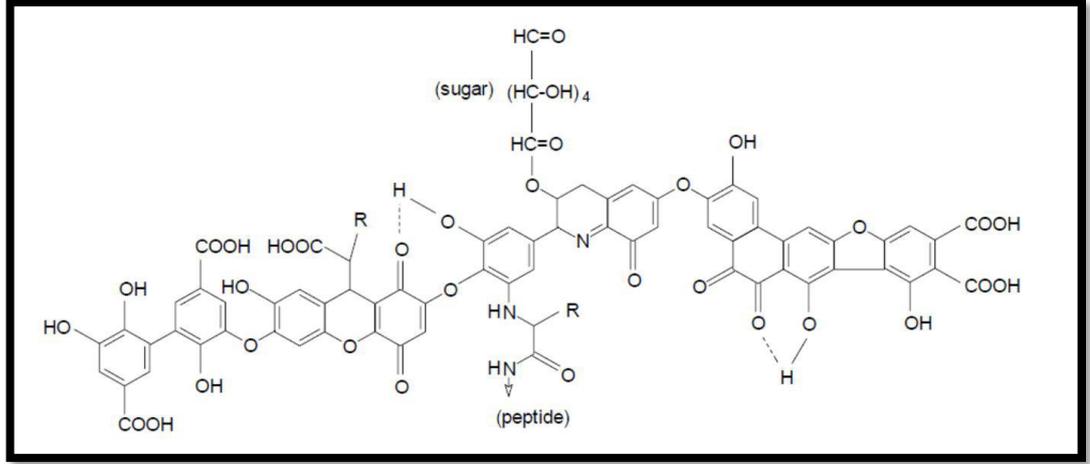
Humik asit birçok farklı maddeden meydana gelebilen, doğada yaygın olarak bulunan ve doğadaki karbon rezervlerinin büyük bir bölümünü meydana getiren doğal bir maddedir (112). Humik maddeler vanillin asit, resorkinol, ferulik asit, protokateşik asit ve benzoik asit gibi değişik fenolik asitler içermektedirler (113).

Bir tek yapısal formül humik maddeleri tanımlamaya yeterli gelmeyecektir. Fakat humik maddeler amino asitli, amino şekerli, peptidli ve aromatik gruplarla bağ kurmuş alifatik bileşikli kompleks aromatik makromoleküller olarak düşünülmektedir (114).

Tablo 2. 1: Humik maddelerin sınıflandırılması ve kimyasal özellikleri.

HUMİK MADDELER				
Fülvik Asit		Humik Asit		Hümin
Açık Sarı	Sarı-Kahverengi	Koyu Kahverengi	Gri-Siyah	Siyah
Renk yoğunluğu artar. Polimerizasyon derecesi artar Moleküler ağırlığı artar. Karbon içeriği artar. Oksijen içeriği azalır. Asit derişimi azalır. Çözünürlük azalır.				





Şekil 2. 3: Humik asit modeli

Kimyasal özellikleri oluşma süresine, fonksiyonel grubuna ve humifikasyon derecesine bağlı olarak farklılık göstermektedir (113).

Ziraat alanındaki yaygın kullanımının yanında humik maddeler tıbbi alanda da kullanılmaktadır. Humik asit tıpta antibakteriyel, antiviral, antitoksik, antiülserojenik, antiartrik, antialerjik, immünomodülatör ve antiinflamatuvar özellik taşıması nedeniyle kullanılmaktadır (115, 116). Humik maddelerin insanlar ve hayvanlarda birçok biyokimyasal etkileri daha önce yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Bunlar protein sentezinin artması, östrojenin uyarılması, araşidonik asitin azaltılması ve lökotrienler, prostaglandinler ile tromboksanlar gibi iltihabi reaksiyonda yer alan medyatörlerin salınımının engellenmesini içermektedir. Bütün bu özelliklerin yanında kollajen sentezini indükleyerek de yara dokusunun iyileşmesinde yardımcı rol oynadığı bilinmektedir (117, 118). Yapılan bazı araştırmalarda ise humik asidin ve fulvik asidin antimikrobiyal ve anti-HIV özelliği gösterilmiştir (119-121).

2.2. Biyoyumluluk

Biyoyumluluk, bir materyalin canlı dokular ile temas halindeyken, herhangi bir cevap oluşturmaması, lokal veya sistemik olarak karsinojenite göstermemesi, konak tarafından yıkıma uğratılmaması anlamına gelmektedir (122, 123). Genel olarak bir

materyalin biyoyumluluğu, materyalin allerjenitesi, sitotoksisitesi, genotoksisitesi, oluşturduğu sistemik cevaplar ve karsinojenik özellikleriyle birlikte değerlendirilmektedir (124, 125).

Bir materyalin biyoyumlu olarak kabul edilebilmesi için konakçı, materyal ve materyalin fonksiyonu uyumlu olmalıdır. Biyoyumluluk dinamik bir olay olup bu faktörden herhangi birinde değişiklik meydana geldiğinde bozulmaktadır (123). Biyoyumluluk için yalnızca materyal değil aynı zamanda materyalin çevre dokularla arasındaki etkileşimde de önemli rol oynamaktadır (126). Kısaca biyoyumluluk için konak, materyal ve materyalin fonksiyonu arasındaki etkileşimin birleşimi en önemli noktadır (123).

2.2.1. Dental materyallerde biyoyumluluk

Biyoyumluluk, diğer tıp alanlarında olduğu gibi diş hekimliğinde de herhangi bir dental restoratif materyallerin taşınması gereken temel özelliklerden birisi olarak kabul edilmektedir (123).

Birçok materyal özellikle de restoratif materyaller oral mukoza, dentin, pulpa, periodontal ve periapikal dokular gibi canlı dokularla uzun süre temas halindedir. Bu nedenle klinik kullanıma geçilmeden önce bu materyallerin ve/veya komponentlerinin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Materyaller bu değerlendirme sonrası elde edilen bilgiler dahilinde klinik kullanıma sürülmelidir (127).

Dental materyallerin biyoyumluluklarının değerlendirilmesi, biyolojik faktörleri, hasta risk faktörlerini, klinik deneyimleri ve mühendislik üzerine çalışmalarını içeren kompleks bir alandır (123).

Endodontide kök kanal tedavisinde kök kanallarının yıkanması ve doldurulması sırasında farklı içerikli birçok materyal kullanılmaktadır. Kullanılan materyaller çevre yumuşak ve sert dokularla temas etmektedir. Bu materyallerin biyoyumlu olmaması, temasta olduğu bölgede bulunan hücrelerin yapısında, proliferasyonunda, adezyonunda, enzim sistemlerinde ve dolayısıyla tüm yaşamsal

fonksiyonlarında dejenerasyonların meydana gelmesi ihtimalini de beraberinde getirmektedir(128). Ayrıca kullanılan bu materyallerin yapısal özellikleri tedavinin başarısını önemli ölçüde etkilemektedir (127).

Diş hekimliğinde kullanılan malzemeler biyouyumluluk değerlendirilmesinde beş ayrı grupta incelenmektedir (129):

1. Ağız dışında bulunan ancak vücudun diğer bölümleri ile yutma, solunma veya dokunma yoluyla temasta olan malzemeler,

2. Ağız içinde bulunan ve yumuşak dokularla temas halindeki malzemeler,

3. Pulpanın sağlığını etkileyebilecek malzemeler,

4. Kanal dolgu malzemeleri,

5. Diş sert dokularının sağlığını etkileyebilecek malzemeler.

Dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri, istenmeyen doku reaksiyonlarının çok çeşitlilik göstermesi nedeni ile karmaşık ve kapsamlı bir konudur. Materyallerin biyouyumluluk açısından incelenmesinde çok sayıda teknik mevcuttur (130).

1982 yılında Uluslararası Diş Hekimliği Birliği (FDI), Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu "International Organization for Standardization" (ISO) ve Amerikan Diş hekimleri Birliği [American Dental Association (ADA)] tarafından ortak görüş ile yayımlanan klavuzda; biyolojik testler birincil testler, ikincil testler ve kullanım testleri olarak üç grupta sınıflandırılmıştır (131).

1. Birincil Testler (İn vitro testler):

- Sitotoksikite

- Genotoksikite

- Östrojenite bu grupta yer alan testlerdir.

2. İkincil Testler (İn vivo hayvan deneyleri):

- Sensitizasyon
- İmplantasyon
- Mukozal irritasyon bu grupta yer alan testlerdir

3.Kullanım Testleri (İnsanlarda Klinik Uygulamalar):

- Pulpa ve dentin testleri
- Pulpotomi testleri
- Endodontik kullanım testleri bu grupta yer almaktadır.

Schmalz biyoyuymulluk değerdendirilmesinde uygulanacak test yöntemlerinin seçimini ise aşağıdaki tablo ile özetlemiştir (130).

Tablo 2. 2: Biyoyuymulluk çalışmalarda uygulanan test yöntemleri.

	Sistemik reaksiyonlar	Lokal reaksiyonlar	Alerjik reaksiyonlar	Diğer reaksiyonlar
İn vitro	Hücre kültürü testleri spesifik problemler için kullanılır.	Hücre kültürü testleri Agar üstü testler MTT testi Dentin – bariyer testi	Hücre kültürü modelleri geliştirilmektedir	Mutajenite Ames testi Mikronükleus testi HPRT testi Fare lenfoma testi
Hayvan deneyleri	Akut LD ₅₀ (Oral uygulamalar) Kronik LD ₅₀ (Oral uygulamalar)	İmplantasyon testleri Kullanım testleri Endodontik testler Pulpa/dentin testleri İmplantasyon testleri	Modifikasyonlu Maksimizasyon testi Lokal lenf nodu testi	Mikronükleus testi Teraojenite Üreme üzerindeki toksisite
Hasta	Klinik çalışmalar			
Diğer	Mesleki temas, zehirlenme			

1.İn vitro testler (öncül testler, eleme testleri, başlangıç testleri): Test malzemesinin, uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir (132).

Bu testler, hücre ve dokuda oluşan yaralanmaların dejeneratif (reversible) ve nekrotik (irreversible) aşamalarında ortaya çıkan spesifik olayları inceler (129).

Dental materyallerin olası toksik etkilerinin, geleneksel in vivo metotlarla değerlendirilmesindeki kısıtlamalar, in vitro test metotlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (133).

Bu tür testler, test tüpleri, hücre kültür plakları, flask veya diğer taşıyıcı kaplarda yapılabilmektedir. Memeli hücreleri, organeller, dokular, bakteri veya bazı enzim türleri, biyolojik sistem olarak kullanılabilir. Test edilecek materyal veya bu materyalden elde edilen özüt, biyolojik sistemle temas edecek şekilde test kabına yerleştirilir (134).

Biyolojik sistemle materyal arasındaki temas, direkt veya indirekt olabilmektedir. Direkt temasta biyolojik sistem, materyal ile doğrudan temas halinde iken, indirekt temasta biyolojik sistemle materyal veya özüt arasındaki etkileşim agar, filtre membranlar veya dentin gibi bariyer sistemleri sayesinde olmaktadır (127, 134)

İn vitro biyoyumluluk testlerinin amacı; vücut dokuları üzerine veya içine yerleştirildiklerinde, malzemelere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonun test ortamında oluşturulmasıdır (127, 135).

Bu testler, sitotoksitate, hemolizis, ağız veya damar yolu ile kullanım sonucu sistemik toksisite, inhalasyon toksisitesi, teratojenite, karsinojenite tahmin testleri, Ames mutajenite testi, Styles hücre transformasyon testi gibi, bir seri yöntemi kapsamaktadır (136).

İn vitro testlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir (127, 136);

1. Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
5. Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,
6. Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkân tanınmaları,
7. Hayvan ve kullanım testlerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmalarıdır.

İn vitro testlerin dezavantajları ise şunlardır (131, 133):

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. İn vitro ortamın organizmada bulunan immün sistem, inflamatuvar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık koordinasyon mekanizmalarına sahip olamaması.

Birçok in vitro sistemde tek tür hücre kullanılması bu tür etkileşimlerin oluşmasını engellemektedir. Bu durum, in vitro test sonuçlarının in vivo şartlarla uyumluluğunu tartışmalı hale getirmektedir.

Tüm sitotoksikite testlerinde, test sisteminin nontoksik, steril ve tekrarlanabilir olması önemlidir.

2-İn vivo hayvan deneyleri (ikincil testler): Test edilecek materyal, fare, rat, koyun, kedi, köpek ve domuz gibi bazı deney hayvanlarına implante edilmektedir

(134). Bu şekilde materyal ile biyolojik çevre arasında oluşabilecek karmaşık ilişkilerin gözlemlenmesi hedeflenmektedir. Test materyali klinik kullanıma en yakın şekilde deney hayvanına yerleştirilir. Biyolojik cevap, kısa (7+/-2 gün) veya uzun (70 +/-5 gün) takip süreleri sonunda alınmaktadır.

Fakat biyolojik cevabın karmaşık yollarla oluşması, sonuçların kantitatif olarak değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Hayvan testlerinde değişkenlerin kontrolü genellikle zordur. Etik ilkeler ve hayvan hakları gibi konuların önem kazanması bu testlerin kullanılmasını giderek azaltmaktadır (134). İn vivo test çeşitleri bağ dokusu veya kemik dokuya implantasyon, oral mukoz membran irritasyon testleri ve sensitizasyon testlerini içermektedir.

3-Klinik koşullarda kullanıma dayanan testler: Klinik kullanım testleri herhangi bir materyalin insanlarda veya hayvanlarda klinik olarak kullanılması hedeflenen alana yerleştirilmesi sonrasında, materyale verilen cevapların gözlenmesi esasına dayanmaktadır (137). Klinik kullanım testleri, hayvan veya insanlar üzerinde yapılabilmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan testlere “klinik deneme” denilmektedir. Klinik kullanım testlerinin insanlar üzerinde yapılabilmesi için bir materyalin klinik uygulamaya geçebilecek düzeye geldiğine ait yeterli çalışma ve veri olması gerekmektedir. Bu testlerde materyal kullanılacak son haliyle gönüllü bir insana yerleştirilir. İnsanlar üzerinde yapıldığında bu testlerin klinik tabloyu yansıtmaya potansiyeli oldukça yüksektir (138).

İN vivo testler hayvanlar üzerinde, klinik kullanım testleri ise malzemenin subkutan (deri altı), kas ya da kemik içerisine yerleştirildikten sonra doku cevabının incelenmesine dayanır. Kullanım testleri en iyi değerlendirme sonuçlarını vermektedir, fakat öncesinde in vitro ve in vivo testlerin yapılması gerekmektedir (139).

Yaptığımız bu çalışmada in vitro sitotoksosite testi uygulanmıştır. Dental materyallerin sitotoksisitelerini değerlendirmek için çoğunlukla biyolojik sistem olarak hücre kültürleri kullanılmaktadır (139, 140).

2.3. Hücre Kültürü

1885'te Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun meduller tabakasını alarak salin solüsyonu içinde günlerce canlı tutarak hücre kültürünün temellerini atmıştır (141).

Hücre kültürü bir dokudan spontan migrasyonla ya da mekanik veya enzimatik yöntemlerle ayrılmış, in vitro şartlarda yaşatılan ve çoğaltılan tek tip hücre topluluğudur. Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli çoğalmasını ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadırlar. Besleyici sıvılar hayvan embriyo ekstraktlarını, plazma-serum aminoasit ve minerallerini, şeker ve tuzları, vitamin ve antibiyotikleri içermektedir (142).

2.3.1. Hücre Kültürü Çeşitleri

Farklı dokulardan üretimi sağlanabilen hücre kültürleri genel olarak:

1. Primer hücre kültürleri
2. Diploid hücre kültürleri
3. Devamlı hücre kültürleri, olarak üç sınıfta gruplandırılmaktadır.

2.3.1.1. Primer hücre kültürleri

Orijinal dokudan yeni izole edilen kültürler ilk pasajlamaya kadar primer kültür olarak bilinir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşır (143). Primer kültürden sonra, pasajlama ile hücre hattı olarak tanımlanan alt kültür elde edilir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluşturmaktadırlar (143).

2.3.1.2. Diploid Hücre Kültürleri:

Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilmektedirler. Tekrarlanan pasajlar sonucu orijinal dokunun karyotipini büyük oranda kaybetmemiş olan hücre dizileri olarak tanımlanır.

2.3.1.3. Devamlı Hücre Kùltürleri:

Subkùltürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kùltürlerdir. Herhangi bir kùltürün, devamlı doku kùltürü olabilmesi için en az 70 kere subkùltürünün yapılması gerekmektedir. Bu hücreler, sürekli transformasyona uğramaları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Devamlı hücre hatları, embriyonik veya kanserli dokulardan kodlanarak kullanıma sunulmuştur. Standardize edilerek ve kodlanarak kullanıma sunulmuştur (144, 145).

Sitotoksitenin değeriendirilmesinde primer hücrelerin devamlı hücrelere oranla daha etkili oldukları bilinmektedir. Bununla birlikte, primer ve devamlı hücre kùltürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevaplar arasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır (135, 146).

Dental materyallerin toksisitelerinin değeriendirilmesinde primer, sekonder ve devamlı hücre kùltürlerinin üçü de kullanılmaktadır (147, 148).

Hücre Kùltür Çalışmalarının Avantajları (135, 149) ;

1. Hücre kùltürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağılı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç gibi koşullar hücre kùltüründe daha kolay sağlanabilir.

2. Homojenite kontrolü sağlanabilir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Yapılan pasajlar sonrasında, kùltüre edilmiş hücreler homojen hale gelirler. Hücrelerin homojenitesi elde edilen ürünlerin kalitesi açısından önemlidir.

3. Hücre kùltürleri ekonomiktir. İn vivo sistemlerde, test için canlıya verilen maddenin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda, canlı bir organizmada, verilen maddenin ancak %10'una bir cevap alınabilirken, hücre kùltürlerinde bu oran %90'lara kadar çıkabilmektedir.

Hücre Kültür Çalışmalarının Dezavantajları (149);

1. Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşır ve bir miktar ölüm her zaman gerçekleşir.

2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğu için, primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkiler.

3. Deneyim çok önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilite, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirir.

4. Hücre kültürleri ekonomik olmasına rağmen, kullanılan hücre üretme araçları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna karşılık elde edilen ürünün saf olması çok önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin de geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır.

2.3.2. Hücre kültürü test yöntemleri

Diş hekimliği materyallerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılan hücre kültürü test yöntemlerinin çoğu ilaçların sitotoksitesinin değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerden uyarlanmıştır. Ancak ilaç ve dental materyaller çözünürlük konusunda aynı değildir. Dental materyaller ilaçlara göre daha düşük çözünürlük gösterirler. Bu nedenle dental materyallerin sitotoksite testleri yapılırken test yöntemi metodunda ve değerlendirme ölçütlerinde bir takım modifikasyonlar yapılmaktadır (136).

Diş hekimliğinde sitotoksite değerlendirmesinde kullanılan test düzenekleri başlıca şu şekilde özetlenebilmektedir (150);

1. Ekstraksiyon yöntemi

2. Bariyer yöntemi

3. Direkt temas yöntemi

1.Ekstraksiyon yöntemi: Katı materyalleri değerlendirmek için kullanılır. Kanal patının biyoyumluluk değerlendirmesi için uygun olan test yöntemidir. Biyoyumluluğu test edilecek olan kanal patı test için belirtilen uygun miktarda hazırlanıp hücre besiyerinde belirlenen bir süre boyunca bekletilir. Bu işlemin amacı materyale ait sitotoksik bileşenlerin çözülerek besiyerinde birikmesidir. Elde edilen katı materyale ait ekstraktlar hücre üzerine uygulanarak seçilen test yardımı ile materyalin sitotoksik aktivitesi saptanır. Bu yöntemde besi yerinde tam olarak çözünme göstermeyecek materyaller olabileceğinden etanol, alkol gibi farklı çözücülerin kullanılması gerekebilir (151) .

2.Bariyer yöntemi: Kanal dolgu patları gibi katı ve irrigasyon solüsyonları gibi sıvı materyallerin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu yöntem uygulanırken in vivo ortam koşulları yaratmak için değerlendirilecek materyal ve ilgili hücre arasında bariyer vardır. Bariyer olarak agar veya agrose ya da değişik boyutlarda porlar içeren polikarbonat membranlar kullanılır. Değerlendirilecek materyal sıvı ise filtre kâğıtlara emdirilip agar/agarose içerisine yerleştirilerek değerlendirme yapılır. Değerlendirilecek materyal katı ise membranlı özel hücre kültürü kullanılarak değerlendirilir. Her iki yöntemde de materyaller uygun bariyer üzerine yerleştirilerek test süresinin sonunda hücre aktivitesi üzerinden sitotoksik etkileri belirlenir (152).

3.Direkt temas yöntemi: Bu test yöntemi katı ve sıvı materyallerin değerlendirilmesinde kullanılır. Değerlendirilmesi yapılacak katı materyal uygun miktarda hazırlanarak daha önceden kültür kaplarına ekilmiş hücreler üzerine yerleştirilir ya da materyal hazırlanıp direkt kültür kabına yerleştirildikten sonra üzerine hücreler ekilir (152). Bu yöntemle test edilecek uygun konsantrasyona ayarlanan sıvı materyaller ise daha önceden kültüre edilmiş hücreler üzerine doğrudan uygulanır. Yapılan çalışmalarda irrigasyon solüsyonları sulandırılırken hücre besiyeri ve distile su kullanıldığı belirtilmiştir (150, 153, 154).

Materyallerin hücre kültürü ile sitotoksik etkilerini değerlendirmek için birçok test vardır. Bu testlerden her biri hücreye ait farklı bir durumu değerlendirmektedir. Bu testler (155);

1. Canlılığı değerlendiren testler,

2. Yaşamı değerlendiren testler,
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler,
4. Hücre metabolizmasını değerlendiren testler.

1. Canlılığı değerlendiren testler:

Bu test ile belirli bir uygulama ve zaman sonrasında canlı hücrelerin oranının ölçülmesi ile kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir. Canlılık testlerinde, hücre içerisine giren eritrosin, tripan mavisi ya da naftalin siyahı gibi boyaların alınımının veya normalde canlı hücreler içerisine giren diasetil florasan, nöral kırmızı gibi boyaların salınımının ölçümüne dayalı olarak hücrelerin membran bütünlüğünün değerlendirilmesi esas alınır (155).

2. Yaşamı değerlendiren testler:

Hızlı ve kolay uygulanabilen bir test olmakla birlikte sadece test esnasındaki ölü hücreleri göstermesi dezavantajıdır. Fakat toksik etkilere maruz kalan hücreler günler veya daha fazla süre etki gösterebilmektedir. Bu nedenle yaşam değerlendirme testleri gibi kısa dönem testleri yerine uzun dönem testleri daha çok tercih edilmektedir (155).

3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler:

Hücre hasarını belirlemek için proliferasyon oranının kullanımı esasına dayanan test yöntemidir. Proliferasyonun değerlendirilmesinde 3H-timidin testi ve bromodeoksiuridin immünohistokimyasal teknik kullanılır. Hücre sayımı bu test ile direkt olarak yapılırken, ölen hücrelerin dışarıda bırakılması amacıyla vital boya uygulanması ile beraberde uygulanabilmesi avantajıdır (156).

4. Hücre metabolizmasını değerlendiren testler:

Hücrelerin metabolik değişimlerinin tespit edilebildiği testlerdir. Hücre metabolizmasını değerlendiren testler uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler(156). Toksik materyaller solunum ile glikolizis metabolizmasında tüketilen oksijen ve üretilen karbondioksit

miktarını değiştirmektedir, bu testte bu değerler manometre ile ölçölür. MTT, XTT, NR ve LDH testleri bu grup içerisinde yer alan yaygın olarak kullanılan enzimatik testlerdir (157).

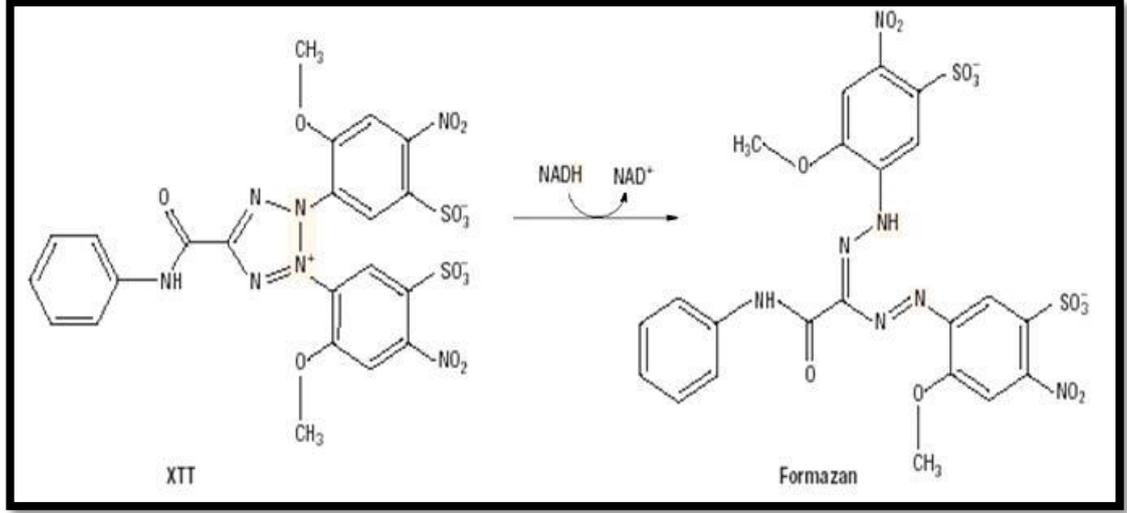
2.4. Sitotoksisite

Sitotoksisite moleköler olaylar sonucunda hücrede çeşitli makromolekölerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır(156). Sitotoksisite testlerinden hücrenin yaşayabilirliği ve hücrenin proliferasyonu gibi farklı parametreler değerlendirilerek veri elde edilir. Bu parametrelerden en önemlileri metabolik aktivite ve DNA sentezidir (158, 159).

XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sölfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) testi: Yaptığımız çalışmada kullanılan sitotoksisite test yöntemidir. XTT Paull ve arkadaşları tarafından 1988 yılında sentezlenen bir tetrazolyum tuzudur. Tetrazolyum tuzları histokimyasal lokalizasyon çalışmalarında ve hücre biyolojisi deneylerinde belirleyici reaktifler olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (160). Hücre biyolojisi ve hücre kültürü çalışmalarında sitotoksite gösteren yapıların elenmesi ve büyüme faktörlerinin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan kimyasallardan biridir.

XTT bulunmadan önce bu amaçlar için öncelikle içerisinde radyoaktif atomlar bulunan DNA etiketli BrdU kullanılmış ama hücre kültürü çalışmalarında yanlış sonuçlara yol aıtığından kısa sürede kullanımından vazgeçilmiştir. 1950 yılından sonra tamamen hücre kültürü çalışmalarında XTT kullanılmıştır. XTT DNA sentezi ve metabolik aktivite üzerine temel değerlendirme sağlayacak bir test yöntemidir. XTT hücre proliferasyonu, sitotoksisite ve apoptoz deneylerinde etkili bir şekilde kullanılabilir (160).

XTT renksiz ya da hafif sarı renkli bir bileşik olup indirgenendiğinde parlak portakal rengine dönüşmektedir.



Şekil 2. 4: XTT' nin formazana dönüşümü.

Aktif olarak proliferen olan hücrelerde XTT dönüşümündeki artış spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir. Bu değer her hangi bir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda hücresel proliferatif aktivitenin göreceli artışı belirlenir (160). XTT ölçümünden önce çözme gerektirmez. Bununla birlikte XTT'nin indirgenmesinin hassasiyeti de oldukça yüksektir.

2.5. Genotoksisite

Genotoksisite, DNA ve DNA bileşenlerinin oluşumunda meydana gelen hasarlarla birlikte mutasyonu da içine alan geniş kapsamlı bir terimdir. Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde devamlı olarak hasarlar oluşmakta, oluşan hasarlar DNA tamir sistemleri tarafından onarılmaya çalışılmakla birlikte, hasarın çok büyük boyutta olduğu veya DNA onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasarlar birikmektedir. Bu birikme zamanla mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (161). Kimyasallar DNA üzerinde direkt etki gösterebilir. Bu etki genotoksisite olarak adlandırılır. Genotoksik etkiyle değişen DNA gelecek nesillere aktarılabilir. Bu etki ise mutojenite olarak adlandırılır. Bu etki subtoksik konsantrasyonlarda görülür. Mutojenite ile kanserojenite arasında da bir ilgi söz

konusudur (162). Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunun gösterilmesi, genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur (163, 164). Pek çok kimyasalın, gelecek nesiller üzerine, kanser riski de dahil olmak üzere olası genetik hasara sebep olabilecek mutajenik özellikler taşıdığı bilinmektedir. Bu nedenle bu tür kimyasalların tanımlanması ve insan maruziyetinin sınırlandırılması gerekmektedir.

Genotoksisite Testleri

Genetik toksisite testleri, geliştirilmekte olan kimyasalların potansiyel kanserojenitelerinin araştırılması, genetik etki spektrumunun karakterize edilmesi ve toksisite ve kanserojenite test sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olarak kullanılır (163).

Genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart in vitro ve in vivo mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (164).

DNA çift sarmal yapıda uzun iplikli bir moleküldür. Bu sarmal guanin, sitozin, timin ve adenin nükleik asitlerinden oluşmaktadır. Nükleik asitlerin riboz ya da deoksiriboz şekerleri ile birleşmesiyle deoksiadenozin, deoksitimidin, deoksisitidin ve deoksiguanozin adı verilen nükleozidler oluşur. Son yıllarda, oluşan DNA hasarının belirlenmesinde DNA baz hasarları da analiz edilmiştir (165).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 15.05.2015 tarih ve 2015-05/30 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra çalışmaya başlanmıştır. Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri tarafından Diş-167 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan solüsyonlar: Solüsyon olarak %5.25'lik NaOCl, %15'lik propolis, %0,2'lik kitosan ve %10'luk humik asit kullanılmıştır. Deneyde kullanılacak solüsyonlar aseptik şartlarda hazırlandıktan sonra deneyin diğer aşamalarına geçilmiştir.

Hücre Hatları: Çalışmamızda kullanılan irrigasyon solüsyonlarının sitotoksosite ve genotoksosite etkinliğini değerlendirmek için human gingival fibroblast (HGF1 (ATCC® CRL2014™)) hücre hattı ve human osteoblast (hFOB 1.19 (ATCC® CRL 11372™)) hücre hattı olmak üzere iki ayrı hücre tipi kullanılmıştır (American Type Culture Collection, Manassas VA).

Kimyasallar: Deneylerde kullanılan DMEM- Low-Glucose (Sigma – Aldrich),FBS (Sigma–Aldrich), Tripsin (Applichem), L-Glutamin Streptomisin (Sigma –Aldrich), RPMI 1640(Sigma –Aldrich) XTT Kiti (Applichem A -1080), 8-OHdG kiti (Applichem A -1080) temin edilmiştir.

Cihazlar: Deneylerde CO₂ inkübatör (NUAIRE), laminar-flow kabin (BIOHAZARD) buzdolapları (BOSCH), santrifüj (MSE Mıstral 1000) ve Elisa-reader (THERMO-SCIENTİFİC–Multiskan FC) kullanılmıştır.

3.1. Hücre kültürü

Deneylerimizde kullanılan hücre hatlarının tamamı kontaminasyonun önlenmesi için dondurularak gönderilmiştir. Bunun için çalışmamıza ilk olarak bu hücre hatlarını çözdürerek başlanılmıştır.

3.1.1. Hücre zdrme Protokolü

Donmuş halde Cryo tüpte bulunan hücreler su banyosunda çözdürüldü. Hücreler falkonlara aktararak üzerlerine 20 ml DMEM konuldu. Ardından falkonlar 5 dakika 800 rpm de santrifüj edilip santrifüj sonunda üstte kalan sıvı kısım atıldı.

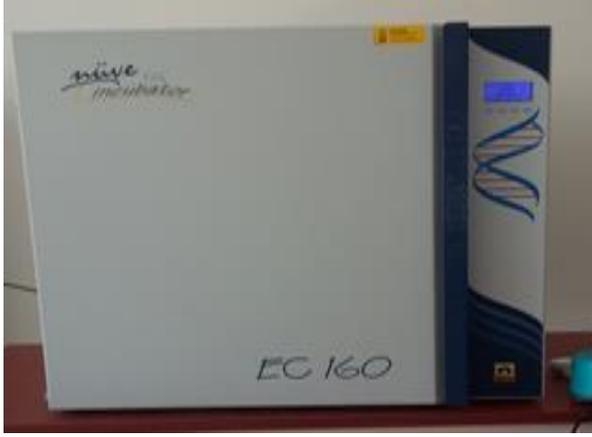


şekil 3.1: Deneyde kullanılan soęutmalđ santrifüj.

Falkonda kalan hücrelerin üzerine 15 ml DMEM eklenerek ortam flasklara aktarıldđ. Flaskın içerisine 5 ml FBS ve birkaç damla antibiyotik konularak flaskın kapaęđ kapatılıp inkübatöre kaldırıldı.

3.1.2. Hücrelerin yıkanması

Flaskların içerisinde büyüyen ve sayıları artan hücrelerin besiyeri azaldđđđ için hücre ölümünün önüne geçmek amacıyla hücrelerin yıkanması işlemi yapıldđ. Bu işlem flow kabinde gerçekleştirildi. Flaskta bulunan ortam boşaltıldıktan sonra içerisine 15 ml DMEM konuldu. Ardından flaskın içerisine 5 ml FBS ve üzerine birkaç damla L- Glutamin eklenerek inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 3. 2: Deneyde kullanılan inkübatör.

3.1.3. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler flaskın bütün yüzeyini kapladığı anda yeni bir flaska pasajlanması gerekmektedir. Aksi takdirde hücreler besin yetersizliği ve alan darlığı nedeniyle kontamine olmaya başlayacak ve kısa bir süre sonra da öleceklerdir. Bunun önüne geçmek için hücreler pasajlanmıştır.

Flaskta bulunan ortam boşaltıldıktan sonra 5 ml Tripsin konuldu. Ardından Tripsinin üzerine 15 ml DMEM konuldu. Bir flask yeni bir flask olacak şekilde pasajlama yapıldı. Flaskın içerisinde toplam 20 ml ortam bulunduğundan eski flastan 10 ml plateyt yardımıyla alınarak flaska aktarıldı.

Bütün flaskın içerisine 8 ml DMEM, 4 ml FBS eklenip ve içlerine birkaç damla L-glutamin konularak flasklar inkübatöre kaldırıldı.

3.1.4. Hücrelerin 96 Kuyucuklu Platelere Ekilmesi

Pasajlama durumuna gelen flasklar seçilerek ekim işlemine başlandı. Bu işlem flow kabinde gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3: Deneyde kullanılan Laminar Flow.

Ekim için tercih edilen flaskların ortamı boşaltıldı. Flaska yapışan hücrelerin kaldırılması amacı ile ortama 5 ml Tripsin eklendi. Bu flask 3 dk inkübatörde bekledildikten sonra, üzerine 15 ml DMEM eklendi ve pipetaj yapılarak flaskların içerisinde iyice yıkanması sağlandı.

Flasklar daha sonra bir flask bir falkon olacak şekilde falkonlara aktarıldı. Falkonlar 800 rpm hızda 8 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra hücreler falkonların alt kısmında toplandı.

Üst kısımlarında kalan ortam döküldü. Falkonlara vurularak hücreler kaldırıldı ve hücrelerin üzerine besiyeri eklendi. 96 kuyucuktan her birine 200 µl lik karışım konuldu. İşlem bitiminde 96 kuyucuklu plateler inkübatöre kaldırıldı.

3.1.5. Hücrelere Solüsyon Uygulanması

Steril herhangi bir falkonun içerisine 40 ml DMEM ve 10 ml FBS konularak hazırlanan karışımın pipetaj yapılarak homojen dağılımı sağlandı.

Deneyde kullanılacak solüsyonlar uygulanarak 96 kuyucuklu platelere ekilen hücrelerin ortamı boşaltıldı. Vorteks sonucunda elde edilen homojen karışımlar hacimleri 10-6,10-7,10-8,10-9 M olacak biçimde kuyucuklara yüklendi. İşlem bitiminde 96 kuyucuklu plateler inkübatöre kaldırıldı.

3.1.6. Hücelere XTT Uygulanması

Besiyeri ortamı bulunan plate boşaltıldı. Kuyucuklara 100 µl besiyeri, 100 µl XTT solüsyonu uygulanarak 4-24 saat 37°C’de inkübasyonda bırakıldı.

XTT yöntemi: Solüsyonların sitotoksik etkisi XTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler 4. ve 24. saatlerde 2 kuyucuk olacak şekilde 96’lık mikropatlelerde XTT (2,3,- bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5 kaboksanilit tuzu) solüsyonu kullanılarak spektrofotometrik ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Reaktifler 50/1 (işaretleme ajanı/aktivasyon ajanı) oranında olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. XTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olmakla beraber canlı hücrede mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Reaksiyon ELISA cihazında okunup kantite edilmiştir. ELISA cihazında 490 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD) okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.



Şekil 3. 4: XTT uygulamasının ardından platelerde renk değişimi.

Plateler 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ELISA okuyucuda okundu.



Şekil 3. 5: Platelerin eliza okuyucuya yerleştirilmesi.

3.1.7. Genotoksisite için 8-OHdG ELISA kiti uygulanması

Çalışmada kullanılan solüsyonların hücre hattı üzerinde oluşturduğu genotoksik hasarın belirlenmesinde 8-hidroksi-deoksiguanozin ELISA kiti kullanıldı.

64, 32, 16, 8, ng/mL standart çözeltileri hazırlandı. Kuyucuklardan bir kısmına 50µL standart, 50 µL streptomycin-HRP eklendi. Diğer kuyucuklara da 40µL örnek, 10 µL VEGF antitodisi, 50 µL streptomycin-HRP eklendi. 37°C’de 60 dk. inkübe edilen playt, 5 defa PBS ile yıkandı.Yıkanan kuyucuklara 50 µL kromojen reagent A, 50 µL kromojen reagent B çözeltisi eklenerek 37°C’de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Tepkimeyi durdurmak için üzerine 50 µL stop çözeltisi eklendi. Renk aniden maviden sarıya döndü. Plateler 490 nm’de spektrofotometrik olarak okundu.



Şekil 3. 6: Durdurucu (stop) Materyalinin Uygulanmasının Ardından Sarıdan Maviye Renk Değişimi.

3.1.8. Sonuçların İstatistiksel Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterildi. Gruplar içerisinde ve 4 saat ile 24 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Bağımlı t testi ile değerlendirildi. Absorbans ve konsantrasyon düzeyleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile 1:1 ve 1:5 oranları (dilüsyon yapılmadan ve 5 kat dilüsyon ile) arasındaki farkın önemliliği ise Student's t testi ile araştırıldı. Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunun önemli bulunması halinde anlamlı farka neden olan grup/grupları belirlemek amacıyla post hoc Tukey testi kullanıldı. $p < 0.001$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Human gingival fibroblast ve human osteoblast olmak üzere iki farklı hücre tipine dört farklı irrigasyon solüsyonunun uygulandığı bu çalışmada XTT test yöntemine ait sitotoksosite verilerine ve 8-OHdG test yöntemine ait genotoksosite verilerine ait bulgular belirtilmiştir.

4.1. Sitotoksosite Test Sonuçlarına Ait Bulgular

4.1.1. Human gingival fibroblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların sitotoksik etkinliğine ait bulgular

Deney grupları ve kontrol grubuna ait XTT yöntemi ile 4. ve 24. saatler sonunda elde edilen verilerin ortalama absorbans düzeylerinin bulguları tablo 4. 1. de verilmiştir.

Tablo 4. 1: Human Gingival Fibroblast Hücre Hattı üzerinde gruplar arasında zamana göre absorbans düzeylerinin dağılımı

Human Gingival Fibroblast Hücresi Sitotoksosite			
Gruplar	4.saat (au)	24.saat (au)	¹ P
Kontrol	1,1400±0,8832 ^a	1,237±0,7564 ^a	> 0,001
Propolis	0,7925±0,03096 ^b	0,6375±,02208 ^c	<0,001
Humik asit	0,8375±0,2986 ^b	0,7425±0,2309 ^b	< 0,001
NaOCl	0,4425±0,04113 ^c	0,2475±0,02217 ^e	<0,001
Kitosan	0,8425±0,2210 ^b	0,3825±0,01708 ^d	<0,001
² P	<0,05	<0,05	

1 Gruplar içerisinde 24-48 saat arasında yapılan karşılaştırmalar (Bağımlı t testi p<0,001 Anlamlı kabul edilmiştir). 2 Gruplar arası karşılaştırmalar (Tek Yönlü Varyans Analizi p<0,05 Anlamlı kabul edilmiştir). au: Absorbans unit

Bütün grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda deney grupları (propolis, humik asit, NaOCl, kitosan) ile kontrol grubu arasında hem 4 hem de 24 saat grubunda oluşan sitotoksik etki arasında anlamlı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Tek yönlü varyans analizi ile yapılan değerlendirmede tablo 4. 1 de görüldüğü üzere, kontrol grubuyla deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 4. 1 görüldüğü üzere 4 saatlik incelemede kontrol grubundan sonra en fazla hücre canlılığı kitosanda iken, en düşük hücre canlılığı NaOCl grubunda gözlenmiştir ($p<0,05$).

Deneyimizin 24. saate ait bulgularında, en fazla hücre canlılığı kontrol grubu ve humik asitte iken en düşük hücre canlılığı NaOCl grubunda izlenmiştir ($p<0,05$).

Her bir solüsyonun 4 ve 24 saatlik sitotoksitesine bakıldığında ise kontrol grubu haricindeki tüm gruplarda uygulama süresi arttığında oluşan sitotoksik etkinin de anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,001$).

4.1.2. Human osteoblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların sitotoksikite etkinliğine ait bulgular

Tablo 4. 2: Human Osteoblast Hücre Hattı üzerinde gruplar arasında zamana göre absorbans düzeylerinin dağılımı.

Human Osteoblast Hücresi			
Gruplar	4.saat	24.saat	p^1
Kontrol	1,1400±0,8832	1,237±0,7564	>0,001
Propolis	0,9225 ±0,01708	0,5625±,02945	<0,001
Humik asit	0,8275±0,2363	0,4125±0,2363	<0,001
NaOCl	0,3875±0,01713	0,3375±0,00957	<0,001
Kitosan	0,6205±0,4546	0,2225±0,00708	<0,001
P^2	<0,05	<0,05	

1 Gruplar içerisinde 24-48 saat arasında yapılan karşılaştırmalar (Bağımlı t testi $p<0,001$ Anlamlı kabul edilmiştir). 2 Gruplar arası karşılaştırmalar (Tek Yönlü Varyans Analizi $p<0,05$ Anlamlı kabul edilmiştir). au: Absorbans unit

Tablo 4. 2 de görüldüğü üzere Human osteoblast hücre hattı üzerine uygulanan deney solüsyonlarının sitotoksitesisi 4 saat gurubunda incelendiğinde kontrol grubundan sonra en fazla hücre canlılığı propoliste iken, en düşük hücre canlılığı NaOCl grubunda gözlenmiştir ($p<0,05$).

24 saat grubuna ait bulgularda ise en fazla hücre canlılığı kontrol grubu ve propoliste iken en düşük hücre canlılığı NaOCl grubunda izlenmiştir. Tek yönlü varyans analizi ile yapılan değerlendirmede tablo 4.2 de görüldüğü üzere, kontrol grubuyla deney grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 4. 2 de görüldüğü üzere her bir solüsyonun 4 ve 24 saatlik sitotoksitesisine bakıldığında ise kontrol grubu haricindeki tüm gruplarda uygulama süresi arttığında oluşan sitotoksik etkinin de anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,001$).

4.2.Genotoksisite Test Sonuçlarına Ait Bulgular

4.2.1. Human gingival fibroblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların genotoksik etkinliğine ait bulgular

Fibroblast hücre hattı üzerinde 4 farklı solüsyon uygulanarak genotoksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Solusyonlar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için elde edilen değerler $p(\text{sig.}):0,935>0,001$ olduğundan normal dağılım varsayımını sağlamıştır. Bununla birlikte Levene varyansların homojenliği testine göre $p(\text{sig.}):0,232>0,001$ olduğundan varyansların homojenliği varsayımı da sağlanmıştır. Bu nedenle farklılığı test etmek için Anova varyans analizi testi kullanılmıştır.

Tablo 4. 3: Human gingival fibroblast hücre hattı üzerinde solüsyonların genotoksik etkisinin değerlendirilmesi

Human Gingival Fibroblast Hücresi	
Solüsyon	Absorbans Değerleri
Kitosan	1,0001±0,37152 ^a
NaOCl	0,5090±0,25932 ^b
Humik Asit	0,5276±0,05730 ^b
Propolis	0,8760±0,30123 ^{a,b}
Kontrol	0,7210±0,23229 ^{a,b}
P	0,002*

p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. N: 8

P(sig.):0,243<0,001 olduğundan human gingival fibroblast hücre hattı üzerinde oluşan genotoksisite de solüsyonlar arası anlamlı bir fark bulunduğundan Tukey testine göre 2 grup oluşmuştur. 1.ci grupta sırasıyla NaOCl, humik asit, propolis solüsyonları ve kontrol grubu yer almaktadır. Buna göre en yüksek genotoksisiteye sahip NaOCl uygulanan grup olmuştur. 1.ci gruba göre daha yüksek ortalamaya sahip düşük toksisiteli 2.ci grupta kontrol, propolis ve kitosan solüsyonları yer almaktadır. 2. grup veri sonuçlarına göre ise en düşük genotoksisite kitosan uygulanan grup olmuştur.

4.2.2. Osteoblast hücre hattı üzerine uygulanan solüsyonların genotoksik etkinliğine ait bulgular

Osteoblast hücrelerde 4 farklı solüsyon kullanılarak genotoksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Solüsyonlar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı belirlenmek istenmiştir. Elde edilen değerler p(sig.):0,112>0,001 olduğundan normal dağılım varsayımını sağlamıştır. Levene varyansların homojenliği testine göre p(sig.):0,00033<0,001 olduğundan varyansların homojenliği varsayımı

sağlanmamıştır. Bu nedenle farklılığı test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

Tablo 4. 4: Human osteoblast hücre hattı üzerinde solüsyonların genotoksik etkisinin değerlendirilmesi

Human Osteoblast Hücresi	
Solüsyon	Absorbans değerleri
Kontrol	0,71438±0,271567
Kitosan	0,48888±0,329378
NaOCl	0,81388±0,135818
Humik asit	0,66925±0,091819
Propolis	0,64975±0,291657
p	0,133

p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. N: 8

Osteoblast hücre hattı üzerinde oluşan genotoksisite değerlendirilmesinde solüsyonlar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Endodontik tedavide başarıyı yakalamak için kök kanal sisteminde bulunan enfekte organik pulpal bileşenlerin, inorganik dokuların, periapikal dokular açısından enfeksiyon riski taşıyan tüm mikroorganizmaların ve toksik ürünlerinin uzaklaştırılması ve ardından kök kanalının ideal olarak şekillendirilip üç boyutlu olarak sızdırmaz bir şekilde doldurulması gerekmektedir (8, 10). Bunun sağlanması için uygun bir irrigan ve irrigasyon sisteminin kullanılması da tedavinin önemli prosedürleri arasında yer almaktadır (166).

Endodontik tedavide kullanılan irrigasyon solüsyonlarının bir kısmı, eskiden beri kullanılan solüsyonlar olmakla birlikte en iyi klinik ve biyolojik yanıtı alabilmek amacıyla ideal kök kanal irrigasyon solüsyonu arama süreci günümüzde hala devam etmektedir.

Modern tıbbın ve diş hekimliğinin bugün üzerinde en çok çalıştığı konulardan biri, tedavide kullanılacak en doğru materyalleri bulmak ve organizma üzerinde en uygun biçimde kullanımını sağlamaktır. Bu bağlamda endodontik tedavide kullanılan materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi büyük bir önem taşımakta olup, biyouyumluluk, herhangi bir dental restoratif materyalin klinik uygulamada kullanılması için gerekli temel şartlarından biri olarak kabul edilmektedir (167, 168).

Biyoyumluluk kısaca, belirli bir uygulamada bir materyalin uygulandığı bölgede uygun bir konak cevabı oluşturabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (169).

Kök kanal tedavisinde kanalların irrigasyonunda farklı içeriğe sahip birçok solüsyon kullanılmaktadır. Kullanılan irrigasyon solüsyonlarının kanal boşluğu içerisinde sınırlı kalmayıp apikal foramen aracılığı ile sement, periodontal ligament ve alveolar kemikten oluşan periapikal dokular ile temas ettiği bilinmektedir. Irrigasyon solüsyonları ayrıca mine, dentin/pulpa, periodonsiyum, yanak, dil ile de lokal olarak karşı karşıya gelebilmektedir (170-172).

Ayrıca çeşitli çalışmalarda, kemomekanik preparasyon esnasında irrigasyon iğnesinin ucu apekikale yaklaştıkça irrigasyon solüsyonunun apikalden taşıdığı ve eğeleme işlemleri sırasında kanal aletinin piston görevi yaparak solüsyonu apeks çevresine pompaladığı belirtilmiştir (37, 173-177).

Bu durum değerlendirildiğinde irrigasyon solüsyonlarının çevre dokularla temas etmesi durumunda bölgedeki hücrelerin yapısında, proliferasyonunda, adezyonunda, enzim sistemlerinde ve dolayısı ile tüm yaşamsal fonksiyonlarında dejenerasyon meydana getirmemesi, biyoyumlu olması istenmektedir (168, 178).

Dental materyaller biyoyumlu olmadığına uygulama alanındaki dokularda pek çok muhtemel yan etkileri oluşturma potansiyeli taşırlar. Bunlar toksik, enflamatuar, allerjik ve mutajenik etkiler olarak sınıflandırılabilir. Dental materyallerin klinikte kullanılmasından önce bu olası yan etkilerin incelenmesi ve mevcut yan etkilerin derecesinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (168, 179).

Walton ve Torabinejad (180) kök kanal tedavilerinin başarısını etkileyen faktörleri sınıflandırdıkları bir araştırma yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda kök kanal tedavilerinde elde edilen başarıyı kullanılan materyallerin biyoyumluluğunun önemli derecede etkilediğini bulmuşlardır. Bu nedenle yeni materyal geliştirme sürecinde, kimyasal ve mekanik özelliklerin yanında materyalin biyoyumluluğu da göz önünde bulundurulması gerektiğini belirtmişlerdir.

Schwarze ve ark.(157) periapikal bölgeye doğrudan temas eden veya kök kanalı içerisinde olup periapikal dokulara zamanla salınan bileşiklerin biyoyumlu olmadığına, periapikal lezyonun iyileşmesine olumsuz etkide bulunabileceğini ya da yeni bir periapikal enflamasyon oluşumunu indükleyebileceğini bildirmişlerdir.

Bu konuda yapılmış bir diğer çalışma sonucunda ise çevre dokularla biyoyumlu olmayan materyallerin periapikal dokulara temas ettiğinde iltihap, nekroz ve beraberinde ağrı oluşturabileceğini, devam eden süreçte ise ilgili bölgenin iyileşmesi ve fonksiyonun sağlanmasında gecikme veya yapılan endodontik tedavide başarısızlık riski oluşabileceği belirtilmiştir (181).

Endodontik tedavi sırasında kullanılan irrigasyon solüsyonlarının tedavi boyunca periapikal dokularla teması söz konusudur. Bu materyallerin çevre dokularla uyumlu olmadığına periapikal bölgedeki hücreler üzerinde sitotoksik ve genotoksik hasar oluşturabileceği çeşitli araştırmalarda vurgulanmıştır (182-184).

Bu bilgiler dahilinde bu çalışmada endodontide en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonu olan NaOCl'e alternatif olabileceğini düşündüğümüz propolis, kitosan ve humik asitin sitotoksik ve genotoksik etkinliği karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Yeni geliştirilen materyallere karşı gelişebilecek pek çok muhtemel yan etki mevcuttur. Materyallere ait bu yan etkilerin klinik kullanım öncesi değerlendirilmesi gerekmektedir. Günümüzde yeni geliştirilen hemen hemen her materyal için değerlendirilen ilk yan etki toksisitedir (168, 179). Bizim çalışmamızda da toksik etki sitotoksik etki ve genotoksik etki olarak iki alt grupta incelenmiştir.

Sitotoksiste; materyallerin dokularla teması sonrasında hücrede çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi, buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (185, 186). Sitotoksiste testlerinden hücrenin yaşayabilirliği ve hücrenin proliferasyonu gibi farklı parametreler değerlendirilerek veri elde edilir. Bu parametrelerden en önemlileri metabolik aktivite ve DNA sentezidir (158, 159).

Genotoksiste; ise genel anlamda materyallerin hücreye ait genetik yapıda değişiklik oluşturması, materyalin çevre hücrelerin DNA sekansının bir bölümünü değiştirmesi olarak ifade edilebilir. Bu durum, materyal ile DNA'nın doğrudan veya dolaylı yoldan etkileşmesiyle meydana gelmektedir (187).

Hücreler sahip oldukları bazı mekanizmalarla, genetik hasarın bir sonraki nesle aktarılmasını için programlanmış hücre ölümleri (apoptoz) gibi mekanizmalarla meydana gelen genotoksik hasarı onarabilirler. Ancak genetik hasar onarılmaz ve bir sonraki nesle aktarırsa mutajenite meydana gelir (186).

Medikal ve dental materyallerin biyouyumluluklarını değerlendirmek için şimdiye kadar çok çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir. İlk olarak hücre kültürlerinin

kullanıldığı in vitro testler ile değerlendirilen materyaller, tatmin edici sonuçlar elde edildiği takdirde hayvan testleri ile (in vivo) ve ardından son basamak olan klinik testlerle değerlendirilmektedir (169). Kısaca bir materyalin biyouyumluluğunun araştırılması için; in vitro hücre kültür testleri, in vivo hayvan testleri ve klinik kullanım testlerinin sırası ile uygulanması materyalin hasta üzerinde rutin kullanımı öncesi değerlendirmesi için izlenecek en doğru yoldur (188).

İn vivo testlerde materyallerin toksisitesinin değerlendirilebilmesinde hayvan deneyleri kullanılmaktadır. Ancak, deneyler sırasında hayvanlara bağlı faktörlerin deney sonuçlarını ve çalışmanın güvenilirliğini etkilemesi söz konusudur. Ayrıca hayvanlar ve insanlardaki fizyolojik reaksiyonlar birbirinden farklı olabilmektedir. Deney sırasında hayvanlara bağlı bu faktörler, farklı biyolojik etkileşimler meydana getirmekte ve anlamlı sonuçlar elde edilmesini engelleyebilmektedir (133).

Ayrıca bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımı, hayvan hakları açısından giderek artan şekilde sorgulanmakta ve sınırlandırılmaktadır. Bunun yanı sıra hayvan deneylerinin pahalı ve zaman alıcı oluşu, hayvanların beslenme ve bakımlarında ortaya çıkabilecek sorunlar in vivo çalışmaların kullanımını zorlaştırmaktadır (129).

Klinik kullanım testleri ise standardize edilmiş yöntemler şeklinde gönüllü, sağlıklı insanlarda ya da primatlarda uygulanmaktadır. En çok kullanılan primatlar köpek türleri, maymun türleri, tavşanlar ve farelerdir (189).

Geçmişte materyaller sitotoksosite ve genotoksosite açısından insanlar üzerinde yapılan klinik kullanım testleri ile değerlendirilmekteydi. Ancak günümüzde bir materyalin biyolojik dokular üzerine etkilerini incelemek için, insanların denek olarak kullanılması, etik olmamasının yanı sıra, yasal olarak da kabul edilmemektedir. Bu nedenle materyallerin biyouyumluluğunu belirlemek için insanlarda uygulanmadan önce geniş kapsamlı in vitro ve in vivo testler ile değerlendirilmesi gerekmektedir (190). Aynı şekilde ağız içerisinde kullanılacak materyallerin de oluşturacağı biyolojik cevabın önceden in vitro ve in vivo test yöntemleri ile değerlendirildikten sonra klinik kullanım testine başvurmak gerekmektedir.

İn vivo ve klinik kullanım testlerine ait bütün bu olumsuz etkilerin yaptığımız bu çalışma sonucunun etkilenmemesi ve daha doğru bir sonuç alınabilmesi için kullanılan irrigasyon solüsyonlarının toksik etkilerini değerlendirmek ve oluşabilecek biyolojik reaksiyonları taklit edebilmek için çalışmamızda in vitro biyoyumluluk testleri kullanılmıştır (129).

Bir materyalin toksisitesini belirlemek amacı ile yapılan araştırmalarda yaygınlıkla kullanılan in vitro hücre kültür testleri, canlı dokuların fizyolojik durumunu taklit etmektedir (157).

İn vitro çalışmalar; kontrol edilebilen şartlarda yürütülen ve hücrel toksisitenin oluşum mekanizmasını açıklayan, uygulanması kolay araştırma test yöntemleridir. Bu testlerde hücrel olaylar tek başına, karmaşık hücreler arası ilişkilerden bağımsız olarak değerlendirilmektedir (191).

Hücre kültür test yöntemleri ayrıca materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara imkân verirler, tekrarlanabilirler, bireysel faktörlerden etkilenmezler ve çalışma koşulları standardize edilebilirler (131, 133, 186). Ayrıca hücre kültür test yöntemleri, hayvan deneylerine kıyasla uygulaması daha kolay, daha az zaman alan ve daha ekonomik testlerdir (192).

Birçok araştırmacı, çeşitli alanlarda kullanılan materyallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmek için hücre kültürü yönteminin hayvan çalışmalarından ve klinik çalışmalardan üstün olduğunu belirtmiş olup çalışmalarını hücre kültürü üzerinde gerçekleştirmiştir. Endodontide çeşitli irrigasyon ajanlarının biyoyumluluğunu değerlendirmek için in vitro hücre kültür yönteminin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (144, 153, 193-195).

Prado ve ark. (196) fosforik asit ve diğer endodontik irrigasyon ajanlarının sitotoksik ve antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırdıkları, Marins ve ark. (197) NaOCl, EDTA, MTAD ve sitrik asitin sitotoksitesini ve genotoksitesini değerlendirdikleri çalışmada, Alkahtani ve ark.(198) Qmix in sitotoksitesini değerlendirdikleri çalışmada, Zhang ve ark. (199) MTAD'ın sitotoksitesini inceledikleri çalışmada ve Chan ve ark.(200)yeni nano partiküllü bir irriganın

sitotoksitesinin değerlendirdikleri çalışmada in vitro hücre kültürünü kullanmışlardır.

Bütün bu bilgiler ve yaptığımız diğer literatür taramaları bizi in vitro şartlarda hücre kültürü test yöntemi üzerinden çalışmamızı yürütmeye yönlendirmiştir.

Dental materyallerin sitotoksitesilerinin incelenmesinde en çok kullanılan hücreler insan ve farelerin çeşitli dokularından alınan hücrelerdir. Bununla birlikte tavşan, domuz ve başka pek çok sayıda hayvandan da hücreler elde edilerek materyaller test edilebilmektedir. Ancak insan ve hayvan hücre fizyolojisinin farklı olması nedeniyle çalışmadan elde edilen verilerde insan hücresi üzerinde yapılar kadar emniyetli olmamaktadır.

Hücre kültür testlerinde en çok kullanılmış hücre tipleri ise; fibroblastlar, makrofajlar, odontoblast hücreleri, gingival fibroblastlar, nöron hücreleri, keratinositler, osteoblast benzeri MG63 hücreleri ve osteoblastlardır (189).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik özelliklerinin incelendiği deneysel bazı çalışmalarda ise dişeti dokusundan izole edilen epitel veya fibroblast hücrelerinden oluşan primer hücre kültürleri de kullanılmıştır. Ancak, kullanılan primer hücre kültürlerinin birkaç pasajlamadan sonra değişime uğraması, testlerde elde edilen biyolojik cevaplarda varyasyonlara neden olarak toksisite bulgularının karşılaştırılması ve standardizasyonu açısından önemli bir dezavantaj oluşurmaktadır (135, 168).

Çeşitli irrigasyon solüsyonlarının in vitro test yöntemi ile sitotoksitesini ve genotoksitesini incelemeyi amaçladığımız bu çalışmamızda tüm bu bilgiler dahilinde, kullanım alanının geniş olması ve standart biyolojik cevap elde edilebilmesi amacıyla ve klinik duruma yakın bir ortam hazırlayabilmek için, endodontik materyallerinin klinik olarak yerleştirildiği bölge ve yakın temas halinde oldukları hücreler de göz önünde tutularak, human gingival fibroblast hücreleri ve human osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Human gingival fibroblast hücreleri ve human osteoblast hücreleri apikalde endodontik materyaller ile reaksiyona katılan major hücrelerdir (201).

Fibroblastlar, periodontal bağ dokusunun yapım sürecinde birçok önemli rol üstlenmektedirler. Bu hücreler periodontal hastalık sürecinde ekstrasellüler matriksi yıkmakla ve enflamatuvar sitokinleri salgılamakla görevlidir. Osteoblast hücreleri ise kemik yapımından sorumlu ana hücelerdir (202, 203). Ayrıca çalışmamızda iki farklı tipte hücre hattı seçilerek hücre hatlarının test edilen irrigasyon solüsyonlarına verecekleri cevapları belirleyip karşılaştırılarak bu materyallerin sitotoksitesite, genotoksitesite ve rejenerasyon etkinliği hakkında daha kapsamlı sonuç elde edilmesi amaçlanmıştır.

Endodontide çeşitli amaçlarla kullanılan, birbirinden kimyasal açıdan farklı çok çeşitli materyalin değerlendirildiği birçok çalışmada in vitro hücre kültüründe bizim çalışmamızda olduğu gibi insana ait hücreler kullanılmıştır. Alhaktanı ve ark. (204) NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının sitotoksitesitesini değerlendirdikleri çalışmada, Barnhart ve ark. (205) endodontide kullanılan çeşitli irrigasyon solüsyonlarının sitotoksitesitesini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, Konjhodzic-prcic ve ark. (206) dört farklı kök kanal patının sitotoksitesitesini karşılaştırdıkları çalışmada, Parirokh ve ark. (207) ile Zhou ve ark. (208) farklı kanal patlarını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada, Jung ve ark. (209) MTAD, biodentin, amalgam ve kompozit materyallerinin toksitesitesitesini inceledikleri çalışmada, Chen ve ark. (210) kalsiyum silikat bazlı simanların endodontide kullanımı ile ilgili yaptıkları in vitro çalışmada insan hücrelerini kullanmışlardır.

Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarla benzer olarak human gingival fibroblast ve human osteoblast hücreleri tercih edilmiştir.

Çalışmamızda solüsyonların hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksitesitesite etkinliğinin belirlenmesinde ise XTT test yöntemi kullanılmıştır.

Bu test suda eriyebilir bir bileşik olan XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'nin canlı hücrelerce turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenme düzeyinin, metabolik aktivite göstergesi olarak ölçüldüğü kolorimetrik bir görüntüleme yöntemidir (211).

XTT testi, standart yönteme göre daha kısa sürede sonuç verme avantajı sunmaktadır. Ayrıca çok sayıda örneğin hızla çalışılıp sonuçların değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır (212). Endodontide yapılan ve çalışmamızla benzer özellikler taşıyan birçok çalışmada da sitotoksisitenin değerlendirilmesinde XTT test yöntemi tercih görmüştür.

Reichl ve ark. (213) geleneksel kök kanal patlarının DNA hasarına etkilerini inceledikleri çalışmada, Lee ve ark. (214) yeni geliştirilen MTA bazlı kök kanal patının sitotoksisitesini inceledikleri çalışmalarında, Petel ve ark. (215) iyodoform içerikli kök kanal patlarının proliferatif ve sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, De-deus ve ark. (216) bioseramik esaslı kaide materyallerinin sitotoksisitesini değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmalarında XTT test yöntemini kullanmışlardır.

Bu araştırmada da benzer olarak kullanılan irrigasyon solüsyonlarının oluşturduğu sitotoksisiteyi değerlendirmek amacıyla XTT yöntemi tercih edildi.

Çalışmada kullanılan solüsyonların kullanılan hücreler üzerinde oluşturduğu toksisite, sitotoksisite testine ilave olarak periapikal dokularda meydana gelen genotoksik etkinin derecesi ve oluşabilecek diğer yan etkileri belirlemek açısından genotoksisite testi ile değerlendirildi. Endodontik tedavide periapikal dokularda genotoksik etki gösteren birçok materyallerin varlığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiş olup bu alandaki çalışmalar önem taşımaktadır (217-219).

Genotoksisite testleri kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV, iyonize radyasyon), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada etkin bir şekilde kullanılmaktadır (165).

Çalışmamızda da kullanılan irrigasyon solüsyonlarının kullanılan hücreler üzerinde oluşturduğu genotoksisite, DNA üzerinde gösterdiği hasar 8-OHdG belirteci kullanılarak değerlendirilmiştir.

DNA da Cu^{+2} iyonları en çok G-C den zengin bölgelerde bulunması, bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek

afinite ile bağlanıp H₂O₂ ile etkileşime girerek DNA hasarını başlatması nedeniyle en fazla hasara guanin bazının maruz kaldığı belirtilmiştir (220).

8-OHdG en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen DNA hasar ürünüdür ve çalışmamızda da genotoksisiteyi değerlendirmede 8-OHdG kullanılmıştır (221). Normal şartlarda, insan dokularındaki 8-OHdG ve diğer okside baz oluşumu ile bunların onarım hızı, kişiden kişiye değişmekle birlikte, neredeyse birbirine eşittir. DNA üzerindeki 8-OHdG bileşikleri 8-oksoguanin glikozilazlar tarafından kesilerek uzaklaştırılır. Fakat onarım yetersiz olduğu koşullarda hasar kalıcı hale gelir ve mutajenite oluşur (222-224) .

8-OHdG DNA'da meydana gelen hasarı deney ortamında belirlemek için kullanılan en yaygın ürünler arasında yer almaktadır (184, 225-227) . Ayrıca 8-OHdG, birçok çalışmada tek başına DNA hasarının göstergesi olarak da kullanılmıştır (228). Diş hekimliğinde birçok alanda da çalışmamızda olduğu gibi DNA hasarını tespit etmek amacıyla 8-OHdG bileşenine bakılmıştır.

Atalayın ve ark. (229) çeşitli bonding ajanlarının oluşturduğu DNA hasarını tespit etmek için hücre kültürü üzerinde 8-OHdG bileşenine bakmışlardır. Kurgan ve ark. (230) kronik periodontitis nedeniyle meydana gelen DNA hasarını belirlemede tükürük içerisindeki 8-OHdG bileşenini baz almışlardır. Agha-hosseini ve ark. (231) liken planus ve skuamöz hücreli karsinomaya bağlı olarak gelişen genotoksisiteyi tükürük içerisinde yer alan 8-OHdG markırına bakarak değerlendirmişlerdir. Volk ve ark. (232) TEGDMA'nın oral keratinokistler üzerinde oluşturduğu genotoksik etkiyi değerlendirmek için 8-OHdG değerine bakmışlardır. Buljan ve ark.(233)braketlerin oluşturduğu strese bağlı olarak gelişen DNA hasarını belirlemek için yaptıkları çalışmada aynı yönteme başvurmuştur.

Yaptığımız tüm bu literatür taramalarından elde edilen veriler ve dental materyallerin genotoksisitesi üzerine yapılmış birçok çalışmada belirtilen bilgiler tarafımızdan değerlendirilerek bu çalışmada da genotoksisitenin belirlenmesinde 8-OHdG belirtecinin kullanılmasına karar verilmiştir.

NaOCl endodontide en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonu olmasına karşın yüksek bir toksisiteye sahiptir. Bu nedenle günümüzde hala NaOCl'ye alternatif olabilecek irrigasyon solüsyonu arayışı devam etmektedir (234). Yaptığımız bu çalışmada alternatif olabilecek diğer solüsyonlar ile NaOCl'in sitotoksitesi ve genotoksitesi karşılaştırılmıştır.

NaOCl'in en önemli dezavantajlarından birini oluşturan toksisitesi üzerinde literatürde birçok çalışma mevcuttur. Botton ve ark. (218) süt dişlerinde pulpektomi işleminde kullanılan irrigasyon solüsyonlarının toksisitesi ve farmakolojik açıdan değerlendirmesini yaptığı NaOCl (%1 ve %2,5), %2 klorheksidin, %6 sitrik asit ve %17 oranında EDTA'nın karşılaştırıldığı tüm irrigasyonların bazı derecelerde toksisite gösterdiğini bulmuşlardır. NaOCl'nin diğer üç gruba göre daha toksik olduğunu bulmuşlardır.

Ok ve ark. (235) %5,25'lik NaOCl ve %2'lik CHX'in sitotoksik etkilerini human gingival fibroblast hücreleri üzerinde değerlendirmiş ve çalışma sonucunda NaOCl CHX'e göre daha sitotoksik bulunmuştur.

Bajrami ve ark. (236) farelere ait gingival fibroblast hücrelerinde %3 NaOCl, %2 CHX ve MTAD'in sitotoksitesini değerlendirmiş, çalışma sonucunda NaOCl diğer solüsyonlara göre daha sitotoksik bulunmuştur.

Navarro-escobar ve ark. (237) %2,5'lik NaOCl, %15'lik sitrik asit ve %5'lik fosforik asitin sitotoksitesine in vitro hücre kültüründe bakmıştır. Çalışmaların sonucunda NaOCl diğer gruplara göre daha sitotoksik bulunmuştur.

Serper ve ark. (238) %5 NaOCl, %17 EDTA ve oksidatif potansiyele sahip suyun sitotoksik etkilerini in vitro hücre kültüründe karşılaştırmıştır. OPW, EDTA ve NaOCl ye göre kullanılan konsantrasyonlarda daha az sitotoksite göstermiştir.

Mirhadi ve ark. (239) hidrojen peroksitle farklı konsantrasyonlarda kombine edilmiş CHX ve NaOCl' in toksik etkisine yaptıkları in vitro hücre kültürü ile bakmışlardır. Çalışma sonucunda NaOCl daha toksik bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmanın sonucunda ise NaOCl' nin 4. ve 24. saatlerde hem human gingival

fibroblast hücresi, hemde human osteoblast hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi deney grubundaki diğer solüsyonlara göre istatistiksel olarak daha fazla olmuştur($p<0.05$).

Bu çalışmaların sonucunda deney grubundaki diğer solüsyonlara göre toksisitesi daha fazla bulunan NaOCl bizim çalışmamızda da en yüksek sitotoksositeye sahip olmuştur. Yaptığımız çalışmanın sonucunun belirtilen bu çalışmalarla uyumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Tüm bu çalışmalarda ve bizim çalışmamızda da karşılaştırma gruplarına göre daha toksik olduğu bildirilen NaOCl'e karşı alternatif olarak propolis, kitosan gibi fitoterapik içerikli iki solüsyonu ve doğal bir materyal olan humik asiti çalışmamıza dahil ederek bu alana yeni seçenekler getirmeyi amaçladık.

NaOCl'e alternatif olabileceğini düşündüğümüz solüsyonlardan ilki propolistir ve apiterapik bir üründür. Doğal arı ürünlerinin insan sağlığını koruma ve tedavi etme amacıyla tıpta kullanımı apiterapi olarak adlandırılmaktadır (240). Apiterapik uygulamaların son yıllarda tıp alanında olduğu olduğu gibi diş hekimliğinde de kullanımı artmaktadır.

Propolis arılar tarafından üretilen reçine içeren, birçok biyolojik aktiviteye sahip doğal bir üründür (241). Propolisin antibakteriyel, antiinflamatuvar, antioksidan, antiviral etkiye sahip olduğu daha önceden bu konularda yapılmış çalışmalarda belirtilmektedir (242-244).

Propolis diş hekimliğinde farklı amaçlarla farklı alanlarda kullanılmıştır. Kuafajda kaide materyali olarak, dentin hipersensivitesini önlemek için, kök kanal irrigasyon solüsyonu olarak, endodontik kanal patının içerisinde, periodontal hücrelerin canlılığını korumak için avulse dişlerde, periodontolojide yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda, oral mukozal ülserasyonların iyileştirilmesinde ve diğer birçok alanda propolis etkin şekilde kullanılmıştır (245-250).

Endodontide irrigasyon solüsyonu olarak da propolisin kullanıldığı antibakteriyel ve antifungal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (242, 251, 252).

Tyagi ve ark. (242) yaptığı bir çalışmada *C.albicansa* karşı propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* ve %5'lik NaOCl'nin antifungal etkinliği karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda NaOCl ve propolis en yüksek antifungal etkiyi göstermiş olup, bu iki solüsyon arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Saxena ve ark. (251)yaptıkları bir çalışmada propolis ile birlikte beş adet bitkisel içerikli solüsyonun *E.Faecalis* e karşı antimikrobiyel etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda NaOCl ile birlikte propolis en yüksek antimikrobiyel aktiviyeyi göstermiş olup, bu iki materyal arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Jolly ve ark. (253) bir çalışmada endodontik aerobik ve aneorobik mikroorganizmalara karşı klorheksidin ve propolisin antimikrobiyel etkinliği karşılaştırmıştır. Çalışma sonucunda klorheksidin aneorobik grupta en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiştir. Fakat aerobik mikroroganizma grubuna karşı klorheksidin ve propolis eşit seviyelerde antimikrobiyal etki göstermiştir.

Bununla birlikte literatür taramalarında propolisin sitotoksitesi üzerine yapılmış daha sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Bu nedenle yaptığımız bu çalışmada propolisin sitotoksik ve genotoksik etkileri ile ilgili veri elde etmek ve literatüre bu yönde katkı sağlamak amaçlanmıştır (254).

Al-shaher ve ark. (255) pulpada yer alan fibroblast hücrelerinde ve periodontal ligamentte yer alan fibroblast hücrelerinde 0–20 mg/ml propolis ve 0–250 mg/ml kalsiyum hidroksitin 2 saatlik inkübasyon sonrasında sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda propolis uygulandığı hücrelerde görülen sitoksisite kalsiyum hidroksit grubuna göre anlamlı derecede daha az bulunmuştur. Bizim çalışmamızda değerlendirilen propolis NaOCl grubuna göre her iki saat grubunda da daha az sitotoksosite oluşturmuştur. Yaptığımız çalışmanın sonucunun bu çalışma sonucu ile bu nedenle örtüşüğünü düşünmekteyiz.

Singla ve ark. (256) ratlara vücut kitle indeksine göre ayarlanan propolisi oral yoldan verdikten sonra 12, 13 ve 14. günde ratların karaciğer hücresinde oluşan

sitotoksik etkiye bakmışlardır. Çalışma sonucunda propolisin bizim çalışmamızın sonucundan farklı olarak sitotoksik etki göstermediğini bildirilmişlerdir. Bu farklılığın nedeninin çalışmada sitotoksisiteyi değerlendirmede enzimatik assay testinin kullanılmasının, ayrıca uygulanan hücre tipi, uygulanan konsantrasyon ve uygulama süresinin çalışmamızdan farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Grenho ve ark. (257) 3T3-L1 fare fibroblast hücreleri üzerinde %25'lik brezilya propolisinin sitotoksik etkilerini MTT test yöntemi ile 1. 3. ve 7 günde değerlendirmişlerdir. Üç zaman dilimde de hücre canlılığında anlamlı bir fark olmayıp propolisin sitotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Sönmez ve ark. (258) human gingival fibroblast hücrelerinde %10'luk propolisin gösterdiği sitotoksik etkiyi 4 saat sonrasında MTT test yöntemi ile değerlendirip aynı şekilde çalışma sonucunda propolisi sitotoksik bulmamışlardır. Çalışmamızın sonucundan bu iki çalışmanın sonucunun farklı olmasının nedeninin, MTT ve XTT test yöntemlerinin hassasiyet farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tyszka-Czochara ve ark. (259) cilt fibroblast hücreleri üzerinde %0.01'lik propolisin sitotoksik etkisini 24 saat sonrasında MTT test yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmaları sonrasında propolisin uygulanan konsantrasyonda sitotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda uygulanan propolis konsantrasyonunun bizim çalışmamızda uygulanan konsantrasyondan oldukça düşük olmasından dolayı çalışma sonuçlarının farklı olduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca belirtilen bu çalışmaların sonucunun, bizim yaptığımız çalışmanın sonucundan farklılık göstermesinde farklı yörelere ait propolislerin içerik ve etki olarak da farklılık göstermesinden kaynaklandığını da düşünmekteyiz.

Propolisin, çalışmamızda kullanılan NaOCl solüsyonuna göre daha düşük sitotoksisiteye sahip olmasında ise içeriğinde yer alan flavanoidler ile kafeik asit esterlerinin önemli bir rolünün olduğunu düşünmekteyiz. Propoliste bulunan bu iki bileşen antioksidan mekanizmasından ve immunomodulator mekanizmasından sorumlu en önemli kilit maddedir (260, 261). Ayrıca içeriğinde yer alan hidroksisinnamik asit, ferulik asit, ellajik asit, kuersetin, tokoferol gibi diğer

bileşenlerin sağladığı diğer faydalı biyolojik etkilerin propolisin daha az toksik etki göstermesini sağladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda değerlendirilen bir diğer etki olan genotoksisite ile ilgili propolis üzerine yapılmış çeşitli çalışmalarda ise farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Ali Yazıcıoğlu ve ark. (262) %25, %50 ve %75 konsantrasyonda Türk propolisinin genotoksisitesini dermal fibroblast hücre hatları üzerinde comet assay test yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda H₂O₂ tarafından indüklenen genotoksisiteyi propolisin azalttığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda yaptığımız çalışma sonucu ile uyumlu olarak propolis genotoksik etki göstermemiştir. Bunda daha öncede belirttiğimiz gibi aynı yörelere ait propolisin kullanılmasının büyük etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Fu ve ark. (263) fare ilik hücre hattı üzerinde %20'lik propolisin genotoksik etkisine ames test yöntemi ile bakmışlardır. Çalışmaları sonucunda, bizim çalışmamızla uyumlu olarak propolisin genotoksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Montoro ve ark. (264) 48 saat süresince, insana ait lenfosit hücre hattı üzerine %10 konsantrasyona sahip propolis uygulamasının ardından giemsa boyama tekniği ile genotoksisiteyi değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda propolisin genotoksik etkinliğinin olmadığı belirtilmiştir. Santos ve ark.(265) yaptıkları çalışmada fare over hücre hattı üzerinde gama ışını uygulanarak hasar meydana getirmişlerdir. Ardından hücrelere 24 saat süresince %5 konsantrasyona sahip propolis uygulamışlardır. Çalışmada genotoksisiteyi belirlemek için mikronükleus test yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda propolisin DNA hasarını azaltarak genotoksisiteyi de azalttığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda ise human gingival hücre hattı üzerinde 8-OHdG test yöntemi ile değerlendirilen propolis kontrol gurubu ile eş değer bir sonuç vererek genotoksik hasar oluşturmamıştır. Yine çalışmamız kapsamında değerlendirilen human osteoblast hücre hattı üzerinde de propolisin genotoksik etkisinin olmadığı sonucunu elde ettik. Yaptığımız çalışmanın sonuçlarının yukarıda sunduğumuz benzer içerikli çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Yaptığımız bu çalışma kapsamında değerlendirilen bir diğer irrigasyon solüsyonu olan kitosan ise genellikle yengeç, karides, midye gibi bazı deniz kabuklularının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, doğada yaygın olarak bulunan bir biyopolimerdir (266).

Dişhekimliğinde periradiküler cerrahide hemostatik ajan (267), endodontide şelasyon ajanı (268), dolgu materyali (269), periodontal doku rejenerasyonu (270), kanal içerisindeki kalsiyum hidroksitin uzaktıştırması (271), bond ajanı (272) gibi birçok alanda kullanılmıştır.

Yapılan birçok çalışmada kitosanın çeşitli hücre ve dokular üzerindeki sitotoksitesi değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Jena ve ark. (273) insana ait makrofaj hücre hattına gümüş nano partikülü ile kaplı kitosan uygulamasından 24 saat sonra sitotoksitesiyi MTT test yöntemi kullanarak değerlendirmiştir. Çalışma sonunda kitosanın bakterisidal dozda sitotoksitesiyi indüklediği belirtilmiştir. Bizim yaptığımız bu çalışmanın sonucunda ise kitosan her iki hücre hattında da kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha sitotoksik bulunmuştur. Bu iki çalışma sonucunda ki farklılığın nedeninin kullanılan hücre hattı ve test yöntemi olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak kitosan ile birlikte gümüş nano partikül içeriğinin kullanılmasının kitosanın toksisitesini azalttığını düşünmekteyiz. Kitosanın çalışmamızda sitotoksik etki göstermesinde kitosani solüsyon haline getirmekte kullandığımız asetik asidin etkisinin de olduğunu düşünmekteyiz (274).

Çalışmamızda değerlendirilen bir diğer etki olan genotoksisite ile ilgili kitosan üzerine yapılmış çalışmalarda çeşitli sonuçlar bildirilmiştir.

Fernandes ve ark. (275) insan lenfosit hücre hattı üzerinde kitosanın genotoksitesine bakmışlardır. Çalışma sonucunda 0.07mg/mL ve daha düşük dozlarda kitosanın genotoksik etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Hu ve ark. (276) kitosani greft modellerle kombine ederek genotoksitesine ames test yöntemi kullanarak bakmışlardır. Çalışma sonucunda kitosanın

genotoksisite oluşturmadağı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda ise human gingival hücre hattı üzerinde 8-OHdG test yöntemi ile değerlendirilen kitosan kontrol grubuna ve diğer solüsyonlara göre değerlendirildiğinde en iyi etkiyi göstermiş olup Çantigenotoksik etkili bulunmuştur. Yine çalışmamız kapsamında değerlendirilen human osteoblast hücre hattı üzerinde de propolisin genotoksik etkisinin olmadığı sonucunu elde ettik. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçların yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamız dahilinde değerlendirilen bir diğer materyal olan humik asit organik bileşiklerin ayrışması ile oluşan doğal bir materyaldir. Humik asit ile ilgili bu yaygın tanıma rağmen humik asitin biyolojik etkileri bu konuda yapılan çalışmaların sınırlı olması nedeniyle tartışmalıdır (112).

Humik asit medikal birçok alanda kullanılmaktadır fakat diş hekimliği alanında kullanımı üzerine yaptığımız literatür çalışmasında sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Çalışır ve ark. (277) ratlar üzerinde oluşturulan periodontitis üzerine humik asitin etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonrasında humik asit uygulanan gruptaki alveolar kemik kaybı ve inflamasyon kontrol grubuna göre anlamlı dercede daha düşük bulunmuştur.

Humik asidin sitotoksitesisi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda ise farklı sonuçlar bildirilmiştir.

Kihara ve ark. (278) human vasküler endotelyal hücre hattında humik asitin sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda humik asidin uzun dönemde bu hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve buna bağlı kronik vasküler hastalığa neden olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda ise bu çalışma ile uyumlu olarak humik asitin kontrol grubundan daha sitotoksik olduğu bulunmuştur. Ayrıca 4.saat uygulamasında sitotoksitesisi NaOCl'den daha düşük bulunurken 24. saat ölçümünde sitotoksitesite açısından NaOCl ile arasında fark bulunmamıştır.

Hseu ve ark. (279) humik asidin eritrosit hücre hattında üzerine sitotoksik etki ettiğini ve endemik bir rahatsızlık olan blackfoot hastalığında predispozan faktör olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonucu bu çalışma sonucu ile örtüşmektedir.

Çalışmamızda değerlendirilen bir diğer etki olan genotoksisite ile ilgili humik asit üzerine yapılmış çalışmalarda çeşitli sonuçlar bildirilmiştir.

Cheng ve ark. (118) bu hastalık kapsamında human primer fibroblast hücre hattında humik asidin etkisini incelemiştir. Çalışmaları sonucunda humik asidin oksidatif hasara bağlı olarak genotoksisite oluşturduğu, fibroblast hücrelerinin büyümesini ve canlılığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın sonucunda ise human gingival hücre hattı üzerinde 8-OHdG test yöntemi ile değerlendirilen humik asit NaOCl'den sonra en genotoksik materyal olarak bulunmuştur. Bu sonucun yukarıda belirtilen çalışma sonuçları ile uyumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Yine çalışmamız kapsamında değerlendirilen human osteoblast hücre hattı üzerinde de humik asidin ise genotoksik etkisinin olmadığı sonucunu elde ettik. Bu farklılığın kullanılan farklı hücre hattına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

İrrigasyon solüsyonu seçiminde etkili olan tek faktör biyoyoumluluk değildir. İdeal irrigasyon solüsyonunun biyoyoumlu olmasının yanı sıra geniş antibakteriyel etkinliğe ve smear tabakasını kaldırma özelliğine sahip, nekrotik ve vital pulpa dokusunu çözmesi açısından yeterli olması gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda irrigasyon solüsyonlarının in vitro test yöntemi üzerinde sitotoksisite ve genotoksisite etkinliği değerlendirilmiştir. Ancak bu sonuçlar kullanılan bu maddelerin endodontik tedavideki başarısını öngörmede tek başlarına yeterli değildir. Bu maddelerin klinik başarıları hakkında daha kapsamlı yorum yapılabilmesi için kök kanal irrigasyon solüsyonlarına karşı dokularda oluşabilecek yanıtların incelendiği in vivo çalışmalar ile uzun süreli kullanım testlerinin sonuçlarının beraber değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu nedenlerden dolayı endodontik tedavilerde kullanılmak üzere üretilen yeni maddelerin biyolojik uyumluluğu, güvenli kullanımları ve başarıya olan etkileri hakkında yargıya varılabilmesi için in vivo hayvan çalışmalarının sonuçlarının oldukça önemli olduğu ve bu çalışmaların yanında kullanım testleri gibi klinik çalışmaların sonuçlarının da değeriendirildiği çalışmaların da yapılması gerektiği kanısına varıldı. Bu çalışmanın ileride yapılacak klinik ve deneysel çalışmalara temel oluşturabileceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Human gingival fibroblast hücrelerinin kullanıldığı XTT deney sonuçlarına göre hem 4 hemde 24 saatlik değerlendirmelerde irrigasyon solüsyonları kontrol grubuna göre daha sitotoksik bulunmuştur. Ayrıca irrigasyon solüsyonlarının sitotoksisite düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir.

XTT sonuçlarına göre human gingival fibroblast hücre hattı üzerine 4 saat süresince uygulanan irrigasyon solüsyonlarına ait absorbans düzey dağılımı değerlendirildiğinde en düşük sitotoksisiteyi kitosan gösterirken en yüksek sitotoksisiteyi NaOCl göstermiştir.($p<0.05$)

XTT sonuçlarına göre human gingival fibroblast hücre hattı üzerine 24 saat süresince uygulanan irrigasyon solüsyonlarına ait absorbans düzey dağılımı değerlendirildiğinde en düşük sitotoksisiteyi humik asit gösterirken en yüksek sitotoksisite yine NaOCl grubunda gözlenmiştir. ($p<0.05$)

Human osteoblast hücrelerinin kullanıldığı XTT deney sonuçlarına göre hem 4 hemde 24 saatlik değerlendirmelerde irrigasyon solüsyonları kontrol grubuna göre daha sitotoksik bulunmuştur. Ayrıca irrigasyon solüsyonlarının sitotoksisite düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. ($p<0.001$)

XTT sonuçlarına göre human osteoblast hücre hattı üzerine hem 4 saat hemde 24 saat süresince uygulanan irrigasyon solüsyonlarına ait absorbans düzey dağılımı değerlendirildiğinde en düşük sitotoksisiteyi propolis gösterirken en yüksek sitotoksisiteyi NaOCl göstermiştir.($p<0.05$)

Human gingival fibroblast hücrelerinin kullanıldığı 8-OHdG deney sonuçlarına göre değerlendirilen irrigasyon solüsyonlarının genotoksisite değerlendirmesinde irrigasyon solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Genotoksisite değerlendirilmesinde en genotoksik materyal NaOCl bulunurken, kitosan kontrol grubundan da daha iyi etki göstererek antigenotoksik bulunmuştur. (p<0.05)

Human osteoblast hücrelerinin kullanıldığı 8-OHdG deney sonuçlarına göre değerlendirilen irrigasyon solüsyonlarının genotoksisite değerlendirmesinde ise irrigasyon solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Kullandığımız dört farklı irrigasyon solüsyonu değişik derecelerde sitotoksisite göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları materyallerin sitotoksisiteleri hakkında fikir verse de konu ile ilgili daha fazla in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics*, 10(1):77-102,2005.
2. Gu L-s, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod*, 35(6):791-804,2009.
3. Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(4):560-569,2007.
4. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*, 32(5):389-398,2006.
5. Siqueira JF, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod*, 25(5):332-335,1999.
6. Lambrianidis T, Tosounidou E, Tzoanopoulou M. The effect of maintaining apical patency on periapical extrusion. *J Endod*, 27(11):696-698,2001.
7. Becker TD, Woollard G. Endodontic irrigation. *Gen Dent*, 49(3):272,2001.
8. Alaçam T. *Endodonti*. 1 ed. Ankara: Özyurt Matbaacılık; 2012. 529-588 p.
9. Aşçı SK. *Endodonti*. 1 ed. İstanbul: Quintessence 2014. 415-436 p.
10. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod*, 35(6):791-804,2009.
11. Abbott PV, Heijkoop PS, Cardaci SC, Hume WR, Heithersay GS. An Sem Study of the Effects of Different Irrigation Sequences and Ultrasonics. *Int Endod J*, 24(6):308-316,1991.

12. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*, 32(5):389-398,2006.
13. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 94(6):658-666,2002.
14. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(1):86-93,1998.
15. Özkan HB. Farklı endodontik irrigasyon materyallerinin tek ve kombine kullanımlarında *A. E. faecalis*'e karşı etkinliklerinin in vitro olarak incelenmesi [Doktora tezi]: Selçuk Üniversitesi 2009.
16. Peters OA, Peters CI, Schonenberger K, Barbakow F. ProTaper rotary root canal preparation: effects of canal anatomy on final shape analysed by micro CT. *Int Endod J*, 36(2):36-86,2003.
17. Peters O, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni–Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J*, 34(3):221-230,2001.
18. Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Wevers M, Lambrechts P. A methodology for quantitative evaluation of root canal instrumentation using microcomputed tomography. *Int Endod J*, 34(5):390-398,2001.
19. Stephen Cohen KMH. *Pathways of The Pulp* 9ed: Mosby; 2009.
20. Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Topics*, 10(1):103-122,2005.
21. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am*, 54(2):291-312,2010.

22. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J*, 33(3):173-185,2000.
23. Desai P, Himel V. Comparative Safety of Various Intracanal Irrigation Systems. *J Endod*, 35(4):545-549,2009.
24. Virtej A, MacKenzie CR, Raab WHM, Pfeffer K, Barthel CR. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *J Endod*, 33(8):926-929,2007.
25. Rhodes SJ. *Advanced Endodontics 1ed*: Taylor & Francis Group; 2006.
26. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 94(6):756-762,2002.
27. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, 34(6):424-428,2001.
28. Frai S, Ng YL, Gulabivala K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. *Int Endod J*, 34(3):206-215,2001.
29. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*, 13(2):113-117,2002.
30. Alaçam T. *Pulpa ve Periapikal Dokuların Biyolojisi*. Ankara: Barış Yayınları; 2000. 17-44 p.
31. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J*, 43(4):250-256,1998.

32. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Dogramaci EJ, Steier L, De Figueiredo JA. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*, 44(9):792-799,2011.
33. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*, 11(12):525-528,1985.
34. Soğur HD. Farklı kök kanal yıkama solüsyonlarını antimikrobiyal etkinliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. İzmir: Ege üniversitesi; 2007.
35. Crincoli V, Scivetti M, Di Bisceglie MB, Pilolli GP, Favia G. Unusual case of adverse reaction in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment: a case report. *Quintessence Int*, 39(2):e70-73,2008.
36. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod*, 15(5):224-226,1989.
37. Pelka M, Petschelt A. Permanent mimic musculature and nerve damage caused by sodium hypochlorite: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106(3):e80-e83,2008.
38. Behrents K, Speer M, Noujeim M. Sodium hypochlorite accident with evaluation by cone beam computed tomography. *Int Endod J*, 45(5):492-498,2012.
39. Boutsoukis C, Psimma Z, Sluis vdL. Factors affecting irrigant extrusion during root canal irrigation: a systematic review. *Int Endod J*, 46(7):599-618,2013.
40. Paschoalino MA, Hanan A, Marques A, Garcia LF, Garrido A, Sponchiado Jr E. Injection of sodium hypochlorite beyond the apical foramen--a case report. *Gen Dent*, 60(1):16-19,2011.

41. Psimma Z, Boutsoukis C, Kastrinakis E, Vasiliadis L. Effect of needle insertion depth and root canal curvature on irrigant extrusion ex vivo. *J Endod*, 39(4):521-524,2013.
42. Kaufman AY. Facial emphysema caused by hydrogen peroxide irrigation: report of a case. *J Endod*, 7(10):470-472,1981.
43. Kim M, Kim J, Lim S. Accidental Extrusion of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment in a Primary Tooth. *J Korean Acad Pediatr Dent*, 42(3):264-269,2015.
44. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J*, 33(3):186-193,2000.
45. Yaşar S. Değişik kompozisyon ve konsantrasyonlardaki sodyum hipoklorit solüsyonlarının farklı kök kanal dolgularının sızdırmazlıklarına etkisi [Doktora]. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi 2010.
46. Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J*, 30(5):335-342,1997.
47. Hülsman M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J*, 33(3):186-193,2000.
48. Park M, Pang N-S, Jung I-Y. Effect of dentin treatment on proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells. *Restor Dent Endod* 40(4):290-298,2015.
49. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*, 13(4):256-264,2010.
50. Eddy RS, Joyce AP, Roberts S, Buxton TB, Liewehr F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. *J Endod*, 31(9):672-675,2005.

51. Cobankara FK, Ozkan HB, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide. *J Endod*, 36(2):272-274,2010.
52. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*, 36(12):810-830,2003.
53. Serper A, Calt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod*, 28(7):501-502,2002.
54. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J*, 43(1):2-15,2010.
55. Aktener BO, Bilkay U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *J Endod*, 19(5):228-231,1993.
56. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod*, 31(11):817-820,2005.
57. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod*, 31(2):107-110,2005.
58. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother*, 9(2):192-196,1954.
59. Russell AD. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev*, 3(2):99-119,1990.
60. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho JB, Ben Johnson W, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod*, 29(3):170-175,2003.

61. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod*, 29(4):233-239,2003.
62. Haznedaroglu F, Ersev H. Tetracycline HCl solution as a root canal irrigant. *J Endod*, 27(12):738-740,2001.
63. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod*, 32(11):1091-1093,2006.
64. Solovyeva AM, Dummer PM. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. *Int Endod J*, 33(6):494-504,2000.
65. El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(4):560-569,2007.
66. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses*, 46(2):150-154,1996.
67. Guinesi AS, Andolfatto C, Bonetti Filho I, Cardoso AA, Passaretti Filho J, Farac RV. Ozonized oils: a qualitative and quantitative analysis. *Braz Dent J*, 22(1):37-40,2011.
68. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*, 32(6):527-531,2006.
69. Eddy RS, Joyce AP, Roberts S, Buxton TB, Liewebr F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E-faecalis* in bovine incisors. *J Endod*, 31(9):672-675,2005.

70. Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. *J Endod*, 34(1):66-70,2008.
71. Singh DK, Ray AR. Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives. *J Macromol Sci Rev Macromol Chem Phys*, C40(1):69-83,2000.
72. Demir A, Seventekin N. Chitin, Chitosan and General application Areas. *Journal of Textile Technologies*, 3(2) 92-103 2009.
73. Bostan K, Aldemir T, Aydın A. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 37(2):118-127 2007.
74. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents*, 18(6):553-557,2001.
75. No HK, Kim SH, Lee SH, Park NY, Prinyawiwatkul W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. *Carbohydr Polym*, 65(2):174-178,2006.
76. Koide SS. Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. *Nutrition Research*, 18(6):1091-1101,1998.
77. Güvercin M, Gönül O, Salih İ, Göker K. Denizden Gelen Sağlık: Kitozan. *Akad Dent Dİs Hekİm Derg*, 6:1-5, 2004.
78. Gholipour-Kanani A, Bahrami SH, Rabbani S. Effect of novel blend nanofibrous scaffolds on diabetic wounds healing. *IET Nanobiotechnology*, 10(1):1-7,2016.
79. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 97:417-426,2015.

80. Liu S-H, Cai F-Y, Chiang M-T. Long-Term Feeding of Chitosan Ameliorates Glucose and Lipid Metabolism in a High-Fructose-Diet-Impaired Rat Model of Glucose Tolerance. *Mar Drugs*, 13(12):7302-7313,2015.
81. da Silva SB, Ferreira D, Pintado M, Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery—In vitro tests. *Int J Biol Macromol*, 84:112-120,2016.
82. Petrovich I, Grigor'iants L, Gurin A, Gurin N. [Chitosan: structure, properties, use in medicine and stomatology]. *Stomatologiya*, 87(4):72-77,2007.
83. Galler K, D'souza R, Hartgerink J, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*, 23(3):333-339,2011.
84. van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Dijkstra RJ, Busscher HJ. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci*, 115(4):303-307,2007.
85. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzman CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res*, 76(2):665-672,1997.
86. Khan G, Yadav SK, Patel RR, Nath G, Bansal M, Mishra B. Development and Evaluation of Biodegradable Chitosan Films of Metronidazole and Levofloxacin for the Management of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*:1-14,2015.
87. Arancibia R, Maturana C, Silva D, Tobar N, Tapia C, Salazar J, Martínez J, Smith P. Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 92(8):740-745,2013.
88. Pimenta JA, Zapparoli D, Pecora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. *Braz Dent J*, 23(3):212-217,2012.

89. Silva PV, Guedes DFC, Pécora JD, Cruz-Filho AMd. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. *Braz Dent J*, 23(4):357-361,2012.
90. Pimenta JA, Zapparoli D, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. *Braz Dent J*, 23(3):212-217,2012.
91. Silva P, Guedes D, Nakadi F, Pécora J, Cruz-Filho A. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*, 46(4):332-338,2013.
92. Muzzarelli R, Biagini G, Pugnaroni A, Filippini O, Baldassarre V, Castaldini C, Rizzoli C. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, 10(9):598-603,1989.
93. Aoyagi S, Onishi H, Machida Y. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *Int J Pharm*, 330(1):138-145,2007.
94. Lee Y-M, Park Y-J, Lee S-J, Ku Y, Han S-B, Klokkevold PR, Choi S-M, Chung C-P. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*, 71(3):410-417,2000.
95. Liu L, Lv Q, Zhang Q, Zhu H, Liu W, Deng G, Wu Y, Shi C, Li H, Li L. Preparation of Carboxymethyl Chitosan Microspheres and Their Application in Hemostasis. *Disaster Med Public Health Prep*:1-8,2015.
96. Lan G, Lu B, Wang T, Wang L, Chen J, Yu K, Liu J, Dai F, Wu D. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 136:1026-1034,2015.
97. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C*, 57(5-6):530-533,2002.

98. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 Suppl 1:S1-6,2002.
99. Arslan S. Çürük Gelişimi Üzerine Türk Propolisinin İn vitro ve İn vivo Etkisinin İncelenmesi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2009.
100. Osés S, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño M, López-Díaz T, Sancho M. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem*, 196:1215-1223,2016.
101. Veloz JJ, Saavedra N, Lillo A, Alvear M, Barrientos L, Salazar LA. Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* Is Influenced by the Year of Collection. *Biomed Res Int* 2015,2015.
102. Özcan M, Ceylan D, Ünver A, Yetişir R. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden sağlanan polen ve propolis ekstraktlarının antifungal etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2003(3),2003.
103. Gülçelik NE, Dilara Zeybek F. Antitumor activity of propolis on differentiated cancer cell lines. *Med Sci*, 1(4),2012.
104. Şener K, Şahinler N. Propolis Ekstraktının Bitki Patojeni Funguslara Karşı Antifungal Aktivitesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2003(3),2003.
105. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans streptococci*. *Biol Pharm Bull*, 26(4):527-531,2003.
106. Schkenderoff S. Arı Ürünleri Kitabı. Sofya1983.
107. Saral Ö. Apiterapik Arı Ürünlerinin (Bal, Polen, Propolis Ve Arı Sütü) Biyoaktif Özellikleri Ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rollerini Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2013.

108. Almas K, Mahmoud A, Dahlan A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin. A SEM study. *Indian J Dent Res*, 12(1):21-27,2001.
109. Moradi S, Saghravanian N, Moushekhian S, Fatemi S, Forghani M. Immunohistochemical Evaluation of Fibronectin and Tenascin Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate, Platelet-Rich Plasma and Propolis in Dogs' Teeth. *Iran Endod J*, 10(3):188,2015.
110. Kayaoglu G, Omurlu H, Akca G, Gurel M, Gencay O, Sorkun K, Salih B. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod*, 37(3):376-381,2011.
111. Toker H, Ozan F, Ozdemir H, Deger H. Dentin hassasiyetinin tedavisinde propolisin etkisi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 25(3):1-7,2008.
112. Vetvicka V, Baigorri R, Zamarreño AM, Garcia-Mina JM, Yvin J-C. Glucan and humic acid: Synergistic effects on the immune system. *J Med Food* 13(4):863-869,2010.
113. Vengerovskii AI, Golovina EL, Burkova VN, Saratikov AS. Enteric sorbents potentiate hepatoprotective effect of eplir in experimental toxic hepatitis. *Eksp Klin Farmakol*, 64(1):46-48,2001.
114. Tan KH. *Humic Matter in Soil and the Environment*. New York2003. p. 1–50.
115. Van Rensburg C, Van Straten A, Dekker J. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *J Antimicrob Chemother*, 46(5):853-854,2000.
116. Zhang H, Feng J, Zhu W, Liu C, Gu J. Bacteriostatic effects of cerium-humic acid complex. *Biol Trace Elem Res* 73(1):29-36,2000.

117. Onuryüz Ş, Z., Güler A. Humik maddelerin kullanım alanı ve sektörde girişimcilik. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi 1:345-350,2012.
118. Cheng M-L, Ho H-Y, Huang Y-W, Lu F-J, Chiu DT-Y. Humic acid induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human primary fibroblasts. *Exp Biol Med* 228(4):413-423,2003.
119. van Rensburg CE, Dekker J, Weis R, Smith TL, Janse van Rensburg E, Schneider J. Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy*, 48(3):138-143,2002.
120. Joone GK, van Rensburg CE. An in vitro investigation of the anti-inflammatory properties of potassium humate. *Inflammation*, 28(3):169-174,2004.
121. Jooné GK, Dekker J, Jansen van Rensburg CE. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Z Naturforsch C* 58(3-4):263-267,2003.
122. Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent*, 69(4):406-415,1993.
123. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*, 83(2):223-234,2000.
124. Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 74(1):617-626,2005.
125. Komurcuoglu E, Olmez S, Vural N. Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants in vitro. *J Oral Rehabil*, 32(2):116-121,2005.
126. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*, 86(2):203-209,2001.

127. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro*, 19(1):145-154,2005.
128. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod*, 26(4):228-229,2000.
129. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, 12(3):186-193,1996.
130. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dental Materials*. 1 ed. Berlin-Heidelberg Germany: Springer; 2009. 99-137 p.
131. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 1(4):154-162,1997.
132. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 86(2):203-209,2001.
133. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-- does it have a role? *Int Endod J*, 21(2):50-58,1988.
134. Wataha JC. *Biocompatibility of Dental Materials*: Elsevier Science; 2003.
135. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola CR, Savarino L, Stea S, Montanaro L, Pizzoferrato A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicol In Vitro*, 13(4-5):801-810,1999.
136. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*, 21(2):89-99,1988.
137. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(10):1467-1480,2004.

138. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12(3):E258-266,2007.
139. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials--histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig*, 1(1):5-11,1997.
140. Schmalz G. Use of Cell-Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials Advantages and Limitations. *J Dent* 22:S6-S11,1994.
141. M. K. Farklı dentin bağlayıcı ajanların dentin bariyer testi kullanılarak L929 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin incelenmesi [Doktora Tezi]. Konya: Selçuk Üniversitesi 2007.
142. Gerstner R. Tissue cultures of pulpal elements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 32(3):473-486,1971.
143. Pollard JW. Basic cell culture. *Methods Mol Biol*, 75:1-11,1997.
144. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*, 36(2):75-85,2003.
145. van Wyk CW, Olivier A, Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med*, 30(3):168-177,2001.
146. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*, 18(4):318-323,2002.
147. Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro*, 16(1):63-69,2002.

148. Tsaryk R, Kalbacova M, Hempel U, Scharnweber D, Unger RE, Dieter P, Kirkpatrick CJ, Peters K. Response of human endothelial cells to oxidative stress on Ti6Al4V alloy. *Biomaterials*, 28(5):806-813,2007.
149. Çekiç UG. Doğal mercan ve hidroksiapatitin in vitro olarak rat kemik iliği hücre kültüründe biyouyumluluk ve osteojenik aktivite yönünden araştırılması. Ankara: Hacettepe Üniv; 2001.
150. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod*, 29(10):654-657,2003.
151. Spangberg L, Pascon EA. The Importance of Material Preparation for the Expression of Cyto-Toxicity during Invitro Evaluation of Biomaterials. *J Endod*, 14(5):247-250,1988.
152. A. MJ, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines JM D, editor. New York: Oxford University Pres; 1998.
153. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*, 31(10):746-748,2005.
154. Scelza MF, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95(2):234-236,2003.
155. Freshney IR. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5 ed: John Wiley& Son; 2005.
156. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirilmesi. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Der*, 21:141-149,2011.
157. Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod*, 28(11):784-786,2002.

158. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*, 288(2):369-376,2005.
159. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods*, 73(3):211-215,2008.
160. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11:127-152,2005.
161. Başaran N. *Tıbbi Genetik*. İstanbul: Güneş&Nobel Kitapevi; 2003.
162. Zorba YO, Yıldız M. Adeziv restoratif materyallerde biyouyumluluk testleri ve kriterleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg*, (2):15-21,2007.
163. Zeiger E. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen*, 44(5):363-371,2004.
164. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *Tübav Bilim Dergisi*, (3):221-229,2011.
165. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3):221-229,2011.
166. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. *J Endod*, 36(7):1216-1221,2010.
167. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod Dent Traumatol*, 7(4):181-185,1991.
168. Wataha J. *Biocompatibility of Dental Materials*2003.

169. Türkcan İ, Nalbant AD. Dental protetik materyallerin biyolojik uyumluluğu ve test yöntemleri. *Acta Odontologica Turcica*, 33(2),2016.
170. Chaugule VB, Panse AM, Gawali PN. Adverse Reaction of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment of Primary Teeth. *Int J Clin Pediatr Dent*, 8(2):153,2015.
171. Alkahtani A, Al Khudhairi TD, Anil S. A comparative study of the debridement efficacy and apical extrusion of dynamic and passive root canal irrigation systems. *BMC oral health*, 14(1):12,2014.
172. Mehdipour O, Kleier DDJ, Averbach DRE, Kleier DJ, Averbach RE. Anatomy of sodium hypochlorite accidents. *Compend Contin Educ*, 5(8):9,2007.
173. Brown DC, Moore BK, Brown CE, Jr., Newton CW. An in vitro study of apical extrusion of sodium hypochlorite during endodontic canal preparation. *J Endod*, 21(12):587-591,1995.
174. Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod*, 9(11):475-479,1983.
175. Williams CE, Reid JS, Sharkey SW, Saunders WP. In-vitro measurement of apically extruded irrigant in primary molars. *Int Endod J*, 28(4):221-225,1995.
176. Motta M, Chaves-Mendonca M, Stirton C, Cardozo H. Accidental injection with sodium hypochlorite: report of a case. *Int Endod J*, 42(2):175-182,2009.
177. Lam T, Wong O, Tang S. A case report of sodium hypochlorite accident. *Hong Kong J Emerg Med*, 17(2):173,2010.
178. Çalışkan MK. Endodontik materyallerin biyouyumluluğu ve kök kanallarının irrigasyon. 2. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.

179. Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod*, 26(7):391-394,2000.
180. Walton RE, Johnson WT. *Principles and Practice of Endodontics*. 2 ed. Philadelphia: 1996.
181. Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, Dettori C, Pashley DH, Tay FR. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *J Endod*, 34(9):1085-1088,2008.
182. Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J*, 40(5):338-343,2007.
183. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 92(4):446-450,2001.
184. Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 71(2):429-440,2004.
185. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12(3):258-266,2007.
186. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011(2),2011.
187. Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(1):71-84,2002.

188. Pişkin B, Aksever H, Gündüz K. Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumluluk değerlendirme yöntemleri. *Ondokuz Mayıs Univ Dis Hekim Fak Ders* 10(2):41-49,2009.
189. Pişkin B, Avsever H, Gündüz K. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumluluk değerlendirme yöntemleri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 10(2),2009.
190. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials*. 12 ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006.
191. Wataha JC, Lockwood PE. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater*, 14(2):158-163,1998.
192. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod*, 27(2):96-102,2001.
193. Scelza MFZ, Daniel RLP, Santos EM, Jaeger MMM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod*, 27(12):741-743,2001.
194. Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J*, 39(1):40-47,2006.
195. Mehalick LA, Poulsen C, Fischer CL, Lanzel EA, Bates AM, Walters KS, Cavanaugh JE, Guthmiller JM, Johnson GK, Wertz PW. Differential cytotoxicity of long-chain bases for human oral gingival epithelial keratinocytes, oral fibroblasts, and dendritic cells. *Data in brief*, 5:285-291,2015.
196. Prado M, Silva EJNI, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFAD, Gomes BPFDA. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid

- solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*, 23(2):158-163,2015.
197. Marins JSR, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Br Dent J*, 23(5):527-533,2012.
 198. AlKahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC oral health*, 14(1):27,2014.
 199. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod*, 29(10):654-657,2003.
 200. Chan EL, Zhang C, Cheung GS. Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic irrigant. *Clin Cosmet Investig Dent*, 7:65,2015.
 201. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J*, 43(12):1116-1121,2010.
 202. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*, 13(5):264-269,2003.
 203. Harada S-i, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937):349-355,2003.
 204. Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Varying Concentrations of Sodium Hypochlorite on Human Mesenchymal Stem Cells. *J Contemp Dent Pract* 15(4):473,2014.
 205. Barnhart BD, Chuang A, Dalle Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod*, 31(8):613-615,2005.

206. Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. In Vitro Comparison of Cytotoxicity of Four Root Canal Sealers on Human Gingival Fibroblasts. *Med Arch*, 69(1):24,2015.
207. Parirokh M, Forghani FR, Paseban H, Asgary S, Askarifard S, Mahani SE. Cytotoxicity of Two Resin-Based Sealers and a Fluoride Varnish on Human Gingival Fibroblasts. *Iran Endod J*, 10(2):89,2015.
208. Zhou H-m, Du T-f, Shen Y, Wang Z-j, Zheng Y-f, Haapasalo M. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-containing Endodontic Sealers. *J Endod*, 41(1):56-61,2015.
209. Jung S, Mielert J, Kleinheinz J, Dammaschke T. Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. *Head & face medicine*, 10(1):55,2014.
210. Chen C-C, Ho C-C, Chen C-HD, Wang W-C, Ding S-J. In vitro bioactivity and biocompatibility of dicalcium silicate cements for endodontic use. *J Endod*, 35(11):1554-1557,2009.
211. Gündoğdu G. Homosistein toksisitesine sülfüt molekülünün olası katkisi ve oksidatif stresin rolünün nöroblastoma hücre dizisinde incelenmesi: Pamukkale Üniversitesi; 2012.
212. Arikan S. Antifungal duyarlılık testleri: Neredeyiz.
213. Reichl F, Rothmund L, Shehata M, Högg C. DNA double-strand breaks caused by new and contemporary endodontic sealers. *Int Endod J*,2015.
214. Lee B-N, Son H-J, Noh H-J, Koh J-T, Chang H-S, Hwang I-N, Hwang Y-C, Oh W-M. Cytotoxicity of newly developed ortho MTA root-end filling materials. *J Endod*, 38(12):1627-1630,2012.
215. Petel R, Moskovitz M, Tickotsky N, Halabi A, Goldstein J, Hourri-Haddad Y. Cytotoxicity and proliferative effects of Iodoform-containing root canal-

- filling material on RAW 264.7 macrophage and RKO epithelial cell lines. Arch Oral Biol, 58(1):75-81,2013.
216. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. J Endod, 35(10):1387-1390,2009.
217. Huang T-H, Ding S-J, Hsu T-Z, Lee Z-D, Kao C-T. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. J Mater Sci Mater Med, 15(7):767-771,2004.
218. Botton G, Pires C, Cadoná F, Machado A, Azzolin V, Cruz I, Sagrillo M, Praetzel J. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. Int Endod J,2015.
219. Ribeiro DA, Scolastici C, de Lima PLA, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 99(5):637-640,2005.
220. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. J Environ Sci Health C, 27(2):120-139,2009.
221. Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol, 300:156-166,1998.
222. Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget J-P, Ravanat J-L, Sauvaigo S. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. Free Radic Res, 29(6):541-550,1998.
223. Yokuş B, Çakir DÜ. İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. Turk Klinikleri J Med Sci, 22(5):535-543,2002.

224. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, 58(18),1998.
225. Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol*, 73(5):551-554,2002.
226. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 33(7):875-885,2002.
227. Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, 20(4):216-220,2005.
228. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 387(3):147-163,1997.
229. Atalayin C, Armagan G, Konyalioglu S, Kemaloglu H, Tezel H, Ergucu Z, Keser A, Dagci T, Onal B. The protective effect of resveratrol against dentin bonding agents-induced cytotoxicity. *Dent Mater J*, 34(6):766-773,2015.
230. Kurgan Ş, Önder C, Altıngöz S, Bağış N, Uyanık M, Serdar M, Kantarcı A. High sensitivity detection of salivary 8-hydroxy deoxyguanosine levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*,2015.
231. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Farmanbar N, Abdollahi M. Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 41(10):736-740,2012.

232. Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100(2):391-399,2012.
233. Buljan ZI, Ribaric SP, Abram M, Ivankovic A, Spalj S. In vitro oxidative stress induced by conventional and self-ligating brackets. *Angle Orthod*, 82(2):340-345,2011.
234. Vinothkumar TS, Rubin MI, Balaji L, Kandaswamy D. In vitro evaluation of five different herbal extracts as an antimicrobial endodontic irrigant using real time quantitative polymerase chain reaction. *J Conserv Dent*, 16(2):167,2013.
235. Ok E, Adanir N, Hakki S. Comparison of cytotoxicity of various concentrations origanum extract solution with 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite. *Eur J Dent* 9(1):6,2015.
236. Bajrami D, Hoxha V, Gorduysus O, Muftuoglu S, Zeybek ND, Küçükaya S. Cytotoxic effect of endodontic irrigants in vitro. *Med Sci Monit Basic Res*, 20:22,2014.
237. Navarro-Escobar E, González-Rodríguez M-P, Ferrer-Luque C-M. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15(1):e90-94,2010.
238. Serper A, Çalt S, Dogan AL, Guc D, Özçgelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidativepotential water, NaOCl and EDTA. *J Oral Sci*, 43(4):233-238,2001.
239. Mirhadi H, Abbaszadegan A, Ranjbar MA, Azar MR, Geramizadeh B, Torabi S, Aleyasin ZS, Gholami A. Antibacterial and Toxic Effect of Hydrogen Peroxide Combined with Different Concentrations of Chlorhexidine in Comparison with Sodium Hypochlorite. *J Dent* 16(4):349,2015.

240. Yazici S, Başkan EB. Dermatolojide Arı ve Bal (Apterapi). *Turkiye Klinikleri J Gen Surg-Special Topics*, 6(1):36-41,2013.
241. Purra AR, Mushtaq M, Acharya SR, Saraswati V. A comparative evaluation of propolis and 5.0% potassium nitrate as a dentine desensitizer: A clinical study. *J Indian Soc Periodontol*, 18(4):466,2014.
242. Tyagi SP, Sinha DJ, Garg P, Singh UP, Mishra CC, Nagpal R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J Conserv Dent*, 16(6):532,2013.
243. Joy Sinha D, Garg P, Verma A, Malik V, Maccune ER, Vasudeva A. Dentinal Tubule Disinfection with Propolis & Two Extracts of *Azadirachta indica* Against *Candida albicans* Biofilm Formed on Tooth Substrate. *Open Dent J*, 9(1),2015.
244. Bankova V, Galabov A, Antonova D, Vilhelmova N, Di Perri B. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21(11):1432-1438,2014.
245. Madhavan S, Nayak M, Shenoy A, Shetty R, Prasad K. Dentinal hypersensitivity: A comparative clinical evaluation of CPP-ACP F, sodium fluoride, propolis, and placebo. *J Conserv Dent*, 15(4):315,2012.
246. Lima RVE, Esmeraldo MRA, de Carvalho MGF, de Oliveira PT, de Carvalho RA, da Silva FL, de Brito C, Melo EM. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. *Pediatr Dent* 33(1):14-18,2011.
247. Ahangari Z, Alborzi S, Yadegari Z, Dehghani F, Ahangari L, Naseri M. The effect of propolis as a biological storage media on periodontal ligament cell survival in an avulsed tooth: an in vitro study. *Cell J* 15(3):244,2013.

248. Carbajal Mejía JB. Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Investig Clin Dent*, 5(3):194-200,2014.
249. Wimardhani YS, Soegyanto AI. Oral Mucosal Ulceration Caused by the Topical Application of a Concentrated Propolis Extract. *Case Rep Dent*, 2014,2014.
250. Bretz WA, Paulino N, Nör JE, Moreira A. The Effectiveness of Propolis on Gingivitis: A Randomized Controlled Trial. *J Altern Complement Med*, 20(12):943-948,2014.
251. Saxena D, Saha SG, Saha MK, Dubey S, Khatri M. An in vitro evaluation of antimicrobial activity of five herbal extracts and comparison of their activity with 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res*, 26(5):524,2015.
252. Verma MK, Pandey RK, Khanna R, Agarwal J. The antimicrobial effectiveness of 25% propolis extract in root canal irrigation of primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 32(2):120,2014.
253. Jolly M, Singh N, Rathore M, Tandon S, Banerjee M. Propolis and Commonly Used Intracanal Irrigants.: Comparative Evaluation of Antimicrobial Potential. *J Clin Pediatr Dent*, 37(3):243-249,2013.
254. Bıray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoğlu N. Propolis Ve Etken Maddeleri Olan Kafelik Asit Fenetil Ester (Cape) Ve Sınamik Asitin, İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Dizisi (Ccrf-Cem)'De Sitotoksik Ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 45(2),2006.
255. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*, 30(5):359-361,2004.

256. Singla S, Kumar NR, Kaur J. In vivo studies on the protective effect of propolis on doxorubicin-induced toxicity in liver of male rats. *Toxicol İnt*, 21(2):191,2014.
257. Grenho L, Barros J, Ferreira C, Santos V, Monteiro F, Ferraz M, Cortes M. In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. *Biomed Mater*, 10(2):025004,2015.
258. Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, 102(3):371-376,2005.
259. Tyszka-Czochara M, Paško P, Reczyński W, Szłósarczyk M, Bystrowska B, Opoka W. Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis. *Biol Trace Elem Res*, 160(1):123-131,2014.
260. Serarslan G, Altuğ ME, Konaş T. Kafeik asid fenetil ester'in insizyonel yara modelinde plazma lipid peroksidasyonu, antioksidan durum ve nitrik oksit seviyesi üzerine etkisi. *Türkderm*, 41:11-14,2007.
261. Akyol S, Armutçu F, Yiğitoğlu MR. Propolisin Aktif Bileşenlerinden Kafeik Asit Fenetil Ester'in (Cape) bazı Nörolojik Hastalık ve Acillerde Kullanılması The Medical Usage of Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape), an Active Compound of Propolis, in Neurological.
262. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Cakiroglu T, Akalin I, Deger O, Bedir A. Preventive and protective effects of turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4):388-396,2011.
263. Fu J-Y, Xia Y, Zheng Y. Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vivo and in vitro. *Biomed. Environ. Sci*, 17(4):469-475,2004.

264. Montoro A, Barquinero J, Almonacid M, Montoro A, Sebastià N, Verdú G, Sahuquillo V, Serrano J, Saiz M, Villaescusa J. Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against γ -ray-induced chromosome damage in human blood lymphocytes. *J Evid Based Complementary Altern Med*, 2011,2010.
265. Santos GS, Tsutsumi S, Vieira DP, Bartolini P, Okazaki K. Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with ^{60}Co gamma-radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 762:17-23,2014.
266. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod*, 40,2015.
267. Azargoon H, Williams BJ, Solomon ES, Kessler HP, He J, Spears R. Assessment of hemostatic efficacy and osseous wound healing using HemCon dental dressing. *J Endod*, 37(6):807-811,2011.
268. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod*, 40(3):195-201,2015.
269. Ibrahim MA, Neo J, Esguerra RJ, Fawzy AS. Characterization of antibacterial and adhesion properties of chitosan-modified glass ionomer cement. *J Biomater* 0885328215589672,2015.
270. Yan X-Z, van den Beucken JJ, Cai X, Yu N, Jansen JA, Yang F. Periodontal tissue regeneration using enzymatically solidified chitosan hydrogels with or without cell loading. *Tissue Eng Part A*, 21(5-6):1066-1076,2014.
271. Vineeta N, Gupta S, Chandra A. Retrieval of calcium hydroxide intracanal medicament with Chitosan from root canals: An in vitro CBCT volumetric analysis. *J Conserv Dent*, 17(5):454,2014.

272. Diolosà M, Donati I, Turco G, Cadenaro M, Di Lenarda R, Breschi L, Paoletti S. Use of Methacrylate-Modified Chitosan to Increase the Durability of Dentine Bonding Systems. *Biomacromolecules*, 15(12):4606-4613,2014.
273. Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine*, 7:1805,2012.
274. Lineaweaver W, Howard R, Soucy D, McMorris S, Freeman J, Crain C, Robertson J, Rumley T. Topical antimicrobial toxicity. *Arch Surg*, 120(3):267-270,1985.
275. Fernandes JC, Borges M, Nascimento H, Bronze-da-Rocha E, Ramos OS, Pintado ME, Malcata FX, Santos-Silva A. Cytotoxicity and genotoxicity of chitooligosaccharides upon lymphocytes. *Int J Biol Macromol*, 49(3):433-438,2011.
276. Hu P, Wang T, Xu Q, Chang Y, Tu H, Zheng Y, Zhang J, Xu Y, Yang J, Yuan H. Genotoxicity evaluation of stearic acid grafted chitosan oligosaccharide nanomicelles. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 751(2):116-126,2013.
277. Çalışır M, Akpınar A, Poyraz Ö, Göze F, Çınar Z. The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*,2015.
278. Kihara Y, Tanaka M, Gumiri S, Hosokawa T, Tanaka S, Saito T, Kurasaki M. Mechanism of the toxicity induced by natural humic acid on human vascular endothelial cells. *Environ Toxicol*, 29(8):916-925,2014.
279. Hseu Y-C, Lu F-J, Engelking LR, Chen C-L, Chen Y-H, Yang H-L. Humic acid-induced echinocyte transformation in human erythrocytes: characterization of morphological changes and determination of the

mechanism underlying damage. J Toxicol Environ Health A, 60(3):215-230,2000.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı: Zeliha UĞUR

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Şubat 1988, Aksaray

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 346 21910 10

Fax: +90 346 219 10 10

e-mail: zlhugur@gmail.com

Yazışma Adresi: Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti A.D.
Merkez/SİVAS

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Uzmanlık Eğitimi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hek. Fak.	2013-2014
Uzmanlık Eğitimi	Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek. Fak.	2014-halen
Lisans	İstanbul Üniversitesi Diş Hek. Fak.	2010
Lise	Ortaköy Lisesi, Aksaray	2005