



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜNÜMÜZDE KULLANILAN REZİN ESASLI  
KOMPOZİTLERİN SİTOTOKSİSİTESİ VE  
KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA POTANSİYELİNE  
ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. EZGİ ÇEKMEGELİ

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap Akyüz

İSTANBUL 2015

Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

### TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Doktora  
Anabilim Dalı : Pedodonti  
Tez Sahibi : Ezgi ÇEKMEGELİ  
Tez Başlığı : Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin *in vitro* Olarak İncelenmesi  
Sınav Yeri : M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı  
Sınav Tarihi : 13/07/2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

#### Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Serap AKYÜZ

#### Kurumu

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

#### İmza



#### Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Betül KARGÜL

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

Prof. Dr. Aysen YARAT

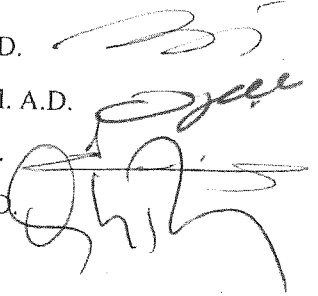
M.Ü. Diş Hek. Fak. Temel Tıp Bil. A.D.

Prof. Dr. Elif SEPET

İ.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

Yrd. Doç. Dr. Sertaç PEKER

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 21/07/2015 tarih ve 6. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



12.06.2015

Ezgi ÇEKMEGELİ

## TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na girişimde büyük desteği olan, Pedodonti eğitimini en iyi şekilde almamız için gerekli ortam ve şartları sağlayan Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya,

Doktora eğitimim süresince, tüm tecrübelerini ve bilgisini benimle paylaşan, ihtiyacım olan her an bilgi ve düşüncelerine başvurduğum, sevgisini ve iyi niyetini her zaman hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ**'e,

Pedodonti doktora eğitimim boyunca bana sayısız katkıları olan değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Ali MENTEŞ** ve **Prof. Dr. Betül KARGÜL**'e,

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen, her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Ayşen YARAT**'a,

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilebilmesi için tüm imkanları sağlayan, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, bilime bağlılığı ile örnek aldığım, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı, değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN**'e,

Tez izleme komitemde bulunan ve ihtiyacım olduğunda desteğini hissettiğim İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Elif SEPET**'e,

Tezimin laboratuvar çalışmalarında bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan, deney süresince çıkan her türlü probleme çözüm bularak destek olan ve verilerin yorumlanmasında yardımcı olan, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim Sayın **Araş. Gör. P. Neslihan TAŞLI** ve **Binnur H. KIRATLI**'ya,

Mesleki tecrübelerini paylaşarak bana sayısız katkıları olan **Yrd. Doç. Dr. Sertaç PEKER**, **Yrd. Doç. Dr. Işıl Özgül KALYONCU**, **Yrd. Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU**, **Yrd. Doç. Dr. Figen EREN GİRAY**, **Dr. Başak DURMUŞ** ve **Dr. Ahu DURHAN**'a,

Doktora eğitimim ve yaşamım boyunca her an desteğini hissettiğim, dostum **Dr. Sezin KUREL**'e,

Pedodonti Anabilim Dalı'nda bulunduğum süre boyunca bilimsel ve mesleki alandaki birlikteliğimizin ötesinde dostluklarını, sevgilerini paylaştığım ve birlikteliğimizden güç aldığım **Dr. Mustafa Sarp KAYA, Dr. Damla AKŞİT BIÇAK, Dt. Belen ŞİRİNOĞLU ÇAPAN, Dt. Burak KITIKİ, Dr. Pınar KULAN, Dt. Berna GÖKKAYA, Dt. Canan DUMAN, Dr. Edibe EGİL ve Dt. Barhan PEKEL**'e,

Doktora hayatımın pek çok mutlu ve hüzünlü günlerini paylaştığım ismini tek tek sayamadığım **tüm asistan arkadaşlarıma** ve sevgili **Bahtişen ÜRER**'e,

Hayatıma girdiği günden beri bana daima destek olan, doktoram süresince her türlü yardımını benden esirgemeyen, varlığı ile hayatıma anlam katan sevgili eşim **Okan ÇEKMEGELİ**'ye,

Beni her durum ve şartta en iyi koşullarda büyütüp yetiştiren, hayatım boyunca bana her zaman destek olup bugünlere gelmemi sağlayan, varlığımı borçlu olduğum ve teşekkürlerin yetmeyeceği canım annem **Harbiye ERARSLAN** ve canım babam **Ali Fuat ERARSLAN**'a,

Sevgisini ve desteğini sonsuz hissettiğim, her zaman yanımda olan sevgili ağabeyim **Çağdaş ERARSLAN**, eşi **Burcu ERARSLAN** ve bütün dertlerimi unutturan biricik yeğenim **Talya ERARSLAN**'a ve tüm **aileme**

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-041213-0452 numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ .....	xiv
RESİM LİSTESİ.....	xvi
<b>1. ÖZET.....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>6</b>
4.1. Kompozit Dolgu Materyallerinin Gelişimi .....	6
4.2. Kompozit Dolgu Materyalleri .....	8
4.2.1. Kompozit dolgu materyallerinin yapısı.....	10
4.2.1.1. Organik matriks fazı.....	10
4.2.1.2. İnorganik faz .....	13
4.2.1.3. Bağlayıcı faz.....	14
4.2.2. Kompozit dolgu materyallerinin sınıflandırılması.....	15
4.2.2.1. İnorganik doldurucu partikül büyüklüğüne göre kompozitler .....	15
4.2.2.2. Viskozitelerine göre kompozitler.....	17
4.2.3. Kompozit dolgu materyallerinde son gelişmeler .....	20

4.2.3.1. Doldurucu partikül alanındaki gelişmeler .....	20
4.2.3.2. Organik matriks alanındaki gelişmeler .....	22
4.2.4. Kompozit dolgu materyallerinin polimerizasyonu .....	23
4.2.5. Reaksiyona girmemiş artık monomer salınımı .....	25
4.3. Kompozit Dolgu Materyallerinin Biyouyumluluğu.....	27
4.3.1. Sistemik toksisite .....	28
4.3.2. Lokal toksisite .....	30
4.3.3. Biyouyumluluğun değerlendirilmesi.....	33
4.3.3.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	36
4.3.3.2. Sitotoksosite testleri .....	38
4.4. Kök Hücreler.....	40
4.4.1. Farklılaşma kapasitesine göre kök hücreler .....	41
4.4.1.1. Totipotent kök hücreler .....	41
4.4.1.2. Pluripotent kök hücreler.....	41
4.4.1.3. Multipotent kök hücreler.....	41
4.4.1.4. Oligopotent kök hücreler .....	42
4.4.1.5. Unipotent kök hücreler.....	42
4.4.2. Kök hücre tipleri .....	42
4.4.2.1. Embriyonik kök hücreler (EKH).....	42
4.4.2.2. Fetal kök hücreler.....	43
4.4.2.3. Kordon kanı kök hücreleri .....	43

4.4.2.4. Yetişkin kök hücreler (YKH) .....	43
4.4.2.4.A. Hematopoetik kök hücreler .....	44
4.4.2.4.B. Mezenkimal kök hücreler (MKH) .....	45
4.4.3. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DK-MKH).....	45
4.4.3.1. Diş pulpası kök hücreleri (DPKH).....	46
4.4.3.2. Süt dişi pulpası kök hücreleri.....	46
4.4.3.3. Apikal papilla kök hücreleri.....	46
4.4.3.4. Diş folikülü kök hücreleri .....	46
4.4.3.5. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH) .....	46
4.4.4. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin önemi.....	47
4.4.4.1. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin odontojenik farklılaşması ve diş pulpasının rejenerasyonu.....	47
4.4.4.2. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması ve periodontal rejenerasyon .....	48
4.4.5. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin odontojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesi .....	50
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>53</b>
5.1. Çalışma gruplarının belirlenmesi .....	55
5.1.1. Sitotoksisite deneyi için çalışma gruplarının belirlenmesi.....	55
5.1.2. Farklılaşma deneyi için çalışma gruplarının belirlenmesi .....	55
5.2. Kompozit örneklerinin hazırlanması.....	56
5.3. Hücre Kültürü.....	57

5.3.1. DPKH ve PDLKH'nin izolasyonu .....	58
5.3.2. DPKH ve PDLKH'nin pasajlanması.....	60
5.3.3. Hücre sayımı .....	62
5.4. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizleri .....	63
5.5. Hücre Toksikite Deneyi .....	64
5.5.1. DPKH ve PDLKH'nin ekimi .....	64
5.5.2. MTS testinin uygulanması .....	65
5.6. Odontojenik ve Osteojenik Farklılaşma Deneyleri.....	66
5.6.1. DPKH ve PDLKH'nin ekimi .....	66
5.6.2. Alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi.....	67
5.6.3. Alizarin red (ALR) boyaması.....	68
5.6.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR) analizi.....	69
5.6.4.1. RNA izolasyonu .....	70
5.6.4.2. cDNA sentezinin yapılması.....	72
5.6.4.3. Primerlerin hazırlanması .....	73
5.6.4.4. Reaksiyon karışımının hazırlanması .....	74
5.7. İstatistiksel Analiz .....	77
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>78</b>
6.1. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları.....	78
6.2. MTS Testi Sonuçları.....	79

6.2.1. DPKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları.....	79
6.2.2. PDLKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları .....	83
6.3. Odontojenik ve Osteojenik Farklılaşma Deneylerinin Sonuçları.....	87
6.3.1. Alkalen fosfataz aktivite testi sonuçları .....	87
6.3.2. Alizarin red boyama görüntüleri .....	90
6.3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları .....	91
6.3.3.1. DPKH'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon sonuçları.....	91
6.3.3.2. PDLKH'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon sonuçları.....	96
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>100</b>
7.1. Gereç ve Yöntemin Tartışması .....	100
7.1.1. Kompozit örneklerinin hazırlanması.....	100
7.1.2. Hücre kültürü .....	102
7.1.3. Hücre kültüründe kök hücre kullanılması .....	104
7.1.4. Kök hücrelerin yirmi yaş dişlerinden elde edilmesi.....	106
7.1.5. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizlerinin yapılması.....	107
7.1.6. Hücre toksisite deneyi .....	108
7.1.7. Odontojenik ve osteojenik farklılaşma deneyleri.....	109
7.1.8. Alkalen fosfataz enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	111
7.1.9. Alizarin red boyamasının yapılması .....	111
7.1.10. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon analizinin yapılması.....	112
7.2. Bulguların Tartışması .....	114

7.2.1. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları.....	114
7.2.2. MTS Testi Sonuçları.....	115
7.2.2.1. DPKH için elde edilen MTS testi sonuçları.....	115
7.2.2.2. PDLKH için elde edilen MTS testi sonuçları .....	117
7.2.3. Odontojenik ve osteojenik farklılaşma deneylerinin sonuçları.....	118
7.2.3.1. Alkalin fosfataz aktivite testi sonuçları .....	119
7.2.3.2. Alizarin red boyama görüntüleri .....	120
7.2.3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları .....	121
7.2.3.3.A. DPKH'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları .....	121
7.2.3.3.B. PDLKH'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları... ..	123
7.3. Sonuçlar .....	125
7.3.1. DPKH sonuçları.....	125
7.3.2. PDLKH sonuçları.....	125
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>128</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>157</b>
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	157
Ek 2. Hasta Bilgilendirme Formu .....	158
Ek 3. Hasta Onam Formu.....	159
Ek 4. Çalışma İzin Yazısı .....	160
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>161</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ALP	Alkalen fosfataz (Alkaline phosphatase)
ALR	Alizarin red
Bis-DMA	Bisfenol-A dimetakrilat
Bis-EMA	Etoksilenmiş bisfenol-A glikol dimetakrilat
Bis-GMA	Bisfenol-A glisidil dimetakrilat
BMP	Kemik morfogenetik proteini (Bone morphogenetic protein)
BPA	Bisfenol A (Bisphenol A)
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DK-MKH	Diş kaynaklı mezenkimal kök hücreler
DMEM	Dubecco'nun modifiye Eagle medyumunu (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMP1	Dentin matriks proteini 1 (Dentin matrix protein 1)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DPKH	Diş pulpası kök hücreleri
DPP	Dentin fosfoprotein (Dentin phosphoprotein)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DSP	Dentin sialoprotein

DSPP	Dentin sialofosfoprotein (Dentin sialophosphoprotein)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EKH	Embriyonik kök hücreler
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration)
FDI	Uluslararası Dişhekimliği Birliği (World Dental Federation)
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatograf (High performance liquid chromatography)
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization)
LED	Light emitting diode
MKH	Mezenkimal kök hücreler
MMA	Metil metakrilat
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-5-(3-karboksimetoksifenil)2-(4-sülfofenil) -2H tetrazolyum
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
OK	Osteokalsin
ON	Ostonektin
P	Pasaj

PBS	Fosfatla tamponlanmış salin (Phosphate buffered saline)
PDL	Periodontal ligament
PDLKH	Periodontal ligament kök hücreleri
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Round per minute)
STRO-1	Fibroblast yüzey belirleyici
TEGDMA	Trietilen glikol dimetakrilat
UDMA	Üretan dimetakrilat
YKH	Yetişkin kök hücreler

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Organik matriks içerisinde yer alan monomerlerin moleküler yapısı.....	11
Şekil 2. Doldurucu partikül modifikasyonuna göre kompozitlerin kronolojik gelişimi.....	17
Şekil 3. Şematize edilmiş nanomer ve nano kümecik yapı.....	21
Şekil 4. Nanomer ve nano kümecik içeren nano kompozit yapısının geçirimli elektron mikroskop (Transmission electron microscope) görüntüsü .....	21
Şekil 5. Dentin derinliğine göre dentin kanal sayısının değişimi .....	32
Şekil 6. Kök hücre kaynakları.....	44
Şekil 7. Çalışma planı .....	54
Şekil 8. DPKH'nin akım sitometri analizi sonuçları .....	78
Şekil 9. PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları.....	79
Şekil 10. MTS testi ile farklı süreler sonunda tespit edilen DPKH'nin canlılık düzeyleri.....	80
Şekil 11. MTS testi ile farklı süreler sonunda tespit edilen PDLKH'nin canlılık düzeyleri.....	84
Şekil 12. DPKH kültürü için ALP aktivite test sonuçlarının karşılaştırılması.....	88
Şekil 13. PDLKH kültürü için ALP aktivite test sonuçlarının karşılaştırılması .....	89
Şekil 14. DPKH kültüründen tayin edilen Kollajen tip I düzeylerinin karşılaştırılması .....	92
Şekil 15. DPKH kültüründen tayin edilen DSPP düzeylerinin karşılaştırılması .....	94
Şekil 16. DPKH kültüründen tayin edilen DMP1 düzeylerinin karşılaştırılması .....	95

<b>Şekil 17.</b> PDLKH kültüründen tayin edilen Kollajen tip I düzeylerinin karşılaştırılması .....	97
<b>Şekil 18.</b> PDLKH kültüründen tayin edilen OK düzeylerinin karşılaştırılması.....	97
<b>Şekil 19.</b> PDLKH kültüründen tayin edilen ON düzeylerinin karşılaştırılması.....	99

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirmelerinde kullanılan test yöntemleri .....	35
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyalleri ve özellikleri.....	54
<b>Tablo 3.</b> Örnek başına hazırlanan reaksiyon karışımı.....	74
<b>Tablo 4.</b> DPKH grubu için hazırlanan reaksiyon plağı.....	75
<b>Tablo 5.</b> PDLKH grubu için hazırlanan reaksiyon plağı .....	76
<b>Tablo 6.</b> DPKH kültüründen 1., 3., 7., 10. ve 14. günler için elde edilen MTS test sonuçları .....	80
<b>Tablo 7.</b> DPKH'ne ait MTS test sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması.....	82
<b>Tablo 8.</b> DPKH'ne ait MTS test sonuçlarının günler arası ikili karşılaştırması .....	83
<b>Tablo 9.</b> PDLKH kültüründen 1., 3., 7., 10. ve 14. günler için elde edilen MTS test sonuçları .....	84
<b>Tablo 10.</b> PDLKH'ye ait MTS test sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması ..	86
<b>Tablo 11.</b> PDLKH'ye ait MTS test sonuçlarının günler arası ikili karşılaştırması....	86
<b>Tablo 12.</b> ALP aktivite test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	87
<b>Tablo 13.</b> ALP aktivite testi sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması.....	89
<b>Tablo 14.</b> DPKH grubunun Gerçek Zamanlı PZR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	92
<b>Tablo 15.</b> DPKH'ye ait Gerçek Zamanlı PZR analiz sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması .....	93

**Tablo 16.** PDLKH grubunun Gerçek Zamanlı PZR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi..... 96

**Tablo 17.** PDLKH'ye ait Gerçek Zamanlı PZR analiz sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması ..... 98

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 1.</b> Çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyalleri.....	53
<b>Resim 2.</b> Kompozit örneklerinin hazırlanmasında kullanılan teflon kalıp .....	56
<b>Resim 3.</b> Kompozit örneklerinin hazırlanması .....	57
<b>Resim 4.</b> Kompozit örneklerinin polimerizasyonunda kullanılan ışık cihazı.....	57
<b>Resim 5.</b> Laminar akışlı steril kabin .....	58
<b>Resim 6.</b> Dişlerden pulpa ve PDL dokusunun elde edilmesi.....	59
<b>Resim 7.</b> Homojenize edilen pulpa ve PDL dokularına kültür besiyerinin eklenmesi.....	59
<b>Resim 8.</b> Dokuların inkübatörde bekletilmesi .....	60
<b>Resim 9.</b> Santrifüj sonrası pulpa ve PDL hücre çökeltilerinin elde edilmesi .....	61
<b>Resim 10.</b> Pulpa ve PDL hücrelerinin falkon tüpten kültür kabına aktarılması .....	61
<b>Resim 11.</b> İnvvert mikroskop altında hücre sayımının yapılması .....	62
<b>Resim 12.</b> Akım sitometri cihazı .....	63
<b>Resim 13.</b> Sayımı yapılan hücrelerin 24 bölmeli kültür plağına ekiminin yapılması	64
<b>Resim 14.</b> Hazırlanan kompozit örneklerinin milipor filtre sistemi üzerine yerleştirilmesi.....	65
<b>Resim 15.</b> MTS örneklerinin ELISA cihazına yerleştirilmesi.....	65
<b>Resim 16.</b> ALP deney kiti.....	67
<b>Resim 17.</b> ALR boyası .....	68

<b>Resim 18.</b> ALR boyama yöntemi ile hazırlanan örneklerden invert mikroskop altında görüntü alınması.....	69
<b>Resim 19.</b> RNA izolasyon kiti .....	70
<b>Resim 20.</b> Vorteks işlemi .....	70
<b>Resim 21.</b> Toplama tüplerinin santrifüj cihazına yerleştirilerek santrifüj edilmesi...	71
<b>Resim 22.</b> RNA kütle ölçümlerinin yapılması .....	72
<b>Resim 23.</b> PZR cihazında cDNA sentezinin yapılması .....	73
<b>Resim 24.</b> Reaksiyon karışımının 96 bölmeli reaksiyon plağına yerleştirilmesi.....	75
<b>Resim 25.</b> Reaksiyon plağının Gerçek Zamanlı PZR cihazına yerleştirilerek okutulması.....	76
<b>Resim 26.</b> ALR boyaması sonucunda DPKH'den elde edilen invert mikroskop görüntüleri.....	90
<b>Resim 27.</b> ALR boyaması sonucunda PDLKH'den elde edilen invert mikroskop görüntüleri.....	91

## **Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin *in vitro* Olarak İncelenmesi**

**Öğrencinin Adı:** Dt. Ezgi ÇEKMEGELİ

**Danışmanı** : Prof. Dr. Serap AKYÜZ

**Anabilim Dalı** : Pedodonti

### **1. ÖZET**

**Amaç:** Çalışmamızın amacı, benzer monomer yapıya sahip universal, bulk fill ve akışkan tipteki kompozit dolgu materyallerinin insan diş pulpası kök hücreleri (DPKH) ve periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH) üzerindeki sitotoksitesisini saptamak ve DPKH'nin odontojenik; PDLKH'nin osteojenik farklılaşma potansiyeline olan etkilerini incelemektir. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow materyallerinin sitotoksik etkileri 1, 3, 7, 10 ve 14. günlerde MTS testi ile değerlendirildi. DPKH ve PDLKH'nin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi için Alizarin red (ALR) boyaması ve Alkalin fosfataz (ALP) aktivite testinin yanı sıra, Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı-PZR) ile DPKH kültüründen kollajen tip-I, dentin sialofosfoprotein, dentin matriks protein 1; PDLKH kültüründen ise kollajen tip-I, osteonektin ve osteokalsin tayini gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz, SPSS-22 programı kullanılarak Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile yapıldı. **Bulgular:** MTS testi sonuçları değerlendirildiğinde, TetricEvoFlow grubu 3. günde DPKH kültüründe ve 14. günde her iki hücre kültüründe en düşük hücre canlılığını gösterdi. ALR boyaması sonucunda, kompozit materyallerine maruz bırakılan her iki hücre kültüründeki kalsifikasyon yoğunluğunun pozitif kontrolden daha az olduğu izlendi. ALP aktivitesi ve Gerçek Zamanlı-PZR analizlerine göre, kompozit gruplarının DPKH'nin odontojenik farklılaşmasını engellediği; PDLKH'nin osteojenik farklılaşması üzerine daha az etkili olduğu görüldü. **Sonuçlar:** Bu çalışmanın sonunda, kompozit dolgu materyallerinin, doldurucu içeriğine bağlı olarak pulpa ve periodontal ligament dokuları üzerinde toksik etkilerinin olabileceği, aynı zamanda dokuların tamir fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği görüldü.

**Anahtar Sözcükler:** Kompozit dolgu materyalleri, diş pulpa kök hücresi, periodontal ligament kök hücresi, sitotoksitesite, farklılaşma kapasitesi

## ***In vitro* Evaluation of the Effects of Recently Used Resin Based Composites on Cytotoxicity and Differentiation Potential of Stem Cells**

**Student's Name:** Dt. Ezgi ÇEKMEGELİ

**Advisor** : Prof. Dr. Serap AKYÜZ

**Department** : Pediatric Dentistry

### **2. SUMMARY**

**Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of universal, bulk-fill and flowable types of a resin composite with the same monomer content on cytotoxicity and odontogenic differentiation potential of human pulp stem cells (DPSCs) and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs).

**Material and Method:** The cytotoxicity of Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill and Tetric EvoFlow was measured on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days using MTS assay. To evaluate the differentiation capacity of both cells, Alizarin-red (ALR) staining, Alkaline phosphatase (ALP) activity test and expression analysis of differentiation-related genes (collagen type-I, dentin sialophosphoprotein, dentin matrix protein-1 for DPSCs and collagen type-I, osteonectin, osteocalcin for PDLSCs) with Real Time-Polymerase Chain Reaction (Real Time-PCR) were performed. The statistical analysis was done by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests using SPSS-22 software. **Results:** According to MTS results, Tetric EvoFlow demonstrated the lowest cell viability on day 3 for DPSCs and also day 14 for both cell cultures. ALR results showed that composite groups had less calcification density than positive control. According to ALP activity and Real Time-PCR, it was revealed that the odontogenic differentiation of DPSCs was inhibited and the osteogenic differentiation of PDLSCs was less affected by composite groups. **Conclusion:** Our results revealed that resin composites may have some cytotoxic effects on the pulp and periodontal ligament tissue according to their filler content and the differentiation capacity of progenitor cells may be compromised, which means repair process of these tissues could be affected.

**Key Words:** resin composites, dental pulp stem cells, periodontal ligament stem cells, cytotoxicity, differentiation capacity

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüz Restoratif Diş Hekimliği uygulamalarında estetiğin önem kazanması ve en az kavite preparasyonunun benimsenmesi, amalgam dolgulara nazaran ışıkla sertleşen rezin esaslı kompozit dolgu materyallerinin kullanımını yaygınlaştırmıştır (Uluakay ve ark., 2011). Çocuk Diş Hekimliği uygulamalarında süt, karışık ve daimi dişlenme dönemlerinde rezin esaslı fissür örtücüler, rezin modifiye cam iyonomer simanlar ve kompomerlerin yanı sıra kompozitler sıklıkla kullanılmaktadır (Mousavinasab, 2011).

Mine ve dentin dokusuna adezyon ile bağlanan kompozitler, 1962 yılında Dr. Ray Bowen tarafından tanıtılmış ve kompozitlerin yapısı elli yıldan bu yana büyük gelişme göstermiştir. Son yıllarda mikrohibrit kompozitlerin yapısına nano partikül ve daha önce polimerize edilmiş rezin doldurucuların eklenmesiyle oluşturulan, hem arka hem ön diş grubu dişlerin restorasyonunda kullanılabilir (universal) nanohibrit kompozitlerin üretimi ve kullanımı ön plandadır (Ferracane, 2011). Bunun yanında, doldurucu partikül boyutu, dağılımı, şekli ile monomer ve polimerizasyon teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde özel uygulama alanlarına sahip kompozitler geliştirilmektedir. Akışkan kompozitler, doldurucu oranının azaltılması ile elde edilen düşük viskoziteli kompozitlerdir. Küçük kaviteilerin restorasyonunda kullanımının yanı sıra, derin kaviteelerde kompozitlerin altında stres kırıcı materyal olarak da kullanılır (Bayne ve ark., 1998). Son dönemde piyasaya sürülen düşük polimerizasyon büzülme özelliğine sahip kütleli yerleştirilebilen “bulk fill” kompozitler ise dolgu yapımı sırasında zorluk yaşanan arka dişlerde kullanım kolaylığı sunar (Flury ve ark., 2012).

Klinik kullanımda, uygun dolgu materyalinin seçimi ve kabul edilebilirliği, sadece materyalin fiziksel ve kimyasal üstünlüklerine göre olmayıp, aynı zamanda biyouyumluluğuna bağlıdır. Biyouyumluluk, bir materyalin spesifik bir uygulamada konakta uygun bir cevap oluşturabilme özelliği olarak tanımlanır (Nicholson ve Croll, 1997).

Diş hekimliğinde kullanılan dolgu materyallerinin biyouyumlu olup sistemik ve lokal toksik etki oluşturmaması önemlidir. Lokal toksik etki, dişe uygulanan kompozit ile komşu olan oral mukoza, diş eti ve pulpa dokularında görülür. Pulpadaki etki kompozitten salınan komponentlerin dentinden difüzyon yolu ile pulpaya ulaşması ile ortaya çıkar (Moharamzadeh ve ark., 2009). Sitotoksik olan materyaller kısa veya uzun dönemli doku enflamasyonu veya hücre ölümüne sebep olur (Geurtsen, 2000). Dolgu materyallerinin biyouyumluluğu açısından en büyük endişe verici durum organik rezinlerden ortama artık monomer, reaksiyon başlatıcı gibi bileşenlerin veya inorganik doldurucudan metal iyonları gibi sitotoksik maddelerin salınmasıdır (Rodriguez-Lozano ve ark., 2013). Polimerizasyon sırasında ve sonrasında ortaya çıkan artık monomerlerin hücreSEL ve moleküler sitotoksitenin asıl kaynağı olduğu, bunun da pulpa canlılığını etkilediği ve periodontal alanı da etkileyerek diş etinde çekilmeye sebep olduğu bildirilmiştir (Bakopoulou ve ark., 2011b; Franz ve ark., 2009). Rezin esaslı materyallerin ve bileşenlerinin *in vitro* biyouyumluluk değerlendirmeleri için çeşitli hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır (Darmani ve ark., 2007; Galler ve ark., 2011; Bakopoulou ve ark., 2012). Yapılan hücre kültürü çalışmaları ile kompozit dolgu materyallerinin biyouyumlulukları konusunda şüpheler olduğu ve güncel çalışmaların giderek bu konu üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında genellikle fibroblast hücreleri kullanılmakta olup, son yıllarda üç boyutlu doku mühendisliği modelleri geliştirilmiştir (Moharamzadeh ve ark., 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, rezin esaslı kompozitlerin içeriğindeki monomerlerin, hücrelerin gen sentezinde bozukluğa ve dentin-pulpa kompleksinin rejeneratif potansiyelinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Galler ve ark., 2011; Bakopoulou ve ark., 2012). Dentin-pulpa kompleksi farklılaşmış veya henüz farklılaşmamış odontoblast, odontoblast benzeri hücreler ve pulpa kök hücrelerinden oluşur (Sloan ve Smith, 2007). Çeşitli tiplerde kollajen, fibronektin ve proteoglikan içeren odontoblast hücreleri pulpanın periferinde sıralanan, dentin matriksinin formasyonundan sorumlu hücrelerdir. Atrizyon, erozyon, çürük ve restoratif prosedürler gibi dış etkenler sonucu odontoblastların stimülasyonu ile rejeneratif veya reperatif dentinogenesis oluşumu gerçekleşir (Smith, 1995). Pulpanın açığa çıkması ve derin kavitelere kompozit uygulanması gibi daha ciddi etkenler ile odontoblastik tabaka zarar görür (Bakopoulou ve ark., 2012). Toksik bulunmayan düşük

konsantrasyonda dahi, rezin monomerlere maruz bırakılan insan diş pulpası kök hücrelerinin migrasyon, odontojenik farklılaşma ve mineralizasyon kapasitesinde gecikme olduğu; yüksek konsantrasyonda ise monomerlerin, reparatif dentin oluşumunu tamamen engellediği gösterilmiştir (Bakopoulou ve ark., 2011b).

Bu etkiler nedeniyle, geniş kullanım alanına sahip ve piyasaya yeni sürülmüş kompozitlerin ve diğer dental materyallerin fiziksel özelliklerinin yanında, komşu dokular üzerine olan biyouyumluklarının sorgulanması gerektiği ve bu amaçla yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır (Rodriguez-Lozano ve ark., 2013).

Bu bilgiler ışığında, klinikte uygulanmakta olan güncel kompozitlerin *in vitro* ortamda oluşturduğu sitotoksik ve pulpadan / periodontal ligamentten elde edilen kök hücrelerin farklılaşma kapasitesine olan etkisini incelediğimiz çalışmamızın bu konuya açıklık getirerek literatüre katkı sağlayacağına düşünmekteyiz.

Yukarıda bahsedilen etkileri test etmek amacıyla son dönemde yapılan kök hücre çalışmalarının kompozitlerin içeriğindeki monomerlerin direkt etkisini değerlendirdikleri görülmektedir (Bakopoulou ve ark., 2011b; Bakopoulou ve ark., 2012). Çalışmamızda ise, polimerizasyonu sağlanmış kompozit örneklerinin hücreler ile aynı ortamda tutulması sonucu kompozitlerden ortama salınan bileşenlerin kök hücreler üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır. Ayrıca yine son dönemdeki kök hücre çalışmalarından farklı olarak, pulpa kök hücrelerinin yanında periodontal alandan elde edilen kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi üzerine olan etkiler de değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın amacı, Çocuk Diş Hekimliği pratiğinde kullanımı yaygın olan benzer monomer yapıya sahip universal, bulk fill ve akışkan tipteki kompozit dolgu materyallerinin, *in vitro* ortamda polimerizasyonunu takiben insan diş pulpası kök hücreleri (DPKH) ve periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH) üzerindeki sitotoksitesini saptamak ve DPKH'nin odontojenik; PDLKH'nin osteojenik farklılaşma potansiyeline olan etkilerini incelemektir.

## 4. GENEL BİLGİLER

Çeşitli sebeplerle kaybedilen diş dokusunun estetik ve fonksiyonel olarak tedavi edilmesini amaçlayan, kalan diş dokusunun uygun restoratif materyal ile kapatılması prensibine dayanan Restoratif Diş Hekimliği alanında sürekli olarak yeni materyaller geliştirilmektedir (Waggoner, 2005). Bu amaçla geçmişten günümüze kadar amalgam, silikat siman, akrilik rezin, cam iyonomer simanlar ve rezin esaslı kompozitler gibi diş direkt olarak uygulanan farklı restoratif materyaller kullanılmıştır (Willems ve ark., 1993).

### 4.1. Kompozit Dolgu Materyallerinin Gelişimi

Diş hekimliği tarihinde, diş direkt olarak uygulanabilen ilk dolgu materyalleri altın folyo, dental amalgam ve silikat simanlardır (McCabe ve Walls, 2000). Bunlardan sadece amalgam günümüzde hala kullanılmaktadır.

En eski dolgu maddelerinden olan amalgam, temel olarak gümüş, bakır, kalay, çinko ve bazen de palladyum, indiyum ve selenyumun sıvı civa ile karışımından meydana gelen bir alaşımdır (Johnson, 2002). Diş hekimliğinde 1880'lerden beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Fuks, 2002). Diğer restoratif materyallere kıyasla daha ucuz, teknik hassasiyeti daha az ve doğru uygulandığında daha uzun ömürlü olabilmektedir. Ancak, tutuculuk için dişten fazla doku kaldırılması gerekliliği, estetik olmaması, korozyona uğraması gibi dezavantajları vardır. Estetik dolgu malzemelerinin geliştirilmesi ile birlikte kullanımı giderek azalmıştır. Özellikle içeriğindeki toksik maddeler (örn: civa) sebebi ile hasta ve diş hekimliği çalışanları için endişe uyandırmaktadır (Arenholt-Bindslev ve Hersted-Bindslev, 2009). Amalgamın uygulanması ve uzaklaştırılması sırasında ortama salınan civanın vücut üzerine çeşitli yan etkilerinin olabileceği ve hasta ve diş hekimleri için sağlık açısından risk oluşturduğu öne sürülmüştür (Çolak, 1989; Berglund ve Molin, 1997; Eley, 1997). Amalgamın toksisitesi ve güvenilirliği, yapılan araştırmalarla uzun süreden beri incelenmektedir (Mackert ve Berglund, 1997; Counter ve Buchanan, 2004; Brownawell ve ark., 2005). Bu sebeple kullanımı giderek azalmakta, hatta Batı ülkelerinde kullanımı artık terk edilmektedir (Powers, 2002).

Fletcher tarafından 1871 yılında tanıtılan silikat simanlar, aynı zamanda diş rengindeki ilk estetik dolgu materyali olarak kabul edilir. Silikat simanların çığneme kuvvetlerine karşı dayanıksız oluşu, kırılğan, asidik yapıda, neme karşı duyarlı ve ağız sıvılarında çözünebilir olması nedeni ile kullanımı terk edilmiştir (McCabe ve Walls, 2000).

Daha sonra polimer teknolojisindeki ilerleme ile 1930'lu yıllarda protez temel maddesi olan akrilik rezinler keşfedilmiştir. Bunu takiben 1940'lı yıllarda polimetil metakrilat esaslı akrilik dolgu materyalleri geliştirilmiş ve böylece akrilik rezinler diş görünümünü taklit edebilen ilk rezin esaslı dolgu materyali olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişme, bugün kullandığımız rezin esaslı kompozit dolgu materyallerinin gelişiminin ilk adımı olarak kabul edilir. Ancak akrilik rezinlerin sertleşme sırasında ısı açığa çıkarması, renk stabilitesinin kötü olması, polimerizasyon büzülmesinin yüksek olması, termal genleşme katsayısının dişe kıyasla çok fazla olması ve diş yapısına zayıf bağlanma nedeni ile yeni arayışlar başlamıştır (Willems ve ark., 1993; McCabe ve Walls, 2000; Powers, 2002). İlk doldurucu içerikli seramik-polimer esaslı kompozit, Knock ve Glenn tarafından 1951 yılında patentlenmiştir (Eliades ve ark., 2003).

Bowen ise yaptığı çalışmalar sonucunda, 1962 yılında bisfenol-A glisidil dimetakrilat (Bis-GMA) monomerini keşfetmiş ve bu yapı günümüz diş hekimliğinde kullanılan rezin esaslı kompozitlerin temel yapısını oluşturmuştur. Resin esaslı kompozitlerin keşfedilmesi ile ön bölge restorasyonlarında kullanılan silikat simanların ve akrilik rezinlerin kullanımı hızlıca azalmıştır (McCabe ve Walls, 2000).

Kompozit dolgu materyallerinin gelişiminden sonra, 1970'li yıllarda, asit/baz reaksiyonu göstermesi ve cam partikülleri içermesi özelliği ile silikat simanlara benzerlik gösteren cam iyonomer simanlar geliştirilmiştir. Fluor salınımı yapma özelliğine ve bu nedenle de Çocuk Diş Hekimliği alanında geniş kullanım endikasyonuna sahiptir. Cam iyonomer simanın yapısını güçlendirmek amacıyla, içeriğine polimerize olabilen rezin eklenerek 1980'li yıllarda rezin modifiye cam iyonomer simanlar piyasaya sürülmüştür. Resin modifiye cam iyonomer simanlarda hem ışık aktivasyonu ile hem de cam iyonomer simana özgü asit-baz reaksiyonu ile birlikte sertleşme tamamlanmaktadır. Yüksek çürük riski olan çocuklarda kullanımı

endikedir (Wiegand ve ark., 2007). Daha sonra, kompozitin estetik özellikleri ile cam iyonomer simanın fluor salınımı yapma ve diş yapısına kimyasal bağlanma özelliklerinin kombine edilmesi ile 1990'lı yıllarda poliasit modifiye kompozit rezinler (kompomerler) geliştirilmiş ve Çocuk Diş Hekimliği uygulamalarında popüler hale gelmiştir (Nicholson, 2007).

Günümüze kadar kullanımı mevcut olan dolgu materyallerinden amalgam, cam iyonomer simanlar, rezin modifiye cam iyonomer simanlar, kompomerler ve rezin esaslı kompozit dolgu materyalleri Çocuk Diş Hekimliği alanında (süt, karışık ve daimi dişlenme dönemlerinde) kullanılmaktadır (Mousavinasab, 2011). Uzun süredir süt ve daimi dişlerin restorasyonunda kullanılan amalgamın, içeriğindeki civa nedeni ile kullanımının tartışma konusu olması ve estetik olmaması nedeniyle kullanımı giderek azalmakta ve yerini diş rengindeki rezin esaslı kompozitlere bırakmaktadır (Powers, 2002). Cam iyonomer simanlar, rezin modifiye cam iyonomer simanlar ve kompomerlerin ise fiziksel ve estetik özelliklerinin rezin esaslı kompozitlere göre yetersiz oluşuna bağlı olarak klinik başarı oranları düşüktür (Gladys ve ark., 1997; Meyer ve ark., 1998). Bu sebeplerle günümüz Çocuk Diş Hekimliği alanında rezin esaslı kompozit dolgu materyallerinin kullanımı yaygınlaşmaktadır.

Bugüne kadar bir çok gelişme gösteren rezin esaslı kompozitler, sadece restoratif materyal olarak değil, aynı zamanda pit ve fissür örtücü, post ve kor materyali, inlay, onlay, kuron materyali, yapıştırma simanı ve geçici restorasyon yapımı olmak üzere günümüz diş hekimliğinde birçok uygulamada kullanılmaktadır (Schmalz, 2009; Ferracane, 2011).

#### **4.2. Kompozit Dolgu Materyalleri**

Kompozit terimi, birbiri içinde tamamen çözünmeyen farklı yapı ve özellikteki iki veya daha fazla maddenin birleşimini ifade eder; bu birleşim içeriğinde bulunan maddelerin tek başına taşımadıkları özelliklere sahip bir materyal haline gelir (van Noort, 2013). Resin esaslı kompozit dolgu materyalleri, esas olarak organik bir matriks içerisine belirli oranlarda ilave edilen inorganik doldurucular ve doldurucuların organik matrikse tutunmasını sağlayan bağlayıcı (silan) kısımdan oluşur (Altun, 2005).

Mine ve dentin dokusuna adezyon ile bağlanan rezin esaslı kompozitler, ilk olarak 1962 yılında Dr. Ray Bowen tarafından tanıtılmıştır. Bowen, epoksi rezinlerde bulunan epoksi grupları yerine metakrilat gruplarını ekleyerek Bis-GMA monomerini elde etmiş ve bu monomer içerisine inorganik grupların ilavesiyle de ilk rezin esaslı kompozitleri geliştirmiştir (Bayne ve ark., 1994; Cobb ve ark., 2000).

Diş hekimliğinde ilk kullanımları toz-likit karışımı şeklinde olan kompozitler daha sonra iki pat şeklinde kullanılmıştır. Ancak iki patın karıştırılması sırasında oluşabilecek hava kabarcıklarının kompozitin direncini düşürdüğü; ayrıca, çalışma süresinin kısa olması ve tek seferde kütleli olarak kaviteye yerleştirilme zorunluluğundan kaynaklanan başarısızlıklar yarattığı görülmüştür. Bu nedenle günümüzde tek pat şeklinde ve dalga boyu ortalama 460 nm olan görünür ışıkla polimerize edilen kompozit dolgu materyalleri kullanılmaktadır (Arıkan, 2005; van Noort, 2013).

Günümüz Restoratif Diş Hekimliği uygulamalarında estetiğin önem kazanması, en az kavite preparasyonunun benimsenmesi ve civa toksisitesine duyulan korku, ışıkla sertleşen kompozit dolgu materyallerinin kullanımını amalgam dolgulara nazaran yaygınlaştırmıştır (Uluakay ve ark., 2011). Bu özelliklerinin yanı sıra adeziv sistemlerle diş dokusuna bağlanabilmeleri, kalan diş yapısını desteklemeleri, düşük termal iletkenlikleri, yapısının gelişen teknoloji ile sürekli yenilenmesi gibi avantajları vardır (Morin ve ark., 1984; Garcia-Godoy, 2000). Ancak kompozitin uygulanması esnasında adeziv sistemlerin kullanımının teknik hassasiyet gerektirmesi, amalgama kıyasla daha maliyetli olmasına neden olmaktadır (Kugel ve Ferrari, 2000).

Rezin esaslı kompozitler, ön/arka bölgedeki süt ve daimi dişlerin restorasyonunda, koruyucu rezin restorasyonların uygun olduğu pit ve fissür çürüklerinin restorasyonunda kullanılır (Ferracane, 2001; Powers, 2002). Ancak, tükürük izolasyonunun sağlanamadığı dişlerde, geniş ve çok yüzeyle restorasyon ihtiyacı olan azı dişlerinde ve ağız hijyeni kötü olan yüksek çürük riskli hastalarda kullanımları uygun değildir.

#### **4.2.1. Kompozit dolgu materyallerinin yapısı**

Rezin esaslı kompozit dolgu materyalleri, organik matriks fazı, inorganik faz ve bağlayıcı faz olmak üzere üç ana bileşenden oluşur (Altun, 2005; Schmalz, 2009).

##### **4.2.1.1. Organik matriks fazı**

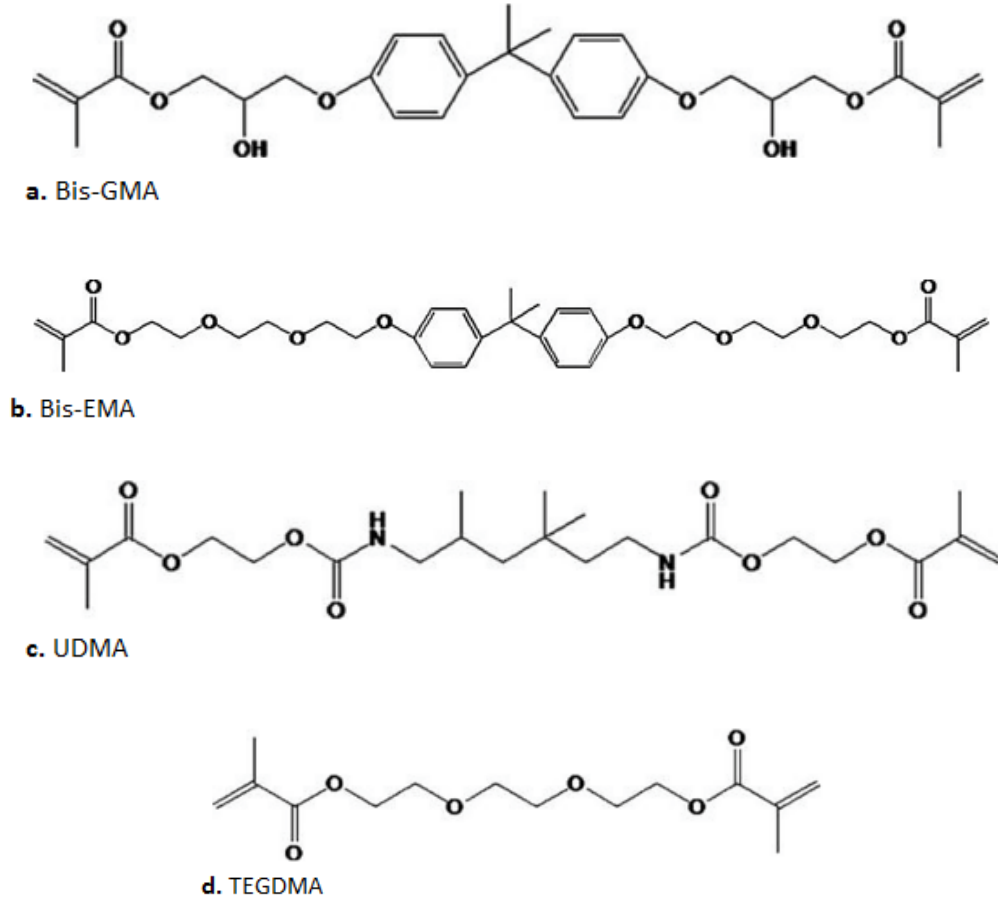
Organik matriks fazı, rezin esaslı kompozitin kimyasal olarak aktif olan komponentidir. Monomerler, ko-monomerler, polimerizasyon inhibitörleri, polimerizasyon başlatıcılar, aktivatörler, ultraviyole stabilizatörleri ve pigmentlerden oluşur (Spahl ve ark., 1998). Başlangıçta sıvı monomer yapısına sahip olan organik matriks fazı polimerizasyon (sertleşme) reaksiyonu sonucu rijid polimer yapısına dönüşür (van Noort, 2013).

Rezin esaslı kompozitlerin klinik performansını ve polimerizasyon derecesini organik matriks miktarı belirler. Organik matriks fazı, rezin esaslı kompozitin en zayıf ve aşınma direncinin en düşük olduğu fazdır; suyu absorbe edebilir ve renklenebilir. Bu nedenle üreticiler kompozit materyalinin matriks içeriğini azaltıp doldurucu içeriğini arttırarak fiziksel ve mekanik özellikleri daha iyi kompozitler oluşturmayı hedeflemektedir (Gladwin ve Bagby, 2009).

- **Monomerler**

Organik matriks, bir veya daha fazla monomer karışımından oluşur (Altun, 2005). Monomerler polimerize olmamış restoratif materyalin akışkan olmasından sorumludur. Monomerler içerisinde bisfenol A (BPA) türevi olan Bis-GMA monomerinin kullanımı yaygındır (Geens ve ark., 2011). İlk defa Bowen tarafından 1962 yılında geliştirilen bu sentetik monomer, 2,2-bis [4-(2-hidroksi-3-metakrilosi propoksi) fenil] propandır. Yüksek viskoziteli, hemen hemen renksiz bir monomer olup, düşük polimerizasyon büzülmesi, hızlı sertleşme, sert yüzey özelliklerine sahiptir (van Noort, 2013). Ancak, Bis-GMA hidrofilik bir monomerdir ve su emilimine izin verir. Bu nedenle materyalin dayanıklılık ve aşınma direnci azalır. Bu problemleri azaltmak amacı ile Bis-GMA'nın bir türü olan etoksilenmiş bisfenol-A glikol dimetakrilat (Bis-EMA) monomeri geliştirilmiştir. Bis-GMA'ya göre daha hidrofobik ve daha az visköz yapıdadır (Craig, 1981; Skrtic ve ark., 2006).

Kullanımı yaygın olan diğ er bir monomer renk değişimine dirençli olan ve daha iyi adezyon sağlayan üretan dimetakrilat (UDMA)'dır (Uluakay ve ark., 2011). Bis-GMA'ya benzer molekül ağırlığına sahip olsa da UDMA daha akıcıdır. Tek başına kullanılabildiği gibi Bis-GMA ve trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) gibi diğ er monomerlerle birlikte de kullanılabilir (Ferracane, 2001) (şekil 1.).



**şekil 1.** Organik matriks içerisinde yer alan monomerlerin moleküler yapısı (a) Bis-GMA (b) Bis-EMA (c) UDMA (d) TEGDMA (Sakaguchi ve ark., 2012b)

Yüksek moleküler ağırlığı nedeniyle Bis-GMA ve UDMA oldukça visk z d r ve küçük miktarda doldurucu ilave edilmesi bile klinik kullanım için fazlasıyla sert bir kompozit elde edilmesine neden olur. Bu problemin üstesinden gelmek için, matriks yapısına metil metakrilat (MMA), etilen glikol dimetakrilat, TEGDMA ve Bis-EMA gibi düşük viskoziteli monomerler ilave edilir (Venhoven ve ark., 1993; Peutzfeldt, 1997; Sakaguchi ve ark., 2012a).

TEGDMA, esnek ve düşük moleküler ağırlığa sahip bir monomerdır. Bis-GMA'ya eklendiğinde materyalin çalışma özelliklerini iyileştirirken polimerizasyon büzülmesini ve su emilimini arttırır (Cramer ve ark., 2011; Finer, 2012). Kompozit dolgu materyalleri geliştirilirken, monomer kompozisyonları bu özelliklerin dengelenmesi üzerine modifiye edilmektedir (Finer, 2012).

- **İnhibitörler**

Organik matriks içerisindeki inhibitörler, monomerlerin kendi kendine polimerize olmasını engellemek amacı ile eklenen fenol türevi bileşikler olup en yaygın olarak kullanılan çeşitleri 4-metoksifenol ve 2,4,6-tritersiyeer bütifenol'dür. Malzemenin yeterli raf ömrünün ve uygun çalışma süresinin sağlanmasına yardımcı olurlar (Craig, 1981; Peutzfeldt, 1997).

- **Polimerizasyon başlatıcılar ve aktivatörler**

Polimerizasyon başlatıcılar ve aktivatörler, kompozitin içeriğindeki monomerlerin polimerize edilerek kompozitin sertleştirilmesine yardımcı olurlar. Polimerizasyon başlatıcılar, serbest radikallerin oluşmasına yol açarak polimerizasyon reaksiyonunun başlamasını sağlar (Powers, 2002; Finer, 2012).

Farklı polimerizasyon sistemleri araştırılmakla birlikte günümüzde en sık kullanılan kompozitler ışık ile aktive olanlardır (Ferracane, 2011). Kimyasal olarak sertleşen (otopolimerizan) kompozitlerde polimerizasyon başlatıcı olarak organik peroksit, görünür ışık ile polimerize olan (fotopolimerizan) kompozitlerde ise yaygın olarak kamforokinon kullanılır (Stansbury, 2000; Finer, 2012). Piyasadaki bazı formülasyonlar fenil propandiyon (1-fenil-1,2-propanedion) ve lusirin gibi farklı başlatıcı sistemler içerir (Ferracane, 2011).

Polimerizasyon reaksiyonunu hızlandıran maddeler ise aktivatörlerdir. Aktivatör olarak N,N-bis (2 hidroksi etilen)-p-toludin gibi aromatik tersiyeer amin kullanılır (Stansbury, 2000; Ferracane, 2011).

- **Ultraviyole stabilizatörleri**

Özellikle kimyasal sertleşen kompozitlerin polimerizasyon reaksiyonunun ardından reaksiyona girmeyen artık ürünler, ultraviyole ışığın etkisiyle parçalanarak kahverengi renklemelere neden olabilirler. Bunu engellemek amacıyla yapıya ultraviyole stabilizatörleri (örneğin, 2- hidroksi-4-metoksibenzofenon) ilave edilir (Willems ve ark., 1993).

- **Pigmentler ve diğer komponentler**

Kompozitin yapısına küçük miktarda katılan farklı renk tonundaki pigmentler sayesinde çeşitli renklerde kompozitler elde edilir. Bu da restorasyonun diş rengine en yakın görüntüyü vermesine olanak sağlar (Powers, 2002). Genellikle inorganik oksitler bu amaçla kullanılır. Demir oksit en çok kullanılan pigment olup sarıdan griye kadar renk çeşitliliği sunar.

Ayrıca doğal diş görünümü vermek amacıyla kompozit yapısına floresan özellikte ajanlar da eklenebilmektedir. Bunlar boya veya pigmentlerden oluşur ve restorasyonun rengine beyazlatma etkisi yaratır (Sakaguchi ve ark., 2012a).

#### **4.2.1.2. İnorganik faz**

Rezin esaslı kompozitlerin üstün fiziksel özellik göstermesi ve diş dokusuna benzer niteliklere sahip olabilmesi için organik matrikse farklı boyut, şekil ve miktarda inorganik doldurucu partiküller eklenir (Craig, 1981; Dayangaç, 2011). Bu partiküller kompozitin dayanıklılığını ve elastikiyetini artırır, aşınma direncini ve marjinal uyumunu iyileştirir, kompozite radyoopasite özellik kazandırır, su emilimini ve polimerizasyon büzülmesini azaltır (Cook ve ark., 1984; Kim ve ark., 2002; Zimmerli ve ark., 2010). Ayrıca kompozitin uygulanmasını kolaylaştırır ve estetik özelliklerini iyileştirir (Hervas-Garcia ve ark., 2006).

Geçmiş zamanlarda inorganik doldurucu olarak çoğunlukla kuartz partikülleri kullanılırken, günümüzde sıklıkla, organik matriks içerisine dağılmış farklı şekil ve boyutlardaki cam partikülleri, kolloidal silikat, borosilikat cam, lityum alüminyum silikat, yitrium cam, baryum alüminyum silikat ve hidroksiapatit kullanılmaktadır

(Bayne ve ark., 1994; Chen, 2010). Aşınmaya karşı direnç göstermesi ve radyografide radyoopak görüntü vermesi için stronsiyum, baryum, çinko, zirkonyum gibi maddeler ilave edilir (Ilie ve Hickel, 2011).

Günümüzde kullanılan kompozitler, içerdikleri doldurucu miktarları ve boyutları açısından çeşitlilik gösterir. Kompozitlerin yapısındaki doldurucu miktarları hacim veya ağırlık yüzdeleri (genellikle ağırlık) ile belirtilir. Doldurucuların yüksek oranda ilavesi kompozitin mekanik, fiziksel ve estetik özelliklerini arttırırken akıcılığını azaltır. Küçük boyutlu doldurucular estetik özellikleri geliştirirken büyük boyutta olan doldurucular fiziksel özellikleri arttırır (McCabe ve Walls, 2000; Kim ve ark., 2002). Son dönemde nano boyutta doldurucuların üretimi ön plandadır.

#### **4.2.1.3. Bağlayıcı faz**

Organik matriks ile inorganik doldurucular arasında kimyasal bir bağlanma yoktur. Bu iki yapı arasında bağlanmayı sağlamak için bağlayıcı ajan kullanılır. Doldurucu partiküllerin yüzeyinin önceden bifonksiyonel bağlayıcı ajan ile muamele edilmesi ve sonrasında kompozit yapısına katılması ile bağlanma sağlanır (Cramer ve ark., 2011; Finer, 2012).

Kompozitin mekanik özelliklerinin iyi olması için, organik matriks ile inorganik doldurucu faz arasındaki bağlanma kuvvetli ve sürekli olmalıdır. Bu bağlantı organik silisyum bileşiği olan silanlar (silikon ve metan kelimelerinin birleşimi ile adlandırılmıştır) ile gerçekleşir (Craig, 1981; Powers, 2002). Cam dolduruculu kompozitlerde yaygın olarak kullanılan silan tipi  $\gamma$ -metakriloksipropil trimetoksisilan'dır. Silanlar organik matriksteki metakrilat grubu ile kovalent bağlar kurarken, inorganik kısımda doldurucu partiküllerin yüzeyindeki hidroksil gruplarına bağlanırlar (Craig, 1981; Wilson ve ark., 2005; Chen, 2010; Dayangaç, 2011).

Aradaki bağlanmanın iyi olması, materyalin fiziksel ve mekanik özelliklerini geliştirdiği gibi, rezinin çözünürlüğünü ve su emilimini azaltır (Ferracane, 1995; van Noort, 2013). Silan bağlanma ajanları, inorganik fazın özellikle silika partiküllerinde olumlu sonuçlar verdiği için kompozit dolgu materyallerinin çoğunda silika içerikli doldurucular kullanılır (Wakefield ve Kofford, 2001; Dayangaç, 2011).

#### **4.2.2. Kompozit dolgu materyallerinin sınıflandırılması**

Kompozitlerin sınıflandırması araştırmacılar arasında farklılık göstermektedir. İçeriğindeki doldurucu partikül büyüklüğü ve yüzdesine, viskozitesine, kullanıldıkları bölgeye, polimerizasyon yöntemlerine göre olmak üzere çeşitli sınıflamalar mevcuttur (Dayangaç, 2011). En fazla kullanılan sınıflama sistemi Lutz ve Philips (1983) tarafından tanımlanan doldurucu partikül büyüklüğünü esas alır (Puckett ve ark., 2007).

##### **4.2.2.1. İnorganik doldurucu partikül büyüklüğüne göre kompozitler**

Kompozitler inorganik partikül büyüklüğüne göre,

- Megafil (50-100  $\mu\text{m}$ ),
- Makrofil (10-100  $\mu\text{m}$ ),
- Midifil (1-10  $\mu\text{m}$ ),
- Minifil (0,1-1  $\mu\text{m}$ ),
- Mikrofil (0,01-0,1  $\mu\text{m}$ ) ve
- Nanofil (0,005-0,01  $\mu\text{m}$ ) olarak sınıflandırılabilir (Dayangaç, 2011).

Makrofil ve midifil kompozitler, geleneksel kompozitler olarak adlandırılırlar (Dayangaç, 2011). Makrodoldurucu kompozitlerin en önemli dezavantajı, organik matriksin kolayca aşınması ve doldurucuların aşınmayıp yüzeyin pürüzlü kalmasına sebep olmalarıdır. Polisaj, diş fırçalama ya da çiğneme sonucunda rezin matriks aşındıkça dolgu yüzeyinde çıkıntılar oluşur (Dayangaç, 2011; Ferracane, 2011).

İnorganik doldurucu partiküllerin küçük ve çok sayıda olması makrofil kompozitlere oranla daha düzgün bir yüzey elde edilmesini sağlar. Küçük partiküllü kompozitler cilalanabilirliklerinin iyi olması nedeniyle anterior dişlerin restorasyonlarında tercih edilir (Dayangaç, 2011).

Geleneksel kompozitlerden sonra üretilen mikrofil kompozitler iyi polisajlanabilen kompozitler olarak da adlandırılır. Ancak mikrofil kompozitlerin daha az oranda doldurucu içermesinden dolayı dayanıklılıkları çok iyi değildir. İyi cilalanabilir olmasının yanı sıra dayanıklılığın da artırılması amacıyla hibrit kompozitler geliştirilmiştir (Ferracane, 2011).

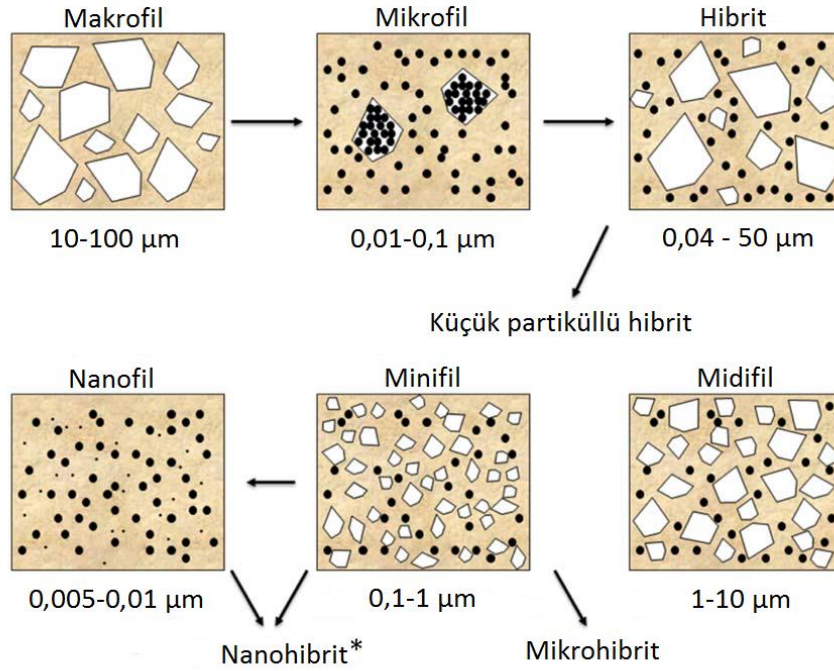
- **Hibrit kompozitler**

Hibrit kompozitler, çeşitli büyüklükteki doldurucu partiküllerin karışımını içeren kompozitlere denir. Günümüzde kullanılan kompozitlerin büyük çoğunluğu genel olarak hibrit kompozit olarak sınıflandırılır. Bu geniş kategori geleneksel hibrit, mikrohibrit ve nanohibrit kompozitleri içerir (Ferracane, 2011). Hibrit ismi, submikron inorganik partiküller (0,04-0,2 µm) ile küçük partiküller (1-4 µm) içeren rezin kompozitlerin karışımını ifade eder. Çeşitli büyüklükte doldurucu partiküllerin bileşimi materyalin aşınma ve kırılma direnci ve cilalanabilme özelliğini artırır ve materyalin hem anterior hem de posterior bölgede kullanımını mümkün kılar (Puckett ve ark., 2007).

Mikrohibrit kompozitler cilalanabilir ve dayanıklı olması nedeniyle ön ve arka dişlerin restorasyonunda kullanılabilir ve “universal kompozit” olarak kabul edilir (Ferracane, 2011).

Son yıllarda mikrohibrit kompozitlerin yapısına nano boyutta doldurucu partikül ve polimerize edilmiş rezin doldurucuların eklenmesiyle oluşturulan, hem arka hem ön diş grubu dişlerin restorasyonunda kullanılabilen (universal) nanohibrit kompozitler geliştirilmiştir (Ferracane, 2011). Bu tip kompozitler mikrofil kompozitler gibi iyi cilalanabilmenin yanı sıra, hibrit kompozitler gibi çiğneme kuvvetlerine karşı dayanıklılık gösterir. Estetik özelliklerinin yanında iyi fiziksel özelliklere sahiptir ve bu sayede universal olarak uygulanabilir. Mikrohibrit ve nanohibrit kompozitlerin özellikleri birbirine benzer olup mikrofil kompozitlere göre mekanik olarak üstündürler (Ilie ve Hickel, 2009).

Doldurucu partikül modifikasyonuna göre kompozitlerin kronolojik gelişimi Ferracane (2011) tarafından özetlenmiştir (Şekil 2).



\* Polimerize edilmiş rezin doldurucu içerebilir.

**Şekil 2.** Doldurucu partikül modifikasyonuna göre kompozitlerin kronolojik gelişimi (Ferracane, 2011)

#### 4.2.2.2. Viskozitelerine göre kompozitler

Doldurucu partikül boyutu, dağılımı, morfolojisi ve monomer teknolojisindeki ilerlemeler, özel uygulama alanlarına sahip kompozitlerin geliştirilmesine neden olmuştur:

- **Akışkan kompozitler**

Akışkan kompozitler ilk olarak 1995 yılında hizmete sunulan, doldurucu oranının azaltılması ile elde edilen düşük viskoziteli kompozitlerdir. Akışkanlığı arttırmak ve kavite duvarlarına daha iyi adapte olabilmesi için genellikle daha az miktarda ve küçük boyutta inorganik doldurucu içerirler (Wakefield ve Kofford, 2001; Dayangaç, 2011). Ancak büyük ölçüde doldurucu kısmın azaltılması mekanik ve büzülme özelliklerini kötü etkileyeceğinden, yüzey hazırlayıcı gibi modifiye edici ajanlar eklenerek akışkanlığı kontrol edilir. Özel şırınga sistemi ile kaviteye uygulanması kolay ve akışkanlığı sayesinde kaviteye adaptasyonu iyidir (Bayne ve ark., 1998).

Materyalin akışkan yapısından dolayı kavite preparasyonunun tabanındaki ve duvarlarındaki mikrodefektlerin kapatılması, küçük kavite ve sınıf V kavite restorasyonu, fissürlerin örtülmesi, kompozit dolguların tamiri gibi çeşitli kullanım alanları vardır. Derin kavite restorasyonlarında kompozitlerin altında stres kırıcı materyal / kaide materyali olarak kullanımları mümkündür. Bu amaçla kullanıldığında, elastik bir tabaka olarak davranıp oluşan stresi absorbe eder (Cadenaro ve ark., 2009). Aynı zamanda, üzerine uygulanacak kompozit dolgu materyalinin miktarı azaltılmış olduğundan, polimerizasyon büzülme oranı da azaltılmış olur. (Labella ve ark., 1999; Stein ve ark., 2005). Sınıf II restorasyonlarda nanofil veya kondanse olabilen kompozitlerle birlikte kullanıldıklarında, akışkan kompozitlerin mikrosızıntıyı azalttığı gösterilmiştir (Sadeghi ve Lynch, 2009).

Ancak doldurucu oranının az olmasından dolayı akışkan kompozitlerin aşınma direnci düşüktür; bu nedenle oklüzal kuvvetlere birebir maruz kalan bölgelerde kullanılmamalıdır. Ayrıca yüksek polimerizasyon büzülmesi nedeniyle ince tabakalar halinde uygulanmalıdır (Bayne ve ark., 1998).

Bir başka sınıflamaya göre ise kompozitler üç gruba ayrılarak düşük viskoziteye sahip akışkan kompozitler ‘‘light-body kompozitler’’ olarak adlandırılırken, ön ve arka grup dişlerde kullanılabilen mikrofil, hibrit ve mikrohibrit olanlar ‘‘medium-body kompozitler’’, kondanse edilebilir kompozitler ise ‘‘heavy-body kompozitler’’ olarak gruplandırılmaktadır (Jackson ve Morgan, 2000).

- **Kondanse olabilen kompozitler**

Kondanse olabilen kompozitler, amalgam ve altın alaşımlarına alternatif olarak estetik restoratif materyallerin arka dişlerde de uygulanması amacı ile piyasaya sürülmüştür. Aşırı basınç altındaki arka diş restorasyonlarında amalgama benzer şekilde kondanse edilebilir özelliktedir. Bu kompozitler hibrit kompozitlere oranla daha çok doldurucu içerirler ve doldurucu dağılımları da farklıdır (Jackson ve Morgan, 2000; Manhart ve ark., 2000; Loguercio ve ark., 2001). Viskozite artışı partikül sayısındaki artıştan çok, partiküllerin şekil, boyut ve dağılımında yapılan değişiklikler ve fiberlerin eklenmesiyle sağlanır (Choi ve ark., 2000). Hibrit kompozitlerden daha kolay proksimal kontak oluşturulabileceği düşünülür (Ferracane, 2011).

Ancak hibrit kompozitlere göre büyük doldurucu partikül içermesinden dolayı bitirme ve cilalama işlemlerinden sonra yüzeyin pürüzlü kalma riski vardır (Jackson ve Morgan, 2000). Yüksek viskozitelerinden dolayı küçük okluzal kavitelere uygulanmaları zordur ve kavite duvarlarında ve kompozit tabakaları arasında boşluklar oluşabilir. Dolayısıyla derin kavitelere tabakalama tekniğinin uygulanması zor olmaktadır. Kavite duvarlarına adaptasyonu arttırmak için akışkan kompozit rezinlerle kullanılmaları önerilir (Roeters ve ark., 2005).

Tabakalama tekniği, ışıkla polimerize olan kompozitlerin sınırlı kalınlıkta kaviteye uygulanarak polimerize edilme tekniği olup altın standart olarak kabul edilir. Kompozitin maksimum uygulama kalınlığı 2 mm olarak tanımlanır (Sakaguchi ve ark., 1992; Pilo ve ark., 1999) Ancak, derin kavitelere tabakalama tekniği ile restorasyonun tamamlanması, zaman alıcı olmakta ve tabakalar arasında hava boşlukları kalmasına sebep olabilmektedir. Bu sebeple arka diş restorasyonunda zaman kazandırıcı restoratif materyal arayışı içine girilmiş ve son dönemde kaviteye kütleli yerleştirilebilen ‘‘bulk fill’’ kompozitler piyasaya sürülmüştür (Flury ve ark., 2012).

- **Bulk Fill kompozitler**

Bulk fill kompozitler, 4 mm kalınlığa kadar tek seferde kaviteye uygulanma özelliğine sahiptir. İçeriğe eklenen polimerizasyon sağlayıcı özel ajanlar sayesinde polimerizasyon aşamasında minimum polimerizasyon büzülme özelliği gösterir (Flury ve ark., 2012). Kütleli yerleştirilebilme özelliği sayesinde dolgu yapımı sırasında zorluk yaşanan posterior alanlarda kullanım kolaylığı sunar (Rodriguez-Lozano ve ark., 2013).

Piyasaya ilk sürülen bulk fill kompozitler, kaviteye uygulandıktan sonra en üst tabakaya geleneksel bir kompozit uygulamasını gerektirirken, son dönemde piyasaya sürülen bulk-fill kompozitler için böyle bir işleme gerek kalmamakta ve dolayısıyla bu da kullanımlarını daha pratik hale getirmektedir (Ilie ve Draenert, 2013). Bu kompozitlerin bir kısmı düşük viskoziteye, bir kısmı da yüksek viskoziteye sahiptir. Yüksek viskoziteye sahip olan bulk fill kompozitlerin, düşük viskoziteli olanlara göre daha iyi mekanik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Bucuta ve Ilie, 2014).

Geleneksel kompozitlerle genellikle aynı monomer yapıya ve polimerizasyon başlatıcı sistemlere sahip olan bulk fill kompozitlerin bazı çeşitlerinde, bunlara ek olarak farklı polimerizasyon başlatıcılar da kullanılmaktadır. Polimerizasyon derinliği genellikle kompozitin translusentliği artırılarak sağlanır (Lee, 2008).

#### **4.2.3. Kompozit dolgu materyallerinde son gelişmeler**

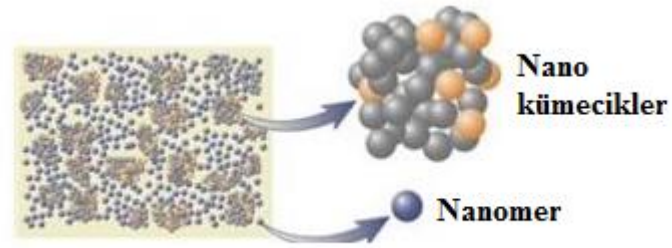
Kompozitin keşfedilmesi, Restoratif Diş Hekimliği'nde önemli bir adımdır ve yapısı elli yıldan bu yana büyük gelişme göstermiştir. Ancak polimerizasyon büzülmesi, sekonder çürük oluşumunun nedeni olarak gösterilen dolgu ile diş arasındaki bağlantının zamanla bozulması, artık monomerlerin salınımı sonucu sitotoksik etkilerin görülmesi gibi bazı istenmeyen özellikleri nedeniyle araştırmacılar yeni arayışlar içindedir (Jandt ve Sigusch, 2009). Kompozitlerde meydana gelen gelişmeler, genel olarak doldurucu partikül ve organik matriks teknolojisindeki gelişmeleri içerir.

##### **4.2.3.1. Doldurucu partikül alanındaki gelişmeler**

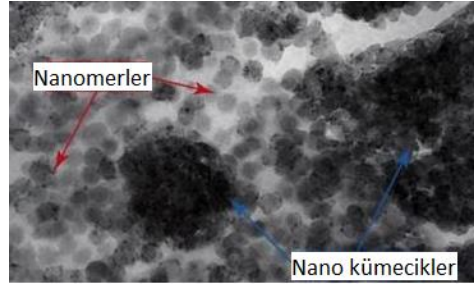
Günümüzde nanoteknoloji sayesinde, doldurucu partikül büyüklüklerinin giderek küçültülmesi ve daha üniform yapıda oluşturulması ile fiziksel özellikleri, kaviteye uygulanımı ve cilalanabilirliği daha iyi olan nanohibrit ve nano kompozitler üretilmektedir (Hickel ve ark., 1998). “Nano” kelimesi Yunanca kökenli olup, nanometre (nm),  $10^{-9}$  metreyi veya  $10^{-3}$  mikrometreyi ( $\mu\text{m}$ ) ifade eden bir ölçü birimidir. Nanoteknoloji farklı kimyasal ve mekanik yollarla 0,1-100 nm boyutundaki çeşitli materyal ve fonksiyonel yapıların üretilmesi ve kullanılması olarak bilinir (Ferracane, 1995).

Nanoteknoloji sayesinde inorganik doldurucu kısmı nanomer ve nano kümeciklerden (nanocluster) oluşan nano doldurucu kompozitler geliştirilmiştir (Chen, 2010) (Şekil 3, 4). Nanomer yapısı 5 nm'den 75 nm'ye kadar olan bir aralıktaki partikülleri ifade eder. Nano kümecikler ise küçük nanomerlerin gevşek bağlar ile meydana getirdiği yapılardır. Silika veya zirkonyum partiküllerini içerirler. Organik matriksin içine, nanomer ve nano kümecikler birlikte katılarak, ağırlıkça % 72-87 oranında doldurucu içeren kompozit yapısı meydana getirilir. Nano doldurucuların

geleneksel mikro dolduruculara göre daha küçük olmaları, organik yapı ile temas eden yüzey alanının artmasını ve inorganik faz-organik faz bağlantısının daha kuvvetli olmasını sağlar (Mitra ve ark., 2003; Ure ve Harris, 2003). Doldurucu oranının artması ile organik matris fazı azalmış ve bu sayede kompozitin polimerizasyon büzülme oranı da azaltılmış olur. Ayrıca iyi estetik ve optik özellikler göstermesi nedeniyle ön bölge restorasyonlarında rahatlıkla kullanılır (Mitra ve ark., 2003; Chen, 2010).



**Şekil 3.** Şemate edilmiş nanomer ve nano kümecek yapı (Sakaguchi ve ark., 2012a)



**Şekil 4.** Nanomer ve nano kümecek içeren nano kompozit yapısının geçirimli elektron mikroskop (Transmission electron microscope) görüntüsü (Sakaguchi ve ark., 2012a)

Son dönemde kompozit yapısına polimer nanofiberler, cam fiberler ve titanyum nanopartiküllerinin eklenmesi üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur (Chen, 2010). Antibakteriyel özellik için kompozit içerisine florid (Xu ve ark., 2010b), klorheksidin (Leung ve ark., 2005) gibi maddeler eklenmiştir. Doldurucu yapısına kalsiyum florid eklenen kompozitlerin yüksek oranda flor salınımı gerçekleştirdiği ve mekanik özelliklerinin yeterli olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark., 2010a). Belki de en umut verici deneysel çalışmalardan biri, kompozit yapısına dikalsiyum veya tetrakalsiyum fosfat

nanopartiküllerinin eklenerek mekanik özelliklerin iyileştirilmesinin yanı sıra, kalsiyum ve fosfat salınımı sayesinde remineralize edici özelliğin sağlanabilmesi olmuştur (Xu ve ark., 2006).

#### **4.2.3.2. Organik matriks alanındaki gelişmeler**

Doldurucu partikül alanındaki yeniliklerin yanı sıra, kompozitlerdeki polimerizasyon büzülmesinin azaltılmasına yönelik olarak, kompozit formülasyonunda yeni monomerler ve kendiliğinden dış yapısına adezyon sağlayan (self-adeziv) kompozitlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar mevcuttur (Ferracane, 2011).

Polimerizasyon büzülmesinin azaltılması amacıyla epoksi bazlı siloran dolgu materyali geliştirilmiştir. İyi mekanik özelliklerinin olduğu bildirilmiş (Ilie ve Hickel, 2009), ancak marjinal bütünlük özelliği nanohibrit kompozite kıyasla başarısız bulunmuştur (Schmidt ve ark., 2011). Aynı amaçla, yüksek moleküler ağırlığa sahip monomerlerin üretilmesi denenmiştir. Modifiye üretan dimetakrilat monomeri (DX511), üretan monomer TCD-DI-HEA (Marchesi ve ark., 2010), dimer asit monomeri (Lu ve ark., 2010) bu monomerlere örnek olarak sayılabilir.

Son dönemde, adeziv monomer içerikli akışkan kompozitler de geliştirilmiştir. Bu kompozitlerin yapısında, geleneksel metakrilat monomer sistemine ek olarak, dental adeziv ajanlarda yer alan asidik monomerler bulunur. Küçük kavitelelerin restorasyonunda ve derin kavitelelerde kaide materyali olarak kullanımı önerilir (Ferracane, 2011).

Gelecekte de nanoteknoloji sayesinde çeşitli biyomateryallerin geliştirilmesiyle birlikte kompozitlerin yapısında farklı yenilikler beklenmektedir. Bu sayede yeni dönem kompozitlerin antimikrobiyal etkili, dış etkenlere karşı kendi kendini onarıcı ve dental sert doku rejenerasyonu sağlayıcı gibi özellikler taşıması beklenmektedir (Jandt ve Sigusch, 2009; Ferracane, 2011).

#### 4.2.4. Kompozit dolgu materyallerinin polimerizasyonu

Polimer yapısı, monomer adı verilen çok sayıda küçük molekülün kimyasal bağlarla bir araya gelerek oluşturduğu uzun zincirli moleküllerdir. Polimerizasyon monomerlerin polimerlere dönüşmesi olayına denir. Diş hekimliğinde kullanılan monomerler genellikle sıvı formdadır ve polimerizasyon sürecinde sertleşerek katı forma dönüşür (McCabe ve Walls, 2000; Sakaguchi ve ark., 2012b).

Polimerizasyon yöntemlerine göre kompozitler:

- Kimyasal olarak polimerize olan (otopolimerizan) kompozitler,
- Işık ile polimerize olan (fotopolimerizan) kompozitler (mor ötesi ışık, görünür ışık, lazer ışığı),
- Hem kimyasal hem de ışık ile polimerize olan (dual cure) kompozitler olarak sınıflandırılır (McCabe ve Walls, 2000; Dayangaç, 2011).

Görünür mavi ışıkla polimerizasyon, 1970'li yıllarda geliştirilmiş ve günümüzde kullanılan en yaygın polimerizasyon yöntemidir (Çelik ve Özel, 2008). Işık kaynağının rezin içeriğindeki başlatıcı molekülleri aktive etmesi ile serbest radikaller oluşur ve polimerizasyon başlar. Başlatıcı moleküllerin ışık kaynağı ile aktive edilebilmesi için ışığın ve moleküllerin birbirlerine uygun dalga boylarında olmaları gerekir. Aksi takdirde rezin materyalin polimerizasyonu yetersiz kalır (McCabe ve Walls, 2000; van Noort, 2013). Günümüzde kompozit rezinlerin polimerizasyonunda kullanılan ışık kaynakları kuartz tungsten halojen, "light emitting diode" (LED), plazma ark ve lazer ışık kaynaklarıdır (Powers, 2002; Bektaş ve ark., 2006; Çelik ve Özel, 2008).

Polimerizasyon için görünür mavi ışığın 450-500 nm dalga boyunda veya gücünün en az 300 mW/cm<sup>2</sup> olması gerekir. Polimerizasyon başlatıcı olarak en çok kamforokinon kullanılır (Stansbury, 2000). Bu kompozitlerde 450-500 nm dalga boyundaki ışığı absorbe eden kamforokinon harekete geçer, aktivatör olarak ilave edilen amin ile reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturur ve bu sayede polimerizasyon başlamış olur. Ortaya çıkan serbest radikallerin monomer molekülleri ile etkileşime girmesi sonucu polimerizasyon ilerler ve reaksiyona girmemiş

monomerlerin de yapıya eklenmesiyle polimer zinciri büyür. Ortamdaki serbest radikaller veya monomerlerin azalmasıyla da reaksiyon sonlanır (Sakaguchi ve ark., 1992; Sakaguchi ve ark., 2012b).

Işık ile sertleşen kompozitlerin dezavantajı polimerizasyonun her bölgede aynı oranda olamamasıdır; yüzeye yakın bölgelerde derin bölgelere göre daha iyi polimerizasyon gerçekleşir (Cook ve ark., 1984). Bu nedenle kavite derinliğinin 2 mm'yi aştığı durumlarda kompozitin tabakalama tekniği ile uygulanması gereklidir. Bu teknikte kaviteye en fazla 2'şer mm kalınlığında kompozit yerleştirilerek polimerizasyon sağlanır. Böylece her tabakaya ışığın eşit derecede etki etmesi ile polimerizasyonun yeteri kadar sağlanması ve polimerizasyon büzülmesinin azaltılması amaçlanır (Liebenberg, 1996).

### **Polimerizasyon derecesi**

Polimerizasyon boyunca monomerlerin polimere dönüşüm oranına verilen addır ve karbon çift bağlarının tek bağlara dönüşme miktarının yüzde cinsinden ifadesidir (Ferracane, 2001).

Kompozitin içerisindeki bileşenler (monomer yapısı, başlatıcılar vb.) monomerlerin polimere dönüşüm oranını etkiler (Finer, 2012). Ayrıca kullanılan ışığın dalga boyu, yoğunluğu ve uygulama şekli, uygulama süresi, ortam ısısı ve ortamda oksijenin varlığı gibi birtakım faktörler de bu oranın etkilenmesine sebep olur (Stansbury, 2000; Kömürcüoğlu ve ark., 2005).

Ortamdaki oksijen varlığının polimerizasyonu inhibe etme özelliği vardır. Serbest radikaller oksijenle reaksiyona girmeye daha eğilimli olduğundan, kompozitin oksijenle temas eden en üst yüzeyinde polimerizasyon tam olarak gerçekleşemez. Bu nedenle restorasyonun en üst tabakasına "oksijen inhibisyon tabakası" denir ve mutlaka uzaklaştırılması gerekir (Bowen ve Marjenhoff, 1992; Ferracane, 1994). Aksi takdirde polimerize olmamış monomer ve dış etkenler sonucu materyalde oluşan bozunma ürünleri ortama salınır.

#### 4.2.5. Reaksiyona girmemiş artık monomer salınımı

Reaksiyona girmeyerek polimere dönüşmeden kalan monomerler, artık monomer olarak adlandırılır ve materyal yapısında bozukluğa yol açarak restorasyonda başarısızlıklara sebep olur (Nalçacı ve Ulusoy, 2005; Frankenberger ve ark., 2013).

İdeal bir polimerizasyonda tüm monomerlerin reaksiyona girerek polimer zincirinde yer alması gerekir. Ancak polimerizasyon sırasında moleküllerin polimer zincire katılmasıyla viskozite artar ve monomerlerin polimerlere dönüşümü yavaşlar. Bu durumun, miktarı giderek azalan polimerize olmamış monomerlerin hareketinin yavaşlamasına ve dolayısıyla polimerizasyon alanına geçişinin azalmış olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak bir miktar monomer, reaksiyona katılamayıp artık monomer olarak kalabilmektedir (Tuna ve Gençay, 2006). Işıklı polimerize olan sistemlerde reaksiyona giren monomer çift bağlarının yüzdesi %55-80 olarak bildirilmiştir (Ferracane 1994, Peutzfeldt 1997, Kömürcüoğlu 2005, Tuna ve Gençay 2006).

Rezin esaslı kompozitlerden reaksiyona girmeyerek bulunduğu ortama salınım gösteren TEGDMA, Bis-GMA, UDMA gibi monomerlerin miktarları yüksek performanslı sıvı kromatograf (HPLC), gaz-sıvı kromatograf ve gaz kromatograf/mass spektrometre cihazları ile ölçülebilir. Bunlardan HPLC cihazı yaygın olarak kullanılmaktadır (Michelsen ve ark., 2003).

Meydana gelen artık monomer salınımı, difüzyon prensibine dayanır; kompozitin yapısına ve ortama bağlıdır (Oilo, 1992; Ferracane, 1994; Moharamzadeh ve ark., 2007b). Polimerizasyondan hemen sonra artık monomer salınımının en yüksek seviyede olduğu ve bir hafta sonrasında ise belirgin düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Muller ve ark., 1997). Yapılan *in vivo* bir çalışmada kompozit dolgu materyalinin uygulanmasından önce ve uygulanmasından 10 dakika, 24 saat ve 7 gün sonra tükürük örnekleri alınarak monomer salınımları değerlendirilmiştir. 10. dakikada Bis-GMA, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), UDMA, TEGDMA monomerleri ve 24. saatte sadece HEMA monomerinin varlığı saptanırken, Bis-EMA monomerine hiçbir örnekte rastlanmamıştır (Michelsen ve ark., 2012).

Ortama bağılı artık monomer salınımının değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, su içerisinde 3 saat boyunca bekletilen kompozit örneklerinden % 50 oranında salınım gerçekleştiği, etanolün eklenmesiyle salınım oranının % 75'e yükseldiği; ilk 24 saat içinde salınımın gerçekleştiği ve salınım hızının ortama göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Ferracane ve Condon, 1990). Yirmi dört saatte salınımın tamamlanması, artık monomer salınımının sürekli bir olay olmadığını göstermekle birlikte, yapılan deneylerin *in vitro* olması nedeniyle ağız ortamının tam olarak yansıtılamamakta olduğu da bildirilmiştir (sürekli mekanik aşınma, ortamın sürekli değişmesi vb.) (Finer, 2012).

Polimerizasyondan hemen sonra artık monomer salınımının gerçekleşmesinin yanı sıra, uzun vadede, polimerize olmuş kompozitin yüzey yapısının erozyon ve tükürüğün etkisiyle hidrolitik bozunması sonucu bazı bileşenlerin de ortama salındığı bilinmektedir (Gopferich, 1996). Uzun vadede gerçekleşen bu bozunma, insan tükürüğünde bulunan esteraz gibi enzimlerin etkisiyle olmakta ve yapılan çalışmalarda bozunma derecesi genellikle mikrosertlik ölçümleri ile ilişkilendirilmektedir (Santerre ve ark., 1999; Shokati ve ark., 2010). Literatürde, insan tkrğnden elde edilmiş esteraz enzimleriyle inkübe edilen Bis-GMA/TEGDMA monomer yapısına sahip kompozitin kütlesinde kontrol grubuna göre belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır (Finer ve Santerre, 2004). Bis-GMA yapısı, TEGDMA ve UDMA'ya kıyasla hidrolitik bozunmaya karşı dayanıklı bulunmuştur (Munksgaard ve Freund, 1990). Farklı bir çalışmada ise esterazların etkisi ile ortama Bis-GMA ve UDMA monomeri salındığı belirtilmiştir (Al-Hiyasat ve ark., 2005).

Kompozit uygulamalarında ortama salınan artık monomer miktarını tamamen yok etmek olanaksız olduğundan salınan monomer miktarını minimale indirmek için kompozit dolgu materyallerinin en ideal şekilde, tekniğine uygun, dikkatli ve hassas bir şekilde uygulanması gereklidir (Gl ve Akgl, 2013).

Artık monomerler, kompozit materyalinin mekanik yapısını bozmakla birlikte biyolojik özelliklerini de olumsuz yönde etkiler (Nalçacı ve Ulusoy 2003). Yapılan çalışmalarla, bu monomerlerin toksik olduğu çeşitli testler ile gösterilmiş; sitotoksik, genotoksik, mutajenik / östrojenik etkilerinin ve pulpal enflamasyon oluşturma potansiyellerinin olduğu belirtilmiştir (Geurtsen ve ark., 1998; Schmalz, 1998;

Geurtsen, 2000; Schweikl ve ark., 2006). Bu nedenle bu materyallerin biyouyumluluk açısından sorgulanması gerektiği bildirilmektedir (Schmalz 1998; Geurtsen 2000).

### **4.3. Kompozit Dolgu Materyallerinin Biyouyumluluğu**

Diş dokusunun restorasyonunda kullanılan dental materyallerin sahip olması gereken özellikler açısından birçok faktör göz önüne alınmalıdır. Fonksiyonel, estetik ve biyolojik özellikler ana faktörler olarak sıralanabilir (Ilie ve Hickel, 2011). Bu materyallerin fiziksel ve mekanik özellikleri diş yapılarına benzer olmalı, çiğneme kuvvetlerine dayanabilmeli, doğal diş görünümünde olmalı, dişin form ve fonksiyonunu geri kazandırabilmelidir (Vaderhobli, 2011). İyi bir renk uyumu, optimum cilalanabilirlik, marjinal veya yüzey renkleşmesinin olmaması ve uzun dönemde iyi anatomik formun korunması gibi estetik gereklilikleri de karşılamalıdır. Ayrıca, biyouyumlu olması (sistemik ve lokal), postoperatif ağrı ve hassasiyetin olmaması, çatlak ve kırıkları önleyerek diş yapısını koruması ve çürük önleyici özelliğinin olması gibi biyolojik özelliklere de sahip olmalıdır (Ilie ve Hickel, 2011; Vaderhobli, 2011).

Uygun restoratif materyalin seçimi ve kabul edilebilirliği sadece onların fiziksel ve kimyasal üstünlüklerine göre olmayıp, aynı zamanda biyouyumluluklarına bağlıdır. Biyouyumluluk, bir materyalin spesifik bir uygulamada vücudun lokal veya sistemik toksisite, alerji, mutajenik ve karsinojenik etki gibi doku reaksiyonları oluşturmaması veya kabul edilebilir doku cevabı sağlaması olarak tanımlanır (Nicholson ve Croll, 1997; Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009). Biyouyumluluğu, materyalin korozyona uğraması veya çözünürlüğü sonucu materyalden salınan maddeler belirler. Bu maddeler hücrelere zarar verebilmekte veya enflamasyona neden olabilmektedir. (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009).

Biyomateryal, insan vücuduna yerleştirilerek biyolojik sistemle ilişkide olan materyallere verilen isimdir. Dental materyaller ağız boşluğuna yerleştirildikleri için bu gruba dahil edilir. Bu nedenle bazı yasal düzenlemelere tabi tutulması, günlük diş hekimliği pratiğini etkiler. Özel sertifikasyon uygulamalarından başarıyla geçen dental materyaller kullanıma sunulur (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009). Özellikle nanoteknoloji, bilişim teknolojileri ve fabrikasyon yöntemlerindeki gelişmelere

paralel olarak günümüzde daha uyumlu biyomateryallerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (Wataha, 2001).

Biyouyumlu olmayan materyaller ise insan sağlığı üzerine bazı etkilere sahiptir. Bu etkiler, sistemik ve lokal toksisite, alerji, diğer etkiler (mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler) olarak sıralanabilir (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009).

Bir materyalin biyoyumlu olup olmadığı sitotoksosite, genotoksosite, mutojenite gibi çeşitli testler ile belirlenir. Ağız ortamında kullanılacak restoratif materyallerin biyoyumlu olup sistemik ve lokal toksik etki oluşturmaması, pulpa ve periodontal ligament (PDL) gibi çevre dokulara zarar vermemesi önemlidir (Moharamzadeh ve ark., 2009; Tuncer ve Demirci, 2011). Bu nedenle klinik olarak uygulanmadan önce her restoratif materyalin biyoyumluluğunun çeşitli standardize testlerle değerlendirilmesi gereklidir (Schmalz 1998; Geurtsen, 2000).

Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu [Food Drug Administration (FDA)], ağız ortamı ile kısa süreli temasta bulunan ölçü maddesi ya da restoratif materyaller gibi uzun dönem kullanılan materyallerin oluşturabileceği yan etkileri göz önünde bulundurarak, yapılan çeşitli testler sonucunda bu materyaller için kullanım onayı verir (Tuncer ve Demirci, 2011).

#### **4.3.1. Sistemik toksisite**

Toksisite, bir materyalin kimyasal yollarla biyolojik sisteme zarar vermesi olarak tanımlanır (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009).

Sistemik toksisite varlığında, materyalin etkisi uygulandığı bölgeden uzakta görülür. Hemen hemen tüm dental materyallerden ağız boşluğuna çeşitli maddeler salınır. Bu maddeler yutkunma ve solunum yoluyla farklı rotaları takip ederek vücuda girebilir ve kan dolaşımı yoluyla farklı organlara taşınabilir. Eğer maddenin konsantrasyonu fazla ise bulunduğu yerdeki fonksiyonu engelleyebilir ve sistemik toksisite ortaya çıkabilir. Maddenin akut, subakut ve kronik olmak üzere üç farklı sistemik etkisi görülür. Amalgam dışında dental materyallerin kronik temasına bağlı oluşan kronik toksisite ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009).

Sistemik toksik etki alerji, östrojenite, mutojenite ve karsinojenite testleri ile değerlendirilir (Moharamzadeh ve ark., 2009).

Kompozit dolgu materyalleri ile ilgili meydana gelen alerji sorunları kontakt dermatitis şeklinde karşımıza çıkar (Lygre ve ark., 1999). Hasta, diş hekimleri ve yardımcıları arasında alerjik reaksiyon görülme sıklığının % 0,7 ile % 2 arasında olduğu belirtilmiştir. Kompozitin direkt temasta olduğu deri ve mukozada doku reaksiyonu olarak hafif kırmızılık gözlenirken, alerji söz konusu ise ellerde, parmaklarda, ön kolda veya indirekt temas sonucu yüzde, göz kapağında ve boyunda kontakt dermatitis gibi reaksiyonlar ortaya çıkabilir (Ortengren ve ark., 1999; Geurtsen ve Leyhausen, 2001; Goldberg, 2008). Bu nedenle rezin esaslı materyallerdeki potansiyel içeriklere dikkat edilmesi ve bu materyaller ile direkt deri temasından kaçınılması önerilir (Schmalz, 1998).

Kompozitlerin güvenilirliği ile ilgili olarak yapılan çalışmalara bakıldığında bu materyallerin östrojenik etkisi olduğundan bahsedilmektedir. BPA ve Bis-GMA gibi bileşiklerin ksenoöstrojenler içerebildiği; ksenoöstrojenlerin ise, yapısal olarak östrojene benzemeseler de bu doğal steroid hormonunun etkilerini taklit edebilme yeteneklerinin olduğu ve dolayısıyla karsinojenik potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir (Soderholm ve Mariotti, 1999; Wada ve ark., 2004; Sasaki ve ark., 2005; Azarpazhooch ve Main, 2008). BPA, Bis-GMA ve bisfenol-A dimetakrilat (Bis-DMA)'nın hücre kültürü sistemlerinde östrojenik davranışının incelendiği çalışmalarda BPA ve Bis-DMA'nın östrojenik etkilere sebep olduğu, Bis-GMA'nın ise böyle bir etki göstermediği tespit edilmiştir (Fung ve ark., 2000). Araştırmalarda Bis-DMA'nın enzimler tarafından BPA'ya parçalandığı ve bu enzimlerin de tükürükte mevcut olduğu belirtilmiştir (Schmalz ve ark., 1999).

Bununla ilgili olarak Olea ve ark. (1996), çalışmalarında çocuklara fissür örtücü uygulamışlar; tedaviden önce ve tedaviden 1 saat sonra tükürük örneklerini almışlardır. Tedavi sonrası alınan örneklerde BPA bulunduğunu tespit ederek Bis-GMA bazlı kompozitlerin diş hekimliğinde kullanımının ve özellikle çocuklarda yapılan fissür örtücü uygulamalarının östrojenik etkilere sebep olabileceğini belirtmişlerdir.

Fung ve ark. (2000) ise, aynı fissür örtücü materyalini çalışmalarında kullanarak uygulamadan sonra belirli aralıklarla tükürük ve kan örneklerini toplamışlardır. Sonuçta tükürük örneklerinde BPA'nın sadece 1 ve 3 saatlik örneklerde tespit edildiğini, 24 saatlik tükürük örneğinde ve tüm aralıklarda alınan kan örneklerinde ise tespit edilemediğini saptamışlardır. Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak, BPA'nın ağız ortamına salınsa da absorbe edilmediği, sistemik dolaşımında belirlenemeyecek kadar küçük oranda bulunabileceği ve potansiyel bir östrojenik etkisinin olmayacağı sonucunu çıkarmışlardır.

Mutojenite ve karsinojenite değerlendirmeleri, sistemik uyumluluğun değerlendirilmesinde kullanılan diğer parametrelerdendir. Genetik hasarın gelecek nesillere aktarılması olarak tanımlanan mutajenite hücre çekirdeğini etkileyen ve genellikle DNA üzerinde mutasyon gibi kalıcı nitelikte değişiklikler oluşturan durumdur (Schweikl ve ark., 2007; Schmalz, 2009). Karsinojenite, *in vivo* olarak kanser oluşturma yeteneğidir. Mutajenite aynı zamanda materyallerin olası karsinojenik etkisinin belirteci olarak kabul edilir. Genler üzerinde toksik etkisi olan maddeler ise genotoksik olarak tanımlanır (Schmalz, 1998). Yapılan *in vitro* değerlendirmeler sonucunda, kompozit yapısındaki bileşenlerin mutajenik etki gösterdiği ve DNA genomunda değişimlere (genotoksisite) neden olabileceği bildirilmiştir (Schweikl ve ark., 2005b; Schweikl ve ark., 2006).

Sistemik toksisite testlerinin sonucunda, kompozitlerin söz konusu östrojenik ve diğer etkilerinin hastanın genel sağlığını tehdit edecek düzeyde olmadığı, bunun da ortaya çıkan dozların çok düşük miktarda olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 1998; Cao ve ark., 2009).

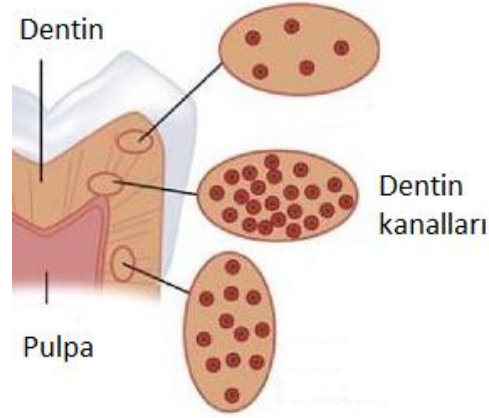
#### **4.3.2. Lokal toksisite**

Lokal toksisite varlığında ise materyalin etkisi uygulandığı bölgede ortaya çıkar (Schmalz, 2009).

Diş hekimliğinde lokal toksik etki, dişe uygulanan kompozit ile komşu olan ağız mukozası, diş eti ve pulpa dokularında görülür. Dolgu materyallerinin biyouyumluluğu açısından en büyük endişe verici durum organik rezinlerden ortama artık monomer, reaksiyon başlatıcılar gibi komponentlerin veya inorganik doldurucudan metal iyonları gibi sitotoksik maddelerin salınmasıdır (Rodriguez-Lozano ve ark., 2013). Polimerizasyon sırasında ve sonrasında ortaya çıkan artık monomerlerin hücresel ve moleküler sitotoksitenin asıl kaynağı olduğu (Franz ve ark., 2009), bunun da pulpa canlılığını etkilediği ve periodontal alanı da etkileyerek diş etinde çekilmeye sebep olduğu bildirilmiştir (Darmani ve ark., 2007; Bakopoulou ve ark., 2011b).

Pulpadaki toksik etki, kompozit materyalinden salınan komponentlerin dentinden difüzyon yolu ile pulpaya ulaşması ile ortaya çıkar (Moharamzadeh ve ark., 2009). Bu komponentlerin dentine difüze olarak pulpada bakteriyel enfeksiyon olmaksızın reaksiyona yol açtığı, sitotoksik olan materyallerin kısa veya uzun dönemli doku enflamasyonu veya hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmiştir (Gerzina ve Hume, 1994; Geurtsen, 2000; Munksgaard ve ark., 2000).

Pulpanın restoratif materyallerin olası toksik etkilerine maruz kalması, derin kavitelerde kalan dentin tabakasının miktarıyla yakından ilişkilidir. Dentin kalınlığı azaldıkça dentin yüzeyindeki kanalların çapları ve sayısı artar. En dış kısımda dentin yüzeyinin ancak % 5'i dentin kanallarından oluşurken, daha derin kısımda dentin yüzeyinin % 20-50'si dentin kanallarından oluşur (Şekil 5). Bu durum daha fazla dentin geçirgenliğine neden olarak toksik etkilerin artışına yol açar (Stockton, 1999; Murray ve ark., 2002). Ayrıca kompozit pulpayla direkt temasta olacak şekilde yerleştirildiğinde pulpa nekrozu görülme olasılığı vardır. Bu nedenle kompozitin pulpayla direkt temasta olmaması ve 0,5 mm veya daha az dentin kalınlığı varlığında biyouyumlu materyallerin kullanımı tavsiye edilmektedir (Murray ve ark., 2002).



**Şekil 5.** Dentin derinliğine göre dentin kanal sayısının değişimi (Sakaguchi ve ark., 2012b)

Yapılan çalışmalarda, özellikle dentin bariyerinin ince olduğu durumlarda TEGDMA gibi hidrofilik monomerlerin dentinden difüze olduğu gösterilmiştir (Hamid ve Hume, 1997a; Bouillaguet ve ark., 1998). Difüze olan monomer miktarlarının pulpa hücrelerinde toksik etki oluşturabilecek düzeyde olduğu vurgulanmıştır (Bouillaguet ve ark., 1998).

Bu düşüncenin aksine toksik etkinin asıl kaynağının bakteriyel sızıntı olduğu, derin kavitelere direkt olarak adeziv sistemlerin ve sonrasında restoratif materyallerin uygulanabileceği de savunulmaktadır. *İn vitro* ortamda adeziv sistemlerin dentin bariyeri kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada, hedef hücreye ulaşan toksik madde miktarının azaldığı belirtilmiştir (Hanks ve ark., 1992).

Rezin esaslı materyallerin ve komponentlerinin *in vitro* biyouyumluluk değerlendirmeleri için yapılan çeşitli hücre kültürü çalışmaları mevcuttur (Darmani ve ark., 2007; Bakopoulou ve ark., 2011b; Galler ve ark., 2011; Rodriguez-Lozano ve ark., 2013). Sitotoksikite çalışmalarının bir kısmı organik rezin yapısında bulunan saf monomerlerin etkilerini incelerken (Bakopoulou ve ark., 2011b; Galler ve ark., 2011), bazıları da materyalin direkt etkisine bakmışlardır (Huang ve Chang, 2002; Al-Hiyasat ve ark., 2005; Rodriguez-Lozano ve ark., 2013).

Schweickl ve ark. (2005a), kompozitlerden salınan monomerlerin sitotoksik etkilerinin yanında, TEGDMA'nın hücre bölünmesini baskılayarak pulpa, diş eti ve ağız mukozası dokularında yara iyileşmesini etkileyebileceğini ifade etmiştir. TEGDMA'nın hidrofilik ve düşük moleküler ağırlığa sahip olması nedeniyle hücre zarına nüfuz ederek toksik özelliğinin fazla olduğu vurgulanmıştır (Geurtsen ve Leyhausen, 2001). Ayrıca, yapılan ölçüm sonucunda materyallerin toksik etkisinin, sıvıya geçişi kolay olan TEGDMA miktarıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Wataha ve ark., 2003; Al-Hiyasat ve ark., 2005).

Bis-GMA gibi yüksek moleküler ağırlıklı hidrofobik maddelerin ise düşük miktarlarda salındığı ve hücre zarına çok az oranda nüfuz edebildiği bildirilmiştir (Geurtsen ve Leyhausen, 2001). Bunun aksine Bis-GMA'nın yağda çözünbilme özelliğinin daha fazla olduğu ve bu nedenle diğer monomerlere oranla toksisitesinin yüksek olduğunu tespit eden araştırmacılar vardır. Bis-GMA'nın hücre zarında değişikliklere neden olduğu ve daha az konsantrasyonda bile toksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Reichl ve ark., 2006; Moharamzadeh ve ark., 2007a).

Ayrıca, akışkan kompozitlerin geleneksel kompozitlere kıyasla daha toksik olduğunu belirten çalışmalar vardır. Bunun nedeni akışkan kompozitlerin, rezin kısmının fazla olması nedeniyle daha fazla monomer salınımı göstermesine bağlanmaktadır (Schmalz, 1998; Schmalz ve ark., 1998).

#### **4.3.3. Biyouyumluluğun değerlendirilmesi**

Biyouyumluluk testleri, materyallerin vücuttaki dokulara temas ettiğinde meydana gelebilecek reaksiyonları önceden belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. Dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri istenmeyen doku reaksiyonlarının çeşitlilik göstermesi nedeni ile karmaşık ve kapsamlı bir alandır.

Uluslararası Diş Hekimliği Birliği [World Dental Federation (FDI)] ve Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu [International Organization for Standardization (ISO)] tarafından yayınlanan kılavuzda belirtildiği üzere biyouyumluluk testleri öncül, ikincil testler ve kullanım testleri olmak üzere üç grupta sınıflandırılır (Hanks ve ark., 1996; ISO, 1999; ISO, 2008):

### 1- Öncül testler

- a. Letal doz - ağız içi test,
- b. Letal doz - karın içi test
- c. Soluma testi
- d. Hemolizis testi
- e. Ames testi
- f. Styles testi
- g. Dominant letal test,
- h. Sitotoksisite testi.

### 2- İkincil testler

- a. Kemik implantasyon testi,
- b. Oral mukoza membran testi,
- c. Sensitizasyon testi,
- d. Subkutanöz implantasyon testi.

### 3- Kullanım testleri

- a. Restoratif materyaller için pulpa ve dentin testi,
- b. Kuafaj ve pulpatomi materyalleri testi,
- c. Endodontik materyal testi,
- d. Kemik içi implant testi.

Öncül testler yardımıyla malzemeye olan öncül tepkiler belirlendikten sonra malzemenin uzun dönem kullanımı sonrasında oluşacak enflamasyon, immun cevaplar, mutajenik ve karsinojenik gibi subakut toksisite değerlerini yansıtan ikincil testlere geçilir (Ferracane, 1994).

Biyoyumluluk değerlendirmeleri, materyallerin sistemik / lokal toksisitesinin, mutajenik, teratojenik, üreme sistemi üzerine etkilerinin ve allerjik özelliklerinin değerlendirilmesini sağlayan testler, klinik çalışmalar ve hastalar üzerinde uygulanan

tanımlayıcı testler olarak gruplandırılabilir (Schmalz, 2009). Bu gruplandırmaya göre, biyoyoumluluğun değerlendirilmesinde kullanılan test yöntemleri Schmalz (2009) tarafından özetlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Dental materyallerin biyoyoumluluk değerlendirmelerinde kullanılan test yöntemleri (Schmalz, 2009)

	Sistemik Reaksiyonlar	Lokal Reaksiyonlar	Alerjik Reaksiyonlar	Diğer Reaksiyonlar
<i>in vitro</i>	Hücre kültürü testleri spesifik problemler için kullanılabilir.	<u>Hücre kültürü testleri</u> - Agar üstü testler - MTT testi* - Dentin bariyer testi	Hücre kültürü modelleri geliştirilmektedir.	<u>Mutojenite</u> - Ames testi - Mikronükleus testi - HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) test - Fare lenfoma testi
<b>Hayvan Deneyleri</b>	- Akut LD <sub>50</sub> (örn: oral uygulamalar) - Kronik LD <sub>50</sub> (örn: oral uygulamalar)	<u>İmplantasyon testleri</u> <u>Kullanım testleri</u> - Pulpa/dentin testleri - Endodontik testler - İmplantasyon testleri	- Modifikasyonlu maksimizasyon testi - Lokal lenf nodu testi	- Mikronükleus testi (kemirgen) - Teratojenite (kemirgen) - Üreme üzerindeki toksisite (kemirgen)
<b>İnsan</b>	← Klinik çalışmalar →			
<b>Diğer</b>	← Mesleki temas, zehirlenme* →			

\*Gerçek test yöntemi olmayıp değerlendirmeye yardımcı olurlar.

Sistemik toksisitenin değerlendirilmesinde genellikle hayvan deneyleri tercih edilir. Diş hekimliği çalışmalarında materyal veya komponentler genellikle ağız yoluyla hayvana verilerek, deney popülasyonunun % 50'sinin ölümüne yol açan letal doz (LD<sub>50</sub>) değeri belirlenir.

Kronik sistemik etki, materyal veya ekstraktının birkaç ay veya hayvanın yaşamı boyunca uygulanması ile test edilir. Bu çalışmaların sonucunda hayvanların yaşam oranı ve dokuların histolojik değerlendirmesi yapılır (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009).

Dental materyallerin lokal toksik etkileri çeşitli testler yardımı ile saptanabilir (Schmalz, 2009):

- Hücre kültürü testleri,
- İmplantasyon testleri,
- Pulpa hasarı ve pulpa / dentin testleri,
- Mukozal hasar ve mukozal kullanım testleri,
- Periapikal hasar ve endodontik kullanım testleri,
- Kemik içi implant testleri.

En temel ve sıklıkla tercih edilen yöntem hücre kültürü ile uygulanan *in vitro* testlerdir. Hücre kültürü gibi basit test yöntemleri hedef dokuyu tam olarak yansıtamadığı için materyalin spesifik olmayan toksisitesini belirlemeye yardımcı olur. Bu testler sonucunda materyalin başarılı cevap vermesi ile daha karmaşık olan hayvan ve kullanım testleri (*in vivo* testler) uygulanabilir. Klinik çalışmalar bu değerlendirmedeki son basamaktır (Sakaguchi ve ark., 2012a). Bir materyalin biyouyumluluğunun saptanmasında en etkili yolu *in vitro*, hayvan ve kullanım testlerinin kombine uygulanmasıdır.

#### **4.3.3.1. Hücre kültürü çalışmaları**

Hücre kültürü, kendiliğinden göç, mekanik veya enzimatik yöntemlerle dokudan ayrılmış, *in vitro* şartlarda yaşatılan ve üretilen tek tip hücre topluluğudur. Canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretilmesini ve gelişimini ifade eder (ISO, 1999; ISO, 2008). Hücre kültürü çalışmalarında, hayvan veya insanlardan izole edilen dokular kültür ortamında büyütülerek testler için kullanılır (Schmalz, 2009).

Hücre kültürü çalışmaları hızlı, basit ve tekrarlanabilirliği olan çalışmalardır (Wataha, 2001; Cao ve ark., 2005). Hayvan ve kullanım testlerinden daha ekonomiktir. Ancak enflamatuar ve diğer koruyucu mekanizmaların etkisi devre dışı kaldığından test edilen materyalin *in vivo* ortamdaki etkilerini tam olarak yansıtamaz. Bu nedenle tek başına *in vitro* testler, materyalin biyouyumluluğu hakkında bize kesin sonuç veremez (Sakaguchi ve ark., 2012a).

Test edilen materyal ile kullanılan hücre hattının teması açısından direkt kontakt, indirekt kontakt ve ekstrakt (özüt) testleri olmak üzere üç farklı *in vitro* test yöntemi mevcuttur (Cao ve ark., 2005).

Direkt kontakt testleri, sıvı ve katı materyaller için uygun bir yöntemdir. Katı materyaller belirlenen miktarlarda hazırlandıktan sonra hücre kültürü üzerine yerleştirilir ya da hücreler, kültür kabı tabanına yerleştirilen katı materyal üzerine ekilir (ISO, 2008). Sıvı materyaller ise test edilecek konsantrasyonlarda sulandırılarak hücre kültürü üzerine uygulanır (Hanks ve ark. 1996).

İndirekt kontakt testlerinde, hücreler ve test edilecek materyal arasında bir bariyer bulunur; bu sayede test düzeneğinin *in vivo* koşullara benzerliği amaçlanır. Bariyerler, keratinize epitel, dentin veya ekstrasellüler matriks gibi materyallerden elde edilebilir (Sakaguchi ve ark., 2012a). Test edilecek materyalin belirlenen miktarda hazırlanarak bariyer üzerine yerleştirilmesi ve belirli bir süre sonunda hücre aktivitesi üzerine olan etkilerinin saptanması hedeflenir (ISO, 2008). Agar test yöntemi, milipor test yöntemi ve dentin-bariyer test yöntemi bu testlere örnek olarak sayılabilir. Selüloz esterinden elde edilen filtrelerin kullanıldığı milipor filtre test yöntemi, 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) gibi sitoksisite testleri ile kombine olarak uygulanabilir. Hücre ile materyal arasına ince bir dentin diski yerleştirilen dentin-bariyer testi, daha ileri bir teknik gerektiren yöntemdir (Sakaguchi ve ark., 2012a).

Ekstrakt testlerinde (ekstraksiyon yöntemi) ise, test edilecek materyalin sıvı bir karışımın içinde belirli bir süre boyunca bekletilmesi ile ekstrakt elde edilir. Ekstraktların elde edilmesinde hidrofilik (salin solüsyonu), lipofilik [dimetilsülfoksit (DMSO)] sıvılar veya etanol-su gibi karışımlar kullanılır (Ferracane, 1994; Schmalz, 2009). Bekleme sürelerinin sonunda elde edilen ekstraktlar hücreler üzerine uygulanır ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren nemli etüvde 37 °C'de belirlenen sürelerde bekletilmelerinin ardından seçilen bir test yardımı ile materyalin hücre aktivitesi üzerindeki etkileri saptanır (ISO, 2008). Kompozit materyalleri için ekstrakt yöntemi uygulamasında, bu materyallerin yapısındaki artık monomerlerin sıvı ortama geçmesi hedeflenir.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücelere materyal veya ekstraktı ile muamele edilerek hücre sayısı, gelişim hızı, hücrelerin çeşitli metabolik veya hücresel fonksiyonları ölçülür. Protein sentezi, enflamatuar belirteçlerin sentezi gibi çeşitli parametrelere bakılarak materyal bileşenlerinin hücre sistemi üzerindeki etkileri tespit edilebilir (Schmalz, 2009).

#### 4.3.3.2. Sitotoksosite testleri

Sitotoksosite, hücrenin temel organellerinde kimyasal etkenin oluşturduğu yıkım olarak tanımlanır (Hanks ve ark., 1991). Hücre sayısı ve canlılığının değerlendirildiği sitotoksosite testleri biyoyumluluk araştırmalarında en çok tercih edilen öncül testlerdendir. Sitotoksosite testlerinin temeli, hücrenin bir materyale karşı canlılık belirtilerine dayanır. Canlılık, hücrelerin yaşamını sürdürmeleri ve üremelerini devam ettirebilmeleri olarak tanımlanır.

*In vitro* sitotoksosite testlerinin avantajları, kolay kontrol edilebilir, tekrarlanabilir, etkili, güvenilir ve materyallerin temel özelliklerini değerlendirmek için uygun olmaları olarak kabul edilirken, yapılan değerlendirmelerin tam anlamıyla *in vivo* ortamı yansıtamaması ve uygulanan test yöntemleri için standardizasyon geliştirilmesi gerekliliği bu test sistemlerinin dezavantajlarını oluşturur (Schmalz, 1997).

*In vitro* koşullarda sitotoksik etkilerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılır (Hanks ve ark., 1996; ISO, 1999):

1. Hücre sayısı ve büyüme testleri,
2. Oksijen alımında ve glikoz metabolizmasındaki değişikliklerin saptanması,
3. Hücre membran bütünlük testleri,
4. Enzim aktivite testleri.

Sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde çok sayıda test yöntemi bulunur ve bunların arasından uygun test yönteminin seçilmesi en önemli aşamadır (Hanks ve ark., 1996; Schmalz, 1997). Hücredeki toksik etki sonucu ortaya çıkan zararı değerlendiren test metotlarından ilki boyama yöntemidir. Membran geçirgenliği ve

değişiklikleri, canlı hücrelerde depolanan ve membran hasar gördüğünde dışarı salınan veya ölü hücreleri boyayabilen boyalarla belirlenir (Schmalz, 2009). Canlı hücreler için kullanılan boyalara örnek olarak nötral kırmızısı, ölü hücreleri boyayabilen boyalara örnek olarak ise tripan mavisi ve propidyum iyodür verilebilir. Bir diğer değerlendirme yöntemi, hücre zarı fonksiyonlarının değerlendirildiği agar difüzyon testidir. Metabolik aktivite testleri ise toksik zarar sonucu hücrenin enzim aktivitesindeki bozulmayı değerlendirir (Sakagushi ve ark., 2012a).

Günümüzde, canlı hücrelerin metabolik aktivitesinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntem mitokondriyal enzimlerin aktivitesini renk değişim reaksiyonu ile gösteren kolorimetrik deneylerdir (Keiser ve ark., 2000). Mitokondriyal aktivite, canlı hücrelerin sayısının belirlenmesinde önemli bir belirteçtir. Bir hücre topluluğundaki hücre canlılık oranının tespit edilebildiği bu test yöntemine örnek olarak MTT testi verilebilir (Schmalz, 2009).

Mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan birinci jenerasyon tetrazolyum türevi olan MTT testi ile, hücrenin mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi ölçülür. Sarı renkte, suda çözünebilir tetrazolyum tuzlarının canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondriyal bir enzim olan süksinik dehidrojenaz tarafından parçalanarak suda çözünmeyen mor renkli tetrazolyum formazan yan ürününün ortaya çıkması esasına dayanır (Sakagushi ve ark., 2012a). Canlı hücrelerdeki mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ve ölü hücrelerin bu boyayı parçalama özelliğini yitirmesi prensibinden yararlanır. Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renge boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Elde edilen mor solüsyon spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölçümler, absorban değeri 570 nm dalga boyu kullanılarak plak okuyucusunda yapılır (Galluzzi ve ark., 2009). Bu yöntem diğer sitotoksikite test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Ayrıca uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir (Güven ve ark., 2011).

Hücre canlılık testlerinde kullanılan diğer tetrazolyum türevleri, 3-(4,5-dimetialtiazol-2il)-5-(3-karboksümetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H tetrazolyum (MTS) ve 4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum)-1,3-benzen disulfonat (WST-1) gibi testlerdir. Bu tetrazolyum türevleri suda çözünebilir, toksik olmayan

ürünlere metabolize edilirler. Bu nedenle hücre kültürlerinin canlılığını riske atmazlar ve çözünme gibi başka bir ara aşama içermedikleri için uygulanmaları MTT'ye kıyasla daha kolaydır (Galluzzi ve ark 2009).

Sitotoksisite yöntemlerinin yanında moleküler toksikoloji yöntemleri de gelişmeye devam etmektedir. Bu yöntemler sayesinde materyalin hücre metabolizması üzerindeki etkisi belirlenir. Bunlar apoptozis hızı, DNA hasarı veya onarımı, hücre siklusundaki değişim, spesifik protein sentezi veya enflamatuar belirteçlerin sentezi gibi sıralanabilir (Schmalz, 2009).

Sitotoksisite testlerinde genellikle fare fibroblastları (L-929, 3T3), insan epitel hücreleri (HeLa), insan diş eti veya pulpa fibroblast hücreleri kullanılır. Çünkü bu hücreler kolaylıkla büyütülebilir, iyi bilinir ve dayanıklıdır (Schmalz, 2009). Son yıllarda üç boyutlu doku mühendisliği modellerinin geliştirilmesiyle hücreler üç boyutlu olarak büyütülebilmekte ve bu sayede daha *in vivo*ya benzer şartlar sağlanabilmektedir (Moharamzadeh ve ark., 2009). Bu da kök hücre çalışmalarıyla mümkün hale gelmektedir.

#### **4.4. Kök Hücreler**

Kök hücreler, doku yenilenmesinin sağlanmasında önemli rolü olan hücrelerdir. Sürekli bölünebilme, kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme ve hasarlı dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilme özelliklerine sahiptir (Gronthos ve ark., 2000; Huang ve ark., 2008).

Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreler, kaynak aldıkları dokuya göre embriyonik kök hücreler (EKH) ve yetişkin kök hücreler (YKH) olarak iki ana gruba ayrılır (Gronthos ve ark., 2002; Seo ve ark., 2004; Ramalho-Santos ve Willenbring, 2007).

İleride laboratuvar ortamında istenilen hücre türüne dönüştürülerek hasarlı doku veya organların hücresel tedavisinde kullanılabileceği düşüncesi, kök hücrelere olan ilgiyi arttırmıştır (Liu ve Chang, 2010). Kök hücreyi diğer hücrelerden ayıran özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kök hücreler vücuttaki herhangi bir fonksiyonel hücreye dönüşmemiş olan hücrelerdir.
- Kendi kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip olan kök hücreler b l nd klerinde iki yavru hücre oluşur. Bunlardan biri farklılaşmaya aday  nc  hücreye dönüşürken diğeri kök hücre özellikleri gösteren hücre olarak kalır.
- Kök hücreler çeşitli uyarılar (büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler, hücre dışı matriks bileşenleri gibi) varlığında fonksiyonel hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahiptirler (Southall ve ark., 2008).

#### **4.4.1. Farklılaşma kapasitesine göre kök hücreler**

##### **4.4.1.1. Totipotent kök hücreler**

Döllenmiş yumurta hüresinin ilk birkaç bölünmesi ile oluşan hücrelerdir (Morula safhası). Bu hücreler tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek  zelliğ'e sahiptir (Rao ve Mattson, 2001).

##### **4.4.1.2. Pluripotent kök hücreler**

Döllenmeden sonraki ilk beş günden itibaren meydana gelen hücreler blastokist denilen küresel bir şekil alırlar. Blastokist hücreleri vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahipken, tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak  zelliğ'e sahip değillerdir. Mezodermal, ektodermal ve endodermal jerm tabakalarından türeyen bütün hücre tiplerine farklılaşabilirler (Fortier, 2005; Nadig, 2009).

##### **4.4.1.3. Multipotent kök hücreler**

Multipotent kök hücreler, buldukları dokudaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir (Fortier, 2005; Nadig, 2009). Örneğın kan kök hücreleri gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir.

#### **4.4.1.4. Oligopotent kök hücreler**

Bir dokuda bulunan yalnızca birkaç hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (lenfoid ve myeloid kök hücreler gibi) (Rao ve Mattson, 2001).

#### **4.4.1.5. Unipotent kök hücreler**

Sadece tek hücre tipini (kendilerini) oluşturabilirler (Rao ve Mattson, 2001).

### **4.4.2. Kök hücre tipleri**

#### **4.4.2.1. Embriyonik kök hücreler (EKH)**

Dölllenmiş yumurta hücresinden sonraki embriyonik süreçlerde ortaya çıkan kök hücrelerdir ve blastokistten kaynaklanır. Dört günlük hücre bölünmesinden sonra hücreler, iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi olmak üzere ikiye ayrılarak blastokist halini alır. EKH blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Pluripotent özellikte olup mezodermal, ektodermal ve endodermal jerm tabakalarına ve vücutta herhangi bir farklılaşmış hücreye dönüşebilir. EKH'nin elde edildiği blastokistler üç farklı kaynaktan elde edilir. Bunlar tüp bebek tedavisi sonucu artık olarak kalan embriyolar, EKH üretmek için *in vitro* döllenme sonrası meydana getirilen embriyolar ve somatik hücre çekirdek transferi sonrası elde edilen embriyolardır (Pera ve ark., 2000).

EKH'den fonksiyonel sinir hücreleri (Steinbeck ve ark., 2012), pankreatik hücreler (Kelly ve ark., 2011), kalp kası hücreleri (Xu ve ark., 2011), kan hücreleri (Dias ve ark., 2011), deri hücreleri (Zabierowski ve Herlyn, 2010), kemik ve kırıkta hücreleri (Hematti, 2011) gibi birçok hücre tipi laboratuvar ortamında üretilmiştir. Bu nedenle birçok hastalığın tedavisinde umut verici hücreler olarak kabul edilir.

Ancak EKH ile ilgili yapılan araştırmalarda, blastokistlerin kullanılmasından kaynaklanan etik problemler vardır (Conrad ve Huss, 2005). Bu nedenle, klinik ve laboratuvar çalışmalarında YKH tercih edilmektedir.

#### **4.4.2.2. Fetal kök hücreler**

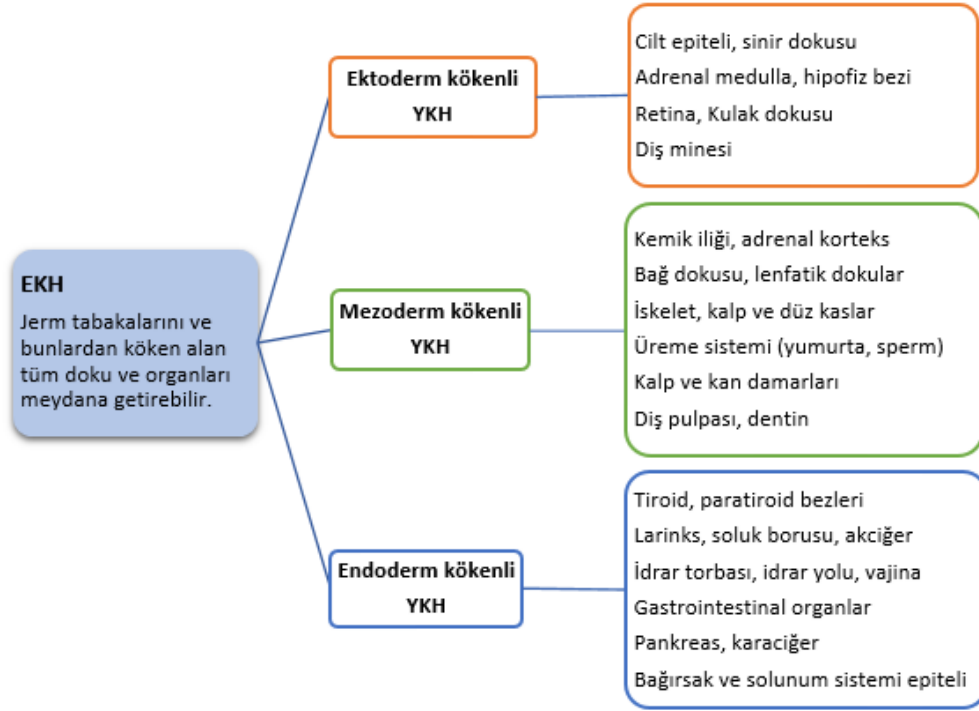
Kök hücre izolasyonu düşük fetüslerden elde edilir. Bu hücreler, pluripotent yapıda kök hücrelerdir. Bugüne kadar fetal dokulardan hematopoetik, nöral, pankreatik, endotel ve mezenkimal kök hücreler üretilebilmiştir. Ancak tek başına bir organizmayı oluşturma özelliğine sahip değildirler. Fetüsten elde edilen kök hücreler gelişimin daha geç safhasında elde edildiği için çoğalma potansiyeli EKH'ye göre daha azdır (Beattie ve ark., 1997).

#### **4.4.2.3. Kordon kanı kök hücreleri**

Bebek ile anne arasındaki bağlantıyı sağlayan göbek kordonundan elde edilir. İçerisinde periferik kanda bulunan kan hücrelerinin yanında hematopoetik kök hücre bulunduğu da gösterilmiştir. Kordon kanı kök hücreleri günümüzde daha çok kan hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Doğum sırasında alınan ve saklanan kök hücreler otolog olarak kullanılma amacıyla depolanabilir ancak bu hücrelerin otolog olarak tedavide kullanımı ile ilgili bulgular sınırlıdır (Broxmeyer ve ark., 1989).

#### **4.4.2.4. Yetişkin kök hücreler (YKH)**

Gelişimin daha ileri safhalarındaki farklılaşmış olan doku ve organların içerisinde farklılaşmadan kalan kök hücrelerdir. Her yaştaki insanda farklı dokular içerisinde bulunur ve multipotent özelliktedir. Gelişimin ilerleyen aşamalarında meydana gelen ektoderm, mezoderm ve endoderm jerm tabakalarından kaynaklanır ve bu tabakaların devamı olacak doku ve organları meydana getirerek, aynı zamanda bu doku ve organların tamir ve devamlılığını da sağlar (Şekil 6).



**Şekil 6.** Kök hücre kaynakları (Klimanskaya ve ark., 2008)

Organizma yaşadığı süre boyunca YKH kendi kopyalarını üreterek çoğalırlar. İhtiyaç durumunda buldukları dokudaki farklı hücre türlerine dönüşebilirler. Buldukları dokulardaki eskiyen, hastalanan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini üreterek doku yenilenmesinde görev alırlar. Kemik iliği, göbek kordonu, amniyotik sıvı, beyin dokusu, pankreas, karaciğer, kornea, diş pulpası, PDL gibi değişik dokulardan elde edilebilirler. YKH izole etmesi daha kolay kök hücrelerdir ve etik sınırlamaları EKH'ye kıyasla yok denebilir (Sunil ve ark., 2012).

#### 4.4.2.4.A. Hematopoetik kök hücreler

Hematopoetik kök hücreler, kemik iliğinde bulunan ve kan dolaşımı ile farklı dokulara göç etme potansiyeli olan kök hücrelerdir. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı, fetüs (karaciğer, dalak) ve plasentadan izole edilebilirler. Kemik iliğinde devamlı kendilerini yenileyerek ve farklılaşarak kan hücrelerini meydana getirirler (Goodell ve ark., 1996). Üzerinde en çok çalışılan ve tedavide kullanılan kök hücre tipidir. Kordon kanından alınan HKH, özellikle kanser hastalarında veya kan hastalığı nedeniyle kemik iliği tahrip olmuş kişilerde kullanılmaktadır (Charbord, 1994).

#### **4.4.2.4.B. Mezenkimal kök hücreler (MKH)**

Kendini onaran ve kemik iliğinde kemik farklılaşmasını sağlayan hematopoetik olmayan popülasyonun varlığı ilk olarak 1970 yılında gösterilmiştir (Friedenstein ve ark., 1970). Daha sonra aynı teknikle kemik iliğinden köken alan hücreler izole edilmiş ve bu hücrelerin yüksek çoğalma ve mezenkimal dokulara dönüşebilme potansiyelleri bildirilmiştir. Bu nedenle bu hücreler için mezenkimal kök hücreler terimi kullanılmıştır (Caplan, 1991).

MKH, farklı kaynaklardan elde edilmiş olsa da kıkırdak, kemik, yağ dokusu, iskelet kasları ve bağ dokularının stromasını oluşturan mezodermal türlere farklılaşabilirler (Minguell ve ark., 2000). Bunun yanında MKH'nin, pankreatik hücreler, hepatositler, endotel hücreler, epitel, ve nöron hücrelerine dönüşebildiğini gösteren *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (Phinney ve Prockop, 2007).

Bir hücre popülasyonunun hızlı bir şekilde tanımlanmasına imkan sağlayan yüzey antijen sentezi, MKH'nin tanımlanmasına yardımcı olur. MKH'nin tespiti için hematopoetik hücre yüzey belirteçleri olan CD14, CD34, CD45 gibi belirteçler negatif; CD105, CD73 ve CD90 gibi yüzey antijenleri ise pozitif olmalıdır (Pittenger ve ark., 1999; Huss, 2000).

Kemik iliği, en temel MKH kaynağı olarak kabul edilmektedir. MKH daha çok kemik iliği stromasından elde edildiğinden “stromal kök hücreler” olarak da adlandırılırlar (Sunil ve ark., 2012). Bunun yanında MKH periost, trabeküler kemik, yağ dokusu, kıkırdak, iskelet kası, akciğer ve dental kaynaklardan da elde edilebilmektedir (Cihova ve ark., 2011).

#### **4.4.3. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DK-MKH)**

İnsan diş dokularından MKH'nin elde edilme prosedürü kolay ve etkin bir yöntemdir. Genellikle rutin ortodontik tedavi sırasında çekilen dişler kullanıldığı için EKH'deki gibi etik sorunlar yoktur (Yalvaç ve ark., 2009).

İnsan DK-MKH, diş pulpası, apikal papilla, dental folikül ve PDL dokularından elde edilebilmektedir (Bluteau ve ark., 2008):

#### **4.4.3.1. Diş pulpası kök hücreleri (DPKH)**

DPKH, yüksek proliferasyon gösterebilen, çoğaltılabilen, yüksek farklılaşma yeteneğine sahip, sürme sonrası dönemde yok olmayan multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerdir (Gronthos ve ark., 2000). Çekim endikasyonu konan dişlerden kolayca elde edilebilmesinden dolayı genellikle yirmi yaş dişlerinden veya ortodontik tedavi amacıyla çekilen dişlerden elde edilirler. Yirmi yaş dişlerinin, en son gelişen dişler olması nedeniyle, gelişimin erken evresinde yakalandığında pulpa dokusu açısından zengin olduğu bildirilmiştir (Graziano ve ark., 2008).

#### **4.4.3.2. Süt dişi pulpası kök hücreleri**

Genellikle alttaki daimi dişin sürmek üzere olduğu, çekimi gereken süt dişlerinden elde edilir. DPKH'ye oranla daha fazla proliferasyon oranına sahip olduğu ve daha immatür özellikteki multipotent hücrelerden oluştuğu, ancak kompleks pulpa-dentin yapısı oluşturmada daha yetersiz olduğu bildirilmiştir (Miura ve ark., 2003; Shi ve ark., 2005).

#### **4.4.3.3. Apikal papilla kök hücreleri**

İnsan dişlerinin gelişmekte olan kök ucundan izole edilirler ve yüksek rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Ancak, çoğunlukla gelişimin erken evresindeki gömük dişlerde çekim endikasyonu bulunmaması nedeniyle elde edilmesi zordur (Morsczeck ve ark., 2008).

#### **4.4.3.4. Diş folikülü kök hücreleri**

Gelişmekte olan üçüncü büyük azı dişinin çekiminden sonra izole edilebilen diş germi dokusudur (Yalvaç ve ark., 2009).

#### **4.4.3.5. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH)**

PDLKH, çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden izole edilirler. Periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilirler (Seo ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2008).

#### **4.4.4. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin önemi**

DK-MKH multipotent özelliktedir. MKH'de olduğu gibi bölünebilirler ve kendi kendilerini yenileyebilirler. DK-MKH, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere benzer olarak osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücre çeşidine farklılaşabilirler (Huang ve ark., 2009). Odontojenik hücreye farklılaşma kapasitesi ise sadece dental dokulardan izole edilen kök hücrelerin sahip olduğu bir özelliktir. Yu ve ark. (2007), odontojenik farklılaşma açısından değerlendirdikleri hücrelerden, DPKH'nin kemik iliği bağ dokusundan alınan hücrelere göre odontojenik farklılaşma için daha uygun olduğunu ortaya koymuşlardır.

DK-MKH'nin farklılaşma potansiyeli, diş dokularında meydana gelen hasarların tamir mekanizmasında önemlidir. Dentin-pulpa kompleksi ve sement-periost kompleksinin insan DPKH ve PDLKH ile rejenerasyon olabileceği (yenilenebileceği) bildirilmektedir (Seo ve ark., 2004; Casagrande ve ark., 2006; He ve ark., 2008; Kawazoe ve ark., 2008). Rejenerasyon ise bu hücrelerin farklılaşma kapasitesine bağlıdır.

##### **4.4.4.1. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin odontojenik farklılaşması ve diş pulpasının rejenerasyonu**

Dentin-pulpa kompleksi farklılaşmış veya henüz farklılaşmamış odontoblast, odontoblast benzeri hücreler ve pulpa kök hücrelerinden oluşur (Sloan ve Smith, 2007). Odontoblast hücreleri dentin pulpa sınırında konumlanan, olgun bir dişte ekstrasellüler matriksin salgılanmasından ve mineralizasyonundan sorumlu olan hücrelerdir. Atrizyon, erozyon, çürük ve restoratif prosedürler gibi diş etkenler sonucu odontoblastların stimülasyonu ile dentin matriksi salgılanarak rejeneratif veya reparatif dentinogenezis olayı gerçekleşir ve diş onarım süreci başlamış olur (Smith ve ark., 1995).

Yetişkin insan diş pulpasının çeşitli kimyasal ve büyüme faktörlerinin etkisi altında odontoblast hücrelerinin oluşumunu sağlayan progenitör hücrelere sahip olduğu gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000; Miura ve ark., 2003). DPKH ilk defa Gronthos ve arkadaşları tarafından üçüncü büyük azı dişinden izole edilmiş, bu

hücrelerin *in vitro* ortamda osteo/kondroblastik hücelere, *in vivo* ortamda ise odontoblastik hücelere dönüştüğü gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000).

Dişin onarım süreci, DPKH'nin aktif hale geçerek odontojenik farklılaşması (odontoblastik hücre farklılaşması) sonucu pulpanın rejenerasyonu ile gerçekleşir (Couple ve ark., 2000; Goldberg ve Smith, 2004; Mitsiadis ve Rahiotis, 2004). DPKH'nin odontojenik farklılaşması, dentin matriksinin (protein, yağ ve karbonhidrat molekülleri) sentezi ve salgılanmasıyla odontojenik dokunun yeniden organize edilmesi anlamına gelir. Dentin ekstraselüler matriks protein yapısının büyük çoğunluğunu kollajen yapı oluştururken diğer kısmını ise proteoglikan, glikoprotein, glikozaminoglikan, osteonektin (ON), osteopontin, dentin matriks proteini 1 (DMP1), dentin sialoprotein (DSP) ve dentin fosfoprotein (DPP) oluşturur (Linde, 1989; Butler ve Ritchie, 1995; MacDougall ve ark., 1997). Kollajen yapıdaki dentin matriksinin oluşmasından sonra DSP, DPP ve DMP1 gibi nonkollajenöz proteinlerin sentezlenmesiyle gelişen olaylar zincirine dentinogenezis denir. DSP ve DPP proteinleri dentin formasyonu ve mineralizasyonu ile ilgili önemli proteinler olup tek bir gende kodlanarak dentin sialofosfoproteini (DSPP) oluşturur (Feng ve ark., 1998).

Pulpa dokusundan odontoblast benzeri hücre oluşumunu sağlamak amacıyla çeşitli hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır (Tsukamoto ve ark., 1992; Kasugai ve ark., 1993; Nakashima, 1994; Couple ve ark., 2000; Huang ve ark., 2006).

Dentin-pulpa kompleksinin tamir fonksiyonunun devamı için, kullanılan restoratif materyallerin pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşma potansiyellerini olumsuz yönde etkilememesi önemlidir (Sharma ve ark., 2010).

#### **4.4.4.2. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması ve periodontal rejenerasyon**

Periodonsiyum, yumuşak ve sert mineralize dokulardan oluşur; PDL, sement, alveol kemiği ve diş eti dokularını kapsar. Bu dokular, dişin fiziksel güçlere karşı koyabilmesinin yanında dişin kemiğe bağlanmasını sağlar. (Pitaru ve ark., 1994). PDL, dişi destekleyerek doku hemostazını sağlayan, sement ve alveol soket iç duvarını birbirine bağlayan özel bir bağ dokudur (Seo ve ark., 2004). Hızlı dönüşüm ve yeniden

şekillenme özelliği ile karakterizedir (Lekic ve ark., 2001).

Yetişkin periodonsiyumu, hasar sonrası diş onaran kök hücre progenitörleri içerir. Bu hücreler özel alanlarda yer alır (McCulloch ve ark., 1987). Periodontal dokunun hasar görmesi durumunda, diş folikülü, sement ve PDL hücrelerinin periodontal rejenerasyon olayında rol aldığını gösteren çalışmalar vardır (Hammarstrom, 1997; Jin ve ark., 2003; Shimonon ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2004). PDL'den köken alan progenitor hücreler kendi kendilerini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip olup, periodontal doku rejenerasyonunda önemli fonksiyona sahiptir (Ivanovski ve ark., 2006; Nagatomo ve ark., 2006).

Dokuda yer alan kök hücrelerin aktif hale gelmesiyle bölgedeki hasarlı dokunun tamiri sağlanır. Sağlıklı dokudaki YKH ve progenitörleri çoğalarak hasarlı alana doğru göç ederler. Yaralanma sonrası ilgili bölgede artmış sayıda hücre popülasyonu bulunur. Göç eden hücreler fibroblast, osteoblast veya sementoblastlara farklılaşarak PDL, kemik ve sement dokusunun oluşturur (McCulloch ve ark., 1987).

PDL hücreleri ile kemik hücrelerinin aynı MKH yüzey antijenlerini içermekte olduğu bildirilmiştir. Taşıdıkları yüzey antijenleri açısından kemik iliği kök hücreleriyle de benzerlik gösterdiği ve PDLKH'nin osteojenik farklılaşma gösterdiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2008). Aynı zamanda kemik iliği mezankimal kök hücrelerinin, periodontal defekte etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hücrelerin farklılaşarak beklenen periodontal rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir (Hasegawa ve ark., 2006).

Dentin ve kemik oluşumu (odontoblastların ve osteoblastların uyarılması) için gereken moleküler düzenleyiciler arasında belirgin bir fark yoktur. Buna rağmen meydana gelen dokuların farklı olmasını araştırmacılar, hücre gruplarına özel proteinlerin (genlerin) ve büyüme faktörlerini harekete geçiren moleküler sinyallerin farklı olmasına bağlamaktadır (Shi ve ark., 2005; Morsczech ve ark., 2009).

#### 4.4.5. Diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin odontojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesi

DK-MKH, *in vitro* ortamda çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılarak, hücre kültüründe sert doku oluşumları değerlendirilebilmektedir. Bu değerlendirme için hücresel düzeyde testler uygulanmaktadır. Bu testler yardımıyla hücresel belirleyicilerin tayini yapılarak dokuda meydana gelen farklılaşma düzeyi tespit edilebilmektedir.

DPKH'nin odontojenik farklılaşma mekanizmasında, dentin yapımında görev alan kollajen tip I, DSPP, DMP1 ve kemik morfogenetik proteini 2 (BMP2) gibi proteinler farklılaşmanın erken belirteçleri olarak değerlendirilir. Bu belirteçler odontojenik farklılaşmaya uğrayan hücreler tarafından farklılaşma mekanizmasının erken safhasında salgılanır ve salgılanan belirteçlerin tayini yapılarak hücrelerde meydana gelen farklılaşma düzeyi belirlenebilir (Zhu ve ark., 2008).

Kollajen tip I, dentin matriksi ve mineral formasyonunun önemli belirteçlerindendir. Dentin matriks protein yapısının büyük çoğunluğunu kollajen yapı oluşturur (Linde ve Goldberg, 1993; Butler, 1998). DSPP, odontoblastlar tarafından sentezlenir ve dentinin kollajen olmayan organik matriksinin önemli bir bileşenidir. *In vitro* çalışmalarda, bir hücrenin odontoblast hücresi olduğunun anlaşılması için fonksiyonel olarak dentine özel protein olan DSPP sentezini gerçekleştiriyor olması şarttır (Ruch ve ark., 1995). DMP1, odontoblast hücreleri tarafından sentezlenir ve mineralize doku oluşumunu ifade eder. Dentinin kollajen olmayan organik matriksinin diğer önemli bileşenidir ve DSP gibi salgılama evresinin göstergelerindendir (Tziafas ve ark., 2000).

Dentin yapımında belirtilen proteinlerin büyük çoğunluğu kemik yapımında da görev alır. Kemik oluşumu için gerekli olan dönüştürücü büyüme faktörü (transforming growth factor  $\beta$ ), BMP 2, 4 ve 7 gibi düzenleyiciler odontoblast gelişimini de destekler. Bu nedenle dentin ve kemik matriksinde bulunan mineralizasyon sistemi, ortak protein yapılarından dolayı birbirine oldukça benzer yapıdadır. PDLKH'nin osteojenik farklılaşma mekanizmasında kemik yapımında görev alan kollajen tip I, kemik sialoprotein, osteokalsin (OK), ON, osteopontin ve

BMP gibi proteinler farklılaşma belirteçleri olarak değerlendirilir (Chen ve ark., 2007; Feng ve ark., 2010).

Dentin matriksinde olduğu gibi kemik matriksinin büyük kısmını da kollajen yapı oluşturur. OK, osteoblastlar tarafından sentezlenen nonkollajenöz bir proteindir ve genel olarak osteoblast göstergesi olarak kabul edilir (Alvarez ve ark., 2000). Kemiğin ekstrasellüler matriksine girer ve kalsiyum bağlama yeteneği kazanır. Kemikte hidroksiapatit kristalleriyle birleşik olduğu düşünülür (Christenson, 1997). ON, kemiğin ekstrasellüler matriksinde yer alarak kollajenle bileşik oluşturur ve kristal depozisyonunu teşvik eder (Garcia ve ark., 2003; Kömürcü ve ark., 2011).

Odontojenik ve osteojenik farklılaşma sırasında hücrelerden sentezlenen proteinlerin belirlenmesinin yanında sert doku oluşumlarının değerlendirilmesinde Alkalin fosfataz (ALP) enzim aktivitesi ve hücre kültüründe mineralize alanların (kalsiyum birikim alanları) belirlenmesi gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

ALP enzim aktivitesi, kalsifiye doku oluşumunda önemli bir role sahiptir ve odontojenik / osteojenik farklılaşma kapasitesi hakkında bilgi verir. Hücrelerin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesinde sık kullanılan parametrelerden birisidir (Yoshida ve ark., 1995). Farklılaşmaya uğramamış DK-MKH'ye oranla odontoblastların ALP aktivitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Yu ve ark., 2006).

ALR boyama yöntemi, kültür ortamında kalsiyum veya kalsiyum tuzlarının boyanması prensibine dayanan ve farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntemdir (Pittenger ve ark., 1999). Boyanma sonucunda kalsiyum tuzlarının birikim gösterdiği bölgeler turuncu / kırmızı renkte boyanır. Kalsiyum iyonlarının temel rolü kemik mineralizasyonuna katılmaktır.

Pulpanın açığa çıkması ve derin kavitelere kompozit uygulanması gibi etkenler ile odontoblastik tabakanın zarar gördüğü bilinmektedir. Bu tip işlemler sonucunda rezin monomerlerin pulpa dokusuna difüze olarak kök hücrelerin odontojenik farklılaşmasını engellediği düşünülmektedir (Bakopoulou ve ark., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kompozitlerin, hücrelerin gen sentezinde bozukluğa ve dentin-

pulpa kompleksinin rejeneratif potansiyelinde azalmaya sebep olduđu bildirilmiřtir (Galler ve ark., 2011; Bakopoulou ve ark., 2012). Toksik bulunmayan dűřük konsantrasyondaki HEMA ve TEGDMA monomerlerine maruz bırakılan pulpa kűk hűcrelerinin, migrasyon, odontojenik farklılařma ve mineralizasyon kapasitesinde gecikme olduđu; yűksek konsantrasyonda monomere maruz bırakıldıđında ise, reparatif dentin oluřumunun tamamen engellendiđi gűsterilmiřtir (Bakopoulou ve ark., 2011).

Dentin-pulpa ve periodontal-sement kompleksinin tamir mekanizmasını devam ettirebilmesi için, kullanılan restoratif materyallerin hűcreler űzerine toksik etkisinin olmaması ve hűcrelerin farklılařma potansiyelini olumsuz yűnde etkilememesi űnemlidir.

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapılarak 08.10.2013 tarihinde onay (Karar no: 6) alındı (Ek 1).

Çalışmamızda kullanılan benzer monomer içeriğine sahip universal, bulk fill ve akışkan olmak üzere üç farklı uygulama alanı olan rezin esaslı kompozit dolgu materyalleri [Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow (Ivoclar Vivadent, Liechtanstein, Amerika)] Resim 1'de ve bu materyallerin özellikleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

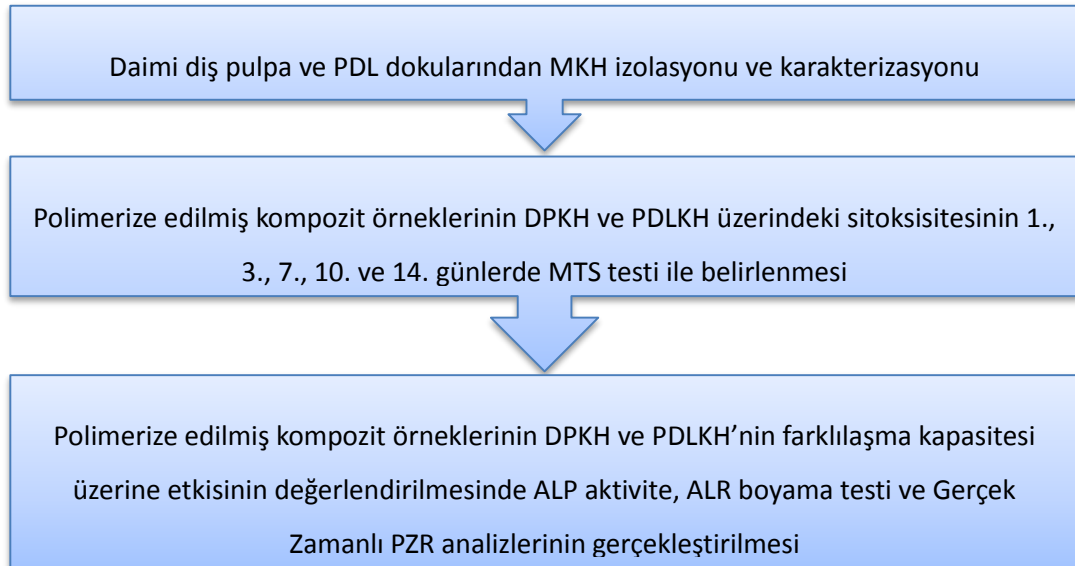


**Resim 1.** Çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyalleri (a) Tetric EvoCeram (b) Tetric EvoCeram Bulk Fill (c) Tetric EvoFlow (Ivoclar Vivadent, Liechtanstein, Amerika)

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyalleri ve özellikleri

Kompozit Dolgu Materyalleri	Tipi	Rengi	Seri No	Kimyasal İçeriği
Tetric EvoCeram	Universal	A2	R43479	<b>Matriks (ağırlık yüzdesi %17):</b> Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA <b>Doldurucu (%82):</b> Baryum cam, itterbiyum tri-florür, oksit karışımı, prepolimer (%34) <b>Diğer (%1):</b> Başlatıcı, katalizör, stabilizatör, pigmentler
Tetric EvoCeram Bulk Fill	Bulk Fill	IVA	S09720	<b>Matriks (ağırlık yüzdesi %20):</b> Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA <b>Doldurucu (%79):</b> Baryum cam, itterbiyum tri-florür, oksit karışımı, prepolimer (%17) <b>Diğer (%1):</b> Başlatıcı (kamforokinon + Ivocerin), katalizör, stabilizatör, pigmentler
Tetric EvoFlow	Akışkan	A2	S45964	<b>Matriks (ağırlık yüzdesi %38):</b> Bis-GMA, UDMA, Dekandioldimetakrilat. <b>Doldurucu (%61):</b> Baryum cam, itterbiyum tri-florür, oksit karışımı, silika, prepolimer (%20) <b>Diğer (%1):</b> Başlatıcı, katalizör, stabilizatör, pigmentler

Seçilen kompozit dolgu materyallerinin insan yirmi yaş dışından elde edilen DPKH ve PDLKH üzerindeki sitotoksik etkilerini ve bu materyallerin, hücrelerin farklılaşma kapasitesi üzerine olan etkilerini incelediğimiz çalışmamız üç aşamada gerçekleştirildi (Şekil 7).



**Şekil 7.** Çalışma planı

## **5.1. Çalışma gruplarının belirlenmesi**

### **5.1.1. Sitotoksosite deneyi için çalışma gruplarının belirlenmesi**

Sitotoksosite deneyi için, kompozit grupları ve kontrol grupları olmak üzere toplam 5 çalışma grubu oluşturuldu. Hücre kültürüne sadece besiyeri eklenen grup negatif (-) kontrol grubu, hücrelere toksik etkisinin olduğu bilinen % 20 DMSO (Merck KGaA; Darmstadt, Almanya) maddesinin eklendiği grup pozitif (+) kontrol grubu olarak belirlendi:

1. Grup: Tetric EvoCeram
2. Grup: Tetric EvoCeram Bulk Fill
3. Grup: Tetric EvoFlow
4. Grup: Pozitif (+) kontrol grubu = % 20 DMSO
5. Grup: Negatif (-) kontrol grubu

Hücre canlılığının belirleneceği her bir gün (1, 3, 7, 10 ve 14. günler) için kompozit grupları 3'er tekrarlı, kontrol grupları 2'ser tekrarlı olacak şekilde DPKH ve PDLKH için iki ayrı deney düzeneği hazırlandı. Buna göre toksisite deneyi için kompozit grubu başına 30'ar adet olmak üzere toplamda 90 adet kompozit örneği hazırlandı.

### **5.1.2. Farklılaşma deneyi için çalışma gruplarının belirlenmesi**

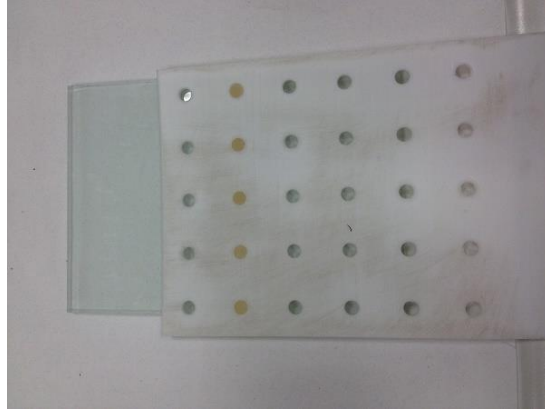
Farklılaşma deneyi için, kompozit grupları ve kontrol grupları olmak üzere toplam 5 çalışma grubu oluşturuldu. Hücre kültürüne sadece farklılaşma besiyeri eklenen grup (+) kontrol grubu, kültür besiyeri eklenen grup ise (-) kontrol grubu olarak belirlendi:

1. Grup: Tetric Evo Ceram
2. Grup: Tetric EvoCeram Bulk Fill
3. Grup: Tetric EvoFlow
4. Grup: (+) kontrol grubu
5. Grup: (-) kontrol grubu

Farklılaşmanın değerlendirileceği ALP aktivite testi ve ALR boyaması için kompozit grupları 3'er tekrarlı; üç adet gen sentezinin analiz edildiği Gerçek Zamanlı PZR değerlendirmesinde her bir gen için kompozit grupları 3'er tekrarlı; kontrol grupları ise 2'şer tekrarlı olacak şekilde çalışma planlandı. DPKH için odontojenik, PDLKH için osteojenik farklılaşma deneyi olmak üzere iki ayrı deney düzeneği hazırlandı. Buna göre toksisite deneyi için kompozit grubu başına 30'ar adet olmak üzere toplamda 90 adet kompozit örneği hazırlandı.

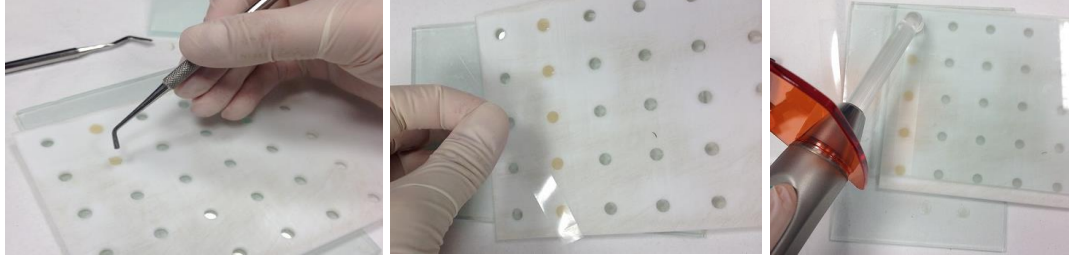
## 5.2. Kompozit örneklerinin hazırlanması

Kompozit örneklerinin belli bir standartta oluşturulması için, üzerinde 5 mm çapında, 2 mm yüksekliğinde silindirik boşluklar hazırlanan teflon kalıp kullanıldı (Resim 2).



**Resim 2.** Kompozit örneklerinin hazırlanmasında kullanılan teflon kalıp

Örnekler, kontaminasyonu engellemek için steril teflon kalıpta laminar akışlı kabin içinde steril şartlarda hazırlandı. Kompozit materyalleri teflon kalıptaki boşluklara yerleştirildikten sonra, oksijen inhibisyon tabakasının oluşumunun engellenmesi için materyallerin alt ve üst yüzeyi plastik şeffaf matriks bandı ile kaplandı ve hava kabarcığı oluşumunu engellemek için teflon kalıp iki cam tabla arasında konumlandırılarak polimerizasyon aşamasına geçildi (Resim 3).



**Resim 3.** Kompozit örneklerinin hazırlanması

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ışık cihazının 10 saniye uygulanması ile polimerizasyon sağlanarak kompozit örnekleri elde edildi. Polimerizasyon için LED teknolojisi ile üretilmiş, dalga boyu 430-480 nm arasında, gücü 1200 mW/cm<sup>2</sup> olan Elipar S10 (3M ESPE Dental Products; Minnesota, Amerika) ışık cihazı kullanıldı (Resim 4).



**Resim 4.** Kompozit örneklerinin polimerizasyonunda kullanılan ışık cihazı (Elipar S10, 3M ESPE Dental Products; Minnesota, Amerika)

### 5.3. Hücre Kültürü

Çalışmanın hücre kültürü aşamaları (DPKH ve PDLKH'nin izolasyonu, pasajlanması ve karakterizasyonu) ve *in vitro* deney aşamaları Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde gerçekleştirildi.

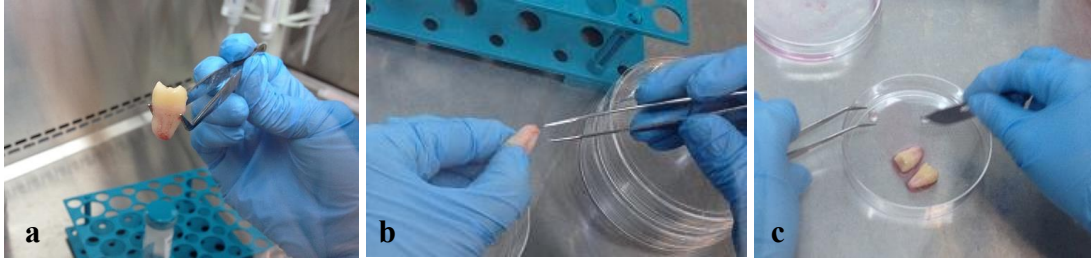
### 5.3.1. DPKH ve PDLKH'nin izolasyonu

Hücre kültürü için gerekli olan pulpa ve PDL doku örnekleri Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran 16-18 yaş aralığındaki herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan hastaların çekilen gömük yirmi yaş dişlerinden elde edildi. Çalışmaya dahil edilen hastalar ve/veya ebeveynleri tarafından bilgilendirme ve onam formları imzalatıldı. Çekilen dişler, steril falkon tüpler (ISOLAB Laborgeräte GmbH; Wertheim, Almanya) içindeki kültür besiyerine [% 1 oranında penisilin, streptomisin, amfoterisin ve % 10 fetal sığır serumu içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM; low glucose 500 mL (Gibco, Life Technologies; NY, Amerika)] alınarak bir saat içerisinde Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarı'na ulaştırıldı. DPKH ve PDLKH'nin izolasyonu laminar akışlı steril kabin (Esco Technologies; Pennsylvania, Amerika) içerisinde gerçekleştirildi (Resim 5).



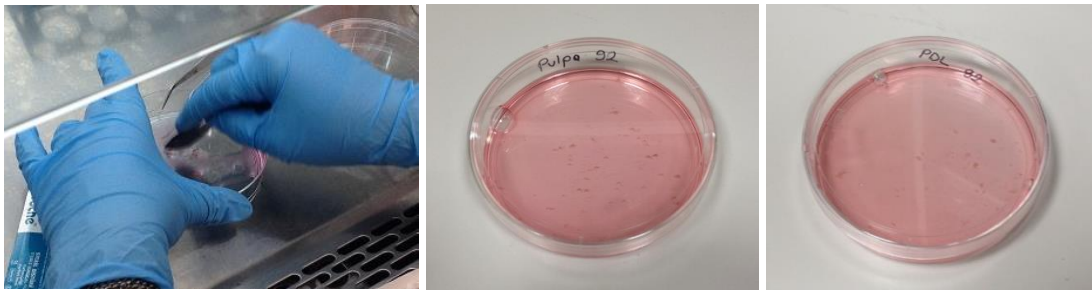
**Resim 5.** Laminar akışlı steril kabin

Dişlerin yüzeyindeki gingival dokular ve kök ucundaki çevre dokuların uzaklaştırılmasından (Resim 6a) sonra pulpa dokusu, henüz kök oluşumu tamamlanmamış yirmi yaş dişinin kök ucundan steril pens yardımı ile dikkatli bir şekilde çıkartılarak (Resim 6b) petri kabına alındı. PDL dokusu ise dişin kök yüzeyinin 22 no.lu steril bistüri (Schreiber GmbH; Fridingen, Almanya) yardımıyla travma yaratmayacak şekilde kazınmasıyla (Resim 6c) elde edildi.



**Resim 6.** Dişlerden pulpa ve PDL dokusunun elde edilmesi (a) Diş yüzeyindeki ve kök ucundaki çevre dokuların uzaklaştırılması (b) Dişin açık olan kök ucundan pulpa dokusunun çıkartılması (c) Diş yüzeyindeki PDL dokusunun kazınarak petri kabına alınması

Pulpa ve PDL dokuları farklı petri kaplarında 22 no.lu bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak homojenize edildi. Her bir petri kabına, daha önce hazırlanan kültür besiyerinden eklendi (Resim 7).



**Resim 7.** Homojenize edilen pulpa ve PDL dokularına kültür besiyerinin eklenmesi

Homojenize edilen dokular, 37°C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub> ortamındaki inkübatörde (Sanyo CO<sub>2</sub> incubator, Japonya) kültüre edilerek besiyerleri 2-3 günde bir değiştirildi (Resim 8). Hücrelerin çoğalmaları invert mikroskop (Nikon TS 100; Tokyo, Japan) altında her gün takip edildi ve hücrelerin çoğalarak kültür kabının yüzeyini % 70-80 oranında kaplamasıyla pasajlama işlemine geçildi.



**Resim 8.** Dokuların inkübatörde bekletilmesi

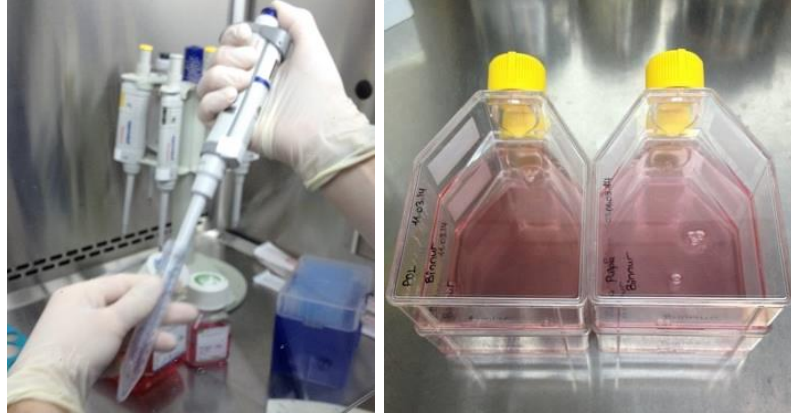
### **5.3.2. DPKH ve PDLKH'nin pasajlanması**

Pasajlama işlemi için kültür kabındaki besiyeri aspire edilerek, 3-4 mL fosfat tamponu (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: PBS, Gibco, Life Technologies; New York, Amerika) ile üç kez yıkandı. Kültür kabına 3 mL % 0,25'lik Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Gibco, Life Technologies; İngiltere) solüsyonu eklenerek 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. Daha sonra üzerine 3 mL besiyeri eklendi. Oluşan çözelti pipetaj yapılarak 15 mL'lik falkon tüpüne alındı ve santrifüj cihazında (Sigma GmbH, Almanya) oda sıcaklığında 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek hücre çökeltisi elde edildi (Resim 9).



**Resim 9.** Santrifüj sonrası pulpa ve PDL hücre çökeltilerinin elde edilmesi

Üstte kalan medyum (süpernatant) atıldıktan sonra hücre çökeltileri üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek hücre süspansiyonu oluşturuldu. Her 1 mL hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirildi ve besiyeri eklenmiş 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına (T-25) aktarılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi (Pasaj 1 = P1) (Resim 10).



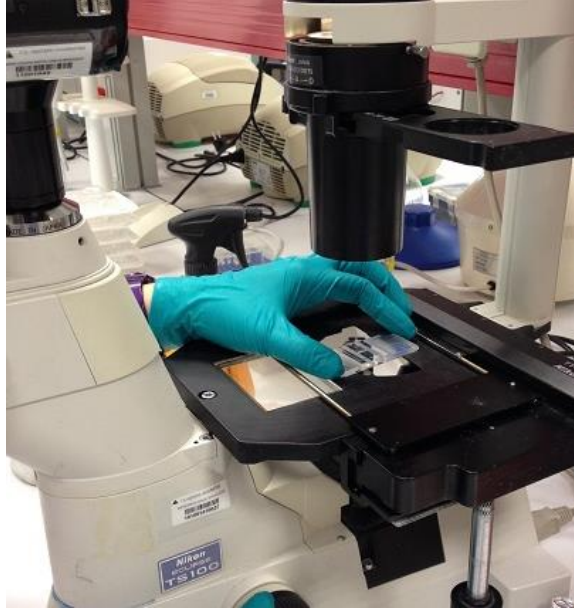
**Resim 10.** Pulpa ve PDL hücrelerinin falkon tüpten kültür kabına aktarılması

Hücreler 37°C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub> ortamındaki inkübatörde kültüre edilerek besiyerleri 2-3 günde bir değiştirildi. Kültür kaplarındaki hücrelerin çoğalması invert mikroskop altında her gün izlenerek, hücreler yeterli çoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi tekrarlandı. Sonraki pasajlama işlemlerinde 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kapları (T-75) kullanıldı. Çalışmada pasajlama işlemi P3 düzeyine kadar sürdürüldü.

### 5.3.3. Hücre sayımı

Kültür kabındaki hücreler istenilen yoğunluğa geldiğinde, pasajlama işleminde olduğu gibi hücreler önce hücre kaplarından Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı ve santrifüj edilerek çöktürüldü. Üstte kalan medyum atıldıktan sonra 1 mL kültür besiyeri ilave edilerek hazırlanan hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirildi ve 10 µL'si hücre sayımı yapılmak üzere küçük ependorf tüpüne aktarıldı. Geriye kalan hücreler sitotoksisite ve farklılaşma deneyleri için kullanıldı.

Hücre sayımı hemositometre kullanılarak gerçekleştirildi (Resim 11). Hemositometre üzerindeki hücre sayım alanına denk gelecek şekilde lamel (ISOLAB Laborgeräte GmbH; Wertheim, Almanya) yerleştirildi. Ependorf tüpünde hücre sayımı için ayrılan süspansiyon, mikropipet (Eppendorf Research; New York, Amerika) yardımıyla lamel üzerine aktarıldı. Hücreler invert mikroskop (40x büyütme) altında sayılarak ortalaması alındı. Alınan ortalamanın, 10 000 (sabit sayı) ve dilüsyon oranı ile çarpılmasıyla mililitredeki toplam hücre sayısı hesaplandı.



**Resim 11.** İvert mikroskop altında hücre sayımının yapılması

#### 5.4. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizleri

İnsan daimi diş pulpası ve PDL dokularından elde edilen MKH'nin karakterize edilmesi için akım sitometri analizi literatürde belirtilen şekilde yapıldı (Yalvaç ve ark., 2010). Üçüncü pasaja getirilen hücreler önce hücre kaplarından Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve santrifüj edilerek çöktüldü. Hücre çöktüsü PBS ile karıştırılarak 100 000 hücre/100µL PBS/tüp olacak şekilde akım sitometre tüplerine alındı. Tüpteki hücreler, 1 saat PBS içerisinde seyreltilmiş antikorlar ile muamele edildi. Karakterizasyon işlemi için CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 (Abcam; Cambridge, MA, Amerika) ve CD29 (Biolegend; San Diego, CA, Amerika) antikorları kullanıldı. Antikor eklenmeyen grup negatif kontrol grubu, antikor olarak integrin eklenen grup pozitif kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Daha sonra 1 mL PBS ile yıkayıp 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilen hücre yığığını 500 µL PBS içerisinde çözdü ve akım sitometri tüplerine alındı. FACS Calibur Akım Sitometre (Becton Dickinson; California, Amerika) sistemi kullanılarak analiz gerçekleştirildi (Resim 12).



**Resim 12.** Akım sitometri cihazı

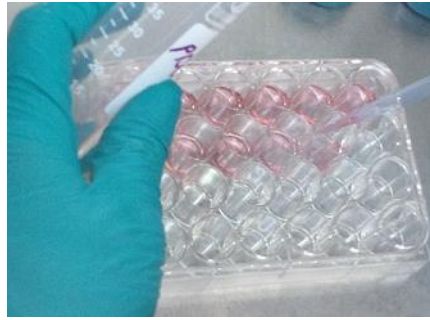
## 5.5. Hücre Toksikite Deneyi

Hücre toksisite deneyinde, çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerindeki olası toksik etkileri 1, 3, 7, 10 ve 14. günlerde MTS testi ile değerlendirildi.

### 5.5.1. DPKH ve PDLKH'nin ekimi

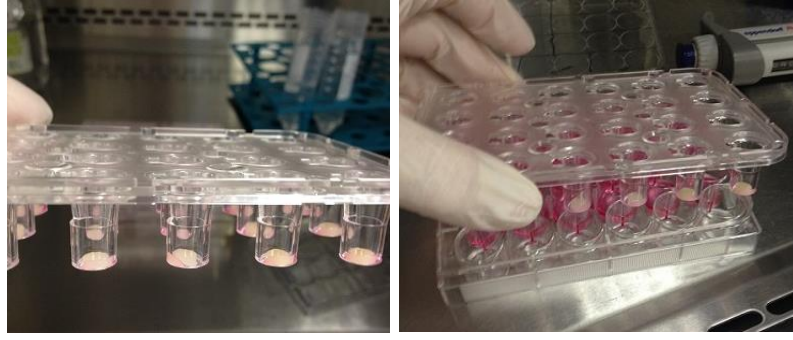
Çalışmada, hücre ile materyal arasındaki temas açısından indirekt metot tercih edildi. Bu amaçla deney düzeneği olarak 24 bölmeli milipor filtre sistemi (EMD Millipore Corporation; Massachusetts, Amerika) kullanıldı. Bu sistem 24 kuyucuklu kültür plağı ve üzerine yerleştirilen filtre sisteminden oluşur. Filtre sistemi polietilen tereftalat malzemesinden imal edilmiş olup filtre çapı 6,5 mm'dir. Filtre yüzey alanı 0,33 cm<sup>2</sup> ve yüzeydeki porların genişliği 3 µm'dir.

Kuyucuk başına 25 000 hücre gelecek şekilde kullanılacak toplam hücre miktarı hesaplanarak DPKH ve PDLKH'nin kültür plaklarına ekimi yapıldı (Resim 13). Kuyucuklara 500 µL besiyeri eklenerek hücreler 1 gün süreyle inkübatörde bekletildi. Hücre ekimi ve deney sürecindeki tüm işlemler laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirildi.



**Resim 13.** Sayımı yapılan hücrelerin 24 bölmeli kültür plağına ekiminin yapılması

Bir gün süreyle inkübatörde bekletilen hücrelerin besiyerleri aspire edilerek, hazırlanan kompozit örnekleri milipor filtre sisteminin üzerine yerleştirildi (Resim 14). Örneklerin üzerini kaplayacak şekilde kuyucuk başına toplam 500 µL besiyeri eklendi. Deney süresi boyunca iki günde bir besiyerleri değiştirildi.



**Resim 14.** Hazırlanan kompozit örneklerinin milipor filtre sistemi üzerine yerleştirilmesi

### 5.5.2. MTS testinin uygulanması

Hazırlanan kompozit örneklerinin DPKH ve PDLKH'nin canlılığına olan etkisi, hücre canlılığını mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı ölçen MTS testi (CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega; İngiltere) kullanılarak belirlendi.

MTS testinin yapılacağı 1, 3, 7, 10 ve 14. günlerde ilgili kuyucuktaki besiyeri aspire edildi. Karanlık ortamda her bir kuyucuğa 450  $\mu$ L DMEM ve 50  $\mu$ L MTS karışımı konularak 2 saat boyunca alüminyum folyoya sarılı şekilde inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuktaki karışımdan 100'er  $\mu$ L alınarak örnekler 96 kuyucuklu plağa yerleştirildi. Oluşan renk değişimi, ELISA plak okuyucusu (Elx800, Bio-Tek Instruments; Vermont, Amerika) kullanılarak absorbans (490 nm) ölçümüne dayalı şekilde değerlendirildi (Resim 15).



**Resim 15.** MTS örneklerinin ELISA cihazına yerleştirilmesi

## 5.6. Odontojenik ve Osteojenik Farklılaşma Deneyleri

Çalışmanın üçüncü aşaması olan farklılaşma deneyinde, kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH'nin farklılaşma potansiyeline olan etkisi değerlendirildi. Bu amaçla, 14 gün boyunca DPKH'nin odontojenik, PDLKH'nin osteojenik farklılaşması sağlandı.

DPKH'nin odontoblastlara farklılaşmasını sağlamak amacıyla, DMEM içerisinde 50 µg/mL askorbik asit (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika), 10 nM deksametazon (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika) ve 50 nM β-gliserofosfat (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika) kullanılarak 5x olacak şekilde odontojenik besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri her kullanımda 1x'e seyreltilerek kullanıldı.

PDLKH'nin osteoblastlara farklılaşmasını sağlamak amacıyla DMEM içerisinde 50 µM askorbik asit, 0,1 µM deksametazon ve 10 mM β-gliserofosfat kullanılarak 5x olacak şekilde osteojenik besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri her kullanımda 1x'e seyreltilerek kullanıldı.

### 5.6.1. DPKH ve PDLKH'nin ekimi

Farklılaşma deneyinde hücre ile materyal arasındaki kontakt açısından indirekt metot tercih edildi. Bu amaçla deney düzeneği olarak 24 bölmeli milipor filtre sistemi kullanıldı.

Kuyucuk başına 25 000 hücre gelecek şekilde kullanılacak toplam hücre miktarı hesaplanarak DPKH ve PDLKH'nin kültür plaklarına ekimi yapıldı. Kuyucuklara 500 µL besiyeri eklenerek hücreler 1 gün süreyle inkübatörde bekletildi.

Bir gün süreyle inkübatörde bekletilen hücrelerin besiyerleri aspire edilerek, hazırlanan kompozit örnekleri milipor filtre sisteminin üzerine yerleştirildi. Farklılaşma besiyeri, her bir kuyucukta 500 µL olacak ve örneklerin üzerini kaplayacak şekilde dağıtıldı ve 14 gün boyunca 2 günde bir besiyerleri değiştirildi. Bu sürenin bitiminde deneyler sonlandırılarak grupların ALP aktivitesi, ALR boyaması ve Gerçek Zamanlı PZR analizlerine geçildi.

### 5.6.2. Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesi

ALP aktivitesinin tayini için çalışmamızda QuantiChrom Alkalen Fosfataz Deney Kiti (BioAssay Systems; California, Amerika) kullanıldı (Resim 16).



**Resim 16.** Alkalen fosfataz (ALP) deney kiti

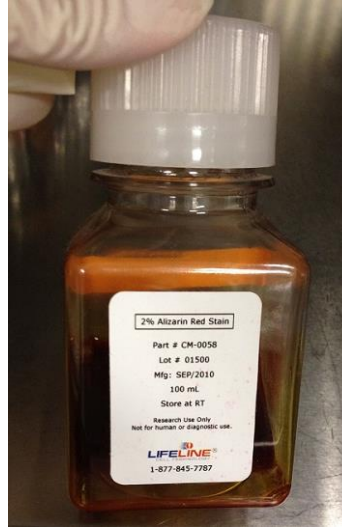
Farklılaşma deneyinin sonunda, analiz için kullanılacak hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılarak her bir deney grubuna ait hücre grubu tek bir ependorf tüpüne alındı ve santrifüj edilerek hücre çökeltisi elde edildi. Üretici firmanın talimatlarına göre aşağıdaki protokol izlendi:

- Ependorf tüplerinin her birine, hücreleri parçalayarak içerisindeki proteini açığa çıkarmak amacıyla 500  $\mu$ L % 0,2'lik Triton-X 100 (MP Biomedicals; Illkirch, Fransa) koyuldu. Karışım, 300 rpm'de çalışan karıştırıcı (Titramax 100, Heidolph Instruments; Schwabach, Almanya) üzerinde 20 dakika oda ısısında karıştırıldı.
- Elde edilen örneklerden 30'ar  $\mu$ L alınarak 96 kuyucuklu plak içerisine dağıtıldı. Üzerine, protokole göre hazırlanan ALP belirleme karışımından 50'şer  $\mu$ L eklendi. Karanlıkta 15 dakika bekletildikten sonra ELISA cihazında 405 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçümü yapıldı.

### 5.6.3. Alizarin Red (ALR) boyaması

ALR boyama analizi için kullanılacak hücrelerin besiyerleri aspire edilerek aşağıdaki protokol izlendi:

- Hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelerin fiksasyonu için kuyucuklara 500  $\mu$ L etanol konarak 30 dakika boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.
- Daha sonra etanol aspire edilerek hücreler iki kez distile su ile yıkandı. Kuyucuklara 500  $\mu$ L % 2'lik ALR boyası (LifeLine Cell Technology; Maryland, Amerika) konularak oda sıcaklığında 15 dakika beklendi (Resim 17).



**Resim 17.** Alizarin red (ALR) boyası

- Bekleme süresinin sonunda ALR boyası kuyucuklardan aspire edildi ve aşırı boyayı uzaklaştırmak için hücreler dikkatli bir şekilde 2-3 kez distile su ile yıkandı. Hazırlanan örnekler invert mikroskop (Primo Vert, Zeiss; Almanya) altında görüntülendi ve görüntüler bilgisayara kaydedildi (Resim 18).



**Resim 18.** ALR boyama yöntemi ile hazırlanan örneklerden invert mikroskop altında görüntü alınması

#### **5.6.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR) analizi**

Gerçek Zamanlı PZR analizinde, DPKH kültüründen odontojenik farklılaşmaya özgü olan kollajen tip I, DSPP ve DMP1 genlerinin; PDLKH kültüründen ise osteojenik farklılaşmaya özgü olan kollajen tip I, ON ve OK genlerinin sentez düzeyleri analiz edildi. Gerçek Zamanlı PZR analizi için aşağıdaki işlem basamakları uygulandı:

- RNA izolasyonu
- cDNA sentezi
- Primerlerin hazırlanması
- Reaksiyon karışımının hazırlanması ve örneklerin Gerçek Zamanlı PZR cihazında okutulması

#### 5.6.4.1. RNA izolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu için Rneasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı (Resim 19).



**Resim 19.** RNA izolasyon kiti

Farklılaşma deneyi sonrasında, analizi yapılacak hücreler kültür kaplarından kaldırılarak her deney grubuna ait hücre topluluğu tek bir ependorf tüpüne alındı. Üzerine PBS eklenerek santrifüj edildi. Üretici firmanın talimatlarına göre aşağıdaki protokol izlendi:

1. Santrifüj edilen hücelere 600  $\mu$ L liziz tamponu (Buffer RLT) eklenerek karışım 15 saniye vortekslendi (Resim 20).



**Resim 20.** Vorteks işlemi

2. Üzerine 600  $\mu$ L %70'lik etanol eklenen karışım tekrar vortekslendi.

3. Oluşan karışımın 700  $\mu$ L'si, Rneasy toplama tüpü içerisinde bulunan filtre tüpüne alınarak santrifüj cihazında (Mikro 22R, Hettich; Tutlingen, Almanya) 15 saniye 12 000 rpm'de santrifüj edildi (Resim 21). Toplama tüpünde biriken atık dökülerek filtre tüpü tekrar toplama tüpü içerisine yerleştirildi.



**Resim 21.** Toplama tüplerinin santrifüj cihazına yerleştirilerek santrifüj edilmesi

4. Filtre tüpü içerisine 700  $\mu$ L yıkama tamponu-1 (Buffer RW1) konularak 15 saniye 12 000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken atık dökülerek filtre tüpü tekrar toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

5. Filtre tüpüne 500  $\mu$ L yıkama tamponu-2 (Buffer RPE) eklenerek 15 saniye 12 000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken atık dökülerek filtre tüpü tekrar toplama tüpü içerisine yerleştirildi.

6. Tekrar filtre tüpüne 500  $\mu$ L yıkama tamponu-2 (Buffer RPE) eklendi ve 2 dakika 12 000 rpm'de santrifüj yapıldı. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilerek 1 dakika 12 000 rpm'de santrifüj tekrarlandı.

7. Son olarak filtre tüpü 1,5 mL'lik toplama tüpü içerisine yerleştirilerek, içerisine 30  $\mu$ L RNase içermeyen su (RNase-free water) konuldu ve 1 dakika 12 000 rpm'de santrifüj yapılarak RNA'nın toplama tüpünde birikmesi sağlandı.

Sonuç olarak, 5 adet DPKH için ve 5 adet PDLKH için toplam 10 tüp olacak şekilde total RNA elde edildi. Her tüpten 3  $\mu\text{L}$  alınarak kütle spektrofotometre cihazında (Nanodrop 2000, Thermo Scientific; Delaware, Amerika) RNA kütle ölçümleri yapıldı (Resim 22) ve tüpteki RNA'lar buz içerisinde bekletilerek cDNA sentezi işlemine geçildi.



**Resim 22.** RNA kütle ölçümlerinin yapılması

#### **5.6.4.2. cDNA sentezinin yapılması**

Bu aşamada cDNA sentez kiti (Fermentas RevertAid First Strand, Thermo; Amerika) kullanıldı. Kite göre her bir RNA örneği için aşağıda belirtilen miktarlarda ana karışım hazırlandı:

- Reverse Transkriptaz buffer: 4  $\mu\text{L}$
- Reverse Transkriptaz enzim: 1  $\mu\text{L}$
- RNase inhibitör: 1  $\mu\text{L}$
- dNTP: 2  $\mu\text{L}$

Her örnek için, RNA, distile su ve kit içerisinde yer alan Random Hexamer Primer'den (1  $\mu\text{L}$ ) alınarak 12'şer  $\mu\text{L}$ 'lik karışım oluşturuldu. Bu karışımın üzerine 8'er  $\mu\text{L}$  ana karışımdan ilave edildi. Elde edilen toplam 20  $\mu\text{L}$ 'lik karışımın PZR cihazında (MyCycler, BIORAD, California, Amerika) 5 dakika boyunca 22°C'de, 30 dakika boyunca 42°C'de ve son olarak 4°C'de inkübe edilmesiyle cDNA'ların sentezi gerçekleştirildi (Resim 23). cDNA'lar deney günü kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.



**Resim 23.** PZR cihazında cDNA sentezinin yapılması

#### 5.6.4.3. Primerlerin hazırlanması

Gerçek Zamanlı PZR analizinde, hücrelerdeki farklılaşmaya özgü olan gen aktivitesinin saptanması amacıyla spesifik primerler kullanıldı. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geni, örneklerden alınan RNA'ların normalizasyonu için standart olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler ve referansları:

<b>Kollajen tip I</b>	<b>Forward:</b> 5'- CCACGCATGAGCGGACCCTAA -3' <b>Reverse:</b> 5'- ATTGGTGGGATGTCTTCGTCTTGG -3'
<b>DSPP</b>	<b>Forward:</b> 5'- GCTGTCACTGGGGTCTTCAT -3' <b>Reverse:</b> 5'- GCTGTCACTGGGGTCTTCAT -3'
<b>DMP1</b>	<b>Forward:</b> 5'- TGGGGATTATCCTGTGCTCT -3' <b>Reverse:</b> 5'- GCTGTCACTGGGGTCTTCAT -3'
<b>ON</b>	<b>Forward:</b> 5'- GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT -3' <b>Reverse:</b> 5'- TCAGCCAACCTCGTCACAGTC -3'

<b>OK</b>	<b>Forward:</b> 5'- GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT -3'
	<b>Reverse:</b> 5'- TCAGCCAACTCGTCACAGTC -3'
<b>GAPDH</b>	<b>Forward:</b> 5'- TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'
	<b>Reverse:</b> 5'- GCAGGGATGATGTTCTGGA-3'

Primerler, üretici firmanın talimatları doğrultusunda distile su ile sulandırılarak hazır hale getirildi. Optimum çalışma sıcaklığının tespiti amacıyla 50°C ile 60°C arasındaki sıcaklığın denendiği bir gradyan PZR yapıldı ve buna göre Gerçek Zamanlı PZR analizinde kullanılacak bağlanma sıcaklığı 58°C olarak belirlendi.

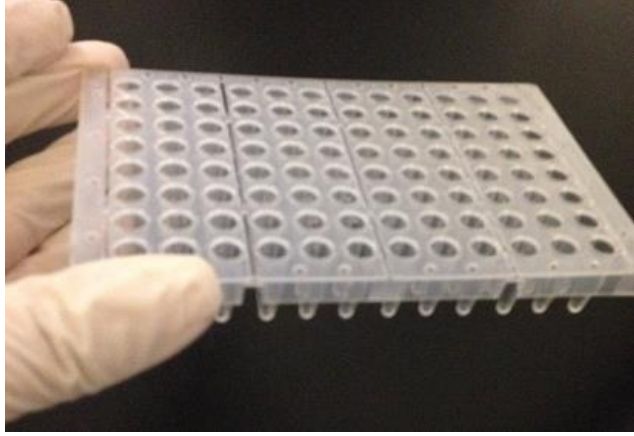
#### 5.6.4.4. Reaksiyon karışımının hazırlanması

Gerçek Zamanlı PZR analizinin gerçekleştirilmesinde SYBR Green (Maxima, Thermo, Amerika) kiti kullanıldı. Üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda, 96 bölmeli reaksiyon plağında örnek başına hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3'te gösterilmektedir.

**Tablo 3.** Örnek başına hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı İçeriği	1 kuyucuktaki miktar	Ana karışım (1 kuyucuktaki) 8 µL
SYBR Green buffer	5 µL	
Primer forward	0,5 µL	
Primer reverse	0,5 µL	
Distile su	2 µL	
cDNA örneği (200 ng/µL)	2 µL	
<b>TOPLAM</b>	<b>10 µL</b>	

Gerçek Zamanlı PZR işlemi için deney grubu başına 4 tekrarlı analiz yapılması planlandı. Buna göre DPKH ve PDLKH grupları için iki ayrı reaksiyon karışımı hazırlanarak, karışımlar 96 bölmeli reaksiyon plağına yerleştirildi (Resim 24). Hazırlanan reaksiyon plaklarında, standart örneklerin bulunduğu kuyucuklara cDNA örneği konmadı (Tablo 4, 5).



**Resim 24.** Reaksiyon karışımının 96 bölmeli reaksiyon plağına yerleştirilmesi

**Tablo 4.** DPKH grubu için hazırlanan reaksiyon plağı

Kollajen tip I				DSPP				DMP1				
G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1= Grup 1
G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2= Grup 2
G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3= Grup 3
PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK= (+) Kontrol
NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK= (-) Kontrol
G1	G1	G1	G1	PK	PK	PK	PK	S1	S1	S1	S1	S1: GAPDH/10
G2	G2	G2	G2	NK	NK	NK	NK	S2	S2	S2	S2	S2: GAPDH/100
G3	G3	G3	G3	S3	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S4	S3: GAPDH/1000 S4: GAPDH/100 000
<b>GAPDH</b>				<b>Standart</b>								

**Tablo 5.** PDLKH grubu için hazırlanan reaksiyon plağı

Kollajen tip I				ON				OK				
G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1= Grup 1
G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2	G2= Grup 2
G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3	G3= Grup 3
PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK= (+) Kontrol
NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK= (-) Kontrol
G1	G1	G1	G1	PK	PK	PK	PK	S1	S1	S1	S1	S1: GAPDH/10
G2	G2	G2	G2	NK	NK	NK	NK	S2	S2	S2	S2	S2: GAPDH/100
G3	G3	G3	G3	S3	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S4	S3: GAPDH/1000 S4: GAPDH/100 000

**GAPDH** **Standart**

Son olarak, hazırlanan reaksiyon plakları optikal film ile kaplandıktan sonra Gerçek Zamanlı PZR cihazına (iCycler Real Time PCR Detection System, Bio-Rad, California, Amerika) yerleştirilerek okutuldu (Resim 25).



**Resim 25.** Reaksiyon plağının Gerçek Zamanlı PZR cihazına yerleştirilerek okutulması

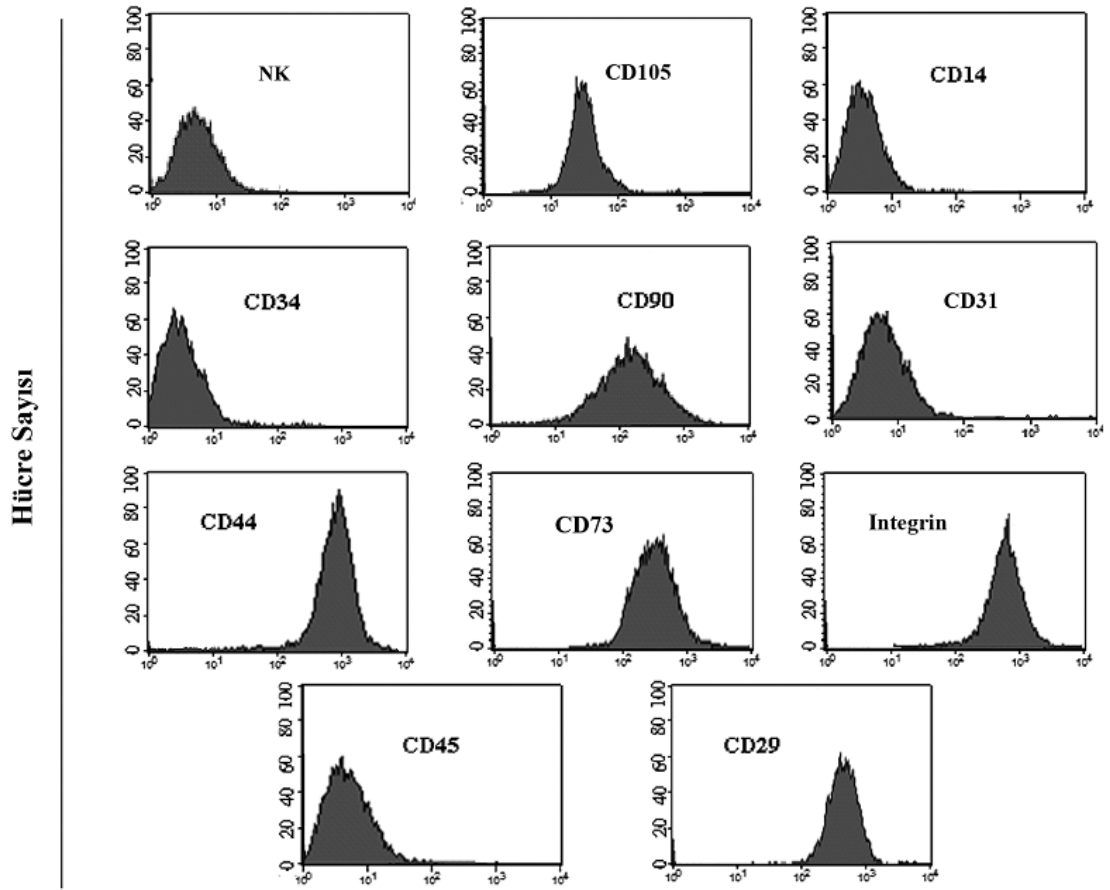
## 5.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Parametreler normal dağılıma uygunluk göstermediğinden, çalışma verilerinin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

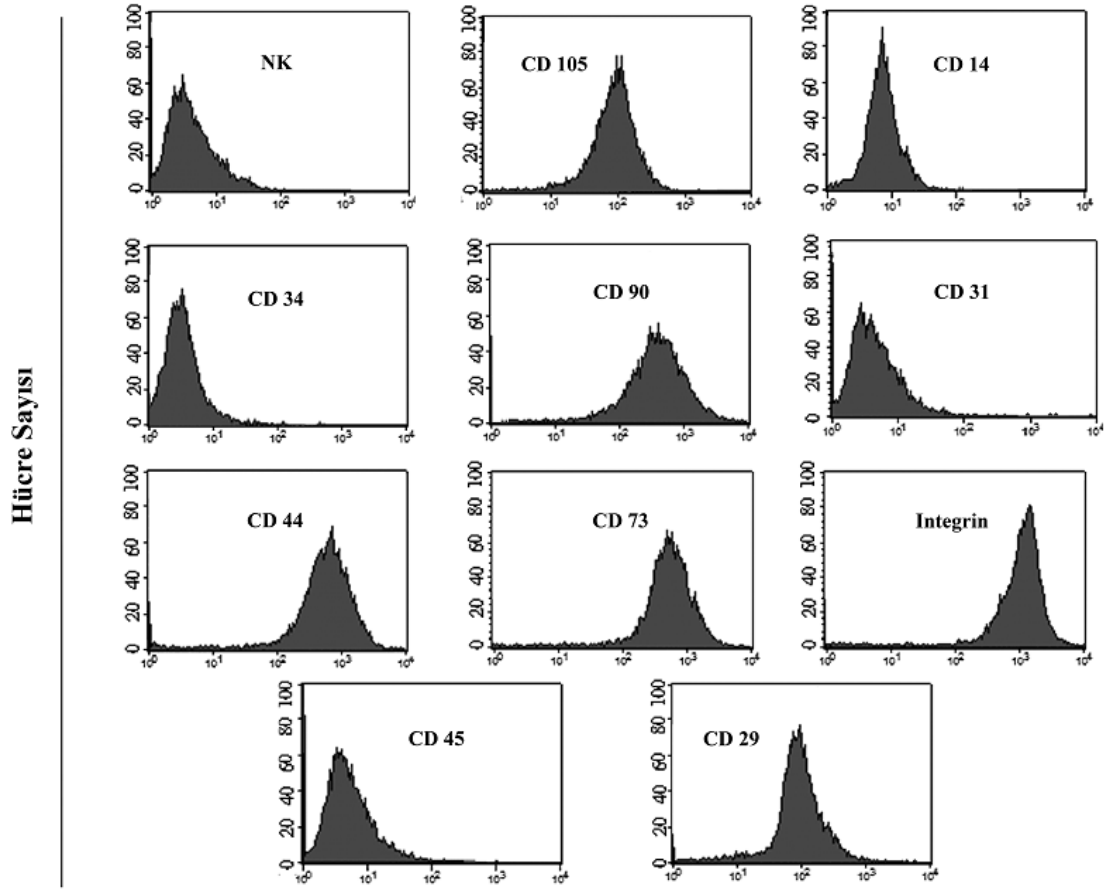
## 6. BULGULAR

### 6.1. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları

İnsan diş pulpası ve PDL dokularından kültüre edilmiş DPKH ve PDLKH'nin karakterizasyonu için yapılan akım sitometri değerlendirmeleri sonucunda, bu hücrelerin, hematopoetik hücre belirteci olan CD14, CD34, CD45 ile endotelial hücre belirteci olan CD31 yüzey antijenleri için negatif olduğu; MKH belirteci olan CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenleri için ise yüksek düzeyde pozitiflik gösterdiği görüldü (Şekil 8, 9).



Şekil 8. DPKH'nin akım sitometri analizi sonuçları



**Şekil 9.** PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları

## 6.2. MTS Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerine olası toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan MTS testi ile 1., 3., 7., 10. ve 14. günlerde çalışma gruplarının hücre canlılık düzeyleri saptandı.

### 6.2.1. DPKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları

DPKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları incelendiğinde 1., 3., 7., 10. ve 14. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılıklar saptandı ( $p < 0.01$ ) (Tablo 6).

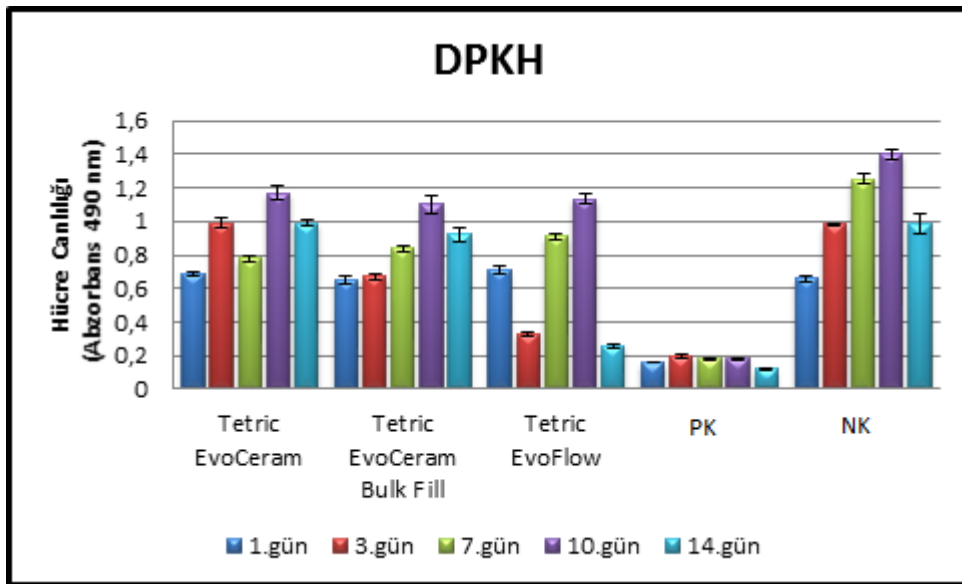
**Tablo 6.** DPKH kültüründen 1., 3., 7., 10. ve 14. günler için elde edilen MTS test sonuçları

DPKH	Tetric EvoCeram	Tetric EvoCeram Bulk Fill	Tetric EvoFlow	PK	NK	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
1.gün	0,69±0,01 (0,69)	0,65±0,02 (0,65)	0,71±0,02 (0,71)	0,16±0 (0,16)	0,66±0,02 (0,66)	0,002**
3.gün	0,99±0,03 (1)	0,67±0,02 (0,67)	0,33±0,01 (0,34)	0,2±0,01 (0,2)	0,98±0,01 (0,97)	0,002**
7.gün	0,78±0,02 (0,78)	0,84±0,02 (0,84)	0,91±0,02 (0,91)	0,18±0,01 (0,19)	1,25±0,03 (1,27)	0,001**
10.gün	1,17±0,04 (1,19)	1,1±0,05 (1,09)	1,13±0,03 (1,13)	0,18±0,01 (0,18)	1,4±0,03 (1,41)	0,003**
14.gün	0,99±0,02 (0,98)	0,92±0,04 (0,94)	0,26±0,01 (0,26)	0,12±0,01 (0,12)	0,98±0,06 (1,01)	0,002**
p	0,002**	0,001**	0,001**	0,002**	0,001**	

Kruskal Wallis Test

\*\* p<0.01

MTS testi ile gruplar arası tespit edilen DPKH'nin canlılık düzeyi Şekil 10'da gösterilmektedir.



**Şekil 10.** MTS testi ile farklı süreler sonunda tespit edilen DPKH'nin canlılık düzeyleri

DPKH kültüründe günler arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Testi sonucunda; bütün günler için tüm grupların hücre canlılık düzeyi PK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo 7).

Birinci günde, Tetric EvoFlow grubundaki hücrelerin canlılık düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun sonucu Tetric EvoCeram ve Tetric EvoFlow gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

Üçüncü günde, Tetric EvoFlow grubunun hücre canlılık düzeyi Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve NK gruplarından; Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun canlılık düzeyi ise Tetric EvoCeram ve NK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram ile NK gruplarının sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

Yedinci günde, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Kompozit grupları arasında, Tetric EvoCeram grubunun sonucu Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow gruplarından; Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun sonucu Tetric EvoFlow grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo 7).

Onuncu günde, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), kompozit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

On dördüncü günde, Tetric EvoFlow grubunun hücre canlılık düzeyi Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve NK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram grubunun sonucu Tetric EvoCeram Bulk Fill grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7.** DPKH'ne ait MTS test sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması

	1.GÜN	3.GÜN	7.GÜN	10.GÜN	14.GÜN
	P	P	P	P	P
<b>G1-G2</b>	0,021*	0,020*	0,019*	0,083	0,021*
<b>G1-G3</b>	0,083	0,020*	0,020*	0,149	0,021*
<b>G1-G4</b>	0,020*	0,019*	0,018*	0,021*	0,021*
<b>G1-G5</b>	0,059	0,384	0,021*	0,021*	0,773
<b>G2-G3</b>	0,021*	0,021*	0,019*	0,386	0,021*
<b>G2-G4</b>	0,020*	0,020*	0,017*	0,021*	0,021*
<b>G2-G5</b>	0,468	0,021*	0,019*	0,021*	0,149
<b>G3-G4</b>	0,020*	0,020*	0,017*	0,021*	0,021*
<b>G3-G5</b>	0,021*	0,021*	0,020*	0,021*	0,021*
<b>G4-G5</b>	0,020*	0,020*	0,018*	0,021*	0,021*

*Mann Whitney U Test*

*\*p<0.05*

**G1:** Tetric EvoCeram; **G2:** Tetric EvoCeram Bulk Fill; **G3:** Tetric EvoFlow; **G4:** PK; **G5:** NK

Deney grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, tüm grupların günler arası sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ( $p<0.01$ ) (Tablo 6). Farklılığın hangi günden kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; *Tetric EvoCeram* ve *NK grubunda* 3. gün ve 14. gün MTS sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ( $p>0.05$ ), diğer günler arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı ( $p<0.05$ ). *Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunda*, 1. gün ve 3. gün MTS sonuçları arasında anlamlı farklılık bulunmazken ( $p>0.05$ ), diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık bulundu ( $p<0.05$ ). *Tetric EvoFlow grubunda*, tüm günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ( $p<0.05$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8.** DPKH'ne ait MTS test sonuçlarının günler arası ikili karşılaştırması

	<b>Tetric EvoCeram</b>	<b>Tetric EvoCeram Bulk Fill</b>	<b>Tetric EvoFlow</b>	<b>PK</b>	<b>NK</b>
	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
<b>1.gün-3.gün</b>	0,020*	0,248	0,021*	0,019*	0,021*
<b>1.gün-7.gün</b>	0,021*	0,019*	0,020*	0,017*	0,021*
<b>1.gün-10.gün</b>	0,021*	0,021*	0,021*	0,020*	0,021*
<b>1.gün-14.gün</b>	0,021*	0,021*	0,021*	0,020*	0,021*
<b>3.gün-7.gün</b>	0,020*	0,019*	0,020*	0,017*	0,021*
<b>3.gün-10.gün</b>	0,020*	0,021*	0,021*	0,042*	0,021*
<b>3.gün-14.gün</b>	1,000	0,021*	0,021*	0,020*	0,248
<b>7.gün-10.gün</b>	0,021*	0,019*	0,020*	0,767	0,021*
<b>7.gün-14.gün</b>	0,021*	0,019*	0,020*	0,018*	0,021*
<b>10.gün- 14.gün</b>	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*

*Mann Whitney U Test* \*  $p < 0.05$

### 6.2.2. PDLKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları

PDLKH kültüründen elde edilen MTS test sonuçları incelendiğinde 1., 3., 7., 10. ve 14. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılıklar saptandı ( $p < 0.01$ ) (Tablo 9).

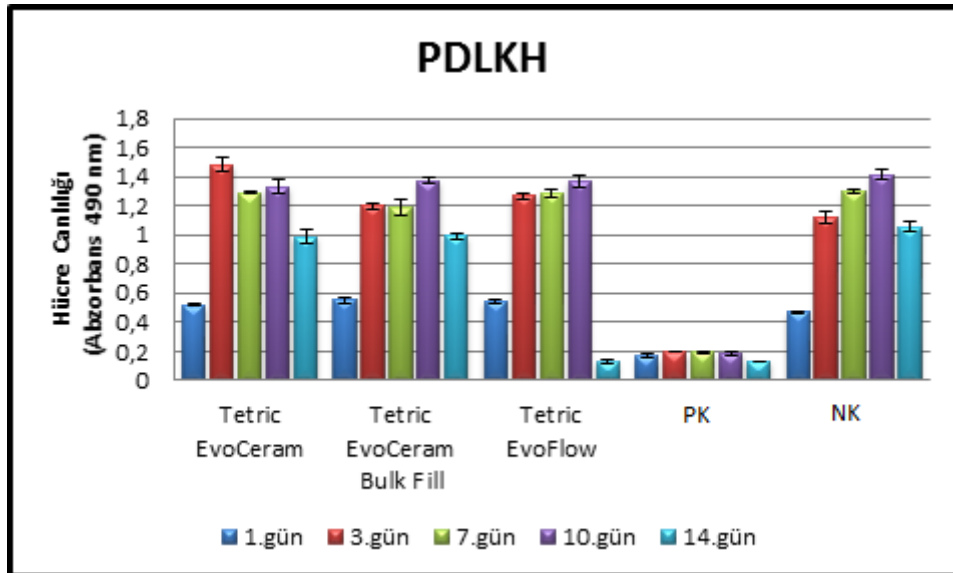
**Tablo 9.** PDLKH kültüründen 1., 3., 7., 10. ve 14. günler için elde edilen MTS test sonuçları

PDLKH	Tetric EvoCeram	Tetric EvoCeram Bulk Fill	Tetric EvoFlow	PK	NK	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
1.gün	0,52±0,01 (0,517)	0,551±0,02 (0,551)	0,543±0,01 (0,55)	0,169±0,01 (0,167)	0,467±0,01 (0,466)	0,002 **
3.gün	1,48±0,05 (1,459)	1,197±0,02 (1,2)	1,265±0,02 (1,268)	0,195±0 (0,196)	1,119±0,04 (1,104)	0,001 **
7.gün	1,291±0,01 (1,289)	1,19±0,06 (1,207)	1,287±0,03 (1,279)	0,192±0,01 (0,19)	1,3±0,01 (1,301)	0,004 **
10.gün	1,329±0,05 (1,346)	1,374±0,02 (1,376)	1,373±0,04 (1,364)	0,187±0,01 (0,186)	1,415±0,04 (1,41)	0,007 **
14.gün	0,985±0,05 (1,01)	0,994±0,02 (0,999)	0,13±0,01 (0,133)	0,134±0 (0,135)	1,056±0,03 (1,067)	0,002 **
p	0,001**	0,002**	0,002**	0,003**	0,001**	

Kruskal Wallis Test

\*\* p<0.01

MTS testi ile gruplar arası tespit edilen PDLKH'nin canlılık düzeyleri Şekil 11'de gösterilmektedir.



**Şekil 11.** MTS testi ile farklı süreler sonunda tespit edilen PDLKH'nin canlılık düzeyleri

PDLKH kültüründe günler arası farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; PK grubunun hücre canlılık düzeyi 14. gün haricinde bütün gruplardan istatistiksel olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo 10).

Birinci günde, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyi, NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Kompozit grupları arasında Tetric EvoCeram grubunun sonucu Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), Tetric EvoCeram Bulk Fill ile Tetric EvoFlow gruplarının sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 10).

Üçüncü günde, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Kompozit grupları arasında Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun sonucu Tetric EvoCeram ve Tetric EvoFlow gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), Tetric EvoCeram grubunun sonucu, Tetric EvoFlow grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo 10).

Yedinci günde, Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun hücre canlılık düzeyi Tetric EvoCeram, Tetric EvoFlow ve NK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 10).

Onuncu günde, Tetric EvoCeram grubunun hücre canlılık düzeyi Tetric EvoCeram Bulk Fill ve NK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 10).

On dördüncü günde, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram ve Tetric EvoCeram Bulk Fill gruplarının sonuçları Tetric EvoFlow ve PK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** PDLKH'ye ait MTS test sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması

	1.GÜN	3.GÜN	7.GÜN	10.GÜN	14.GÜN
	P	P	P	P	P
G1-G2	0,043*	0,020*	0,021*	0,043*	0,564
G1-G3	0,042*	0,020*	0,309	0,248	0,020*
G1-G4	0,020*	0,017*	0,021*	0,021*	0,020*
G1-G5	0,021*	0,020*	0,149	0,021*	0,043*
G2-G3	0,561	0,021*	0,021*	0,773	0,020*
G2-G4	0,020*	0,018*	0,021*	0,021*	0,020*
G2-G5	0,021*	0,043*	0,021*	0,149	0,021*
G3-G4	0,019*	0,018*	0,021*	0,021*	0,225
G3-G5	0,020*	0,021*	0,248	0,191	0,020*
G4-G5	0,020*	0,018*	0,021*	0,021*	0,020*

Mann Whitney U Test \* p<0.05

**G1:** Tetric EvoCeram; **G2:** Tetric EvoCeram Bulk Fill; **G3:** Tetric EvoFlow; **G4:** PK; **G5:** NK

Deney grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde, tüm grupların günler arası sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ( $p<0.01$ ) (Tablo 9). Farklılığın hangi günden kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; **Tetric EvoCeram**, **Tetric EvoCeram Bulk Fill** ve **NK grubunda**, tüm günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $p<0.05$ ). **Tetric EvoFlow grubunda**, 3. ve 7. günler arasında anlamlı bir fark bulunmazken ( $p>0.05$ ), diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğu saptandı ( $p<0.05$ ) (Tablo 11).

**Tablo 11.** PDLKH'ye ait MTS test sonuçlarının günler arası ikili karşılaştırması

	Tetric EvoCeram	Tetric EvoCeram Bulk Fill	Tetric EvoFlow	PK	NK
	P	P	P	P	P
1.gün-3.gün	0,020*	0,021*	0,020*	0,017*	0,021*
1.gün-7.gün	0,021*	0,021*	0,020*	0,020*	0,021*
1.gün-10.gün	0,021*	0,021*	0,020*	0,020*	0,021*
1.gün-14.gün	0,021*	0,021*	0,019*	0,019*	0,021*
3.gün-7.gün	0,020*	0,773	0,564	0,375	0,021*
3.gün-10.gün	0,020*	0,021*	0,021*	0,038*	0,021*
3.gün-14.gün	0,020*	0,021*	0,020*	0,017*	0,021*
7.gün-10.gün	0,248	0,021*	0,021*	0,309	0,021*
7.gün-14.gün	0,021*	0,021*	0,020*	0,020*	0,021*
10.gün- 14.gün	0,021*	0,021*	0,020*	0,020*	0,021*

Mann Whitney U Test \* p<0.05

### 6.3. Odontojenik ve Osteojenik Farklılaşma Deneylerinin Sonuçları

DPKH'nin odontojenik, PDLKH'nin osteojenik farklılaşmasının sağlandığı 14 günlük farklılaşma deneyinin sonunda, çalışmada kullanılan kompozit dolgu materyallerinin bu hücrelerin farklılaşma potansiyeline olan etkileri değerlendirildi. Bu amaçla hücre kültürlerinden elde edilen ALP aktivite testi, ALR boyama ve Gerçek Zamanlı PZR sonuçları analiz edildi.

#### 6.3.1. ALP aktivite testi sonuçları

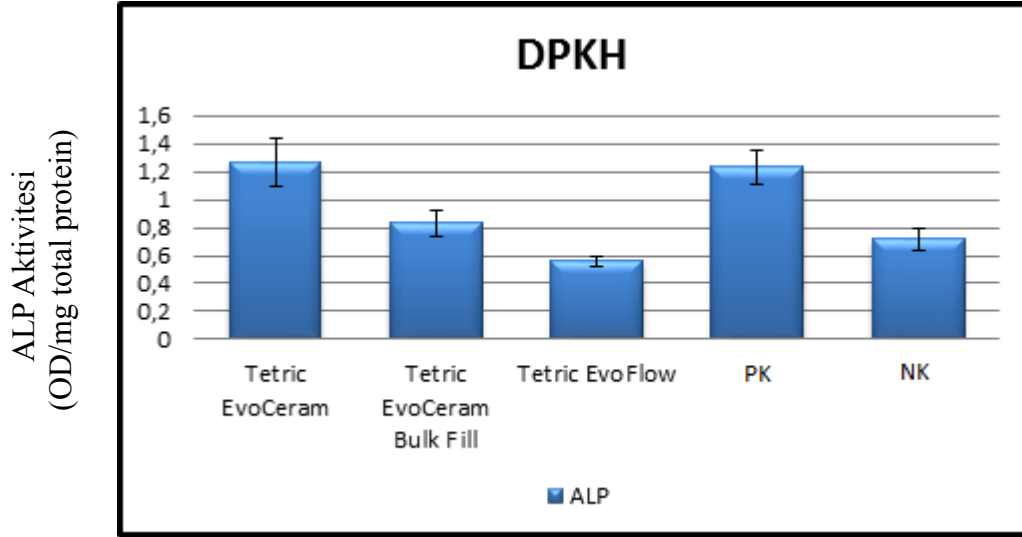
Yapılan ALP aktivite testi analizinde, DPKH ve PDLKH kültürlerinde, gruplar arası ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0.01$ ) (Tablo 12).

**Tablo 12.** ALP aktivite test sonuçlarının değerlendirilmesi

	ALP	
	DPKH	PDLKH
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)
<b>Tetric EvoCeram</b>	1,27±0,17 (1,29)	1,21±0,10 (1,22)
<b>Tetric EvoCeram Bulk Fill</b>	0,83±0,09 (0,82)	1,13±0,09 (1,17)
<b>Tetric EvoFlow</b>	0,56±0,04 (0,57)	1,22±0,08 (1,25)
<b>PK</b>	1,23±0,12 (1,18)	1,61±0,07 (1,57)
<b>NK</b>	0,72±0,08 (0,74)	0,24±0,03 (0,24)
<b>p</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,006**</b>

*Kruskall-Wallis Test      \*\*p<0.01*

DPKH kültüründen tayin edilen ALP düzeyleri Şekil 12’de gösterilmektedir.



Şekil 12. DPKH kültürü için ALP aktivite test sonuçlarının karşılaştırılması

DPKH’de farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; Tetric EvoFlow grubunun ALP düzeyi, bütün gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0.01$ ). Tetric EvoCeram Bulk Fill ile NK gruplarının ALP düzeyi, Tetric EvoCeram ve PK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p < 0.01$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 13).

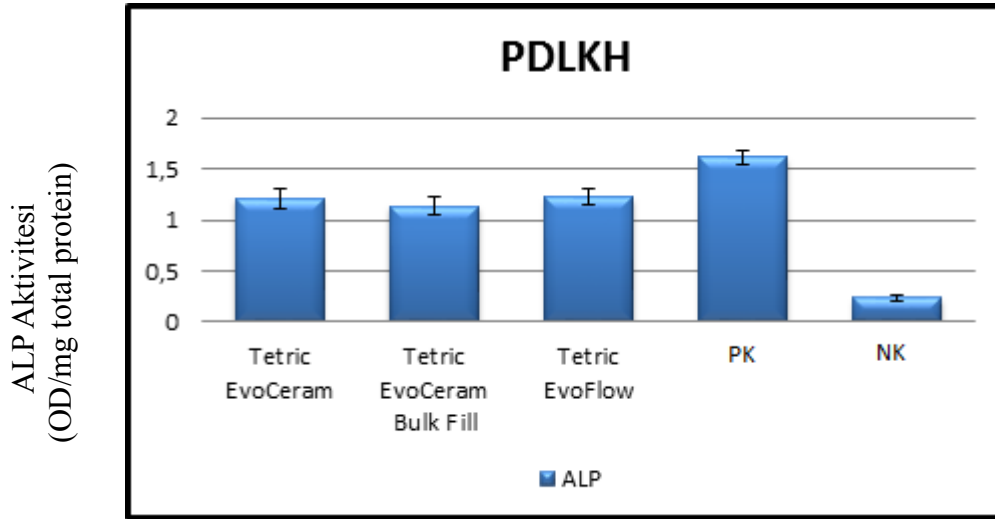
**Tablo 13.** ALP aktivite testi sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması

ALP		
	DPKH	PDLKH
	p	p
G1-G2	0,009**	0,175
G1-G3	0,009**	0,917
G1-G4	0,465	0,009**
G1-G5	0,009**	0,009**
G2-G3	0,009**	0,047*
G2-G4	0,009**	0,009**
G2-G5	0,117	0,009**
G3-G4	0,009**	0,009**
G3-G5	0,009**	0,009**
G4-G5	0,009**	0,009**

*Mann Whitney U Test* \*\* $p < 0.01$  \* $p < 0.05$

G1: Tetric EvoCeram; G2: Tetric EvoCeram Bulk Fill;  
G3: Tetric EvoFlow; G4: PK; G5: NK

PDLKH kültüründen tayin edilen ALP düzeyleri Şekil 13'te gösterilmektedir.



**Şekil 13.** PDLKH kültürü için ALP aktivite test sonuçlarının karşılaştırılması

PDLKH’de farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda ise; kompozit gruplarının ALP düzeyi, PK grubundan istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düzeyde düşük bulunurken ( $p<0.01$ ), NK grubundan istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.01$ ). Tetric EvoFlow grubunun ALP düzeyi, Tetric EvoCeram Bulk Fill grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 13).

### 6.3.2. ALR boyama görüntüleri

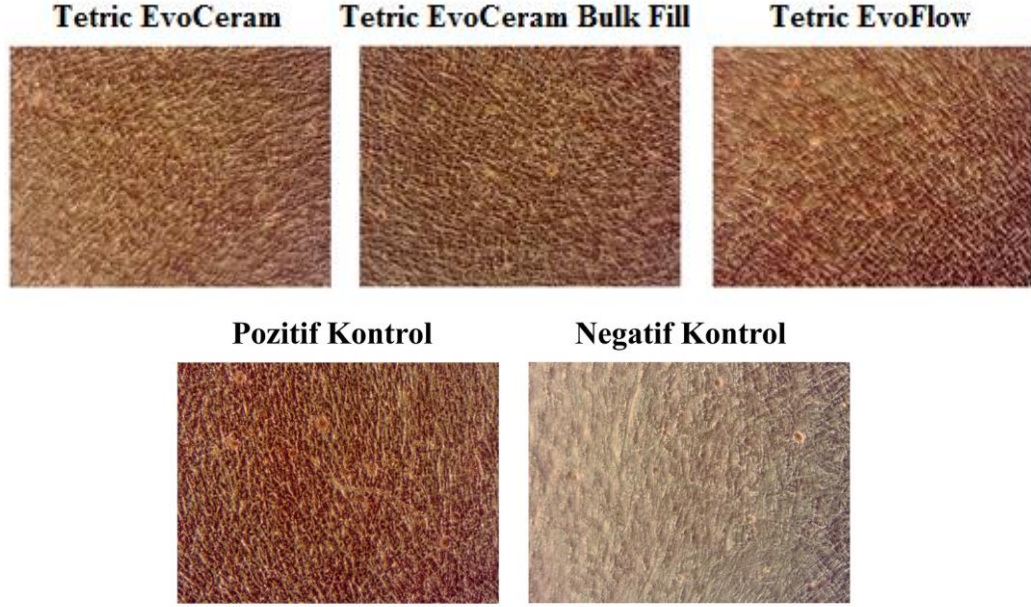
On dört günlük farklılaşma deneyinin sonunda, ALR boyaması yapılarak hücre kültüründe saptanan kalsifikasyon yoğunluğu invert mikroskop yardımıyla görüntülendi ve bilgisayara kaydedildi.

DPKH’nin odontojenik farklılaştırılması sonucunda alınan görüntülerde, boyanma en fazla PK grubunda saptanırken, en az boyanma NK grubunda saptandı. Kompozit grupları arasında benzer görüntü izlendi (Resim 26).



**Resim 26.** ALR boyaması sonucunda DPKH’den elde edilen invert mikroskop görüntüleri (10x büyütme)

PDLKH'nin osteojenik farklılaşmaya uğratılması sonucunda alınan görüntülerde, boyanma en fazla PK grubunda saptanırken, en az boyanma NK grubunda saptandı. Kompozit grupları arasında benzer görüntü izlendi (Resim 27).



**Resim 27.** ALR boyaması sonucunda PDLKH'den elde edilen invert mikroskop görüntüleri (10x büyütme)

### 6.3.3. Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

Gerçek Zamanlı PZR analizinde, odontojenik farklılaşmaya uğratılan DPKH kültüründen kollajen tip I, DSPP ve DMP1 varlığında sentez edilen DNA miktarları; osteojenik farklılaşmaya uğratılan PDLKH kültüründen ise kollajen tip I, OK ve ON varlığında sentez edilen DNA miktarları saptanarak hücrelerin gruplar arası farklılaşma kapasiteleri değerlendirildi.

#### 6.3.3.1. DPKH'nin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

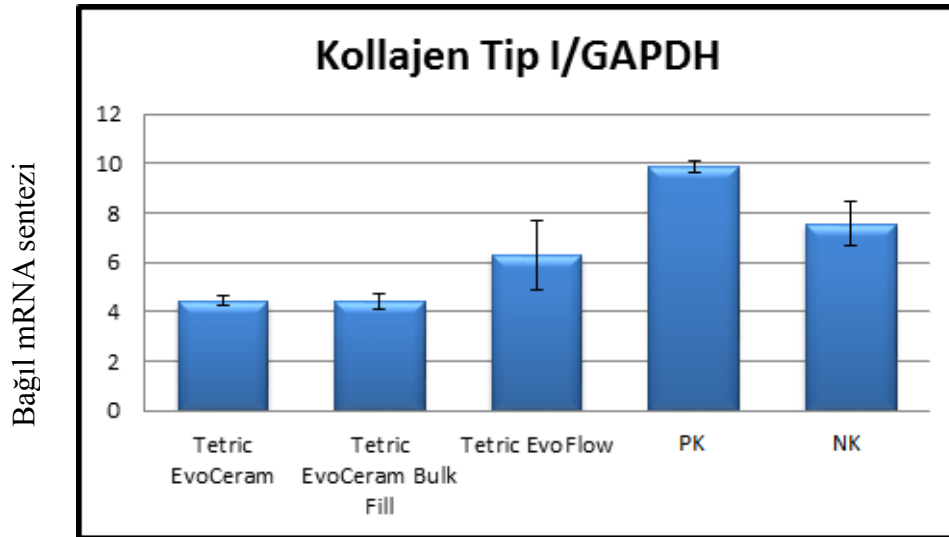
DPKH'nin Gerçek Zamanlı PZR analizinde, çalışma gruplarına ait hücrelerden sentezlenen kollajen Tip I, DSPP ve DMP1 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılıklar saptandı ( $p < 0.01$ ) (Tablo 14).

**Tablo 14.** DPKH grubunun Gerçek Zamanlı PZR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

DPKH	Kollajen	DSPP/GAPDH	DMP1/GAPDH
	TipI/GAPDH		
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)
<b>Tetric EvoCeram</b>	4,434±0,196 (4,445)	0,002±0 (0,002)	0,013±0,003 (0,013)
<b>Tetric EvoCeram Bulk Fill</b>	4,437±0,299 (4,305)	0,001±0 (0,001)	0,015±0,004 (0,017)
<b>Tetric EvoFlow</b>	6,303±1,405 (6,524)	0,007±0,005 (0,007)	0,037±0,008 (0,038)
<b>PK</b>	9,869±0,257 (9,817)	0,14±0,01 (0,141)	0,061±0,007 (0,061)
<b>NK</b>	7,565±0,933 (7,479)	0,003±0,002 (0,003)	0,01±0,002 (0,01)
<b>p</b>	<b>0,004**</b>	<b>0,017*</b>	<b>0,006**</b>

*Kruskall-Wallis Test    \*\*p<0.01    \*p<0.05*

DPKH kültüründen gruplar arası tayin edilen kollajen tip I düzeyleri Şekil 14'te gösterilmektedir.



**Şekil 14.** DPKH kültüründen tayin edilen Kollajen tip I düzeylerinin karşılaştırılması

Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; DPKH kültüründen tayin edilen kollajen tip I düzeyleri incelendiğinde, PK grubunun kollajen tip I düzeyi, bütün gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram ve Tetric EvoCeram Bulk Fill gruplarının kollajen tip I düzeyi, NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoFlow grubunun kollajen tip I düzeyi, Tetric EvoCeram grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 15).

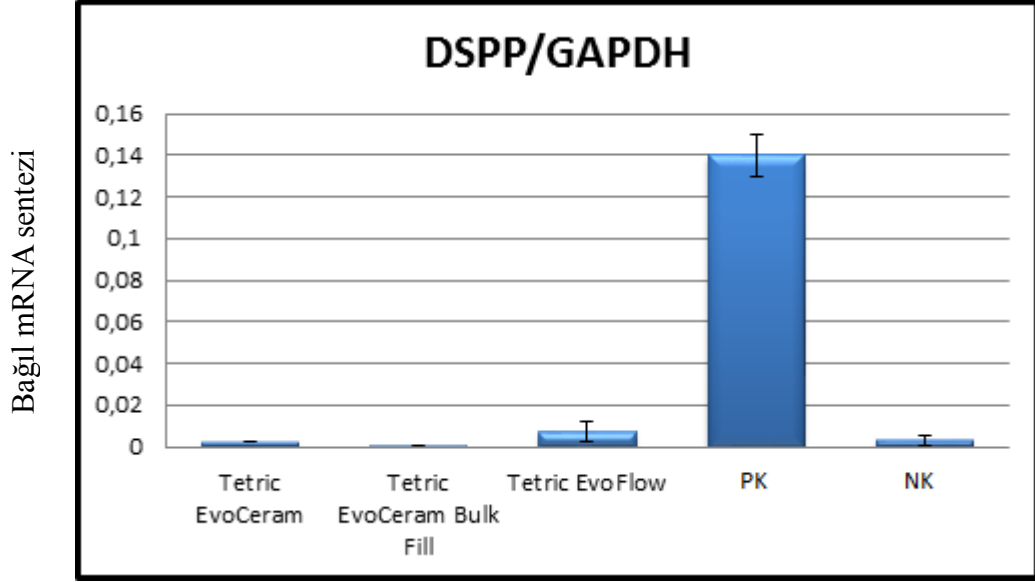
**Tablo 15.** DPKH'ye ait Gerçek Zamanlı PZR analiz sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması

	<b>Kollajen</b>	<b>DSPP/GAPDH</b>	<b>DMP1/GAPDH</b>
	<b>TipI/GAPDH</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>G1-G2</b>	1,000	0,049*	0,386
<b>G1-G3</b>	0,034*	0,048*	0,034*
<b>G1-G4</b>	0,021*	0,034*	0,021*
<b>G1-G5</b>	0,021*	0,513	0,149
<b>G2-G3</b>	0,077	0,049*	0,034*
<b>G2-G4</b>	0,021*	0,034*	0,021*
<b>G2-G5</b>	0,021*	0,513	0,149
<b>G3-G4</b>	0,034*	0,034*	0,034*
<b>G3-G5</b>	0,157	0,275	0,034*
<b>G4-G5</b>	0,021*	0,034*	0,021*

*Mann Whitney U Test* \*  $p<0.05$

**G1:** Tetric EvoCeram; **G2:** Tetric EvoCeram Bulk Fill; **G3:** Tetric EvoFlow; **G4:** PK; **G5:** NK

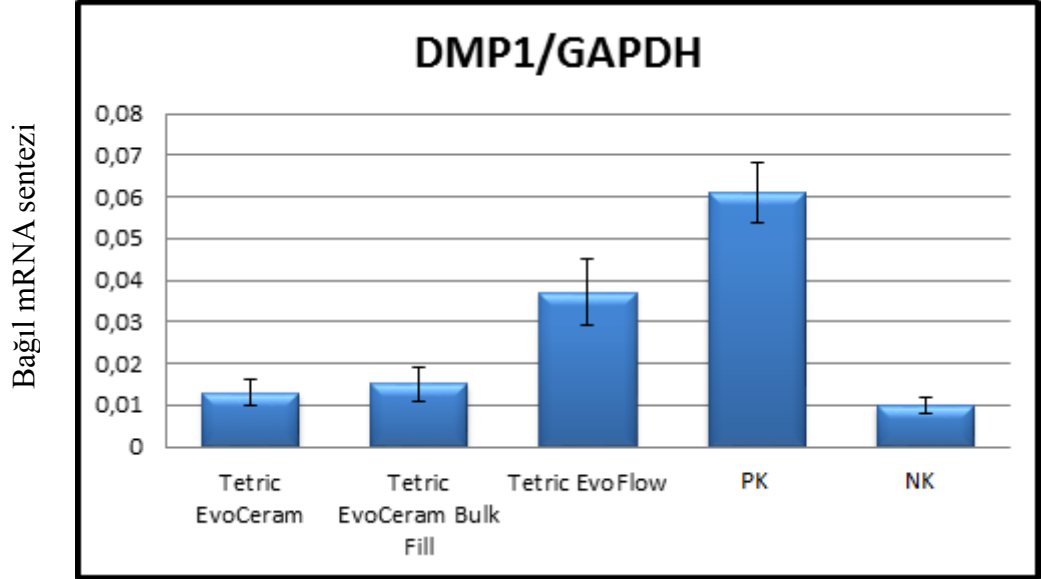
DPKH kültüründen gruplar arası tayin edilen DSPP düzeyleri Şekil 15'te gösterilmektedir.



Şekil 15. DPKH kültüründen tayin edilen DSPP düzeylerinin karşılaştırılması

DPKH kültüründen tayin edilen DSPP düzeyleri açısından farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; bütün grupların DSPP düzeyi PK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0.05$ ). Tetric EvoFlow grubunun DSPP düzeyi, Tetric EvoCeram ve Tetric EvoCeram Bulk Fill gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulursa da ( $p < 0.05$ ), kompozit grupları ile NK grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 15).

DPKH kültüründen gruplar arası tayin edilen DMP1 düzeyleri Şekil 16'da gösterilmektedir.



Şekil 16. DPKH kültüründen tayin edilen DMP1 düzeylerinin karşılaştırılması

DPKH kültüründen tayin edilen DMP1 düzeyleri açısından farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; tüm grupların DMP1 düzeyi PK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0.05$ ). Tetric EvoFlow grubunun DMP1 düzeyi Tetric EvoCeram, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve NK gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p < 0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 15).

### 6.3.3.2. PDLKH'nin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

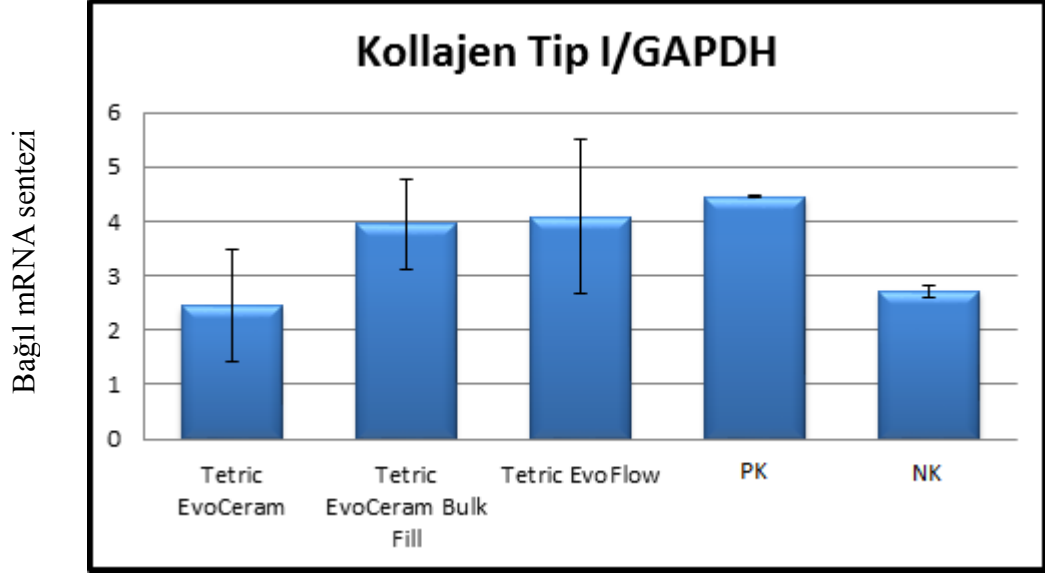
PDLKH'nin Gerçek Zamanlı PZR analizinde, çalışma gruplarına ait hücrelerden sentezlenen kollajen tip I düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ( $p>0.05$ ); OK ve ON düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0.05$ ) (Tablo 16).

**Tablo 16.** PDLKH grubunun Gerçek Zamanlı PZR analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

PDLKH	Kollajen	OK/GAPDH	ON/GAPDH
	Tip I/GAPDH		
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)
Tetric EvoCeram	2,448±1,024 (2,407)	0,002±0,001 (0,002)	0,638±0,225 (0,676)
Tetric EvoCeram Bulk Fill	3,943±0,839 (3,772)	0,002±0 (0,002)	0,773±0,137 (0,712)
Tetric EvoFlow	4,089±1,406 (4,185)	0,003±0,001 (0,003)	0,93±0,297 (0,931)
PK	4,441±0,018 (4,452)	0,005±0 (0,005)	0,790±0,01 (0,791)
NK	2,72±0,112 (2,666)	0,001±0 (0,001)	0,363±0,052 (0,337)
<b>p</b>	<b>0,114</b>	<b>0,013*</b>	<b>0,049*</b>

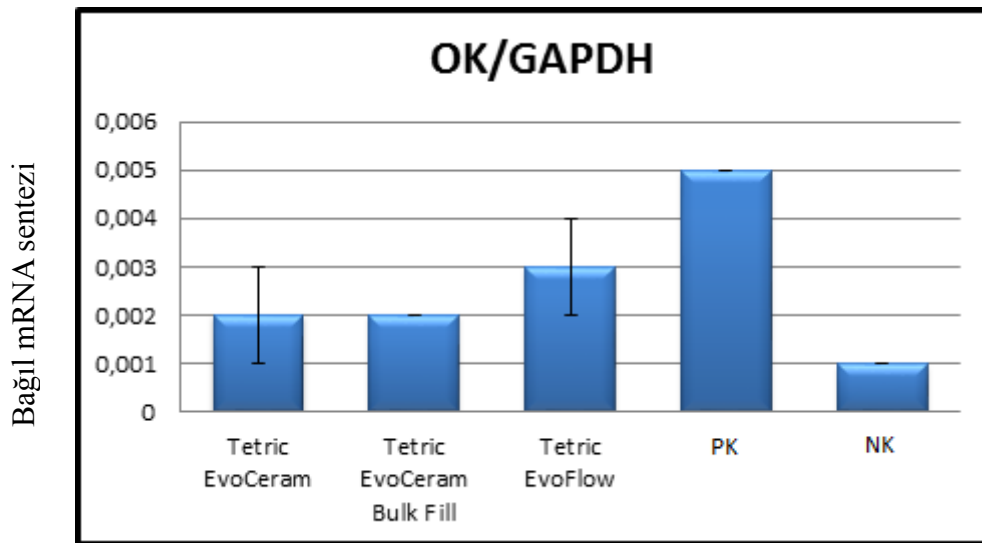
*Kruskal-Wallis Test* \* $p<0.05$

PDLKH kültüründen gruplar arası tayin edilen kollajen tip I düzeyleri Şekil 17’de gösterilmektedir.



Şekil 17. PDLKH kültüründen tayin edilen Kollajen tip I düzeylerinin karşılaştırılması

PDLKH kültüründen gruplar arası tayin edilen OK düzeyleri Şekil 18’de gösterilmektedir.



Şekil 18. PDLKH kültüründen tayin edilen OK düzeylerinin karşılaştırılması

PDLKH kültüründen tayin edilen OK düzeyleri açısından farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; bütün grupların OK düzeyi NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Tetric EvoCeram ve Tetric EvoCeram Bulk Fill gruplarının OK düzeyi PK grubundan anlamlı şekilde düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 17).

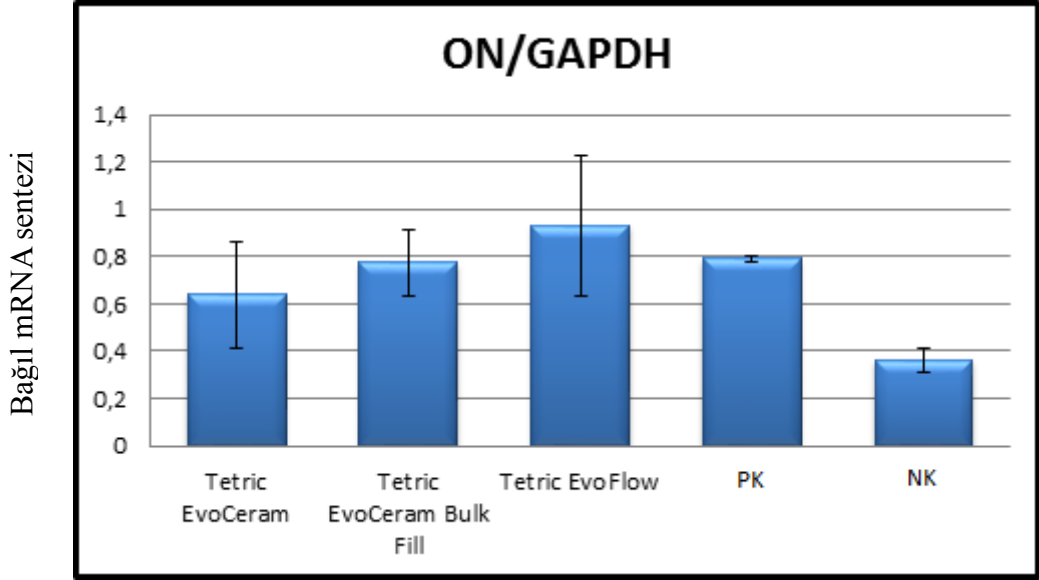
**Tablo 17.** PDLKH'ye ait Gerçek Zamanlı PZR analiz sonuçlarının gruplar arası ikili karşılaştırması

	<b>Kollajen</b>	<b>OK /GAPDH</b>	<b>ON/GAPDH</b>
	<b>TipI/GAPDH</b>		
	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>G1-G2</b>	0,127	0,564	0,386
<b>G1-G3</b>	0,127	0,643	0,289
<b>G1-G4</b>	0,065	0,034*	0,289
<b>G1-G5</b>	0,513	0,021*	0,248
<b>G2-G3</b>	0,827	0,643	0,724
<b>G2-G4</b>	0,507	0,034*	0,289
<b>G2-G5</b>	0,055	0,021*	0,021*
<b>G3-G4</b>	0,507	0,083	0,513
<b>G3-G5</b>	0,513	0,044*	0,034*
<b>G4-G5</b>	0,064	0,034*	0,034*

*Mann Whitney U Test* \*  $p<0.05$

**G1:** Tetric EvoCeram; **G2:** Tetric EvoCeram Bulk Fill; **G3:** Tetric EvoFlow; **G4:** PK; **G5:** NK

PDLKH kültüründen gruplar arası tayin edilen ON düzeyleri Şekil 18'de gösterilmektedir.



Şekil 19. PDLKH kültüründen tayin edilen ON düzeylerinin karşılaştırılması

PDLKH kültüründen tayin edilen ON düzeyleri açısından farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann-Whitney U Test sonucunda; PK, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow gruplarının ON düzeyi, NK grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ( $p < 0.05$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 17).

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 7.1. Gereç ve Yöntemin Tartışması

Yeterli estetik, fiziksel ve adeziv özellikleri nedeniyle rezin esaslı kompozitlerin kullanımını günümüzde ön plana çıkmıştır. Ancak kompozitlerin sitotoksik, genotoksik, mutojenik, östrojenik etkileri hakkında duyulan şüphe nedeniyle güncel çalışmaların biyoyoumluluk konusu üzerine yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. İdeal bir restoratif materyalin uygun mekanik ve fiziksel özelliklere sahip olmasının yanı sıra, bu materyallerin temasta olduğu çevre dokularla biyoyoumlu olması gerekliliği göz ardı edilmemelidir (Murray ve Smith, 2002). Bu nedenle geniş kullanım alanına sahip, piyasaya yeni sürülmüş kompozitlerin ve diğer dental materyallerin fiziksel özelliklerinin yanında mutlaka biyoyoumluluk açısından sorgulanması gerektiği vurgulanmaktadır (Schmalz 1998; Geurtsen 2000).

Güncel kompozit dolgu materyallerinin çevre dokular üzerindeki biyoyoumluluğunu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, monomer içeriği benzer olan ancak farklı kullanım alanına sahip kompozit dolgu materyallerinin pulpa ve PDL dokuları üzerine olan etkilerinin *in vitro* ortamda test edilmesi amaçlandı. Bunun için çalışmamızda, Çocuk Diş Hekimliği'nde geniş kullanım alanı olan nanohibrit yapıdaki universal, bulk fill ve akışkan olmak üzere üç farklı tipteki kompozit dolgu materyali tercih edildi.

#### 7.1.1. Kompozit örneklerinin hazırlanması

Rezin esaslı kompozit dolgu materyalleri ile ilgili yapılan toksisite çalışmalarında, gruplar arası farklılıkların sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için standart boyutlarda örneklerin hazırlanması önemlidir. Bu amaçla çeşitli boyut ve hacimlerde farklı malzemelerden hazırlanmış standart kalıplar kullanılır. Araştırmacılar, plastik ve cam esaslı kalıpların kompozitlerden salınan maddelerin ölçüm sonuçlarını olumsuz etkileyebileceğini ifade etmişlerdir (Ferracane, 1994; Hamid ve Hume, 1997b).

Ergün ve ark. (2011) farklı yapıdaki kompozit materyallerinin toksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, örnek hazırlanmasında 6 mm çapında, 2 mm

yükseğinde politetrafloroetilen kalıp kullanırken; Franz ve ark. (2003) polietilen kalıp; Aranha ve ark. (2010) paslanmaz çelik materyali kullanmıştır. Güven ve ark. (2013) ise rezin esaslı endodontik materyallerin sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmada teflon kalıp (4mm x 3mm) tercih etmiştir. Benzer olarak Wataha ve ark. (2003) ile Shafiei ve ark. (2014), kompozit materyallerinin toksik etkilerini inceledikleri çalışmalarda, örnek hazırlanması için teflon kalıp kullanmışlardır.

Wataha ve ark. (2003) ile Shafiei ve ark. (2014)'na benzer şekilde, çalışmamızda, kompozit örneklerinin belli bir standartta oluşturulması amacıyla teflon kalıp kullanıldı. Materyal yüzeyi ile kültür besiyeri hacmi arasındaki oranın ISO standartlarına (Gorduysus ve ark., 2007) uyması dikkate alınarak, teflon kalıp üzerinde 2 mm yüksekliğinde, 5 mm çapında silindirik boşluklar hazırlandı.

Kompozit dolgu materyallerinden dakikalar içinde meydana gelen monomer salınımının büyük kısmı yüzeydeki oksijen inhibisyon tabakası ile ilişkilendirilmiş (Soderholm ve Mariotti, 1999) ve salınan miktarın zaman içinde azaldığı bildirilmiştir (Ferracane 1994, Gerzina ve Hume 1994, Olea ve ark 1996, Söderholm ve Mariotti 1999). Restoratif işlemler sırasında bu tabakanın uzaklaştırılması için dolgu yapımını takiben cilalama işlemi önerilir. Çalışmamızın örnek hazırlama aşamasında, *in vivo* ortamı taklit edebilmek amacıyla, oksijen inhibisyon tabakasının engellenmesi için Franz ve ark. (2003), Ergün ve ark. (2011) ile Shafiei ve ark. (2014)'nın yaptıkları toksisite çalışmalarına benzer şekilde, polimerizasyondan önce materyallerin yüzeyi şeffaf matris bandı ile kaplandı. Ayrıca hazırlanan örneklerde hava kabarcığı kalmaması için teflon plaka iki cam tabla arasında konumlandırılarak polimerizasyon aşamasına geçildi.

Diş hekimliğinde görünür ışık ile aktive olan kompozitlerin geliştirilmesiyle birlikte kuartz halojen ışık kaynaklarının kullanımı mümkün hale gelmiştir. Halojen cihazlardan sonra kompozitlerin polimerizasyonu için LED, argon lazer ve plazma ark lambaları üretilmiştir. Argon lazerler yüksek yoğunlukta ışık üreterek daha kısa sürede ve daha derin mesafede polimerizasyon sağlar. Bu nedenle argon lazerler ilk bakışta çok avantajlı görünse de, kısa sürede polimerizasyon sağlaması nedeniyle diş ile kompozit arasındaki bağlantıda sorun yaratması ve maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir. Plazma ark cihazları, argon lazere benzer yoğunlukta ışık

üretirken, aynı zamanda daha ekonomik cihazlardır. Ancak, bu cihazların sağladığı yüksek polimerizasyon hızı, argon lazerlerde olduğu gibi fazla büzülme stresine neden olur. LED cihazları ise verimli olmalarının yanı sıra, küçük şarj aparatı sayesinde mobil olarak kullanılabilirler. Dalga boyu aralığı dar (460-480 nm) olan LED cihazları günümüzde kliniklerde sıklıkla kullanılmaktadır (van Noort, 2013).

Çalışmamızda, Cao ve ark. (2005) ile Bakopoulou ve ark. (2006)'nın çalışmasına benzer şekilde, kompozit dolgu materyallerinin polimerizasyonu için kliniklerde sıklıkla kullanılmakta olan, yeterli güç ve dalga boyuna sahip LED ışık cihazı kullanıldı.

Kompozitlerin polimerizasyonu sırasında, ışığın dalga boyu, gücü gibi faktörlerin yanı sıra, ışığın uygulanma şekli ve uygulanma süresi de polimerizasyon derinliğinin sağlanmasında önemli faktör olarak kabul edilir. Ergün ve ark. (2011), yapmış oldukları toksisite çalışmasının sonucunda, ışık cihazının ucu ile kompozit materyali arasındaki mesafenin mümkün olduğunca az olması gerektiğini, bu mesafenin biyoyumluluk üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Bu nedenle çalışmamızda, ışık cihazının ucu materyale dik ve 1 mm mesafede olacak şekilde konumlandırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, yüksek ışık gücüne sahip LED ışık kaynağının 10 saniye boyunca uygulanmasıyla polimerizasyon aşaması tamamlandı. Materyallere aynı güçte ışık uygulanabilmesi için, çalışma boyunca ışık cihazının gücü kontrol edildi.

### **7.1.2. Hücre kültürü**

Dental bir materyalin lokal toksik etkilerinin saptanmasında en temel ve sıklıkla tercih edilen yöntem hücre kültürü ile uygulanan *in vitro* test yöntemleridir (Schmalz, 2009). *In vitro* biyoyumluluk testleri ile, materyallerin canlı dokular üzerindeki biyolojik etkileri laboratuvar ortamında belirlenir (Hanks ve ark., 1996). Son yıllarda rezin esaslı dental materyallerin biyoyumluluğunun test edilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmalarına ağırlık verildiği görülmektedir (Darmani ve ark., 2007; Bakopoulou ve ark., 2011b; Galler ve ark., 2011; Rodriguez-Lozano ve ark., 2013). Hücre kültürü çalışmalarının hızlı, basit ve tekrarlanabilir olmasının yanında, *in vitro*

ortamda deneye etki eden faktörlerin kolayca kontrol edilebilir olması avantaj sağlar (Wataha, 2001; Cao ve ark., 2005). Bu nedenle çalışmamızda, kompozit dolgu materyallerinin insan pulpa ve PDL dokularına olan lokal toksik etkileri ve bu dokuların tamir fonksiyonuna olan etkilerinin *in vitro* yöntemle incelendi.

Yapılan *in vitro* sitotoksisite çalışmaları incelendiğinde, kullanılan test materyellerinin hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılmasında, materyalin hücrelerle temasta bulunduğu direkt kontakt testleri (Schedle ve ark., 1998), materyal ile hücreler arasında agar tabakası, milipor filtre veya diş dentin dokusu gibi bir bariyerin bulunduğu indirekt kontakt testleri (Sjogren ve ark., 2000) ve hücrelerin kompozit materyalinden salınan bileşenlere maruz bırakıldığı ekstrakt testleri (Bakopoulou ve ark., 2006; Ergün ve ark., 2011) gibi yöntemlerin kullanıldığını görmekteyiz.

Özellikle derin kavitelerde uygulanan restoratif materyallerden salınan komponentlerin dentinden difüzyon yolu ile pulpa dokusuna ulaştığı ve pulpa dokusunun rejeneratif özelliğini etkilediği, ayrıca periodontal alanla ilişkili olarak diş etinde de çekilmeye neden olabileceği bildirilmiştir (Bakopoulou ve ark., 2011b; Bakopoulou ve ark., 2012; Rodriguez-Lozano ve ark., 2013). Klinik koşullar göz önüne alındığında, derin kaviteye kompozit dolgu materyalinin uygulanması durumunda, materyalin pulpa dokusu üzerinde yaratacağı toksik etkilere karşı dentin dokusunun bir bariyer görevi gördüğü bilinmektedir.

Güven ve ark. (2013), endodontik materyallerin sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 0,4 µm'lik porlardan oluşan bariyer sistemini kullanarak materyallerin hücre kültürü üzerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Buna benzer olarak, kompozit dolgu materyallerinin çevre dokularda meydana getirdiği etkileri test ettiğimiz çalışmamızda, *in vivo* ortamı taklit etmek amacıyla hücre ile materyal arasında bir bariyer olarak milipor filtre sistemi kullanıldı. Bu yöntemle, hücreler ile örnekler aynı besiyeri ortamında tutularak bariyer görevi gören filtre sisteminden ortama salınan bileşenlerin belirli süreler sonunda hücreler üzerine olan etkileri değerlendirildi.

Kullandığımız yöntem ekstrakt yöntemine benzerlik göstermekle birlikte, ekstrakt yönteminde örneklerin ayrı bir besiyerinde belirli süre boyunca bekletilmesiyle elde edilen ekstraktın hücrelere olan etkisi (genellikle kümülatif etki) incelenmekteyken;

çalışmamızda, kompozit materyalinden ortama salınan bileşenlerin dokular tarafından uzaklaştırılması esası dikkate alındı. Hazırlanan örneklerin hücrelerle aynı ortamda bekletilmesi ile, bu bileşenlerin hücreler üzerindeki eş zamanlı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Materyallerin etkilerini test etmek amacıyla son dönemde yapılan kök hücre çalışmaları daha çok kompozitlerin içeriğindeki monomerlerin direkt etkisini değerlendirirken (Bakopoulou ve ark., 2011b; Bakopoulou ve ark., 2012); çalışmamızda ise monomerlerin etkisinin yanı sıra, kompozitlerin polimerizasyonundan sonra ortama salınan tüm bileşenlerin kök hücreler üzerindeki etkisi incelendi.

### **7.1.3. Hücre kültüründe kök hücre kullanılması**

Hücre kültürü çalışmalarında biyouyumluluğun belirlenmesinde kullanılan test yöntemlerinin yanı sıra, materyallerin etkisinin incelendiği hücre türü de önemlidir. Literatürde dental materyallerin sitotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalarda kolaylıkla büyütülebilir, iyi bilinir ve dayanıklı olmaları nedeniyle fare fibroblastları (L-929, 3T3), insan epitel hücreleri (HeLa), insan diş eti veya pulpa fibroblast hücrelerinin kullanımının ağırlıkta olduğu görülmektedir (Schmalz, 2009).

Yapılan biyouyumluluk çalışmalarında, Cao ve ark. (2005) ile Ergün ve ark. (2011), L-929 kültürünü kullanırken; Imaizumi ve ark. (2006), fare dişi pulpa hücrelerini kullanmışlardır. Reichl ve ark. (2006) ile Zhou ve ark. (2013), monomerlerin toksik etkilerini insan diş eti fibroblast hücreleri üzerinde test ederken; Gorduysus ve ark. (2007) PDL fibroblast hücresi üzerinde değerlendirme yapmıştır. About ve ark. (2002), Schweickl ve ark. (2005) ile Kwon ve ark. (2015) ise, rezin monomerlerin olası toksik etkilerini ve pulpa dokusunun tamir fonksiyonuna etkisini değerlendirmek amacıyla insan diş pulpa hücrelerini kullanmışlardır. Ancak, hücre kültürü çalışmaları sırasında enflamatuar ve diğer koruyucu mekanizmaların etkisi devre dışı kaldığından, yapılan değerlendirmelerin tam anlamıyla *in vivo* ortamı yansıtamaması önemli bir dezavantaj olarak kabul edilir (Schmalz, 1997).

Ağız ortamında, restoratif materyallerin derin kavitelere uygulanması sonucu, bu materyallerden salınan bileşenlerin pulpa ve periodontal doku gibi çevre dokularda çeşitli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, restoratif materyalin etkisi altında,

pulpa ve periodontal alandaki hücrelerin canlılığını devam ettirmesiyle birlikte, bu dokuların rejenerasyon / yenilenme kapasitelerini devam ettirerek, tamir mekanizmalarının aktif olması önemli bir konudur.

Kök hücrelerin kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme ve hasarlı dokuyu tamir edebilme özelliklerine bağlı olarak, insan pulpa ve PDL dokularında yer alan prekürsör / kök hücrelerin aktif olması durumunda dentin-pulpa kompleksi ve sement-periost kompleksinin rejenerasyon olabileceği bildirilmiştir (Seo ve ark., 2004; Casagrande ve ark., 2006; He ve ark., 2008; Kawazoe ve ark., 2008).

İnsan diş dokularından MKH'nin elde edilme prosedürü kolay ve etkin bir yöntem olarak kabul edilir. Ayrıca, bireylerin tedavi amacıyla çekilmiş olan dişlerinden elde edilmesinden dolayı, *in vitro* çalışmalarda kullanımında herhangi bir etik sınırlama bulunmamaktadır (Yalvaç ve ark., 2009). Bu nedenlerle, dental materyallerin ilişkide olduğu çevre dokular üzerindeki etkilerini *in vivo*'ya benzer şartlar altında test etmek amacıyla son dönemde yapılan *in vitro* biyouyumluluk çalışmalarında, insan diş dokusundan elde edilen çeşitli tipteki kök hücrelerin kullanıldığı görülmektedir.

Rezin içeriğindeki saf monomerlerin sitotoksik etkileri ve hücrelerin yenilenme kapasitesine olan etkilerini değerlendirmek amacıyla, Bakopolou ve ark. (2011b; 2012), insan süt dişi pulpasından elde edilen kök hücreleri ve insan dişinden elde edilen apikal papilla kök hücrelerini kullanırken; Trubiani ve ark. (2010), çalışmalarında DPKH'ni kullanmıştır. Shafiei ve ark. (2014), iki farklı kompozit dolgu materyalinin DPKH ve pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkilerini incelerken; Rodriguez-Lozano ve ark. (2013) ise kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmiştir.

Bu bilgiler ışığında, kompozit dolgu materyallerinin pulpa ve PDL dokuları üzerine olan toksik etkilerinin yanı sıra, bu dokuların yenilenme / tamir mekanizmasına olan etkilerini de değerlendirdiğimiz çalışmamızda, Trubiani ve ark. (2010), Rodriguez-Lozano ve ark. (2013) ile Shafiei ve ark. (2014)'nın çalışmalarına benzer şekilde, *in vitro* ortamda doku cevabını en iyi taklit edebilecek hücre tipi olan kök hücrelerin kullanımı tercih edildi.

Rodriguez-Lozano ve ark. (2013), kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerindeki toksik etkilerini değerlendirirken; araştırmamızda, toksik etkilerin yanı sıra, kompozit dolgu materyallerinin bu hücrelerin farklılaşma kapasitesine olan etkileri de değerlendirildi.

#### **7.1.4. Kök hücrelerin yirmi yaş dişlerinden elde edilmesi**

Diş pulpası ve PDL dokusundan elde edilen kök hücreler, yüksek çoğalma, yenilenme, farklılaşma kapasitesine sahip, sürme sonrası dönemde yok olmayan multipotent özellikteki mezenkimal kök hücrelerdir (Gronthos ve ark., 2000; Atalayın ve ark., 2012). Başlıca pulpa ve PDL kök hücre kaynakları ortodontik veya periodontal tedavi nedeniyle çekilen dişler, fazla dişler, çekilmiş süt dişleri ve çekim endikasyonu bulunan yirmi yaş dişleridir (Atalayın ve ark., 2012). Yirmi yaş dişlerinin son gelişen dişler olması nedeniyle, gelişimi daha ileri evrede olan dişlere göre hücre açısından zengin ve bu dişlerden elde edilen hücrelerin çoğalmaya daha yatkın olduğu bildirilmiştir (Graziano ve ark., 2008).

Buna bağlı olarak, diş dokularından elde edilen farklı tipte kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, kök hücrelerin daha çok genç yaş grubuna ait çekilmiş yirmi yaş dişlerinden elde edildiği görülmektedir. Bakopoulou ve ark. (2011a), DPKH ve apikal papilla kök hücrelerinin odontojenik/osteojenik farklılaşmasını değerlendirdikleri çalışmada, 16-18 yaş aralığındaki bireylerin çekilmiş yirmi yaş dişlerinden elde edilen hücreleri kullanmış ve osteodentin oluşumunu izlemişlerdir. Zhang ve ark. (2006), yirmi yaş dişinden elde ettikleri kök hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebildiğini ve bu nedenle multipotent kök hücre kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Süzergöz ve ark. (2009) da yaptıkları pilot çalışmada, çekilmiş yirmi yaş dişinden elde ettikleri pulpa hücrelerini kullanmışlardır.

Trubiani ve ark. (2010), yaptıkları sitotoksisite çalışmasında kullandıkları DPKH'ni herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan 14-16 yaş arasındaki hastaların ortodontik nedenle çekilen dişlerinden izole etmişlerdir. Güven ve ark. (2013), endodontik materyallerin DPKH üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, genç hastalardan çekilen henüz kök gelişimini tamamlamamış yirmi yaş dişlerini;

Kadar ve ark. (2009), DPKH ve PDLKH'nin izolasyonu için 18-26 yaş aralığındaki kişilerin çekilmiş yirmi yaş dişlerini kullanmışlardır.

Çalışmamızda, Bakopoulou ve ark. (2011a)'nın çalışmasına benzer şekilde, hücre kültürü için gerekli olan pulpa ve PDL dokuları 16-18 yaş aralığındaki hastaların çekilmiş yirmi yaş dişlerinden elde edildi. Uygun koşullar altında, çekilmiş dişlerin pulpa dokusundan DPKH, kök yüzeyinden ise PDLKH'nin izolasyonu daha önce literatürde belirtilen şekilde gerçekleştirildi (Yalvaç ve ark., 2010).

Hücre kültürünü pasajlama işleminde, 2-3 günde bir kültür besiyeri değiştirilerek kültür kabına yapışmayan hücreler uzaklaştırılır. Pasajlama işlemi istenilen sayıya kadar devam ettirilir. Ancak, pasaj sayısının artmasıyla birlikte fazla manipüle edilmiş hücrelerde stres belirtilerinin ortaya çıktığı ve bu nedenle hücrelerin *in vivo* durumundan sapmalara yol açabileceği bilinmektedir. İlerleyen pasajlarda sitogenetik bozukluk, tutunmada azalma gibi durumlar görülebildiğinden, üçten fazla pasajlama önerilmemektedir (Rastegar ve ark., 2010). Bu nedenle çalışmamızda üçüncü pasaja getirilen hücre kültürleri kullanıldı.

#### **7.1.5. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizlerinin yapılması**

MKH, elde edildikleri dokulardan bağımsız olarak plastik kültür kaplarına yapışabilme, fibroblast benzeri morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşma ve hücre yüzeyi tarafından üretilen bazı spesifik belirteçleri (%95'ten fazla oranda CD105, CD73, CD90 yüzey antijen belirteçleri) taşımaları gibi ortak özellikleri vardır. Bu hücreler, genellikle sahip oldukları spesifik yüzey antijenleri sayesinde veya farklılaşmış oldukları olgun hücre tipleri ile karakterize edilirler. Hücre yüzey antijeni tayini yöntemi, kök hücrelerin hızlı bir şekilde karakterize edilmesine veya tanımlanmasına olanak tanır. Bu da akım sitometri analiziyle gerçekleştirilir. Kemik iliği, kas, kıkırdak, yağ hücresi ve diş dokularından elde edilen hücrelerin, MKH ile aynı yüzey antijenlerini taşıdığı bildirilmiştir (Gronthos ve ark., 2000; Seo ve ark., 2004).

Yapılan kök hücre çalışmalarında, hücrelerin karakterizasyon işlemi için akım sitometri analizlerinin yapıldığı görülmektedir (Karaöz ve ark., 2010; Taşlı ve ark., 2013). Benzer şekilde, Wei ve ark. (2007), Kadar ve ark. (2009), Yalvaç ve ark. (2010), Bakopoulou ve ark. (2011a), Özbay (2013) ve Kulan (2015)'ın kullandıkları kök hücre tiplerinin farklılaşma kapasitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, hücre karakterizasyonu için akım sitometri analizinden faydalanmışlardır.

Biz de çalışmamızda, DPKH ve PDLKH'nin karakterizasyonu için, akım sitometri analizlerinden faydalanarak kültüre edilen hücrelerden spesifik yüzey antijenlerinin tespitini gerçekleştirdik.

#### **7.1.6. Hücre toksisite deneyi**

Dental materyallerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde farklı yöntemler mevcuttur. Hücre sayısı ve canlılığının değerlendirildiği sitotoksisite testleri biyoyumluluk araştırmalarında en çok tercih edilen yöntemlerdendir. Bu amaçla, hücre canlılığının önemli göstergelerinden olan mitokondriyal enzimlerin aktivitesini renk değişim reaksiyonu ile gösteren kolorimetrik testler sıklıkla kullanılır (Keiser ve ark., 2000; Bakopoulou ve ark., 2011b). Bu testlerin ilk jenerasyonu olan MTT testi, diğer sitotoksisite test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verir (Güven ve ark., 2011). MTS testi, suda çözünebilir olduğundan ikinci bir aşamaya ihtiyaç duymaz ve MTT'ye kıyasla uygulaması daha kolaydır. Ayrıca metabolize edildiğinde, hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmaz (Galluzzi ve ark. 2009).

Yapmış oldukları sitotoksisite çalışmalarında Ratanasathien ve ark (1995), Keiser ve ark. (2000), Cao ve ark. (2005), Gorduysus ve ark. (2007), Wataha ve ark. (2003) ile Ergün ve ark. (2011), hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla MTT test yöntemini tercih ederken; Güven ve ark. (2013), Özbay (2013), Kulan (2015) ile Zhang ve ark. (2015) yapmış oldukları sitotoksisite çalışmalarında hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla MTS test yöntemini kullanmışlardır. Benzer şekilde, çalışmamızda kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerine olan toksik etkilerinin test edilmesi aşamasında hücre canlılığını saptanması amacıyla güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi nedeniyle MTS testi kullanıldı.

Kompozit yapısında kalan artık monomer salınımının, polimerizasyondan hemen sonraki günlerde yüksek, daha sonraki dönemde ise düşük konsantrasyonda gerçekleşebileceği ortaya konmuştur (Geurtsen, 1998). Buna bağlı olarak kompozit dolgu materyallerinin sitotoksik etkilerinin zamana bağlı değişim gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle polimerizasyondan sonraki farklı zamanlarda değerlendirme yapılması önemlidir.

Bu amaçla, sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde, hücre kültürü ile farklı sürelerde kompozit materyallerinin veya ekstraktlarının inkübe edilmesi yöntemi kullanılmaktadır. Shafiei ve ark. (2014), iki farklı kompozit materyalinin DPKH üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, 1, 7 ve 14. günler için toksisite değerlendirmesi yapmışlardır. Trubiani ve ark. (2010), DPKH'nin 1, 2 ve 3 gün boyunca dört farklı rezin esaslı adeziv materyaline maruz bırakılmaları sonucu hücre canlılık oranlarını değerlendirmişlerdir. Güven ve ark (2013), endodontik materyallerin kök hücre üzerine toksik etkilerini incelemek amacıyla hücre canlılığını 1, 3, 7 ve 14. günde değerlendirirken; Sepet ve ark. (2009) 1, 2 ve 7. günde; Zhou ve ark. (2013) ise, 1, 3 ve 7. günde değerlendirme yapmıştır. Benzer şekilde Bakopoulou ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada 1, 3, 7 ve 14 günlük hazırlanan ekstraktları hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanmışlardır.

Çalışmamızda, Güven ve ark (2013) ile Bakopoulou ve ark. (2006)'na benzer şekilde, hazırlanan kompozit örneklerinin DPKH ve PDLKH'nin canlılığına olan etkisi MTS testi yardımıyla 1, 3, 7 ve 14. günlerde değerlendirildi. Buna ek olarak, 10. gün için de değerlendirime yapıldı.

#### **7.1.7. Odontojenik ve osteojenik farklılaşma deneyleri**

Yapılan çalışmalarla DK-MKH'nin, yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olduğu; DPKH'nin odontoblastlara farklılaşarak dentin-pulpa kompleksini oluşturduğu gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000; Gronthos ve ark., 2002; Yu ve ark., 2007). Son dönemde yapılan kök hücre çalışmalarında karakterizasyonu yapılan PDLKH'nin ise osteojenik olarak farklılaşabildiği bildirilmiştir (Kadar ve ark., 2009; Tang ve ark., 2014; Açıl ve ark., 2015).

DPKH ve PDLKH'nin farklılaşma kapasitesi, diş dokularında meydana gelen hasarların tamir mekanizmasında önemlidir. Dentin-pulpa kompleksi ve sement-periost kompleksinin bu hücreler vasıtasıyla rejenerere olabileceği bildirilmiştir (Seo ve ark., 2004; Casagrande ve ark., 2006; He ve ark., 2008; Kawazoe ve ark., 2008).

Rezin monomerlerin odontoblast hücre farklılaşmasına olan etkisi dikkate alındığında, derin kavitelere kompozit dolgu materyali uygulamasının tamir dentini oluşumu üzerine etkisi şüphe uyandırmaktadır (Bakopoulou ve ark., 2011b). Dentin kalınlığının 1 mm'den az olduğu durumda monomerlerin pulpaya geçişinin arttığı bilinmektedir. Bu nedenle kompozit materyallerinin derin kavitelere uygulanması durumunda pulpa ve PDL dokularının rejeneratif özelliğinin korunabilmesi için materyallerin dokular üzerindeki etkilerinin bilinmesi önemlidir.

Çalışmamızda, kompozit dolgu materyallerinin pulpa ve PDL dokularının tamir mekanizması üzerine etkilerini test etmek amacıyla, DPKH'nin odontojenik, PDLKH'nin osteojenik farklılaşması stimule edilerek deney sonunda gruplar arası farklılıklar değerlendirildi.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, kök hücrelerin çeşitli kimyasal ve büyüme faktörlerinin etkisi altında farklılaştığı gösterilmiştir. Trubiani ve ark. (2010) çalışmalarında, kültür besiyerine deksametazon, askorbik asit ve  $\beta$ -gliserofosfat ekleyerek oluşturdukları osteojenik besiyerini kullanmış ve 4 hafta sonunda hücrelerin farklılaştığını göstermişlerdir. Deksametazon, hücre büyümesini ve kalsiyum fosfat birikimini uyarırken; askorbik asit, kollajen matriks üretiminde ve mineralizasyonunda;  $\beta$ -gliserofosfat da kalsiyum fosfat birikiminde önemli rol oynamaktadır (Coelho ve Fernandes, 2000). Feng ve ark. (2010) ile Mucuk (2014) ise hücre farklılaşmasında D3 vitamininin etkisini değerlendirmişler ve olumlu etkisinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda, Yalvaç ve ark. (2010) ile Taşlı ve ark. (2013)'nin çalışmalarına benzer şekilde, kültüre edilen DPKH'nin odontojenik ve PDLKH'nin osteojenik farklılaşmasını sağlamak için kültür besiyerine farklı oranlarda  $\beta$ -gliserofosfat, askorbik asit ve deksametazon eklenerek farklılaşma 14 gün boyunca stimule edildi. Bu sürenin bitiminde hücre kültür grupları arasındaki farklılaşma kapasiteleri çeşitli

yöntemlerle değerlendirildi. Bu amaçla ALP aktivite testi, ALR boyama ve Gerçek Zamanlı PZR analiz yöntemleri kullanıldı.

#### **7.1.8. ALP enzim aktivitesinin belirlenmesi**

Hücrelerde meydana gelen farklılaşma düzeyinin tespit edilebilmesi için farklılaşmaya özgü hücresel belirleyicilerin tayin edilmesi gereklidir. ALP aktivitesi, hücre kültür sistemlerinde odontoblastlar ve osteoblast için erken tanı işareti olarak kabul edilir (Beck ve ark., 2010). ALP, mineralize matriks oluşumunu sağlayan farklılaşmış hücreler tarafından sentezlenir (Bakopoulou ve ark., 2011a).

Gronthos ve Simmons (1995), DPKH'nin farklılaşmaya uğratıldığında yüksek oranda ALP enzim aktivitesi gösterdiğini ve bu hücrelerin dentin benzeri yapı oluşturabildiğini göstermişlerdir. Bakopoulou ve ark. (2011a), ALP aktivitesinin farklılaşmanın indüklendiği 1. haftadan 3. haftaya kadar izlenebildiğini; Wei ve ark. (2007), 21. güne doğru arttığını tespit etmişlerdir. Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012), monomer etkisi altında kök hücrelerin farklılaşmasını değerlendirmek için; Güven ve ark. (2011) ile Taşlı ve ark. (2013), 14 gün boyunca odontojenik ve osteojenik farklılaştırmaya uğrattıkları kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini değerlendirmek amacıyla çalışmalarında ALP aktivitesini incelemişlerdir.

Biz de benzer şekilde çalışmamızda, kompozit materyallerine maruz bırakılan DPKH ve PDLKH kültür gruplarının odontojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla ALP enzim aktivitesini değerlendirdik.

#### **7.1.9. ALR boyamasının yapılması**

Hücre kültürü çalışmalarında, odontojenik ve osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem, hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin görüntülenmesidir. ALR boyama yönteminde, kalsiyum depoları hidroksil grubuyla reaksiyona girerek bir çökelti oluşturur (Tsukamoto ve ark., 1992; Couble ve ark., 2000). Hücre kültüründeki kalsiyum içeren bölgelerin ALR ile teması sonucu, bu bölgeler kırmızıya boyanır.

Kadar ve ark. (2009) farklı tipte kök hücrelerin farklılaşmasını değerlendirdikleri çalışmalarında; Trubiani ve ark. (2010), Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012) ile Zhang ve ark. (2015) yaptıkları biyoyumluluk çalışmalarında, hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin görüntülenmesi için ALR boyama yönteminden faydalanırken; Kulan (2015) ise kalsiyum birikim bölgelerinin görüntülenmesinde Von Kossa boyama yönteminden faydalanmıştır.

Çalışmamızda, Kadar ve ark. (2009), Trubiani ve ark. (2010) ile Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012)'na benzer şekilde, kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini belirlemek amacıyla hücre kültürlerindeki kalsifikasyon yoğunluğunun görüntülenmesinde ALR boyama yöntemi kullanıldı.

#### **7.1.10. Gerçek Zamanlı PZR analizinin yapılması**

Gerçek Zamanlı PZR yönteminde, farklılaşmaya özgü proteinlerin tayini yapılarak hücre kültüründe meydana gelen farklılaşmanın derecesi değerlendirilir. Klasik PZR ve jel elektroforez işlemleri, kullanılan primerin cDNA üzerindeki ilgili bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını gösterirken, Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ise primerin etkisiyle çoğalan cDNA'nın miktarı ile ilgili bilgi verir.

Wei ve ark. (2007), Zhu ve ark. (2008), Güven ve ark. (2011), Atari ve ark. (2012), Açıl ve ark. (2015), Kwon ve ark. (2015) ile Zhang ve ark. (2015) yapmış oldukları kök hücre farklılaştırma çalışmalarında, hücre kültürlerinden farklılaşmaya özgü genlerin tayin edilmesi amacıyla Gerçek Zamanlı PZR yöntemini kullanmışlardır.

Benzer şekilde çalışmamızda da, DPKH kültüründen odontojenik ve PDLKH kültüründen osteojenik farklılaşmaya özgü genlerin tayini Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle analiz edildi.

Gerçek Zamanlı PZR analizi ile, farklılaşması sağlanan hücre DNA'larının, dokuya özel protein karşısında çoğaldığının gösterilmesi gereklidir. Bunun için de spesifik primerler kullanılır. DPKH'nin odontojenik farklılaşma mekanizmasında, dentin yapımında görev alan kollajen tip I, DSP, DMP1 gibi proteinler farklılaşmanın erken belirteçleri olarak değerlendirilir (Zhu ve ark., 2008). DSPP'nin sadece odontoblast hücreleri için özel protein olduğu bilinmektedir (Couple ve ark., 2000).

Wei ve ark. (2007), izole ettikleri DPKH'nin odontojenik farklılaşmasını belirlemek için yaptıkları çalışmada, Gerçek Zamanlı PZR analizi ile hücrelerden DSPP sentezinin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Bakopoulou ve ark. (2011a), DPKH ve apikal papilla kök hücrelerinin odontojenik/osteojenik farklılaşmasını değerlendirdikleri çalışmada DSPP, BSP, OK ve ALP gen sentezi analizinin yanı sıra, hücre kültüründe mineralize alanların görüntülenmesi için ALR boyama yöntemini kullanmışlar ve hücre kültüründe osteodentin yapısının oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

Kültürü yapılan DPKH'nin odontojenik farklılaşmasında kollajen tip I (Young ve ark., 2002), DSPP (Zhu ve ark., 2008) ve DMP1 (Hao ve ark., 2004) proteinlerinin sentezine rastlanması ve bu proteinlerin odontoblast farklılaşmasıyla ilişkilendirilmesi nedeniyle, çalışmamızda da bu genlerin tayini Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilerek kompozit materyaline maruz bırakılan DPKH'nin odontojenik farklılaşma kapasitesi incelendi.

Dentin ve kemik matriksinde bulunan mineralizasyon sistemi, ortak protein yapılarından dolayı birbirine oldukça benzer yapıda olduğu bilinmektedir. Genel olarak OK ve ON osteoblast hücrelerinin göstergesi olarak kabul edildiğinden, PDLKH'nin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılır.

Garcia ve ark. (2003), kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, kollajen tip I, ON ve kemik sialoprotein düzeylerini incelemişler ve ON'nin osteoprogenitor hücrelerin varlığında ve osteoblastların farklılaşması sırasında ortamda yoğun olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Karaöz ve ark. (2010), natal diştten elde ettikleri kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesini değerlendirirken ALP aktivitesi ve ALR boyama yönteminin yanı sıra, immünohistokimyasal boyama yöntemi ile OK, osteopontin, ON, BMP2 ve BMP7 tayinini gerçekleştirmişlerdir. Açıl ve ark. (2015), PDLKH'ni 14 gün boyunca uyararak osteojenik farklılaşmasını değerlendirdikleri çalışmada, hücrelerden osteopontin ve OK gen sentezini değerlendirmişler ve farklılaşma kapasitesini yüksek bulmuşlardır. Benzer şekilde Atari ve ark. (2012), osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesinde hücrelerden kollajen tip I, ON, OK, osteopontin gibi genlerin varlığını analiz etmişlerdir.

Çalışmamızda da, kompozit materyaline maruz bırakılan PDLKH'nin osteojenik farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla, hücre kültürlerinden osteojenik hücre belirteci olarak kabul edilen kollajen tip I (Hesse ve ark., 2010), OK (Açıl ve ark., 2015) ve ON (Atari ve ark., 2012) genlerinin tayini Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle gerçekleştirildi.

## **7.2. Bulguların Tartışması**

### **7.2.1. DPKH ve PDLKH'nin akım sitometri analizi sonuçları**

Akım sitometri analizi ile gerçekleştirilen MKH'nin karakterizasyon işlemi, özel yüzey antijenlerin tespiti ile yapılır. Hücrenin MKH olarak tanımlanabilmesi için, hücrelerin %95 veya daha fazlasının CD105, CD73, CD90 antijenleri için pozitif olması gerekirken; diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için CD45, CD34, CD14, CD19 gibi hematopoetik hücrelere ait yüzey antijenlerinin pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekir (Dominici ve ark., 2006).

Trubiani ve ark. (2010), çalışmalarında DPKH'nin karakterizasyonu için MKH belirteci olan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 yüzey antijenlerinin varlığını akım sitometri yöntemi ile tespit etmişlerdir. Bakopoulou ve ark. (2012), kullandıkları monomerlerin apikal papilla kök hücreleri üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, karakterizasyon aşamasında STRO-1, CD146, CD34, CD45, CD105, CD117, CD24, CD90 kök hücre belirteçlerini kullanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde, Taşlı ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada, kullandıkları kök hücreleri CD29, CD44, CD105, CD90, CD73 ve CD166 MKH belirteçleri için pozitif; CD34, CD45 ve CD14 hematopoetik belirteçler için negatif bularak hücrelerin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmamızda, çekilmiş yirmi yaş dişinin pulpa ve PDL dokularından izole edilen hücrelerin akım sitometri değerlendirmeleri sonucunda bu hücrelerin, hematopoetik hücre belirteci olan CD14, CD34, CD45 ile endotelial hücre belirteci olan CD31 yüzey antijenleri için negatif; MKH belirteci olan CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenleri için ise yüksek düzeyde pozitif olduğu saptanarak MKH olduğu ve farklılaşma kapasitelerinin yüksek olduğu belirlendi.

## 7.2.2. MTS Testi Sonuçları

### 7.2.2.1. DPKH için elde edilen MTS testi sonuçları

Üç farklı uygulama alanına sahip kompozit dolgu materyalinin DPKH kültürü üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapmış olduğumuz MTS testi sonuçlarına göre, sadece kültür besiyerinin eklendiği negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, kompozit gruplarının DPKH'nin mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesini kötü yönde etkilediği saptandı.

Üçüncü günde, Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğu görülmekle birlikte, özellikle Tetric EvoFlow materyaline maruz bırakılan DPKH'nin canlılık düzeyinde DMSO kullanılan pozitif kontrol grubuna benzer şekilde bir azalma olduğu görüldü. Üçüncü günde akışkan kompozit grubunun hücre canlılığında görülen bu azalma, Imazato ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları sitotoksisite çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulundu. Araştırmacılar, rezin esaslı restoratif materyallerden gerçekleşen monomer salınımının en fazla 72 saat içerisinde gerçekleştiğini ve hücre kültürü üzerindeki etkilerinin de buna paralel olarak 3. günde saptanabildiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda, DPKH'nin 3. gündeki canlılık düzeyinde görülen düşüş, polimerizasyondan hemen sonra gerçekleşen monomer salınımına bağlı olarak toksik etkilerin daha belirgin olmasına bağlanabilir.

Ferracane ve Condon (1990), kompozitlerin toksik etkilerinin en fazla ilk 24 saat içerisinde gerçekleştiğini; Franz ve ark. (2003), materyallerin yaşlandırma sonrasında daha düşük toksik etkiye neden olduklarını; Schedle ve ark. (1998), direkt kontakt yöntemini kullandıkları araştırmalarında, test edilen adeziv restoratif materyallerin hazırlanmalarının hemen ardından hücre kültüründe toksik etki gösterdiklerini; 1, 2, 7 gün ve 6 hafta yaşlandırıldıktan sonra hücre kültürüne uyguladıklarında ise toksik etkinin azaldığını bildirmişlerdir. Bakopoulou ve ark. (2006), kompozitlerden elde edilen 24, 72 saat, 7 ve 14 günlük ekstraktların sitotoksisitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, 1 haftalık örneklerin başlangıca göre daha az seviyede, 2 haftalık örneklerin ise minimum düzeyde toksisite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Yedinci günde Tetric EvoCeram haricindeki grupların hücre canlılığında NK grubuna benzer bir artış olduğu; 10. günde hücre canlılığındaki artışın tüm gruplarda devam ettiği izlendi. On dördüncü günde ise, kompozit gruplarının hücre canlılık düzeyinde NK grubuna paralel olarak genel bir azalma olduğu saptandı. Bu durum, yüksek çoğalma özelliğine sahip kök hücrelerin sayıca fazla artmasından dolayı birbirini uyararak apoptoza neden olduğunu düşündürmektedir. Ancak, Tetric EvoFlow grubunun hücre canlılığında, PK grubuna yakın düzeyde bir azalma olduğu dikkat çekmiştir.

Restoratif materyallerin toksisitesi ile materyallerden salınan artık monomer miktarı arasında anlamlı bir ilişki olmasının yanı sıra, materyallerden salınımı gözlenen doldurucu partiküller, başlatıcılar gibi diğer bileşenlerin de biyouyumluluk üzerinde etkili olabildikleri bilinmektedir (Floyd ve Dickens, 2006). Bütün bu bileşenlerin materyal toksisitesi üzerindeki etkilerinin yanı sıra, salınım gösteren monomerlerin sinerjistik ya da antagonistik etki göstererek sitotoksitenin derecesini değiştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Ratanasathien ve ark., 1995). MTS sonuçlarımızın 14. gününde görülen hücre canlılığındaki azalmanın bu faktörlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Shafiei ve ark. (2014), DPKH üzerinde kompozitlerin toksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, siloran esaslı kompozit dolgu materyalinin maruz bırakıldığı hücre kültür canlılık oranının 7. günden 14. güne doğru arttığını; rezin esaslı kompozit grubu için ise 14. güne doğru hücre canlılık oranının azaldığını gözlemişlerdir. On dördüncü günde rezin esaslı kompozit grubunun DPKH canlılık düzeyinde azalmaya neden olması, çalışmamızın 14. gün MTS sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Wataha ve ark. (2003) da kompozitlere bağlı sitotoksik etkilerin 4 haftaya kadar gözlenebileceğini bildirmiştir.

Bunun yanında, çalışmamızda özellikle akışkan kompozit grubunun hücre canlılığında görülen ciddi azalmanın, akışkan kompozitlerin düşük doldurucu oranına sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Resin esaslı dental materyallerin toksik etkilerinin, resin içeriği ile ilişkilendirildiği gibi doldurucu içeriğine de bağlı olduğu; akışkan kompozitlerin, uzun dönemde daha yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Wataha ve ark., 2003). Caughman ve ark. (1991),

kompozitlerin doldurucu oranı ile sitotoksitesiteleri arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, polimerizasyon derecesinin artışı ile toksisite arasında ters ilişki olduğunu; doldurucu oranı, boyutu ve dağılımının toksisite üzerine etkili olduğunu belirtmiştir.

Al-Hiyasat ve ark. (2005), üç farklı kompozit (Admira, Z250, Tetric Ceram) ile bunların akışkan tiplerinin toksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, akışkan tipleri ile karşılaştırıldıklarında Z250 ve Tetric Ceram'ın daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir. En düşük sitotoksik etki Tetric Ceram grubunda izlenirken, çalışmamızın MTS testi sonuçlarına benzer şekilde en fazla sitotoksik etki akışkan kompozit grubunda (Tetric Flow) görülmüştür. Benzer şekilde, Ergün ve ark. (2011)'nin arka bölge dişlerin restorasyonunda kullanılan kompozit materyallerinin sitotoksitesitelerini değerlendirdikleri çalışmada, yüksek doldurucu oranına sahip olan kompozitlerin diğer gruplara göre toksik etkilerinin düşük olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızın MTS sonuçları, akışkan kompozit grubunun toksik bulunması açısından Wataha ve ark. (2003), Caughman ve ark. (1991), Al-Hiyasat ve ark. (2005) ve Ergün ve ark. (2011)'nin sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

#### **7.2.2.2. PDLKH için elde edilen MTS testi sonuçları**

Kompozit dolgu materyallerinin PDLKH kültürü üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapmış olduğumuz MTS testi sonuçlarına göre ise, kompozit gruplarının hücre canlılığında 1. günden 3. güne doğru NK grubuna benzer olarak anlamlı bir artış olduğu; 7. ve 10. günde grupların, NK grubuna benzer düzeyde hücre canlılığına sahip olduğu; 14. günde ise Tetric EvoFlow'un toksik etki göstererek, PK grubu ile arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı gözlemlendi.

On dördüncü günde gözlenen hücre canlılık düzeyindeki düşüşün, yukarıda bahsedilen literatürler ışığında, kompozit materyali içeriğindeki monomer ve diğer bileşenlerin etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ancak, toksik etkinin tekrar akışkan kompozit grubunda görülmesi, doldurucu oranının sitotoksitesite üzerinde daha etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Ayrıca çalışmamızda, aynı materyallere maruz bırakılan DPKH ve PDLKH'nin canlılık düzeyleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, PDLKH'nin DPKH'ne kıyasla daha az etkilendiği gözlemlendi. Bu durum, PDLKH'nin kompozit materyallerinin olası toksik etkilerine karşı daha dayanıklı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma sonucumuza benzer şekilde, Tadin ve ark. (2014) pulpa ve PDL fibroblast hücrelerinin canlılık düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, PDL hücrelerinin dental materyallerin toksik etkilerine karşı daha dayanıklı olduğu sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızdan farklı olarak Rodriguez-Lozano ve ark. (2013) ise, iki farklı düşük polimerizasyon büzülme özelliğine sahip bulk fill kompozitlerin hem pulpa hem de periodontal hücre üzerine sadece toksik etkisini değerlendirmiş; çalışmanın sonucunda PDLKH'nin kompozit materyallerin toksik etkilerine karşı, DPKH'ne kıyasla daha dayanıksız olduğu sonucuna varmışlar ve deneysel hücre kültürü çalışmalarında pulpa hücrelerinin kullanılmasını önermişlerdir.

### **7.2.3. Odontojenik ve osteojenik farklılaşma deneylerinin sonuçları**

Literatürde resin esaslı kompozitlerden salınım gösteren monomerlerin, süt dişi pulpası ve apikal papilladan elde edilen kök hücreler (Bakopoulou ve ark. 2011b; 2012) ve kök hücre karakterizasyonu yapılmamış insan daimi diş pulpa hücrelerinin farklılaşması üzerine olan etkilerini gösteren çalışmaların (About ve ark., 2002; Kwon ve ark., 2015) yanı sıra; adeziv sistemlerin DPKH üzerine olan etkilerinin de incelendiği (Trubiani ve ark., 2010) görülmektedir. Çalışmamızda bunlardan farklı olarak, kompozit dolgu materyallerinden ortama salınan bileşenlerin sinerjik ve antagonistik etkilerinin olabileceği düşünülerek, bu bileşenlerin DPKH ve PDLKH'nin farklılaşma kapasitesi üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Kompozit dolgu materyallerinin PDLKH'nin farklılaşma kapasitesi üzerine olan etkilerini değerlendiren çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamız, farklı uygulama alanlarına sahip kompozit dolgu materyallerinin hem DPKH ve hem de PDLKH'nin farklılaşma kapasitesi üzerine olan etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.

### 7.2.3.1. ALP aktivite testi sonuçları

Karaöz ve ark. (2010), çalışmalarında kullandıkları natal diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin farklılaşmasını değerlendirmek amacıyla ALP aktivitesini incelemişler; 14. güne kadar hücre kültüründeki ALP aktivitesinde artış görürken, 14. günden sonra düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Hücre kültüründe izlenen ALP aktivitesinin 14. günden sonra azalması, Mygind ve ark. (2007) ve Imazato ve ark. (2009) tarafından da gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, farklılaştırma süreci 14 gün olarak belirlendi ve bu sürenin sonunda literatüre uyumlu olarak, pozitif kontrol grubuna ait hücre kültüründe ALP aktivitesi saptandı.

Çalışmamızın ALP aktivite testi sonuçlarına göre, rezin esaslı kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH'nin ALP aktivitesini etkilediği görüldü.

DPKH grubuna ait hücre kültüründen elde edilen ALP enzim aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde, Tetric EvoFlow grubunun ALP aktivitesinin NK grubundan düşük olduğu; Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunun ALP aktivite düzeyinin NK grubundan yüksek, ancak PK grubundan düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum, akışkan kompozit grubunun hücre kültürü üzerindeki ALP enzim aktivitesini engellediğini, Bulk Fill grubunun ise hücre kültüründeki ALP enzim aktivitesi üzerine daha az etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Tetric EvoCeram grubu ile, farklılaşmanın uyarıldığı PK grubu arasında fark bulunmaması ise bu grubun hücre kültüründeki ALP enzim aktivitesi üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012), Kwon ve ark. (2015), rezin monomerlerin farklı kök hücre tiplerinin odontojenik farklılaşması üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ALP aktivite testi sonuçlarımıza benzer şekilde, hücre kültüründeki ALP aktivitesinde düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızın PDLKH grubuna ait hücre kültüründen elde edilen ALP enzim aktivitesi sonuçlarına göre ise, kompozit gruplarının ALP düzeyinin NK grubuna göre oldukça yüksek, PK grubundan ise düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, kompozit dolgu materyallerine maruz bırakılan PDLKH kültüründe ALP enzim aktivitesinin devam ettiğini; ancak bu aktivitenin bir miktar olumsuz etkilendiğini düşündürmektedir.

Imazato ve ark. (2009), kompozit materyalinden salınımını tespit ettikleri TEGDMA monomerinin, osteoblast benzeri hücreler üzerindeki ALP aktivitesinde 3. günde belirgin bir düşüşe neden olduğunu gözlerken; 14. günde hücrelerin ALP aktivite düzeyinin kontrol hücre grubuna benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Buna benzer olarak çalışmamızda, osteojenik farklılaştırmaya uğratılan PDLKH grubunda ALP aktivitesinin olduğu saptandı.

### **7.2.3.2. ALR boyama görüntüleri**

Çalışmamızın odontojenik ve osteojenik farklılaşma deneylerinin sonunda, hücre kültürlerinde oluşan kalsiyum birikiminin tespiti için gerçekleştirilen ALR boyaması sonucunda alınan görüntülerde, DPKH ve PDLKH grubuna ait PK hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin yoğun olduğu gözlemlendi. Kompozit materyallerine maruz bırakılan hücre kültürlerinde ise kalsifikasyon yoğunluğunun NK grubundan fazla, PK grubundan az olduğu görüldü.

Trubiani ve ark. (2010) tarafından DPKH'nin farklılaştırılmasının değerlendirildiği çalışmada, PK sonuçlarımıza benzer olarak, hücre kültüründe ALR yöntemi ile kalsiyum birikim alanlarının oluşumu gösterilmiştir. PDLKH'nin osteojenik farklılaşmasını takiben oluşan mineralize alanların varlığını ALR boyama yöntemi ile gösteren çalışmalar mevcuttur (Seo ve ark., 2004; Saito ve ark., 2005; Açıl ve ark., 2015).

Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012)'nin yaptıkları çalışmalarda, kontrol grubuna kıyasla rezin monomer ile muamele edilen apikal papilla ve süt dişi kök hücre kültüründeki kalsiyum birikiminde azalma olduğu; yüksek dozda monomere maruz bırakılan grupta ise farklılaşmanın tamamen engellendiği gözlemlenmiştir.

Buna benzer olarak, Imazato ve ark. (2009) tarafından, osteoblast benzeri hücre kültüründe ALR boyama yöntemi ile kalsifiye alanların oluşumu değerlendirilmiş; 14 gün sonunda kalsifiye alanların görüntülenemediği, kompozitten salınım gösteren TEGDMA monomer miktarının mineralize alan oluşumunu etkilemezken, yüksek dozda HEMA monomerine maruz kalan hücre kültüründe ise mineralizasyonunu engellendiği gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın ALR sonuçlarında, Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012)'nin sonuçlarına benzer olarak, 14 gün boyunca farklılaşması indüklenen pozitif kontrol hücre kültüründe gözlenen boyanma alanlarına (kalsifiye alanlara) kıyasla, kompozit gruplarında daha az boyanma olduğu izlendi. Bu sonuç aynı zamanda ALP enzim aktivitesi sonucuyla da uyumlu bulundu.

### **7.2.3.3. Gerçek Zamanlı PZR sonuçları**

Gerçek Zamanlı PZR analizi ile DPKH kültüründe kollajen tip I, DSPP ve DMP1 gen aktivite düzeyleri; PDLKH kültüründe ise kollajen tip I, OK ve ON gen aktivite düzeyleri saptanarak hücrelerin gruplar arası farklılaşma kapasiteleri değerlendirildi.

#### **7.2.3.3.A. DPKH'nin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları**

Çalışmamızda, DPKH'nin odontojenik farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Gerçek Zamanlı PZR analizinde, pozitif kontrol grubuna ait hücre kültüründen kollajen tip I, DSPP ve DMP1 genleri yüksek düzeyde saptanırken, kompozit materyallerine maruz bırakılan hücre kültürlerinden tayin edilen gen düzeylerinin olumsuz yönde etkilendiği görüldü.

Bakopoulou ve ark. (2011a), DPKH ve apikal papilla kök hücrelerinin odontojenik / osteojenik farklılaşmasını değerlendirdikleri çalışmada DSPP, BSP, OK ve ALP gen sentezi analizi ile birlikte, hücre kültüründe mineralize alanların görüntülenmesi için ALR boyama yöntemini kullanmışlar ve osteodentin yapısının oluştuğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızın PK grubunda olduğu gibi, DSPP sentezine 14 gün sonunda rastlamışlardır.

Ancak çalışmamızda, özellikle dentin matriks oluşumunu takiben gerçekleşen mineralizasyon aşamasında ciddi bir artış gösteren ve sadece odontoblastlara özgü olan DSPP gen sentezine (Couble ve ark., 2000) hiçbir kompozit grubunda rastlanmadı.

Diğer odontojenik farklılaşma belirteçlerinden olan kollajen tip I ve DMP1 gen seviyeleri açısından çalışmamızda, bütün kompozit gruplarının gen düzeyi PK grubundan düşük bulundu. En düşük gen seviyeleri Tetric EvoCeram ve TetricEvo Bulk Fill grubunda saptandı.

Odontojenik farklılaşma deneyimize ait sonuçlar, rezin esaslı restoratif materyallerin, çeşitli kök hücre tiplerinin odontojenik farklılaşma mekanizması üzerine olumsuz etkilerinin olabileceğini bildiren About ve ark. (2002), Bakopoulou ve ark. (2011b; 2012), Kwon ve ark. (2015)'nin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, kompozit dolgu materyallerinin DPKH'nin odontojenik farklılaşma mekanizması üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ve bu nedenle pulpa dokusunun tamir fonksiyonunu olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir.

About ve ark. (2002), pulpa fibroblast hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaşması üzerine polimerize edilmemiş rezin monomerlerin etkisini inceledikleri çalışmalarında, sonuçlarımıza benzer şekilde, monomerlerin pulpa hücrelerinden sentez edilen kollajen tip I, ON ve DSP gen seviyelerini etkilediği sonucuna varmışlardır. Özellikle hücre kültüründe tespit edilen DSP seviyesinde belirgin düzeyde bir düşüş olduğu ve monomerlerin pulpa fibroblast hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaşmasını engellediği belirtilmiştir.

Bakopoulou ve ark. (2012)'nin, monomerlerin apikal papilla kök hücrelerinin odontojenik farklılaştırmasının değerlendirilmesi için yaptıkları çalışmada, ALR boyama ve ALP aktivitesinin belirlenmesinin yanı sıra, Gerçek Zamanlı PZR analiziyle hücre kültüründen farklılaşmaya özgü olan DSPP, BSP, OK genlerinin tespiti yapılmış ve monomer ile muamele edilen kültürden elde edilen gen düzeylerinin pozitif kontrol grubuna göre belirgin düzeyde düşük olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda hücre kültüründeki odontojenik farklılaşmanın monomerlerin etkisi altında önemli ölçüde olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir. Bundan yola çıkarak, düşük konsantrasyonda da olsa rezin esaslı restoratif materyallerden açığa çıkan komponentlerin uzun süre içerisinde pulpa dokusunu etkilemesiyle pulpanın tamir fonksiyonu üzerinde olumsuz etkide bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı araştırmacıların yaptığı diğer bir çalışmada, süt dişi pulpa kök hücrelerinin üzerinde aynı monomerlerin etkisi değerlendirilmiştir (Bakopoulou ve ark., 2011b). Bu

çalışmada da, toksik bulunmayan dozdaki monomere maruz bırakılan hücre kültürünün odontojenik farklılaşma kapasitesinin ve mineralize alanların oluşumunun, çalışmamıza benzer şekilde ciddi oranda engellendiği görülmüştür.

Kwon ve ark. (2015), TEGDMA ve HEMA monomerlerinin insan dişi pulpa hücrelerinin odontojenik farklılaşması üzerine olan etkisini, ALP aktivitesi ve Gerçek Zamanlı PZR analizleri ile değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, monomerlerin toksik olmayan dozda dahi, hücrelerin ALP aktivitesinde ve hücre kültüründen tayin edilen odontojenik gen (DSPP, OK, osteopontin) düzeyinde düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir.

#### **7.2.3.3.B. PDLKH'nin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları**

Çalışmamızda PDLKH'nin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Gerçek Zamanlı PZR analizinde, kollajen tip I düzeyleri açısından gruplar arasında fark görülmemesinin, MKH'den kollajen tip I'in yüksek düzeyde sentez edilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, kompozit materyallerine maruz bırakılan hücre kültüründen elde edilen OK ve ON gen düzeylerinin, farklılaşmaya uğratılmamış NK hücre kültüründen daha yüksek düzeyde olduğu izlenmekle birlikte, Tetric EvoFlow ile PK grubu arasında bir fark bulunmaması dikkat çekmiştir. Bu durum, kompozit materyallerine maruz bırakılan PDLKH kültüründe osteojenik farklılaşmanın gerçekleşebildiğini, ancak Tetric EvoFlow grubunun haricinde farklılaşma kapasitesinin bir miktar olumsuz etkilendiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın MTS test sonuçlarına göre hücreler üzerine toksik etkilerinin olabileceğini düşündüğümüz Tetric EvoFlow grubunun, hücre kültüründeki ALP aktivitesini bir miktar olumsuz etkilerken, PDLKH'nin osteojenik farklılaşması üzerine olumsuz etkisinin gözlenmemesi, Keila ve ark. (2004)'nin yapmış olduğu çalışma sonucu ile benzerlik göstermiştir. Araştırmacılar, kullanmış oldukları materyalin sıçan dişeti fibroblastlarının ALP aktivitesi üzerindeki olumsuz etkisine rağmen, matriks oluşumunu arttırması ile ilişkili olarak osteojenik farklılaşmasından bahsetmişlerdir. Ayrıca, Imazato ve ark. (2009), Tetric EvoFlow için elde ettiğimiz

sonuçlarımıza benzer şekilde, kompozit materyalinden açığa çıkan monomer miktarının osteoblast hücreleri üzerine düşük düzeyde olumsuz etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Imazato ve ark. (2009), osteoblast benzeri hücreler üzerinde rezin esaslı restoratif materyallerden salınım gösteren monomerlerin etkisini inceledikleri çalışmada, hücre kültüründen elde edilen kollajen tip I, ON gen düzeyleri ve ALP aktivitesi açısından, çalışma grupları ile kontrol grubu arasında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Hücre kültüründen elde edilen OK gen düzeyi ise 21. güne kadar oldukça düşük bulunurken, ancak 28. günde saptanabilmiştir. Bu durum, OK'nın farklılaşmış osteoblast hücreleri tarafından mineralizasyon aşamasında sentez edilmesine bağlı olarak, osteoblastik farklılaşmanın geç belirteci olmasına bağlanmıştır. Bundan farklı olarak çalışmamızda, PK grubuna ait hücre kültüründen gerçekleşen OK sentezinin 14. günde tespit edilebildiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada, rezin modifiye cam iyonomer simandan açığa çıkan monomer miktarının osteoblast hücrelerinin çoğalma, mineralizasyon ve farklılaşma potansiyeli üzerine olumsuz etkilerinin olduğu; cam iyonomer simanın ise osteoblastların farklılaşmasını arttırabileceği sonucuna varılmıştır (Imazato ve ark., 2009). Bu nedenle farklı tipte restoratif materyallerin osteoblast benzeri hücreler üzerine olan etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu alanda çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

### 7.3. Sonuçlar

- Henüz gelişimini tamamlamamış yirmi yaş dişinin pulpa ve PDL dokularından mekanik ayrıştırma yöntemi ile elde edilen kök hücrelerin, canlılık ve farklılaşma kapasitesinin yüksek olduğu görüldü.
- İnsan diş pulpası ve PDL dokularından kültüre edilmiş hücrelerin, akım sitometri analizlerine göre, MKH'ye ait spesifik yüzey belirteçlerine sahip olduğu gözlemlendi.

#### 7.3.1. DPKH sonuçları

- **DPKH** kültüründen elde edilen sitotoksosite (**MTS**) testi sonuçlarına göre, Tetric EvoFlow grubunun 3. ve 14. günlerdeki hücre canlılık düzeyinde belirgin bir azalma olduğu izlendi.
- On dört günlük farklılaşma deneyinin sonucunda, **DPKH** kültüründen elde edilen **ALP** aktivite testi verilerine göre, Tetric EvoCeram ALP aktivitesini etkilemezken, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow gruplarının tamamen engellediği görüldü. En düşük ALP aktivitesi, Tetric EvoFlow grubunda saptandı.
- **ALR** boyama görüntülerine göre, kompozit materyallerine maruz bırakılan **DPKH** kültüründeki kalsifikasyon yoğunluğunun pozitif kontrolden daha az olduğu izlendi.
- **Gerçek Zamanlı PZR** yöntemi ile **DPKH** kültüründen tayin edilen **kollajen tip I**, **DSPP** ve **DMP1** gen analizinde, kompozit gruplarının hücre kültüründeki gen aktivitesini engellediği; Tetric EvoFlow'un ise, düşük düzeyde DMP1 aktivitesi gösterdiği saptandı.

#### 7.3.2. PDLKH sonuçları

- **PDLKH** kültüründen elde edilen **MTS** testi sonuçlarına göre, Tetric EvoFlow grubunun 14. gündeki hücre canlılık düzeyinde pozitif kontrol grubuna benzer şekilde belirgin bir azalma olduğu görüldü.

- On dört günlük farklılaşma deneyinin sonucunda, **PDLKH** kültüründen elde edilen **ALP** aktivite testi verilerine göre, kompozit gruplarının, pozitif kontrolden daha düşük seviyede olmak üzere ALP aktivitesi gösterdiği izlendi. Kompozit grupları arasında en düşük ALP aktivitesi Tetric EvoCeram Bulk Fill grubunda saptandı.
- **ALR** boyama görüntülerine göre, kompozit materyallerine maruz bırakılan **PDLKH** kültüründeki kalsifikasyon yoğunluğunun pozitif kontrolden daha az olduğu gözlemlendi.
- **Gerçek Zamanlı PZR** yöntemi ile **PDLKH** kültüründen tayin edilen **kollajen tip I, OK ve ON** gen analizinde, gruplar arası kollajen tip I aktivitesinde anlamlı bir fark bulunmadı. En yüksek TetricEvoFlow grubunda olmak üzere, bütün kompozit gruplarında OK aktivitesi görüldü. Tetric EvoFlow, pozitif kontrole benzer OK aktivitesi gösterirken; diğer kompozit gruplarının, hücre kültüründeki OK aktivitesini bir miktar azalttığı izlendi. ON gen aktivitesinin analizinde ise, Tetric EvoCeram Bulk Fill ve Tetric EvoFlow grubunun ON aktivitesi gösterdiği; Tetric EvoFlow ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Diş hekimliğinde, uygun restoratif materyalin seçimi sadece materyalin fiziksel ve kimyasal üstünlüklerine göre olmayıp, aynı zamanda biyouyumluluğuna da bağlıdır. Son yıllarda, kompozit dolgu materyallerinin biyouyumlulukları konusunda şüpheler olduğu ve güncel çalışmaların giderek bu konu üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Literatürde, kompozit dolgu materyallerinin DPKH ve PDLKH üzerine toksik etkilerini inceleyen çalışma bulunurken, bu materyallerin PDLKH'nin farklılaşma / tamir mekanizması üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız, günümüz diş hekimliği pratiğinde sıklıkla uygulanmakta olan benzer monomer yapıya sahip universal, bulk-fill ve akışkan tipteki kompozitlerin hem DPKH hem de PDLKH'nin farklılaşma / tamir mekanizması üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın sonucuna göre, kompozit dolgu materyallerinin, doldurucu içeriğine bağlı olarak pulpa ve periodontal ligament dokuları üzerinde toksik etkilerinin olabileceği, aynı zamanda dokuların tamir fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği görüldü.

## 8. KAYNAKLAR

About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JQ. Influence of Resinous Monomers on the Differentiation in Vitro of Human Pulp Cells into Odontoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;63: 418-423.

Açil Y, Yang F, Gulses A, Ayna M, Wiltfang J, Gierloff M. Isolation, characterization and investigation of differentiation potential of human periodontal ligament cells and dental follicle progenitor cells and their response to BMP-7 in vitro. *Odontology.* 2015;e-pub: Mar.

Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem M. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Invest.* 2005;9: 21-25.

Altun C. Kompozit Dolgu Materyallerinde Son Gelişmeler. *Gülhane Tıp Derg.* 2005;1: 77-82.

Alvarez L, Ricos C, Peris P, Guanabenez N, Monegal A, Pons F, Ballesta AM. Components of biological variations of biochemical markers of bone turnover in Paget's Bone disease. *Bone.* 2000;26: 571-576.

Aranha AMF, Giro EMA, Hebling J, Lessa FCR, Costa CAS. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblastlike cells. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(5): 461-466.

Arenholt-Bindslev D, Hersted-Bindslev P. Dental amalgam. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, eds. *Biocompatibility of dental materials.* 1st ed. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer.; 2009, p: 59-98.

Arıkan S. Posterior kompozit restorasyonlar. *Cumhuriyet Üniv Diş Hek Fak Derg.* 2005;8: 63-70.

Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *GÜ Diş Hek Fak Derg.* 2012;29: 115-120.

Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, Garcia-Fernandez D, Barajas M, Carrasco MA, Jung HS, Alfaro FH, Casals N, Prosper F, Ferres-Padro E, Giner L. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci.* 2012;125: 3343-3356.

Azarpazhooh A, Main PA. Is there a risk of harm or toxicity in the placement of pit and fissure sealant materials? A systematic review. *J Can Dent Assoc.* 2008;74: 179-183.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater.* 2012;28: 327-339.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011a;56: 709-721.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Effects of HEMA and TEGDMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater.* 2011b;27: 608-617.

Bakopoulou AA, Trivaii IN, Tsiftoglou AS, Garefis PD. In vitro assessment of cytotoxicity of resin-based dental restorative materials on WEHI 13 var fibroblasts. *Int J Prosthodont.* 2006;19: 13-16.

Bayne SC, Heymann HO, Swift EJ, Jr. Update on dental composite restorations. *J Am Dent Assoc.* 1994;125: 687-701.

Bayne SC, Thompson JY, Swift EJ, Jr., Stamatiades P, Wilkerson M. A characterization of first-generation flowable composites. *J Am Dent Assoc.* 1998;129: 567-577.

Beattie GM, Otonkoski T, Lopez AD, Hayek A. Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? *Diabetes*. 1997;46: 244-248.

Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;97: 8352-8357.

Bektaş ÖÖ, Siso ŞH, Eren D. Işık kaynakları, polimerizasyon ve klinik uygulamalar. *EÜ Dişhek Fak Derg*. 2006;27: 117-124.

Berglund A, Molin M. Mercury levels in plasma and urine after removal of all amalgam restorations: the effect of using rubber dams. *Dent Mater*. 1997;13: 297-304.

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;16: 1-9.

Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, *in vitro*. *J Oral Rehabil*. 1998;25: 45-51.

Bowen RL, Marjenhoff WA. Dental composites/glass ionomers: the materials. *Adv Dent Res*. 1992;6: 44-49.

Brownawell AM, Berent S, Brent RL, Bruckner JV, Doull J, Gershwin EM, Hood RD, Matanoski GM, Rubin R, Weiss B, Karol MH. The potential adverse health effects of dental amalgam. *Toxicol Rev*. 2005;24: 1-10.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86: 3828-3832.

Bucuta S, Ilie N. Light transmittance and micro-mechanical properties of bulk fill vs. conventional resin based composites. *Clin Oral Investig*. 2014;18: 1991-2000.

Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci*. 1998;106 (Suppl 1): 204-210.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol.* 1995;39: 169-179.

Cadenaro M, Marchesi G, Antonioli F, Davidson C, D.E. DS, Breschi L. Flowability of composites is no guarantee for contraction stress reduction. *Dent Mater.* 2009;25: 649-654.

Cao LY, Sood A, Taylor JS. Hand/face/neck localized pattern: sticky problems-resins. *Dermatol Clin.* 2009;27: 227-249.

Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol.* 2005;25: 101-108.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9: 641-650.

Casagrande L, Mattuella LG, de Araujo FB, Eduardo J. Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;31: 25-27.

Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials.* 1991;12: 737-740.

Charbord P. Hemopoietic stem cells: analysis of some parameters critical for engraftment. *Stem cells.* 1994;12: 545-562.

Chen MH. Update on dental nanocomposites. *J Dent Res.* 2010;89: 549-560.

Chen ZX, Chang M, Peng YL, Zhao L, Zhan YR, Wang LJ, Wang R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Regul Pept.* 2007;142: 16-23.

Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism, an overview. *Clin Biochem.* 1997;30: 573-593.

Choi KK, Ferracane JL, Hilton TJ, Charlton D. Properties of packable dental composites. *J Esthet Dent.* 2000;12: 216-226.

Cihova M, Altanerova V, Altaner C. Stem cell based cancer gene therapy. *Mol Pharm.* 2011;8: 1480-1487.

Cobb DS, MacGregor KM, Vargas MA, Denehy GE. The physical properties of packable and conventional posterior resin-based composites: a comparison. *J Am Dent Assoc.* 2000;131: 1610-1615.

Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 21(11): 1095-1102.

Conrad C, Huss R. Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery. *J Surg Res.* 2005;124: 201-208.

Cook WD, Beech DR, Tyas MJ. Resin-based restorative materials-a review. *Aust Dent J.* 1984;29: 291-295.

Couple ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000;66: 129-138.

Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;198: 209-230.

Craig RG. Chemistry, composition, and properties of composite resins. *Dent Clin North Am.* 1981;25: 219-239.

Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res.* 2011;90: 402-416.

Çelik Ç, Özel Y. Rezin restoratif materyallerin polimerizasyonunda kullanılan ışık kaynakları. *ADO Klin Bilim Derg.* 2008;2: 109-115.

Çolak Ş. Amalgam: Dünü ve bugünü. *AÜ Diş Hek Fak Derg.* 1989;16: 533-538.

Darmani H, Al-Hiyasat AS, Milhem MM. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int.* 2007;38: 789-795.

Dayangaç GB. Kompozit restorasyonlar, İstanbul: Quintessence Yayıncılık: 2011.

Dias J, Gumenyuk M, Kang H, Vodyanik M, Yu J, Thomson JA, Slukvin, II. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20: 1639-1647.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8: 315-317.

Eley BM. The future of dental amalgam: a review of the literature. Part 6: Possible harmful effects of mercury from dental amalgam. *Br Dent J.* 1997;182: 455-459.

Eliades G, Eliades T, Brantley WA, Watts DC. Dental Materials in vivo: aging and related phenomena. *Quintessence Int.* 2003: 79-122.

Ergün G, Eğilmez F, Çekiç-Nagas I. The cytotoxicity of resin composites cured with three light curing units at different curing distances. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16: 252-259.

Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, De Souza RN, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem.* 1998;273: 9457-9464.

Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett.* 2010;32: 635-642.

Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994;21: 441-452.

Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6: 302-318.

Ferracane JL. Direct posterior restoratives. In: Ferracane JL, ed. *Materials in Dentistry: Principles and Applications.* 2nd ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001, p: 119-147.

Ferracane JL. Resin composite-state of the art. *Dent Mater.* 2011;27: 29-38.

Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990;6: 282-287.

Finer Y. Medical implant materials. In: Narayan R, ed. *Materials for medical devices.* ASM Int; 2012, p: 296-306.

Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res.* 2004;83: 22-26.

Floyd CJ, Dickens SH. Network structure of Bis-GMA and UDMA based resin systems. *Dent Mater.* 2006;22: 1143-1149.

Flury S, Hayoz S, Peutzfeldt A, Hüsler J, Lussi A. Depth of cure of resin composites: Is the ISO 4049 method suitable for bulk fill materials? *Dent Mater.* 2012;28: 521-528.

Fortier LA. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 2005;34: 415-423.

Frankenberger R, Garcia-Godoy F, Murray PE, Feilzer AJ, Krämer N. Risk aspects of dental restoratives: From amalgam to tooth-colored materials. *World J Stomatol.* 2013;2: 1-11.

Franz A, König F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, Lucas T, Sperr W, Schedle A. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater.* 2003;19: 382-392.

Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dent Mater.* 2009;25: 232-239.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3: 393-403.

Fuks AB. The use of amalgam in Pediatric Dentistry. *Pediatr Dent.* 2002;24: 448-455.

Fung EYK, Ewoldsen NO, Germain HA, Marks DB, Miaw CL, Siew C, Chou HN, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *JADA.* 2000;131.

Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, Schmalz G. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2011;90: 257-262.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16: 1093-1107.

Garcia JMO, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins in human dental pulp and cultured pulp cells. *Int Endod J.* 2003;36: 404-410.

Garcia-Godoy F. Resin-based composites and compomers in primary molars. *Dent Clin North Am.* 2000;44: 541-570.

Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214: 339-347.

Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994;21: 463-468.

Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci.* 1998;106: 687-695.

Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11: 333-355.

Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998;41: 474-480.

Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res.* 2001;80: 2046-2050.

Gladwin M, Bagby M. Direct polymeric restorative materials. In: Gladwin M, Bagby M, eds. *Clinical Aspects of Dental Materials. Theory, Practice, and Cases.* 3rd ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009, p: 55-73.

Gladys S, Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative physico-mechanical characterization of new hybrid restorative materials with conventional glass-ionomer and resin composite restorative materials. *J Dent Res.* 1997;76: 883-894.

Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008;12: 1-8.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15: 13-27.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 1996;183: 1797-1806.

Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17: 103-114.

Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2007;33: 1450-1454.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4: 21-26.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81: 531-535.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97: 13625-13630.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood.* 1995;85: 929-940.

Gül P, Akgül N. Kompozit materyallerin biyouyumluluğu hakkında literatür derlemesi. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.* 2013;(Suppl 7): 78-86.

Güven EP, Yalvaç ME, Şahin F, Yazıcı MM, Rizvanov AA, Bayırlı G. Effect of dental materials calcium hydroxide-containing cement, mineral trioxide aggregate, and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. *J Endod.* 2011;37: 650-656.

Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Bayırlı G. Human tooth germ stem cell response to calciumsilicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci.* 2013;21: 351-357.

Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil.* 1997a;24: 20-25.

Hamid A, Hume WR. A study of component release from resin pit and fissure sealants in vitro. *Dent Mater.* 1997b;13: 98-102.

Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol.* 1997;24: 658-668.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991;70: 1450-1455.

Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod.* 1992;18: 589-596.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 1996;12: 186-193.

Hao J, Zou B, Narayanan K, George A. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone.* 2004;34: 921-932.

Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol.* 2006;77: 1003-1007.

He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGF $\beta$ 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2008;32: 827-834.

Hematti P. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol Biol.* 2011;690: 163-174.

Hervas-Garcia A, Martinez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, Fos-Galve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11: E215-220.

Hesse E, Hefferan TE, Tarara JE, Haasper C, Meller R, Krettek C, Lu L, Yaszemski MJ. Collagen type I hydrogel allows migration, proliferation, and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94: 442-449.

Hickel R, Dasch W, Janda R, Tyas M, Anusavice K. New direct restorative materials. FDI Commission Project. *Int Dent J.* 1998;48: 3-16.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88: 792-806.

Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32: 1066-1073.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34: 645-651.

Huss R. Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000;9: 783-793.

Ilie N, Hickel R. Investigations on mechanical behavior of dental composites. *Clin Oral Invest.* 2009;13: 427-438.

Ilie N, Hickel R. Resin composite restorative materials. *Aust Dent J.* 2011;56 (Suppl 1): 59-66.

Ilie NS, Draenert BM. Bulk-fill resin-based composites: an in vitro assessment of their mechanical performance. *Oper Dent.* 2013;38: 618-625.

Imaizumi N, Kondo H, Ohya K, Kasugai S, Araki K, Kurosaki N. Effects of exposure to 4-META/MMA-TBB resin on pulp cell viability. *J Med Dent Sci.* 2006;53: 127-133.

Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S. Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88: 378-386.

ISO (1999). International standart 10993. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.

ISO (2008). International standart 7405. Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis.* 2006;12: 358-363.

Jackson RD, Morgan M. The new posterior resins and a simplified placement technique. *J Am Dent Assoc.* 2000;131: 375-383.

Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.* 2009;25: 1001-1006.

Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Giannobile W. Cementum engineering using three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2003;67: 54-60.

Johnson GL. Amalgam. In: Craig RG, Powers JM, eds. *Restorative Dental Materials.* 11th ed. St.Louis: Mosby Inc; 2002, p: 288-327.

Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60 (Suppl 7): 167-175.

Karaöz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyuz S, Ayhan S, Genc ZS, Yuruker S, Duruksu G, Demircan PC, Sariboyaci AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133: 95-112.

Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol.* 1993;38: 769-777.

Kawazoe Y, Katoh S, Onodera Y, Kohgo T, Shindoh M, Shiba T. Activation of the FGF signaling pathway and subsequent induction of mesenchymal stem cell differentiation by inorganic polyphosphate. *Int J Biol Sci.* 2008;4: 37-47.

Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z, Weinreb M. In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2004;83: 134-138.

Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000;26: 288-291.

Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, Richardson M, Carpenter MK, D'Amour KA, Kroon E, Moorman M, Baetge EE, Bang AG. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011;29: 750-756.

Kim KH, Ong JL, Okuno O. The effect of filler loading and morphology on the mechanical properties of contemporary composites. *J Prosthet Dent.* 2002;87: 642-649.

Klimanskaya I, Rosenthal N, Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7: 131-142.

Kömürcüoğlu E, Ölmez S, Vural N. Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants in vitro. *J Oral Rehabil.* 2005;32: 116-121.

Kömürcü E, İnanmaz ME, Işık C, Akan B, Köse KÇ. Kemik yerine geçen biyomateryaller 2. kısım: Hayvansal ve Sentetik Greftler. *Düzce Tıp Derg.* 2011;13: 46-52.

Kugel G, Ferrari M. The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc.* 2000;131 (Suppl): 20-25.

Kulan P. Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar İle Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2015, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Betül Kargül).

Kwon JH, Park HC, Zhu T, Yang HC. Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. *Biomater Res.* 2015;19: 1-7.

Labella R, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G. Polymerization shrinkage and elasticity of flowable composites and filled adhesives. *Dent Mater.* 1999;15: 128-137.

- Lee YK. Influence of filler on the difference between the transmitted and reflected colors of experimental resin composites *Dent Mater*. 2008;24: 1243-1247.
- Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res*. 2001;36: 71-79.
- Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials*. 2005;26: 7145-7153.
- Liebenberg WH. Successive cusp build-up: an improved placement technique for posterior direct resin restorations. *J Can Dent Assoc*. 1996;62: 501-507.
- Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec*. 1989;224: 154-166.
- Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4: 679-728.
- Liu ZC, Chang TM. Artificial cell microencapsulated stem cells in regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2010;670: 68-79.
- Loguercio AD, Reis A, Rodrigues Filho LE, Busato AL. One-year clinical evaluation of posterior packable resin composite restorations. *Oper Dent*. 2001;26: 427-434.
- Lu H, Trujillo-Lemon M, Ge J, Stansbury JW. Dental resins based on dimer acid dimethacrylates: a route to high conversion with low polymerization shrinkage. *Compend Contin Educ Dent*. 2010;31 (2): 1-4.
- Lutz F, Phillips RW. A classification and evaluation of composite resin systems. *J Prosthet Dent*. 1983;50: 480-488.
- Lygre H, Hol PJ, Solheim E, Moe G. Organic leachables from polymerbased dental filling materials. *Eur J Oral Sci*. 1999;107: 378-383.
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem*. 1997;272: 835-842.

- Mackert JR, Jr., Berglund A. Mercury exposure from dental amalgam fillings: absorbed dose and the potential for adverse health effects. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8: 410-436.
- Manhart J, Kunzelmann KH, Chen HY, Hickel R. Mechanical properties of new composite restorative materials. *J Biomed Mater Res.* 2000;53: 353-361.
- Marchesi G, Breschi L, Antonioli F, Di Lenarda R, Ferracane J, Cadenaro M. Contraction stress of low-shrinkage composite materials assessed with different testing systems. *Dent Mater.* 2010;26: 947-953.
- McCabe JF, Walls AWG. Resin-based filling materials. In: Mc Cabe JF, Walls AWG, eds. *Applied Dental Materials.* 8th ed. England: Blackwell Scientific Pub.; 2000, p: 87-178.
- McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec.* 1987;219: 233-242.
- Meyer JM, Cattani-Lorente MA, Dupuis V. Compomers: between glass-ionomer cements and composites. *Biomaterials.* 1998;19: 529-539.
- Michelsen VB, Kopperud HBM, Lygre GB, Björkman L, Jensen E, Kleven IS, Svahn J, Lygre H. Detection and qualification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *Eur J Oral Sci.* 2012;120: 89-95.
- Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 2003;111: 263-271.
- Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33: 881-887.
- Mitra SB, Wu D, Holmes BN. An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc.* 2003;134: 1382-1390.

Mitsiadis TA, Rahiotis C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injuries. *J Dent Res.* 2004;83: 896-902.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100: 5807-5812.

Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials.* 2009;2: 514-548.

Moharamzadeh K, van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater.* 2007a;23: 40-44.

Moharamzadeh K, van Noort R, Brook IM, Scutt AM. HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med.* 2007b;18: 133-137.

Morin D, DeLong R, Douglas WH. Cusp reinforcement by the acid-etch technique. *J Dent Res.* 1984;63: 1075-1078.

Morszeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 2008;12: 113-118.

Morszeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Saugspier M, Viale-Bouroncle S, Driemel O. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Invest.* 2009;13: 383-391.

Mousavinasab MS. Biocompatibility of composite resins. *J Dent Res.* 2011;8: 21-29.

Mucuk, G. Diş Kaynaklı Kök Hücrelerin Odontoblastik Diferansiyasyonu Üzerine D3 Vitamininin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisinin İncelenmesi. İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2014, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Elif Sepet).

Muller H, Olsson S, Soderholm KJ. The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites. *Eur J Oral Sci.* 1997;105: 362-368.

Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res.* 1990;98: 261-267.

Munksgaard EC, Peutzfeldt A, Asmussen E. Elution of TEGDMA and Bis-GMA from a resin and resin composite cured with halogen or plasma light. *Eur J Oral Sci.* 2000;108: 341-345.

Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dent Mater.* 2002;18: 470-478.

Murray PE, Smith AJ. Saving pulps-a biological basis. An overview. *Prim Dent Care.* 2002;9: 21-26.

Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, Kassem M, Bungler C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials.* 2007;28: 1036-1047.

Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent.* 2009;12: 131-138.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006;41: 303-310.

Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res.* 1994;73: 1515-1522.

Nalçacı A, Ulusoy N. Kompozit rezinlerde artık monomer miktarının belirlenmesi. *AÜ. Diş Hek. Fak. Derg.* 2005;30: 105-113.

Nicholson JW. Polyacid-modified composite resins ("compomers") and their use in clinical dentistry. *Dent Mater.* 2007;23: 615-622.

Nicholson JW, Croll TP. Glass-ionomer cements in restorative dentistry. *Quintessence Int.* 1997;28: 705-714.

Oilo G. Biodegradation of dental composites/glass-ionomer cements. *Adv Dent Res.* 1992;6: 50-54.

Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Fertrell AN, Pedraza V, Soto M, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* 1996;104: 298-305.

Ortengren U, Andreasson H, Karlsson S, Meding B, Barregård L. Prevalence of self-reported hand eczema and skin symptoms associated with dental materials among Swedish dentists. *Eur J Oral Sci.* 1999;107: 496-505.

Özbay G. Günümüzde Kullanılan Çeşitli Amputasyon Materyallerinin Diş Pulpası Üzerindeki Sitotoksik Ve Rejeneratif Etkilerinin Hücresel Düzeyde İncelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Betül Kargül).

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000;113: 5-10.

Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci.* 1997;105: 97-116.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells.* 2007;25: 2896-2902.

Pilo R, Oelgiesser D, Cardash HS. A survey of output intensity and potential for depth of cure among light-curing units in clinical use. *J Dent.* 1999;27: 235-241.

Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res.* 1994;29: 81-94.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284: 143-147.

Powers JM. Composite restorative materials. In: Craig RG, Powers JM, eds. *Restorative Dental Materials.* 11th ed. St. Louis: Mosby Inc; 2002, p: 231-257.

Puckett AD, Fitchie JG, Kirk PC, Gamblin J. Direct composite restorative materials. *Dent Clin North Am.* 2007;51: 659-675.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007;1: 35-38.

Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* 2001;122: 713-734.

Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang BQ, He BC, Chen L, Zuo GW, Luo Q, Shi Q, Wagner ER, Huang E, Gao Y, Gao JL, Kim SH, Zhou JZ, Bi Y, Su Y, Zhu G, Luo J, Luo X, Qin J, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, Deng ZL, He TC. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells.* 2010;2: 67-80.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74: 1602-1606.

Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol.* 2006;80: 370-377.

Rodriguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Perez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda JM. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24: 979-988.

Roeters JJ, Shortall AC, Opdam NJ. Can a single composite resin serve all purposes. *Br Dent J.* 2005;199: 73-79.

Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995;39: 51-68.

Sadeghi M, Lynch CD. The effect of flowable materials on the microleakage of Class II composite restorations that extend apical to the cemento-enamel junction. *Oper Dent.* 2009;34: 306-311.

Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res.* 2005;20: 50-57.

Sakaguchi RL, Douglas WH, Peters MC. Curing light performance and polymerization of composite restorative materials. *J Dent.* 1992;20: 183-188.

Sakaguchi RL, Powers JM, Khajotia SS, Mitra SB. Biocompatibility and tissue reaction to biomaterials. In: Sakaguchi RL, Powers JM, eds. *Craig's Restorative Dental Materials.* 13th ed.; 2012a.

Sakaguchi RL, Powers JM, Kiersten L, Muenchinger AB. Restorative materials-composites and polymers. In: Sakaguchi RL, Powers JM, eds. *Craig's Restorative Dental Materials.* 13th ed. Elsevier Health Sciences; 2012b.

Santerre JP, Shajii L, Tsang H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J Dent Res.* 1999;78: 1459-1468.

Sasaki N, Okuda K, Kato T, Kakishima H, Okuma H, Abe K, Tachino H, Tsuchida K, Kubono K. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16: 297-300.

Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* 1998;14: 429-440.

Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental materials. *Clin Oral Invest.* 1997;1: 154-162.

Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 1998;106: 696-706.

Schmalz G. Resin-based composites. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, eds. *Biocompatibility of Dental Materials.* Berlin-Heidelberg, Germany: Springer; 2009, p: 99-137.

Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Dental filling materials. Hazards to patients and to environment? Introduction. *Eur J Oral Sci.* 1998;106: 677.

Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Basic aspects. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, eds. *Biocompatibility of Dental Materials.* Berlin-Heidelberg, Germany: Springer.; 2009, p: 1-12.

Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D. Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig.* 1999;3: 114-119.

Schmidt M, Kirkevang LL, Horsted-Bindslev P, Poulsen S. Marginal adaptation of a low-shrinkage silorane-based composite: 1-year randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2011;15: 291-295.

Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Kerstin G, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials.* 2005a;26: 4111-4118.

Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007;23: 688-695.

Schweickl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005b;26: 1713-1719.

Schweickl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006;85: 870-877.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364: 149-155.

Sepet E, Pınar A, İlhan B, Ulukapı I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int*. 2009;40(8): 55-61.

Shafiei F, Tavangar MS, Razmkhah M, Attar A, Alavi AA. Cytotoxic effect of silorane and methacrylate based composites on the human dental pulp stem cells and fibroblasts. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19: 350-358.

Sharma S, Sikri V, Sharma NK, Sharma VM. Regeneration of tooth pulp and dentin: trends and advances. *Annals of Neurosciences*. 2010;17: 31-43.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8: 191-199.

Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Micros Res and Tech*. 2003;60: 491-502.

Shokati B, Tam L, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the resin-dentin interface. *J Biomed Mater Res*. 2010;94: 230-237.

- Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent.* 2000;84: 229-236.
- Skrtic D, Antonucci JM, Liu DW. Ethoxylated bisphenol dimethacrylate-based amorphous calcium phosphate composites. *Acta Biomater.* 2006;2: 85-94.
- Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13: 151-157.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995;39: 273-280.
- Soderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc.* 1999;130: 201-209.
- Soderholm KJ, Mukherjee R, Longmate J. Filler leachability of composites stored in distilled water or artificial saliva. *J Dent Res.* 1996;75: 1692-1699.
- Southall TD, Egger B, Gold KS, Brand AH. Regulation of self-renewal and differentiation in the *Drosophila* nervous system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73: 523-528.
- Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent.* 1998;26: 137-145.
- Stansbury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent.* 2000;12: 300-308.
- Stein PS, Sullivan J, Haubenreich JE, Osborne PB. Composite resin in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15: 641-654.
- Steinbeck JA, Koch P, Derouiche A, Brustle O. Human embryonic stem cell-derived neurons establish region-specific, long-range projections in the adult brain. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69: 461-470.

Stockton LW. Vital pulp capping: a worthwhile procedure. J Can Dent Assoc. 1999;65: 328-331.

Sunil P, Manikandhan R, Muthu M, Abraham S. Stem cell therapy in oral and maxillofacial region: An overview. J Oral Maxillofac Pathol. 2012;16: 58-63.

Süzergöz F, Erdem AP, Sepet E, Bektaş M, Yalman N, Güro AO. Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu, koloni oluşturma yeteneği ve kök hücre içeriğinin belirlenmesi üzerine bir ön çalışma. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(1): 128-133.

Tadin A, Marovic D, Galic N, Kovacic I, Zeljezic D. Composite-induced toxicity in human gingival and pulp fibroblast cells. Acta Odontol Scand. 2014;72(4): 304-311.

Tang R, Wei F, Wei L, Wang S, Ding G. Osteogenic differentiated periodontal ligament stem cells maintain their immunomodulatory capacity. J Tissue Eng Regen Med 2014;8: 226-232.

Taşlı PN, Tapşın S, Demirel S, Yalvaç ME, Akyüz S, Yarat A, Şahin F. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a patient with Papillon-Lefevre syndrome. J Endod. 2013;39: 31-38.

Trubiani O, Caputi S, Di Iorio D, D'Amario M, Paludi M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F, De Angelis F, D'Arcangelo C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. Int Endod J. 2010;43: 646-653.

Tsakamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. Arch Oral Biol. 1992;37: 1045-1055.

Tuna EB, Gençay K. Kompozit materyallerden artık monomerlerin salınımını etkileyen faktörler. Türk Dişhek Derg. 2006;66: 226-228.

Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg. 2011;21: 141-149.

- Uluakay M, Inan H, Yamanel K, Arhun N. Kompozit rezinler ve polimerizasyon büzülmesi. *ADO Klin Bilim Derg.* 2011;5: 895-902.
- Ure D, Harris J. Nanotechnology in dentistry: reduction to practice. *Dent Update.* 2003;30: 10-15.
- Vaderhobli RM. Advances in dental materials. *Dent Clin North Am.* 2011;55: 619-625.
- van Noort R. Clinical dental materials. In: van Noort R, Barbour ME, eds. *Introduction to Dental Materials.* 4th ed. Mosby Elsevier 2013, p: 61-168.
- Venhoven BAM, Gee AJ, Davidson CL. Polymerization contraction and conversion of light-curing BisGMA-Based Methacrylate resins. *Biomaterials.* 1993;14: 871-875.
- Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res.* 2004;83: 222-226.
- Waggoner WF. Restorative Dentistry for the Primary Dentition. In: Pinkham JR, Casamassimo PS, Fields JHW, McTigue DJ, Nowak AJ, eds. *Pediatric Dentistry: Infancy through Adolescence.* 4 th ed. St. Louis: Saunders; 2005, p: 341-374.
- Wakefield CW, Kofford KR. Advances in restorative materials. *Dent Clin North Am.* 2001;45: 7-29.
- Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practioners. *J Prosth Dent.* 2001;86: 203-209.
- Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater.* 2003;19: 25-31.
- Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod.* 2007;33: 703-708.
- Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-- fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 2007;23: 343-362.

Willems G, Lambrechts P, Braem M, Vanherle G. Composite resins in the 21st century. *Quintessence Int.* 1993;24: 641-658.

Wilson KS, Zhang K, Antonucci JM. Systematic variation of interfacial phase reactivity in dental nanocomposites. *Biomaterials.* 2005;26: 5095-5103.

Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, O'Sullivan C, Laflamme MA, Zhu WZ, Van Biber B, Hegerova L, Yang J, Delavan-Boorsma K, Davies A, Lebkowski J, Gold JD. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Regen Med.* 2011;6: 53-66.

Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Novel CaF<sub>2</sub> nanocomposite with high strength and fluoride ion release. *J Dent Res.* 2010a;89: 739-745.

Xu HH, Sun L, Weir MD, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, Peltz M. Nano DCPA-whisker composites with high strength and Ca and PO<sub>4</sub> release. *J Dent Res.* 2006;85: 722-727.

Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM. Strong nanocomposites with Ca, PO<sub>4</sub>, and F release for caries inhibition. *J Dent Res.* 2010b;89: 19-28.

Yalvaç ME, Ramazanoğlu M, Rizvanov AA, Şahin F, Bayrak OF, Şallı U, Palotas A, Köse GT. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2010;10: 105-113.

Yalvaç ME, Rizvanov AA, Kılıç E, Şahin F, Mukhamedyarov MA, Islamov RR, Palotas A. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des.* 2009;15: 3908-3916.

Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunoelectron-microscopic study of the localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Arch Oral Biol.* 1995;40: 83-89.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81: 695-700.

Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng.* 2006;12: 3097-3105.

Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell.* 2007;99: 465-474.

Zabierowski SE, Herlyn M. Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. *Methods Mol Biol.* 2010;584: 301-316.

Zhang J, Park YD, Bae WJ, El-Fiqi A, Shin SH, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Biomater Appl.* 2015;29 (7): 954-964.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12: 2813-2823.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH, Jr., Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *J Periodontol.* 2004;75: 154-161.

Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39: 478-483.

Zhou Y, Hutmacher DW, Sae-Lim V, Zhou Z, Woodruff M, Lim TM. Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. *J Periodontol.* 2008;79: 525-534.

Zhu F, Nie RR, Wu L, Liu L, Tang W, Tian WD. Expression of odontogenic and osteogenic genes in bone marrow mesenchymal stem cells with overexpression of mouse dentin sialophosphoprotein. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008;39: 290-293.

Zimmerli A, Strub M, Jeger F, Stadler O, Lussi A. Composite materials: Composition, properties and clinical applications. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2010;120: 972-979.

## 9. EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

**PROJENİN ADI:** Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin In Vitro Olarak İncelenmesi  
**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof.Dr. Serap AKYÜZ  
**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR:** Ezgi ÇEKMEGELİ  
**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI:** 08.10.2013-6

Sayın Prof.Dr. Serap AKYÜZ

112 protokol nolu “Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin In Vitro Olarak İncelenmesi” isimli projeniz Enstitümüzün Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

*F. Arıcıoğlu*

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Komisyon Başkanı

*İnci Alıcan*

Prof. Dr. İnci ALİCAN

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

*Levent Kabasakal*

Doç. Dr. Levent KABASAKAL

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

*Neyşe Bayhçecik*

Doç. Dr. Neyşe BAYHÇECİK

*Hakkı Arıkan*

Doç. Dr. Hakkı ARIKAN

Doç. Dr. Asım CİNGİ

*Pınar Ay*

Doç. Dr. Pınar AY

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

*Tolga Güven*

Yrd. Doç. Dr. Tolga GÜVEN

## **Ek 2. Hasta Bilgilendirme Formu**

Çalışmamız gönüllülük esasına dayanmaktadır. Katılımınızdan önce size araştırma hakkında bilgi vermek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılım kararınızı veriniz. Çalışmamıza katılmak zorunlu değildir. İstedığınız zaman bu çalışmadan çıkabilirsiniz. Çalışmamızda herhangi bir maddi ve manevi risk bulunmamaktadır. Yaptığımız “Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin in vitro Olarak İncelenmesi“ isimli çalışmamızın amacı, farklı yapıya sahip rezin esaslı kompozit dolgu malzemelerinin sitotoksitesini tespit etmek, ayrıca bu materyallerin diş pulpasından elde edilmiş kök hücrelerin odontojenik (dişin dentin doku oluşumunu sağlayan hücreler) farklılaşması ve periodontal alandan elde edilmiş kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerine etkilerini karşılaştırmaktır. Bu amaçla, endikasyonu uzman hekimler tarafından konulup çekilen dişiniz bu araştırmada kullanılacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bilimsel nitelikli yayınlarda ve diş hekimliği öğrencilerinin eğitimlerinde kullanılabilir. Bu amaç dışında kullanılmayacaktır ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ek ödeme yapılmayacaktır.

---

### **Açıklama yapan araştırmacının:**

Adı-Soyadı: Dt.Ezgi (ERARSLAN) ÇEKMEGELİ

Tel: 0532 157 40 80

### **Ek 3. Hasta Onam Formu**

Araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (veya bu metin bana okundu). Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu form ile ilgili soru soracak zaman ve fırsatım oldu. Tüm sorularım cevaplandı. Çekilen dişimin “Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeline Etkisinin in vitro Olarak İncelenmesi“ isimli araştırmada kullanılacağını biliyorum. Bu koşullarla, söz konusu çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. Tıbbi tarihçemi de içeren, kendim hakkımda verdiğim her türlü bilginin doğruluğunu da teyit ediyorum.

#### **Gönüllünün**

Adı-Soyadı:

İmza

Adres:

Tarih:

Tel:

---

**Velayet veya vesayet altında bulunanlar için rıza alma işleminde veli veya vasinin**

Adı-Soyadı:

İmza

Adres:

Tarih:

Tel:

---

#### **Açıklama yapan araştırmacının:**

Adı-Soyadı:

İmza

Tarih:

Tel:

## Ek 4. Çalışma İzin Yazısı



T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ 26.09.2013

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'na,

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı doktora öğrencisi Ezgi (ERARSLAN) ÇEKMEGELİ'nin "Günümüzde Kullanılan Rezin Esaslı Kompozitlerin Sitotoksitesisi ve Kök Hücrelerin Farklaşma Potansiyeline Etkisinin *in vitro* Olarak İncelenmesi" başlıklı tez çalışması Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde yapılacaktır.

Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

Yeditepe Üniversitesi  
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi  
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

r.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Ezgi	<b>Soyadı</b>	ÇEKMEGELİ
<b>Doğum Yeri</b>	Samsun	<b>Doğum Tarihi</b>	16/06/1984
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kimlik No</b>	15899751612
<b>E-mail</b>	ee_erarlan@hotmail.com	<b>Tel</b>	+90 532 157 4080

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	Marmara Üniv. Diş Hekimliği Fak. Pedodonti Anabilim Dalı	2015
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2008
<b>Lise</b>	Haydarpaşa Anadolu Lisesi	2002

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

<b>Yabancı Dil Sınav Notu #</b>								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	82.500							

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	72.180	76.633	79.783

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office	İyi