T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR VE İKİ FARKLI BİYOAKTİF CAMIN FARE FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ VE ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNE OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DENİZ TARAKCIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜNSELİ GÜVEN POLAT

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
TEMMUZ/2025

İTHAF

“Tezimi hayatımın her anında yanında olup beni koşulsuzca seven canım annem ve babama ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve akademik rehberliğiyle yolumu aydınlatan; her zaman sabır ve anlayışla destek veren; sadece akademik değil insani yönüyle de bana örnek olan; beni her zaman yüreklendiren, inanan ve cesaretlendiren çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Günseli Güven Polat'a,

Deneysel çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, laboratuvar sürecinde emeğini, desteğini ve sabrını esirgemeyen, bilimsel titizliği, çözüm odaklı yaklaşımı ve desteği sayesinde bu süreci çok daha verimli ve öğretici bir şekilde tamamlayabilmemi sağlayan, hem bilimsel yaklaşımıyla hem de insani yönüyle üzerimde derin bir iz bırakan değerli hocam Doç. Dr. Eray Metin Güler'e,

Doktora sürecimde bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan, mesleki gelişimimde katkılarını her zaman hissedeceğim değerli Çocuk Diş Hekimliği zümresi hocalarım Doç. Dr. Başak Kızıltan Eliaçık, Doç. Dr. Emine Kaya ve Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Türkoğlu Kayacı'ya,

Birlikte mesai yaptığım Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Kliniği'nin tüm fertlerine,

Sevgileriyle beni her daim güçlü kılan, her anımda yanımda olan, bana güç ve huzur veren; anlayışları, sabırları ve sonsuz destekleriyle bu yolculuğumu ve tüm hayatımı benim için kolaylaştıran canım anneme, babama, kardeşime,

Hayatımın her anında yanımda hissettiğim, birlikte bütün zorlukların üstesinden geldiğimiz, sevgisini ve desteğini hep arkamda hissettiğim Ali'ye teşekkür ederim.

Bu doktora tezine verdikleri katkı ve desteklerinden dolayı, 2024/027 numaralı proje kapsamında çalışmamı destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. DİŞ SERT DOKULARI 5
2.2. PULPA 5
2.2.1. Pulpanın Fonksiyonları 6
2.2.2. Pulpanın Hücreleri 7
2.2.2.1. Odontoblastlar 7
2.2.2.2. Kök hücreler 7
2.2.2.3. Fibroblastlar 8
2.2.2.4. İmmunolojik hücreler. 9
2.3. DİŞ ÇÜRÜĞÜ 9
2.4. DEMİNERALİZASYON VE REMİNERALİZASYON 10
2.5. ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN REMİNERALİZASYON AJANLARI 12
2.5.1. Florür İçeren Remineralizasyon Ajanları 12
2.5.1.1. Gümüş Diamin Florür 13
2.5.2. Florür İçermeyen Remineralizasyon Ajanları 15
2.5.2.1. Biyoaktif camlar 16
2.6. DENTAL MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUĞU 20
2.6.1. Dental Materyallere Uygulananan Biyouyumluluk Testleri 21
2.6.1.1. İn vitro çalışmalar 21
2.6.1.2. İn vivo çalışmalar 22
2.6.1.3. Klinik çalışmalar 23
2.7. İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ 23
2.7.1. Direkt Temas Testi 24

2.7.2. Bariyer Testi 24
2.7.2.1. Filtre difüzyon testi 24
2.7.2.2. Agar diffüzyon testi 25
2.7.2.3. Dentin bariyer testi 25
2.8. SİTOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ 26
2.8.1. Canlılık Değerlendirme Testleri 26
2.8.2. Yaşam Değerlendirme Testleri 26
2.8.3. Hücre Proliferasyon Testleri 26
2.8.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri 27
2.8.4.1. Mikrotitrasyon testleri 27
2.9. APOPTOZ SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER 28
2.9.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri 28
2.9.1.1. Işık mikroskobu. 28
2.9.1.2. Floresan mikroskobu. 28
2.9.1.3. Elektrik mikroskobu 29
2.9.1.4. Faz kontrast mikroskobu 29
2.9.2. İmmunhistokimyasal Yöntemler 30
2.9.2.1. Annexin V Floresan İzotiyosiyanat yöntemi 30
2.9.2.2. TUNEL yöntemi 30
2.9.2.3. M30 antijen tespiti. 30
2.9.2.4. Aktif kaspaz-3 yöntemi 30
2.9.3. Biyokimyasal Yöntemler 31
2.9.3.1. Agaroz jel elektroforezi 31
2.9.3.2. Western blotting 31
2.9.3.3. Akım sitometri 31
2.9.4. İmmünolojik Yöntemler 31
2.9.4.1. Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi 31
2.9.4.2. Florometrik yöntemler 31
2.9.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri 32
2.10. ALKALEN FOSFATAZ 32
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER 33
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER, KİMYASAL VE SARF MALZEMELER 34
3.2.1. Cihaz ve Aletler 35
3.2.2. Kimyasal Malzemeler ve Sarf Malzemeleri 40
3.3. DENEY ÖNCESİ MATERYALLERİN HAZIRLANMASI 41

3.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ 42
3.5. SİTOTOKSİSİTE TESTİ 47
3.6. APOPTOZ TAYİNİ 48
3.7. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ 48
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 48
4. BULGULAR 49
4.1. SİTOTOKSİSİTEYE AİT BULGULAR 49
4.2. APOPTOTİK AKTİVİTEYE İLİŞKİN BULGULAR 52
4.3. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ TAYİNİNE AİT BULGULAR 57
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 86
KAYNAKLAR 87
EK 100

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Biyoaktif cam türleri ve bunların kompozisyonları 17

Tablo 4.1: Gümüş Diamin Florür'ün konsantrasyonlara göre canlılık oranları 49

Tablo 4.2: 45S5'in konsantrasyonlara göre canlılık oranları 50

Tablo 4.3: S53P4'ün konsantrasyonlara göre canlılık oranları 50

Tablo 4.4: Gümüş Diamin Florür'ün dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları 52

Tablo 4.5: 45S5 grubunun dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları 53

Tablo 4.6: S53P4 grubunun dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları 53

Tablo 4.7: Gümüş Diamin Florür grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri 58

Tablo 4.8: 45S5 grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri 59

Tablo 4.9: 45S5 grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri 59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Remineralizalizasyon ve demineralizasyon döngüsü 12

Şekil 2.2: 45S5 molekülünün şematik diyagramı..... 19

Şekil 4.1: : 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür'ün 3'lü karşılaştırmalı analiz grafiği . 51

Şekil 4.2: Farklı doz gruplarında 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür ortalama apoptoz oranları 57

Şekil 4.3: Her bir doz için 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür gruplarının üçlü karşılaştırılması 60

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: RIVASTAR (SDI Dental, LTD.) 33

Resim 3.2: 45S5 (MO SCI, LTD.) 34

Resim 3.3: S53P4 (MO SCI, LTD.) 35

Resim 3.4: Hücre kültürü deneylerinde kullanılan laminar akım kabini 36

Resim 3.5: Santrifüj cihazı 37

Resim 3.6: Hücreleri flask ve plakada görüntülemek için kullanılan mikroskop 38

Resim 3.7: Hücre kültürü inkübatörü 39

Resim 3.8: Multimod okuyucu 40

Resim 3.9: Pasive edilme prosedürü 42

Resim 3.10: L929 fare fibroblast hücreleri 43

Resim 3.11: Hücre kültürü prosedürü 44

Resim 3.12: S53P4'ün IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması 45

Resim 3.13: Gümüş Diamin Florür'ün IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması 46

Resim 3.14: 45S5'in IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması 47

Resim 4.1: 24 saat 0,375 mg/ml Gümüş Diamin Florür uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü 54

Resim 4.2: 24 0,375 mg/ml 45S5 uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü 55

Resim 4.3: 0,375 mg/ml S53P4 uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü 56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAPD : Amerikan Çocuk Diş Hekimliği Derneği

ADA : Amerikan Diş Hekimliği Derneği

ALP : Alkalen Fosfataz

ANOVA : Tek Yönlü Varyans Analizi

ATP : Adenozin Trifosfat

BMP : Kemik Morfogenik Proteini

DAPI : 4′,6-diamidino-2-phenylindole

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetikasit

ELISA : Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi

EMEM : Eagle'ın Minimum Esansiyel Besiyeri

FBS : Fetal Sığır Serumu

FDA : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

FITC : Floresan İzotiyosiyanat

GDF : Gümüş Diamin Florür

GSH : Glutatyon

IC_{50} : İnhibitör Konsantrasyon

Ip : İyon Ürünü

ISO : Uluslararası Standartlar Teşkilatı

Ksp : Çözünürlük Ürün Sabiti

MMP : Matriks Metalloproteinaz

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qHTS : Kantitatif Yüksek Çıktılı Tarama Yaklaşımı

SDH **:** Süksinat Dehidrogenaz

TGF- β **:** Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

TLR-2 **:** Toll Benzeri Reseptör-2

GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR VE İKİ FARKLI BİYOAKTİF CAMIN FARE FİBROBLAST HÜCRELERİÜZERİNDE SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ VE ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNE OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı Gümüş Diamin Florür (GDF), 45S5 ve S53P4'ün fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik etkilerini kıyaslayabilmek ve bu materyallerin Alkalen Fosfataz (ALP) enzim aktivitesi üzerine etkilerini inceleyebilmektir.

Gereç ve Yöntem: Materyaller Uluslararası Standartlar Teşkilatı (ISO) 109935 biyouyumluluk standartlarına uygun olarak hazırlandı. Ani alkali reaksiyonları ve pH değişimlerini önlemek amacıyla deney öncesi 45S5 ve S53P4 pasive edildi. L929 hücre hattı, %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren Eagle'ın Minimum Esansiyel Besiyeri (EMEM) içinde 37°C'de %5 CO_2 ortamında kültürlendi. Hücrelere 0,005 mg/ml'den 3 mg/mL'ye kadar farklı konsantrasyonlardaki materyaller uygulandı, sitotoksisite Adenozin Trifosfat (ATP) biyolüminesans kiti ile ölçüldü. Hücre canlılığı kontrol grubu ile karşılaştırılarak IC_{50} değerleri hesaplandı ve sonraki deneylerde IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlar kullanıldı. Apoptotik etkiler değerlendirildi. ALP enzim aktivitesi, ticari Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi (ELISA) kitleri kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Hücre canlılık analizlerinde, üç grupta da konsantrasyon arttıkça canlılığın azaldığı, en düşük canlılığın 3 mg/ml konsantrasyonda olduğu belirlendi. Tüm dozlarda GDF grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük canlılık oranları gözlendi ($p<0,05$). Apoptoz analizlerinde, doz bağımlı artış olduğu ve en yüksek apoptoz oranının GDF grubunda olduğu tespit edildi ($p<0,001$). ALP aktivitesi açısından 45S5 ve S53P4 gruplarında doz arttıkça aktivitenin yükseldiği, ancak GDF grubunda azaldığı belirlendi. 45S5 grubunun ALP seviyesi tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en yüksek bulunurken, GDF grubunun en düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Sonuç: Sonuç olarak, 45S5 ve S53P4 materyalleri hücre canlılığını ve odontojenik aktiviteyi desteklerken, GDF'nin daha yüksek sitotoksisite ve apoptoz oranına sahip olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif Cam, Fibroblast, GDF, Remineralizasyon, S53P4, 45S5

EVALUATION OF THE EFFECT OF SILVER DIAMINE FLUORIDE AND TWO BIOACTIVE GLASSES ON CYTOTOXICITY, APOPTOSIS AND ALKALINE PHOSPHATASE ON L-929 CELL LINE

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to compare the cytotoxic, apoptotic and odontoblastic effects of Silver Diamine Fluoride, 45S5, and S53P4 on mouse fibroblast cells.

Materials and Methods: The materials for the experiment were prepared in accordance with ISO 10993-5 biocompatibility standards. To prevent alkaline burst reactions, 45S5 and S53P4 bioactive glasses were passivated before use in the experiments. The L929 fibroblast cell line was cultured. Cells were treated with the materials at concentrations ranging from 0.005 to 3 mg/mL. Cell viability was compared with the control group, and IC_{50} values were calculated, with subsequent experiments conducted at concentrations below IC_{50}. Apoptotic effect was evaluated. ALP activity was measured using ELISA kits.

Results: Viability decreased as concentration increased in all groups. Apoptosis analyses showed a dose-dependent increase, with the highest apoptosis rate observed in the Silver Diamine Fluoride group. Regarding activity of ALP, while activity increased with higher doses in the 45S5 and S53P4 groups, it decreased in the SDF group. The ALP level in the 45S5 group was found to be significantly the highest at all concentrations, whereas the Silver Diamine Fluoride group exhibited the lowest ALP level.

Conclusion: It has been concluded that while 45S5 and S53P4 materials supported cell viability and odontogenic activity, Silver Diamine Fluoride exhibited higher cytotoxicity and apoptosis rates.

Key Words: Bioactive Glass, Fibroblast, Remineralization, Silver Diamine Fluoride, S53P4, 45S5

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrobiyal dental plak diş yüzeyinde bulunan, içerisinde organik asit üreten sayısız bakteri de dahil olmak üzere lökositler, makrofajlar, ölü epitelyal hücreler, glikoproteinler gibi birçok farkı komponentten meydana gelen bir birikimdir. Mikrobiyal dental plağın içerisindeki bakteriler tarafından metabolik olarak üretilen organik asitler diş sert dokularının çözünmesine, başka bir deyişle mine ve dentinde demineralizasyon sürecinin başlamasına neden olmaktadırlar. Diş yüzeyinde demineralizasyon sonucu meydana gelen mineral kaybı tükürük ve diğer oral sıvılardaki minerallerin depozisyonu ile dengelenebilmektedir. Bu süreç remineralizasyon olarak adlandırılmaktadır. Demineralizasyon ve remineralizasyon reaksiyonları arasındaki dengenin demineralizasyon tarafına kaydığı durumlarda ise diş çürüğü oluşumu görülmektedir (1).

Diş çürüğü günümüzde bütün dünyayı etkileyen bir halk sağlığı problemidir (2–4). Etiyolojiyisi karmaşık, multifaktöriyel enfeksiyöz bir hastalıktır (2,5). Hastalığın oluşabilmesi için bir konak, beslenme ile alınan substrat ve metabolik ürün olarak asit üretebilen bakterilerin olması şarttır (6).

Bakteriler; tükürük ve besin sayesinde diş yüzeyinde bir biyofilm tabakası oluşturmaktadırlar. Biyofilm tabakasındaki bakteriler, zaman içinde substratları metabolize edip diş yüzeyini demineralize eden asitlerin üretimini sağlamaktadırlar. Tükürük akış hızı, tükürüğün yoğunluğu, tamponlama ve remineralizasyon kapasitesi diş çürüğünün ilerlemesine etki eden kritik faktörlerdir. Dengeli bir ağız ortamında tükürük, güçlü bir apatit yapısı oluşturmayı sağlayacak bileşenleri dişe sağlayabilmektedir. Ağız ortamının elverişsiz olduğu, sık sık ve fazla miktarda asit üretiminin gerçekleştiği koşullarda bile yeterli tükürük akışı olduğunda, üretilen asit seyreltilip tamponlanabilmektedir. Bu sayede diş yapısında oluşacak hasar yavaşlamakta hatta bazen onarılabilmektedir. Çürük aktivitesini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilecek birçok anatomik, davranışsal, genetik, sosyal, kültürel, sosyoekonomik, terapötik ve beslenme ile ilgili faktör bulunmaktadır (7).

Diş çürüğü önlenebilir bir hastalıktır. Tipik olarak minede başlamaktadır. Hastalığın erken safhaları yavaş ilerlemektedir. Diş yapısında kavitasyon görülmesi çürüğün oldukça ileri bir aşamada olduğunun göstergesidir. Kavitasyon oluşumu

görülmeden önce uygun bir ağız ortamı sağlanabilirse hastalığın ilerleyişi durabilmekte hatta süreç tam tersine çevrilebilmektedir. Kavitasyon oluşumu meydana geldikten sonra bile henüz pulpanın etkilenmediği durumlarda, kavite plak tutulumu açısından temizlenebilir bir formda ise çürüğün ilerleyişi durabilmekte ve lezyon inaktif hale gelebilmektedir. Durmuş çürük lezyonlarında tipik olarak koronal harabiyet görülmesine karşın açığa çıkan dentin dokusu oldukça sert ve koyu renkli olmakta, pulpanın etkilendiğine dair bir kanıt görülmemekte ve hastada ağrı şikayeti olmamaktadır. Diş çürüğü, çürükten etkilenmiş dişin restore edilmesi ile tedavi edilebilen bir hastalık değildir. Diş çürüğü oluşumuna sebep olan olumsuz koşullar mevcudiyetini devam ettirdiği sürece hastalık devam edecek ve zaman içerisinde daha fazla restorasyona ihtiyaç duyulacaktır. Ağız içerisindeki enfeksiyonu ve çürük sürecini kontrol altına almak, karyojenik mikroorganizma sayısının azaltılıp remineralizasyon sürecinin gerçekleşeceği uygun bir ağız ortamı sağlayarak mümkün olabilmektedir (8).

Mine demineralizasyonu diş dokusuna sıkıca bağlı olan mikrobiyal dental plak içerisinde pH'ın 5,5 altına düşmesi ile başlamaktadır. Bu sebeple diş üzerinde mikrobiyal dental plağın öncelikli olarak oluştuğu bölgeler çürük gelişimine en yatkın olan bölgeler olarak kabul edilmektedirler. Diş minesinin en dış tabakası, daha derindeki tabakalara göre aside karşı daha dirençli olduğu için en fazla demineralizasyon mine yüzeyinden 15 μm derinde gerçekleşmektedir. Yeni başlayan yüzey altı mine lezyonlarında demineralizasyonun devam etmesi durumunda beyaz nokta lezyonları adı verilen klinik tablo oluşmaktadır. Demineralizasyon sürecinin durdurulamadığı veya tersine çevrilmediği durumlarda, yüzey altı lezyonu büyümeye devam etmekte ve dış yüzeydeki tabakanın demineralizasyondan dolayı incelip çökmesiyle kavitasyon oluşumu görülmektedir (9).

Remineralizasyon, kaybedilen kalsiyum ve fosfat iyonlarının, mine veya dentin yüzeyinde yeniden kristalize olması ile gerçekleşen bir süreçtir. Buradaki kalsiyum ve fosfat'ın kaynağı temel olarak tükürüktür. İngiltere, Danimarka ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda son 30-40 yıl içerisinde çürümüş, restore edilmiş veya çürük sebebiyle kaybedilmiş diş sayısında önemli bir azalma olduğu görülürken, çürüksüz birey sayısında bir artış olduğu görülmektedir (10–12). Çürük prevelansındaki bu düşüş, birçok ülkede florürlü diş macunu kullanımının yaygınlaşmasına dayandırılmaktadır (13).

Florür, diş çürüklerinin kontrol altına alınmasında oldukça etkili bir elementtir. Çürük lezyonlarının oluşumunu engellemekte ve mevcut çürüklerin remineralizasyonunu sağlamaktadır (14). Bununla birlikte florür uygulamaları en çok çürük lezyonlarının yüzeysel tabakasında etkilidir. Yüzeysel tabakanın derindeki tabaklara göre çok daha hızlı remineralize olması, lezyon gövdesinin remineralize olmasını zorlaştırmaktadır (15). Florürlü diş macunu kullanan hastaların, ortodontik tedavi sırasında gelişen başlangıç çürük lezyonlarının incelendiği bir çalışmada; braketlerin sökülmesinin ardından lezyonların gerileme ve durma eğiliminde olduğu görülürken, lezyonlarda tam anlamıyla bir iyileşme gerçekleşmediği tespit edilmiştir (16). Günümüzde remineralizasyonu sağlamadaki etkinliği düşünüldüğünde florür hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Bunula birlikte florür kullanımına bağlı gelişebilecek yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda, remineralizasyon tedavilerinde kullanılacak florür dozunu azaltmak amacıyla florürle kombine olarak kullanılabilecek veya flora alternatif olarak sunulabilecek, remineralizasyon derinliği daha fazla ve toksisitesi daha az olan farklı ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda yeni materyal arayışları devam etmektedir (17).

Hench ve arkadaşları tarafından 1970'lerin başında, geliştirilen bir biyoaktif cam olan 45S5'in içeriğinde; %45 oranında SiO_2, %24,5 oranında CaO, %24,5 oranında Na_2O, %6 oranında P_2O_5 bulunmaktadı (18). 45S5, ideal osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler gösteren, biyolojik olarak çözünürlüğü kontrol edilebilen biyoaktif bir materyaldir. Suyun içerisinde hidroksiapatit karbonat oluşturabildiği için kemik rejenerasyonu ve doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (19). PerioGlas (NovaBone Osteobiologics, Jacksonville, FL, USA) ve NovaMin (NovaMin Technology, Alachua, FL, USA) diş hekimliğinde kullanılan 45S5 içerikli materyallerdendir. Yapılan çalışmalarda bu materyalin dentin tübüllerini tıkayabileceği ve dentin remineralizasyonu sağlayabileceği öne sürülmüştür (20,21).

Yaygın olarak kullanılan diğer bir biyoaktif cam çeşidi olan S53P4'ün kompozisyonunda ise; %53 oranında SiO_2, %23 oranında Na_2O, %20 oranında CaO ve %4 oranında P_2O_5 olduğu bildirilmiştir. Bulunduğu bölgede fosfor tuzlarının, kalsiyum ve sodyum iyonu salınımı yaptığı için bölgesel olarak pH'ın ve osmotik basıncın artmasına sebep olup bakteriyel adezyon ve proliferasyonu engellediği görülmüştür (22). Meydana gelen bu iyon birikiminin üzerine amorf kalsiyum fosfatın çökelmesiyle silikat

bir jel tabaka oluştuğu, jel tabakanın kristalleşmesiyle de doğal hidroksiapatit oluştuğu bildirilmiştir (23). S53P4'ün çürük profilaksisinde ve dentin hipersensitivitesinin tedavisinde kullanılabilecek bir materyal olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (20,24).

İçeriğinde %24-29 oranında gümüş %5-6 oranında florür bulunduran GDF, çürüğün ilerlemesini durdurmak ve dentin hipersensitivitesini tedavi etmek için kullanılan alkali yapıda renksiz bir solüsyondur (25). İçerisindeki gümüş iyonları sayesinde bazı karyojenik bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği ve florür iyonları sayesinde ise remineralizasyonu arttırdığı görülmektedir (9,26). Uygulaması basit, non-invaziv ve ucuzdur. En önemli dezavantajı GDF uygulandığı dişlerde renklemelere sebep olmasıdır (27).

Dişler ve oral dokularla temas halinde olan materyallerin biyouyumluluğunun analiz edilmesi gerekmektedir (28,29). İdeal bir remineralizasyon ajanı pulpal dokuya zarar vermemelidir. Pulpa hücrelerinin remineralizasyon tedavisi için kullanılan bir ajana olan tepkisinin ve remineralizasyon ajanınında pulpal hücreler üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada GDF, 45S5 ve S53P4'ün fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkileri araştırılarak ideal özelliklere sahip remineralizasyon ajanlarının geliştirilebilmesi için literatüre katkı sağlamak amaçlanmaktadır. Literatürde S53P4'ün pulpal hücrelere olan etkisi ile ilgili verilerin yetersiz olduğu ve yeni verilere ihtiyaç olduğu görülmüştür. Ayrıca GDF, 45S5 ve S53P4'ün fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve odontojenik etkilerinin kıyaslandığı bir çalışma bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİŞ SERT DOKULARI

Dişler mine, dentin ve sement olmak üzere 3 farklı mineralize dokudan ve bu sert dokular tarafından çevrelenmiş pulpa adı verilen bağ dokusundan meydana gelen organlardır. Mine dokusu embriyolojik olarak ektoderm dokusundan köken almaktadır. Dentin, sement ve pulpa dokuları ise ektomezenkimal orijinli dokulardır. Mine ve dentinin birleştiği bölgeye mine-dentin sınırı, sement ve minenin birleştiği bölgeye mine sement sınırı, sement ve dentinin birleştiği bölgeye ise dentin-sement sınırı adı verilmektedir. Diş yapısının büyük bir kısmını dentin dokusu oluşturmaktadır. Dentin dokusunun etrafı kökte sement ile, kron bölgesinde ise mine dokusu ile çevirilmiştir (30).

Pulpa dokusu, dental papilladan gelişmektedir. Hayat boyunca devam edecek olan dentin üretiminden sorumludur. Ayrıca pulpa dokusu, fiziksel uyaranları ve toksinleri algılayan bir duyu organı görevi yapmaktadır. Dışarıdan gelen uyaranlara karşı pulpa dokusunda immünolojik enflamatuar bir yanıt verilmekte ve buna karşılık olarak sekonder dentin üretimi gerçekleşmektedir. Diş çürüklerinden kaynaklanan enfeksiyonun uzun süreli devam ettiği durumlarda diş pulpası canlılığını yitirmekte ve doku nekrotik hale gelmektedir (30).

2.2. PULPA

Dental pulpa; mine, dentin ve sement dokusu ile çevrelenmiş, dişin tam merkezinde yer alan bir dokudur. Etrafını çevreleyen dokular pulpa dokusuna hem mekanik olarak bir destek sağlamakta hem de oral mikrobiyal ortamdan pulpayı korumaktadır. Pulpanın etrafındaki bu fiziksel bariyer bütünlüğünü kaybederse pulpa oral kaviteden gelebilecek olası iritasyonlara açık hale gelmektedir. Diş çürükleri, dental travma sonucu oluşabilecek kırıklar, çatlaklar veya diş üzerindeki restorasyonların bütünlüğünün bozulması sonucu mikroorganizmalar ve toksinleri pulpaya erişebilmekte ve pulpal irritasyonlar gelişebilmektedir. İrritasyonlar sonucu pulpal enflamasyon ve ağrı gelişebilmekte, ilerleyen süreçte irritasyon ortadan kaldırılmadığında pulpa dokusu nekrotik hale gelebilmektedir (31).

Pulpa dokusu nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Nöral krest hücrelerinin çoğalıp yoğunlaşması ile dental papilla oluşmaktadır. Dental papilladan ise pulpa dokusu gelişmektedir (32). Pulpa dokusu, fiziksel olarak küçük bir alanda sınırlı olmasına rağmen zengin bir duyusal innervasyona ve mikrosirküler sisteme sahip olması bakımından eşsiz bir dokudur. Pulpanın periferal bölgesinde dentin depozisyonunun gerçekleşmesini sağlayan odontoblast hücreleri yer almaktadır. Odontoblastların haricinde pulpanın periferal bölgesinde dışarıdan gelen uyaranları algılayan ve bu uyaranlara cevap oluşturulmasını sağlayan özelleşmiş dentritik hücreler ve trigeminal terminal sinir uçları bulunmaktadır. Odontoblast hücreleri de pulpa dokusundaki yabancı antijenleri tespit edebilmektedir (33).

2.2.1. Pulpanın Fonksiyonları

Pulpa dokusu; diş gelişimi, dişin fonksiyondayken desteklenmesi gibi süreçlerde aktif olarak görev almaktadır. Dentinin üretiminde ve gelişiminin tamamlamasında pulpanın da etkisi vardır (34). Dentin üretimine başlanması, mine dokusunun üretimi için öncülük eden bir reaksiyondur. Mine epiteli odontoblastların farklılaşmasını indüklemekte, pulpa hücrelerinden olan odontoblastlar ve dentin dokusu da mine üretimini indüklemektedir. Bu şekilde birbirine bağlı olarak gerçekleşen bu epitelyal ve mezenkimal etkileşimlerle diş gelişim süreci ilerlemektedir. Odontoblastlar tarafından dentin üretimi sadece diş gelişim aşamasında değil dental travma, diş çürükleri, restoratif prosedürler sebebiyle dentin bütünlüğünün bozulduğu bölgelerde de cevap olarak üretilmeye devam etmektedir. Odontoblast hücrelerini barındırmasının dışında, pulpa dokusu içerisindeki zengin vasküler sistemi sayesinde dentinin oluşması ve dişin bütünlüğünü koruması için gerekli olan besinleri sağlamaktadır. Ayrıca pulpa dokusu, bakteri toksinleri gibi yabancı cisimleri tanıyıp bunlara karşı immün cevap oluşturma yeteneğine sahiptir. Pulpa içerisinde yalnızca vasküler bir pleksus bulunmaz, aynı zamanda yoğun sinir ağları da bu dokuda yer almaktadır. Bu sinir ağları sayesinde mine, dentin ve pulpa dokusundaki fizyolojik uyaranlar ağrı olarak hissedilmektedir. Pulpada miyelinli bir sinir lifi uyarıldığında ağrı daha hızlı ve keskin hissedilirken miyelinsiz bir lif uyarıldığında daha yavaş ve difüz bir ağrı hissedilmektedir (35).

2.2.2. Pulpanın Hücreleri

2.2.2.1. Odontoblastlar: Pulpanın karakteristik hücreleri odontoblastlardır. Pulpanın etrafında tek tabakalı bir yapı oluştururlar, dentin mineralizasyonunu kontrol etmektedirler (36). Odontoblastların morfolojisi aktivitesini yansıtmaktadır. Hücre hacmi büyüdükçe matriks sentezleme kapasitesi kapasitesi arttığı bilinmektedir. Koronal pulpadaki odontoblast hücrelerinin sayısının oldukça fazla (45000-60000 mm^2) ve daha kolumnar şekilli olduğu söylenirken kökün servikal kısmındaki pulpa dokusunda yer alan odontoblastların hem sayıca daha az hem de daha yassı şekilli olduğu bildirilmiştir (37). Odontoblastların aktivitesi yaşam boyu değişkenlik göstermektedir. Bazı odontoblast hücrelerinin, pulpanın hacmi küçüldükçe otofajik-lizozomal sistemler sayesinde programlanmış bir şekilde canlılıklarını kaybettiği, başka bir değişle apoptoza uğradığı bildirilmiştir (38). Diş çürüğünün ilerlemesi durumunda odontoblastlar canlılığını kaybettiği bildirilmiştir ancak koşullar değişirse kök hücrelerin farklılaşarak odontoblastlara dönüşebildiği görülmüştür. Odontoblastlar hücre gövdesi ve uzantılar olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Odontoblastların hücre gövdeleri henüz mineralize olmamış dentin matriksin altında yer alırken odontoblastik uzantılar dentin tübüllerine kadar uzanabilmektedir. Daha kısa hücre uzantıları ise tübüllere kadar odontoblast ve fibroblastların birbirine bağlanmasını sağlamaktadır (35). Odontoblastların içerisinde ve hücre membranlarının üzerinde çeşitli reseptörler bulunmaktadır. Örneğin odontoblastlarda bulunan Toll Benzeri Reseptör-2 (TLR-2) ve TLR-4 gram pozitif bakterilerin bileşenleri tarafından aktive edildiği ve bu aktivasyon sonrası odontoblastlardan proinflamatuar sitokinleri salgıladığı bildirilmiştir. Bu sayede odontoblastlar, bakteriyel ürünler dentine ulaştığında antijenleri tanıyabilmektedir (39). Bu reseptörlerin dışında odontoblastlarda ısıya ve dentin tübüllerinin içerisindeki sıvıya karşı duyarlı reseptörler bulunmaktadır (40,41).

2.2.2.2. Kök hücreler: Hücresel boyama yapılmış kesitler incelendiğinde odontoblastik tabakanın altındaki bağ dokusu hücrelerinin birbirine benzer morfolojik yapıda olduğu görülmüştür. Pulpa dokusunda; odontoblastlar, savunma hücreleri ve fibroblastlar gibi birçok farklılaşmış hücre türü bulunmaktadır. Bu hücreler belirli uyaranlar karşında yanıt oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerdir ancak kendilerinin haricinde farklı hücre türlerine farklılaşamamaktadırlar. Pulpa dokusunda dental travma veya çürük gibi çeşitli sebeplerle meydana gelen bir hasar sonucu odontoblastların

canlılığını yitirebilmektedir. Dental pulpada şiddetli bir uyaran karşısında odontoblastlara dönüşüp tersiyer dentin oluşumunun gerçekleştirilmesine yardımcı hücrelerin varlığı uzun süredir bilinmektedir. Böyle bir durum söz konusu olduğunda henüz farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin, yeni odontoblastlar oluşturmak için farklılaştığı bilinmektedir (42). Geçmişte bu hücreler pluripotent hücreler veya ektomezenkimal hücreler olarak adlandırılsa da günümüzde bu hücreler kök hücre olarak isimlendirilmektedir (33). Pulpada meydana gelen hücre ölümü ve yaralanmaya karşı cevap olarak çeşitli sinyal molekülleri salgılanmaktadır. Bu sinyal molekülleri sayesinde preodontoblast adı verilen öncü hücrelerin yaralanmanın olduğu bölgeye göç ettiği ve odontoblastlara farklılaştığı bildirilmiştir (43). Bu prosesin gerçekleşmesini sağlayan başlıca sinyal moleküllerinin Kemik Morfogenik Proteini (BMP) ailesi ve Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta **(**TGF- β**)** olduğu bildirilmiştir (35).

Dental pulpa kök hücreleri diş üzerinde odontoblastik tabakanın hemen altında ve kan damarlarının etrafında bulunmaktadır. Multipotent hücreler oldukları için adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşabilmektedirler. Ayrıca nöral ve vasküler endotelyal hücrelere de farklılaşabildikleri bildirilmiştir (44).

2.2.2.3. Fibroblastlar: Pulpada en yaygın görülen hücreler fibroblastlardır. Şekilleri değişkenlik göstermekle birlikte genellikle yıldız şekillidirler. Fibroblast hücreleri sayıca en çok koronal pulpada bulunmaktadır. Fibroblastların da aynı odontoblastlar gibi sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır. Bu uzantılar sayesinde fibroblastlar hem diğer fibroblastlarla hem de odontoblastlarla bağlantı kurmaktadılar. Uzantıların ve hücre içerisindeki organellerin belirginliği, hücresel aktivite miktarına göre değişkenlik göstermektedir. Pulpal bağ dokusunun ana bileşenlerini ve kolajen üreterek pulpanın yapısal olarak bütünlüğünü sağlarlar. Odontoblastlarda olduğu gibi pulpadaki fibroblast hücreleri de belirli durumlarda apoptotik olarak hücre ölümüne uğrayabilmekte ve gerektiğinde ölü hücrelerin yerine diferansiye olmamış hücreler tarafından yeni fibroblast hücreleri üretilebilmektedir (35).

2.2.2.4. İmmunolojik hücreler: Pulpa içerisindeki en belirgin immün sistem hücresi dendritik hücrelerdir (45). Antijen sunan bu hücreler en fazla odontoblastik tabakada ve kan damarlarının etrafında bulunmaktadır. Bu bölgelerde yabancı antijenleri tanıyıp, onlara karşı immün yanıt oluşturmaktadırlar. Pulpa dokusunda makrofajlar, nötrofiller, T lenfositleri gibi pek çok antijen sunan hücre bulunmaktadır ancak konum ve sayı bakımından en belirgin olan immün sistem hücresi dendritiki hücrelerdir (46). Yaklaşık olarak 50 μm uzunluğunda ve en az 3 dendritik uzantıya sahip oldukları ve bazı dentritik hücrelerde bu uzantılarının dentin tübüllerine kadar uzandığı bildirilmiştir. Bir antijen, dendritik hücre tarafından yakalandığında bu hücreler yakalanan antijenle birlikte lenf nodlarına göç etmekte ve burada T lenfositlerinin bölünüp farklılaşmasını tetiklenmektedir (47).

2.3. DİŞ ÇÜRÜĞÜ

Beslenme ile alınan karbonhidratların bakteriler tarafından fermente edilmesi sonucu açığa çıkan asidik ürünlerin diş sert dokularında lokalize olarak sebep olduğu yıkım diş çürüğü olarak adlandırılmaktadır (48). Bu tanımdan da anlaşılacağı üzere diş çürüğünün başlayabilmesi için öncelikle bakterilerin diş üzerinde kolonize olması gerekmektedir. Bakteriler diş yüzeyinde kendilerine konak savunmasına karşı koruyucu bir kalkan oluşturmak için çeşitli organik substratlar salgılamaktadırlar. Salgıladıkları bu substratlarla diş yüzeyinde birikerek sadece fiziksel olarak temizlenebilecek mikrobiyal dental plak tabakasını oluşturmaktadırlar. Mikrobiyal dental plak tabakası içerisindeki bakteriler beslenme yoluyla alınan karbonhidratları fermente ederek asidik yan ürünler üretmektedirler. Oluşan bu organik asitler pH'ı düşürerek biyofilm tabakası altında asidik bir ortam oluşturmakta ve bu durum diş yapısından mineral kaybedilmesi ile sonuçlanmaktadır (49). Diş çürüklerinin oluşmasında en sık katkıda bulunan bakterilerin *S. mutans* ve *Lactobasil* türleri olduğu bildirilmiştir (49–51). Bakteriler tarafından üretilen organik asitler mine yapısına difüze olmakta, hidrojen iyonları açığa çıkmakta ve ortamın pH'ı düşmektedir. Hidrojen iyonlarının mine dokusu içerisindeki hidroksil ve fosfat gruplarına olan afinitesi sayesinde bu iyonlar minenin kristal yapısından ayrışmakta bu şekilde demineralizasyon süreci başlamaktadır. Minenin pH'ı, hidrojen iyonu yoğunluğu sebebi ile kritik pH olarak nitelendirilen değerin altına düştüğünde minenin mineralize yapısından çözülmeler meydana gelmektedir. Kritik pH değeri bireyler arasında farklılık göstermektedir. Tükrükteki kalsiyum ve fosfat iyonu konsantrasyonları

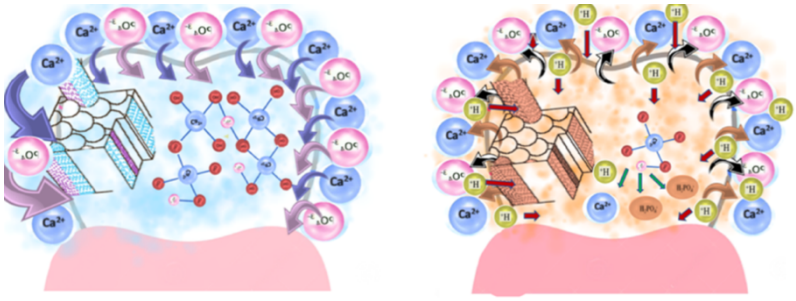
arttıkça kritik pH değeri yükselmektedir. Tükrükteki kalsiyum ve fosfat düzeylerinin normal kabul edildiği bireylerde kritik pH değerinin yaklaşık olarak 5,5 olduğu var sayılmaktadır (52). Tükürükteki proteinlerin mine yüzeyine yapışması ile pelikıl tabakası oluşmaktadır. Pelikıl tabakası; protein, karbonhidrat ve lipitlerden meydana gelmektedir. Pelikıl tabakasının, mine demineralizasyonunu bir noktaya kadar önleyebildiği söylenmektedir (53,54). Bakteriyel organizmaların pelikıl tabakası üzerine kolonize olması ile mikrobiyal dental plak oluşumu başlamaktadır. Pelikıl tabakası, kolonize olmuş bakterilere bir substrat görevi görmektedir ancak seçici geçirgen bir tabaka olduğu için biyofilm tabakası içerisinde zararsız bakterileri destekleyip, karyojenik bakteri miktarının azalmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu tabaka hidroksiapatit tabakasından kalsiyum ve fosfat bileşenlerinin çözünmesini engelleyip demineralizasyonun önüne geçebilmekte ve fonksiyonel olarak dişin karşılaması gereken mekanik kuvvetler karşısında oluşabilecek sert doku kayıplarını en aza indirgemektedir (54). Tüm bunların dışında kalsiyum, fosfat ve florid iyonlarının mine yüzeyinde çökelmesini inhibe ederek yüzey altı remineralizasyonunu desteklediği söylenmektedir (53).

2.4. DEMİNERALİZASYON VE REMİNERALİZASYON

Remineralizasyon, diş çürüklerinin ilerlemesini engellemek için vücut tarafından geliştirilmiş bir doğal onarım sürecidir (55). Diş çürüğü ilk etapta beyaz nokta lezyonu olarak başlamaktadır. Bu aşamada lezyonun yüzeyi sağlamlığını korurken yüzey altı tabakalarda demineralizasyon başlamaktadır. Gerçekleşen mineral kaybı, ışığın kırılma indisini değiştirmekte ve lezyon, etkilenmemiş mine dokusuna göre daha beyaz görünmektedir (56). Beyaz nokta lezyonlarında minedeki matriks, yapısını ve mevcudiyetini korumaktadır. Bu sebeple iyon depozisyonu için uygun ortam sağlanabilmekte ve bozulmuş kristal yapı onarılabilmektedir. Bununla birlikte kaviteleşmiş bir lezyonda kaybedilmiş sert dokunun onarımı mümkün değildir. Böyle bir durumda diş restore edilmelidir (49,52,55). Remineralizasyon sürecinin gerçekleşebilmesi için tükrüğün kalsiyum ve fosfat iyonlarını sağlayabilmesi gerekmektedir (55,56).

Oral kavitede her gün demineralizasyon ve remineralizasyon reaksiyonları gerçekleşmektedir. İki reaksiyon arasındaki dengenin bir tarafa doğru kayması lezyonun ilerleyiş sürecini belirlemektedir (49). Remineralizasyon ve demineralizasyon reaksiyonları arasında dengenin hangi yöne kayacağı; kritik pH, Çözünürlük Ürün Sabiti

(Ksp), tükürük ve plaktaki iyon miktarı gibi faktörlerce belirlenmektedir (52). Ksp, doygun bir çözeltideki bir mineralin, çözelti içerisindeki iyonlarının konsantrasyonlarının çarpımıdır. Doygun bir çözeltide bu iyonların konsantrasyonları sabit kaldığı için Ksp değeri de sabit kalmaktadır. Toparlayacak olursak her mineral için bir Ksp değeri mevcuttur ve bu değer mineralin çözünme eğilimi konusunda bir fikir edinilmesini sağlar. Doygun bir çözelti içerisinde hidroksiapatit için Ksp 10^{-55} mol/L olarak hesaplanmıştır. Çözelti içerisinde Ksp değerinin her zaman sabit olduğu bildirilmiştir. Ksp değerini sabit tutmak için hidroksiapatiti oluşturan üç komponentin konsantrasyonlarının gerektiğinde değişebildiği görülmüştür (52,54,57). İyon Ürünü (Ip), Ksp ile benzerlik gösteren ancak tanımı farklı bir kavramdır. Ksp çözeltinin doygunluğu hakkında bize bilgi verirken, Ip çözeltideki mevcut iyon konsantrasyonlarını temel alarak hesaplanmaktadır. Ksp tükrük veya plak sıvısının kalsiyum, fosfat ve hidroksil iyonlarına ne kadar doygun olduğu hakkında bir bilgi verirken, Ip tükürük ve plak sıvısında bu iyonların konsantrasyonlarının ne kadar olduğu konusu hakkında bilgi vermektedir. Tükürük veya plak sıvısında Ip değeri Ksp değerine eşitse ortamın hidroksiapatit açısından doygun olduğu, Ip Ksp'den büyükse çözeltinin aşırı doygun olduğu, Ip değerinin Ksp'den küçük olduğu durumlarda ise çözeltinin doymamış olduğu fikri edinilebilir. Doğal ağız ortamında Ip değerinin Ksp değerinden büyük olduğu ve bu sebeple mine dokusunda çözülme olmadığı bildirilmiştir. Ancak eğer pH değeri kritik pH'ın altına düşerse, asidik ortamdaki hidronyum iyonlarının H^+, su molekülü oluşturmak için hidroksil iyonlarına OH^- bağlandığı belirtilmiştir. Hidroksil iyon konsantrasyonu azaldığında, doygunluğu korumak için kalsiyum iyon ve fosfat iyon konsantrasyonlarında bir artış meydana geldiği ve bu şekilde yüzeysel mine tabakasında bir çözülme gerçekleştiği görülmüştür. Bu durum ortamın pH'ı, kritik pH'ın altına düştüğünde demineralizasyonun nasıl gerçekleştiğini açıklamaktadır (52).



Şekil 2.1: Remineralizalizasyon ve demineralizasyon döngüsü (58)

2.5. ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN REMİNERALİZASYON AJANLARI

Remineralizasyon, hidroksiapatit kristallerinden kaybedilmiş minerallerin tekrar kazanılmasını sağlayan doğal bir onarım mekanizmasıdır. Günümüzde, remineralizasyon tedavilerinde çeşitli ajanlar ve teknolojiler kullanılmaktadır. Bu alanda yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda her geçen gün yeni yaklaşımlar geliştirilmekte ve bu tedavi yöntemleri ilerlemektedir (59). İdeal bir remineralizasyon ajanının, demineralize olmuş bölgeye kontrollü bir şekilde kalsiyum ve fosfat iyonları sağlayabilmesi, aşırı miktarda kalsiyum salınımına neden olmaması, diş taşı oluşumunu tetiklememesi, aktif çürük lezyonlarındaki demineralizasyonu durdurabilmek için asidik pH koşullarında etkili olabilmesi, kserostomili hastalarda fayda sağlayabilmesi ve tükürüğün remineralize edici özelliklerini artırabilmesi gerektiği bildirilmiştir (60).

2.5.1. Florür İçeren Remineralizasyon Ajanları

Florür, diş çürüklerinin oluşumunu engellemek ve var olan çürük lezyonlarını remineralize etmek için kullanılmakta olan ürünlerin içerisinde yer alan, en önemli minerallerden birisidir. Ağız gargaraları, topikal jeller, vernikler ve içme suları gibi pek çok farklı şekilde florür alımı gerçekleştirilmektedir (56). Topikal olarak diş macunları, jeller, vernikler ve gargaraların içerisinde kullanılan florür türleri; sodyum florid, sodyum monoflorofosfat, stannöz florid ve asidüle fosfat florid olarak sıralanabilmektedir (61). Topikal florür uygulamalarıyla çürük lezyonlarının oluşumunun engellendiği, var olan lezyonların ilerlemesinin durdurulduğu ve bazı durumlarda lezyonun remineralize edilebildiği bilinmektedir. Florür bakteriyel metabolizmayı inhibe etmekte, demineralizasyonu engellemekte ve remineralizasyonu sağlamaktadır. Ortamın pH'ı düştüğünde F^- iyonlarının ortamdaki H^+ iyonlarını bağlayıp hidrojen florür molekülü oluşturmaktadır. F^- iyonları bakteriyel hücre membranını geçememekte bununla birlikte HF molekülü bakteriyel hücre membranından difüze olabilmektedir. HF molekülü bakteri hücresi içerisine girdiğinde yapısındaki F^- iyonlarını serbest bırakır. Serbest kalan F^- iyonları bakterilerin karbonhidratları metabolize etmesini sağlayan enolaz enzimini inhibe etmektedir. Bu şekilde F^- bakterilerin karbonhidrat mekanizmasını inhibe etmektedir. Florür, demineralize olmuş hidroksiapatit yapısında kaybedilmiş olan karbonat veya hidroksil iyonlarının yerine geçerek florapatit yapısı oluşturmaktadır. Florapatit, dişin yapısında doğal olarak bulunan hidroksiapatite göre asit ataklarına karşı

daha dayanıklıdır. Tükürük veya plak sıvısında bulunan F^- iyonları, demineralize olmuş diş yüzeyinde toplanmakta, adsorbe olmaktadırlar. Diş yüzeyindeki bu adsorbisyon alanları, remineralizasyonun gerçekleşebilmesi için bir nükleasyon alanı işlevi görmektedir. Nükleasyon alanındaki F^- iyonları kalsiyum iyonlarını çekmekte, kalsiyum iyonları ise fosfat iyonlarını çekerek yeniden kristal oluşumu yani remineralizasyonu sağlamaktadır (51,56,62). Florür iyonları mine dokusu ile temas ettiğinde florapatit kristallerinin yanında kalsiyum florür oluşumu da gerçekleşmektedir. Oluşan bu kalsiyum florür bileşeni bir flor rezervuarı görevi görmektedir (63).

2.5.1.1. Gümüş Diamin Florür: Gümüş elementi çok uzun yıllardır tıp alanında kullanılmaktadır. Medikal olarak gümüşün bilinen en eski kullanım amacının suyun dezenfekte edilip saklanması olduğu bildirilmiştir (64). Diş hekimliğinde ise ilk kez 1840'lı yıllarda gümüş nitrat'ın çürük durdurucu ajan olarak kullanıldığı bildirilmiştir (65). 1917 yılında Howe amonyaklı gümüş nitrat çözeltisi hazırlayarak bu solüsyonu direk olarak çürük lezyonlarının üzerine uyguladığını bildirmiştir (66). 1950'lere kadar bu solüsyon, antibakteriyel etki gösterdiği düşünülerek etkilenmiş dentin üzerine uygulanmıştır. 1950'lerde bu solüsyonun etkinliği ile ilgili soru işaretlerinin oluşmasıyla birlikte bu yaklaşım sonlandırılmıştır (67). 20. yüzyılın sonlarına gelindiğinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gümüş florür içerikli bileşiklerin çürük lezyonlarını durdurmakta etkili olduğu görülmüştür. Bu araştırmalar sonucunda Meksika, Avusturalya ve Japonya'da gümüş diamin bileşikleri klinik olarak kullanılmaya tekrar başlanmış, bileşiğin içerisine amonyum da dahil edilmiş ve GDF ortaya çıkmıştır (68–74).

İçerisinde hem gümüş, hem de florür iyonları bulunan GDF'nin, karyojenik biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada GDF ile tedavi edilen dentin yüzeyinde, çürük gelişimi için en önemli organizmalardan biri olan *S. mutans* miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (75). Literatürde GDF'nin pek çok farklı karyojenik mikroorganizma üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (76,77). Yüksek konsantrasyonda florüre maruz kaldığında daha önceki bölümlerde bahsedildiği üzere karyojenik bakterilerin karbonhidratları metabolize etmesini sağlayan enzim inhibe olmakta ve bu şekilde biyofilm tabaksının oluşumunun önüne geçilebilmektedir. GDF içerisindeki yüksek konsantrasyondaki florürün de aynı etkiyi yarattığı bildirilmiştir (77). GDF'nin içerisindeki bir diğer bileşen olan gümüş iyonlarının ise antibakteriyel etkinliğini; bakterilerin hücre duvarlarına penetre olarak

hücre duvarlarını parçalayarak, bakterinin metabolik aktivitesi için gerekli olan enzimleri inhibe ederek ve bakterilerin Deoksiribonükleik Asit (DNA) replikasyonunu engelleyerek gerçekleştirdiği söylenmektedir (78).

Dentin çürüğü üzerinde remineralize edici bir etkiye sahip olduğu bilenen GDF, bu özelliği ile ön plana çıkmaktadır (79). GDF ve hidroksiapatit reaksiyona girdiğinde gümüş fosfat ve kalsiyum florür açığa çıkmaktadır. Bu bileşikler hem pH'ı yükseltmekte hem de florür rezervuarı olmatadırlar (80). Daha sonra oluşan bu bileşiklerde kalsiyum ve florür'ün çözünmesi ile florapatit oluşumu gerçekleşmektedir. GDF ve hidroksiapatit arasındaki reaksiyon sayesinde, hidroksiapatit kristallerine nanoskopik metalik gümüş parçacıklarının bağlandığı bildirilmiştir (79). Gümüş minerallerinin hidroksiapatit kristallerine bağlanması, gümüşün antibakteriyel ve antikaryojenik özellikleri sebebiyle inaktive edilmiş bir çürük lezyonu üzerinde yeni çürük oluşumunu engelleyecektir. Ayrıca yapılan çalışmalarda GDF'nin sistein katepsin ve Matriks Metalloproteinaz (MMP) inhibitörü olduğu görülmüştür (81,82). MMP'ler ve katepsinler, dentindeki kollajenleri degrade eden ve çürüğün ilerlemesine katkıda bulunan proteolitik enzimlerdir. Bunun yanısıra MMP ve katepsinler dentin ve adeziv arasındaki kollajen matriksin hidrolitik degradasyonundan sorumludur. Bir istein katepsin ve MMP inhibitörü olduğu için GDF'nin adeziv restorasyonların ömrünü uzatmak için kullanılabilecek bir materyal olduğu söylenmektedir (83).

Diş çürüklerini önleyici özelliğinin yanında GDF dentin hipersensitivitesinin tedavisi için de araştırılmıştır. 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) dentin hipersensitivitesinin tedavisi için GDF'nin kullanımını onaylamıştır (84). GDF solüsyonu açığa çıkmış dentin dokusu üzerinde skuamöz bir tabaka oluşturmakta ve buradaki dentin tübüllerini parsiyel olarak tıkamaktadır. Bu sayede dentin tübülleri içerisinde sıvı hareketi ve dolayısıyla dentin hassasiyetini de azalmaktadır (27,85).

Tüm iyi özelliklerinin yanında GDF'nin bir takım bölgesel yan etkileri bulunmaktadır. GDF'nin en sık görülenyan etkisi renklenme olarak bildirilmiştir (84,86–88). GDF uygulandıktan sonra çürük lezyonları içerisindeki gümüş fosfattan dolayı, uygulama sonrası koyu kahverengiye dönmektedir. Renklenmenin önüne geçebilmek için uygulandıktan sonra bölgeye bir tuz uygulaması yapılması önerilmiştir. Tuz molekülleri serbest gümüş iyonları ile reaksiyona girmesi ve renklenmeye sebep olan Ag_3PO_4

molekülünün oluşumunun engellenmesi hedeflenmiştir. Günümüzde bu amaçla potasyum iyodür tuzu kullanılmaktadır (89). KI kullanımıyla renklenmenin bir miktar azaldığı ancak tamamen engellenemediği görülmektedir (90).

Gümüş iyonları dentinopulpal komplekse penetre olabileceği için GDF'nin pulpaya çok yakın olan lezyonlarda kullanımı önerilmemektedir (91). Bununla birlikte yapılan *in vivo* ve *ex vivo* çalışmalarda derin çürük lezyonlarında GDF'nin indirekt kuafaj materyali olarak araştırıldığı çalışmalarda; pulpa üzerinde minimal olumsuz etkilere sebep olduğu, tersiyer dentin oluşumunu indüklendiği, geniş bir odontoblastik tabaka oluşumunun görüldüğü, tübüller içine penetrasyonun uygulandığı bölge ile sınırlı kaldığı görülmüştür (92–96). Yapılan çalışmalarda GDF'nin indirekt pulpa kuafajı için kullanımı konusunda ümit verici sonuçlar görülsede direkt pulpa kuafajlarında GDF kullanımı hakkında yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (90).

2.5.2. Florür İçermeyen Remineralizasyon Ajanları

Florür uygulamaları, kavitasyon oluşumu gerçekleşmemiş çürük lezyonlarının tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte florürün etkili bir şekilde remineralizasyonu teşvik edebilmesi için tükürük veya plak içerisinde yeteri kadar kalsiyum ve fosfat iyonu bulunmalıdır (97). Yapılan *in vitro* çalışmalarda ortamda yeteri kadar kalsiyum, fosfat ve flor iyonu bulunduğunda minedeki lezyonlarda remineralizasyonunun sağlandığı ve hatta daha minenin altındaki dentin dokusuna kadar remineralizasyonun gerçekleştiği, yani remineralizasyon derinliğinin arttığı görülmüştür (98,99). Özellikle yüksek dozda topikal florür uygulamalarında özellikle sadece lezyonun yüzeysel tabakasında remineralizasyonun gerçekleştiği görülmüştür (100–103). Sadece yüzeysel tabakanın remineralize olması lezyonun istenilen estetik ve yapısal özelliklerini yeterince iyileştirememektedir. İdeal bir remineralizasyon ajanı, yeterli derinlikte remineralizasyon sağlamak için yüksek biyoyararlanıma sahip stabilize edilmiş kalsiyum, fosfat ve florür iyonlarını sunabilmelidir. Günümüzde çürük oluşumunu engellemede florür kullanımı hala altın standart olarak kabul edilmesine rağmen epidemiyolojik çalışmalarda florürlü diş macunu kullanımı yaygın olan popülasyonlar dahi diş çürüğü oranın artış göstermesi florürün etkinliği hakkında soru işaretleri oluşturmaktadır (104). Topikal florür uygulamarının remineralizasyon potansiyelini arttırmak için daha yüksek dozda florürlü ağız bakım ürünleri geliştirilmiştir ancak özellikle çocuklarda yüksek dozda florür maruziyetine bağlı gelişebilen kaygılar mevcuttur (105,106). Florür

kullanılırken önerilen maksimum dozun aşılmaması gerekmektedir. Bu doz aşıldığında toksisite ve yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Diş gelişimi sırasında kronik olarak, aşırı miktarda flor alımı sonucunda dental florozis adı verilen klinik tablo gelişebilmektedir (107). Bütün bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda remineralizasyon derinliği flordan daha fazla, yan etkileri ve toksisitesi ise flordan daha az olan, florürle kombine olarak veya florüre alternatif olarak kullanılabilecek materyal arayışlarına devam edilmektedir.

Florür içermeyen remineralizasyon ajanları kendi içinde aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilmektedir (108):

1. Biyomimetik sistemler
2. Florürün etkinliğini güçlendiren sistemler

A) Kalsiyum ve fosfat sistemleri

B) Polifosfat sistemleri

C) Doğal ürünler

2.5.2.1. Biyoaktif camlar: Son yüzyılda, dental materyallerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalara yoğunlaşılmıştır. Kolajen, fibrin, kitosan, hyaluronik asit ve agar gibi doğal materyallerin yanında polilaktik asit, poliglikolik asit ve polilaktoglikolik asit gibi sentetik biyomateryaller ve hidroksiapatit, beta-trikalsiyum fosfat ve silikat içerikli camlar gibi inorganik sentetik materyaller doku mühendisliği alanında kullanılan materyaller arasındadır (109). Biyoaktif camlar, rejeneratif tıp alanında alanında kullanılan önemli biyomateryallerdendir (110). Biyoaktif camlar ilk olarak 1969 yılında Larry L. Hench tarafından bulunmuştur (111). L. Hench'in tanımına göre, bir materyal dokulara uygulandıktan sonra doku ile materyal arasında bağ oluşumuna yol açan bir yanıt veriyorsa, o materyal biyoaktiftir (18). Biyoaktif camlar silikat bazlıdır ve yapıları üç boyutlu silika ağlardan oluşmaktadır. Bu üç boyutlu silika yapının, dokulara uygulandıktan sonra özellikle de kemikle ve kemiğe benzer dokularda, doku ile arasında güçlü kimyasal bağlar oluşturduğu bildirilmiştir (112). Vücut sıvılarına maruz kaldıklarında biyoaktif camların çözülüp yüzeysel tabakalarında apatit kristalleri oluşturduğu, bu sayede kemik ve diş dokuları ile kimyasal olarak bağlanabilme yeteneği kazandığı söylenmektedir (113). Biyouyumluluklarının oldukça yüksek olduğu, seramiklerin bazı özelliklerini sergiledikleri ve antimikrobiyal özellikler sergiledikleri söylenen biyoaktif camların, doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılmak için uygun

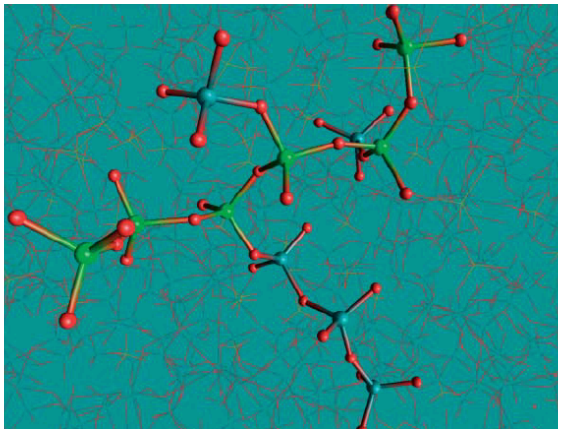
özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir (114). Kompozisyonları birbirinden farklı olan çeşitli biyoaktif cam türleri bulunmaktadır. Biyoaktif cam türlerinden bazıları FDA onaylı olup terapötik amaçlarla kullanılabilmektedir (110). 45S5 ve S53P4, FDA onaylı olup tedavi amaçlı kullanılabilen biyoaktif camlara birer örnek olarak verilebilmektedir (115). Biyoaktif camların biyouyumluluğu yüksektir ve içerisinde bulunan kalsiyum ve fosfat bileşenleri sebebiyle hidroksiapatit yapısına benzerlik göstermektedir (116). Biyoaktif camların, osteoblastların proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu sağlayan silikat yapılı jel bir tabaka oluşturduğu ve osteoblastların, kemikteki organik matriksin sentez ve depozisyonunu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (117). Bu sayede biyoaktif camlar diş hekimliği ve tıp alanında geniş bir kullanım alanına sahip olabilmiştir (115). Fosfat, silikat ve borat bazlı olmak üzere toplam 3 farklı türde biyoaktif cam bulunmaktadır (118). 45S5, günümüzde en çok kullanılan biyoaktif türüdür. İçerisinde %45 oranında SiO_2, %24,5 oranında Na_2O, %24,5 oranında CaO ve %6 oranında P_2O_5 bulunduğu bildirilmiştir (119). 45S5 üzerine güncel çalışmalar yapılmaya devam edilmekte, kompozisyonunu değiştirip farklı klinik amaçlarla kullanılabilecek yeni biyoaktif cam türleri geliştirilmektedir (113). Tablo 2.1'de bilinen biyoaktif cam türleri ve bunların kompozisyonları yer almaktadır (120).

Tablo 2.1: Biyoaktif cam türleri ve bunların kompozisyonları (121)

Biyoaktif cam	SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5	Diğerleri
45S5	45,0	24,5	24,5	6,0	-
42S5	42,1	26,3	29,0	2,6	-
S53P4	53,0	23,0	20,0	4,0	-
55S4	52,1	21,5	23,8	2,6	-
58S	60,0	0,0	36,0	4,0	-
70S30C	70,0	30,0	0,0	0,0	-
45S5F	45,0	24,5	12,25	6,0	12,5 CaF_2
40S5B5	40,0	24,5	24,5	6,0	5 B_2O_3

Biyoaktif camlar; biyolojik olarak diş yapısını desteklemeleri, iyi bir iskele görevi görmeleri ve antibakteriyel özellik göstermeleri sebebiyle diş hekimliğinde oral maksillo fasiyal cerrahiler, dental implantoloji, periodontoloji, kemik rejenerasyonu, pulpal tedaviler, restoratif tedaviler, dentin hipersensitivitesi, mine remineralizasyon tedavileri gibi pek çok farklı alanda kendine kullanım alanı bulabilmiş materyallerdir (118). Remineralizasyon yetenekleri oldukça yüksek olduğundan diş dokusuna kaybettiği kalsiyum ve fosfatı yeniden kazandırmak amacı ile diş macunlarının içerisinde çok küçük partikül boyutlarında dahil edilmektedirler (122). Biyoaktif camların dentin remineralizasyonu için araştırıldığı ilk çalışmada Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) ile dentin diskleri yapay olarak demineralize edilmiş, oluşturulan lezyona biyoaktif cam uygulanmıştır. Yapılan incelemede biyoaktif camların lezyonda önemli ölçüde remineralizasyon sağlandığı görülmüştür (21). Ayrıca başka bir çalışmada biyoaktif cam içeren diş macunlarının dentin geçirgenliğini azalttığı, asit ataklarına karşı dişin daha dayanıklı olmasını sağladığı görülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde biyoaktif camların dentin hipersensitivitesi ve remineralizasyon tedavilerinde kullanımının faydalı olabildiği sonucuna ulaşılmıştır (123).

2.5.2.1.1. 45S5: Biyoaktif camlar, 1969 yılında Florida Üniversitesinde L. Hench tarafından keşfedilmiştir. Hench kemik dokusuyla kuvvetli bağlar kurabilen bir materyal arayışına girmiştir. Vücut içerisinde degrade edilebilen ve içerisinde yüksek oranda kalsiyum bulunduran cam yapılı bir materyal geliştirmeye odaklanmış ve ağırlıkça %45 SiO_2, %24,5 CaO, %24,5 Na_2O ve %6 P_2O_5'ten oluşan 45S5 Bioglass'ı geliştirmiştir. Bioglass geliştirilmiş ilk biyoaktif cam türüdür. Materyalin formülizasyonundaki 45S ağırlıkça %45'ini oluşturan SiO_2'i, 5 ise içerisindeki kalsiyum ve fosfatın birbirine oranının 5 olmasını ifade etmektedir. 45S5'in, biyoaktivite indeksi en yüksek biyoaktif cam bileşeni olduğu bildirilmiştir (111). Literatürde 45S5 partiküllerinin antibakteriyel etkisinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (124). Yapılan bir çalışmada 45S5 nanopartiküllerinin çok hızlı bir şekilde çözündüğü, bu sebeple pH'ta çok hızlı bir artışa sebep olduğu ve mikrobiyotanın bu hızlı pH yükleşini tolere edemediği görülmüştür (125). Moleküler yapısı incelendiğinde esas olarak molekülün yapısını silisyum elementinin oluşturduğu, silisyumun oluşturduğu iskeleye kovalent bağlar ile oksijen atomlarının bağlandığı ve bir cam yapının oluştuğu, bu cam yapıya kalsiyum ve sodyum elementlerinin iyonik bağlarla bağlandığı görülmüştür (126). Şekil 2.2'de 45S5'in şematik diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 2.2: 45S5 molekülünün şematik diyagramı (127)

Yapılan birçok çalışmada 45S5'in erken çürük lezyonlarını remineralize edebildiği görülmüştür. 45S5'in tükürük ve fizyolojik sıvıların ortamda mevcut olduğu durumlarda mine dokusunda apatit oluşumunu teşvik ettiği söylenmektedir. İçerisinde bulunan kalsiyum, sodyum, fosfat ve silikat iyonlarının vücut sıvıları ile tepkimeye girdiği ve kalsiyum fosfatın çökelmesine yol açtığı, çökelen bu kalsiyum fosfatın çözüldüğü, çözülme sonucu açığa çıkan ürünlerinin ortamın kimyasal kompozisyonunu ve pH'ını değiştirdiği, buna bağlı olarak kalsiyum fosfat için çekirdeklenme bölgeleri oluştuğu bildirilmiştir (128). Oral kavite içerisinde tükürüğün etkisi ile biyoaktif cam partiküllerinden sodyum iyonları salınımı gerçekleşmekte ve ortamda var olan hidrojen iyonları, sodyum iyonları ile yer değiştirmekte bu sayede ortamın pH'ı yükselmektedir. Bu iyon değişiminin gerçekleşmesi biyoaktif cam partiküllerinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının salınmasına yol açmakta ve sonuç olarak biyoaktif camın yüzeyinde silika açısından zengin bir tabaka oluşumu gerçekleşmektedir. Bu döngü devam ettikçe ortamdaki kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonunun gitgide arttığı ve biyoaktif camın üzerinde oluşmuş olan silika tabakasının üzerine bu iyonların çökeldiği bildirilmiştir (129).

Biyoaktif camların daha çok hidroksiapatatit oluşturduğu bildirilmiştir ancak, florür içerikli biyoaktif camların florapatit oluşuturduğu da tespit edilmiştir. Biyoaktif camlar; diş macunları, profilaksi patları, membranlar ve cilalar gibi pek çok farklı materyalin içerisinde yer almakta ve demineralizasyon tedavileri için kullanılmaktadır. Bununla birlikte biyoaktif camlarla yapılan çalışmaların çoğu *in vitro* çalışmalar olup

biyoaktif camların uzun dönem klinik kullanımı hakkında yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (58).

Bütün bu özelliklerine rağmen 45S5 uygulandığı yüzeylerden kolayca ayrışabilmektedir. Bu sebeple 45S5 üzerine modifikasyonlar yapılarak özellikleri iyileştirilmeye çalışılmış ve yeni biyoaktif cam türleri geliştirilmiştir. S53P4 bu biyoaktif camlardan olup çürük profilaksisinde, diş macunlarında, dentin hipersensitivitesinde, endodontik patların içerisinde ve implant tedavilerinde kendine kullanım alanı bulmuştur. S53P4'ün daha çok daha fazla silikat salınımı yaptığı ve sert doku remineralizasyonunu daha fazla sağladığı bildirilmiştir (130). Remineralize edici özelliğinin yanında 455S5'in en dikkat çekici bir diğer özelliği de antibakteriyel etkinliğinin oldukça yüksek olmasıdır. 45S5'in *S. mutans* üzerindeki bakterisidal etkisi yapılan çalışmalarda görülmüştür. 45S5 alkali iyonlar salarak ortamın pH'ını yükseltmekte ve bu sayede antimikrobiyal etki sağlamaktadır (58).

2.5.2.1.2. S53P4: 1990 yılında Anderson ve Karlsson tarafından gelistirilen S53P4, FDA onaylı bir biyoaktif camdır. İçerisinde ağırlık olarak %53 oranında SiO_2, %4 oranında P_2O_5, %23 oranında Na_2O_4 ve %20 oranında CaO bulunmaktadır (19). S53P4'ün ticari adı Bonalive Biomaterials Ltd.'dir. Klinik olarak kemik defektlerinin, osteomyelit'in tedavisi ve kraniofasiyal cerrahiler gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. 45S5'in bir türevidir. Kemik dokusunda iyileşmeyi çok iyi sağlamasının yanı sıra bakteriyel adezyonu engelleyerek bakterilerin kolonizasyonunu engellemekte ve bakterilerin büyüme yeteneğini engelleyerek antibakteriyel etki sağlamaktadır. Ayrıca vücut sıvıları ile temas ettiğinde alkali iyonlarının salınımına yol açarak pH'ı yükseltmekte bu da S53P4'ün antibakteriyel etkisine katkı sağlamaktadır. Daha çok 0,8 – 3,5 mm'lik granüller veya disk formunda kullanılmaktadır (23). S53P4'ün remineralizasyon ve dentin hipersentivitesinin tedavisinde başarılı sonuçlar verdiği *in vitro* çalışmalar mevcuttur (24,131–133). Bununla birlikte S53P4 içeriği olan bir remineralizasyon ajanı ticari olarak henüz kullanıma geçmemiştir. Bu konuda daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6. DENTAL MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUĞU

Yeni bir dental materyalin veya uygulanacak herhangi bir tedavinin klinik olarak uygulanmaya geçilmeden önce güvenilir olduğu kanıtlanmalıdır. Herhangi bir tedavinin veya kullanılacak ilacın güvenilirliğine FDA veya ISO gibi uluslararası kuruluşların

rehberliklerince, *in vitro* testler, hayvan deneyleri ve klinik çalışmaların sonuçları değerlendirilerek karar verilmektedir (134). Son yıllarda dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesi kapsamlı, bağımsız ve karşılaştırmalı olarak uygulanan bir bilim dalı haline gelmiştir. Bir materyal uygulandıktan sonra uygulama amacına uygun bir konak yanıtı oluşturuyorsa o materyal için biyouyumlu denilebilmektedir. Geçmişte bir biyomateryalden inert veya biyolojik olarak tolere edilebilen bir materyal olması beklenirken, günümüzde daha çok materyalin uygulandığı bölgelerdeki hücrelerde hedeflenmekte olan etkiyi yaratabilmesi yani biyoaktif özellik göstermesi beklenmektedir. Materyalin salgıladığı maddeler, yüzey özellikleri ve proteinlerle olan etkileşimi o materyalin nasıl bir biyolojik yanıt oluşturacağını belirleyen faktörlerdir (135).

2.6.1. Dental Materyallere Uygulananan Biyouyumluluk Testleri

Dental materyallerin biyouyumluluklarının incelenmesi karmaşık ve kapsamlı bir alandır. İstenmeyen doku reaksiyonları pek çok farklı doku çeşidinde meydana gelebilmektedir. Biyouyumluluk testlerinin her biri sadece bir çeşit istenmeyen reaksiyonu incelemeye yardımcı olabilmektedir. Bununla birlikte istenmeyen çok çeşitli reaksiyon türü mevcuttur. Örneğin pulpa/dentin testi ile materyalin pulpaya olan uyumluluğu değerledirilebilmekte, ancak alerjik potansiyeli hakkında bir fikir edinilememektedir. Ayrıca her bir test yöntemi yalnızca belirli bir istenmeyen reaksiyon çeşidinin tek bir yönünü inceleyebilmektedir. Örneğin hücre kültürü çalışmalarında incelenen materyelin sadece izole edilmiş hücreler üzerindeki etkileri değerlendirilebilmektedir. Bu durum aynı materyalin bir hastaya uygulanması durumunda reaksiyonun aynı şekilde gerçekleşeceği anlamına gelmemektedir. Örneğin hücre kültüründe herhangi bir reaksiyon oluşturmamış materyal pH değerinin düşüklüğü sebebi ile problemlere yol açabilmektedir. Bununla birlikte hücre kültürü testinin bulguları istenmeyen reaksiyonun mekanizmasını daha iyi anlayabilmeye yardımcı olabilmektedir (136).

2.6.1.1. İn vitro çalışmalar: Bir materyalin biyouyumluluğunun *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmesi canlı bir organizma içerisinde değil, hücre kültürü altında değerlendirilmesiyle yapılmaktadır. Bu deneyler sırasında klinik pratiğe daha yakın sonuçlar vermesi amacı ile mine veya dentin diskleri gibi fiziksel bariyerler kullanılabilmektedir. İn vitro çalışmalar sayesinde hücre fonksiyonları ve canlılığı, gen

ekspresyonu, protein ve inflamatuar mediyatörlerin ekspresyonu, reaktif oksijen türleri, hücre ölümü, hücre morfolojsi gibi faktörler değerlendirilebilmektedir (137–139). İn vitro çalışmalar; tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, hızlıca uygulanabilmesi, maaliyetinin daha düşük olması, kontrol gruplarının daha kolay belirlenebilmesi, hayvan ve insanlar üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye sahip olmaması sebebiyle etik ve hukuksal olarak herhangi bir çatışmaya yol açmaması gibi avantajlara sahiptir (140). Geçmişte kullanılan yöntemler *in vivo* koşulların daha iyi taklit edilebilmesi için geliştirilmektedir (134). Örneğin dental materyallerin biyouyumluluğu değerlendirilirken dentin bariyerleri oluşturularak *in vivo* koşullara daha yakın bir gözlem yapılması sağlanmıştır (141,142). Bu teknikte yapay pulpa odası kullanılmakta, mine ve/veya dentin diskleri oluşturulup pulpa odasının üzerine yerleştirilmekte, diskin oklüzal yüzeyinde kavite oluşturmak amacı ile standardize olarak dentin dokusu inceltilmekte ve test edilecek materyal bu bölgeye uygulanmaktadır (138). Dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirildiği çalışmalarda dikkat edilmesi gereken bir diğer noktada uygun hücre hattının kullanılmasıdır. Klinik koşulların daha iyi taklit edilebilmesi için odontoblastik fenotip gösteren hücre hatlarının kullanımının daha uygun olduğu belirtilmiştir (143–145).

2.6.1.2. İn vivo çalışmalar: Hayvanların bilimsel araştırmalar için kullanılması etik açıdan tartışmalı bir konudur. Bu konuda geniş çaplı tartışmalar mevcuttur (146,147). Bununla birlikte, *in vivo* çalışmalarda incelenecek olan materyalin kanla olan etkileşimi, oluşturduğu inflamatuar cevaplar, kemik rejenerasyonuna olan etkisi gibi sistemik ve önemli parametreler değerlendirilebildiği için *in vivo* çalışmalardan, *in vitro* çalışmalara göre daha anlamlı bilimsel veriler sağlanabilmektedir (148). Klinik çalışmalarla kıyaslandığında hayvan deneyleri çok daha düşük maaliyetlerle ve daha kontrollü bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Hayvan çalışmalarında dikkat edilmesi gereken bir önemli nokta da çalışmanın sonucuna kullanılacak hayvanın türü, yaşı ve cinsiyeti etki edeceğidir. Ayrıca herhangi bir konuda yapılmış olan bir hayvan deneyinin sonuçlarının, insanlar üzerinde paralel bir şekilde benzer klinik tablolar oluşturacağı hakkında bir varsayım yapılmamalıdır (134,148,149). Test edilen materyallerin dokuya uygulanırken gerçekleşebilcek travmalar veya olası yerel enfeksiyonlar gibi faktörler sonucu etkileyebileceğinden hayvan deneylerinin sonuçları dikkatli yorumlanmalıdır.

2.6.1.3. Klinik çalışmalar: Klinik çalışmalar, araştırılan materyallerin gönüllü denekler üzerinde uygulandığı çalışmalardır. Klinik çalışmalar bir materyalin özelliklerinin ve performansının anlaşılabilmesi için altın standart olarak kabul edilmektedirler (150). Klinik çalışmaların çoğunda incelenen materyallerin biyouyuyumluluklarından çok mekanik özelliklerinin araştırıldığı bildirilmiştir (136). Genel olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kıyaslandığında, klinik çalışmaların maaliyeti yüksektir, gerçekleştirilmesi uzun sürer, kontrolü ve sonuçlarının yorumlanması zordur. Ayrıca çalışma insanlar üzerinde gerçekleştirileceğinden etik açıdan ciddi hassasiyetler içermektedirler (151). Retrospektif, kesitsel ve prospektif gibi farklı klinik çalışma türleri mevcuttur. Bir materyalin biyolojik performansının belirlenmesi açısından prospektif çalışmaların daha güvenilir olduğu bildirilmiştir. Çalışmaların güvenilirliklerinin arttırılması için körleştirme, randomizasyon, plasebo gruplar ve yanlılığı en aza indirgeyecek stratejiler kullanılmaktadır (152). Bu çalışmalarda tedavi uygulanır ve ardından hastalar belirli periyotlarda takip edilmektedir. Bu sayede veriler toplanmaktadır. Klinik çalışmalarla ilgili dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da bu çalışmalar tedaviyi uygulayan kişiyle ilgili faktörlerden etkilenebilmektedirler (150).

2.7. İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

Sitotoksisite testleri kolay ve hızlıca uygulanabildiği yüksek hassasiyete sahip olduğu ve hayvanlar üzerinde yapılacak olan testleri azalttığı bu sayede hayvanları toksisiteye karşı korduğu için biyouyumluluk testleri içerisinde pilot bir test niteliği görmekte ve önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (153,154). Sitotoksisite testleri biyolojik tarama ve değerlendirme testlerinden biridir. Hücre büyümesi, üremesi ve morfolojilerini gözlemlemek amacı ile *in vitro* ortamlarda hücreler kullanılmaktadır (155).

İn vitro sitotoksisite testlerinde araştırılmak istenen materyallerin hangi hücreler üzerine uygulanacağı ve bu hücrelerle ne şekilde temas edeceği büyük bir önem arz etmektedir. ISO yapılacak olan deneylerde belirli bir standardizasyonu sağlayabilmek için L929, Balb/3T3 ve WI38 gibi hücre hatlarının kullanımını önermektedir. ISO tarafından belirlenen bu hücrelerin üreme karakterlerinin ve morfolojilerinin homojen olması sitotoksisitenin anlaşılabilmesinin kolaylaştırmaktadır (156,157). ISO 19093-5 temel olarak sitotoksisite testlerini; direkt hücre kültürü, ekstrakt testi, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi ve dentin bariyer testi olarak sınıflanlandırmaktadır. Ekstrakt

testlerinde daha çok araştırılan materyellerin çözündüğünde açığa çıkardığı ürünlerin toksisitesi araştırılmaktadır. Bu testlerden elde edilen sonuçların genellikle hayvanlar üzerinde yapılan toksisite testleri ile parallel sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (158). Direkt temas testi sitotoksisite tespiti için kullanılan en hassas yöntem olarak kabul edilmektedir. Çok düşük sitotoksisitesi olan dental materyallerin sitotoksisitesi bile bu direkt temas yöntemi ile incelenebilmektedir (159). Agar difüzyon testi yüksek toksisiteye sahip olup büyük miktarlarda filtrasyon gerektiren materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için kullanılırken; moleküler filtrasyon yöntemi küçük moleküler ağırlıklı materyallerin biyouyumlulukları değerlendirilirken tercih edilmektedir (160,161).

2.7.1. Direkt Temas Testi

Direkt temas yönteminde kültüre edilmiş hücrelerin üzerine arada bir bariyer olmadan materyalin teması sağlanmaktadır. Ardından hücrelerin sayılarında veya morfolojilerindeki değişimler incelenmektedir. Bu yöntemde materyalin hücreler üzerindeki etkileri doğrudan gözlemlenmiş olur. Hassasiyeti oldukça yüksek bir tekniktir. Direkt temas tekniği bütün materyaller için uygulanması için mümkün olmayan bir tekniktir (162). Örneğin yoğunluğu daha az olan materyaller hücre besiyerinde yüzeceğinden materyalin hücreler olan teması zorlaşmakta ve bu teknikle sitotoksisite ölçümü yapılamamaktadır (158).

2.7.2. Bariyer Testi

Belirlenmiş dört sitotoksisite testinden üçü bariyer test yöntemlerindendir. Direkt temas testi sıkça kullanılan bir tekniktir ancak klinik durumu her zaman doğrudan yansıtmayabilmektedir. Birçok klinik durumda kullanılan dental materyal ve hücreler doğrudan temas etmemekte arada bir dentin tabakası bulunmaktadır. Bariyer testlerinde amaç araya bir bariyer koyarak dentin dokusunu taklit etmektir. Bu testlerin dentini çözüp dentin tübüllerinden difüze olma yeteneği de değerlendirilerek toksisitesi yorumlanmaktadır (163).

2.7.2.1. Filtre difüzyon testi: Bu yöntemde hücreler ve materyal arasına selüloz asetattan bir filtre konarak sitotoksisite testi gerçekleştirilmektedir. Filtrenin bir yüzeyine hücreler temas ederken diğer yüzeyine uygulanacak materyal temas etmektedir. Sitotoksik etkinin var olabilmesi için test edilecek materyalin 0,45 μm filtreden difüze

olması gerektiği bildirilmiştir (164). Hücrelerin Süksinat Dehidrogenaz (SDH) enzim aktivitesi ölçülerek sitotoksisite incelenmektedir. Test sırasında toksisiteye bağlı olarak hasar görmüş bir bölge ve bu bölgede SDH negative hücreler oluşmaktadır. Bölgenin genişliği materyalin sitotoksisite seviyesi ile ilişkilendirilmektedir. Sonuçların daha güvenilir ve anlamlı olabilmesi için bölgenin genişliğine dair bir skorlama sistemi oluşturulmuştur (165).

2.7.2.2. Agar diffüzyon testi: En uzun süredir uygulanan bariyerli sitotoksisite test yöntemidir. Öncelikle hücreler kültüre edilir, ardından ya %1'lik canlı hücre içeren boyalı agar veya erime noktası düşük olan bir agar eklenir ve agarın bir yüzeyine hücreler diğer yüzeyinde incelenecek materyal temas ettirilir. Besinlerin, çözülebilen toksik maddelerin ve gazların agar içerisinden penetre olabildiği bildirilmiştir (166). Bu sayede salınan toksik maddeler hücrelere ulaşabilmektedir. Sonuç yarı kantitatiftir, sayısal olarak ölçülememekte, görsel olarak belirlenmektedir. Basit, hızlıca uygulanabilen, düşük maaliyetli bir yöntemdir. Agarın *in vivo* koşulları birebir taklit edemeyeceği bildirilmiştir. Ayrıca testin sonucu toksik materyallerin agar içerisinden difüze olabilme yeteğinden etkilenmektedir ve testin sonuçlarının yorumlanması bireysel faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü agar difüzyon testlerinin doğruluk ve güvenilirliği değerlendirilirken tüm bu faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (158).

2.7.2.3. Dentin bariyer testi: Sitotoksisite testleri uygulanırken *in vivo* koşullar taklit edilmeye çalışılmaktadır. Filtre difüzyon testi ve agar difüzyon testi ile *in vivo* koşullar taklit edilmeye çalışılsa da diş dokusunu daha iyi taklit etmek amacıyla dentin bariyer testi yöntemi kullanılmaktadır (167). Bu teknikte bariyer olarak materyalle hücre arasına dentin diskleri yerleştirilmektedir. Yöntemin geliştirilmesindeki temel amacın dentin tübüllerinden gerçekleşen difüzyonu tanımlayabilmek olduğu bildirilmiştir (168). Yapılan çalışmalarda tübüllerden gerçekleşen difüzyon miktarının; tübüllerin yoğunlu, çapı ve uzunluğundan, diffüze olacak molekülün büyüklüğü ve konsantrasyonundan etkilendiği görülmüştür (169). Diğer test yöntemlerine kıyasla, insan vücudundaki biyolojik ortamı daha doğru taklit edebildiği için dentin bariyer testi ISO 7405 tarafından kullanımı önerilen bir sitotoksisite değerlendirme testidir (165).

2.8. SİTOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

2.8.1. Canlılık Değerlendirme Testleri

Canlılık değerlendirme testleri genellikle primer disagregasyon, hücre separasyonu veya kriyoprezervasyon gibi travmatik prosedürlerden sonra canlı hücre oranını ölçmek için kullanılmaktadır. Birçok canlılık değerlendirme testi hücre membranının bütünlüğündeki bozulmaya dayanmaktadır. Membran bütünlüğü bozulan bir hücre tripan mavisi, eritrosin veya naftalen siyahı gibi normalde geçirgen olmadığı bir boyaya karşı geçirgenleşmekte veya normalde canlı hücreler tarafından tutulan nötral kırmızı veya diasetil floresan gibi bir boyanın yansıtılması ile ölçülmektedir. Bu testler hemen sonuç vermektedir ancak hücrenin canlı kalacağı uzun vadede canlı kalıp kalmayacağı hakkında bir bilgi bu testlerle elde edilememektedir. Örneğin tripan mavisi ile boyanmamış bir hücre canlıymış gibi gözükse de birkaç saat içerisinde canlılığını kaybedebilmektedir. Bu durumda canlılık oranının gerçekten yüksekmiş gibi değerlendirilmesine sebep olabilmektedir (170). Canlı veya cansız hücrelerin boyanarak değerlendirilen testlerde spektrofotometrik olarak sitotoksisite belirlenmektedir (171).

2.8.2. Yaşam Değerlendirme Testleri

Kısa vadede uygulanabilen testler daha kullanışlı, hızlı ve kolay uygulanabilir olsa bile bu testlerle sadece test sırasında canlılığını yitiren hücre sayısı analiz edilebilmektedir. Bununla birlikte toksik etkilere maruz kalmış hücrelerin saatler hatta bazen günler sonra etki gösterebildiği bildirilmiştir. Kısa vadeli testler toksik etkilerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini geç gösterdiği durumlarda yetersiz kaldığı görülmektedir. Böyle durumlarda hücrelerin canlılığını değerlendirebilmek için kullanılması gereken testlerin doğası farklı olmalıdır. Uzun vadede gerçekleştirilen testlerde hücrelerin canlılık durumunun uzun süreli gözlemlerle daha doğru şekilde tespit edilebildiği söylenmektedir (170).

2.8.3. Hücre Proliferasyon Testleri

Bir materyalin, hücreler üzerindeki proliferatif etkisini belirlemek amacı ile materyal hücre kültürüne uygulandıktan birkaç gün sonra hücre sayımı yapılabilmektedir. Teste başladıktan sonra kısa bir süre içerisinde hücre sayımı gerçekleştirildiğinde

özellikle de bu sayım bir kere yapıldığında sonuçların yanıltıcı olabileceği söylenmektedir. Bu sebeple hücre proliferasyon hızının doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için bir büyüme eğrisi oluşturulması önerilmektedir. Bununla birlikte hücre sayma yöntemiyle ancak küçük örneklem gruplarında büyüme eğrisi oluşturulabilmektedir. Bundan dolayı büyük bir örneklem kullanıldığı durumlarda proliferasyon hızı tek bir zaman belirlenerek incelenebilmektedir. Hücre sayımının sadece bir zaman noktasında yapıldığı durumlarda sayım yapılacak zamanın hücre proliferasyon hızının en yüksek olduğu logaritmik fazın ortası olması önerilmektedir. Büyüme eğrisi incelendiğinde materyalin hücre proliferasyonu üzerinde bir etkisi olduğu düşünülüyorsa bu etkiyi doğrulamak amacı ile klojenik testler veya MTT testi gibi alternatif testlerin de uygulanması önerilmektedir (170).

2.8.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri

Örneklem sayısı fazla olduğunda ve deney 2-4 haftalık süreler içerisinde gerçekleştiğinde plaka verimliliği testlerini gerçekleştirmek çok zaman alıcı bir hale gelmektedir. Ayrıca bazı hücre hatları düşük plate verimliliğine sahip olmakta ve bu durum kolonizasyon kapasitelerini düşürmektedir. Bu sebeplerden ötürü daha yüksek yoğunluktaki hücrelerin değerlendirilmesi için alternatif test yöntemleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte bu testlerden hiçbiri doğrudan hücre yaşamı (survival) değerlendirmesi yapamamaktadır. Bu testlerle daha çok hücre sayısındaki net artış (büyüme verimi), toplam protein veya DNA miktarındaki artış, devam eden metabolik aktiviteler belirlenebilmektedir. Toksik etki ortamdan kaldırıldıktan sonra hücre popülasyonundaki metabolik ve proliferatif kapasitenin ne kadar süre boyunca korunabildiğine bakılmaktadır. Metabolizma testleriyle metabolik aktivite ve proliferasyon ölçümleri yapılarak uzun dönemde oluşacak zarar ölçülmektedir. Bununla birlikte bu testlerde metabolik veya proliferatif aktivitenin hücre başına aktivitenin azalmasından mı yoksa hücre sayının azalmasından mı kaynaklandığının ayırdı yapılamamaktadır. Bu nedenle yapılan gözlemlerin doğruluğunu sağlamak için klonojenik hayatta kalma testlerinin yapılması önerilmektedir (170).

2.8.4.1. Mikrotitrasyon testleri: Çok kuyucuklu plakaların kullanımı doku kültürü çalışmalarında örneklem tekrarını arttırması açısından bir devrim niteliği taşımaktadır. Bu plakaların maaliyetleri uygun ve optik kaliteleri yüksektir. Çok kuyucuklu plakalar içerisinde en meşhur olan plaka 96 kuyucuklu mikrotitrasyon

plakasıdır. Her bir kuyucukta yaklaşık olarak 28-32 besiyer mm^2 büyüme alanı olan plakalar içerisinde 0,1 ml medium ve $1x10^5$ hücre barındırabilmektedir. Mikrotitrasyon testlerinde çok sayıda örneklem eş zamanlı olarak işleme tabi tutulabilmektedir ancak her örnek için daha az sayıda hücre kullanılabilmektedir. Bu yöntem ile tüm hücre popülasyonu toksik bir ajanla muamele edildikten sonra genellikle ATP veya NADH/NADPH gibi metabolik parametreler incelenerek canlılık incelemeleri gerçekleştirilebilmektedir (170).

2.9. APOPİTOZ SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Apoptoz, canlı bir organizma içerisinde hasar görmüş veya vazifesini tamamlamış hücreleri ortadan kaldırması sağlayan programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan fizyolojik bir süreçtir. Apoptozun *in vitro* olarak tespiti için birçok yöntem geliştirilmiştir. Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında kullanılmıştır ve sadece hücre morfolojisindeki değişimleri ifade etmek için kullanılmıştır (172). Ancak günümüzde apoptoz denildiğinde hücresel morfolojik değişimlerin yanında moleküler seviyedeki değişimler de anlaşılmaktadır. Tanımın değişmesiyle birlikte bu süreçte apoptozun tespiti için kullanılan yöntemlerde de gelişmeler yaşanmıştır. Yaşanan bu ilerlemeler sayesinde apoptoz tespiti daha hassas ve güvenilir hale gelmiştir.

2.9.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

2.9.1.1. Işık mikroskobu: Işık mikrosokobu altında yapılan incelemelerde hücreler boyanmış olması gerekmektedir. Bunun için Hematoksilen boyama ve Giemsa boyama olmak üzere iki çeşit boyama yapılmaktadır (173).

2.9.1.2. Floresan mikroskobu: Bu yöntemde boyama akridin turuncusu, etidyum bromür, Hoechst boyası, 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) veya propidium iodide gibi floresan maddelerle yapılmaktadır. Floresan boya DNA'ya bağlanmakta ve kromatin ve nükleus görünür hale gelmektedir. Floresan sistemleri, ışık mikroskobu altındaki sistemlere daha yüksek maliyetlidir ancak floresan sistemlerde canlı ve ölü hücreler birbirinden ayırt edilebilmektedir. Bu boyamalarda canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi için hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan bir boyanın (akridin turuncusu) yanında, yalnızca ölü hücreleri boyayan başka bir boya (etidyum bromür) daha kullanılmaktadır. Bu yöntemde canlılık değerlendirilirken temel olarak hücre zarının

bütünlüğünü koruyup korumadığına bakılmaktadır. Canlı hücreler sağlam bir hücre zarına sahip olduğu için etidyum bromür gibi boyalarla boyanmazken membranlarında defekti olan ölü hücreler bu boya ile boyanmaktadır. Bu sebeple hem canlı hem ölü tüm hücreleri boyayan akridin turuncusu gibi başka bir boya ile çift boyama yapılmaktadır. Hücrelerin hangi nedenle canlılığını yitirdiğini anlayabilmek için nükleer morfolojileri incelenmelidir (173).

Nekrotik hücrelerin çekirdeklerinde apoptotik hücrelerdeki gibi kromatinlerde bir yoğunlaşma, çekirdek bütünlüğünde bozulma görülmemektedir. Çekirdek hem akridin turuncusu hem de etidyum bromür boyası ile boyanmaktadır. Etidyum bromür DNA'ya bağlanıp yoğun kırmızı turuncu renk yayar, akridin turuncusu DNA'ya bağlanıp yeşil floresan RNA'ya bağlanıp turuncu floresan yayar. Etidyum bromür boyası floresan mikroskop altında daha baskın bir sinyal verdiği için nekrotik hücre çekirdekleri kırmızı veya turuncu olarak görülmektedir (173).

Apoptotik hücrelerde sekonder bir nekroz olmadığı sürece, hücre membranı bütünlüğünü her zaman korumaktadır. Bu sebeple etidyum bromür boyası apoptotik hücreleri boyayamamaktadır ancak akridin turuncusu boyayabilmektedir. Erken apoptotik evrede etidyum bromür hücreye girememekte akridin turuncusu DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanmakta ve parlak yeşil floresan görüntü oluşmaktadır. Geç evrede hem her iki boya da hücre içerisinde olacağından kırmızı turuncu bir çekirdek görülmektedir ancak nükleer morfolojilerinde apoptotik hücrelere ait değişimler yaşanmaktadır (173).

Canlı hücreler ise hücre membran bütünlüğünü korunduğu için etidyum bormür boyası ile boyanırken akridin turuncusu ile boyanmaktadırlar ancak nükleer morfolojileri normal seyretmektedir (173).

2.9.1.3. Elektrik mikroskobu: Apoptotik değerlendirilmelerde elektron mikroskobu altın standart olarak kabul edilmektedir (174). Morfolojik değişimlerin en iyi şekilde gözlemlendiği yöntemdir. Mitokondrinin durumu, hücresel veya nükleer zarın bütünlüğünün korunup korunmadığı gibi subselüler detaylar incelenebilmektedir (173).

2.9.1.4. Faz kontrast mikroskobu: Faz kontrast mikroskobu, hücre kültürü ortamında büyüyen hücrelerin gözlemlenmesinde kullanılmaktadır. Hücreler substrat üzerine yapışarak büyümekte, ölü hücrelerse bağlı oldukları substrattan ayrılıp kültür

ortamında serbestleşmektedir. Besiyerde yüzen bu ölü hücreler faz kontrast mikroskobu ile tespit edilebilmektedir (173).

2.9.2. İmmunhistokimyasal Yöntemler

2.9.2.1. Annexin V Floresan İzotiyosiyanat yöntemi: Hücre membranındaki fosfolipidlerden biri olan fosfatidilserin hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunmaktadır. Hücre apoptoza girdiğinde PS molekülleri hücrenin dış yüzeyine taşınmaktadır. Bu translokasyon apoptozun işaretidir. Annexin V, PS molekülü ile bağlanabilen ve floresan maddelerle Floresan İzotiyosiyanat (FITC) işaretlenebilen bir proteindir. Bu işaretli proteinin hücre kültürüne uygulandıktan sonra floresan mikroskop altında apoptotik hücrelerin tayini yapılabilmektedir (175). Bununla birlikte nekroza giren hücrelerde sitoplazma ekspoz olduğundan sitoplazmaya işaretli moleküllerin girebileceği ve PS moleküllerini boyayıp yalancı pozitif sonuç verebileceği unutulmamalıdır (173). Floresan mikroskobunun kullanılamadığı durumlarda, aynı test akım sitometri yöntemiyle de yapılabilmektedir (176).

2.9.2.2. TUNEL yöntemi: Bu yöntemde DNA'da meydana gelen kırılmalar in situ olarak belirlenebilmektedir (177). Bu yöntem parafin bloklar, dondurulmuş kesitler ve hücre kültürü üzerine uygulanabilmektedir. Bu teknikte incelenen mateyal proteinler değil, DNA'dır. Apoptotik hücreler DNA yoğunlaşmakta ve DNA üzerinde kırılmalar meydana gelmektedir. Bu nedenle yapılan boyamalarda kahverengiye boyanmaktadır (173).

2.9.2.3. M30 antijen tespiti: Apoptotik hücrelerde kaspaz aktivitesi ile meydana gelen sitokeratin 18 epitopunun ortaya çıkması ile uygulanan bir yöntemdir. Yalnızca epitelyal hücreler sitokeratin 18 salgılayabildiği için bu yöntemin kullanımı epitelyal hücrelerin apoptoz tayini ile sınırlıdır (178).

2.9.2.4. Aktif kaspaz-3 yöntemi: Prokaspaz-3 çeşitli hücre tiplerinde apoptoz için aktif bir rol oynayan bir proteazdır (179). Prokaspaz-3, apoptozu indükleyen çeşitli uyaranlar tarafından aktiflenerek kaspaz-3 adını almaktadır ve immünhistokimyasal yöntemler ile tespit edilebilmektedir. Aktif formdaki kaspaz-3'ün tespit edilmesi ile o hücrelerdeki apoptoz spesifik olarak belirlenebilmektedir. Bununla birlikte bu yöntem uygulanmadan önce incelenecek doku veya hücrelerde kaspaz-3'ün eksprese edilip

edilemeyeceği bilinmeli, kaspaz-3 dokuda mevcut değilse bu yöntem tercih edilmemelidir (173).

2.9.3. Biyokimyasal Yöntemler

2.9.3.1. Agaroz jel elektroforezi: Apoptoz esnasınsa DNA belirli bölgelerinden parçalanmaktadır ve elektroforez altında bu merdiven gibi bir görüntü vermektedir (180). Bununla birlikte nekrotik hücreler smear deseni ortaya çıkarmaktadırlar. Bu şekilde apoptotik ve nekrotik hücreler birbirinden ayırt edilebilmektedir (173).

2.9.3.2. Western blotting: Bu yöntem apoptozla ilişkili proteinlerin tespitinde, apoptoza bağlı meydana gelen parçalanmaların tespitinde kullanılmaktadır (173). Ayrıca, apoptoz sırasında mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom c gibi belirli moleküllerin hücrenin hangi bölgesinde yer aldığını belirlerken de kullanılmaktadır (181).

2.9.3.3. Akım sitometri: Apoptoz sırasında ekspresyonunda değişiklik meydana gelen herhangi bir protein flor sitometri yöntemi ile tespit edilebilmektedir. Bu proteinler, antikor ve floresan maddeler kullanılarak tespit edilebilmektedir (176). Kolayca ve kısa sürede uygulanabildiği ve kantitatif sonuçlar alınabildiği için klinik kullanım açısından oldukça avantajlıdır. Propidium iyodür gibi floresan maddelerle veya Anneksin V ile apoptoz tayin edilebilmektedir (173).

2.9.4. İmmünolojik Yöntemler

2.9.4.1. Enzim Bağımlı İmmunosorbent Testi: Virüs veya bakteri kaynaklı enfeksiyonların tespitinde ve apoptoz tayininde ELISA testi kullanılabilmektedir. Hızlı sonuç alınan, duyarlılığı yüksek ve spesifik bir yöntemdir (182). Bu test ile internükleozomal DNA kırılmaları ve M30 antijeni gibi apoptotik biyo belirteç tespit edilebilmektedir. Bu sayede apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir (173).

2.9.4.2. Florometrik yöntemler: Bu yöntem ile hücre kültüründeki kaspaz aktivitesi (kaspaz-3 ve kaspaz-9) ölçülmektedir (183). Öncelikle hücre lizatındaki aktif kaspaz molekülleri mikrotitre plakalardaki antikorlara bağlanmakta, ardından ortama

kaspazlar tarafından parçalanabilen bir substrat eklenmekte ve bu substratın kırılması sonucu floresan yoğunluk artmaktadır (173).

2.9.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Apoptoz tayini DNA microarray teknolojisi kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir. Yeni ve nispeten daha pahalı bir teknolojidir. Tek seferde apoptozla ilişkili pek çok gen tespit edilebilmektedir (173). Apoptozu haricinde sitotoksisite ve genotoksisite ile ilgili yolakları incelemek için kullanılabilmektedir (184).

2.10. ALKALEN FOSFATAZ

Plazma membran proteinlerine bağlı bir glikoprotein olan ALP, genellikle dimerik yapıda bulunmakta ve hücre yüzeyinde yer almaktadır (185–187). Yüksek pH'larda inorganik fosfat salınımı yaparak çeşitli monofosfat esterlerini hidrolize etmektedirler (188). Kas ve iskelet sistemi hastalıklarında takip, tespit ve araştırma açısından önemli enzimlerden biridir (189,190). Klinik laboratuvarda ilk olarak ALP Paget hastalığı, multiple myeloma gibi iskelet sistemi ile ilgili hastalıklarda çalışılmıştır (191–193). Günümüzde ise ALP seviyelerinin böbrek ve karaciğer fonksiyonları ile de ilişkili olduğu anlaşılmış olup, bu hastalıkların tanısında serum ALP düzeyleri değerlendirilmektedir (194,195).

Biyomateryallerin remineralizasyonu destekleme yetenekleri birçok biyokimyasal belirteç kullanılarak ölçülebilmektedir. ALP de diş sert doku oluşturma kapasitesi ölçülürken en çok kullanılan belirteçlerden biridir (196). İnsanda ALP'ler evrensel (böbrek, kemik, karaciğer), bağırsak ve plasental olmak üzere 3 ana tipe ayrılmaktadır (197). Bu enzimler homolog ama özdeş olmayan genler tarafından üretilmektedirler ve her tip kendine özgü enzimatik özellikler sergilemektedir (198). Dental pulpa dokusunda ALP'nin daha çok odontoblastik ve subodontoblastik tabakada yoğunlaştığı ve mineralizasyon süreçlerinde rol aldığı için dentin matriksinin mineralizasyonunu desteklemektedir (199). Bu etkisinden dolayı dental pulpa hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda ALP hücrelerin mineralizasyon süreçlerini belirlemek için kullanılan biyobelirteçlerden birisidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

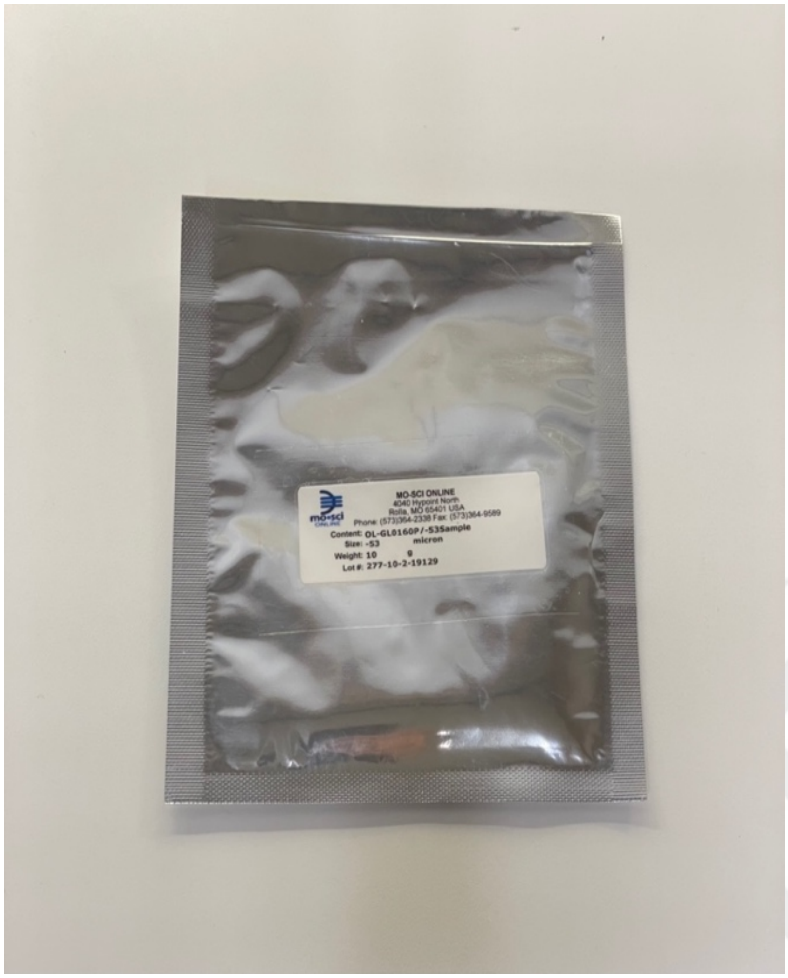
Çalışma, *in vitro* koşullarda Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 45S5 (MO SCI, LTD.), S53P4 (MO SCI, LTD.) ve Riva Star (SDI, Australia) materyallerinin L929 fare fibroblast hüre hattına uygulandığındaki sitotoksik, apoptotik ve ALP enzimine olan etkileri incelenmiştir. Tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar ve Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Dosya no: 23/207). Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2024/027).

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYALLER

Çalışmada kullanılan materyaller Resim 3.1, Resim 3.2 ve Resim 3.3'de gösterilmektedir.



Resim 3.1: RIVASTAR (SDI Dental, LTD.)



Resim 3.2: 45S5 (MO SCI, LTD.)



Resim 3.3: S53P4 (MO SCI, LTD.)

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER, KİMYASAL VE SARF MALZEMELER

3.2.1. Cihaz ve Aletler

Deney sırasında kullanılan cihaz ve aletler aşağıdaki liste ve Resim 3.4, Resim 3.5, Resim 3.6, Resim 3.7 ve Resim 3.8'de görülmektedir.

1- Laminar Akım (Airstream® Plus Class II BSC) (Resim 3.4)

2- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-30) (Resim 3.5)

3- Vorteks (Wisd Vortex Mixer VM-10)

4- Inverted Mikroskop (Nicon Eclipse Ts2) (Resim 3.6)

5- Hücre Kültürü İnkübatörü (Panasonic MCO-170) (Resim 3.7)

6- Su Banyosu (Daihan Scientific)

7- -80˚C Derin Dondurucu (VIP ECO)

8- -20˚C Derin Dondurucu (PHCbi)

9- +4˚C Buzdolabı (KW Apparecchi Scientifici)

10- Multi-mode Reader (Synergy HTX, Biotek) (Resim 3.8)

11- Mikropipet Seti (Eppendorf)

12- Analitik terazi (Radwag)

13- Ultrasonik banyo (Witeg Wisd WiseClean WUC A22H)



Resim 3.4: Hücre kültürü deneylerinde kullanılan laminar akım kabini



Resim 3.5: Santrifüj cihazı



Resim 3.6: Hücreleri flask ve plakada görüntülemek için kullanılan mikroskop



Resim 3.7: Hücre kültürü inkübatörü



Resim 3.8: Multimod okuyucu

3.2.2. Kimyasal Malzemeler ve Sarf Malzemeleri

1- L-929 fare fibroblast hücre hattı
2- Fötal sığır serumu
3- E'MEM
4- Penisilin-streptomisin
5- T75 flask
6- F tabanlı 96 kuyulu opak beyaz plaka
7- ATP analiz kiti
8- 6 kuyulu steril plaka
9- Akridin turuncusu / Etidyum bromür
10- ALP analiz kiti

3.3. DENEY ÖNCESİ MATERYALLERİN HAZIRLANMASI

Bu deneyde üç farklı materyalin (45S5, S53P4 ve GDF) sitotoksik, apoptotik etkileri ve ALP enzim aktiviteleri incelenmiştir. Deney esnasında kullanılacak olan materyaller ISO 10993-5 önerilerine göre hazırlandı (200). Kullanılan materyallerden 45S5 ve S53P4 biyoaktif cam grubunda yer almaktadırlar. Biyoaktif camların sıvılar ile temas ettiklerinde oluşabilecek ani alkali patlama reaksiyonları ve pH yükselmesini önlenmesi amacı ile öncelikle 45S5 ve S53P4 materyalleri pasive edilmiştir (201). Bunun için steril haldeki 45S5 (MO-SCI Bioglass®) ve S53P4 (MO-SCI Bioglass®) tozlarından 5'er mg alınmış, 50 ml'lik falkon içerisinde 1ml'lik E'MEM'e eklenmiştir. Elde edilen bu karışım 37°C'de, %5'lik CO_2'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra oluşturulan karışımlar inkübatörden çıkarılıp 13000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından 53 mikronluk partikül boyutuna uygun bir filtre kağıdı kullanılarak (0,22 mikrometrelik) karışım süzülmüş ve süper natant atılmştır. Pasive edilmiş biyoaktif camların tartımı yapılmıştır. Elde edilen pasive edilmiş 45S5 ve S53P4 partikülleri E'MEM ile seyreltilerek 3,0; 1,5; 0,75; 0,375; 0,187; 0,1; 0,05; 0,005 mg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu 1 ml %38'lik solüsyonun içerisinde 380 mg kadar GDF olduğu tespit edilmiştir (202). Bu bilgiler doğrultusunda 0,00789 ml GDF (Riva Star SDI Dental Limited) 0,9921 ml E'MEM karıştırılıp 3 mg/ml'lik bir solüsyon elde edilmiştir. Elde edilen solüsyon 0,22 μm'lik bir şırınga filtresinden süzülmüştür. Ardından tüm materyaller 3,0; 1,5; 0,75; 0,375; 0,187; 0,1; 0,05; 0,005 mg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Resim 3.9'da pasive edilme prosedürünün aşamaları görülmektedir.

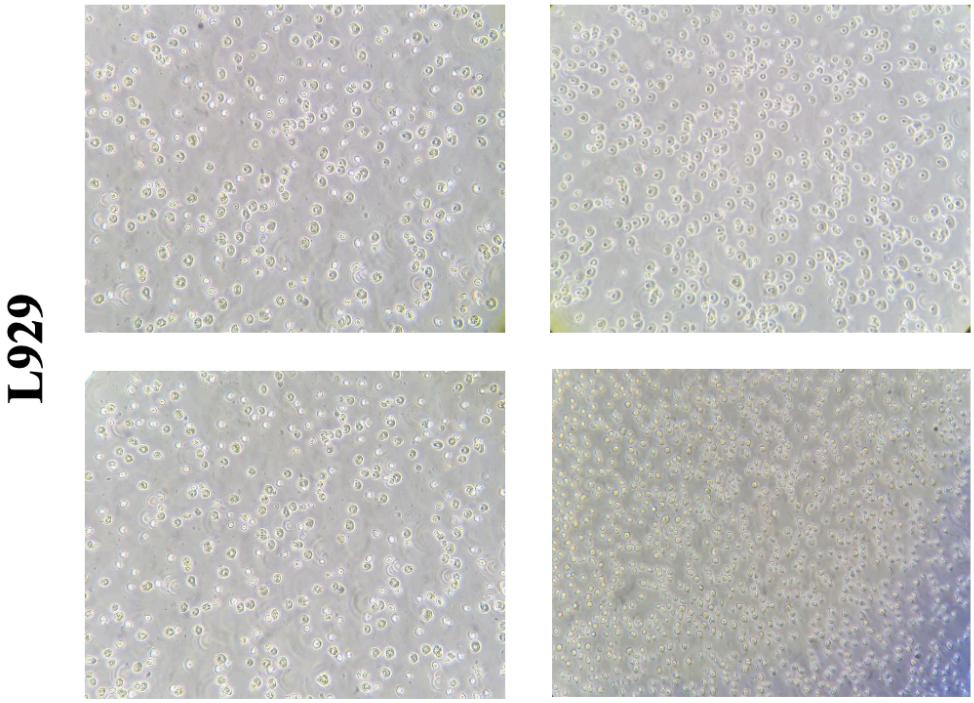


Resim 3.9: Pasive edilme prosedürü

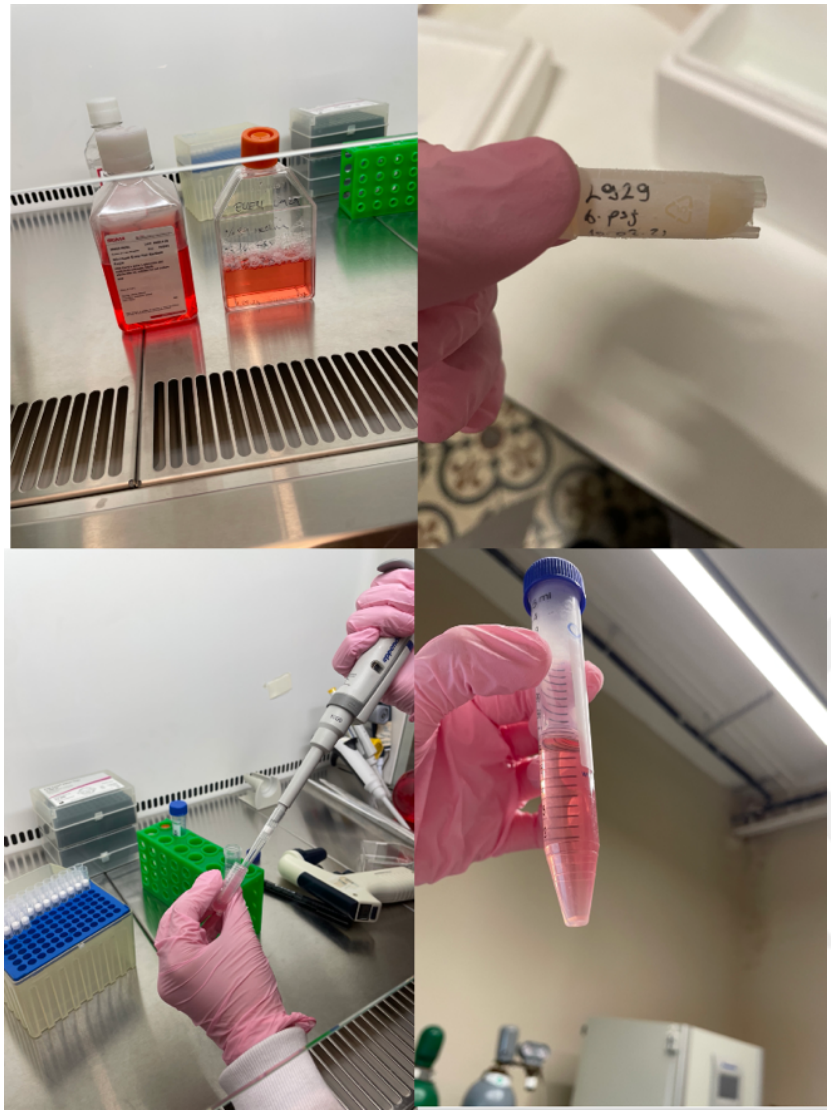
3.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Ticari olarak temin edilen fare fibroblast hücre hattı L929 (American Type Culture Collection®, CCL-1™), %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren E'MEM 37°C'de %5 CO_2 ortamında inkübe edilerek kültüre edilmiştir. Hücreler Resim 3.10'da görülmektedir. Bu hücreler, büyütülüp çoğaltılarak depolanmıştır. Hücre kültürü prosedürü sırasında çekilen fotoğraflar Resim 3.11'de görülmektedir. Hücre hattına, GDF, 45S5 ve S53P'in 0,005 – 3 mg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonları dört tekrar

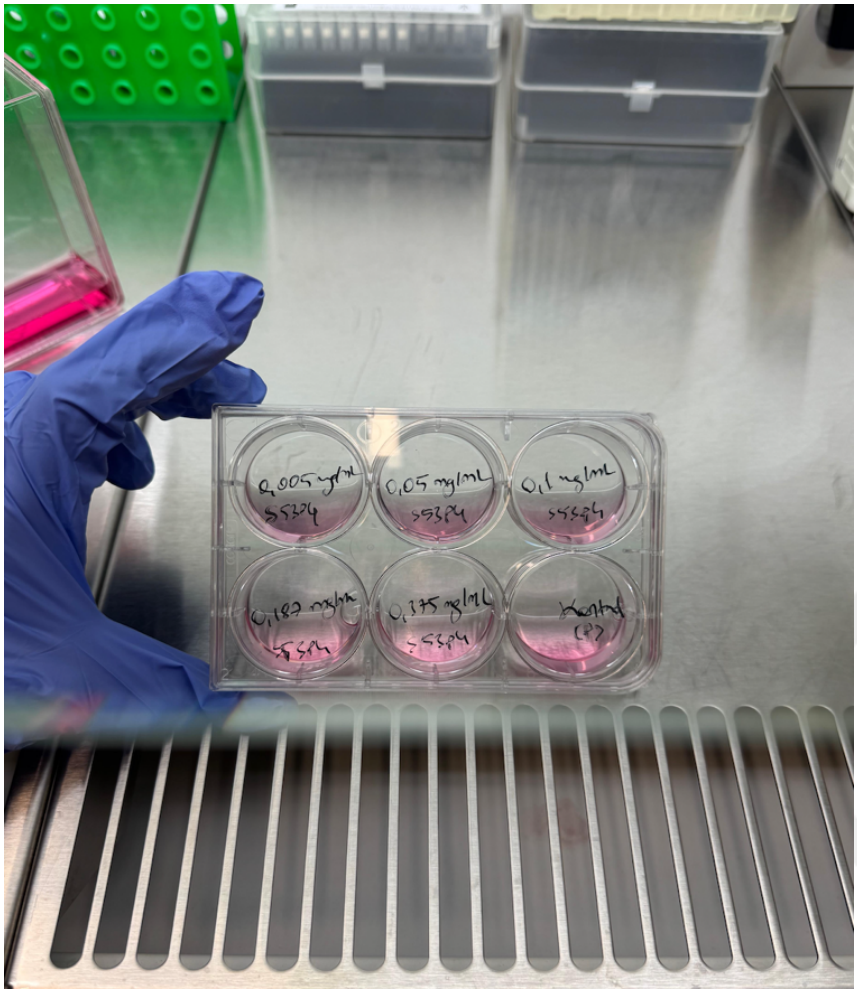
olarak ve 24 saat süreyle uygulanmıştır. Seyreltilmiş materyaller hücre kültürüne direkt temas yöntemi ile uygulanmıştır. Resim 3.12, Resim 3.13 ve Resim 3.14 materyallerin hücre kültürüne nasıl uygulandığı gösterilmektedir.



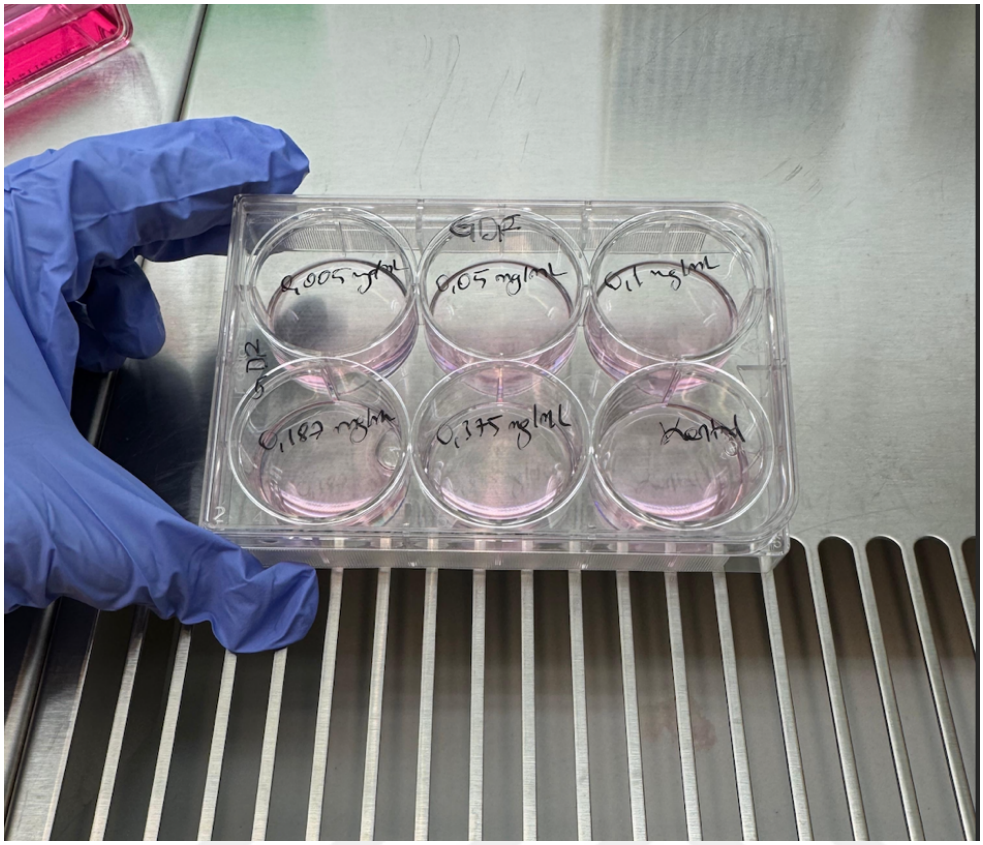
Resim 3.10: L929 fare fibroblast hücreleri



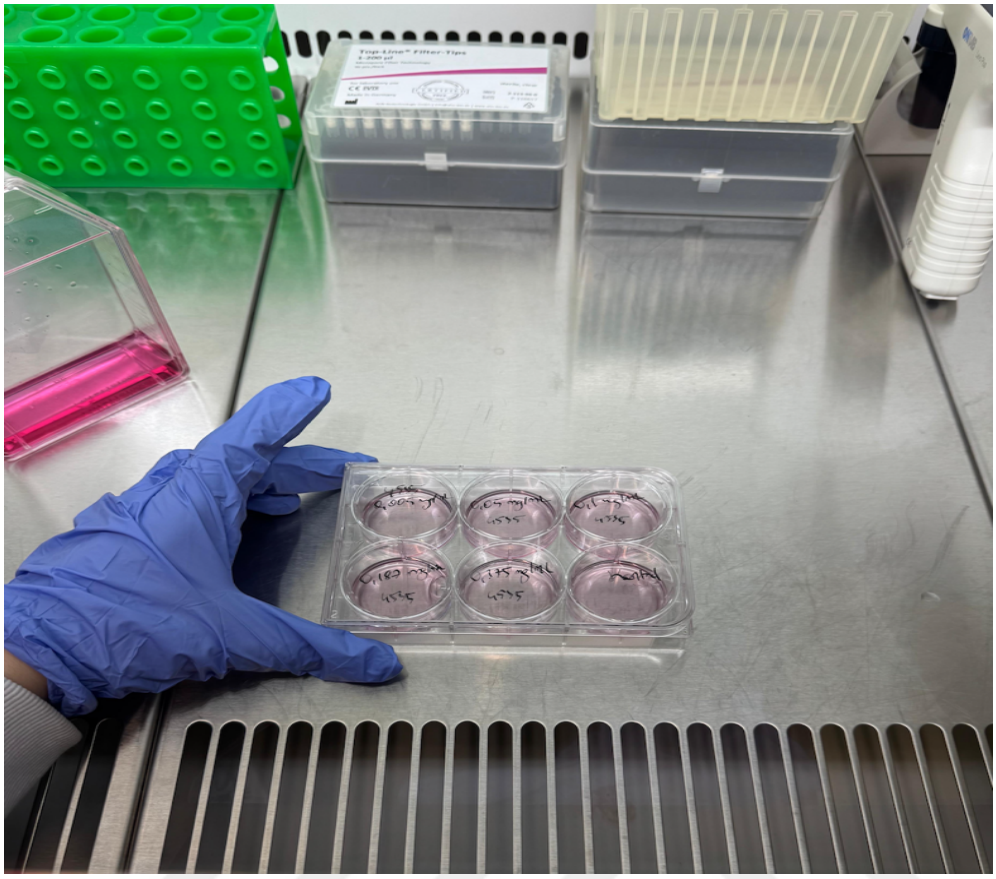
Resim 3.11: Hücre kültürü prosedürü



Resim 3.12: S53P4'ün IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması



Resim 3.13: Gümüş Diamin Florür'ün IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması



Resim 3.14: 45S5'in IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarının hücre kültürü bulunan kuyucuklara uygulanması

3.5. SİTOTOKSİSİTE TESTİ

Sitotoksisitenin belirlenmesi amacıyla L929 hücreleri, 96 kuyucuklu beyaz opak plakalara $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. GDF, 45S5 ve S53P'in 0,005 – 3 mg/ml aralığındaki konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi, ATP kiti kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca bu ajanlarla işlem gördükten sonra ATP çözeltisi eklenmiş ve çok modlu bir plaka okuyucu ile ölçümler yapılmıştır. Kontrol grubu olarak %0,1 DMSO kullanılmıştır. Kontrol hücrelerinin canlılık oranı %100 kabul edilerek, diğer grupların canlılık yüzdeleri kontrolle karşılaştırılmıştır. Yarı maksimum büyüme İnhibitör Konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri hesaplanmış ve sonraki tüm deneyler IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarla dört tekrar olarak yapılmıştır (203).

3.6. APOPTOZ TAYİNİ

Her üç materyalin de apoptotik etkileri akridin turuncusu/etidyum bromür boyası kullanılarak analiz edilmiştir. Bunun için 6 kuyucuklu plakalara $1,5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde L929 hücreleri ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat beklenmiştir. Sonrasında hücreler 37°C'de 24 saat boyunca IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarla inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından medyum çekilmiş, hücreler %0,025'lik tripsin ve EDTA ile kaldırılmış ve +4°C'de 500xg'de 5 dakika santrifüj edilerek 1xdPBS ile yıkanmıştır. Hücre peletleri, lamlar üzerinde 1:1 oranında akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile boyanarak floresans mikroskop (Nicon Eclipse Ts2, Tokyo) ile görüntülenmiştir (204). Rastgele alınan mikroskop görüntülerinde en az 100 hücre sayılmıştır. Deneyler dört tekrar olarak yapılmıştır.

3.7. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

Hücrelerin ALP enzim aktivitesi, ticari olarak temin edilen ELISA kitleri (ALP Activity Assay Kit E-BC-K091-M, Elabscience) kullanılarak fotometrik yöntemle analiz edilmiştir. Her kuyucuğa $1,5x10^5$ L929 hücresi ekilip, hücrelerin yapışması için 24 saat beklenmiş ve ardından hücreler GDF, 45S5 ve S53P'nin IC_{50} değerinin altındaki konsantrasyonlarıyla 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 14 gün sonra absorbans ölçümleri, 450 nm'de mikroplaka okuyucusu (Multi-mode reader, BioTek Instruments, ABD) ile yapılmıştır (205).

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmadaki nicel değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Varyans homojenliği Levene testi ile incelenmiştir. Grupların ortalama karşılaştırmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) veya Brown Forsythe testleri kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise LSD, Dunnett ve Dunnett's T3 testleri kullanılmıştır. Nicel değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson korelasyon analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 alınmıştır. Hesaplamalarda SPSS (version 24, Armonk, NY IBM Corp.) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİSİTEYE AİT BULGULAR

Hücreler ekilip 24 saat boyunca 0,005 – 3 mg/ml'lik 45S5, S53P4 ve GDF ile muamele edildikten sonra ATP kiti kullanılarak yapılan canlılık ölçümleri Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 gösterilmektedir. Yapılan analiz sonucunda her üç grupta da konsantrasyon arttıkça canlılığın azaldığı görülmüştür. 45S5, S53P4 ve GDF gruplarının kendi içerisinde farklı dozlardaki canlılık farklarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p < 0,001$) görülmüştür. Üç grupta sitotoksik etki doza bağlı bir olduğu, en yüksek canlılığın kontrol grubunda en düşük canlılığın ise 3 mg/ml'lik konsantrasyonda olduğu sonucuna erişilmiştir.

Tablo 4.1: Gümüş Diamin Florür'ün konsantrasyonlara göre canlılık oranları

Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Ortalama Canlılık**	**p**
GDF	0 mg/ml	100±0	<0,001
	0,005 mg/ml	88,36±4,81	
	0,05 mg/ml	66,94±8,53	
	0,1 mg/ml	47,39±4,19	
	0,187 mg/ml	41,87±2,26	
	0,375 mg/ml	32,97±4,25	
	0,750 mg/ml	23,84±4,29	
	1,5 mg/ml	14,58±2,25	
	3 mg/ml	9,88±2,67	

Tablo 4.2: 45S5'in konsantrasyonlara göre canlılık oranları

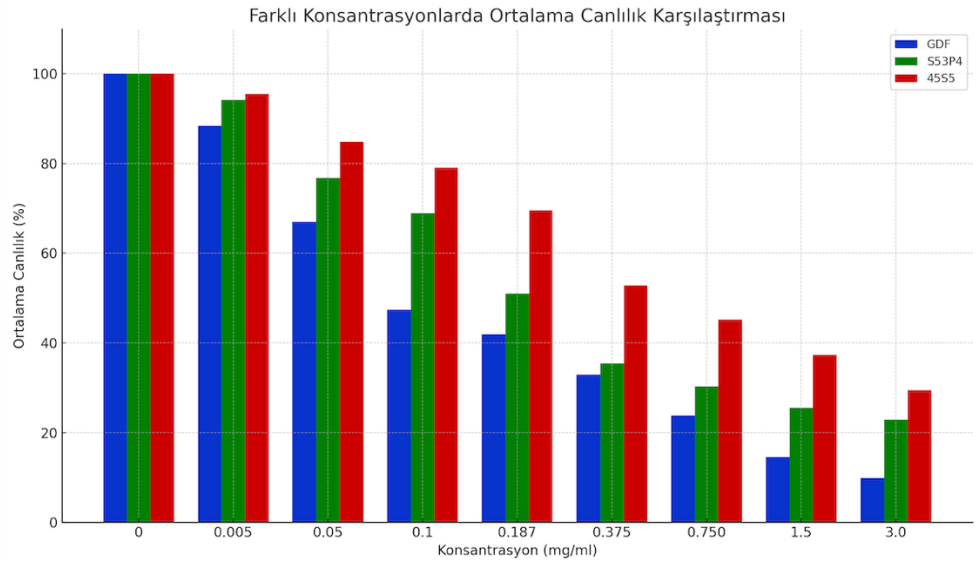
Gruplar	Konsantrasyonlar	Ortalama Canlılık	p
45S5	0 mg/ml	100,00±0	<0,001
	0,005 mg/ml	95,55±2,39	
	0,05 mg/ml	84,77±2,36	
	0,1 mg/ml	79,09±2,66	
	0,187 mg/ml	69,54±3,23	
	0,375 mg/ml	52,76±2,46	
	0,750 mg/ml	45,25±2,38	
	1,5 mg/ml	37,36±4,24	
	3 mg/ml	29,45±4,24	

Tablo 4.3: S53P4'ün konsantrasyonlara göre canlılık oranları

Gruplar	Konsantrasyonlar	Ortalama Canlılık	p
S53P4	0 mg/ml	100±0	<0,001
	0,005 mg/ml	94,13±2,47	
	0,05 mg/ml	76,75±4,37	
	0,1 mg/ml	68,94±7,56	
	0,187 mg/ml	50,93±8,30	
	0,375 mg/ml	35,46±2,31	
	0,750 mg/ml	30,31±4,79	
	1,5 mg/ml	25,56±2,68	
	3 mg/ml	22,86±3,63	

Yapılan ANOVA testi sonrasında 45S5**,** S53P ve GDF materyalleri için farklı doz gruplarının kontrol dozu ile yapılan post-hoc analizi gerçekleştirilmiştir. 45S5 grubunda 0,005 mg/ml'lik konsantrasyondaki canlılığının kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı **(**p=0,201) sonucuna ulaşılırken diğer bütün konsantrasyonlardaki canlılığın istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol grubundan düşük olduğu (p=0,000) tespit edilmiştir. S53P4 grubunda da benzer şekilde 0,005 mg/ml'lik konsantrasyondaki canlılığının kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı **(**p=0,388**)** ancak diğer bütün konsantrasyonlardaki canlılığın istatistiksel olarak anlamlı derecede kontrol grubundan düşük olduğu (p=0,000) tespit edilmiştir. GDF grubunda ise 0,005 mg/ml'lik konsantrasyon (p=0,005) dahil tüm dozlardaki canlılığın (p=0,000) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür.

Tüm gruplar için yapılan 3'lü analiz sonuçlarına göre tüm doz gruplarında canlılığı en yüksek grup 45S5, en düşük olduğu grubun ise GDF grubu olduğu analiz edilmiştir. Tüm doz gruplarındaki materyaller arası canlılık ortalamasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Şekil 4.1'de üç materyalin de 3'lü karşılaştırmalı analiz grafiği görülmektedir.



Şekil 4.1: 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür'ün 3'lü karşılaştırmalı analiz grafiği

Tüm materyallerin her bir dozunun ikili olarak karşılaştırıldığı post hoc analizinde; 45S5 ve S53P4 gruplarının canlılık oranları arasında 0,005 mg/ml (p=0,572)

ve 0,05 mg/ml (p=0,078) dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, diğer tüm dozlarda 45S5 grubunun canlılığı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05). 45S5 ve GDF gruplarının canlılık oranları ikili olarak kıyaslandığında tüm doz gruplarında 45S5 grubunun canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). S53P4 ve GDF gruplarının canlılık oranlarının ikili karşılaştırılmasında yalnızca 0,375 mg/ml dozunda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı (p=0,291), diğer bütün dozlarda S53P4 grubunun hücre canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek (p<0,05) olduğu görülmüştür.

4.2. APOPTOTİK AKTİVİTEYE İLİŞKİN BULGULAR

Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da hücreler ekildikten ve 24 saat boyunca IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlarla inkübe edildikten sonra kontrol, 45S5, S53P4 ve GDF gruplarına ait yapılan akridin turuncusu/etidyum bromür boyama ile floresans mikroskop kullanılarak yapılan değerlendirme sonucu elde edilen ortalama apoptotik hücre değerleri görülmektedir. Üç grupta da uygulanan dozlar arttıkça apoptozda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (p<0,001). Her bir materyalin apoptotik etkilerine bakıldığında apoptotik hücre oranlarının en yüksek olduğu ve doza bağlı olarak en hızlı apoptotik artışın gerçekleştiği grubun GDF olduğu görülmektedir. Resim 4.1, Resim 4.2 ve Resim 4.3'te hücre kültüründe 24 saat boyunca sırasıyla 0,375 mg/ml GDF, 45S5 ve S53P4 uygulanmış ve akridin turuncusu/etidyum bromür ile boyanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüleri mevcuttur.

Tablo 4.4: Gümüş Diamin Florür'ün dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları

Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**P**
GDF	0 mg/ml	2,97±0,09	<0,001
	0,005 mg/ml	28,57±0,58	
	0,05 mg/ml	35,09±1,17	
	0,1 mg/ml	35,25±0,41	

Tablo 4.4 (devam)

	0,187 mg/ml	47,53±1,33	
	0,375 mg/ml	50,59±1,75	

Tablo 4.5: 45S5 grubunun dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları

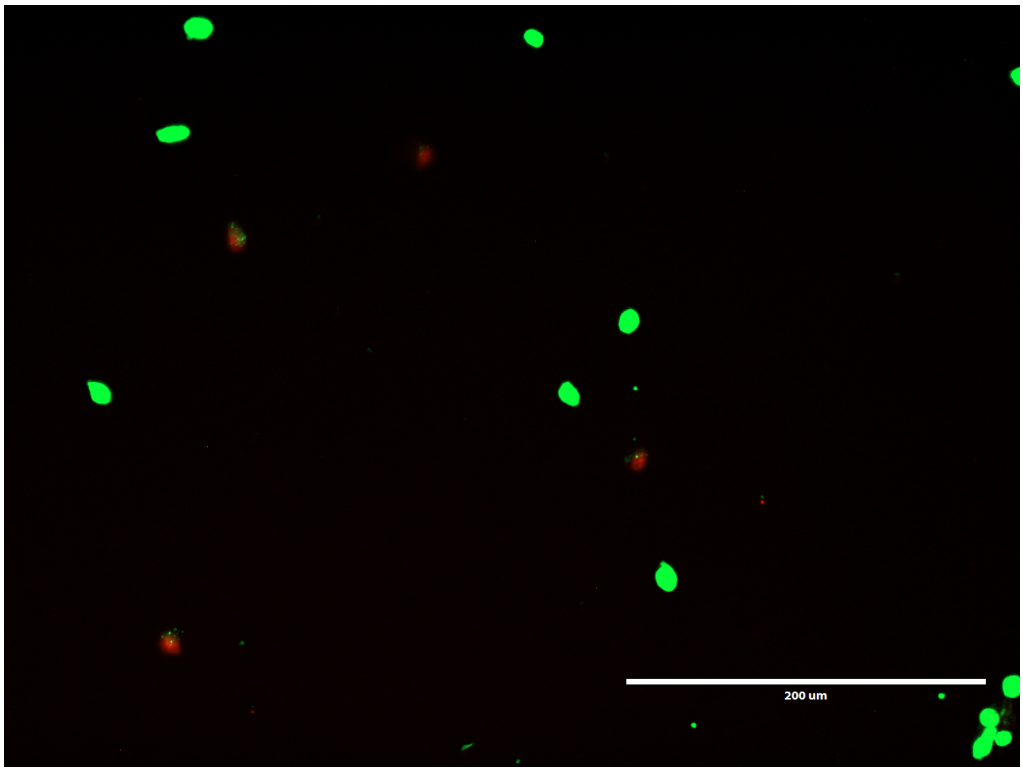
Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**p**
45S5	0 mg/ml	2,31±0,11	<0,001
	0,005 mg/ml	22,69±1,26	
	0,05 mg/ml	24,49±0,43	
	0,1 mg/ml	34,20±0,90	
	0,187 mg/ml	40,55±0,96	
	0,375 mg/ml	42,92±1,94	

Tablo 4.6: S53P4 grubunun dozlara göre apoptotik hücre ortalamaları

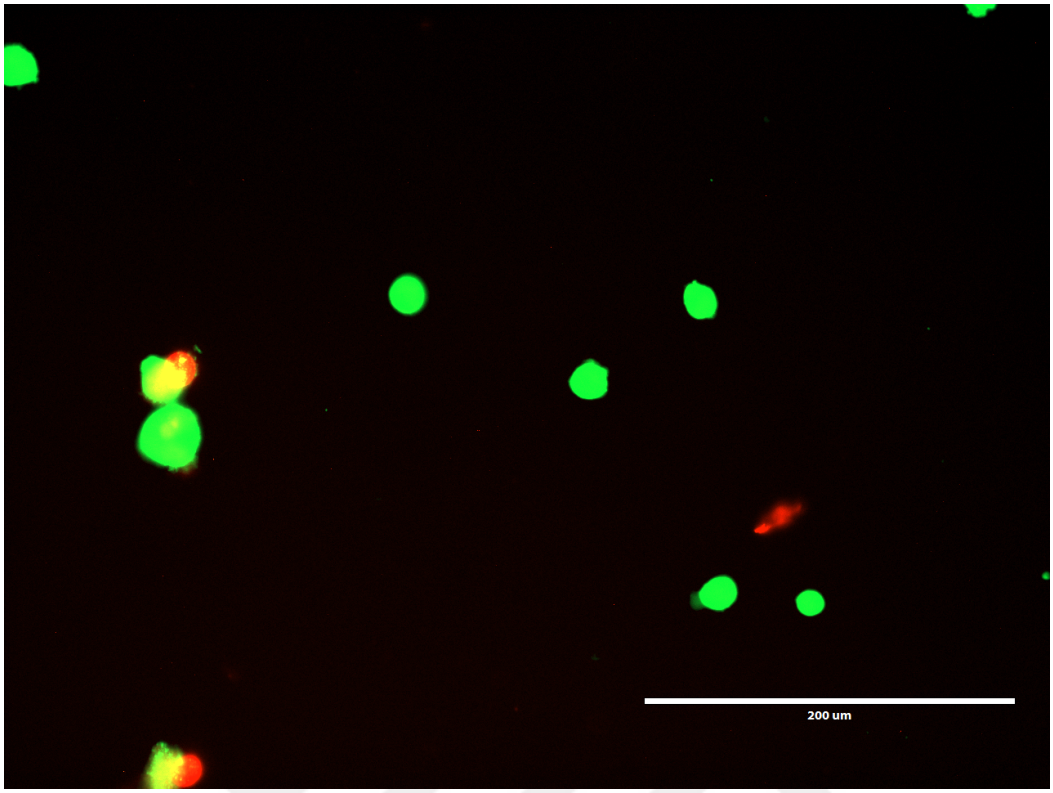
Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**p**
S53P4	0 mg/ml	2,72±0,08	<0,001
	0,005 mg/ml	27,15±0,20	
	0,05 mg/ml	32,47±0,07	
	0,1 mg/ml	34,05±0,14	
	0,187 mg/ml	34,05±0,14	

Tablo 4. 6 (devam)

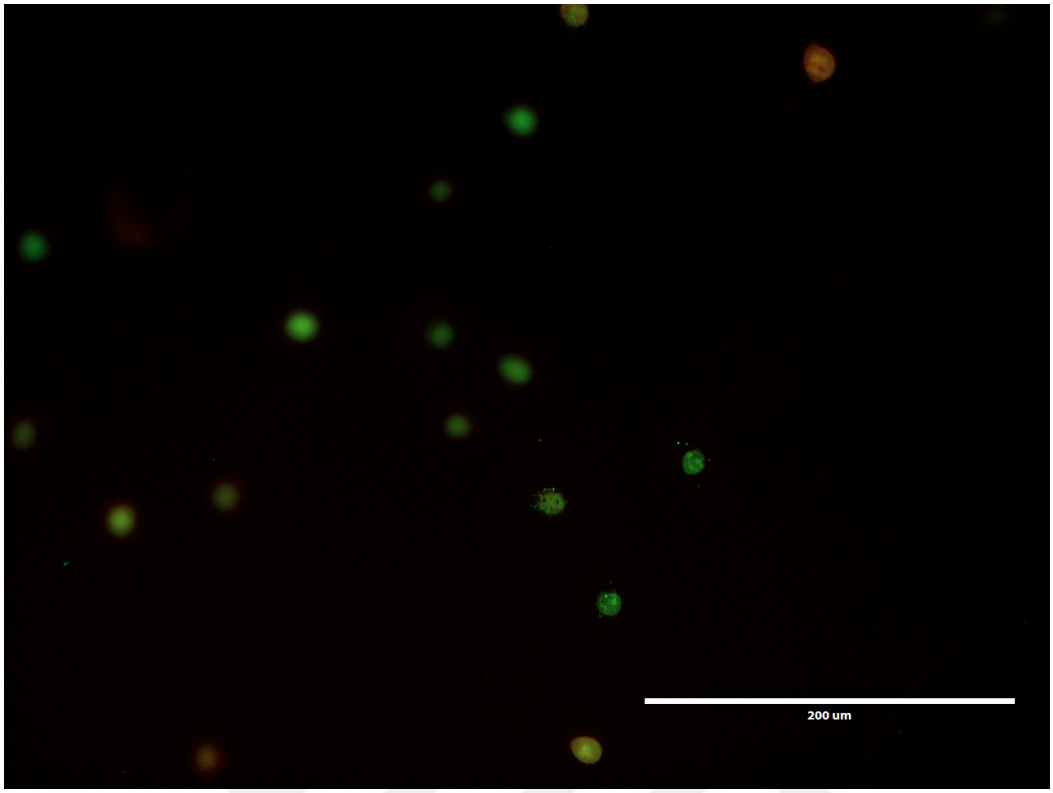
	0,375 mg/ml	46,37±1,18	



Resim 4.1: 24 saat 0,375 mg/ml Gümüş Diamin Florür uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü



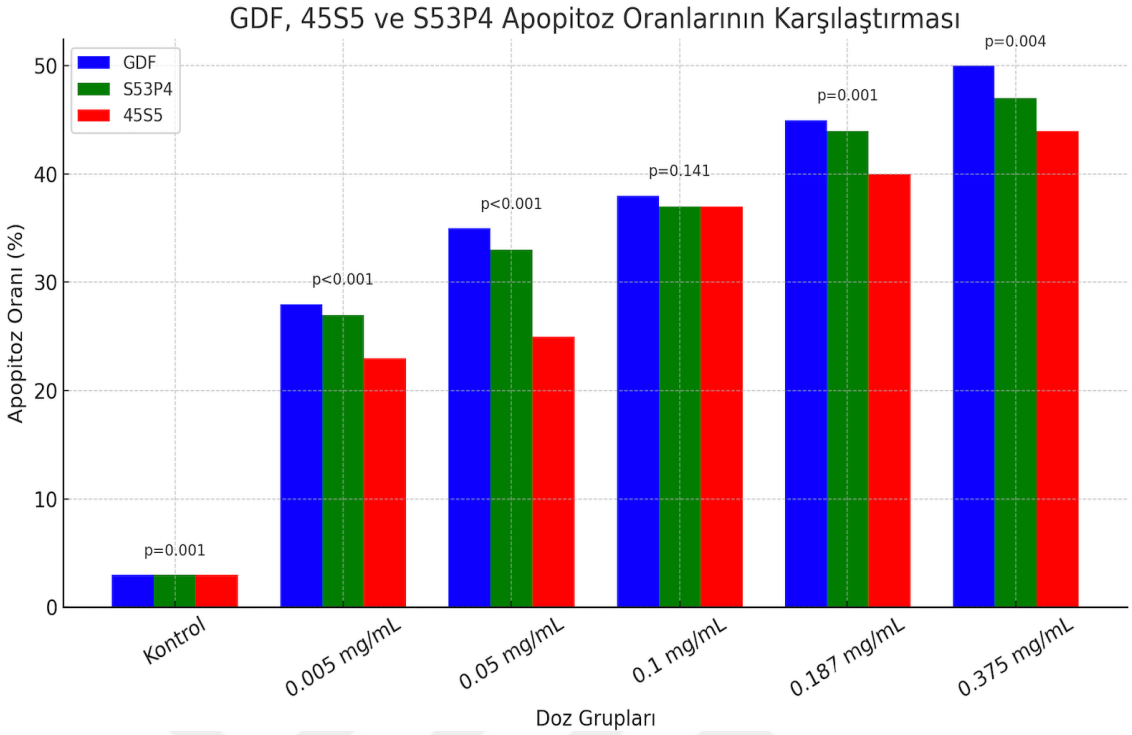
Resim 4.2: 24 saat 0,375 mg/ml 45S5 uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü



Resim 4.3: 0,375 mg/ml S53P4 uygulanmış hücrelerin floresans mikroskop altındaki görüntüsü

Yapılan post hoc analizleri ile GDF, 45S5 ve S53P4 materyallerinin tüm doz gruplarındaki apoptoz oranları, kontrol grubu ile ikili olarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile yapılan ikili karşılaştırmalarda tüm materyallerin bütün konsantrasyonlarındaki apoptoz oranının kontrol grubundaki apoptoz oranından istatistiksel olarak anlamlı olacak derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$).

Post hoc analizleri ile 45S5, S53P4 ve GDF gruplarının her bir konsantrasyonundaki apoptotik hücre oranlarının 3'lü olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda tüm konsantrasyonlarda en yüksek apoptoz oranının GDF grubunda olduğu, en düşük oranın ise 45S5 grubunda olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 0,1 mg/ml'lik konsantrasyon grubu ($p=0,141$) dışındaki tüm konsantrasyonlarda GDF, 45S5 ve S53P4 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulunmuştur. Şekil 4.2'de 3 materyalin de her bir doz grubunda apoptoz oranları görülmektedir.



Şekil 4.2: Farklı doz gruplarında 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür ortalama apoptoz oranları

Her bir doz grubunun kendi içerisinde materyallerin apoptotik etkisi ikili olarak karşılaştırılmıştır. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu 45S5 ve S53P4 gruplarında 0,1 mg/ml'lik konsantrasyon hariç (p=0,123) tüm doz gruplarındaki apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlı ve 45S5 grubunda daha düşük olarak bulunmuştur. GDF ve 45S5 grupları arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda da benzer şekilde sadece 0,1 mg/ml'lik konsantrasyondaki apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamsız (p=0,069) bulunmuş olup diğer tüm gruplarda 45S5 grubunun apoptoz oranı anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. GDF S53P4 gruplarının ikili karşılaştırma analizinde ise 0,005 mg/ml (p=0,076), 0,1 mg/ml (p=0,686) ve 0,187 mg/ml'lik (p=0,109) doz gruplarınının arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamsız diğer doz gruplarında ise S53P4 grubunda anlamlı derecede apoptotik oranın daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4.3. ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİ TAYİNİNE AİT BULGULAR

Yapılan ANOVA testine göre Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da 45S5, S53P4 ve GDF'nin doz gruplarına göre ortalama, standart sapma ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri görülmektedir. 45S5 grubunda doz arttıkça ALP enzim aktivitesinde artış

olduğu görülmüştür. Yine bu grupta standart sapma değerlerinin nispeten düşük ve istikrarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. S53P4 grubunda da doz arttıkça ALP enzim aktivitesinin arttığı ancak bu artışın 45S5 grubuna göre daha düşük seviyelerde kaldığı görülmüştür. Doz arttıkça GDF grubunda düzenli olarak ALP enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Doz grupları arasında her üç materyalde de ALP ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Bu farklar 45S5 için p<0,001, GDF için p<0,001 ve S53P4 için p=0,001 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.7: Gümüş Diamin Florür grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri

Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**P**
GDF	0 mg/ml	35,18±2,5	<0,001
	0,005 mg/ml	34,23±2,79	
	0,05 mg/ml	32,07±1,14	
	0,1 mg/ml	28,25±2,86	
	0,187 mg/ml	23,60±2,89	
	0,375 mg/ml	20,87±1,49	

Tablo 4.8: 45S5 grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri

Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**P**
45S5	0 mg/ml	35,18±2,54	<0,001
	0,005 mg/ml	38,48±1,84	
	0,05 mg/ml	40,82±1,60	
	0,1 mg/ml	44,50±2,47	
	0,187 mg/ml	46,35±3,64	
	0,375 mg/ml	50,87±1,49	

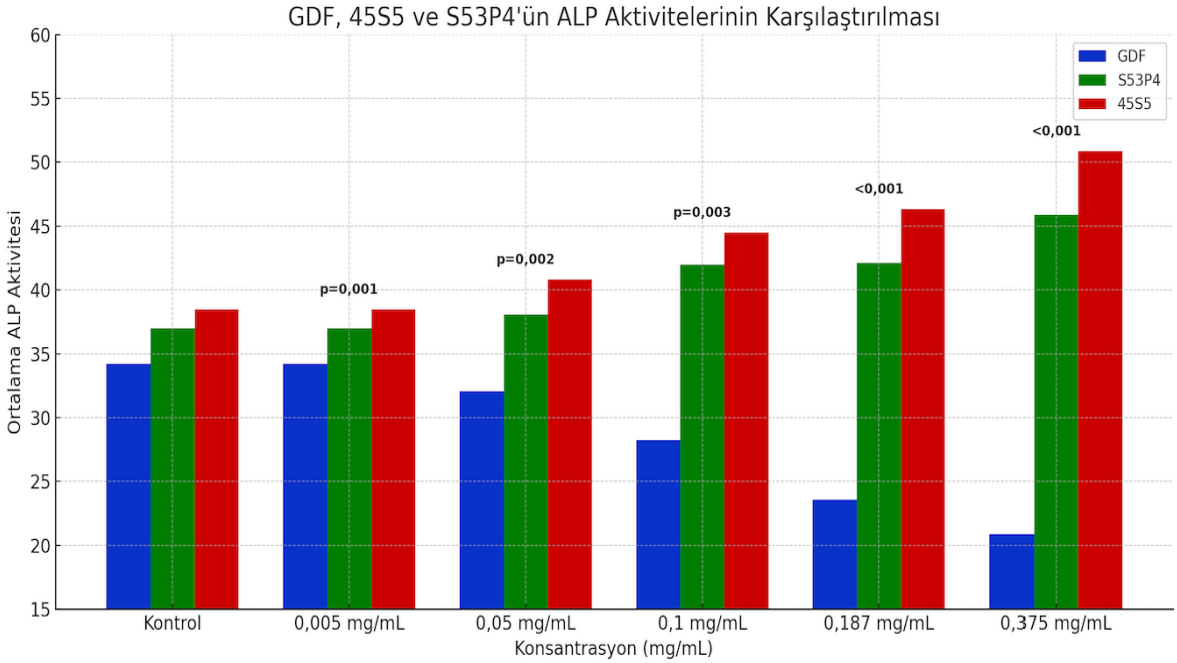
Tablo 4.9: 45S5 grubunda konsantrasyonlara bağlı olarak değişen Alkalen Fosfataz enzim seviyeleri

Gruplar	**Konsantrasyonlar**	**Sonuçlar**	**p**
S53P4	0 mg/ml	35,18±2,54	=0,001
	0,005 mg/ml	36,98±1,56	
	0,05 mg/ml	38,07±3,98	
	0,1 mg/ml	42,00±1,41	
	0,187 mg/ml	42,10±1,91	
	0,375 mg/ml	45,87±4,61	

Post hoc testleriyle 45S5, S53P4 ve GDF'nin farklı dozlarının kontrol grubu ile ikili karşılaştırılması yapılmıştır. 45S5 grubunda 0,005 mg/ml grubunun ALP enzim aktivitesi ile kontrol grubunun ALP enzim aktivitesi arasındaki fark anlamlı bulunmazken ($p = 0,223$), diğer tüm dozlardaki ALP seviyesinin kontrol dozundan anlamlı olarak yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. S53P4 grubunda 0,005 mg/ml ve 0,05 mg/ml gruplarındaki ALP aktivitesiyle kontrol grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

fark bulunamamıştır (p = 0,853 ve p = 0,513). Bunun yanı sıra 0,1; 0,187 ve 0,375 mg/ml gruplarının ALP seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde GDF grubunda da 0,005 mg/ml ve 0,05 mg/ml gruplarındaki aktiviteyle kontrol grubuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p = 0,970 ve p = 0,272). Bununla birlikte 0,1; 0,187 ve 0,375 mg/ml gruplarının ALP seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür.

Her bir doz grubu için her üç materyalin (45S5, S53P4, GDF) ortalama ALP seviyelerinin üçlü grup karşılaştırmaları yapılmıştır. Tüm doz gruplarında ortalama ALP seviyesi en yüksek grup 45S5, en düşük grup ise GDF grubu olarak bulundu. 0,005 mg/ml grubunda ortalama ALP değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamış (p = 0,05), diğer tüm doz gruplarında bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Şekil 4.3'te bütün materyallerin tüm doz gruplarındaki ALP aktivitelerinin karşılaştırılması görülmektedir.



Şekil 4.3: Her bir doz için 45S5, S53P4 ve Gümüş Diamin Florür gruplarının üçlü karşılaştırılması

Bütün doz grupları arasında ve farklı materyallerle ikili grup karşılaştırmaları post hoc analizi ile yapılmıştır. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu 45S5 ve S53P4

gruplarının ALP seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. 45S5 ve S53P4 gruplarının ikili karşılaştırmalar sonucu ALP değerleri arasındaki p değerleri 0,005 mg/ml için p = 0,346; 0,05 mg/ml için p = 0,553; 0,1 mg/ml için p = 0,164; 0,187 mg/ml için p = 0,068 ve 0,375 mg/ml için p = 0,262 olarak bulunmuştur. 45S5 ve GDF gruplarındaki ALP seviyesinin ise tüm konsantrasyonlar için 45S5 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir ($p < 0,05$). S53P4 ve GDF gruplarının ALP seviyelerinin ise 0,1 mg/ml (p=0,00), 0,187 mg/ml (p=0,00), 0,375 mg/ml'lik (p=0,002) konsantrasyonlarda, S53P4 grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

5. TARTIŞMA

Diş çürüğü; prevalansı oldukça yüksek, küresel olarak bütün dünyayı etkileyen ve gerek toplum gerek de bireyler üzerinde ciddi etkilere sahip bir salgın hastalıktır. Bu özelliklerinden dolayı bir pandemi olarak kabul edilmektedir (206). Beslenme, flor alımı ve geleneksel tedaviler ile çürük süreci yönetilmeye çalışılmaktadır ancak tedaviye erişimin mümkün olamadığı toplumlarda ciddi sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2005 yılındaki verilerine göre okul çağındaki çocuklardaki çürük prevalansının yaklaşık olarak %60-90 olduğu bildirilmiştir (207).

Beslenme ile alınan karbonhidratların bakteriler tarafından fermente edilmesiyle diş sert dokularında lokalize olarak oluşan doku yıkımı sonucu diş çürükleri meydana gelmektedir (208). Diş çürüğü; biyofilm tabakası içerisindeki kompleks mikrobiyolojik etkileşimlerle başlayan, tükürük akış hızı ve içeriği, flor maruziyeti, beslenme ile tüketilen karbonhidrat miktarı ve oral hijyen alışkanlıkları gibi pek çok farklı parametreden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalık başlangıç aşamasında ise meydana gelen doku hasarı ve demineralizasyonun geri dönüşümü mümkünken kavitasyon oluşumunun gerçekleştiği ileri aşamalarda dahi uygun koşullar altında çürüğün ilerleyişi durdurulabilmektedir. Diş çürükleri öncelikle beyaz nokta lezyonları olarak başlamaktadırlar. Lezyondaki mineral kaybı mine dokusu ile sınırlı olduğu ve erken evrelerde mine dokusu bütünlüğünü koruduğu için beyaz nokta lezyonlarının tedavi edilebildiği bildirilmiştir (14).

Diş çürüklerinin tedavisi denildiğinde 20. yüzyılın başlarından itibaren esas olarak yapılabilecek restoratif tedaviler akıllara gelmekteydi. Dental restorasyonlar sayesinde dişlerin ağız içerisindeki ömürleri uzamış olsa da bu yaklaşım çürük oluşumunu ve ilerleme hızını düşürememiştir. Ağız içerisindeki dental restorasyonların belirli ömürlerinin olduğu ve çürük oluşumuna yol açan faktörler ortadan kaldırılmadığı sürece yeni restorasyonlara ihtiyaç duyulacağı unutulmamalıdır (209). Bu sebeple son 50 yıldır koruyucu önleyici bir bakış açısıyla diş çürüğü süreci yönetilmeye başlanmıştır ve biyofilm tabakasının kontrol altına alınması, remineralizayon tedavileri gibi koruyucu yaklaşımlarla erken çürük lezyonlarının önlenmesi hedeflenmiştir (210).

Remineralizasyon, demineralizasyon sırasında diş yapısından kaybedilen özellikle de kalsiyum ve fosfat iyonlarının çürük lezyonuna yeniden kazandırılması olarak tanımlanmaktadır. Remineralizasyon süreci doğal olarak gerçekleşebildiği gibi çeşitli tedaviler ve ajanlarla da indüklenebilmektedir. Henüz kavite oluşumu gerçekleşmemiş başlangıç düzeyindeki bir çürük lezyonunda remineralizasyon tedavileri ile çürüğün ilerleyişini durdurmak ve oluşan mineral kaybını tersine çevirmek hedeflenmektedir. Bir remineralizasyon tedavisinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi birçok faktöre bağlıdır. Öncelikle beslenme ve oral hijyen alışkanlıkları gözden geçirilmelidir. Remineralizasyon sürecinin desteklenebilmesi için hastanın basit karbonhidrat tüketiminin azaltılıp, etkin bir şekilde diş fırçalama alışkanlığı kazanması gerekmektedir. Bir diğer önemli nokta ise ağız ortamının pH'ın dengelenip nötral bir düzeye gelmesi sağlanmalı ve diş yüzeyi mineralizasyon için gerekli olan kalsiyum ve fosfat iyonlarına süpersatüre bir duruma gelmelidir (49).

Remineralizasyon kapasitesi bakımından diğer remineralizasyon sistemleriyle kıyaslandığında florür altın standart olarak kabul edilmektedir (211). Florürün diş çürüklerinin durdurulmasında etkili bir ajan olduğu ve doza bağlı olarak etkisinin arttığı yapılan çalışmalar sayesinde görülmüştür (212–214). Profesyonel olarak uygulanan jel ve verniklerin yanında florür, diş macunları ve gargaraların içerisinde de bulunmaktadır. Florürün remineralizasyonu sağladığı, demineralizasyonu engellediği ve antimikrobiyal özellikte olduğu bilinmektedir (215). Yapılan *in vitro* çalışmalarda plaktaki florür seviyesinin *S. mutans*'ın asit üretimi ve glukan sentezi gibi kritik virülans faktörlerini etkilediği görülmüş, buradan yola çıkarak florürün antimikrobiyal etkinliğinin çürük önleyici etkisi ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür (216,217). Antimikrobiyal etkinliğini arttırmak için florür gümüş, kalay gibi çeşitli metallerle kombine edilerek de kullanılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen materyallerden biri olan GDF son yıllarda popülerliğini tekrar kazanmıştır (218).

Diş çürüklerinin noninvaziv tedavilerinde kullanılan ajanlardan biri GDF'dir (219). Yüksek konsantrasyonda florür ve gümüş iyonları içermektedir (220). 50 yıldan daha uzun bir süredir diş hekimliğinde kullanılan bir materyaldir (221). GDF'nin diş çürüklerinin durdurulması amacı ile ilk olarak 1969 yılında Japonya'da uygulandığı bildirilmiştir (222). 2014 yılında GDF, FDA tarafından dentin hassasiyeti için

kullanılmak üzere onaylanmıştır (223). Amerikan Çocuk Diş Hekimliği Derneği (AAPD), GDF'nin diş çürüklerinin tedavileri için kullanımını önermiş, 2020 yılında Amerikan Diş Hekimliği Derneği (ADA), GDF'nin bu amaçla kullanımını desteklemiştir (224,225). GDF'nin diş çürüklerinin durdurulması konusundaki etkinliği, yapılan birçok klinik ve laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (76,86,226–229). Chu ve ark. okul öncesi çocuklarda yaptığı bir çalışmada 30 aylık takip sonunda GDF uygulamasının çürük aktivitesinin azaltılmasında NaF'ye göre daha başarılı olduğu görülmüştür (86). Tan ve ark. yaptığı bir çalışmada ise GDF, NaF ve klorheksidin verniğin yeni çürük oluşumunun azaltılmasındaki etkinliğinin plasebo gruba göre anlamlı decerede yüksek olduğu görülürken; GDF, NaF ve klorheksidin vernik gruplarının çürük oluşumunu önleyici etkileri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (228). Mei ve ark. insan dentininden oluşturdukları bloklar üzerinde yapay çürük modelleri oluşturarak yaptıkları başka bir çalışmada GDF'nin yüzey mikrosertliğini, Ca^{+2} ve F^{-} yüzdesini arttırdığı başka bir değişle demineralizasyonu azalttığı görülmüştür (76). Çürük lezyonları üzerideki etkinliği kanıtlanmış olmasında rağmen GDF'nin pulpa dentin kompleksi üzerindeki etkileri hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (230). Tersiyer dentin oluşumunu indükleyebilemesine rağmen içerisindeki yüksek konsantrasyondaki gümüş ve flor iyonlarının serbest kalmasıyla pulpada nasıl bir cevaba sebep olacağına dair GDF hakkında bir endişe bulunmaktadır. Pulpa üzerinde GDF'nin etkileri hakkında yapılmış çalışmalar mevcuttur (95,231,232). Ancak şimdiye kadar GDF ile pulpa arasındaki etkileşimi tam olarak açıklayacak bir çalışma yapılamamıştır. Çürük kontrolündeki etkinliğinden dolayı çeşitli seviyelerdeki diş çürüklerinin durudurabilmesi için GDF kullanılmaktadır. Hu ve ark. *in vitro* ortamda yaptıkları bir çalışmada GDF'nin 1 mm ve daha az kalınlıktaki dentin dokusunu penetre edebildiği ve dental pulpa hücrelerinin ölümüne neden olabildiği bildirilmiş olup, özellikle orta dereceli veya pulpaya çok yakın çürüklerin tedavisinde kullanımı konusunda endişeler doğmuştur (232). GDF'nin pulpa dentin kompleksi üzerindeki etkileri hakkında daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple bu çalışmada GDF'nin hücreler üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

Florür sayesinde erken çürük lezyonları remineralize edilebilse de bu etkinin en çok lezyon yüzeyinde gerçekleştiği, lezyon gövdesinde yeterli remineralizasyonun sağlanamadığı bildirilmiştir (233). Bu durum minenin en dış tabakasının çok hızlı bir şekilde remineralize olmasıyla, gözenekli yapının tamamen remineralize olup

tıkanması sonucu iyon geçişinin engellenmesinden kaynaklanmaktadır (234). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda florürden daha iyi remineralizayon yeteneğine sahip olup, daha az toksik etkiler gösteren veya sinerjistik olarak florürün etkinliğini arttırıp kullanılacak flor dozunu azaltabilen yeni remineralizasyon ajanları için arayış devam etmektedir. Bu arayışta göze çarpan materyallerin başında biyoaktif camlar gelmektedir.

Biyoaktif camlar ortopediden diş hekimliğine çok geniş klinik kullanım alanlarına sahip bir biyomateryal grubudur. Biyouyumluluklarının yüksek olduğu ve antimikrobiyal özellikler sergiledikleri bildirilmiştir (114). Bir materyalin biyoaktif bir materyal olarak sınıflandırılabilmesi için spesifik olarak bazı biyolojik olayları aktive etmesi ve konak dokusuna bağlanarak olumlu bir yanıt için konağı teşvik edebilmesi beklenmektedir (111). Diş hekimliği alanında biyoaktivite, klinik kullanım alanına göre farklı şekillerde tanımlanabilir. Örneğin, mine ve dentin yüzeyinde hidroksiapatit oluşturma yeteneği ile hücrelerden biyolojik olarak aktif madde ve substratların salınması, biyoaktivite kapsamına giren özelliklerdendir. Biyoaktif camların, vücut sıvılarına maruz kaldıklarında çözündüğü, kendi yüzeylerinde hidroksiapatit kristallerinin oluşturduğu ve bu apatit kristaller sayesinde kemik ve diş dokusu ile kimyasal olarak bağ kurabildiği bilinmektedir (113). Bu yetenekleri biyoaktif camların, biyoaktif materyaller içerisinde yer almasını sağlamıştır.

Biyoaktif camlar dokuların biyolojik yapısını desteklediği, iyi bir iskele görevi gördüğü, antibakteriyel özellik gösterdiği için diş hekimliğinde farklı alanlarda kullanılmaktadır (118). 45S5 geliştirilmiş ilk biyoaktif cam türüdür. Bioglass olarak da geçmektedir (111). 45S5'in remineralizasyon kapasitesi hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Bakry ve ark. yaptıkları bir *in vitro* çalışmada 45S5 içerikli bir macun uygulanan mine yüzeyindeki yapay çürük lezyonlarının brushit kristalleri ile kaplandığı ve fırça aşındırma testinden etkilenmediği görülmüştür (235). 45S5 ve florürün karşılaştırıldığı bir *in vitro* çalışmada ise 45S5'in yüzey altı remineralizasyonunu florüre göre anlamlı derecede daha fazla arttırdığı görülmüştür (236). Florür uygulamalarının en büyük dezavantajlarından biri yüzeyaltı remineralizasyonun yeterince sağlanamamasıdır. Bu çalışma ile 45S5 kullanımı ile florürün bu dezavantajının ortadan kaldırılabileceği düşünülmüştür. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada GDF ile 45S5'in remineralize edici özellikleri kıyaslanmış, her iki

materyalinde anlamlı derecede remineralizasyonu arttırdığı görülmüş, 45S5 grubundaki remineralizasyonun GDF grubundan daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve daha büyük örneklem sayısı olan başka çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (237). 45S5'in erken çürük lezyonlarının remineralizasyonunda için başarılı olarak kullanılabilecek bir ürün olduğu görülmüş olup içerisinde 45S5 bulunan diş macunları, vernikler, profilaksi patları gibi ürünler günümüzde kullanılmaktadır. 45S5'in pulpa hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur (238,239). Benetti ve ark. 45S5, kalsiyum hidroksit ve biyoseramik esaslı bir kanal patı olan Bio-C Temp'in dental pulpa hücreleri üzerindeki etkilerini 7 ve 30. günlerdeki etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda 45S5'in diğer materyallere kıyasla daha yüksek bir biyouyumluluk sergilediği, kalsiyum birikimini desteklediği görülmüştür (239). Bakry ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada 45S5 materyalinin fare pulpa hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, 45S5'in pulpal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin minimal düzeyde seyrettiği görülmüştür (238). Bütün bu avantajlarına rağmen 45S5'in uygulandığı bölgeden kolayca uzaklaşabildiği bildirilmiştir (58). Bu durumu iyileştirebilmek amacı ile 45S5 üzerinde çalışmalar yapılmış ve stabilitesi 45S5'ten daha iyi olan farklı biyoaktif camlar geliştirilmiştir. S53P4 bu arayış sırasında geliştirilen bir biyoaktif cam molekülüdür (23).

Anderson ve Karlsson tarafından 1990 senesinde geliştirilmiş S53P4, FDA tarafından onaylanmış, kraniyofasiyal cerrahiler, osteomiyelit, kemik defektlerinin tedavisi gibi pek çok farklı alanda klinik olarak kullanılmakta olan bir biyoaktif camdır. Antibakteriyel özelliğinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (23). Yapısal olarak kemik ve diş dokusu, özellikle de kemik ve dentin dokusu birbirine benzerlik göstermektedir. Her iki dokuda da etiyolojik faktörleri farklı olsa da demineralizasyon ve remineralizasyon süreçleri yaşamaktadır ve her iki dokunun da remineralizasyon sürecinde kalsiyum ve fosfat iyonlarının önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (240). Bu sebeple kemik defektlerinin ve kemikle ilgili patolojilerin tedavisinde başarılı olarak kullanılabilen S53P4'ün diş remineralizasyonu alanında kullanılıp kullanılamayacağı merak edilmiş bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Forsback ve ark. 3. büyük azı dişlerinden elde ettikleri dentin diskleri ile yaptıkları bir çalışmada öncelikle disklere S53P4 uygulaması yapılmış, ardından remineralizasyonun gerçekleşmesi için diskler nötral bir solüsyon olan yapay vücut

sıvısı içerisinde 14 gün boyunca bekletilmiştir. 14 gün sonunda yapılan taramalı elektron mikroskobu incelemesinde S53P4 uygulanan disklerin yüzeyinde yoğun bir kalsiyum fosfat tabakası oluştuğu, dentin tübüllerinin tamamen kapandığı görülmüş, tedavi uygulamadan önce ve uygulandıktan sonraki disk ağırlığında bir artış olduğu görülmüştür (24). Yapılan başka bir çalışmada 45S5 ve S53P4 içerikli jeller sentezlenmiş, bu jeller 37 ± 2 °C'de yaşlandırılmış, ardından viskozite ölçümü, pH değişimi, suda çözünme süresi, serbest bırakılan iyonların ölçümü ve jellerin cam yüzeye yapışma kuvvetinin ölçülmesi gibi çeşitli fizikokimyasal testlere tabi tutulmuşlardır. Her iki materyalin de kalsiyum, fosfat ve silisyum iyonlarının salınımını gerçekleştirdiği, yüzeydeki adezyonlarının birbiri ile çok benzer olduğu, akışkanlık ve stabilitelerinin zamanla arttığı, 45S5 grubunun pH'ının zaman içerisinde düştüğü ancak S53P4 grubunun pH'ının yükseldiği görülmüş olup, bu sonuçlara bakılarak S53P4'ün de remineralizasyonun sağlanması için uygun şartları sağlayabileceği kanısına varılmıştır (131). Literatürde S53P4'ün dental pulpa hücreleri üzerindeki etkilerine inceleyen çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmalardan birinde dental pulpadan köken alan pluripotent kök hücreler üzerinde S53P4 moleküllerinden elde edilen ekstraktların hücresel canlılık üzerinde olumsuz bir etki göstermediği, endotelyal hücre farklılaşması ve mineralizasyonu indüklediği görülmüştür (241). Çalışmaların sonuçları ümit verici olsa da S53P4 içerikli bir ticari remineralizasyon ajanı piyasada bulunmamaktadır ve geliştirilebilmesi için daha fazla klinik ve laboratuvar çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır. 45S5 ve S53P4 materyallerinin pulpa üzerindeki etkilerini inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmada bu biyoaktif cam türleri ile çalışmayı tercih ettik.

Biyouyumluluk, bir materyalin, bir doku veya organizmaya karşı toksik, zararlı etkiler oluşturmaması, fizyolojik olarak reaktivite göstermemesi ve immunolojik olarak red cevabı oluşturmaması olarak tanımlanmaktadır (242,243). Diş hekimliği çok çeşitli materyallerin kullanıldığı, her geçen gün yeni malzemelerin geliştirildiği bir alandır. Materyal çeşitliliğinin ve geliştirilme hızının bu kadar fazla olması materyallerin biyolojik riskleri konusunda bir farkındalık geliştirilmesine ve belli standardizasyonların uygulanmasına sebep olmuştur. Ayrıca dental materyallerin biyouyumluluğu hastalar kadar bu materyallere her gün maruz kalan sağlık personeli için de oldukça önem arz etmektedir. Dental materyallerin oral kavite içerisinde stabilitesini koruması ve inert olması istenmektedir ancak tüm materyaller belirli derecelerde çözülüp degrade

olabilmektedirler. Materyaller çözüldüğünde açığa çıkan moleküllerin de toksik etkileri olabilmekte ve bu bölgesel veya sistemik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu sebeple kullanılan dental materyallerin biyouyumlu olması oldukça önemlidir (244). Bu tez çalışmasında günümüzde sıkça kullanılan remineralizasyon ajanlarından GDF ve 45S5 ile remineralizasyon tedavileri için geliştirilmiş ticari bir formu olmayan ancak remineralizasyon tedavileri için ümit verici olan S53P4'ün biyouyumluluklarını değerlendirmek amaçlanmıştır.

Dental materyallerin biyouyumlulukları değerlendirilirken öncelikli olarak toksisitesi belirlenmelidir. Dental materyallerin toksisitesi *in vitro* testler, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yardımı ile değerlendirilebilmektedir. Biyouyumluluk çalışmalarında hayvan deneyleri ve klinik çalışmalardan önce ilk olarak *in vitro* deneyler gerçekleştirilmelidir. İn vitro deneyler esas olarak bir materyalin sitotoksik veya genotoksik özelliklerini belirlemek için gerçekleştirilmektedirler. İn vitro çalışmalar; kısa sürelerde gerçekleştirilebilmesi, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması, daha düşük bütçelere gerçekleştirilebilmesi, hayvan ve insanlar üzerinde herhangi bir olumsuz etki oluşturmadığı için etik ve hukuki açıdan bir ihlale sebebiyet vermemesi gibi yönleri ile hayvan deneyleri ile karşılaştırıldıklarında önemli avantajlara sahiptir (140). Bu sebeple çalışmada *in vitro* hücre kültürü modeli kullandık.

İn vitro sitotoksisite testleri; organ ve doku kültürü, hücre kültürü ve hücre organelleri üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. Dental materyallerin *in vitro* olarak sitotoksik etkileri belirlenirken en sık hücre kültürü deneylerinden faydalanılmaktadır (157). Hücre kültürü çalışmalarında standardizasyonun sağlanması önemli bir konudur. Bu çalışmalarda iki çeşit hücre kullanılmaktadır. Bunlardan ilki devamlı hücre hatlarıdır. Bu hücreler önceden transformasyona uğratılmış olup kültür ortamında süresiz olarak büyüyebilmektedirler. Transformasyona uğradıkları için *in vivo* özelliklerini koruyamazlar ancak sahip oldukları özellikleri tutarlı bir şekilde sergilemektedirler. İkinci hücre tipi ise direk olarak canlı dokudan alınıp kültüre edilen primer hücrelerdir. Primer hücreler kültür ortamında sadece sınırlı bir zaman içerisinde büyüyebilmektedirler ancak *in vivo* hücrelerin karakteristik özelliklerine sahiptirler. Primer hücreler tek bir bireyden alındığı için sınırlı bir genetik çeşitlilik göstermekte, virüs veya bakteri taşıyabilmekte bu durum hücrelerin davranışını etkileyebilmekte ve kültür ortamında *in vivo* özelliklerini hızlıca kaybedebilmektedirler. Hücre hatları ise primer hücrelere kıyasla

genetik ve metabolik olarak daha stabil özellikler göstermektedirler. Bu durum hücre hatları ile yapılan deneylerde standadizasyonun önemli ölçüde korunabilmesine katkıda bulunup tekrar edilebilirliği arttırmaktadır (245).

L-929, Balb/3T3 fare fibroblast hücreleri rutin olarak dental materyallerin sitotoksisite tayininde kullanılan hücre hatlarıdır (246,247). L-929 hücre hattı homojen bir morfolojiye ve büyüme karakteristiğine sahiptir. Bu özellikleriyle L-929 hücre hattı ile yapılan *in vitro* sitotoksisite deneylerinin tekrarlanabilirliği yüksektir. Ayrıca L-929 hücre hattının diğer hücre hatlarından daha hassas ve güvenilir olduğu bildirlen çalışmalar mevcuttur (248,249). Dental materyaller sürekli olarak oral epitelyal hücreler ve gingivadaki fibroblast hücreleri ile etkileşim halindedirler (250). Bunun yanısıra pulpa dokusundaki baskın hücre türü fibroblastlardır ve diş sert dokularına uygulanan tüm materyaller dentin tübülleri vasıtası ile pulpa dokusu ile bir etkileşim içerisindedir ve pulpayı etkileyebilmektedir (251). Bu sebeplerden ötürü bu çalışmada L-929 fare fibroblast hücre hattı ile çalışmayı tercih ettik.

Hücre kültürü çalışmalarında materyal ve hücrelerin teması direkt veya indirekt olarak gerçekleştirilebilmektedir. Direkt temas testlerinde hücreler test materyali ile doğrudan temas ederek büyümektedir. İndirekt temas testlerinde ise hücre ile materyal arasında bir bariyer bulunmaktadır. Dental materyaller doğrudan canlı dokularla temas edebildiği gibi bazı durumlarda dentin dokusunun üzerinden uygulamalar yapılabilmekte, başka bir değişle pulpa dokusu ve materyal arasında dentin bir bariyer görevi üstelenebilmektedir. Bu sebeple *in vitro* olarak taklit edilmek istenen duruma göre direkt veya indirekt hücre kültürü uygulamaları tercih edilmektedir. Çalışmada diş sert doku remineralizasyon tedavileri için kullanılan materyallerin biyouyumlulukları araştırılmıştır. Remineralizasyon ajanları diş sert dokularının üzerine uygulanan materyallerdir, açığa çıkmış pulpa yüzeyine bu ajanlar doğrudan uygulanmamaktadırlar. Bununla birlikte her ne kadar remineralizasyon ajanları içerisinde yer alsa da GDF'nin indirekt pulpa kuafajı olarak araştırıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalarda GDF'nin pulpa dokusu üzerinde minimal düzeyde olumsuz etkilere yol açtığı, tersiyer dentin oluşumunu indüklediği, geniş bir odontoblastik tabaka oluşumuna katkı sağladığı görülmektedir (92–96). İçerisinde yüksek konsantrasyonlarda gümüş ve florür iyonları olduğu için direkt olarak pulpa dokusu üzerine uygulanması konsunda endişelerin mevcut olduğu bu sebeple GDF'nin pulpa hücrelerine direkt olarak kullanımı

hakkında literatürde yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (90). Biyoaktif camların da vital pulpa tedavilerinde kullanımını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (251,252). Tüm bunların yanında remineralizasyon ajanları diş sert dokuları üzerine uygulansa da direkt olarak oral kavite içerisindeki canlı doku ve hücreler ile temas edebilmektedir. Ayrıca hücre ve test edilecek materyal arasındaki temas arttıkça elde edilecek sonucun *in vivo* koşulları daha iyi yansıtabileceği söylenmektedir (253). Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada direkt temas testi tercih edilmiştir.

Biyoaktif camlar, biyoreaktivitesi çok yüksek materyallerdir. Sıvılarla temas ettiklerinde ani olarak alkali iyon patlamaları gösterip ortamın pH'ının çok yükselttikleri ve bu duruma bağlı olarak çok yüksek seviyelerde sitotoksisiteye sebep olabildikleri belirtilmiştir (254–257). Hücre canlılığının tehlikeye girmesinin yanında hücre mediumunda meydana gelen bu ani pH yüksekliği aynı zamanda hücresel fonksiyonların yorumlanmasını da zorlaştırmaktadır. Bu durumun önüne geçebilmek için hücre kültürü çalışmalarından önce biyoaktif camların önden bazı ön koşullandırma prosedürlerine tabi tutulması gerektiği söylenmektedir. Pasifizasyon, biyoaktif camların ani alkali iyon patlamalarının önüne geçebilecek ön koşullandırma prosedürlerinden birisidir (201,258). Pasifizasyon prosedürünün, ani pH patlamalarının önüne geçilmesini sağladığı bildirilirken, biyoaktif camların hidroksiapatit oluşturma yeteneklerini etkilemediği söylenmektedir (259). Başka bir değişle pasifizasyon biyoaktif camların biyouyumluluğunu arttırken biyoaktivitelerini etkilememektedir. Literatürler incelendiğinde biyoaktif camların 1 saatten 2 haftaya kadar farklı pasifizasyon sürelerine tabi tutulduğu görülmektedir (260,261). 1-5 mg/ml arası konsantrasyondaki biyoaktif camların farklı pasifizasyon süreleri karşılaştırdığında en etkili pasifizasyon 24 saat sonunda görüldüğü bildirilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda daha uzun süreler pasifizasyon önerilmiştir (262). Çalışmada 0-3 mg/ml aralığındaki biyoaktif cam konsantrasyonları incelendiği için benzer şekilde 24 saatlik bir pasifizasyon prosedürü uygulanmıştır.

Çalışmada 45S5 ve S53P4 materyallerinin saf haldeki partikülleri kullanılırken, diğer bir deney materyali olan GDF %38'lik konsantrasyonda kullanılmıştır. Materyallerin etkilerini aynı konsantasyonlarda kıyaslayabilmek için yapılan literatür tarasması sonucu 1 ml %38'lik konsantrasyondaki GDF'nin 380 mg GDF içerdiği tespit edilmiş ve bu bilginin ışığında materyal konsantrasyonları birbiri ile aynı olacak şekilde

seyreltme işlemleri gerçekleştirilmiştir (225). Sitotoksisite testlerinde dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da çalışılan materyallerin konsantrasyonlarıdır. 1990'larda yapılan birçok hücre kültürü çalışmasında araştırılan materyalin tek bir konsantrasyonun tekrarlı olacak şekilde çalışıldığı görülmektedir. Bu yaklaşımda test edilebilecek materyal çeşitliliğinin arttığı ancak bu durumun istatistiksel olarak güvenilir olmadığı bildirilmiştir (263). Bu sebeple Inglese ve ark. her bir materyalin geniş bir doz aralığında seyreltildiği Kantitatif Yüksek Çıktılı Tarama Yaklaşımı (qHTS) geliştirmiştir (264). Bu yaklaşım sayesinde yanlış negatif ve pozitif sonuç ihtimali azalmış, materyallerin sitotoksik etkileri daha iyi karakterize edilmiş ve daha yüksek kalitede doz cevap eğrileri elde edilmiştir (265). Çalışmadaki konsantrasyonlar belirlenirken de qHTS yaklaşımı benimsenmiş olup, daha önceden bu materyallerle yapılan çalışmalara dayanarak 0,005'ten 3 mg/ml'lik konstrastrasyona kadar 45S5, S53P4 ve GDF konsantrasyonları hazırlanmış, sitotoksisite deneyi bu konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir (266–269). IC_{50} bir materyalin hücre canlılığını %50 oranında azalttığı konsantrasyondur. IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonların genel olarak daha az toksik ve daha biyouyumlu olduğu bilinmektedir (270). Bu sebepten dolayı çalışmada apoptoz ve ALP testlerinde ise IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonları inceledik.

İdeal bir sitotoksisite testininin objektif ve kantitatif olması, tekrarlanabilirlik gibi özelliklere sahip olması istenmektedir. Mevcut literatür incelendiğinde en yaygın olarak kullanılan canlılık testlerinin hücre sayım testleri olduğu göze çarpmaktadır. Hücre sayımlarında, kuyucuk içerisindeki hücrelerin her zaman için işlevsel ve sağlıklı olduğu varsayılmaktadır ve bu durumun yanıltıcı olabileceği belirtilmiştir (271,272). Ayrıca manuel olarak hücre sayımı yapmak zaman alıcıdır ve tüm kuyucuğun yalnızca küçük bir kısmı örneklem olarak incelenebilmektedir. Bu durum örneklem yanlılığına sebep olabilmekte ve hata payını arttırabilmektedir. Manuel sayım sırasında hücre fotoğraflarını çeken ve sayımı yapan kişiler körleştirilmelidir. Ancak hücreler toksik bir madde ile etkileşime girdiğinde belirgin morfolojik değişiklikler göstermekte ve bu durum tarafsız kalmayı zorlaştırmaktadır. Tüm bu dezavantajları düşünüldüğünde hücrelerin canlılığının belirlenmesinde yeni testler geliştirilmiştir. Bu testlerden bazılarında hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülüp hücre canlılığı hakkında yorumlar yapılmaktadır. Sitotoksisitesinin tespit edilebilmesi için metabolik testlerden biri olan ATP testleri de uygulanabilmektedir. Canlı hücrelerin niceliksel olarak tayin edilebilmesi için ATP testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (273–275). Bununla birlikte ATP üretiminin

toksinlere bağlı olarak değişiklik gösterebileceği ve ATP miktarının hücre sayısı ile doğru orantılı olamayabileceği unutulmamalıdır. ATP ölçümleri doğrudan hücre sayısını göstermemekle birlikte, ATP miktarı metabolik canlılığın önemli bir göstergesidir ve sitotoksisite testlerinde oldukça kullanışlıdır (276,277). Mikroplaka bazlı ATP testlerinde hem primer hücreler hem de hücre hatları üzerinde sitotoksisite tayin edilebildiği bildirilmiştir. ATP üretimi hücre metabolizmasında olması zorunlu bir fonksiyon olduğu için bu testlerle ölümcül olmayan hücre hasarı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Kısa vadede, doza ve zamana bağlı olarak oluşan toksisite tespit edilebilmektedir, kuyucuğun tamamı örneklem olarak incelenebilmektedir (278).

Metabolik olarak canlılığının ölçülebilmesi için ATP testi dışında testler de mevcuttur. Bunlar içerinde en sık kullanılanlardan biri MTT testidir. ATP testi, MTT gibi yaygın kullanılan metabolik testlerle karşılaştırıldığında çok daha hassas ölçümler yapabilmekte ve daha geniş bir aralıktaki hücre sayısıyla uygulanabilmektedir. Wang ve ark. sitotoksisite testlerini kıyasladıkları bir çalışmada MTT testlerinin ATP testlerine kıyasla hücre canlılığını olduğundan daha fazla gösterdiği ve bu nedenle IC_{50} değerini yaklaşık iki kat yüksek hesapladığı belirtilmiştir (279). Petty ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada ise ATP testinin uygulanabilmesi için kuyucuk başına minimum 1563 hücre yeterken, MTT testinde bu sayının minimum 25000 hücre olması gerektiği bildirilmiştir (280). Ayrıca ATP testinin inkübasyon süresi MTT'den daha kısa olup deneysel süreç açısından da pratiktir. Bu nedenlerle, çalışmada sitotoksisite değerlendirmesi için ATP bazlı bir yöntem tercih ettik.

Materyallerin biyouyumlulukları değerlendirilirken inkübasyon sürelerinin hücresel canlılık üzerindeki etkili olduğu bilinmektedir. Kısa süreli toksin maruziyetinin (4 saat ve daha az) hücrelerin membran bütünlüğü bozulmadan ATP gibi metabolik belirteçler etkilenebileceği yapılan çalışmalar sonucu bildirilmiştir (281,282). 24 saatten daha uzun süreli maruziyetlerde ise hücre zarı hasar gördükten sonra dış ortama çıkan enzimlerin zaman içerisinde tespit edilemez duruma geldiği, bu durumun ise sitotoksisitenin olduğundan daha düşük ölçülmesine sebep olabileceği bildirilmiştir (283). ISO 10993-5 standartlarına göre de *in vitro* sitotoksisite deneylerinin 37°C'de ve minimum 24 saat inkübasyonla gerçekleştirilmesi önerildiği için çalışmada materyaller hücreler ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir (200). Tüm testler sonuçların güvenilirliği için dört kez tekrar edilmiştir.

Sitotoksisite testlerinde ölen hücre sayısı kadar hücrelerin ölümünün nasıl gerçekleştiği de önem arz etmektedir. Hücrelerin ölüm mekanizması araştırılan materyalin güvenilirliği ve tedavi edici potansiyelinin anlaşılması açısından önemlidir. Basitçe ifade etmek gerekirse hücre kültüründe primer nekroza sebep olan materyallerin yüksek sitotoksik riskler taşıma ihtimali olduğu düşünülürken apoptoza sebep olan materyallerin daha tercih edilebilir olduğu kanısına varılabilmektedir. Uygulanan bileşiğin konsantrasyonuna ve türüne göre hücrelerin ölüm zamanı ve şekli değişkenlik gösterebilmektedir (284–286). Bu sebeple çalışmada incelenen materyallerin farklı konsantrasyonlardaki ATP ölçümlerini takiben IC_{50}'nin altındaki konsantrasyonlardaki apoptoz tayini gerçekleştirilmiştir.

Programlanmış hücre ölümü veya başka bir değişle apoptoz hem embriyonik gelişim hem de patolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Apoptotik hücreler, sağlıklı ve nekrotik hücrelerden morfolojik olarak farklı özelliklere sahip olması ile ayrılabilmektedir. Apoptotik hücrelerde genel anlamda bir yuvarlaklaşma ve büzülme, membran yüzeyinde kabarıklaşma, kromatinlerde kalınlaşma ve çekirdekte parçalanma görüldüğü bildirilmiştir. Kerr ve ark. hücre ölümünü, morfolojik özelliklere dayanarak tanımlamak için apoptoz terimini kullanmışlardır (172). Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi tarafından belirlenen yönergelerde de apoptozun tanımlanması sırasında biyokimyasal analizlerin kullanımı önerilmezken, biyokimyasal analizlerin hücre tipine göre farklılık gösterebileceği ve yanlış negatif sonuçlar elde edilebileceği, bunun önüne geçilebilmesi için apoptoz tayini sırasında morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (284).

Morfolojik görüntüleme birçok farklı teknikle gerçekleştirilebilmektedir. Floresan mikroskopisi de apoptoz tayininde kullanılabilen morfolojik görüntüleme yöntemlerinden birisidir. Bu yöntemde apoptotik hücreler floresan özellik gösteren boyalarla boyanmakta ardından floresan mikroskobu altında incelenmektedir. Akridin turuncusu ve etidyum bromür de apoptoz tayininde kullanılan floresan boyalardandır. Akridin turuncusu ve etidyum bromür ile apoptotik tayinin oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (287–289). Apoptoz tayininde kullanılabilen başka boyama teknikleri de mevcuttur. Anneksin V apoptoz tayini için yaygın olarak tercih edilen boyalardandır. Hem mikroskop altında hem de akım sitometrisi ile kullanılabilmektedir (175,290,291). Akım sitometrisi ile hücrenin fiziksel ve kimyasal özellikleri; değerlendirmeyi yapan

kişiden bağımsız olarak, hızlı bir şekilde, kantitatif ve objektif olarak yapılabilmektedir. Hücreleri mikroskop altında değerlendirmek daha subjektif olsa da mikroskopi ile hücrelerin morfolojik özellikleri direk olarak incelenebilmekte bu sayede apoptotik değişimler daha net anlaşılabilmektedir. Ayrıca akım sitometri yöntemi ile Anneksin V ve propidiyum iodür boyaması yapıldığında, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayırt edilemeyebileceği bildirilmiştir. Bu duruma çözüm olarak akım sitometri yöntemi yerine mikroskop altında inceleme veya başka boyamalar önerilmiştir. Apoptoz tayininde akridin turuncusu etidyum bromür boyamasının en güvenilir yöntem olduğu, hücre morfolojisinin, çekirdeğinin ve kromatin bozulmasının bu boyama ile yüksek kalitede tespit edilebildiği, bu yöntemle canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler arasında net olarak ayrım yapılabildiği bildirilmiştir (292). Literatürlerden elde edilen bu bilgilere dayanarak çalışmada akridin turuncusu ve etidyum boyaması yapılarak floresan mikroskobu altında apoptoz tayini yapılmıştır.

Pulpadaki hücrelerde ALP enzim aktivitesinin artması, bu hücrelerin odontojenik diferansiyasyona uğradığının bir göstergesidir. Dentinogenez sırasında ALP odontoblastlar tarafından üretilmekte ve dentin matriksinin mineralizasyonunu desteklemektedir. Deneysel çalışmalarda dentinogenez sürecine dair tespitlerde bulunabilmek için sıklıkla ALP ekspresyonu ve aktivitesi analiz edilmektedir (196). Yüksek ALP seviyeleri hücrelerde mineralize doku üretmeye başladığını göstermektedir (199). Buradan yola çıkarak çalışmada 45S5, S53P4 ve GDF'nin remineralizasyonu destekleme yeteneğini ölçmek amacıyla, IC_{50}'nin altındaki tüm konsantrasyonlarda ALP enzim aktivite ölçümlerini gerçekleştirdik.

Osteojenik ve odontojenik mineralizasyon analizlerini yapabilmek ve hücresel ve moleküler düzeyde farklılaşmayı daha iyi anlayabilmek için osteojenik ve odontojenik farklılaşmanın belirteçlerini değerlendirmek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Western blot ve ELISA gibi birçok faklı teknik kullanılabilmektedir. ELISA; peptit, protein, antikor, hormon, enzim gibi çözünebilen maddeleri tespit edebilmek ve niceliksel olarak ölçmek için tasarlanmış, plaka bazlı test yöntemidir. Bu teknikte incelenecek protein mikroplaka kuyucukları içerisinde immobilize edilmekte ve spesifik olarak antikorlarla, yüksek hassasiyetle analiz edilmekte, hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilmektedir (293,294). Antijen-antikor tanıma prensbine ve enzimin biyokatalitik özelliğine dayanan temel bir immünolojik test yöntemidir. Hedef antikor

molekülü mevcut olduğu sürece ELISA herhangi bir hedef molekülü tespit etmek için kullanılabilmektedir. ALP katalitik aktivitesi yüksek bir enzim olduğu için ELISA testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (295). Bu bilgiler ışığında etkili, hassas, güvenilir ve pratik bir kullanım sağladığı için çalışmada ALP enzim ölçümü için ELISA kiti kullanımı tercih edilmiştir.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda odontojenik ve osteojenik diferansiasyonun erken evrelerinde ALP enzimine ait salınımın gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu sebeple osteojenik ve odontojenik indüksiyonu inceleyen çalışmaların çoğunda ALP ölçümleri iki hafta içerisinde gerçekleştiği rapor edilmiştir (296). Bu bilgiler doğrultusunda biz de ALP ölçümler materyallerin IC_{50} değerinin altındaki konsantrasyonlarıyla 14 gün boyunca inkübasyon sonrası gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada materyallerin uygulanmasından 24 saat sonra yapılan sitotoksisite ve apoptoz tayininde tüm materyaller için konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığı ve apoptoz oranlarının arttığı belirlenmiş olup, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm materyallerde en yüksek canlılık kontrol grubunda görülürken, en düşük canlılık 3 mg/ml'lik konsantrasyonda elde edilmiştir. Bu durumu destekler nitelikte her üç materyal için en yüksek apoptoz oranı 3 mg/ml'lik grupta tespit edilirken, en düşük apoptoz oranı kontrol grubunda görülmüştür. Bu sonuçlar, incelenen materyallerin biyouyumluluklarının doza bağlı olduğunu göstermektedir.

Deney materyallerinin uygulanmasından 24 saat sonra yapılan ATP ölçümü ile gerçekleştirilen canlılık analizinde, tüm konsantrasyonlarda GDF uygulanan grupta hücre canlılığının diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, apoptoz tayini için yapılan üçlü karşılaştırmalarda da en yüksek apoptoz oranının GDF grubunda tespit edildiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada incelenen materyaller içerisinde biyouyumluluğu en düşük olan materyali GDF olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde, GDF'nin biyouyumluluğuna ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Bernal ve ark., süt dişi kök hücreleri üzerinde iki farklı GDF türü olan Riva Star ve e-SDF'nin 1; 0,1 ve 0,05 mg/ml konsantrasyonlarındaki apoptotik ve sitotoksik etkilerini değerlendirmiştir (266). Yapılan metabolik aktivite ölçümlerinde, e-GDF grubundaki hücrelerin tüm konsantrasyonlarda metabolik aktivite değerlerinin kontrol

grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, Riva Star grubunda ise yalnızca 0,05 mg/ml konsantrasyonunda metabolik aktivite değerleri kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiş; ancak 1 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, her iki materyalin tüm konsantrasyonlarında apoptotik hücre oranları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada da GDF olarak Riva Star kullanılmış ve 0,1 ile 0,05 mg/ml konsantrasyonlarındaki metabolik aktivite ve apoptoz oranları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, apoptoz oranları Bernal ve ark.'larının çalışmasıyla paralellik göstermekte olup, her iki çalışmada da GDF'nin apoptozu artırdığı belirlenmiştir. Ancak, metabolik aktivite ölçümleri açısından bazı farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışmada ise**,** Riva Star grubundaki hücrelerin metabolik aktivitesi, tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir. Bu durum, özellikle 0,05 mg/ml konsantrasyonunda**,** Bernal ve ark.'larının çalışmasındaki bulgularla çelişmektedir. Bu farklılıkların, hücre kültürü koşulları, kullanılan hücre tipleri**,** maruziyet süresi veya deneysel yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kim ve ark. GDF'nin sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri bir çalışmada pulpa benzeri hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda GDF uygulaması yapılmış, ayrıca bu çalışmada GDF'nin neden olabileceği olası bir toksisiteye bir antioksidan olan Glutatyonun (GSH) nasıl etki edeceği de araştırılmıştır. GDF uygulamasından 24 saat sonra yapılan sitotoksisite analizlerine göre GDF'nin tüm konsantrasyonlarda pulpa benzeri hücreler üzerinde kontrol grubundan anlamlı bir şekilde daha fazla sitotoksik etkilere sebep olduğu ve sitotoksisitenin GDF konsantrasyonu arttıkça anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür. GDF'ye GSH eklenmesinin de kısa vadede (6 saat) toksisiteyi azaltabildiği ancak uzun vadede uzun süreli maruziyette (24 saat) bu etkinin azaldığı bildirilmiştir. Bu durum GDF'nin düşük konsantrasyonlarda bile sitotoksik etkiler gösterebileceğine işaret etmiştir. Bu etkinin antimikrobiyal uygulamalarda faydalı olabileceği ancak biyouyumlulukla ilgili endişelere sebep olduğu belirtilmiştir (231). Bu çalışmada da bu çalışmaya paralel olarak 24 saatlik maruziyet sonunda tüm konsantrasyonlardaki canlılık kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış ve uygulanan GDF konsantrasyonu arttıkça canlılığın anlamlı derecede düşmüştür.

Korwar ve ark. yaptıkları klinik bir çalışmada ortodontik sebeplerden ötürü çekilmesi planlanan birinci küçük azı dişlerinde indirekt pulpa tedavisi için GDF ve GC Fuji VII kaide materyalleri olarak incelenmiştir. Çekilmesi planlanan 4 adet birinci küçük azı dişine sınıf V kaviteler açılmış 3 dişe GDF, GC Fuji VII ve Dycal uygulaması yapılmış bir diş kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Restorasyonlar tamamlandıktan sonra 6 hafta beklenmiş, 6 hafta sonra dişler çekilip histopatolojik olarak incelenmiştir. Hiç bir grupta herhangi bir inflamutuar değişim görülmezken GDF ve GC Fuji VII grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla tersiyer dentin oluşumu görülmüştür. Bu çalışma sonucunda GDF ve GC Fuji VII materyallerinin derin kavitelerde kullanımının güvenli olduğu sonucu çıkarılmıştır (95). Bu çalışmanın örneklem sayısının oldukça az olması ve klinik takip süresinin kısıtlı olması, çalışmanın sonuçları ile elde edilen yeni bulgular arasındaki çelişkinin nedeni olabilir.

Rossi ve ark. yaptıkları bir çalışmada herhangi bir pulpal tutulumu olmayıp mine dentin çürüğü olan %38'lik GDF ile tedavi edildikten 1 yıl sonra çekilen süt dişlerinde kronik enflamasyon belirtileri olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada Wistar sıçanlarının dişlerine açılan kaviteler, %38'lik GDF ile tedavi edilmiş, 7 gün sonra incelendiğinde dişlerde hafif inflamasyon belirtileri izlenmiştir (96). Bu bulgular, GDF uygulaması sonrası klinik takip süresi arttıkça inflamatuar reaksiyon görülme şiddetinin artabileceğini düşündürmektedir.

Ho ve ark. yaptıkları bir çalışmada GDF'nin insan derisi modeli üzerindeki sitotoksisitesini araştırmıştır. Çalışama hem insan gingival fibroblast hücreleri üzerinde iki boyutlu olarak hem de üç boyutlu insan deri modeli üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada insan gingival fibroblast hücrelerine GDF temas ettiğinde aniden nekroz geliştiği, bununla birlikte üç boyutlu insan deri modeli üzerinde daha sınırlı bir sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (297). Ho ve ark. çalışmasında bizimkinden farklı olarak fibroblast hücrelerinde çok hızlı bir şekilde nekroz gelişmiştir. Bu durumun, daha yüksek konsantrasyonda (% 0,394) bir GDF uygulamasının yapılmasının sebep olduğunu düşünülmüştür. Bu etkinin üç boyutlu insan deri modeli üzerinde daha kontrollü bir şekilde ortaya çıkmasının ise doku kalınlığı ve hücresel organizasyonların koruyucu etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ho ve ark. çalışmasındaki sonuçlar bu çalışmanın sonuçlarında elde edilen verilerdeki gibi GDF'nin sitotoksik etkilerini

desteklemektedir. GDF'nin periodontal dokular üzerinde sınırlı bir tahribat yaratabileceği çalışma sonunda düşünülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre yapılan üçlü karşılaştırmalarda tüm doz gruplarıda canlılığı en yüksek ve apoptoz oranı en düşük grubun 45S5 grubu olduğu bulunmuştur. 0,005 mg/ml'lik konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarda 45S5 grubunda, canlılığın kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olduğu, 0,005 mg/ml'deki canlılığın ise kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmadığı görülmüştür. Bu gruptaki apoptotik hücre oranları incelendiğinde ise tüm konsantrasyonlarda apoptoz oranının kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir. Bu verilerden yola çıkarak 45S5'in incelediğinen materyaller içerisinde biyouyumluluğu en yüksek materyal olduğu sonucunu çıkarmaktayız.

Bakry ve ark. 45S5 patının RPC-C2A hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan MTT testinde 45S5 uygulanan hücrelerin canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte hücre morfolojileri mikroskopi ile incelendiğinde 45S5'in minimal de olsa sitotoksik etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (238). Bu morfolojik inceleme ile elde edilen bulgular, güncel çalışmadan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Ayrıca, MTT testi ile morfolojik inceleme sonuçları arasındaki farkın, kültüre edilen hücrelerin düşük metabolik aktivitelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu durum, hücre canlılığına dair incelemelerde hem metabolik testlerin hem de morfolojik değerlendirmelerin birlikte kullanılmasının önemini vurgulamaktadır.

Comar ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise OD-21 hücre hattı ve insan dental pulpa hücreleri üzerinde 45S5'in etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda OD-21 ve insan dental pulpa hücrelerinin 45S5'e verdiği yanıtlarda farklılıklar gözlenmiştir. 45S5 uygulanan insan dental pulpa hücrelerinin metabolik aktivitelerinde bir değişiklik tespit edilememiştir ancak OD-21 hücre hattının metabolik aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca güncel çalışmadan elde edilen bulgularla benzer olarak uygulanan 45S5'in konsantrasyonu arttıkça hücreler üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiği ancak düşük konsantrasyonlarda böyle bir etkiye neden olmadığı belirtilmiştir (298). Biyoaktif camlar çözündüklerinde kalsiyum, fosfat, sodyum, silikat gibi iyon salınımları meydana gelmektedir. Literatürde yüksek iyon konsantrasyonun pH'ı arttırarak canlılığı olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (299,300). Ayrıca bu iyonların fazla

miktarlarda salınmasının hücre içi sinyal yolaklarının bozup hücre ölümlerine sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmada, 45S5 ve GDF grupları arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, gruplar arasında yalnızca 0,1 mg/ml'lik konsantrasyondaki apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamsız bulunmuş, diğer tüm konsantrasyonlarda, 45S5 grubunun apoptoz oranı anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte ATP ölçümleri de benzer bir farklılık göstermiştir; 45S5 grubunda ATP üretimi, GDF grubuna kıyasla tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur.

Hücreler üzerinde minimal düzeyde stresin oluştuğu, 0,005 ve 0,05 mg/ml gibi düşük konsantrasyonlarda uygulanan materyallerin biyouyumluluğu hücresel yanıtlar açısından daha belirgin hale gelmektedir. Buna karşın, 0,187 ve 0,375 mg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda, artan konsantrasyonun etkisiyle hücresel stres düzeyi yükselmektedir. Ancak, çalışmada kullanılan 45S5'in yüksek biyouyumluluğa sahip bir materyal olması, bu stresin hücreler tarafından daha iyi tolere edilmesini sağlamaktadır. Bu durumun, hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda 45S5 grubunda gözlemlenen apoptoz oranlarının GDF grubuna kıyasla daha düşük seyretmesine neden olduğunu düşünmekteyiz. Hücresel ATP seviyeleri, hücresel metabolizmanın direkt bir göstergesidir. ATP üretimi korunduğu takdirde hücrelerin enerji dengeleri sağlanabilmektedir ve bu durum apoptozun engellenmesi açısından kritik bir önem arz etmektedir (301). Yapılan 2'li karşılaştırmalarda tüm konsantrasyonlarda ATP üretiminin 45S5 grubunda GDF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. 45S5'in ATP seviyelerinin daha yüksek seyretmesi bize, bu gruptaki hücrelerin metabolizması üzerinde destekleyici bir etki olduğunu düşündürmüştür. GDF grubunda ise ATP üretiminin daha düşük seyrettiği, materyalin daha toksik etkiler gösterdiği ve bu durumun apoptoz oranında artışa sebep olduğunu düşünmekteyiz. Ancak 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonda apoptoz oranları arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bu konsantrasyon seviyesinde hücrelerin belirli bir adaptasyon geliştirdiği ve materyallerin etkilerinin tam olarak ortaya çıkamadığı bir geçiş noktasının oluştuğunu bu sebeple apoptotik konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmadığını düşünmekteyiz. Yapılan literatür taramaları sonucu literatürde GDF ve 45S5'in biyouyumluluk karşılaştırıldığı bir çalışma olmadığı görülmüştür, özellikle 0,05

ve 0,187 mg/ml konsantrasyon aralığında daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmada S53P4 ve GDF'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, 0,375 mg/ml konsantrasyonun haricinde, tüm doz gruplarında S53P4'ün hücre canlılığının GDF'ye kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 0,375 mg/ml konsantrasyonunda iki grup arasındaki canlılık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, düşük ve orta konsantrasyonlarda (0,005 ve 0,1 mg/ml arası) S53P4'ün GDF'ye göre daha az sitotoksik olduğunu, ancak 0,375 mg/ml seviyesinde hücrelerin belirli bir stres eşiğine ulaştığını ve bu nedenle S53P4 ile GDF'nin hücresel etkilerinin birbirine yaklaştığını düşündürmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücrelerin materyallere verdiği yanıt farklılaşarak, GDF sitotoksik etkisinin 45S5'e göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Apoptoz tayini incelendiğinde ise tüm ikili karşılaştırmalarda olduğu gibi 0,1 mg/ml'de iki materyal arasındaki apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış, diğer tüm konsantrasyonlarda S53P4'ün apoptoz oranı anlamlı derecede düşük bulunmuştur. S53P4'ün daha biyouyumlu bir materyal olduğu için apoptoz oranlarının GDF'den daha düşük seyrettiği ancak 0,1 mg/ml'de daha önceden de bahsedildiği gibi hücresel bir adaptasyonun gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatür incelendiğinde GDF ve S53P4'ün doğrudan karşılaştığı bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu konuda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte yüksek gümüş ve florür konsantrasyonu içermesi nedeniyle GDF'nin biyouyumluluğunun biyoaktif camlardan daha düşük olduğu öne sürülmüş ve GDF'nin biyouyumluluğunun iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. GDF'nin fiziksel ve bakteriyel özelliklerini iyileştirmek ve biyouyumluluğunu arttırmak için Bang ve ark. bakır içerikli bir biyoaktif camla GDF'yi birleştirerek yeni bir materyal sentezlemiş ve bu materyali GDF ile dental pulpa kök hücreleri üzerinde kıyaslamıştır. Araştırmanın sonucunda biyoaktif cam eklenen GDF grubunda daha düşük sitotoksik etkiler gözlemlenmiştir (302). Bu sonuç, güncel çalışmada değerlendirilen 45S5'in yüksek biyouyumluluğuna benzer şekilde, biyoaktif camın hücresel stres üzerinde dengeleyici bir etkisi olduğunu desteklemektedir. Özellikle hücresel metabolizma ve apoptoz üzerindeki olumlu etkileriyle biyoaktif cam içeren materyallerin, biyouyumlu dental uygulamalarda önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

Deneyimizde yapılan ATP ölçümlerinde de 0,005 ve 0,05 mg/ml'lik konsantrasyonlarında 45S5 ve S53P4 arasındaki metabolik aktivite farklı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum düşük konsantrasyonlarda 45S5 ve S53P4'ün hücre metabolizması üzerinde benzer etkilere sebep olduğunu göstermektedir. Ancak 0,187; 0,1; 0,375; 1,5; 3,0 mg/ml'lik konsantrasyonlarda 45S5 teki ATP üretiminin S53P4'ten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tayin edilmiş olup yüksek konsantrasyonlarda 45S5'in hücreler üzerinde daha biyouyumlu olduğu tarafımızca düşünülmüştür. 45S5 ve S53P4 gruplarının apoptoz oranlarının ikili karşılaştırmalarında da 0,1 mg/ml'lik konsantrasyon hariç (p=0,123) tüm doz gruplarında 45S5'in apoptoz oranı S53P4'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Daha yüksek seviyelerdeki ATP, hücrelerin enerji dengelerinin korunduğunu ve hücrelerin daha sağlıklı bir metabolik durumu sürdürdüğünü göstermekte olduğu için bu sonucu 45S5 grubundaki hücrelerin ATP seviyelerinin daha yüksek olması ile ilişkilendirmekteyiz.

Yapılan literatür taramasında 45S5 ve S53P4'ün kimyasal ve biyolojik özellikleri hakkında yapılmış birçok çalışma olduğu görülsede bu iki materyalin biyolojik özelliklerini aynı deneysel koşullarda kıyaslayan tek bir çalışma olduğunu gördük. Bu çalışmada Westhauser ve ark. farklı konsantrasyonlardaki 45S5 ve S53P4 tozlarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücreler üzerindeki sitouyumluluk, anjiyojenik ve osteojenik özelliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda her iki materyalin de biyouyumluluk özellikleri oldukça yüksek bulunmuş olup 1 mg/ml'lik konsantrasyonda 45S5 grubundaki hücre canlılığı daha yüksek bulunurken, daha yüksek konsantrayonlarda S53P4 grubunun canlılığının daha yüksek olduğu görülmüştür (269). Bu açıdan Westhauser ve ark.'larının çalışması ile güncel çalışmada çelişen sonuçlar olduğunu görmekteyiz. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın temel sebebinin, kullanılan konsantrasyon aralıklarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Güncel çalışmada 0-3 mg/ml aralığında düşük ve orta konsantrasyonları da kapsarken**,** Westhauser ve ark.'larının çalışması yalnızca 1,0; 2,0 ve 3 mg/ml konsantrasyonlarına odaklanmıştır**.** Düşük ve orta konsantrasyonlarda 45S5'in hücresel metabolizma ve canlılık açısından avantajlarının daha belirgin hale gelmesi, çalışmanın daha geniş bir konsantrasyon aralığını içermesiyle açıklanabilir. Bu durum, biyoaktif camların biyouyumluluğunun yalnızca kimyasal bileşimlerinden değil, kullanılan doz aralıklarından da büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir. 45S5 ve S53P4'ün biyolojik

özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için geniş konsantrasyon aralıklarında bu iki materyalin kıyaslandığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan absorbans ölçümlerine göre 45S5 ve S53P4 gruplarında uygulanan konsantrasyon arttıkça ALP enzim aktivitesinin arttığı görülürken GDF grubunda uygulanan GDF konsantrasyonu arttıkça düzenli olarak ALP aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Yapılan üçlü karşılaştırmalarda 0,005 mg/ml dışındaki tüm konsantrasyonlarda ALP seviyesi en düşük grup GDF grubuyken, en yüksek grubun 45S5 grubu olduğu görülmüştür.

Castro ve ark. GDF türlerinin MDPC-23 hücrelerin üzerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada hiçbir GDF türünün ALP aktivitelerinin kontrol grubundan anlamlı olarak farklı olmadığını ancak mineralizasyon modülü oluşumu incelemelerinde mineralizasyon kapasitesinin önemli ölçüde azalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (303). Bu durum gümüş ve florür içeriği belirli bir konsantrasyonu aştığında hücrelerin mineralizasyon kapasitesini olumsuz yönde etkileyebileceğini bize düşündürmektedir. Yapılan çalışmada ise GDF konsantrasyonu arttıkça ALP enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, gümüş içeriğinin belirli dozlarda hücrelerin normal mineralizasyon süreçlerini baskılayabileceği hipoteziyle örtüşmektedir**.** Önceki çalışmada ALP aktivitesinin korunmasına rağmen mineralizasyonun azaldığı görülürken, güncel çalışmada GDF konsantrasyonunun artışıyla doğrudan ALP aktivitesinde azalma meydana gelmiştir**.** Bu farklılığın, kullanılan hücre hattının ve deney tasarımının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Nakade ve ark. üç farklı hücre tipi üzerinde florürün etkilerini değerlendirdikleri bir çalışmada düşük konsantrasyonlardaki florürün hücreler üzerindeki ALP aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür (304). Çalışmada kullanılan materyallerden biri olan GDF flor konsantrasyonu oldukça yüksek bir materyaldir. Yapılan güncel çalışmada GDF konsantrasyonu arttıkça, hücrelerin maruz kaldığı florür miktarı da artmakta ve bunun sonucunda ALP aktivitesi azalmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar birbiriyle paralellik göstermektedir.

Kim ve ark. GDF'nin ALP etkisine olan etkisini değerlendirdikleri bir çalışmada güncel çalışmaya paralel olacak şekilde GDF'nin ALP aktivitesini baskıladığı ve uygulanan GDF konsantrasyonu arttıkça ALP aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte Kim ve ark. GDF'ye GSH eklendiğinde ALP

aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Bu durum, GDF'nin doza bağımlı olarak hücre fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini ve biyouyumluluğun arttırılması için destekleyici ajanlara ihtiyaç duyulabileceğini göstermektedir. Gelecekte, GSH veya benzeri antioksidanların hücreler üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri araştırılarak, GDF'nin biyouyumluluğunu artırmaya yönelik stratejiler geliştirilebileceği düşünülmektedir (231).

Çalışmada, uygulanan 45S5 ve S53P4 konsantrasyonları arttıkça ALP aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Gong ve arkadaşlarının, 45S5 ve 58S biyoaktif camlarının insan dental pulpa hücreleri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, her iki biyoaktif cam grubunun da odontojenik gen ekspresyonunu ve ALP aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (305). Bununla birlikte, 45S5'in osteoblast benzeri MG-63 hücre hattı üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, 45S5'in tüm konsantrasyonlarda belirli bir ALP enzim aktivitesi sergilediği ancak farklı konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (306). Yapılan yeni çalışmada ise uygulanan 45S5 konsantrasyonları arttıkça ALP aktivitesinde de belirgin bir artış gözlemlenmiştir**.** İki çalışma arasındaki bu farkın, kullanılan 45S5 konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle, yapılan çalışmada kullanılan konsantrasyonlar, önceki çalışmaya kıyasla daha yüksek olup, bu durum ALP aktivitesindeki artışın daha belirgin hale gelmesine neden olabilir.

Kontrol grubu ile 45S5 grubunda 0,005 mg/ml'lik konsantrasyon hariç tüm doz grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ve daha yüksek olduğu bulunmuştur. Mahran ve ark. 45S5'in insan dental pulpa hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri bir çalışmada 45S5 molekülünün ALP aktivitesini arttırdığı ancak bunun kontrol grubundan (DMEM) anlamlı derecede yüksek olmadığı görülmüştür (307). Bu çalışmada, yapılan çalışmadan daha yüksek bir konsantrasyon olan 0,5 mg/ml 45S5 materyali kullanılmıştır. Bu durum, 45S5'in belirli bir konsantrasyona kadar osteojenik aktiviteyi artırabileceğini, ancak belirli bir eşiğin üzerinde ALP aktivitesinin baskılanabileceğini düşündürmektedir.

Ojansivu ve ark. hASCs üzerinde S53P4'ün osteojenik etkilerini ölçmüşlerdir. 14. gün sonunda S53P4'ün ALP aktivitesini azalttığı ancak RUNX2a transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak osteojenik farklılaşmaya hücreleri teşvik ettiği görülmüştür (308). ALP aktivitesi incelendiğinde iki çalışmanın sonuçların çeliştiği

görülmektedir. Bu farklılığın Ojivansu ve ark.'larının çalışmasında, bizden farklı olarak hASCs hücre hattı kullanılması ve çalışmanın disk ve ekstrakta kullanılarak gerçekleştirilmesi sonucunda oluştuğu görüşündeyiz. Bu nedenle, S53P4'ün ALP aktivitesi ve osteojenik/odontojenik farklılaşma üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için, farklı hücre hatları ve partikül formlarını içeren daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Biyoaktif camların (45S5 ve S53P4) yapılan ikili karşılaştırmalarında tüm konsantrasyonlarda ALP enzim aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. 45S5 ve S53P4'ün farklı konsantrasyon düzeylerinde (1,0; 2,0; ve 3 mg/ml) ve farklı zaman noktalarında (7 ve 21. günler) BMSC'ler üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada S53P4 grubunun ALP aktivitesinin 45S5 grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte ne 45S5 ne de S53P4 grubunda ALP aktivitesinin baskılanmadığı bildirilmiştir (269). Bu çalışmalardan ve güncel çalışmadan elde edilen sonuçlardan yola çıkarak S53P4'ün odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmayı teşvik edebilecek bir materyal olduğunu düşünmekteyiz. Bununla birlikte S53P4'ün spesifik olarak dentin remineralizasyonu ve odontojenik farklılaşma üzerindeki etkilerinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* yeni çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Elde edilen bulgular GDF, 45S5 ve S53P4 materyallerinin biyouyumluluğu ve odontojenik etkileri konusunda literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır ancak çalışmanın bazı limitasyonları da bulunmaktadır. Çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiğinden, biyolojik sistemlerin tüm kompleks etkileşimlerini tam olarak yansıtamayabilir. Bu nedenle, *in vivo* çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmada sitotoksisite testi olarak metabolik bir test olan ATP testi kullanılmıştır. Ancak, hücrelerin metabolik aktivitelerindeki değişimler her zaman hücre sayısıyla birebir paralellik göstermeyebilmektedir. Bu nedenle, hücresel yapıyı doğrudan inceleyen ek testlerin kullanılması, sonuçların doğruluğunu artırarak olası yanıltıcı etkileri en aza indirebilir. Ayrıca, çalışmada materyallerin tek bir inkübasyon süresindeki sitotoksik, apoptotik ve ALP aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ancak, farklı inkübasyon sürelerinde elde edilecek verilerin de incelenmesi, materyallerin biyolojik etkilerini daha kapsamlı anlamak adına önemli olacaktır. ALP aktivitesi, erken osteojenik farklılaşmanın önemli bir belirteci olmasına rağmen, odontoblast ve osteoblast farklılaşmasının geç evrelerini daha iyi

anlamak için gen ekspresyon analizleri ve mineralizasyon testleri gelecekteki çalışmalarda yapılabilir. Bu bulgular ışığında GDF, 45S5 ve S53P4 materyallerinin biyouyumluluğu ve odontojenik etkilerinin araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, GDF, 45S5 ve S53P4 biyoaktif camlarının L929 fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, apoptoz mekanizmaları ve ALP enzim aktivitesi açısından biyolojik etkileşimleri *in vitro* ortamda değerlendirilmiştir.

1- Sitotoksisite açısından, tüm materyallerin doz bağımlı bir etki gösterdiği, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığı ve apoptoz oranlarının arttığı gözlemlenmiştir

2- GDF grubu**,** en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiş, özellikle yüksek florür ve gümüş içeriği nedeniyle hücre canlılığı belirgin şekilde azalmış ve apoptoz oranları artmıştır.

3- 45S5 ve S53P4 grupları arasında sitotoksisite açısından 45S5 grubu daha biyouyumlu bulunmuştur. Bununla birlikte her iki materyal de yüksek biyouyumluluk göstermiştir.

4- ALP aktivitesi açısından, 45S5 ve S53P4 gruplarında doz artışı görüldükçe ALP aktivitesinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir.

5- GDF grubunda ise uygulanan konsantrasyon arttıkça ALP aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

6- 45S5 ve S53P4 karşılaştırıldığında, ALP aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

7- S53P4'ün odontojenik ve remineralizasyon potansiyeline sahip olabileceği, ancak bu etkinin hücre tipine ve partikül formuna bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir.

Bu bulgular, GDF'nin sitotoksik etkilerinin yüksek olması nedeniyle kontrollü kullanım gerektirdiğini, 45S5 ve S53P4'ün ise remineralizasyon ve odontojenik farklılaşma süreçlerinde umut vaat eden biyoaktif materyaller olduğunu göstermektedir**.** Ancak, *in vivo* ortamlarda nasıl bir biyolojik etkileşim gösterecekleri daha fazla araştırma gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Suga, Shoichi., & Watabe, Norimitsu. (1992). *Hard Tissue Mineralization and Demineralization*. 197.
2. Bowen, W. H. (2002). Controversy: Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *13*(2), 126–131.
3. Life, D. C. T. (2001). National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: Diagnosis and Management of Dental Caries Throughout Life, March 26–28, 2001. *The Journal of the American Dental Association*, *132*(8), 1153–1161.
4. Taubman, M. A., & Nash, D. A. (2006). The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nature Reviews Immunology 2006 6:7*, *6*(7), 555–563.
5. Cummins, D., & Bowen, W. H. (2016). Biotechnology in oral care. *Biotechnology in Personal Care*, 323–352.
6. Keyes, P. H., & Fitzgerald, R. J. (1962). Dental caries in the Syrian hamster—IX. *Archives of Oral Biology*, *7*(3), 267-IN2.
7. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. Pediatr Dent. 2016 Oct;38(6):52-54.
8. McDonald, R. E., Avery, D. R., & Dean, J. A. (2011). McDonald and Avery's Dentistry for the Child and Adolescent.
9. Nyvad, B., & Fejerskov, O. (1997). Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *25*(1), 69–75.
10. Howard, J. H., Young, J. M., Medina, R., & Alanis, P. J. (1982). REDUCTIONS IN DMFT AND DMFS SCORES BETWEEN 1977 AND 1982 USAF MILITARY POPULATIONS." JOURNAL OF DENTAL RESEARCH. *AMER ASSOC DENTAL RESEARCH*, *63*, 182–182.
11. Fejerskov, O., Antoft, P., & Gadegaard, E. (1982). DECREASE IN CARIES EXPERIENCE IN DANISH CHILDREN AND YOUNG-ADULTS IN THE 1970S. *Journal of Dental Research* , *61*, 1305–1310.
12. Anderson, R. J., Bradnock, G., & James, P. M. C. (1982). THE REDUCTION OF DENTAL-CARIES PREVALENCE IN ENGLISH SCHOOL-CHILDREN. *Journal of Dental Research* , *61*, 1311–1316.
13. G N Jenkins. (1985). Recent changes in dental caries. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, *291*(6505), 9.
14. Lopes, P. C., Carvalho, T., Gomes, A. T. P. C., Veiga, N., Blanco, L., Correia, M. J., Carolina, A., & Mello-Moura, V. (2024). White spot lesions: diagnosis and treatment–a systematic review. *Springer*, *24*(1).
15. tenCate, J. (1980). Remineralization of Artificial Enamel Lesions in vitro III. A Study of the Deposition Mechanism. *Caries Research*, *14*(6), 351–358.
16. Mattousch, T. (2007). Caries lesions after orthodontic treatment followed by quantitative light-induced fluorescence: a 2-year follow-up. *The European Journal of Orthodontics*, *29*(3), 294–298.
17. Delbem, A. C. B., & Pessan, J. P. (2019). Alternatives to Enhance the Anticaries Effects of Fluoride. *Pediatric Restorative Dentistry*, 75–92.
18. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C., & Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, *5*(6), 117–141.
19. Andersson, H., & Kangasniemi, I. (1991). Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, *25*(8), 1019–1030.
20. Curtis, A. R., West, N. X., & Su, B. (2010). Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. *Acta Biomaterialia*, *6*(9), 3740-3746.
21. Vollenweider, M., & Brunner, T. (2007). Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomaterialia*, *3*(6), 936–943.
22. Romanò, C. L., Logoluso, N., Meani, E., Romanò, D., De Vecchi, E., Vassena, C., & Drago, L. (2014). A comparative study of the use of bioactive glass S53P4 and antibiotic-loaded calcium-based bone substitutes in the treatment of chronic osteomyelitis: A retrospective comparative study. *Bone and Joint Journal*, *96 B*(6), 845–850.
23. Gestel, N. van, & Geurts, J. (2015). Clinical applications of S53P4 bioactive glass in bone healing and osteomyelitic treatment: a literature review. *BioMed Research International*, *2015*(1), 684826.
24. Forsback, A. P., Areva, S., & Salonen, J. I. (2004). Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, *62*(1), 14–20.
25. Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2018). Arresting Dentine Caries with Silver Diamine Fluoride: What's Behind It? *Journal of Dental Research*, *97*(7), 751–758.

26. Vasquez, E., Zegarra, G., Chirinos, E., Castillo, J. L., Taves, D. R., Watson, G. E., Dills, R., Mancl, L. L., & Milgrom, P. (2012). Short term serum pharmacokinetics of diammine silver fluoride after oral application. *BMC Oral Health*, *12*(1).
27. Horst, J., Ellenikiotis, H., California, P. M.-J. of the, & 2016, undefined. (2016). UCSF protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications and consent. *Taylor & FrancisJA Horst, H Ellenikiotis, PL MilgromJournal of the California Dental Association, 44*(1), 17–28.
28. Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Álvarez-Muro, T., Lozano, A., Forner, L., Llena, C., Moraleda, J. M., & Rodríguez-Lozano, F. J. (2017). Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *International Endodontic Journal*, *50*(2), e19–e30.
29. López-García, S., & Pecci-Lloret, M. (2019). In vitro evaluation of the biological effects of ACTIVA Kids BioACTIVE restorative, Ionolux, and Riva Light Cure on human dental pulp stem cells. *Materials*, *12*(22), 3694.
30. Berkowitz, B. K. B. (2017). oral anatomy histology and embryology. In *oral anatomy histology and embryology* (fifth, pp. 123–143). Elsevier Health Sciences.
31. Lejeune, H. (1994). A review of odontogenic infections. *The Journal of the Louisiana State Medical Society: Official Organ of the Louisiana State Medical Society*, *146*(6), 239–241.
32. Hargreaves, K. M., & Cohen, S. (2010). *Cohen's pathways of the pulp*. Elsevier.
33. Berkovitz, B., Holland, G., & Moxham, B. (2017). Dental Pulp. In *Berkovitz, Barry KB, Graham Rex Holland, and Bernard J. Moxham. Oral Anatomy, Histology and Embryology E-Book: Oral Anatomy, Histology and Embryology E-Book. Elsevier Health Sciences, 2017.* (5th ed., pp. 176–194).
34. Lisi, S., Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J. L., Ruch, J. V., & Lesot, H. (2003). Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connective Tissue Research*, *44*(SUPPL. 1), 167–170.
35. Torabinejad, M. H. R. (2015). "The biology of dental pulp and periradicular tissues." . In *Endodontics Principles and Practice of Endodontics* (5th ed., pp. 14–19).
36. Sasaki, T., & Garant, P. R. (1996). Structure and Organization of Odontoblasts. *THE ANATOMICAL RECORD*, *245*(235), 249.
37. Couve, E. (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, *31*(10), 643-651.
38. Franquin, J. C., Remusat, M., Hashieh, I. A., & Dejou, J. (1998). Immunocytochemical detection of apoptosis in human odontoblasts. *European Journal of Oral Sciences*, *106*(1 SUPPL.), 384–387.
39. Veerayutthwilai, O., Byers, M. R., Pham, T. T. T., Darveau, R. P., & Dale, B. A. (2007). Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiology and Immunology*, *22*(1), 5–13.
40. Solé-Magdalena, A., Revuelta, E. G., Menénez-Díaz, I., Calavia, M. G., Cobo, T., García-Suárez, O., Pérez-Piñera, P., De Carlos, F., Cobo, J., & Vega, J. A. (2011). Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microscopy Research and Technique*, *74*(5), 457–463.
41. Magloire, H., Maurin, J.-C., Bernard, C., & Lyon, U. (2010). Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *Journal of Orofacial Pain*, *24*(4), 335.
42. Shi, S., Miura, M., Seo, B., Robey, P., Bartold, P., & Gronthos, S. (n.d.). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & Craniofacial Research*, *8*(3), 191–199.
43. Smith, A. J. (2003). Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of dental education*, *67*(6), 678-689.
44. Aurrekoetxea, M., Garcia-Gallastegui, P., Irastorza, I., Luzuriaga, J., Uribe-Etxebarria, V., Unda, F., & Ibarretxe, G. (2015). Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Frontiers in physiology*, *6*, 289.
45. Jontell, M. B. G. (1992). Accessory cells in the immune defense of the dental pulp. *Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia*, *88*, 344–355.
46. Zhang, J., & Kawashima, N. (2006). The existence of CD11c+ sentinel and F4/80+ interstitial dendritic cells in dental pulp and their dynamics and functional properties. *International Immunology*, *18*(9), 375–1384.
47. Bhingare, A. C., Ohno, T., Tomura, M., Zhang, C., Aramaki, O., Otsuki, M., Tagami, J., & Azuma, M. (2014). Dental pulp dendritic cells migrate to regional lymph nodes. *Journal of Dental Research*, *93*(3), 288–293.
48. Pitts, N. B. (2004). Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Research*, *38*(3), 294–304.
49. Selwitz, R., & Ismail, A. (2007). Dental caries. *The Lancet*, *369*(9555), 51–59.

50. Featherstone, J. D. B. (2004). The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *Journal of Dental Research*, *83*(1_suppl), 39-42.
51. Featherstone, J. D. (2000). The science and practice of caries prevention. *He Journal of the American Dental Association*, *131*(7), 887–899.
52. Dawes, C. (2003). What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal-Canadian Dental Association*, *69*(11), 722–725.
53. Siqueira, W. (2012). New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *Journal of Dental Research*, *91*(12), 1110–1118.
54. Lendenmann, U. (2000). Saliva and dental pellicle-a review. *Advances in Dental Research, 14*(1), 22–28.
55. Featherstone, J. D. B. (2009). Remineralization, the natural caries repair process—the need for new approaches. *Advances in Dental Research*, *21*(1), 4–7.
56. Featherstone, J. D. B. (1999). Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *27*(1), 31–40.
57. Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). Critical review in oral biology & medicine: New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of Dental Research*, *89*(11), 1187–1197.
58. Ramadoss, R., Padmanaban, R., & Subramanian, B. (2022). Role of bioglass in enamel remineralization: Existing strategies and future prospects—A narrative review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *110*(1), 45–66.
59. Arifa, M. K., Ephraim, R., & Rajamani, T. (2019). Recent Advances in Dental Hard Tissue Remineralization: A Review of Literature. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *12*(2), 139–144.
60. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides–a clinical safety trial. *British Dental Journal, 215*(4), E6–E6.
61. Priyadarshini, S., & Raghu, R. (2013). Effect of organic versus inorganic fluoride on enamel microhardness: An: in vitro: study. *Journal of Conservative Dentistry*, *16*(3), 203–207.
62. Ten Cate, J. M., & Featherstone, J. D. B. (1991). Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *2*(3), 283–296.
63. Jindal, L., Bhat, N., & Thakur, K. (n.d.). Tooth Remineralization: Averting the Dental Decay. *Journal of Research and Advancement in Dentistry*, *10*, 37–45.
64. Barillo, D., & Burns, D. (2014). Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns*, *40*, 3–8.
65. Stebbins, E. A. (1891). What value has argenti nitras as a therapeutic agent in dentistry? *The International Dental Journal*, *12*(10), 661.
66. Cosmos, H. P.-D., & 1917, undefined. (1917). A method of sterilizing and at the same time impregnating with a metal affected dentinal tissue. *Dent Cosmos*, *59*, 891–904.
67. Peng, J. Y., Botelho, M. G., & Matinlinna, J. P. (2012). Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *Journal of dentistry*, *40*(7), 531-541.
68. Oppermann, R. (1980). Effect of Some Polyvalent Cations on the Acidogenicity of Dental Plaque in vivo. *Caries Research*, *6*(14), 422–427.
69. OPPERMANN, R. V., & JOHANSEN, J. R. (1980). Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper, silver and tin on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, *88*(6), 476–480.
70. OSTELA, I., & TENOVUO, J. (1990). Antibacterial activity of dental gels containing combinations of amine fluoride, stannous fluoride, and chlorhexidine against cariogenic bacteria. *European Journal of Oral Sciences*, *98*(1), 1–7.
71. Thibodeau, E. A., Handelman, S. L., & Marquis, R. E. (1978). Inhibition and Killing of Oral Bacteria by Silver Ions Generated with Low Intensity Direct Current. *Journal of Dental Research*, *57*(9), 922–926.
72. McDonald, S. (1994). A clinical comparison of non-traumatic methods of treating dental caries. *International Dental Journal*, *5*(44), 465–470.
73. Craig, G. G., Powell, K. R., & Cooper, M. H. (1981). Caries progression in primary molars: 24-month results from a minimal treatment programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *9*(6), 260–265.
74. Nishino, M., Yoshida, S., & Sobue, S. (1969). Effect of topically applied ammoniacal silver fluoride on dental caries in children. *The Journal of Osaka University Dental School*, *9*, 149–155.
75. Knight, G., & McIntyre, J. (2005). An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to Streptococcus mutans. *Australian Dental Journal*, *50*(4), 242–245.

76. Mei, M., Chu, C., & Low, K. (2013). Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with S. mutans and L. acidophilus dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, *6*(18), e824.
77. Mei, M. L., Li, Q. L., Chu, C. H., Lo, E. C. M., & Samaranayake, L. P. (2013). Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *12*(1).
78. Peng, J., & Botelho, M. (2012). Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *Journal of Dentistry*, *40*(7), 531–541.
79. Mei, M., Ito, L., Cao, Y., Li, Q., & Lo, E. (2013). Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *Journal of Dentistry*, *41*(9), 809–817.
80. Zhao, I., Gao, S., & Hiraishi, N. (2018). Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *International Dental Journal*, *68*(2), 67–76.
81. Mei, M., Ito, L., Cao, Y., Li, Q., & Chu, C. (2014). The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *Journal of Dentistry*, *42*(3), 329–335.
82. Mei, M., Li, Q., Chu, C., & Yiu, C. (2012). The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dental Materials*, *28*(8), 903–908.
83. Tjäderhane, L., Nascimento, F., Breschi, L., & Materials, A. M. (2013). Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental Materials*, *29*(1), 116–135.
84. U.S. Food & Drug Administration. (2014). *Premarket Notification: Diammine Silver Fluoride Dental Hypersensitivity Varnish.*
85. Markowitz, K., & Pashley, D. H. (2008). Discovering new treatments for sensitive teeth: The long path from biology to therapy. *Journal of Oral Rehabilitation*, *35*(4), 300–315.
86. Chu, C. H., Lo, E. C. M., & Lin, H. C. (2002). Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *Journal of Dental Research*, *81*(11), 767–770.
87. Llodra, J., Rodriguez, A., Ferrer, B., Menardia, V., Ramos, T., & Morato, M. (2005). Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial. *Journals.Sagepub. 84*(8), 721–724.
88. Duangthip, D., Chu, C. H., Lo, E. C. M., Hung, C., & Kong, H. (2016). A randomized clinical trial on arresting dentine caries in preschool children by topical fluorides—18 month results. *Journal of Dentistry*, *44*, 57–63.
89. Quock, R. L., Barros, J. A., Yang, S. W., Patel, S. A., & Yang, S. W. (2012). Effect of silver diamine fluoride on microtensile bond strength to dentin. *Operative Dentistry*, *37*(6), 610–616.
90. Greenwall-Cohen, J., & Greenwall, L. (2020). Silver diamine fluoride-an overview of the literature and current clinical techniques. *Acta Odontologica Latinoamericana: AOL*, *30*(1).
91. Hu, S., Meyer, B., & Duggal, M. (2018). A silver renaissance in dentistry. *European Archives of Paediatric Dentistry*, *19*(4), 221–227.
92. Fung, M. H. T., Duangthip, D., Wong, M. C. M., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2018). Randomized Clinical Trial of 12% and 38% Silver Diamine Fluoride Treatment. *Journal of Dental Research*, *97*(2), 171–178.
93. Yee, R., Holmgren, C., Mulder, J., Lama, D., Walker, D., & van Palenstein Helderman, W. (2009). Efficacy of silver diamine fluoride for arresting caries treatment. *Journal of dental research*, *88*(7), 644-647.
94. Gotjamanos, T. (1996). Pulp response in primary teeth with deep residual caries treated with silver fluoride and glass ionomer cement ("atraumatic" technique). *Australian Dental Journal*, *41*(5), 328–334.
95. Korwar, A., & Sharma, S. (2015). Pulp response to high fluoride releasing glass ionomer, silver diamine fluoride, and calcium hydroxide used for indirect pulp treatment: An: in-vivo: comparative study. *Contemporary Clinical Dentistry*, *6*(3), 288–292.
96. Rossi, G., Squassi, A., Mandalunis, P., & Kaplan, A. (2017). Effect of silver diamine fluoride (SDF) on the dentin-pulp complex. Ex vivo histological analysis on human primary teeth and rat molars. *Acta odontologica latinoamericana: AOL*, *30*(1).
97. Reynolds, E. C., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., Walker, G. D., Morgan, M. V., & Reynolds, C. (2008). Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dental Research*, *87*(4), 344-348.
98. Ten Cate, J. M. (2001). Remineralization of caries lesions extending into dentin. *Journal of Dental Research*, *80*(5), 1407–1411.
99. Ten Cate, J. M., Buijs, M. J., Miller, C. C., & Exterkate, R. A. M. (2008). Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. *Journal of dental research*, *87*(10), 943-947.

100. Arends, J., & Growth, J. (1981). Tooth enamel remineralization. *Journal of Crystal Growth*, *53*(1), 135–147.
101. TEN, C., WL, L., & Arends, J. (1981). REMINERALIZATION OF ARTIFICIAL ENAMEL LESIONS IN VITRO IV: INFLUENCE OF FLUORIDES AND DIPHOSPHONATES ON SHORT-AND LONG. *Caries Research*, *15*(1), 60–69.
102. Øgaard, B., Rølla, G., & Arends, J. (1988). Orthodontic appliances and enamel demineralization Part 2. Prevention and treatment of lesions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *94*(2), 123–128.
103. Willmott DR. (2004). White lesions after orthodontic treatment: does low fluoride make a difference? *Taylor & FrancisDR WillmotJournal of Orthodontics, 2004•Taylor & Francis*, *31*(3), 235–242.
104. Fontana, M. (2016). Enhancing fluoride: clinical human studies of alternatives or boosters for caries management. *Caries Research, 50*, *Suppl. 1*, 22–37.
105. Zohoori, F. (2018). Are there good reasons for fluoride labelling of food and drink? *British Dental Journal*, *224*(4), 215–217.
106. Wierichs, R. J., & Meyer-Lueckel, H. (2015). Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *Journal of Dental Research*, *94*(2), 261–271.
107. Robinson, C., Connell, S., & Kirkham, J. (2004). The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Research*, *38*(3), 268–276.
108. Farooq, I. (2020). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Research*, *9*, 171.
109. Sharma, S., & Srivastava, D. (2014). Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Ournal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, *8*(1), 309.
110. Baino, F., & Hamzehlou, S. (2018). Bioactive glasses: where are we and where are we going? *Journal of Functional Biomaterials*, *9*(1), 25.
111. Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, *17*(11), 967–978.
112 Abbasi, Z., & Bahrololoom, M. (2015). Bioactive glasses in dentistry: a review. *Journal of Dental Biomaterials*, *2*(1), 1–9.
113. Ali, S., & Farooq, I. (2014). A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *The Saudi Dental Journa*, *26*(1), 1.
114. Rahaman, M., Day, D., Bal, B., & Fu, Q. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *7*(6), 2355–2373.
115. Abbasi, Z., & Bahrololoom, M. (2015). Bioactive glasses in dentistry: a review. *Journal of Dental Biomaterials*, *2*(1), 1–9.
116. Skallevold, H., & Rokaya, D. (2019). Bioactive glass applications in dentistry. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 5960.
117. Odatsu, T., Azimaie, T., Velten, M. F., Vu, M., Lyles, M. B., Kim, H. K., Aswath, P. B., & Varanasi, V. G. (2015). Human periosteum cell osteogenic differentiation enhanced by ionic silicon release from porous amorphous silica fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *103*(8), 2797–2806.
118. Tabatabaei, F. S., Torres, R., & Tayebi, L. (2019). Biomedical Materials in Dentistry. *Applications of Biomedical Engineering in Dentistry*, 3–20.
119. Kobayashi, M., Saito, H., & Mase, T. (2010). Polarization of hybridized calcium phosphoaluminosilicates with 45S5-type bioglasses. *Biomedical Materials*, *5*(2), 025001.
120. Jafari, N., Habashi, M. S., Hashemi, A., Shirazi, R., Tanideh, N., & Tamadon, A. (2022). Application of bioactive glasses in various dental fields. *Biomaterials Research*, *26*(1).
121. Drago, L., Toscano, M., & Bottagisio, M. (2018). Recent evidence on bioactive glass antimicrobial and antibiofilm activity: A mini-review. *Materials*, *11*(2).
122. Madan, N., Madan, N., Sharma, V., Pardal, D., & Madan, N. (2011). Tooth remineralization using bio-active glass - A novel approach. *Journal of Advanced Oral Research*, *2*(2), 45–50.
123. Wang, Z., Jiang, T., Sauro, S., Pashley, D. H., Toledano, M., Osorio, R., Liang, S., Xing, W., Sa, Y., & Wang, Y. (2011). The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: An in vitro study. *Australian Dental Journal*, *56*(4), 372–381.
124. Bellucci, D., Cannillo, V., & Sola, A. (2011). Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration. *Ceramics International*, *37*(5), 1575–1585.
125. Waltimo, T., Brunner, T. J., Vollenweider, M., Stark, W. J., & Zehnder, M. (2007). Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research*, *86*(8), 754–757.
126. Jones, J. (2015). Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia, 23*, 53–82.

127. Tilocca, A. (2009). Structural models of bioactive glasses from molecular dynamics simulations. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *465*(2104), 1003–1027.
128. Krishnan, V. , L. T. (2013). Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *4*(2), 78–83.
129. Bakry, A. (2019). The efficacy of a bioglass (45S5) paste temporary filling used to remineralize enamel surfaces prior to bonding procedures. *Journal of Dentistry*, *85*, 33–38. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571219300715
130. de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza, F., Silveira, R. E., Abuna, G., Chinelatti, M. A., Alandia-Román, C. C., & Sinhoreti, M. A. C. (2015). Morphology of sealant/enamel interface after surface treatment with bioactive glass. *Microscopy Research and Technique*, *78*(12), 1062–1068.
131. Raszewski, Z., Chojnacka, K., & Mikulewicz, M. (2024). Investigating Bioactive-Glass-Infused Gels for Enamel Remineralization: An In Vitro Study. *Journal of Functional Biomaterials*, *15*(5), 119.
132. Prabhakar, A. (2010). Comparative evaluation of the remineralizing effects and surface micro hardness of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4): an in vitro. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *3*(2), 69.
133. Yli-Urpo, H., & Närhi, M. (2005). Compound changes and tooth mineralization effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4), an in vivo study. *Biomaterials*, *26*(30).
134. Wataha, J. C. (2012). Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*, *28*(1), 23–40.
135. Standard, B. I. B. (2003). Biological evaluation of medical devices—. *Biological Evaluation of Medical Devices*, *1*, 10993.
136. Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). Determination of Biocompatibility. In *Biocompatibility of dental materials, (1),* 13–40.
137. Bianchi, L., & Ribeiro, A. (2013). Transdentinal cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dental Materials*, *29*(9), 980–990.
138. Soares, D., Basso, F., & Hebling, J. (2014). Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *Journal of Dentistry*, *42*(2), 185–198.
139. Lanza, C. R. M., De Souza Costa, C. A., Furlan, M., Alécio, A., & Hebling, J. (2009). Transdentinal diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biology and Toxicology*, *25*(6), 533–543.
140. Grayson, W., Martens, T., & Eng, G. (2009). Biomimetic approach to tissue engineering. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *20*(6), 665–673.
141. Hume, W. R. (1985). A New Technique for Screening Chemical Toxicity to the Pulp from Dental Restorative Materials and Procedures. *Journal of Dental Research*, *64*(11), 1322–1325.
142. HANKS, C. T., WATAHA, J. C., PARSELL, R. R., STRAWN, S. E., & FAT, J. C. (1994). Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *Journal of Oral Rehabilitation*, *21*(4), 475–487.
143. Soares, D. G. S., Ribeiro, A. P. D., Sacono, N. T., Coldebella, C. R., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2011). Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *International Endodontic Journal*, *44*(2), 116–125.
144. Trindade, F. Z., Ribeiro, A. P. D., Sacono, N. T., Oliveira, C. F., Lessa, F. C. R., Hebling, J., & Costa, C. A. S. (2009). Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H 2O2 bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications. *International Endodontic Journal*, *42*(6), 516–524.
145. Schmalz, G., Schuster, U., & Nuetzel, K. (1999). An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *Journal of Endodontics*, *25*, 24–29.
146. Meyer, O. (2003). Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, *140*, 21–30.
147. White, W. J. (2001). The use of laboratory animals in toxicologic research. *HAYES, AW Principles and methods of toxicology*, *4*, 773-818.
148. Anderson, J. M. (2001). Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Science*, *31*, 81–110.
149. de Souza Costa, C. A. H. J. (2000). Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials*, *16*(3), 188–197.
150. Mjör, I. A. (2007). Minimum requirements for new dental materials. *Journal of Oral Rehabilitation*, *34*(12), 907–912.
151. Wataha, J. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *86*(2), 203–209.

152. Allen, C., & Richmond, K. (2011). The Cochrane Collaboration: International activity within Cochrane Review Groups in the first decade of the twenty-first century. *Journal of Evidence-Based Medicine*, *4*(1), 2–7.
153. Kunzmann, A., Andersson, B., & Thurnherr, T. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1810*(3), 361–373.
154. He, Q., & Chemistry, J. S. (2011). Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility. *Journal of Materials Chemistry*, *21*(16), 5845–5855.
155. Soenen, S. J., Manshian, B., Montenegro, J. M., Amin, F., Meermann, B., Thiron, T., Cornelissen, M., Vanhaecke, F., Doak, S., Parak, W. J., De Smedt, S., & Braeckmans, K. (2012). Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano*, *6*(7), 5767–5783.
156. Hanks, C., & Wataha, J. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, *12*(3), 186–193.
157. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, *22*, 6–11.
158. Li, W., & Zhou, J. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, *5*(5), 617–620.
159. De Melo, W., & Maximiano, W. (2013). Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *71*(1), 35–41.
160. Jin, C. Y., Zhu, B. S., Wang, X. F., & Lu, Q. H. (2008). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical Research in Toxicology*, *21*(9), 1871–1877.
161. Sjögren, G., & Sletten, G. (2000). Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *84*(2), 229–236.
162. Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., & Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-γ-treated microglial cells. *European Journal of Immunology*, *17*(9), 1271–1278.
163. Murray, P., & Oral, C. G. G. (2007). How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, *12*(3), 258–266.
164. Wennberg, A., Hasselgren, G., & Tronstad, L. (1979). A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *Journal of Biomedical Materials Research*, *13*(1), 109–120.
165. ISO 7405. (2018). *Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry* (3rd ed.).
166. Oldham, R., & Siwarski, D. (1973). Evaluation of a cell-mediated cytotoxicity assay utilizing 125 iododeoxyuridine-labeled tissue-culture target cells. *National Cancer Institute Monographs*, *37*, 49–58.
167. Tyas, M. J. (1977). A Method for the In Vitro Toxicity Testing of Dental Restorative Materials. *Journal of Dental Research*, *56*(10), 1285–1290.
168. Outhwaite, W. C., Mckenzie, D. M., & Pashley, D. H. (1974). A Versatile Split-chamber Device for Studying Dentin Permeability. *Journal of Dental Research*, *53*(6), 1503.
169. Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1992). Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid. *Journal of the American Ceramic Society*, *75*(8), 2094–2097.
170. Ian, F. (1987). Culture of animal cells: a manual of basic technique. In *Culture of animal cells: a manual of basic technique* (pp. 131–140). Alan R. Liss, Inc.
171. Jenkins, N. (2007). Methods in Biotechnology. In *Animal cell biotechnology* (8th ed., pp. 239–252).
172. Kerr, J., & Wyllie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239-257.
173. Ulukaya, E., Acilan, C., & Ari, F. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry*, *36*(3).
174. Asher, E., Payne, C. M., & Bernstein, C. (1995). Evaluation of cell death in EB v-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy: II. Induction of non-classic apoptosis ("para-apoptosis" by tritiated thymidine. *Leukemia and Lymphoma*, *19*(1–2), 107–119.
175. Vermes, I., & Haanen, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*, *184*(1), 39–51.
176. Özdemir, Ö. (2014). Flow cytometric mast cell-mediated cytotoxicity assay: a three-color flow cytometric approach using monoclonal antibody staining with annexin V/propidium iodide co-labeling to

assess human mast cell-mediated cytotoxicity by fluorosphere-adjusted counts. *Journal of Immunological Methods*, *365*(1–2), 166–173.
177. Ansari, B., Coates, P. J., Greenstein, B. D., & Hall, P. A. (1993). In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *The Journal of Pathology*, *170*(1), 1–8.
178. Ueno, T., Toi, M., & pharmacotherapy, S. L. (2005). Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *59*, 359–362.
179. Janicke, R., & Sprengart, M. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological*, *273*(16), 9357–9360.
180. Gerschenson, L. E., & Rotello, R. J. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *The FASEB Journal*, *6*(7), 2450–2455.
181. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl- 2 regulation of apoptosis. *Science*, *275*(5303), 1132–1136.
182. Güleş, Ö. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *19*(2), 73–78.
183. González, D., Espino, J., Bejarano, I., López, J. J., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2010). Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *333*(1–2), 151–157.
184. Sakamoto-Hojo, E., & Mello, S. (2003). Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *544*(2–3), 403–413.
185. Mornet, E., Stura, E., & Lia-Baldini, A. (2001). Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *Journal of Biological Chemistry*, *3276*(33), 31171–31178.
186. Benham, F., Cottell, D. C., Franks, L. M., & Wilson, P. D. (1977). Alkaline phosphatase activity in human bladder tumor cell lines. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *25*(4), 266–274.
187. McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., & Posen, S. (2013). *Alkaline phosphatase*. Springer Science & Business Media.
188. Weiss, M. J., Henthorn, P. S., Lafferty, M. A., Slaughter, C., Raducha, M., & Harris, H. (1986). Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(19), 7182–7186.
189. Mitchell, T. C., Meikle, A. W., Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2013). Adrenal function. *Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 7th edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins*, 453-71.
190. McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., & Posen, S. (2013). *Alkaline phosphatase*. Springer Science & Business Media.
191. Robison, R. (1932). *The significance of phosphoric esters in metabolism.*
192. Kay, H. (1929). Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of bone. *British Journal of Experimental Pathology*, *10*(4), 253.
193. Gutman, A. B., & Gutman, E. B. (1935). Paget's Disease: Relative Constancy of Serum Phosphatase Levels over Periods up to Two Years. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *33*(1), 150–153.
194. Siller, A., Research, M. W.-J. of B. and M., & 2018, undefined. (2017). Alkaline phosphatase: discovery and naming of our favorite enzyme. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(2), 362–364.
195. Whyte, M. P. (2010). Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*(1), 190-200.
196. Magnusson, P., Larsson, L., Magnusson, M., Davie, M. W. J., & Sharp, C. A. (1999). Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, *14*(11), 1926–1933.
197. Badger, K. S., & Sussman, H. H. (1976). Structural evidence that human liver and placental alkaline phosphatase isoenzymes are coded by different genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(7), 2201–2205.
198. Kam, W., Clauser, E., Kim, Y. S., Kan, Y. W., & Rutter, W. J. (1985). Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(24), 8715–8719.
199. Yoshiki, S., Kurahashi, Y., & 1971, undefined. (1971). A light and electron microscopic study of alkaline phosphatase activity in the early stage of dentinogenesis in the young rat. *Archives of Oral Biology*, *16*(16(10)), 1143–1154.
200. *ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. (n.d.). Retrieved February 2, 2025, from https://www.iso.org/standard/36406.html

201. Ciraldo, F., Boccardi, E., & Melli, V. (2018). Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. *Acta Biomaterialia*, *75*, 3–10.
202. Crystal, Y. O., & Niederman, R. (2019). Evidence-based dentistry update on silver diamine fluoride. *Dental Clinics of North America*, *63*(1), 45.
203. Guler, E., Sisman, B., & Kocyigit, A. (2021). Investigation of cellular effects of thymoquinone on glioma cell. *Toxicology Reports*, *8*, 162–170.
204. Kocyigit, A., Biology, E. G.-C. and M., & 2017, undefined. (2017). Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer. *Cellular and Molecular Biology*, *63*(11), 97–105.
205. Dinc, D., Seyhan, M. F., & Aktoren, O. (2024). Cytotoxicity and Alkaline Phosphatase Activity of Curcumin, Aloin and MTA on Human Dental Pulp Cells. *Indian Journal of Dental Research*, *35*(2), 216-220.
206. Petersen, P. E. (2003). The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *31*(SUPPL. 1), 3–24.
207. Petersen, P. E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., & Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, *83*(9), 661–669.
208. Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. (2015). *Dental caries: the disease and its clinical management* (B. N. E. K. Ole Fejerskov, Ed.). john Wiley & Sons.
209. Mjör, I. (2000). Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence International*, *31*(3).
210. CRD, N. (1999). NHS Centre For Reviews and Dissemination. Dental... - Google Akademik. *Effective Health Care*, *5*(2), 1–12.
211. Zero, D. T. (2006). Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies (9, Trans.). *BMC Oral Health*, *6*(SUPPL. 1).
212. Ellwood, R. P., Davies, G. M., Worthington, H. V., Blinkhorn, A. S., Taylor, G. O., & Davies, R. M. (2004). Relationship between area deprivation and the anticaries benefit of an oral health programme providing free fluoride toothpaste to young children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *32*(3), 159–165.
213. Davies, G., & Worthington, H. (2003). An assessment of the cost effectiveness of a postal toothpaste programme to prevent caries among five-year-old children in the North West of England. *Community Dental Health*, *20*(4), 207–210.
214. Davies, G., & Worthington, H. (2002). A randomised controlled trial of the effectiveness of providing free fluoride toothpaste from the age of 12 months on reducing caries in 5-6-year-old children. *Community Dental Health*, *19*(3), 131–136.
215. Marquis, R. E. (1995). Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(11), 955–964.
216. Pandit, S., Kim, H. J., Song, K. Y., & Jeon, J. G. (2013). Relationship between Fluoride Concentration and Activity against Virulence Factors and Viability of a Cariogenic Biofilm: in vitro Study. *Caries Research*, *47*(6), 539–547.
217. Pandit, S., Kim, J. E., Jung, K. H., Chang, K. W., & Jeon, J. G. (2011). Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of Streptococcus mutans biofilms. *Archives of Oral Biology*, *56*(7), 643–649.
218. Koo, H., & Sheng, J. (2006). Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyl transferase production and polysaccharide synthesis by mutans streptococci in suspension cultures and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, *254*(1), 134–140.
219. Jiang, C., Duangthip, D., & Chan, A. (2021). Global research interest regarding silver diamine fluoride in dentistry: a bibliometric analysis. *Journal of Dentistry*, *113*, 103778.
220. Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2018). Caries-arresting effects of silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *Journal of Dentistry*, *78*, 65–71.
221. Zhang, J., Got, S., Yin, I., & Lo, E. (2021). A concise Review of silver diamine fluoride on oral biofilm. *Applied Sciences*, *11*(7).
222. Yamaga, R. (1969). Arrestment of caries of deciduous teeth with diamine silver fluoride. *Dental Outlook*, *33*, 1007–1013.
223. Seifo, N., Robertson, M., Maclean, J., Blain, K., Grosse, S., Milne, R., Seeballuck, C., & Innes, N. (2020). The use of silver diamine fluoride (SDF) in dental practice. *British Dental Journal*, *228*(2), 75–81.
224. Slayton, R. L., Urquhart, O., Araujo, M. W. B., Fontana, M., Guzmán-Armstrong, S., Nascimento, M. M., Nový, B. B., Tinanoff, N., Weyant, R. J., Wolff, M. S., Young, D. A., Zero, D. T., Tampi, M. P., Pilcher, L., Banfield, L., & Carrasco-Labra, A. (2018). Evidence-based clinical practice guideline on

nonrestorative treatments for carious lesions: A report from the American Dental Association. *Journal of the American Dental Association*, *149*(10), 837-849.
225. Crystal, Y. O., Marghalani, A. A., Ureles, S. D., Timothy Wright, J., Sulyanto, R., Divaris, K., Fontana, M., & Graham, L. (2017). Use of silver diamine fluoride for dental caries management in children and adolescents, including those with special health care needs. *Pediatric Dentistry*, *39*(5), 135–145.
226. Gao, S., Zhang, S., Mei, M., Lo, E., health, C. C.-B. oral, & 2016, undefined. (2016). Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment–a systematic review. *SpringerSS Gao, S Zhang, ML Mei, ECM Lo, CH ChuBMC Oral Health*, *16*(1).
227. Chu, C. H., Lee, A. H. C., Zheng, L., Mei, M. L., & Chan, G. C. F. (2014). Arresting rampant dental caries with silver diamine fluoride in a young teenager suffering from chronic oral graft versus host disease post-bone marrow transplantation: A case report. *BMC Research Notes*, *7*(1).
228. Tan, H. P., Lo, E. C. M., Dyson, J. E., Luo, Y., & Corbet, E. F. (2010). A randomized trial on root caries prevention in elders. *Journal of Dental Research*, *89*(10), 1086–1090.
229. Mei, M., Nudelman, F., … B. M.-J. of dental, & 2017, undefined. (2017). Formation of fluorohydroxyapatite with silver diamine fluoride. *Journals.Sagepub.ComML Mei, F Nudelman, B Marzec, JM Walker, ECM Lo, AW Walls, CH ChuJournal of Dental Research*, *96*(10), 1122–1128.
230. Zaeneldin, A., & Ollie, Y. (2022). Effect of silver diamine fluoride on vital dental pulp: A systematic review. *Journal of Dentistry*, *119*, 104066.
231. Kim, S., Nassar, M., & Tamura, Y. (2021). The effect of reduced glutathione on the toxicity of silver diamine fluoride in rat pulpal cells. *Journal of Applied Oral Science*, *29*, e20200859.
232. Hu, S., Muniraj, G., Mishra, A., Hong, K., & Lum, J. (2022). Characterization of silver diamine fluoride cytotoxicity using microfluidic tooth-on-a-chip and gingival equivalents. *Dental Materials*, *38*(8), 1385–1394.
233. Biesbrock, A., & Faller, R. (1998). Reversal of incipient and radiographic caries through the use of sodium and stannous fluoride dentifrices in a clinical trial. *The Journal of Clinical Dentistry*, *9*(1), 5–10.
234. tenCate, J. M. ,. (1978). Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Research*, *12*(4), 213–222.
235. Bakry, A., Takahashi, H., & Otsuki, M. (2014). Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 bioglass. *Dental Materials*, *30*(3), 314–320.
236. Bakry, A., Marghalani, H., & Amin, O. (2014). The effect of a bioglass paste on enamel exposed to erosive challenge. *Journal of Dentistry*, *42*(11), 1458–1463.
237. Meshki, R., Ghahramani, N., … M. K.-J. of, & 2024, undefined. (2024). Comparison of the Effect of Bioglass, Chitosan, and SDF Compounds on Remineralization of Primary Caries Lesions in Primary Teeth: An in vitro Study. *Journal of Dentistry (Shiraz)*, *25*(3), 229–235.
238. Samir Bakry, A., Tamura, Y., Otsuki, M., Kasugai, S., Ohya, K., & Tagami, J. (2011). Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment. *Journal of Dentistry*, *39*(9), 599–603.
239. Benetti, F., de Oliveira, P. H. C., de Andrade, M. P. B., Cantiga-Silva, C., Sivieri-Araújo, G., Dezan Júnior, E., Gomes-Filho, J. E., Diniz, I. M. A., dos Reis-Prado, A. H., Souza, M. T., Zanotto, E. D., & Cintra, L. T. A. (2024). Cytotoxicity, Biocompatibility, and Calcium Deposition Capacity of 45S5 Bioglass Experimental Paste and Bio-C Temp: In Vitro and In Vivo Study Using Wistar Rats. *Journal of Functional Biomaterials 2024, Vol. 15, Page 184*, *15*(7), 184.
240. Ali, E., Neel, A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 4743–4763.
241. Núñez-Toldrà, R., Montori, S., Bosch, B., Hupa, L., Atari, M., & Miettinen, S. (2019). S53P4 Bioactive Glass Inorganic Ions for Vascularized Bone Tissue Engineering by Dental Pulp Pluripotent-Like Stem Cell Cocultures. *Tissue Engineering. Part A*, *25*(17–18), 1213–1224.
242. Black, J., & Black, J. (2005). Biological Performance of Materials. *Biological Performance of Materials*.
Wagner, M., Kohler, H., Van Kooten, T. G., Klein, C. L., & Otto, M. (1998). Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *212*(2), 75–84.
244. Shahi, S., Özcan, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., Al-Haj Husain, N., Eftekhari, A., & Ahmadian, E. (2019). A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Taylor & FrancisS Shahi, M Özcan, S Maleki Dizaj, S Sharifi, N Al-Haj Husain, A Eftekhari, E AhmadianToxicology Mechanisms and Methods, 29*(5), 368–377.
245. Sakaguchi, R., & Powers, J. (2018). *Craig's Restorative Dental Materials-E-Book: Craig's Restorative Dental Materials-E-Book* (14th ed.).

246. Cvikl, B., Lussi, A., Skinner, J., & Gwynne, K. (2021). The Biocompatibility of a New Erythritol-and Xyltol-Containing Fluoride Toothpaste. Healthcare 2021, 9(8), 935.
247. Mathirat, A., Dalavi, P., & Prabhu, A. (2022). Remineralizing Potential of Natural Nano-Hydroxyapatite Obtained from Epinephelus chlorostigma in Artificially Induced Early Enamel Lesion: An In Vitro Study. *Nanomaterials (Basel)*, *12*(22), 3993.
248. Taira, M., & Nakao, H. (2000). Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Journal of Prosthodontics, 13*(4), 311–315.
249. Thonemann, B., Schmalz, G., & Hiller, K. (2002). Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, *18*(4), 318–323.
250. Hensten-Pettersen, A. (1998). Skin and mucosal reactions associated with dental materials. *European Journal of Oral Sciences*, *106*(2 Pt 2), 707–712.
251. Wataha, J., Lockwood, P., & Bouillaguet, S. (2003). In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dental Materials*, *19*(1), 25–31.
252. Hanada, K., Morotomi, T., Washio, A., Yada, N., Matsuo, K., Teshima, H., Yokota, K., & Kitamura, C. (2019). In vitro and in vivo effects of a novel bioactive glass-based cement used as a direct pulp capping agent. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *107*(1), 161–168.
253. Cao, T., Saw, T. Y., Heng, B. C., Liu, H., Yap, A. U. J., & Ng, M. L. (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*, *25*(2), 101–108.
254. Brito, A. F., ıgida Antunes, B., dos Santos, F., Fernandes, H. R., & F Ferreira, J. M. (2016). Osteogenic capacity of alkali-free bioactive glasses. In vitro studies. *Wiley Online LibraryAF Brito, B Antunes, F Dos Santos, HR Fernandes, JMF FerreiraJournal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 105*(8), 2360–2365.
255. Hench, L. L., Jones, J. R., & Sepulveda, P. (2002). Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds. *Future Strategies for Tissue and Organ Replacement*, 3–24.
256. Karadjian, M., Essers, C., Tsitlakidis, S., Reible, B., Moghaddam, A., Boccaccini, A. R., & Westhauser, F. (2019). Biological properties of calcium phosphate bioactive glass composite bone substitutes: current experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2).
257. Schmitz, S., Widholz, B., & Essers, C. (2020). Superior biocompatibility and comparable osteoinductive properties: Sodium-reduced fluoride-containing bioactive glass belonging to the CaO–MgO–SiO2. *Bioactive Materials*, *5*(1), 55–65.
258. Westhauser, F., Hohenbild, F., Arango-Ospina, M., Schmitz, S. I., Wilkesmann, S., Hupa, L., Moghaddam, A., & Boccaccini, A. R. (2020). Bioactive glass (BG) ICIE16 shows promising osteogenic properties compared to crystallized 45S5-BG. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1639.
259. Pryce, R., & Hench, L. (2003). Dissolution characteristics of bioactive glasses. *Key Engineering Materials*, *240–242*, 201–204.
260. Lin, Y., Xiao, W., & Bal, B. (2016). Effect of copper-doped silicate 13–93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells in vitro and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, *67*, 440–452.
261. Detsch, R., Guillon, O., Wondraczek, L., & Boccaccini, A. R. (2012). Initial attatchment of rMSC and MG-63 cells on patterned bioglass ® substrates. *Advanced Engineering Materials*, *14*(3).
262. Hohenbild, F., & Arango-Ospina, M. (2020). Preconditioning of bioactive glasses before introduction to static cell culture: what is really necessary? *Methods and Protocols*, *3*(2), 38.
263. Buxser, S., biochemistry, S. V.-A., & 2005, undefined. (2005). Calculating the probability of detection for inhibitors in enzymatic or binding reactions in high-throughput screening. *Analytical Biochemistry*, *340*(1), 1–13.
264. Inglese, J., Auld, D. S., Jadhav, A., Johnson, R. L., Simeonov, A., Yasgar, A., Zheng, W., & Austin, C. P. (2006). Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(31), 11473–11478.
265. Xia, M., Huang, R., & Witt, K. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3), 284–291.
266. García-Bernal, D., & Pecci-Lloret, M. (2022). The Cytocompatibility of Silver Diamine Fluoride on Mesenchymal Stromal Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: An In Vitro Study. *Materials*, *15*(6), 2104.
267. López-García, S., Sanz, J., & Oñate-Sánchez, R. (2024). In vitro biocompatibility of ammonia-free silver fluoride products on human dental pulp stem cells. *Tissue and Cell*, *86*, 102283.

268. Qazi, T. H., Hafeez, S., Schmidt, J., Duda, G. N., Boccaccini, A. R., & Lippens, E. (2017). Comparison of the effects of 45S5 and 1393 bioactive glass microparticles on hMSC behavior. *Wiley Online LibraryTH Qazi, S Hafeez, J Schmidt, GN Duda, AR Boccaccini, E LippensJournal of Biomedical Materials Research Part A 105*(10), 2772–2782
269. Westhauser, F., Arango-Ospina, M., Hupa, L., Renkawitz, T., Boccaccini, A. R., & Kunisch, E. (2024). A comparative analysis of the cytocompatibility, protein adsorption, osteogenic and angiogenic properties of the 45S5-and S53P4-bioactive glass compositions. *Biomedical Materials*, *19*(2), 25027.
270. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews*, *55*(4), 597–606.
271. Ugarte, S. D., Lin, E., Klann, E., Zigmond, M. J., & Perez, R. G. (2003). Effects of GDNF on 6-OHDA-induced death in a dopaminergic cell line: Modulation by inhibitors of PI3 kinase and MEK. *Journal of Neuroscience Research*, *73*(1), 105–112.
272. Leak, R. K., Liou, A. K. F., & Zigmond, M. J. (2006). Effect of sublethal 6-hydroxydopamine on the response to subsequent oxidative stress in dopaminergic cells: Evidence for preconditioning. *Journal of Neurochemistry*, *99*(4), 1151–1163.
273. Hoskins, C., Wang, L., & Cheng, W. (2012). Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticle engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Research Letters*, *7*(1), 77.
274. Unnithan, A. S., Choi, H. J. H., Titler, A. M., Posimo, J. M., & Leak, R. K. (2012). Rescue from a two hit, high-throughput model of neurodegeneration with N-acetyl cysteine. *Neurochemistry International*, *61*(3), 356–368.
275. Essner, M. D., Javed, A., & Eleazer, P. D. (2011). Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: An in vitro study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *112*(5), 662–666.
276. Crouch, S., & Kozlowski, R. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, *160*(1), 81–88.
277. Kangas, L., & Grönroos, M. (1984). Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Medical Biology*, *62*(6), 338–343.
278. Cree, I., & vitro, P. A. (1997). Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicology in Vitro*, *11*(5), 553–556.
279. Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLOS ONE*, *5*(4), e10202.
280. Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, *10*(1), 29–34.
281. Chen, Q. I., & Cederbaum, A. I. (1998). Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Molecular Pharmacology*, *53*(4), 638–648.
282. Bolt, M. W., Racz, W. J., Brien, J. F., & Massey, T. E. (2001). Effects of vitamin E on cytotoxicity of amiodarone and N-desethylamiodarone in isolated hamster lung cells. *Toxicology*, *166*(3), 109–118.
283. Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, *2*(1), 51–62.
284. Cytol, W. A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, *68*, 251–306.
285. Fink, S., immunity, B. C.-I. and, & 2005, undefined. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, *73*(4), 1907–1916.
286. Majno, G. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, *146*(1), 3–15.
287. Gasiorowski, K., & Brokos, B. (2001). A comparison of the methods applied to detect apoptosis in genotoxically-damaged lymphocytes cultured in the presence of four antimutagens. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *6*(2), 141–159.
288. Savitskiy, V. P., Shman, T. V., & Potapnev, M. P. (2003). Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *56*(1), 16-22.
289. Leite, M., Quinta-Costa, M., Leite, P. S., & Guimarães, J. E. (1999). Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death–study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Analytical Cellular Pathology*, *19*(3-4), 139-151.

290. Pläsier, B., Lloyd, D., & Paul, G. (1999). Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *Elsevier*, *229*(1–2).
291. Schutte, B., Nuydens, R., … H. G.-J. of neuroscience, & 1998, undefined. (1998). Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *ElsevierB Schutte, R Nuydens, H Geerts, F RamaekersJournal of Neuroscience Methods, 1998•Elsevier*, *86*, 63–69.
292. Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., & Arsenijević, N. N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*, *30*(11), 924–932.
293. Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Overview of ELISA | Thermo Fisher Scientific - TR*. Retrieved February 10, 2025.
294. SouthernBiotech. (2025). *Introduction to ELISA - SouthernBiotech*.
295. Zhang, Z., Chen, Z., Wang, S., Cheng, F., & Chen, L. (2015). Iodine-Mediated Etching of Gold Nanorods for Plasmonic ELISA Based on Colorimetric Detection of Alkaline Phosphatase. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*(50), 27639–27645.
296. Arora, S., Cooper, P. R., Ratnayake, J. T., Lara, |, Friedlander, T., Rizwan, S. B., Seo, | Benedict, & Hussaini, H. M. (2022). A critical review of in vitro research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell cultures. *International Endodontic Journal, 55*(S1), 3–13.
297. Ho, Y., Gyurko, R., Uzel, N. G., Steeensen, B., Xenoudi, P., Loo, C., & Zoukhri, D. (2022). An In Vitro Pilot Study on the Effects of Silver Diamine Fluoride on Periodontal Pathogens and Three-Dimensional Scaffolds of Human Fibroblasts and Epithelial Cells. *International Journal of Dentistry*, *2022*, 9439096.
298. Comar, E. (2014). *Interactions of 45s5 bioactive glass with the dentine-pulp complex* (Doctoral dissertation, University of Birmingham).
299. Maeno, S., Niki, Y., Matsumoto, H., & Morioka, H. (2005). The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*, *26*(23).
300. Saravanapavan, P., Jones, J. R., Verrier, S., Beilby, R., Shirtliff, V. J., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2004). Binary CaO-SiO 2 gel-glasses for biomedical applications. *Bio-Medical Materials and Engineering*, *14*(4), 467–486.
301. Green, D., & JC Reed. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, *281*(5381), 1309–1312.
302. Bang, S. J., Jun, S. K., Kim, Y. J., Ahn, J. Y., Vu, H. T., Mandakhbayar, N., ... & Lee, J. H. (2022). Characterization of physical and biological properties of a caries-arresting liquid containing copper doped bioglass nanoparticles. *Pharmaceutics*, *14*(6), 1137.
303. Espíndola-Castro, L. F., de Oliveira Ribeiro, R. A., de Souza Costa, C. A., Rosenblatt, A., Galembeck, A., & de Melo Monteiro, G. Q. (2024). Evaluation of the cytotoxicity of new formulations of cariostatic agents containing nano silver fluoride: an in vitro study. *Odontology*, 1-11.
304. Nakade, O., Koyama, H., Arai, J., Ariji, H., Takada, J., & Kaku, T. (1999). Stimulation by low concentrations of fluoride of the proliferation and alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, *44*(1), 89–92.
305. Gong, W., Huang, Z., Dong, Y., Gan, Y., Li, S., Gao, X., & Chen, X. (2014). Ionic extraction of a novel nano-sized bioactive glass enhances differentiation and mineralization of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, *40*(1), 83–88.
306. MačKović, M., Hoppe, A., Detsch, R., Mohn, D., Stark, W. J., Spiecker, E., & Boccaccini, A. R. (2012). Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: In vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(7), 1–22.
307. Hashem Mahran, A., Yehia Abdelrahman, T., & Gamal Ali, H. (2022). Effect of Bioactive Glass Nano Particulates and Nano Hydroxyapatite Coated by Chitosan on Odontogenic Differentiation and Proliferation of human Dental Pulp Stem Cells. *Egyptian Dental Journal*, *68*(3), 2985–2994.
308. Ojansivu, M., Mishra, A., Vanhatupa, S., Juntunen, M., Larionova, A., Massera, J., & Miettinen, S. (2018). The effect of S53P4-based borosilicate glasses and glass dissolution products on the osteogenic commitment of human adipose stem cells. *PLoS One*, *13*(8), e0202740.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 11.09.2023-21279

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 01.09.2023
Toplantı Sayısı : 2023/16
Karar Sayısı : 16/2

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan Prof. Dr. Günseli Güven Polat'ın sorumlu, Doç. Dr. Eray Metin Güler ve Deniz Tarakcıoğlu'nun yardımcı araştırmacı olduğu 23/207 kayıt numaralı ***"GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR ve İKİFARKLI BİYOAKTİF CAMIN FARE FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDE SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ ve ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNE OLAN ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 1.09.2023 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Papatya KELEŞ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Selda RIZALAR
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Erhan ALABAY
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ÖZYAZICI
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Şükran ÖZDATLI KURTULUŞ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan DEMİRCİ
Öğretim Üyesi

04.09.2023 Memur

Feyzanur SEZGİN

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSLKZA3545&eS=21279

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.