



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİR FİBERLE GÜÇLENDİRİLMİŞ KOMPOZİTİN  
YIRMİ YAŞ DIŞINDAN İZOLE EDİLEN  
PULPAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

Zeliha Merve DEMİRAY

Mayıs 2022  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR FİBERLE GÜÇLENDİRİLMİŞ KOMPOZİTİN  
YİRMİ YAŞ DIŞINDAN İZOLE EDİLEN  
PULPAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeliha Merve DEMİRAY

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Başak YAZKAN

Denizli, 2022



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Zeliha Merve Demiray

İmza:

## ÖZET

**BİR FİBERLE GÜÇLENDİRİLMİŞ BİR KOMPOZİTİN YİRMİ YAŞ  
DİŞİNDEN İZOLE EDİLEN PULPAL KÖK HÜCRELER  
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Zeliha Merve DEMİRAY  
Yüksek Lisans Tezi, Kök Hücre AD  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Başak YAZKAN

Mayıs 2022, 47 Sayfa

Dental materyaller, klinik kullanıma girmeden önce, materyalin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, *in vitro* testlerle değerlendirilmeli ve sonrasında yapılacak hayvan deneylerinden elde edilecek sonuçlarla, ilgili materyalin toksisitesi tespit edilmelidir. Bu çalışmada insan yirmi yaş dişi dental pulpasından kök hücre elde edilerek farklı tip akışkan kompozit rezinlerin elde edilen kök hücreler üzerindeki sitotoksitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Etik kurul onayı alındıktan sonra sağlıklı bir gönüllüden steril koşullar altında insan yirmi yaş dişi alınarak, pulpa dokusu çıkarılıp eksplant metodu ile kültüre edildi. Üç pasajlamanın ardından mezenkimal kök hücre tayini için akım sitometri analizi yapıldı. Bununla birlikte, mezenkimal kök hücreleri karakterize etmek amacıyla adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaştırma deneyleri uygulandı. Akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri sonucunda elde edilen kök hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu belirlendi.

Fiberle güçlendirilmiş bir kompozit rezin, yüksek vizkoziteli bir akışkan kompozit rezin ve düşük vizkoziteli bir akışkan kompozit rezinin materyal ekstraktları elde edildi. Dental pulpa kök hücreleri (DPKH), 24, 48 ve 72 saat olmak üzere hazırlanan materyal ekstraktlarına maruz bırakıldı. Sitotoksite değerlendirmesi BrdU test yöntemiyle yapıldı ve hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA ve post hoc Duncan testi kullanılarak yapıldı ( $p < 0.05$ ).

Tüm inkübasyon periyotlarında ve tüm seyreltme konsantrasyonlarında hücre canlılık değerlerinin; yüksek vizkoziteli akışkan kompozit> fiberle güçlendirilmiş kompozit> düşük vizkoziteli akışkan kompozit sırasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

Bu çalışmanın sonuçları dahilinde derin kavitelerde kaide olarak fiberle güçlendirilmiş kompozit rezinin düşük sitotoksite göstermiş olması nedeniyle klinikte güvenle kullanılabileceği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sitotoksite, Dental Pulpa Kök Hücresi, Kök hücre, Farklılaştırma

**Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje no: 2020SABE025) desteklenmiştir.**

**ABSTRACT****EXAMINATION OF THE CYTOTOXICITY OF A FIBER-REINFORCED COMPOSITE ON PULPAL STEM CELLS ISOLATED FROM WISDOM TOOTH**

Zeliha Merve DEMİRAY  
M. Sc. Thesis in Stem Cell  
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Başak YAZKAN

May 2022, 47 Pages

Dental materials, before entering clinical use, the potential harmful effects of the material on oral tissues should be evaluated by in vitro tests, and then the toxicity of the relevant material should be determined by the results of animal experiments to be performed. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxicity of different types of flowable composite resins on stem cells obtained by stem cells from a human wisdom tooth dental pulp.

After receiving the approval of the ethics committee, a human wisdom tooth was taken from a healthy volunteer under sterile conditions, pulp tissue was removed and cultured using the explant method. After three passages, flow cytometry analysis was performed to determine mesenchymal stem cells. Adipogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation experiments were performed to characterize mesenchymal stem cells. As a result of flow cytometry analysis and differentiation experiments, it was determined that the stem cells obtained were mesenchymal stem cells.

Material extracts of a fiber-reinforced composite resin, a high-viscosity flowable composite resin and a low-viscosity flowable composite resin were obtained. Dental pulp stem cells (DPKH) were exposed to the prepared material extracts for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity assessment was done by BrdU test method and cell viability percentages were calculated. Statistical evaluation was performed using one-way ANOVA and post hoc Duncan test ( $p < 0.05$ ).

It was determined that the cell viability values decreased statistically significantly at all incubation periods and at all dilution concentrations; high viscosity fluid composite > fiber reinforced composite > low viscosity fluid composite ( $p < 0.05$ ).

Within the results of the present study, it can be said that fiber reinforced composite resin can be safely used in the clinic as a base in deep cavities due to its low cytotoxicity.

**Keywords:** Cytotoxicity, Dental pulp stem cell, Stem cell, Differentiation

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Fund (Project no: 2020SABE025).**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım, tez içeriğinin düzenlenmesinde ve sonuçlarının yorumlanmasında verdiği destekten dolayı başta tez danışman hocam Pamukkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Başak YAZKAN' a,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren desteklerini ve bilgi paylaşımını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin Abban METE' ye,

Tez çalışmamın tüm deney sürecinde ve devamında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yol göstericim olan çok sevgili ve saygıdeğer hocam Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Nazlı ÇİL' e

Tez çalışmamın farklılaştırma deneyleri aşamasında yardımlarını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant Ünal' a

Tez çalışmama tecrübeleri ile katkıda bulunan misafir jüri üyesi hocam Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Günseli KATIRCI' ya

Tez çalışmamın deney aşaması ve tez yazım aşamasında, bilgi birikimi ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Şiyzen CİNKAYA ve Uzm. Dr. Elif ÖNDER' e

Tez çalışmamın yürütülmesi sürecinde maddi destek sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne

Yüksek Lisans sürecim boyunca her koşulda yanımda olan en büyük destekçim sevgili eşim Halil İbrahim DEMİRAY' a ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan ilk öğretmenlerim olan annem Mükerrerem KÜTÜKCÜ ve babam Mustafa KÜTÜKCÜ' ye teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kök Hücreler.....	3
2.1.1. Mezenkimal kök hücreler .....	3
2.2. Dental Pulpa Kök Hücreleri.....	4
2.2.1. Dental pulpa kök hücrelerinin genel özellikleri .....	4
2.2.2. Dental pulpa kök hücrelerinin immunofenotipik özellikleri .....	4
2.2.3. Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu .....	4
2.2.4. Dental pulpa kök hücrelerinin kültürü .....	5
2.3. Kök Hücrelerin Farklılaştırılması .....	5
2.4. Diş Hekimliğinde Kompozit Rezinler .....	5
2.4.1. Fiberle güçlendirilmiş kompozit rezinler .....	6
2.5. Restoratif Materyallerde Biyouyumluluk .....	7
2.5.1. Sitotoksosite .....	8
2.5.2. Sitotoksosite değerlendirme yöntemleri .....	8
2.6. Hipotez .....	8
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>9</b>
3.1. İnsan Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü .....	9
3.2. Akım Sitometri ile İnsan Diş Pulpa MKH Karakterizasyonu .....	10
3.3. Farklılaşma Testleri .....	10
3.3.1. Osteojenik farklılaşma .....	10
3.3.2. Adipojenik farklılaşma.....	11
3.3.3. Kondrojenik farklılaşma .....	11
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	11
3.5. Materyal Örneklerinin Hazırlanması .....	12
3.6. Materyal Ekstraktlarının Hazırlanması .....	13
3.7. Canlılık Testinin Uygulanması .....	13



3.7.1. BrdU Canlılık Testi Uygulaması .....	14
3.8. İstatistiksel Analiz .....	16
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>17</b>
4.1. Akım Sitometri Bulguları .....	17
4.2. Farklılaştırma Testleri Bulguları .....	17
4.2.1. Osteojenik besi yeri kullanılarak farklılaşmanın indüklenmesi .....	17
4.2.2. Kondrojenik Besi Yeri Kullanılarak Farklılaşmanın İndüklenmesi .....	18
4.2.3. Adipojenik besi yeri kullanılarak farklılaşmanın indüklenmesi .....	19
4.3. Sitotoksisite Analizi Bulguları .....	20
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>23</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>28</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>29</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>34</b>
<b>9. EKLER</b>	

Ek 1. Etik Kurul Onayı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 3.5.</b> Ekstrakt testi materyalleri .....	12
<b>Şekil 3.7.1.</b> Hücre kültür kabında materyallerin sıralaması .....	15
<b>Şekil 3.7.2.</b> Örneklerin absorbands okumasının yapıldığı Elisa cihazı .....	16
<b>Şekil 4.1.</b> İnsan DPKH akım sitometri ile immünofenotiplendirilmesi .....	17
<b>Şekil 4.2.1.</b> Standart besi yeri uygulanmış DPKH'lerde kontrol grupları (a1, a2), Osteojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Alizarin red boyama ile gösterimi (b1, b2). Mikroskop büyütmesi 10x. ....	18
<b>Şekil 4.2.2.</b> Standart besi yeri uygulanmış DPKH'lerde kontrol grupları (c1, c2), Kondrojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Alisan mavi boyama ile gösterimi (d1, d2). Mikroskop büyütmesi 10x. ....	19
<b>Şekil 4.2.3.</b> Standart besi yeri uygulanmış DPKH' llerde kontrol grupları (e1, e2), Adipojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Oil red boyama ile gösterimi (f1, f2). Mikroskop büyütmesi 10x. ....	20

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 3. 1.</b> Kullanılan restoratif materyallere ilişkin LOT, üretici firma ve kimyasal içerik bilgisi. ....	13
<b>Tablo 4. 1.</b> 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon periyotlarından sonra her bir seyreltme konsantrasyonunda her grup için kök hücrelerinin yüzde canlılığının ortalama ve standart sapma değerleri .....	22

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

°C:	Santigrat Derece
cc:	Santrimetreküp
µM:	Mikromolar
µl:	Mikrolitre
ml:	Mililitre
M:	Molar
mM:	Milimolar
DPKH:	Dental Pulpa Kök Hücresi
MKH:	Mezenkimal Kök Hücre
DMSO:	Dimetil sülfoksit
BrdU:	5-bromo-2-deoxyuridine
PBS:	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
FBS:	Fetal Bovine Serum
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium

## 1. GİRİŞ

Dental materyaller, klinik kullanıma girmeden önce, materyalin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, *in vitro* testlerle değerlendirilmeli ve daha sonrasında yapılacak hayvan deneylerinden elde edilecek sonuçlarla, ilgili materyalin toksisitesi tespit edilmelidir (Saraste ve Pulkki 2000). Hücre kültürü ile yapılan uygulamalar *in vitro* testlerdir ve sıklıkla tercih edilmektedir. Materyalin sitotoksitesinin tespit edilebilmesinde doğru veri elde edilebilmesi için *in vitro* deneyler, hayvan deneyleri ve klinik kullanım testleri birlikte uygulanmalıdır. Hücre kültüründe dental materyallerin sitotoksitesinin tespit edilmesinde elde edilmesinin kolay olması sebebiyle sıklıkla tercih edilen kök hücreler dental pulpa kök hücreleridir. Rutin tedavide çekilen dişlerin kolaylıkla kullanılabilir olması sebebiyle de etik kaygılar barındırmamaktadır.

Kompozit rezinlerin polimerizasyonunun tam gerçekleşmemesi nedeniyle salınan artık monomerler, tedavinin uygulanmasını takiben tükürük, dentin ve pulpada saptanmıştır (D'Alpino vd 2017). Bu monomerlerin pulpa dokusu ve oral mukozada zararlı etkilere yol açtığı bildirilmiştir (Schmalz vd 2002). Artık monomer miktarı az olduğu için bu materyallerin sistemik toksisite geliştirme riski çok düşük olduğu, bununla birlikte, dentin kanalları ve sıvısı vasıtasıyla pulpa dokusuna difüze olan bileşenlerin konsantrasyonunun lokal toksisite meydana getirebilecek düzeylerde olduğu gösterilmiştir (Hamid vd 1998). Fiberle güçlendirilmiş kompozitler, derin kaviteelerde kompozit rezinlerin altında uygulandığında dentin dokusunun yerini alarak stres absorbe edici olarak görev yapabilmektedir.

Günümüzde, restoratif tedavi seçenekleri belirlenirken dentin-pulpa kompleksinin canlılığını devam ettirecek, bu kompleksin fonksiyonlarında olumsuz etkilere yol açmayacak biyouyumlu materyallerin kullanılması oldukça önem taşımaktadır. Restoratif materyallerin sitotoksik etkilerinin bilinmesiyle birlikte, uygulanacak tedavilerde, insan sağlığının korunması da gözetilerek biyouyumluluğu daha iyi olan materyaller ön plana çıkacaktır.

### 1.1. Amaç

Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyaller konak dokularda sitotoksik etkiler sergileyebilmektedir. Bir restoratif materyal geliştirilirken, dayanıklılık, estetik ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerin yanında biyouyumluluğu da dikkate alınmalıdır (Hanks vd 1996).

Dental materyaller, klinik kullanıma girmeden önce, materyalin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, in vitro testlerle değerlendirilmeli ve daha sonrasında yapılacak hayvan deneylerinden elde edilecek sonuçlarla ilgili materyalin toksisitesi tespit edilmelidir. Restoratif diş hekimliğinde biyomateryallerin hızlı gelişimleri, bu materyallerin kontrolleri için kullanılacak, güvenilir ve klinik şartları olabildiğince simüle edebilecek sitotoksikite değerlendirme testlerinin de geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmaktadır (Cao vd 2005).

Bu nedenle bu çalışmada fiberle güçlendirilmiş bir akışkan kompozit rezinin yirmi yaş dışından izole edilen pulpal kök hücreler üzerindeki sitotoksitesinin, fiber takviyesi olmayan düşük ve yüksek viskoziteli iki farklı akışkan kompozit rezinin sitotoksitesisi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Kök Hücreler

Kendini yenileme, farklılaşabilme ve klon oluşturma gibi nitelikleri olan özelleşmemiş hücrelerdir. Kendini yenileme özelliği sayesinde kök hücre havuzunun sürekli olarak güncel kalmasını sağlayarak tükenmekten korur. Dokuyu oluşturan farklı hücre tiplerine farklılaşabildikleri için yenileyici tıp alanında umut vaat eden pek çok çalışmaya kaynak sağlamaktadırlar. Kök hücreler farklılaşma potansiyelleri ve elde edildikleri kaynaklara göre iki ana grupta incelenebilir.

Yüksek farklılaşma potansiyelinden düşük potansiyele doğru totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olarak ayrılırlar.

Elde edildikleri kaynağa ya da buldukları yere göre ise embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki ana grupta incelenirler (Erman 2018, Yazır 2018).

#### 2.1.1. Mezenkimal kök hücreler

Organların bağ dokularında bulunan multipotent özellikli erişkin kök hücreleridir. Hematopoetik kök hücrenin keşfinden kısa bir süre sonra Friedenstein ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucu kemik iliğinde hematopoetik olmayan bir öncü hücre grubu olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği ve stromal dokulardan köken alarak çeşitli uyarılar aracılığı ile osteoblast, adiposit ve kondrosit gibi birden fazla hücre serisine farklılaşabilen fibroblast benzeri, *in vitro* çoğalabilen bu hücreler mezenkimal kök hücre (MKH) olarak adlandırılmıştır. MKH, yetişkin ve embriyonik bağ dokularından elde edilerek pek çok kök hücre çalışmasında önemli araştırma konusu olarak ele alınmaktadır (Can 2014, Eriz 2015).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) tarafından MKH tanımlanması için birtakım kriterler belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda plastik kültür kaplarına yapışma özelliği göstermesi, CD73, CD90, CD105 gibi yüzey belirteçlerini ifade ederken CD34, CD45, CD14, CD79 $\alpha$  ve HLA-DR vb. gibi belirteçleri ifade etmemeleri ve adiposit, kondrosit ve osteositlere farklılaşabilmesi MKH

karakterizasyonunda kullanılan en önemli üç belirteçtir (Can 2014). Çalışmamızda 20 yaş dışı diş pulpası MKH kaynağı olarak kullanılmıştır.

## **2.2. Dental Pulpa Kök Hücreleri**

Dental doku kaynaklı kök hücreler pek çok araştırmada kullanılmaktadır. Diş pulpası kök hücreleri (DPKH), süt dişi kaynaklı kök hücreler, periodental ligament kök hücreleri, dental folikül progenitör hücreleri, apikal papilla kök hücreleri ve süt dişi periodental ligament hücreleri olmak üzere altı farklı dental kök hücre tipi ayırt edilebilir (Erman 2018).

### **2.2.1. Dental pulpa kök hücrelerinin genel özellikleri**

Diş pulpası, kron ve kök bölümlerinde dişi tamamıyla çevreleyen dentin dokusu içinde yer alan gevşek bağ dokusudur. Poligonal, soluk ve büyük çekirdekli hücrelerdir. Pulpa çevresindeki odontoblastlarla sınırlanır ve dentin kanallarına doğru uzantıları vardır. Bu uzantılar nedeniyle dentin ve pulpa tek bir oluşum gibi değerlendirilir.

Süt dişi pulpası ile kalıcı diş pulpası birbirine benzer. Süt dişi pulpası kaynaklı kök hücreler, diş kaynaklı diğer kök hücrelere kıyasla yüksek çoğalma aktivitesine sahiptir (Can, 2014).

### **2.2.2. Dental pulpa kök hücrelerinin immunofenotipik özellikleri**

Mezenkimal kök hücreler için ISCT 2005 yılında, insan MKH' larının CD105, CD73, CD90 antijenleri yönünden pozitif (+), CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a ve HLA-DR yüzey antijenleri yönünden negatif (-) olması gerektiğini önermişlerdir. MKH' ler farklı biyolojik aktivitelere sahip olması ve çok çeşitli alt popülasyonları olması nedeniyle DPKH hücreleri belirlenen yüzey antijenlerinin farklı seviyelerde ifade edilmesine neden olabilir (Erman, 2017).

### **2.2.3. Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu**

DPKH' lerin izolasyonu için 2 temel metot tanımlanmıştır: Eksplant metodu ve pulpa dokusunun enzimatik parçalanması metodu. İlk metotta; pulpa dokusu cerrahi olarak çıkarılır ve hücreler doku fragmentlerinden gelişir. İkinci metotta ise; dental pulpa kollajenaz ve dispaz kullanılarak sindirilir, sonra hücreler ekilerek proliferasyonları



gözlemlenir ve spesifik markerlarla akım sitometri yöntemi kullanılarak karakterizasyon gerçekleştirilir. Bugüne kadar çoğalma kapasitesi, karyotip stabilitesi veya DPKH' lerin klinik kullanımı bakımından diğerlerinden daha üstün bir izolasyon tekniği bulunmamıştır fakat çoğu protokol sistematik eksplantasyondan ziyade enzimatik sindirimi içerir (Ergen, 2017).

#### **2.2.4. Dental pulpa kök hücrelerinin kültürü**

Dental pulpa kök hücreleri ilk kez Gronthos ve ark. Tarafından izole edilerek karakterize edilmiştir. Osteoblast öncüsü olarak kabul edilen kemik iliği stroma hücreleri ile kıyaslanarak dental pulpa kök hücrelerinin koloni oluşturduğu ve kolonideki hücrelerin fibroblast benzeri morfoloji gösterdiğini gözlemlemiştir (Gronthos vd, 2000).

#### **2.3. Kök Hücrelerin Farklılaştırılması**

Kök hücre farklanması, işlevsel hale gelme amacıyla olgunlaşma sürecinde meydana gelen bazı fenotipik ve biyokimyasal olayların bütünüdür. Hücrelerin kendi programlanmaları yöneliminde olacağı gibi gen ifadelerinin negatif ya da pozitif olarak yönlendirmesi ile de ortaya çıkabilir (Can, 2014). *In vivo* ortamda hücrenin farklılaşmasını yönlendirmek amacıyla koşullu besi yeri oluşturularak ortama hedef hücreye farklılaşmayı tetikleyecek farklı bileşenler eklenebilir.

#### **2.4. Diş Hekimliğinde Kompozit Rezinler**

Klinikte kullanılan kompozit rezinler 1960'lı yıllarda üretilmeye başlanmıştır. Silikat ve akrilik materyallere göre üstün mekanik özellikte olan, genleşme katsayıları düşük, aşınmaya dirençli ve klinik kullanım performansları iyileştirilmekte olan materyaller olarak kullanıma sunulmuştur.

Kompozit rezinler; organik polimer matriks, inorganik doldurucu parçacıklar ve silan bağlayıcı ajan olmak üzere üç temel bileşenden oluşur (Çelik 2017).

Restorasyon için seçilen kompozit rezinin mükemmel mekanik özellikler göstermesi, biyoyumlu olması, postoperatif hassasiyete yol açmaması, dişin yapısal bütünlüğünü korumasına olanak sağlaması istenmektedir. Bu özelliklerin sağlanması için kompozit rezinler yıllar içerisinde pek çok değişikliğe uğramıştır. Kompozit rezin sistemlerdeki

gelişmeler, materyalin her yönden mükemmel bir duruma gelmesini hedeflemektedir (Hickel 2007, Çelik 2017).

#### **2.4.1. Fiberle güçlendirilmiş kompozit rezinler**

Klinik diş hekimliğinde fiber takviyesini kullanma girişimi elli beş yıldan daha uzun bir süre önce başlamıştır. 1960'larda ve 1970'lerde, araştırmacılar standart polimetil metakrilat protezleri cam veya karbon fiberlerle güçlendirmeye çalışmışlardır. 1980'lerde, benzer uygulamalar devam etmiş ve implantlar, sabit protez restorasyonları, ortodontik tutucular, splintler, fiber postlar ve post endodontik restorasyonlar için fiberlerin güçlendirilmesi için fiber destekli protetik çerçeveler üretmek için ilk çabalar gösterilmiştir (Schreiber 1974, Manley 1979, Deboer 1984, Grave 1985, Bjork 1986, Levenson 1986, Malquarti 1990, Freilich 2000).

Fiberle güçlendirilmiş kompozitler, rezin bir matris tarafından bir arada tutulan fiber malzemeden oluşur. Fiberin tipine (cam, karbon veya polietilen fiber), fiberin yerleşim mimarisine (Ağ, Tek Yönlü, Örgü, Örgü, Leno Örgü) ve fiberin dahil edilme yöntemine göre (Preemprenye diş laboratuvarı) sınıflandırılabilir. Fiber destekli materyaller, aşağıdakiler gibi çeşitli avantajlar sergiler:

1. Güçlü mekanik özelliklere sahiptirler.
2. Metallerle karşılaştırıldığında, aşındırıcı olmama, yarı saydamlık, iyi yapışma özellikleri ve onarım kolaylığı gibi birçok başka avantaj sunarlar.
3. Fiber destekli kompozitler üstün mekanik özellikleri, derin ve geniş kavitelelerin restorasyonunda üst restoratif materyalin altında uygulanmak üzere en ideal materyallerden biridir.
4. Fiberle güçlendirilmiş kompozitler 4-5 mm'ye kadar polimerize edilebilir.
5. Fiberle güçlendirilmiş kompozit restorasyonlar, geleneksel restoratif diş hekimliğine minimal invaziv, düşük maliyetli bir alternatif sunarlar.
6. Fiberle güçlendirilmiş kompozit restorasyonlar, restore edilmiş bir dişte çatlak yayılmasını önleyebilir.
7. Ayrıca protezlerin, ortodontik tutucuların onarımı ve güçlendirilmesinde ve estetik özel yapım post ve korların sağlanmasında başarılı sonuçlar sunmaktadır.

Bununla birlikte Fiber ile desteklenmiş kompozitler bazı dezavantajlara da sahiptir. Bunlar;

1. Fiberle güçlendirilmiş kompozit restorasyonlarda en sık yaşanan problemler kompozit veneerin aşınması ve ikincil çürükler nedeniyle oluşan kırıklar ve oklüzal aşınmadır.

2. Fiber destekli kompozitlerin mekanik özellikleri hidrolitik yaşlandırma sonrasında azalmaktadır.

Fiberle güçlendirilmiş kompozitler (FRC'ler) üç farklı bileşene sahiptir: organik matris (sürekli faz), lifler (dağılmış faz) ve aradaki bölge (interfaz). FRC malzemeleri, yüksek sertlik ve dayanıklılık sunar. FRC'ler uzun süredir çeşitli mühendislik ve biyomedikal alanlarda sayısız uygulama için kullanılmaktadır. Karbon, poliaramid, polietilen ve cam bazlı FRC'ler büyük ölçüde incelenmiştir ve hepsinin arasında, çeşitli bileşimlerdeki cam elyaflar, restoratif ve prostetik materyaller olarak daha yaygın olarak uygulanmaktadır (Seeman vd 2015, Tanner vd 2018).

FRC'ler, kırılma tokluğu, basınç dayanımı, yük taşıma kapasitesi (Agraval ve Mala 2014), eğilme dayanımı (Cacciafesta vd 2007), yorulma direnci (Foek vd 2013), kırılma dayanımı (Kumbuloglu vd 2008) gibi mekanik özelliklere özel vurgu yapılarak yoğun bir şekilde araştırılmıştır.

## **2.5. Restoratif Materyallerde Biyouyumluluk**

Diş hekimliğinde kullanılan rezin esaslı dental materyaller, polimerizasyon sürecinin tamamlanmamasına bağlı olarak konak ve çevre dokularda sitotoksik etki gösterebilmektedir. Bir restoratif materyal geliştirilirken, dayanıklılık, estetik ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerinin yanında biyouyumluluğu da dikkate alınmalıdır (Hanks vd 1996).

Dental materyaller, klinik kullanıma girmeden önce, materyalin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, *in vitro* testlerle değerlendirilmeli ve daha sonrasında yapılacak hayvan deneylerinden elde edilecek sonuçlarla, ilgili materyalin toksisitesi tespit edilmelidir (Saraste ve Pulkki 2000). Restoratif diş hekimliğinde biyomateryallerin hızlı gelişimleri, bu materyallerin kontrolleri için kullanılacak, güvenilir ve klinik şartları olabildiğince simüle edebilecek sitotoksikite değerlendirme testlerinin de geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmaktadır (Wataha 2001).

### 2.5.1. Sitotoksosite

Sitotoksosite, bir maddenin hücrenin temel organellerinde oluşturduğu yıkım olarak tanımlanabilir. Hücre sayısı ve canlılığının değerlendirildiği sitotoksosite testleri biyoyumluluğun araştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Sitotoksosite testlerinin temeli, hücrenin bir materyale karşı sergilediği canlılık belirtilerine dayanır. Canlılık, hücrelerin yaşamını sürdürmeleri ve üremelerini devam ettirebilmeleri olarak tanımlanır. Sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde çok sayıda test yöntemi bulunur ve bunların arasından uygun test yönteminin seçilmesi en önemli aşamadır (Hanks vd 1991, Hanks vd 1996).

### 2.5.2. Sitotoksosite değerlendirme yöntemleri

*In vitro* sitotoksosite testlerinin amacı, materyalin vücut dokularına uygulandığında, dokular tarafından verilen reaksiyonların, laboratuvar şartlarında belirlenmesidir (Hanks vd 1996). Restoratif materyallerin sebep olduğu biyolojik etkileri ölçen *in vivo* testlerin sahip olduğu kısıtlamaları aşmak için pek çok *in vitro* metot geliştirilmiştir.

Sitotoksosite değerlendirme yöntemleri dört başlıkta irdelenebilir. Bunlar;

- Canlılık (viability) değerlendiren testler: kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri gözlemlenir.
- Yaşam (survival) değerlendiren testler: uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri gözlemlenir.
- Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
- Metabolik sitotoksosite değerlendirme testleri (Freshney 2005, Murray vd 2007, Tokur ve Aksoy 2017, Aslantürk 2017).

## 2.6. Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi:

**H<sub>1</sub>:** Fiberle güçlendirilmiş bir akışkan kompozit rezinin yirmi yaş dışından izole edilen pulpal kök hücreler üzerindeki sitotoksitesisi ile fiber takviyesi olmayan düşük ve yüksek viskoziteli iki farklı akışkan kompozit rezinin sitotoksitesisi arasında fark vardır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. İnsan Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Pamukkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız ve Çene Cerrahisi Kliniğinden, 18 yaş üzeri gönüllüden onam alınarak 20 yaş diş temin edildi. Çekimi dikkatle gerçekleştirilen dişin zedelenmediği ve çürük barındırmadığı gözlemlenmiştir. Daha sonra, kron içerisinde kalan pulpa dokusuna zarar verilmeden mine- sement sınırında meziodistal yönde yivler açılarak diş ayrılmadan 50 ml fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) içerisinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarına yarım saat içerisinde taşınmıştır. Steril kabin içerisinde açılmış yivler yönünde doku makası ile 2' ye ayrılarak 450 cc DMEM+ 50 cc FBS+ 5.5 cc Penisilin streptomisin içeren besi yeri içinde diş pulpası steril bistüri ucu ile kazınarak besi yeri içine çıkarılmıştır. Explant kültür yöntemi ile pulpa dokusu 1x1x1 mm parçalara ayrılarak 10 ml besi yeri içerisinde 15 ml'lik falkon tüpe aktarılarak 1500 x rpm' de 5 dk santrifüj edilmiş ve pellet oluşması sağlanmıştır.

Bu esnada 3 ayrı petri kabına 10 ml besi yeri konularak plastik yüzeyli petriler hazırlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan kısmın (süpernatant) 7 ml'lik kısmı atılarak pellet pastör pipeti yardımıyla 3 ml besi yeri içerisinde pipetaj ile homojenize edildi. 10 ml besi yeri içeren 3 ayrı petri kabına 1' er ml olmak üzere paylaştırıldı. Petriler etiketlenerek 37 ° C'de %5 CO<sub>2</sub>'e sahip nemli ortamda inkübe edildi. 3 günde bir petriler kontrol edildi. 7. Günde yüzeye tutunan hücreler görülen petri kabı muhafaza edilerek üreme olmayan petri kapları imha edildi. Büyüme görülen petri kabının besi yeri değiştirildi ve 3 günde bir besi yeri değiştirilmeye devam edildi. Hücreler %80 konfluensiye ulaştığında petrideki besi yeri çekilerek 1.pasaj işlemi yapıldı. 2 ml tripsin ile 37 ° C' de 5 dk inkübe edildi. Tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendi. Tripsini inhibe etmek amacıyla 6 ml besi yeri ilave edildi ve 15 ml' lik falkon tüpe aktarılarak 1500 x rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 4 ml besi yeri eklendi ve pipetaj ile homojenize edilerek 2 adet 8 ml besi yeri eklenmiş 25 cm<sup>2</sup> doku kültür flasklarına 2'şer ml olarak paylaştırıldı ve inkübe edildi. Hücrelerin 5.

günde %90 konfluensiye ulaştığı gözlemlendi. 2 adet %90 konflue 25 cm<sup>2</sup>'lik flask, 6 adet 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska ekilerek 2. pasajlama yapıldı. 7. gün sonunda %80- 90 konflue olan 6 flaskın ikisinde bulunan hücreler P<sub>2</sub> aşamasında %10 DMSO içeren besi yeri ile kriyotüplere aktarılarak -80 °C' de donduruldu. Kalan 4 flaskın her biri 6 ayrı 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilerek 3.kez pasajlandı.7. gün sonunda %80- 90 konflue olan 6 flaskın beşi P<sub>3</sub> aşamasında %10 DMSO içeren besi yeri ile kriyotüplere aktarılarak - 80 °C' de donduruldu. Kalan 1 flastaki hücreler akım sitometri analizi için gerekli işlemlere tabi tutuldu.

### 3.2. Akım Sitometri ile İnsan Diş Pulpa MKH Karakterizasyonu

Diş pulpası kök hücreleri analiz için yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra fenotipik özelliklerini sürdürmeye devam ettiklerini doğrulamak amacıyla farklılaştırılmamış kök hücrelere akım sitometri analizi uygulandı. 3. pasaj sonunda kök hücreler buldukları 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslardan tripsinizasyon yöntemiyle kaldırıldı ve 1 kez %10 FBS içeren besi yeri ile yıkandı. Sonrasında Ca<sup>2+</sup> ve %10 FBS içeren PBS ile 1 kez yıkandı. Hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra PBS içerisinde homojenize edilen hücrelere izosiyonat (FITC/ CD73), fikoeritin (PE/ CD90) ve fikoeritrinsiyanın 7 (PC7/ CD34) ve uygun izotip kontrollerinden 5'er µl eklendi. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edilerek hücreler %0,1 sodyum azid içeren PBS eklenerek 500g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet 500 µl hücre yıkama solüsyonu eklenerek aynı şekilde santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellete 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek homojenize edildi ve hücre süspansiyonu NaviosEx akım sitometri cihazında okutuldu. Analizi Beckman Coulter NaviosEx software 2.0 programı ile gerçekleştirildi.

### 3.3. Farklılaşma Testleri

#### 3.3.1. Osteojenik farklılaşma

20 yaş diş pulpasından izole edilen MKH' lerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için hücreler, osteojenik farklılaşma besi yerinde ve kontroller normal besi yerinde kültür edildi. MKH'ler 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 24 saat sonra hücrelerin yüzeye tutunduğu gözlemlendi. Hücreler, 100 nM deksametazon, 0,05 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin/ streptomisin ve %10

FBS içeren MEM besi yerinde %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 4 hafta süresince haftada iki kez besi yeri değiştirilerek kültüre edildi. Farklılaşma süresi sonunda hücreler Alizarin Red ile boyandı ve faz kontrast mikroskobu ile görüntülenerek fotoğraflandı.

### 3.3.2. Adipojenik farklılaşma

20 yaş dış pulpasından izole edilen MKH'lerin adipojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için hücreler, adipojenik farklılaşma besi yerinde ve kontroller normal besi yerinde kültür edildi. MKH'ler 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 24 saat sonra hücrelerin yüzeye tutunduğu gözlemlendi. Hücreler 4 hafta boyunca %10 FBS, 0,5 mM isobutyl-methylxanthine, 10<sup>-6</sup> M deksametazon, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacin ve %1 penisilin/ streptomisin eklentili MEM besi yerinde kültüre edildi. 4 haftanın sonunda Oil Red boyası ile boyanarak hücre içindeki lipit damlacıkları faz kontrast mikroskobu altında incelendi.

### 3.3.3. Kondrojenik farklılaşma

20 yaş dış pulpasından izole edilen MKH'lerin kondrojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için hücreler, kondrojenik farklılaşma besi yerinde ve kontroller normal besi yerinde kültür edildi. MKH'ler 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 24 saat sonra hücrelerin yüzeye tutunduğu gözlemlendi. Hücreler 3 hafta boyunca %10 FBS, 10 ng/ml TGF-B1, 50 µg/ml askorbat-2- fosfat, 0,5 µM deksametazon, 100 µg/ml sodyum piruvat, 40 µg/ml prolin, 50 mg/ml ITS premiks ve %1 penisilin/streptomisin eklentili MEM besi yerinde kültüre edildi. 3 haftanın sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler Alsian mavisi ile boyanarak mikroskopik olarak incelendi.

## 3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Grup 1: Fiberle güçlendirilmiş akışkan kompozit rezin (Everx Flow, GC, Japonya) ekstraktı uygulanmış DPKH

Grup 2: Düşük vizkoziteli akışkan kompozit rezin (Clearfil Majesty Flow, Kuraray, Japonya) ekstraktı uygulanmış DPKH

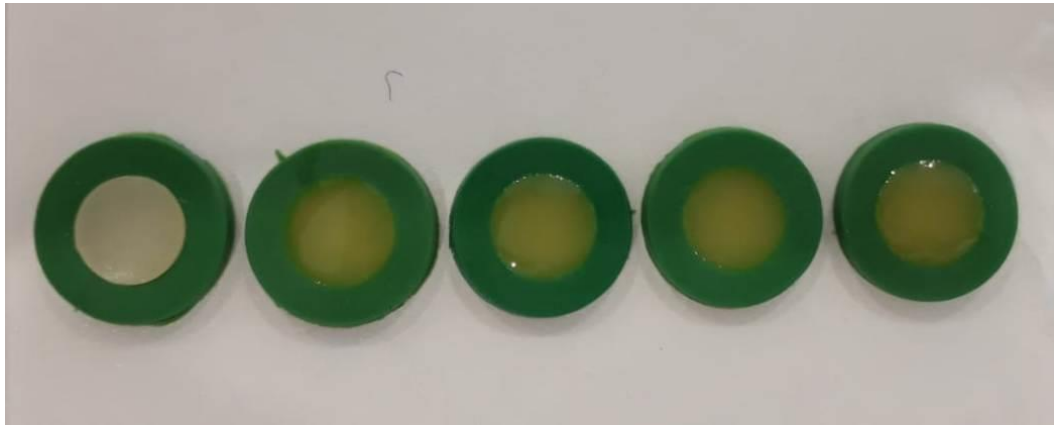
Grup 3: Yüksek vizkoziteli akışkan kompozit rezin (Ganeial Universal Injectable, GC, Japonya)ekstraktı uygulanmış DPKH

Grup 4: Pozitif Kontrol grubu (Materyal ekstraktı içermeyen (boş) DPKH kültür ortamı)

Grup 5: Negatif Kontrol grubu (Etil Alkol uygulanmış DPKH)

### 3.5. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Ekstrakt testi için 5 mm çapında ve 2 mm kalınlığında örnekler aseptik koşullarda, laminar akım hücre kültür kabini içerisinde, teflon kalıp kullanılarak hazırlandı (Şekil 3.5). Hazırlanan örnekler polimerizasyonun tamamlanmasını takiben içerisinde 14 ml hücre kültür ortamı bulunan 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Böylelikle ISO 10993-12 (International Standard ISO 10993- 12: 2007, Biological evaluation of medical devices- part 12: sample preparation and reference materials) standartlarına da uygun olacak şekilde materyal yüzey alanı (cm<sup>2</sup>) ile hücre kültür ortamı (ml) oranı 92,4 elde edilmesi amaçlandı. Falkon tüpler ekstrakt eldesi için 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. 24 saatlik sürenin ardından elde edilen ekstrakt ortamı 0,22 µm'lik şırınga filtre ile süzülerek yeni bir falkon tüpe aktarıldı. Ekstraktlar kullanım zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edildi. Kullanılan restoratif materyallere ilişkin Lot, üretici firma ve kimyasal içerik Tablo 3.1'de sunulmuştur.



**Şekil 3.5.** Ekstrakt testi materyalleri



**Tablo 3. 1.** Kullanılan restoratif materyallere ilişkin LOT, üretici firma ve kimyasal içerik bilgisi.

MATERYAL/ LOT NUMARASI/ ÜRETİCİ FİRMASI	TİPİ	İÇERİĞİ
G-aenial Injectable Flow / 1900920B / GC, Tokyo, Japonya	Yüksek vizkoziteli akışkan kompozit	UDMA, Bis-MEPP, TEGDMA, pigment, foto başlatıcı, ağırlıkça %69, hacimce %50; Silikon dioksit, stronsiyum, cam (10-200 nm).
Ever X Flow / 1911011 / GC, Tokyo, Japonya	Fiberle güçlendirilmiş akışkan kompozit	Bis-EMA, TEGDMA, UDMA, Cam fiber doldurucular, Baryum cam, ağırlıkça %70, hacimce %46 doldurucu
Clearfil Majesty Flow / 210025 / Kuraray, Tokyo, Japonya	Düşük vizkoziteli akışkan kompozit	Silanlı baryum cam dolgu maddeleri, silanlı koloidal silika hacimce %62, trietilen glikoldimetakrilat (TEGDMA), hidrofobik aromatik dimetakrilat

### 3.6. Materyal Ekstraktlarının Hazırlanması

Her kuyucukta 1 ml kültür ortamı içinde  $1 \times 10^5$  hücre içeren hücre süspansiyonu hazırlanarak 96 kuyucuklu hücre kültürü kabına aktarıldı. Daha sonra plaka üzerine hücre, materyal adları ve dilüsyonları yazılarak 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda hücreler standart besi yerinde inkübe edildi. Hazırlanan stok ekstrakt solüsyonundan (1:1) kültür ortamı ile 1:2, 1:4, 1:8 konsantrasyonunda ekstraktlar hazırlandı. Hücre kültürlerinin kültür ortamı 24 saat sonra uzaklaştırılarak her konsantrasyondan 1 ml materyal ekstraktı içeren kültür ortamı ilave edildi. Pozitif kontrol grubu olarak hücrelere yalnızca standart kültür ortamı uygulandı. Negatif kontrol grubu olarak ise; etil alkol uygulandı.

### 3.7. Canlılık Testinin Uygulanması

Deneyler için çalışma ve kontrol gruplarına ait materyaller uygulanmadan önce % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınan pulpa kök hücreleri 24, 48 ve 72 saatlik her bir test için kuyucuk başına 75 000 hücre olacak şekilde DMEM kültür ortamı içeren 96 kuyucuklu kültür kabına hücreler ekildi ve 24 saat yüzeye tutunması beklendi.

Daha sonra çalışma ve kontrol materyalleri ekstrakt testi metodu için materyal ekstraktları dilüe edilerek yukarıda anlatılan şekillerde yerleştirilerek kuyucuklar içindeki hücreler üzerine uygulanarak ve 24, 48 ile 72 saatlik sürelerle inkübatör ortamında tutuldu.

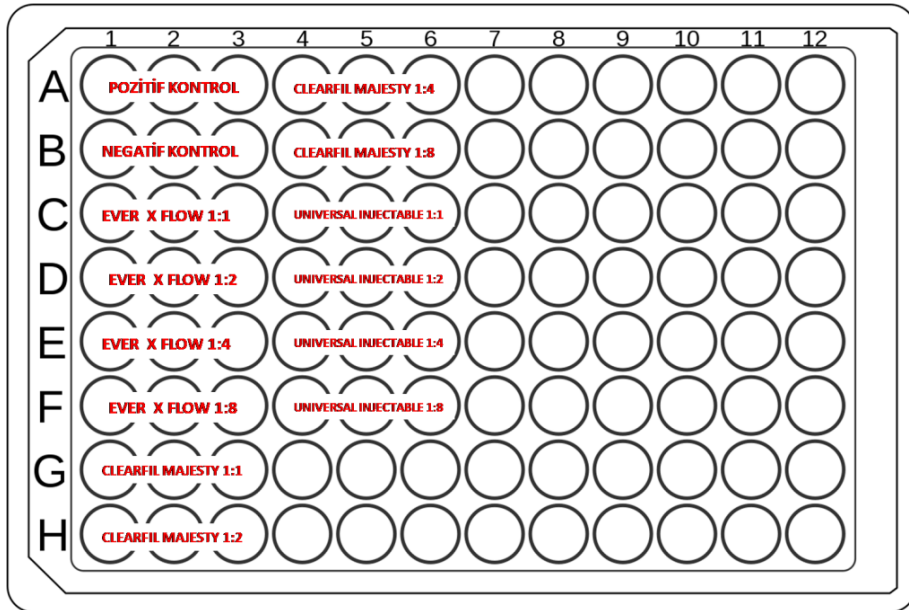
### 3.7.1. BrdU Canlılık Testi Uygulaması

BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine), bir timidin analogudur ve spesifik olarak DNA sarmalına entegre olabilir. DNA sentezleyen hücreler (hücre döngüsünün S-fazında) BrdU'yu DNA'ya dahil eder. Anti-BrdU'ya özgü antikolar daha sonra BrdU'ya maruz kalma sırasında DNA sentezine giren hücreleri tanımlamak için kullanılabilir. Çalışmamızda BioVision BrdU Hücre Canlılık testi (Catalog # K306-200) kullanılarak canlılık testi gerçekleştirildi.

Öncelikle deneyi eksiksiz bir şekilde gerçekleştirebilmek amacıyla gerekli olan tüm malzemeler steril koşullarda, hazırlama prosedürlerine uygun şekilde laminar akım kabini içinde gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan 1000x konsantre BrdU solüsyonundan 10x derişimde 1650 µl stok solüsyon hazırlandı. 300x konsantre BrdU Detection Antibody (BrdUDA) solüsyonundan 1x derişimde 15 ml BrdUDA hazırlandı. 2000x konsantrasyonda bulunan Anti-mouse HRP linked Antiody (AhrpA) kullanılarak 1x derişimde 16 ml AhrpA solüsyonu hazırlandı. 10x konsantrasyonda bulunan yıkama preparatından 1x derişimde 270 ml yıkama solüsyonu hazırlandı. Tüm hazırlıklar tamamlandıktan sonra deney protokolü, kit içerisinde bulunan yönergeler takip edilerek sırasıyla gerçekleştirildi.

Deneyin 0. gününde hücreler, 24, 48 ve 72 saat takip edileceği için 3 adet 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyucukta 75 000 hücre olacak şekilde ekildi ve her bir kültür kabı takip edileceği süreyi göstermek amacıyla etiketlendi. Hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Deneyin 1. gününde hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunduğu görüldü. Deneyin 2. gününde hücrelerin her bir kuyucukta %50- 60 konfluensiye ulaştığı görüldü. Kültür kabında bulunan hücreler Resim 1' de görüldüğü şekilde kontrol solüsyonları ve gerekli dilüsyonlardaki ekstrakt solüsyonlar eklenerek 24, 48 ve 72 saatlik takibe alındı. Pozitif kontrol olarak %10 FBS ve %1 penisilin içeren DMEM, negatif kontrol olarak da %98 etil alkol kullanıldı. (Alkolün uçuculuğu göz önünde bulundurularak negatif kontrol grubu olan kuyucuklara her gün etil alkol eklemesi yapıldı.) Deneyin 3. gününde 24 saatlik, 4. günde 48 saatlik ve 5. günde 72 saatlik takip sonunda değerlendirilecek olan kültür kabı inkübasyondan alınarak BrdU değerlendirmesi için prosedürler gerçekleştirildi.



**Şekil 3.7.1.** Hücre kültür kabında materyallerin sıralaması (WEB\_1)

Sırasıyla BrdU protokolü:

- 10x stok hazırlanan BrdU solüsyonundan 1x olacak şekilde her bir kuyucuğa 11 µl eklendi ve 2 saat inkübatörde bekletildi. 2 saatin sonunda kuyucuklarda bulunan tüm besi yeri çekildi.
- 100 µl fixing/denaturing solüsyonu eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. 30 dk sonunda solüsyon çekildi.
- 100 µl BrdUDA solüsyonu eklendi ve kültür kabı 10 dk aralıklarla hafifçe sallanarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. 1 saat sonunda solüsyon çekildi.
- Her bir kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı. Ardından 100 µl AhrpA solüsyonu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve süre sonunda solüsyon çekildi.
- Her bir kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.

Tüm süreç sonunda absorbans okuma için gerekli işlemlere geçildi. Örneklerin oluşan renk değişimi, ELISA plak okuyucusu (Elx808, Bio-Tek Instruments; Vermont, Amerika) kullanılarak absorbans(450 nm ve 650 nm) ölçümüne dayalı şekilde değerlendirildi (Resim 2).

- 100 µl TMB solüsyonu eklenip 10 dk alüminyum folyo kapatılarak karanlık ortamda bekletildi ve öncelikle 650 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi.

- İlk okuma gerçekleştikten hemen sonra renk değişimini durdurucu solüsyon eklenerek 450 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi.
- Ekstrakt materyalleri uygulanmayan kontrol grubundaki hücrelerin çoğalması %100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının çoğalma oranları yüzde olarak ifade edilmiştir.



**şekil 3.7.2.** Örneklerin absorbans okumasının yapıldığı Elisa cihazı

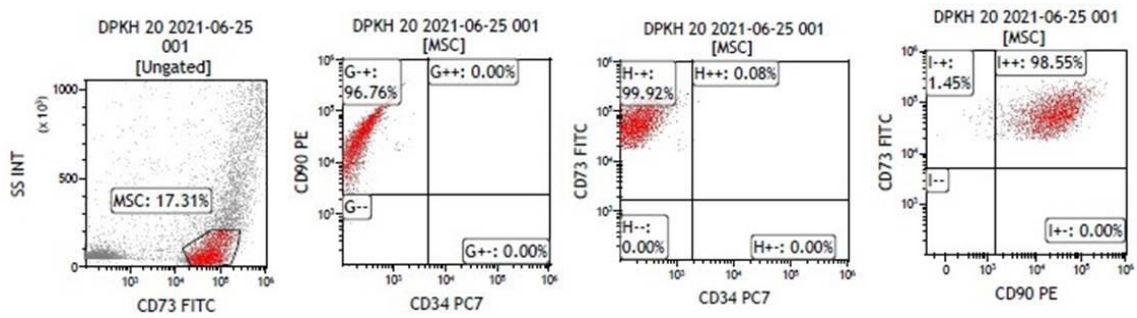
### **3.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz SPSS 25.0 yazılımı (IBM SPSS Statistics 25 yazılımı, Armonk, NY: IBM Corp) kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Bağımsız grup karşılaştırmaları için tek yönlü ANOVA testi, ikili karşılaştırmalar için post hoc Duncan testi kullanıldı.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Akım Sitometri Bulguları

Yirmi yaş dişi pulpasından edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım sitometri analizi sonuçlarına göre CD90 ve CD73'ün sırası ile %96.76 ve %99.92 pozitif, CD34' ün ise % 0.08 pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



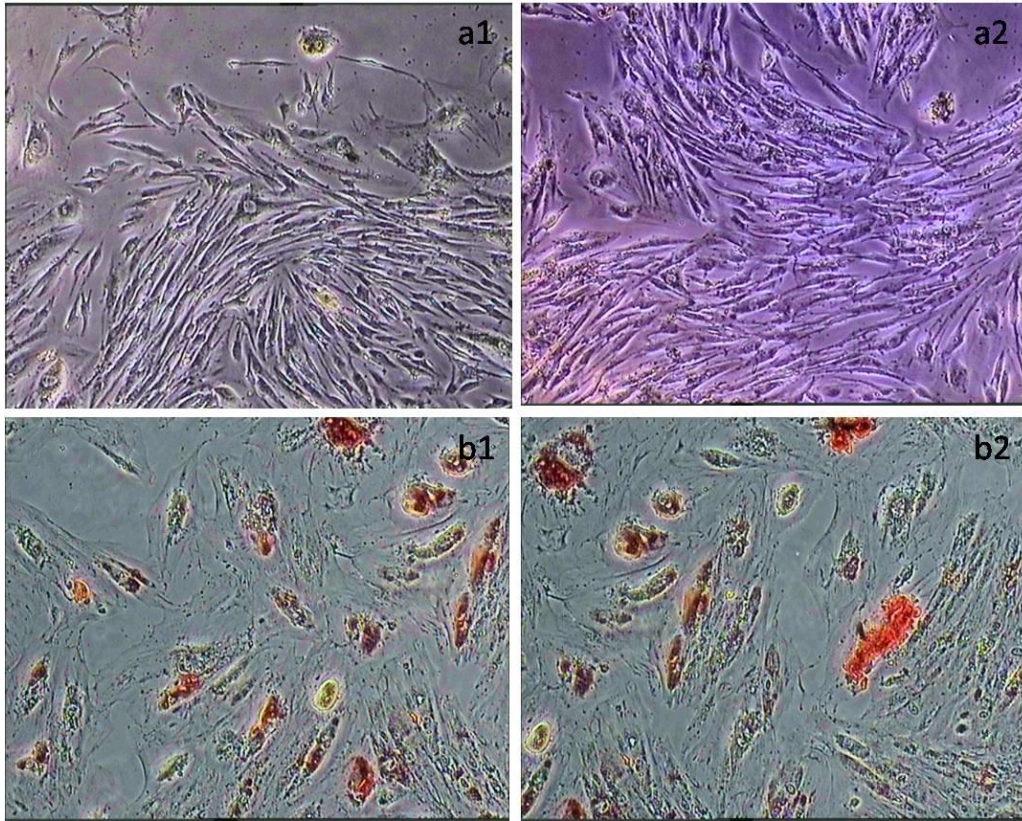
Şekil 4.1. İnsan DPKH akım sitometri ile immünofenotiplendirilmesi

### 4.2. Farklılaştırma Testleri Bulguları

Mezenkimal kök hücreler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik indükleyici besi yerlerinde inkübe edilerek sırasıyla farklılaşmaları incelenmiştir.

#### 4.2.1. Osteojenik besi yeri kullanılarak farklılaşmanın indüklenmesi

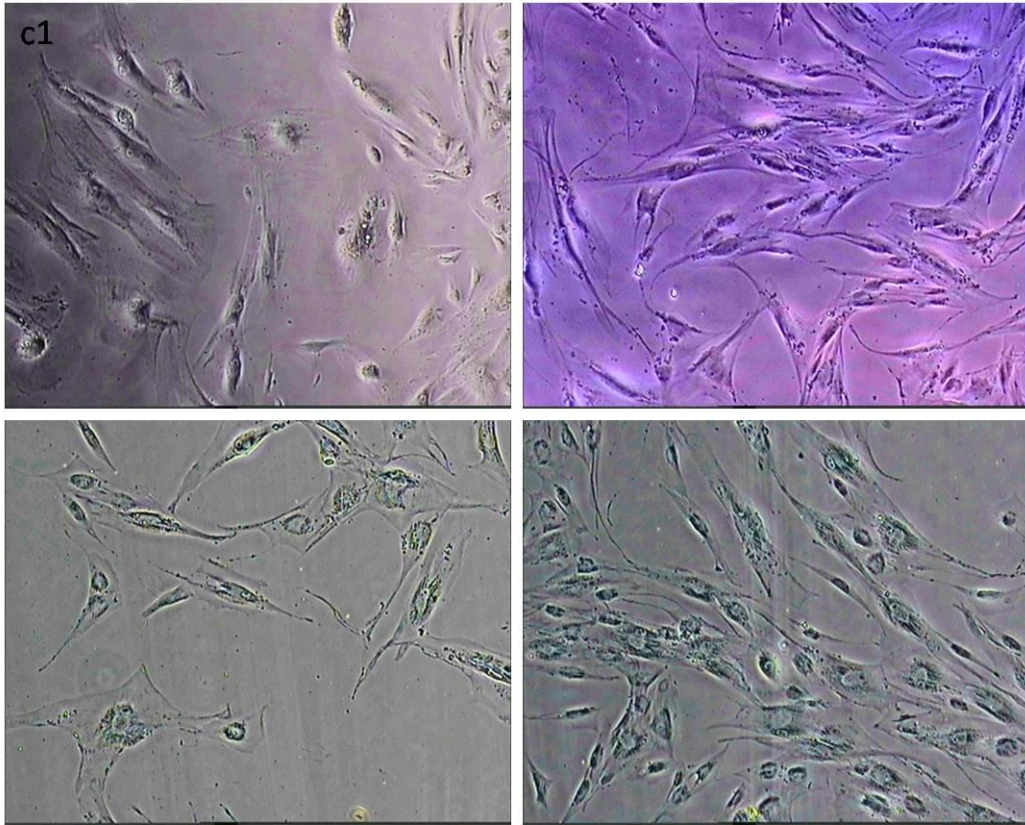
Hücreler osteojenik besi yeri ile inkübe edildikten sonra hücre proliferasyonunda anlamlı değişiklik saptanmadı. Hücrelerin standart döngüde proliferasyona devam ettiği gözlemlendi. 14 ila 15. günde hücrelerde morfolojik değişimler gözlemlendi. 4 haftanın sonunda hücreler alizarin red boyası ile boyanarak faz kontrast mikroskop altında incelendi. Değerlendirmeler sonucunda osteojenik farklılaşmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.2.1).



**Şekil 4.2.1.** Standart besi yeri uygulanmış DPKH'lerde kontrol grupları (a1, a2), Osteojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Alizarin red boyama ile gösterimi (b1, b2). Mikroskop büyütmesi 10x.

#### 4.2.2. Kondrojenik Besi Yeri Kullanılarak Farklılaşmanın İndüklenmesi

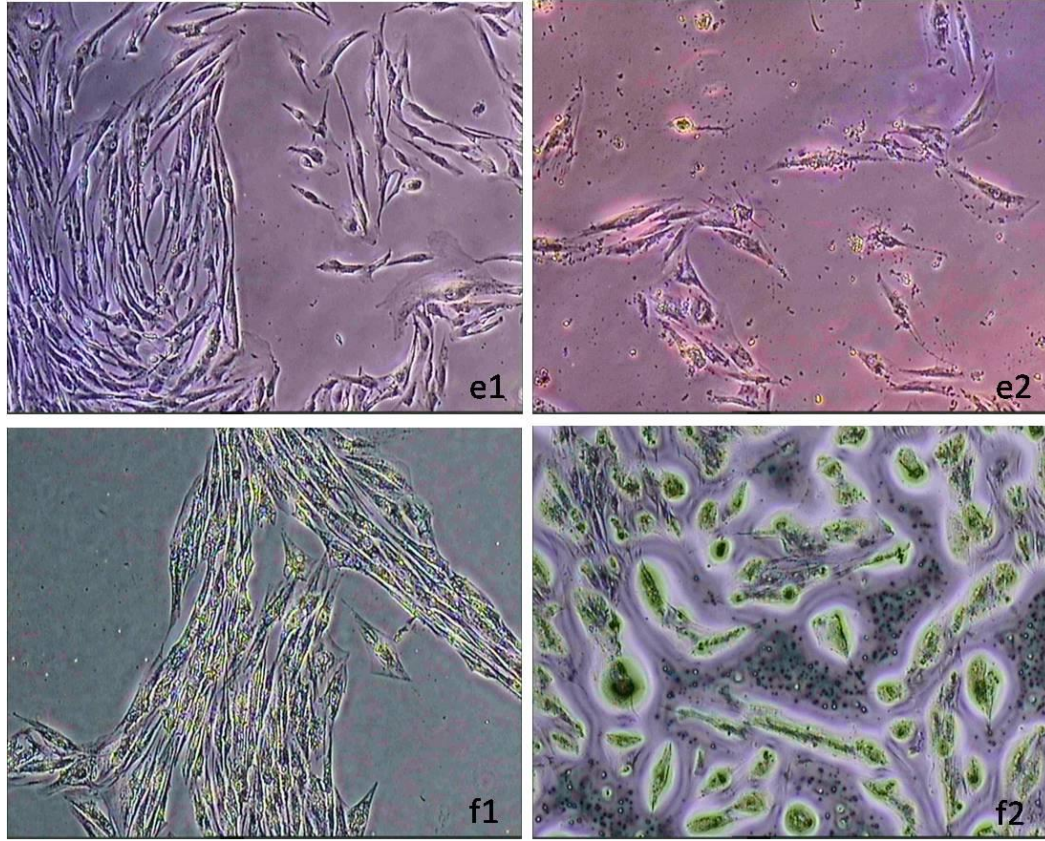
Hücreler kondrojenik besi yeri ile inkübe edildikten sonra hücrelerin standart döngüde proliferere olmaya devam ettiği gözlemlendi. 10. günde hücrelerde morfolojik değişimler gözlemlendi. 3 haftanın sonunda hücreler alsian mavisi ile boyanarak faz kontrast mikroskop altında incelendi. Değerlendirmeler sonucunda kondrojenik farklılaşmanın başarılı şekilde gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.2.2).



**Şekil 4.2.2.** Standart besi yeri uygulanmış DPKH'lerde kontrol grupları (c1, c2), Kondrojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Alcian mavi boyama ile gösterimi (d1, d2). Mikroskop büyütmesi 10x.

#### **4.2.3. Adipojenik besi yeri kullanılarak farklılaşmanın indüklenmesi**

Hücrelerin adipojenik besi yeri ile inkübe edildikten sonra standart döngüde proliferasyon olmaya devam ettiği gözlemlendi. 14. günde hücrelerde morfolojik değişimler gözlemlendi. 4 haftanın sonunda hücreler oil red ile boyanarak faz kontrast mikroskop altında incelendi. Değerlendirmeler sonucunda adipojenik farklılaşmanın başarılı şekilde gerçekleştiği görüldü (Resim 5).



**Şekil 4.2.3.** Standart besi yeri uygulanmış DPKH' lerde kontrol grupları (e1, e2), Adipojenik indüksiyon besi yeri ile farklılaştırılan DPKH'lerin Oil red boyama ile gösterimi (f1, f2). Mikroskop büyütmesi 10x.

### 4.3. Sitotoksosite Analizi Bulguları

Akım sitometri analizi ile mezenkimal kök hücre olduğunu teyit ettiğimiz hücreler sitotoksosite testine tabi tutuldu.

Örnekler 24, 48 ve 72 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılarak, bu süreler sonunda sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi yapıldı.

24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon periyotlarından sonra her bir seyreltme konsantrasyonunda her grup için dental pulpa kök hücrelerinin yüzde canlılığının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.1' de sunulmuştur.

Tüm inkübasyon periyotlarında (24h, 48h ve 72h), tüm seyreltme konsantrasyonlarında (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) hücre canlılık değerlerinin; Grup 3 (yüksek vizkoziteli akışkan kompozit rezin) > Grup 1 (fiberle güçlendirilmiş akışkan kompozit rezin) > Grup 2 (düşük vizkoziteli akışkan kompozit rezin) sırasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).



24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarından sonra yüksek vizkoziteli akışkan kompozit ve fiberle güçlendirilmiş akışkan kompozit, pozitif kontrol (hücre kültürü) ile aynı hücre canlılık yüzdesini (%100) göstermiştir ( $p=1.000$ ).

Tüm çalışma grupları, tüm seyreltme konsantrasyonlarında ve tüm inkübasyon zamanlarında %70'in üzerinde hücre canlılığı sergilemiştir (Tablo 4.1).

Test edilen materyallerin seyreltme konsantrasyonuna bağlı etkisinin sonuçlarında, tüm inkübasyon sürelerinden sonra (24h, 48h ve 72h), tüm gruplarda seyreltme konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılık değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.1,  $p < 0,05$ ). Bununla birlikte, test edilen materyallerin inkübasyon periyoduna bağlı etkisi sonuçlarında, tüm gruplarda belirli bir konsantrasyonda farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (Tablo 4.1,  $p < 0,05$ ).

**Tablo 4.1.** 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon periyotlarından sonra her bir seyreltme konsantrasyonunda her grup için kök hücrelerinin yüzde canlılığının ortalama ve standart sapma değerleri.

DİLÜSYON SUBGRUPLARI						
GRUP	ÖLÇÜM ZAMANI	1:1 (Mean ± SD)	1:2 (Mean ± SD)	1:4 (Mean ± SD)	1:8 (Mean ± SD)	p*
1	24 saat	82.3 ± 0.12	88.2 ± 0.07	100.9 ± 0.11	102.6 ± 0.08	0.0001
	48 saat	75.8 ± 0.11	77.5 ± 0.12	97.4 ± 0.13	98.3 ± 0.16	0.0001
	72 saat	72.9 ± 0.14	74.9 ± 0.14	78.6 ± 0.16	93.7 ± 0.13	0.0001
	p*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
2	24 saat	71.3 ± 0.13	78.2 ± 0.10	90.7 ± 0.14	96.6 ± 0.07	0.0001
	48 saat	73.7 ± 0.14	72.5 ± 0.14	87.8 ± 0.13	88.6 ± 0.14	0.0001
	72 saat	71.8 ± 0.18	73.9 ± 0.12	79.6 ± 0.13	82.7 ± 0.17	0.0001
	p*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
3	24 saat	95.3 ± 0.11	96.3 ± 0.15	100.6 ± 0.12	101.7 ± 0.10	0.0001
	48 saat	90.5 ± 0.15	90.3 ± 0.12	92.8 ± 0.15	98.7 ± 0.15	0.0001
	72 saat	87.1 ± 0.13	91.1 ± 0.13	94.9 ± 0.17	95.2 ± 0.12	0.0001
	p*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
4	24 saat	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	1.000
	48 saat	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	1.000
	72 saat	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	1.000
	p*	1.000	1.000	1.000	1.000	
5	24 saat	6.2 ± 0.07	6.2 ± 0.07	6.2 ± 0.07	6.2 ± 0.07	0.0001
	48 saat	2.9 ± 0.09	2.9 ± 0.09	2.9 ± 0.09	2.9 ± 0.09	0.0001
	72 saat	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.0001
	p*	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	

\* Tek yönlü ANOVA, Post hoc Duncan, p<0.05.

\* 1: Fiberle güçlendirilmiş akışkan kompozit rezin, 2: Düşük vizkoziteli akışkan kompozit rezin, 3: Yüksek vizkoziteli akışkan kompozit rezin, 4: Pozitif Kontrol, 5: Negatif Kontrol

## 5. TARTIŞMA

Yakın dönemde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında kök hücre çalışmaları popüler hale gelmiştir ve bu alandaki çalışma sayısı her geçen gün artmaktadır. Kök hücrenin tercih edilmesindeki sebep, kendini yenileme ve özelleşmiş dokulara farklılaşabilme yeteneğinin olması ve aynı zamanda bağışıklık sistemini düzenleyici etkiye sahip olmalarıdır. Kök hücreler pek çok kaynaktan elde edilebilir ancak bu kaynaklara göre değişen yöntemlerle izole edilerek kültüre edilir. DPKH ilk kez 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. DPKH' nin, kemik iliği kaynaklı MKH' ler ile benzer şekilde plastik yüzeye yapışabilen ve koloni oluşturabilen hücreler olduğu gösterilmiştir (Gronthos vd 2000).

Dental pulpa kök hücresi kullanımının en büyük avantajlarından biri herhangi ilave bir cerrahi işlem gerektirmeden üretilibilmeleridir. DPKH izolasyonunda eksplant ve enzimatik parçalama metotları kullanılır. Çalışmamızda eksplant kültür methodu kullanılarak hücre kültürü gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz DPKH' nin, ISCT tarafından 2006 yılında belirlediği MKH kriterlerine uyum sağladığını gösterdik. 2011 yılında Guimarães ve arkadaşları 8 haftalık erkek C57BL/6 fare kesici dişlerinden izole etmiş oldukları DPKH' nin insan DPHK hücreleri ile morfolojik ve farklılaşma potansiyeli olarak yüksek oranda benzerlik gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Guimaraes vd 2011). Kermani ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada dental doku onarılmasında 6-8 haftalık dişi sıçandan elde ettikleri DPKH' nin kullanılabilirliği ile ilgili yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri kök hücrelerin osteoblastlara dönüştüğünü ancak osteoklastlara dönüşmediğini gözlemlemişlerdir. Ancak dişin genel anestezi gerektirmeden canlı konaktan çıkarılabilmesi nedeniyle dental pulpanın oldukça kolay ulaşılabilen kök hücre kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (Kermani vd 2014). Yaptığımız çalışmada 20 yaş dişi çekilecek olan bir yetişkinden onam formu alınarak kendisine dişinin çalışma amaçlı kullanılacağı açıklanmıştır. Herhangi bir genel anestezi ya da ileri cerrahi müdahale gerektirmeden çekilen dişin kök hücre kaynağı olarak kullanılması vericiye ve çalışma ekibine yüksek konfor ve kolaylık sağlamıştır.

Kök hücre kaynağı olarak 20 yaş dişi dışında, diğer dişler üzerinde de pek çok çalışma yapılmaktadır. Huang ve arkadaşları farklı diş tiplerinin de kök hücre kaynağı

olarak kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmalarında 20 yaş erkek hastadan mesiodens dişi ve kontrol grubu olarak da 10 yaş erkek hastadan sol alt kesici süt dişini kullanarak kök hücre izole etmeyi denemişler ve her iki grup için de başarılı bir şekilde izolasyon ve karakterizasyon gerçekleştirmişlerdir. Mesiodens dişler artık diş olarak kabul edildiği ve atıldığı için faydalı bir kök hücre kaynağı olarak kullanılabilirdiğini göstermişlerdir (Huang vd 2008).

Gelişimi ileri evrede olan dişlere göre yirmi yaş dişlerinin çoğalmaya daha yatkın hücre açısından zengin olduğu, farklı hücre tiplerine dnrebildiği ve multipotent kök hücre kaynağı olarak kullanılabilirdiği sonucuna varılmıştır (Zhang vd 2006, Graziano vd 2008).

MKH' lerin, hücre yüzeyindeki bazı spesifik belirteçleri (%95'in üzerinde CD105, CD73, CD90 yüzey antijen belirteçleri) taşırlar ve taşıdıkları spesifik yüzey antijenleri sayesinde ya da farklılaştıkları olgun hücre tipine göre karakterize edilirler. Yüzey antijenleri, kök hücrelerin kısa sürede tanımlanmasına imkn sağlar. Bu tanımlama akım sitometri analizi ile gerçekleştirilir (Gronthos vd 2000). Kök hücre araştırmalarında karakterizasyon için akım sitometri analizinin kullanıldığı görülmektedir (Karaöz vd 2010, Taşlı vd 2014). Bu alışmada, DPKH karakterizasyonu için, akım sitometri analizlerinden faydalanarak elde edilen hücrelerde spesifik yüzey antijenlerinin tespitini gerçekleştirildi. Çalışmada mezenkimal kök hücre yüzey belirteci olarak CD73, CD90, CD34 kullanılmıştır. Sonuçlara göre CD90 ve CD73'n %95 'in üzerinde pozitif, CD34' n ise %0,08 pozitif olması, mezenkimal kök hücre eldesinin gerçekleştiğini göstermiştir. Akım sitometri analizine ek olarak MKH' lerin adiposit, osteosit ve kondrosite farklılaşması elde edilen DPKH'nin, ISCT tarafından 2006 yılında belirlediği MKH kriterlerine uyum sağladığını gösterir. Çalışmamızda elde ettiğimiz DPKH' lerinin indükleyici besi yeri ortamında adiposit, kondrosit ve osteosite farklılaştığı belirlendi.

*In vitro* biyouyumluluk testleri, materyallerin canlı dokular üzerindeki biyolojik etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilir (Hanks vd 1996). Dental materyallerin sitotoksik etkisinin lokal olarak belirlenmesinde *in vitro* test yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Schmalz 2009).

Restoratif materyallerin derin kavitelere uygulanması sonucu, bu materyallerden salınan monomerlerin pulpa ve periodontal doku gibi komşu dokularda çeşitli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, restoratif materyal etkisinde, pulpa ve periodontal alandaki hücrelerin canlılığını devam ettirmesiyle birlikte, bu dokuların yenilenme kapasitelerini devam ettirerek, tamir mekanizmalarının aktif olması önemlidir. Kök hücrelerin kendilerini yenileme, başka hücrelere farklılaşma ve hasarlı dokuyu tamir edebilme özelliklerine bağlı, insan dental pulpa dokularında yer alan kök hücrelerin aktif olması durumunda dentin- pulpa ve sement- periost kompleksinin yenilenebileceği ifade

edilmiştir (Seo vd 2004, Casagrande vd 2006, He vd 2008). İnsan diş dokularından MKH elde etme prosedürü kolay ve etkin bir yöntem olarak kabul edilir. Ek olarak, kişilerin tedavi amaçlı çekilen dişlerinden elde edildiği için, *in vitro* çalışmalarda kullanımında herhangi bir etik sınırlama bulunmamaktadır (Yalvaç vd 2009). Bu nedenlerle, dental materyallerin ilişkide olduğu çevre dokular üzerindeki etkilerini *in vivo*' ya benzer şartlar altında test etmek amacıyla son dönemde yapılan *in vitro* biyoyumluluk çalışmalarında, insan diş dokusundan elde edilen çeşitli tipteki kök hücrelerin kullanıldığı görülmektedir. Rezin içeriğindeki saf monomerlerin sitotoksik etkileri ve hücrelerin yenilenme kapasitesine olan etkilerini değerlendirmek amacıyla, Trubiani ve ark. (2010), çalışmalarında DPKH'ni kullanırken, Bakopolou ve ark. (2011b; 2012), insan süt dişi pulpasından elde edilen kök hücreleri ve insan dişinden elde edilen apikal papilla kök hücrelerini kullanırken kullanmıştır.

Biyoyumluluk değerlendirme yöntemlerinden *in vitro* sitotoksosite testleri, laboratuvar ortamında kolaylıkla uygulanabilmeleri, kısa sürede sonuç vermeleri ve düşük maliyetli olmaları sebebiyle başlangıç test yöntemi olarak sıklıkla tercih edilmektedir. ISO 10993 tarafından hazırlanan standartlara göre dental materyallerin *in vitro* olarak sitotoksisitelerinin değerlendirilmesinde, materyal ile hücreler arasında direk temas yöntemi olarak direkt hücre kültürü (direkt temas testi ve ekstrakt testi) ve bariyer test yöntemi kullanılırken; agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, dentin bariyer testi de indirek temas yöntemi olarak kullanılmaktadır (Murray vd 2007, Lim vd 2016, Şişman vd 2016). Çalışmamızda, kullanılan kompozit rezinlerin biyoyumlulukları, ISO tarafından hazırlanan 10993- 5' te yer alan "*In vitro* Sitotoksosite Test Yöntemleri" rehber alınarak değerlendirilmiştir.

Dental materyallerin sitotoksosite tayininde ekstraksiyon yönteminin sıklıkla kullanıldığı pek çok çalışmada görülmektedir. Ekstraksiyon yönteminde besi yeri, fizyolojik tuz solusyonu gibi çözücülerden oluşan ekstraksiyon sıvısının kültürdeki hücreler ile temas etmesi sağlanır. Belirli bir inkübasyon döneminin ardından, materyalden salınan bileşenlerin kültürdeki hücreler ile temas etmesi ile mikroskopik olarak değerlendirme yapılır (Tuncer ve Demirci 2011). Sigusch ve ark. farklı ışık cihazları ile polimerize edilen adeziv sistemlerin *in vitro* sitotoksisitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında ekstraksiyon yöntemini tercih etmişlerdir (Sigusch vd 2009). Annunziata da adeziv sistemler üzerinde farklı ışık cihazı kullanımının *in vitro* sitotoksosite üzerine etkisini ekstraksiyon yöntemini kullanarak değerlendirmişlerdir (Annunziata 2004). Lim ve ark. kompozit rezinlerin biyoyumluluklarının değerlendirilmesi konusunda *in vitro* test yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ancak en hassas ölçümleri ekstraksiyon yöntemi ile gözlemlediklerini bildirmektedirler

(Lim vd 2016). Bu sebeple, üç farklı kompozit rezinin in-vitro sitotoksitesini değerlendirdiğimiz çalışmada ekstraksiyon yöntemi tercih edildi.

Diş hekimliğinde kompozit rezinler; diş dokularında minimum madde kaybına sebep olmaları, diş yapılarına adezyon sağlamaları, doğal diş rengine benzerlik göstermeleri ve civa içermemeleri nedeniyle hem hastalar hem de hekimler tarafından günümüzde en çok tercih edilen restoratif materyallerdir (Anfe vd 2008). Kompozit rezinler pulpal ve periodontal hücreler üzerinde, monomer-polimer dönüşümü sırasında serbest monomerlerin salınması veya daha sonra zamanla materyalin bozunması sonucu sızabilen maddelerin salınması nedeniyle sitotoksik etkiler gösterebilir. Özellikle derin ve geniş kavitelere bu durum yerleştirilecek olan kompozit kütlesinin artmasından dolayı daha da çok önem taşımaktadır. Böyle kavitelerde kompozit rezin miktarını azaltmak için bir kaide materyali uygulanması önerilir. Kompozit rezinlerin altına kaide materyali cam iyonomerler, farklı akışkan kompozit rezinler ile fiberle güçlendirilmiş kompozitler uygulanabilmektedir. Fiberle güçlendirilmiş kompozitler güçlü mekanik dayanımlarından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu çalışmada yüksek vizkoziteli akışkan kompozit rezinin sitotoksitesi en az, düşük vizkoziteli akışkan kompozit rezinin sitotoksitesi ise en fazla bulunmuştur. Çalışmanın H<sub>1</sub> hipotezi kabul edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde Gonçaves ve ark. (2018) akışkan kompozit rezinin sitotoksitesini fiberle güçlendirilmiş kompozit rezinden daha düşük bulmuşlardır. Yine bir diğer çalışmada, bu çalışmanın sonuçlarıyla paralel şekilde, fiber takviyesinin sitotoksiteyi artırabileceği ifade edilmiştir (Attik vd 2022). Mevcut çalışmada yüksek vizkoziteli akışkan kompozitin en az sitotoksik bulunması organik matriks oranının hacimce yüzdesinin diğer materyaller ile karşılaştırıldığında daha düşük olmasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız kompozit materyallerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin farklılıklar göstermesi, materyallerin organik matrix ve inorganik doldurucu yapılarının farklı olmasından kaynaklanabilir (Hanks vd 1991, Bouillaguet vd 2002, Quinlan vd 2002).

Organik matriks miktarı ve yapısının kompozit rezinlerin biyoyumlu olarak değerlendirilmesinde ana etkenler olduğu görülmektedir. Bis-GMA, TEGDMA, HEMA gibi monomerlerin sitotoksik, östrojenik, mutojenik, teratojenik ve genotoksik etkileri olduğu ve ayrıca lokal olarak gingival, pulpal ve mukozal irritasyonlara neden olabildiği bildirilmiştir. TEGDMA' nın, reaktivitesinin yüksek olması ve hidrofobik yapıda olması nedeniyle salınımının fazla olduğu düşünülmektedir (Alshali vd 2015, Cebe vd 2015). Cebe ve ark. çalışmalarında, akışkan kompozit rezinlerin zaman içerisinde Bis-GMA, TEGDMA, UDMA ve Bis-EMA salınımına devam ettiğini iddia etmektedirler (Cebe vd 2015). Al-Hiyasat ve ark. akışkan ve geleneksel kompozit rezinlerin sitotoksitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, azalan inorganik doldurucu oranına bağlı olarak

organik içeriğin artması ile sitotoksitenin de arttığı bildirmişlerdir. Ek olarak bu çalışmada akışkan kompozit rezinlerin sitotoksitesinde viskozite kontrol edici monomerlerin etkisi olduğunu bildirmektedirler (Al- Hiyasat vd 2005). Huang ve ark. rezin içerikli dental materyallerin biyouyumluluğunu test ettikleri araştırmalarında, en yüksek organik içeriğe sahip kompozit rezinlerin aynı zamanda en fazla sitotoksik etkiye sahip olduğunu iddia etmişlerdir (Huang vd 2002). Tuna ve ark. (2010) çalışmalarında çeşitli kompozit rezinlerden zaman içerisinde TEGDMA, UDMA, Bis-GMA, Bis-EMA salınımı olduğunu ve daha fazla salınan monomerlerin düşük viskoziteli olduğunu bildirmişlerdir (Tuna vd 2010). Benzer şekilde bu çalışmada da düşük vizkoziteli kompozit rezin grubunun sitotoksik etkilerinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Restoratif materyallerin sitotoksiteleri üzerine yapılan çalışmalar, kompozit rezinlerin organik içeriğinde bulunan farklı metakrilatların glutatyon tüketimi ile mitokondriyal hasarı tetiklediğini ve buna bağlı olarak da reaktif oksijen ürünlerinin arttığını ortaya koymaktadırlar (Nocca vd 2009; 2011). Gociu ve ark. kompozit rezinlerin biyouyumluluklarını incelediklerinde, organik yapıdaki Bis-GMA ve TEGDMA' reaktif oksijen ürünlerini arttırarak hücre canlılığında azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir (Gociu vd 2013).

Geleneksel ve akışkan kompozit rezinlerin polimerizasyon derinlikleri ve biyouyumluluklarının değerlendirilmesi amaçlanan çalışma sonuçlarımızdan elde ettiğimiz verilere göre; materyaller için yeterli polimerizasyon derinliği elde edilse bile zamanla neden oldukları sitotoksik etkilerini değerlendiren ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Aynı zamanda materyallerin sitotoksik etkilerinin in-vivo koşullarda farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, kompozit rezinlerin biyouyumluluklarının arttırılmasına yönelik daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları dahilinde derin kavitelere kaide olarak fiberle güçlendirilmiş kompozit rezinin düşük sitotoksikite göstermiş olması nedeniyle klinikte güvenle kullanılacağı söylenebilir. DPKH kolay elde edilmesi, etik problem oluşturmaması ve farklı birçok hücre hattına farklılaşabilmesi nedeniyle klinik anlamda, rejeneratif tıp alanında ve doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilebilecek hücre türüdür. Diş kaynaklı farklı mezenkimal kök hücre popülasyonları kullanılarak benzer ve ileri çalışmalar yapılarak literatüre katkı sağlanabileceği kanaatindeyiz.



## 7. KAYNAKLAR

Agrawal A, Mala K. An *in vitro* comparative evaluation of physical properties of four different types of core materials. **Journal of conservative dentistry**, 2014; 17. 230-3.

Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. **Clinical oral investigations** 2005; 9(1):21-25.

Alshali RZ, Salim NA, Sung R, Satterthwaite JD, Silikas N. Analysis of long-term monomer elution from bulk-fill and conventional resin-composites using high performance liquid chromatography. **Dental Materials**. 2015; 31(12):1587-1598.

Anfe TEDA, Caneppele TMF, Agra CM, Vieira GF. Microhardness assessment of different commercial brands of resin composites with different degrees of translucence. **Braz Oral Res**. 2008; 22(4):358–363.

Annunziata M. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. **Clinical oral investigations**. 2004; 8(2):81-85.

Aslantürk ÖS. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, **In Tech** 2018; 2.

Attik N, Colon P, Gauthier R, Chevalier C, Grosogeat B, Abouelleil H. Comparison of physical and biological properties of a flowable fiber reinforced and bulk filling composites. **Dental Materials** 2022; 38(4), pp.19-30.

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

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

Bjork N, Ekstrand K, Ruyter IE. Implant-Fixed Dental Bridges from Carbon/Graphite Reinforced Polymethyl Methacrylate. **Biomaterials**, 1986; Vol. 7, 73-75.

Bouillaguet S, Shaw L, Gonzales L, Wataha JC, Krejci I. Long term cytotoxicity of resin based dental restorative materials. **J Oral Rehabil** 2002; 29: 7-13.

Cacciafesta V, Sfondrini MF, Lena A, Scribante A, Vallittu PK, and Lassila LV. Flexural strengths of fiber reinforced composites polymerized with conventional light-curing and additional post curing. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2007; vol. 132(4), pp. 524–527.

Can A. “Mezenkimal Kök Hücreler”, Kök Hücre- Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanım Alanları, **Akademisyen Tıp Kitabevi**, Ankara, 2014; s. 363-366.

Casagrande L, Mattuella LG, de Araujo FB, Eduardo J. Stem cells in dental practice: Cebe MA, Cebe F, Cengiz MF, Cetin AR, Arpag OF, Ozturk B. Elution of monomer from different bulk fill dental composite resins. **Dental Materials**. 2015;31(7):141- 149.

Çelik Ç. Güncel Kompozit Rezin Sistemler. **Türkiye Klinikleri J Med Sci**. 2017; 3: s. 128-37.

D'Alpino PHP, Moura GEDD, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD, Tersariol ILDS. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol, **Dent Mater**, 2017; 33(12):1402-1415.

DeBoer J, Vermilyea SG, Brady RE. The Effect of Carbon Fiber Orientation on the Fatigue Resistance and Bending Properties of Two Denture Resins. **J Prosthet Dent**, 1984; Vol. 51, 119-121.

Ergen E. İnsan Diş Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Koşullu Besiyeri Aracılığıyla Osteojenik Olarak Farklılaştırılması: Deneysel Çalışma. Yüksek Lisans Tezi, **Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kayseri, 2017; s. 8-9.

Eriz N. Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşmasında GAS6 (Growth Arrest Specific Gene 6) nın Rolü. Doktora Tezi, **Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 2015; s. 12-17.

Erman G. Farklı İnsan Dokularından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İmmünofenotipik ve Gen Ekspresyonu Düzeyinde İncelenmesi. Bilim uzmanlığı Tezi, **Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kocaeli, 2018; s. 69.

Foek DLS, Yetkiner E, and Özcan M. Fatigue resistance, debonding force, and failure type of fiber-reinforced composite, polyethylene ribbon-reinforced, and braided stainless steel wire lingual retainers in vitro. **The Korean Journal of Orthodontics**, 2013; vol. 43(4), pp. 186–192.

Freilich MA, Meiers JC, Duncan JP, Goldberg AJ. Fiber-Reinforced Composites in Clinical Dentistry. **Quintessence Publishing Co**, 2000; Hong Kong, 112 p

Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, **John Wiley&Sons, Inc**, Hoboken, 2005; s.696.

Gociu M, Pătroi D, Prejmorean C, Păstrăv O, Boboia S, Prodan D, Moldovan M. Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. **Rom J Morphol Embryol** 2013; 54(2):261-265.

Gonçalves F, Campos L, Rodrigues-Júnior EC, Costa FV, Marques PA, Francci CE, Braga RR, & Boaro L. A comparative study of bulk-fill composites: degree of conversion, post-gel shrinkage and cytotoxicity. **Brazilian oral research**, 2018; 32, e17.

Grave AMH, Chandler HD, Wolfaardt JF. Denture Base Acrylic Reinforced with High Modulus Fibre. **Dent Mater**, 1985; Vol. 1, 185-187.

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

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci**, 2000; 97 (25): 13625-13630.

Guimarães, E.T., Cruz, G.S., de Jesus, A.A., Lacerda de Carvalho, A.F., Rogatto, S.R., PereiraLda, Ribeiro-dos-Santos, V., R., Soares, M.B. Mesenchymal and embryonic characteristics of stem cells obtained from Mouse dental pulp, **Arch. Oral Biol** 2011; 56, 1247–1255.

Hamid A, Okamoto A, Iwaku M, Hume WR. Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements, **J Oral Rehabil**, 1998; 25 (2): 94–9.

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

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review, **Dent Mater** 1996; 12 (3): 186–93.

He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. Effects of FGF2 and TGFβ1 on the differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. **Cell Biol Int**. 2008; 32: 827- 834.

Hickel R, Roulet JF, Bayne S, Heintze SD, Mjör IA, Peters M, et al. Recommendations for conducting controlled clinical studies of dental restorative materials. Science Committee Project 298–FDI World Dental Federation study design (Part I) and criteria for evaluation (Part II) of direct and indirect restorations including onlays and partial crowns. **J Adhes Dent**, 2007; 9 Suppl 1:121-47.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2002;94(3):361–365.

Huang, A. H., Chen, Y. K., Lin, L. M., Shieh, T. Y., & Chan, A. W. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. **J Oral Pathol Med**, 2008; 37(9), 571–574.

Karaöz, E., Doğan, B.N., Aksoy, A. et al. Isolation and *in vitro* characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. **Histochem Cell Biol**, 2010; 133, 95.

Kermani Sh, Megat Abdul Wahab R, Zarina Zainol Abidin I, Zainal Ariffin Z, Senafi S, Hisham Zainal Ariffin Sh. Differentiation capacity of Mouse dental pulp stem cells into osteoblasts and osteoclasts. **Cell J**, 2014; 16(1): 31-42.

Levenson MF. The Use of a Clear, Pliable Film to Form a Fiberglass Reinforced Splint. **J Am Dent Assoc**, 1986, Vol. 112, 79-80.

Lim S, Yap A, Loo C, Ng J, Goh C, Hong C, et al. Comparison of cytotoxicity test models for evaluating resin-based composites. **Human & experimental toxicology**. 2016; 36(4): 339-348.

Malquarti G, Berruet RG, Bois D. Prosthetic Use of Carbon Fiber-Reinforced Epoxy Resin for Esthetic Crowns and Fixed Partial Dentures. **J Prosthet Dent**, 1990, Vol.63, 251-257.

Manley TR, Bowman AJ, Cook M. Denture Bases Reinforced With Carbon Fibers. **Br Dent J**, 1979; Vol. 146; 25.

Murray P, Godoy CG, Godoy FG. How is the biocompatibility of dental materials evaluated? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2007;12(11):258-266.

Nocca G, Martorana GE, De Sole P, De Palma F, Callà C, Corsale P, Lupi A. Effects of 1, 4-butanediol dimethacrylate and urethane dimethacrylate on HL-60 cell metabolism. *European journal of oral sciences*. 2009;117(2):175-181.

Nocca G, Ragno R, Carbone V, Martorana GE, Rossetti DV, Gambarini G, Lupi A. Identification of glutathione- methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC–MS and capillary electrophoresis. **Dental Materials**, 2011;27(5):87-98.

Kumbuloglu O, Özcan M, and User A. Fracture strength of direct surface-retained fixed partial dentures: Effect of fiber reinforcement versus the use of particulate filler composites only. **Dental Materials** 2008; 27(2); pp. 195–202.

Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KE, Sullivan IO. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. **Int Endodont J** 2002; 35: 47-55.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hall marks of apoptosis, **Cardiovasc Res**, 2000; 45 (3): 528–37.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*, **J Endod**, 2002; 28 (3): 188–92.

Schmalz G. Resin-based composites. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, eds. *Biocompatibility of Dental Materials*. **Springer Berlin-Heidelberg**, Germany, 2009; p:99-137.

Schreiber CK. The Clinical Application of Carbon Fiber/Polymer Denture Resin. **Br Dent J**, 1974 Vol. 137, 21-22.

Seemann R, Marincola M, Seay D, Perisanidis C, Barger N, and Ewers R. Preliminary results of fixed, fiber-reinforced resin bridges on four 4- × 5-mm ultra short implants in compromised bony sites: A pilot study. **Journal of Oral and Maxillo facial Surgery**, 2015; vol. 73(4), pp. 630–640.

Seo B-M, Mirura M, Gronthos S et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **The Lancet**, 2004; 364, 149–55.

Sigusch BW, Pflaum T, Völpel A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. **Dent Mater**, 2009; 25(11):1446–1452.

Şişman R, Aksoy A, Yalçın M, Karaöz E. Cytotoxic effects of bulk fill composit resins on human dental pulp stem cells. *J Oral Sci.* 2016; 58(3):299–305.

Tanner J, Tolvanen M, Garoushi S, and Sailynoja E. Clinical Evaluation of Fiber-Reinforced Composite Restorations in Posterior Teeth Results of 2.5 Year Follow-up. *The Open Dentistry Journal*, 2018; vol. 12(1), pp. 476–485.

Taşlı PN, Aydın S, Yalvaç ME, Sahin F. Bmp 2 and bmp 7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014; 172(6): 3016-3025. doi:10.1007/s12010-013-0706-0

Tokur O, Aksoy A. *In Vitro* Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-118.

Trubiani O, Caputi S, Di Iorio D, D'Amario M, Paludi M, Giancola R, Di Nardo Di Maio F, De Angelis F, D'Arcangelo C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *Int Endod J*, 2010; 43: 646-653.

Tuna EB, Aktoren O, Oshida Y, Gencay K. Elution of residual monomers from dental composite materials. *Eur J Paediatr Dent*, 2010; 11(3):110-114.

Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011; 21(2):141–149.

Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*, 2001; 86 (2): 203–209.

**WEB\_1** [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/96-Well\\_plate.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/96-Well_plate.svg)

Yalvaç ME, Rizvanov AA, Kılıç E, Şahin F, Mukhamedyarov MA, Islamov RR, Palotas A. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des*, 2009; 15: 3908-3916.

Yazır Y. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. **25. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu**, Kocaeli, 2018; s.4-12.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*, 2006; 12:2813–2823.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

## 9. EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik  
Kurulu



Sayı :60116787-020/53792  
Konu :Başvurunuz hk.

09/09/2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Başak YAZKAN

İlgi :06/08/2020 tarihli dilekçeniz

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Fiberle Güçlendirilmiş Bir Kompozitin Yirmi Yaş Dışından İzole Edilen Pulpal Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin İncelenmesi**" konulu çalışmanız **08.09.2020 tarih ve 17 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN  
Başkan