

ARAŞTIRMA

Farklı pulpa kaplama materyallerinin toplam oksidan ve antioksidan kapasitelerinin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde değerlendirilmesi*

Seçkin Aksu(0000-0002-5196-215X)^α, Taşkın Gürbüz(0000-0002-8911-6530)^β

Selcuk Dent J, 2020; 7: 192-199 (Doi: 10.15311/selcukdentj.498311)

Başvuru Tarihi: 17 Aralık 2018
Yayına Kabul Tarihi: 17 Nisan 2019

ÖZ

Farklı pulpa kaplama materyallerinin toplam oksidan ve antioksidan kapasitelerinin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada Proroot® Mineral Trioksit Agregat (Proroot® MTA), Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair ve Çinko Oksit Öjenol (ZnOEU) pulpa kaplama materyallerinin toplam oksidan ve antioksidan seviyelerinin insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSCs) üzerinde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda Amerikan Tipi hDPSCs Kültür Koleksiyonu kullanıldı. Üretici firmaların önerileri doğrultusunda steril kabin içerisinde hazırlanan materyaller, hDPSC ile dolaylı temas sağlamak amacıyla taban çapı 6.5 mm insert membranların (Falcon™ Cell Culture Insert, Transparent PET Membran, 3.0 µm pore size) tabanını 3 mm kaplayacak şekilde yerleştirildi. Filtre difüzyon testi, ISO standartlarına göre uygulandı. Biyokimyasal analizler 24. ve 72. saatlerin sonunda gerçekleştirildi. Ölçümler arasında bağımsız grup karşılaştırmaları için Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Bulgular: İlk 24 saatlik sürede Proroot® MTA, kontrol grubuna benzer antioksidatif koruma gösterirken ($p > 0.05$), diğer grupların koruyuculuğunun bu seviyenin altında kaldığı tespit edildi. Tüm grupların toplam antioksidatif etkinliğinin 24 ve 72 saat arasında arttığı belirlendi ($p < 0.05$). En yüksek koruma 72 saat sonunda Biodentine™ ve Pulpine Mineral gruplarında, en zayıf koruma ise ZnOEU grubunda gözlemlendi ($p < 0.05$).

Sonuç: Tüm pulpa kaplama materyallerinin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde hem oksidatif etki hem de antioksidan savunma mekanizmasını uyandırmaya sahip olduğu belirlenmiştir. İlk 24 saatte en yüksek koruma Proroot® MTA grubunda, 72 saatte ise; Biodentine™ ve propolis içeren Pulpine Mineral gruplarında bulunmuştur. ZnOEU grubunun antioksidatif etkisinin yetersiz olduğu tespit edilmiştir. Propolis içerikli pulpa kaplama materyalinin kök hücreler üzerindeki olumlu etkisi nedeniyle kalsiyum fosfat içerikli ürünlere iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER

Diş pulpa kaplaması, kalsiyum fosfat, serbest radikaller, propolis

ABSTRACT

Evaluation of total oxidant and antioxidant status of various pulp capping materials on human dental pulp stem cells

Background: The aim of this study was to evaluate the total oxidant and antioxidant status of Proroot® Mineral Trioxide Aggregate (Proroot® MTA), Biodentine™, Pulpine Mineral, Endo Repair and Zinc Oxide Eugenol (ZnOEU) on human dental pulp stem cells (hDPSCs).

Methods: In our study, American Type Culture Collection hDPSCs were used. The materials prepared in the sterile cabinet in accordance with the recommendations were placed according to ISO standards in a way to cover the bottom of the 6.5 mm insert membranes (Falcon™ Cell Culture Insert, Transparent PET Membrane, 3.0 µm pore size) in order to provide indirect contact with the hDPSC. At the 24th and 72nd hours, biochemical analyses were conducted. Kruskal Wallis Variance Analysis and Mann-Whitney U test were used for independent group comparisons between measurements.

Results: As a result of 24 hours evaluation, only Proroot® MTA exhibited antioxidative protection similar to control group ($p > 0.05$), while other groups remained below this level. At the end of 72nd hours, the best preservative groups were Biodentine™ and Pulpine Mineral, additionally the weakest protective group was ZnOEU ($p < 0.05$).

Conclusion: It was determined that all pulp capping materials have an oxidative effect and an antioxidant defense mechanism on hDPSCs. The highest protection in the acute exposure was found in the Proroot® MTA group and additionally, Biodentine™ and Pulpine Mineral groups were found to be the most protective for a long time. The antioxidative effect of ZnOEU group was found to be insufficient. Propolis containing pulp capping material is thought to be a good alternative to calcium phosphate products due to its positive effect on stem cells.

KEYWORDS

Dental pulp capping, calcium phosphate, free radicals, propolis

Oksidatif stres, fizyolojik süreçlerde aerobik organizmaların oksijen kullanımının doğal bir sonucu olarak yaklaşık % 2 oranında meydana gelen ve serbest radikal olarak isimlendirilen reaktif oksijen

metabolitlerinin mevcut dengeyi bozacak şekilde birikimi ile meydana gelmektedir.¹ Bu radikallerin oluşumunun engellenmesi veya neden olduğu hasarların sınırlandırılması için biyolojik sistemlerde

* Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 19 Ağustos 2011 tarihinde 28030 sayılı "Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik" hükümlerine bağlı kalınarak ve Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu onayı (06.01.2017/04) alınarak Mayıs 2017 tarihinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

^α Mersin Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, Mersin

^β İstanbul Medeniyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, İstanbul

çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirilmektedir. Endojen veya eksojen kaynaklı olabilen antioksidanlar; canlı hücrelerdeki protein, lipid, karbonhidrat ve deoksiribonükleik asit gibi biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyerek veya geciktirerek savunma işlevini yerine getirmektedir.² Farklı oksidan ve antioksidanların spesifik olarak plazma konsantrasyonlarını ölçüm tekniklerinin karmaşık, pahalı ve laboratuvar aşamalarının zaman alıcı olması gibi dezavantajları nedeniyle toplam olarak ölçümleri daha basit ve etkin bir yöntemdir.³

Diş hekimliği alanında kullanılan materyaller, diğer ksenobiyotikler gibi hücrelerle direkt temas sonucunda redoks düzenleme kapasitesinin üzerinde serbest radikal oluşturarak oksidatif stresi indüklemektedir. Literatürde dental materyallerin prooksidan veya antioksidan aktivitesinin test edilmesini amaçlayan çok az sayıda *in vitro* ve *in vivo* biyoyoumluluk analiz çalışması bulunmaktadır.^{4,5} Oksidatif stres durumunun, toksisitenin bir mekanizması olarak kabul görmesinden dolayı materyallerin hücreler üzerinde meydana getirdiği oksidan seviyesinin ve devreye giren antioksidan savunmanın değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Süt ve daimi dişlerde uygulanan dentin rejenerasyonuna izin veren vital pulpa tedavilerinde dental pulpa hücreleri ile pulpa kaplama malzemeleri arasındaki etkileşimler, kök hücre proliferasyonunu etkilemektedir.⁶ Tersiyer dentinogenezisin indüklenmesiyle sonuçlanan başarılı bir tedavi için pulpa kaplama materyallerinin, pulpa üzerinde makrofaj ve dev hücrelerin rol aldığı yabancı cisim reaksiyonu şeklindeki kronik bir inflamasyon yerine diş ömrünün kalanı için olumlu bir etki oluşturacak şekilde seçilmeleri son derece önem taşımaktadır.

Mineral Trioksit Aggregat (MTA) ve Biodentin gibi kalsiyum fosfat içerikli materyaller, son yıllarda hücre farklılaşmasını uyararak aktif mineralize doku birikimi sağlayan ideal pulpa kaplama materyalleri olarak kabul görmektedir.⁷ Biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla, antienflamatuar ve immunomodulatör etkileri olan, propolis vb doğal antioksidanların eklenmesiyle yeni materyaller geliştirilmeye devam etmektedir.⁸

Bu çalışmanın amacı, çeşitli pulpa kaplama materyallerinin insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSCs) üzerindeki Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) ve Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)'nin 24 ve 72 saatlik zaman aralıklarında değerlendirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürünün hazırlanması

Çalışmada, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan elde edilmiş dondurulmuş hDPSC (Lonza Pharma & Biotech, United States, PT-5025, Lot No: 000036115) kullanıldı. Krayoflakonda bulunan 10^6 kadar hücre, 13. pasajda çoğaltıldı. Hızlı bir şekilde ılık distile suda çözülerek yeni besi yeriyle birlikte 5 dakika süre ve 800 rpm devirde santrifüj işlemi (Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge, Indiana, United States) gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan sıvı atılarak geriye kalan hücreler, uygun besi yeri (Lonza, Poetics™, DPSCBM™, PT-3927, Lot No: 0000505052, United States) ile karıştırılarak 25 cm^2 alanındaki hücre kültürü üretim kabına ekildi. Bir hafta sonunda inverted floresans mikroskop (Leica, Germany) ile hücrelerin üretim kabı tabanının % 90 ve üzerini kapladıkları tespit edildikten sonra kültür kabındaki besi yeri aspire edildi. Kabın dibinde biriken hücreler, besi yerinin tamamen uzaklaştırılması için pH değeri 7.0 olan Hank'in dengeli tuz solüsyonu (Sigma - Aldrich Life Science, United States) ile yıkama işlemine maruz bırakıldı. Tripsin - etilendiamin tetraasetik asit (% 0.05, % 0.02, Sigma - Aldrich Life Science, United States) solüsyonlarıyla karıştırıldıktan sonra 37°C 'de ve % 5 CO_2 , % 95 nemli inkübatörde (Esco CelCulture CO_2 Incubator, Friedberg, Germany) 10 dakika inkübe edildi. 15 ml'lik eppendorf tüpüne alınan kültüre Fetal Bovine Serum (Biowest, South America) eklenerek tripsin etkisiz hale getirildi ve tekrar 5 dakika ve 800-1000 rpm devirde santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant bölüm uzaklaştırıldıktan sonra pellet içerisindeki hücreler, hDPSC özel besi yeriyle karıştırılarak Poli-D-Lizin kaplı 24 kuyucuklu plakalara (Sigma - Aldrich Life Science, United States) ekildi ve %5 CO_2 , % 95 nemli etüvde tekrar inkübe edildi. Etüve bırakılan plakalar içerisindeki besi yeri, üç günde bir yenilendi. Üretim kabı tabanının kaplanma oranı % 90 ve üzeri olduğunda pulpa kaplama materyallerinden elde edilen örneklerin hazırlanması aşamasına geçildi.

Örneklerin hazırlanması

Deney gruplarını sırasıyla; ProRoot® MTA (Denstply Tulsa Dental, Tulsa, K, USA), Biodentine™ (Septodont, Saint - Maurdes - Fosses, France), Pulpine Mineral (Hoffmann's Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany), Endo Repair (Hoffmann's Dental Manufactory, Wangenheim, Berlin, Germany) ve Çinko Oksit Öjenol (ZnOEu) (Cavex Holland BV, Haarlem, The Netherlands) pulpa kaplama materyalleri oluşturdu. Üretici firmaların önerileri doğrultusunda steril kabin içerisinde hazırlanan materyaller, siman spatülü ve siman fulvarı yardımıyla hDPSC ile dolaylı temas sağlamak ve dentin tabakasını modellemek amacıyla $3 \mu\text{m}$ boyutlarında açıklıkları bulunan ve taban çapı 6.5 mm olan insert membranların (Falcon™ Cell Culture Insert, Transparent PET Membran, 24 Well $3.0 \mu\text{m}$ pore size) tabanını 3 mm kaplayacak şekilde yerleştirildi. Tabanına herhangi bir materyal yerleştirilmeyen insert membranlar ise kontrol grubu olarak belirlendi. Her grup için 24 adet hazırlanan membranın sterilizasyon amacıyla bir saat ultraviyole ışınına maruz bırakılmasının ardından, -80°C 'de bekletilen hDPSC dolu 24 kuyucuklu plakalarla birleştirilmesi sağlandı.

Biyokimyasal analizler

Kullanılan dental materyallerin zamana bağlı olarak hDPSC üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla TOS ve TAS biyokimyasal analizleri, her gruptaki hücre sıvıları üzerinden 24 ve 72 saat sonunda özel kitler ile ölçüldü.

Toplam oksidan seviyesi

TOS analizi için ortamdaki ferroz iyonu yapısını ferrik iyonuna kümülatif olarak oksitleyen oksidan mekanizmasından yola çıkılarak asidik ortamda ferrik iyonlarının ksenol orange rengi ile kompleks meydana getirmesi temeline dayanan kolorimetrik yöntem kullanıldı.⁹ Sonuç olarak örneklerdeki oksidan miktarıyla bağlantılı olan renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak değerlendirildi. (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Turkey).

Hücre sıvılarına 500 µl Reaktif 1 (Buffer solüsyonu, 50 ml) ilave edilerek 530 nm'de ilk absorbans değeri okundu. Daha sonra 25 µl Reaktif 2 (Prokromojen solüsyonu, 10 ml) eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Süre sonunda 530 nm'de ikinci absorbans değeri okundu. Elde edilen değerler aşağıdaki formül kullanılarak 'mmol H₂O₂ Equiv./ L' cinsinden belirtildi. Standart 2 olarak Stabilize Standart Stok Solüsyonu (800 mm H₂O₂Equiv./L) 10 ml) kullanıldı.

TOS (mmol H₂O₂ Equiv./ L) = [(Δ Örnek absorbans değeri) / (Δ Standart 2 absorbans değeri)] x 20

Toplam antioksidan seviyesi

TAS analizi için, 2-2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) olarak ifade edilen özel, renkli bir katyonik radikalın ortamdaki antioksidan moleküllerinin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olmasını temel alan kolorimetrik yöntem (Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Turkey) kullanıldı.³

Hücre sıvılarına 500 µl Reaktif 1 (Buffer solüsyonu, 50 ml) eklenerek 600 nm' de ilk absorbans değerleri okundu. Daha sonra kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 (Renkli ABTS⁺ solüsyonu,10 ml) eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm'de ikinci absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun şekilde hesaplanarak E vitaminin suda çözünebilen bir analogu olan ve yüksek hidrofilik-lipofilik dengeli antioksidanlardan 'Trolox' maddesine⁸ eşdeğer antioksidan kapasite 'mmol Trolox Equiv./L' cinsinden belirtildi. Standart 1 solüsyonu olarak 10 ml distile su, standart 2 solüsyonu olarak ise; 10 ml 1.0 mmol Trolox Equiv./L eşdeğer solüsyon kullanıldı.

TAS (mmol Trolox Equiv./L) = [(Δ Standart 1 absorbans değeri) – (Δ Örnek absorbans değeri)] / [(Δ Standart 1 absorbans değeri) – (Δ Standart 2 absorbans değeri)]

İstatistiksel analiz

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama ± standart hata olarak verildi. Ölçümler arasındaki bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve takiben Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma gruplarının TOS sonuçlarına göre Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri Şekil 1 ve Tablo 1'de gösterilmektedir. Her iki zaman diliminde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (p> 0.05). TOS değerlerinin 24 saate kıyasla 72 saat sonunda ZnOEU grubunda arttığı, diğer gruplarda azaldığı gözlemlense de bu değişim, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmadı (p> 0.05)(Tablo 2).

Tablo 1.

Tablo 1. Çalışma gruplarının 24 saat ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	12.000 ± 0.000	12.000 ± 0.000
ProRoot® MTA	16.000 ± 4.000	10.670 ± 2.314
Biodentine™	10.670 ± 6.111	12.000 ± 0.000
Pulpine Mineral	14.670 ± 2.310	10.670 ± 2.314
Endo Repair	16.000 ± 4.000	12.000 ± 0.000
ZnOEU	13.333 ± 2.310	14.670 ± 2.314

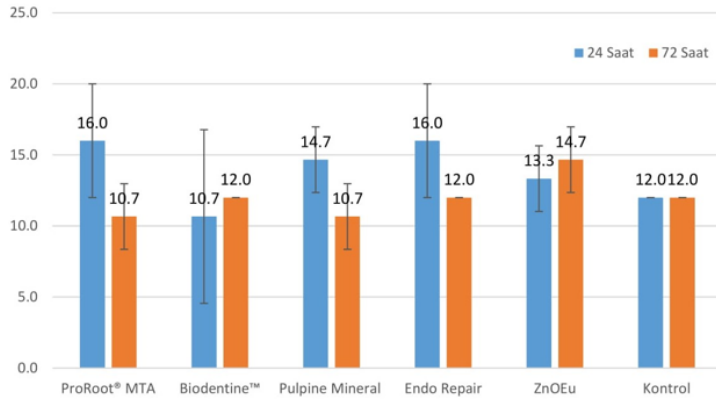
*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05).
SS: Standart Sapma

Tablo 2.

Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen TOS 'p' değerlerinin zamana bağlı değişimleri

Gruplar	24 – 72 saat karşılaştırmalı TOS analizinde 'p' değerleri
Kontrol	1.000
ProRoot® MTA	0.105
Biodentine™	1.000
Pulpine Mineral	0.099
Endo Repair	0.121
ZnOEU	0.456

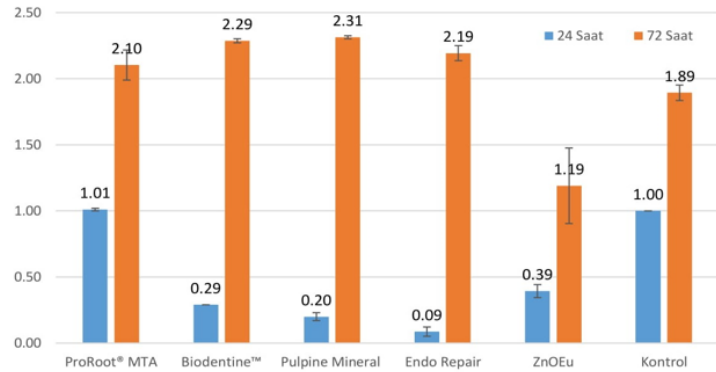
* p<0.05



Şekil 1.

Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TOS ortalama ve standart sapma değerleri

Çalışma gruplarının TAS değerlendirmesi için elde edilen ortalama ve standart sapma değerlerine göre ise; ilk 24 saatte kontrol ve ProRoot® MTA grupları değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$) bulundu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 2, Tablo 3). Ek olarak, 72 saat sonunda Pulpine Mineral ve ProRoot® MTA gruplarının TAS değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0.05$). Pulpine Mineral- ProRoot® MTA ve Pulpine Mineral- Biodentine™ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$). Tüm deney gruplarının TAS değerlerinde 72 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo 4).



Şekil 2.

Çalışma gruplarının 24 ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri

TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan birçok materyal yanak, dil, periodonsiyum ve pulpa-dentin kompleksi gibi canlı dokular ile bir araya geldiğinde farklı lokal reaksiyonlar meydana getirebilmektedir. Materyaller üzerinde yapılan biyoyumumluluk çalışmaları sayesinde dokular üzerindeki lokal toksik etkilerin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir.^{10,11}

Tablo 3.

Çalışma gruplarının 24 saat ve 72 saat sonundaki TAS ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	24 Saat Ortalama ± S.S	72 Saat Ortalama ± S.S
Kontrol	1.000 ± 0.000*	1.893 ± 0.058*
ProRoot® MTA	1.010 ± 0.010	2.103 ± 0.113*
Biodentine™	0.290 ± 0.000*	2.286 ± 0.015*
Pulpine Mineral	0.200 ± 0.030*	2.313 ± 0.011*
Endo Repair	0.086 ± 0.035*	2.193 ± 0.056*
ZnOEu	0.393 ± 0.049*	1.190 ± 0.285*

*İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).
SS: Standart Sapma

Tablo 4.

Mann-Whitney U istatistiksel analizi sonrası elde edilen TAS 'p' değerlerinin zamana bağlı değişimleri

Gruplar	24 – 72 saat karşılaştırılmalı TAS analizinde 'p' değerleri
Kontrol	1.000
ProRoot® MTA	*0.0495 (+)
Biodentine™	*0.037 (+)
Pulpine Mineral	*0.046 (+)
Endo Repair	0.0495 (+)
ZnOEu	*0.0495 (+)

* $p < 0.05$

+ TAS değerlerinde istatistiksel olarak 24 saate kıyasla 72 saate gözlenen artmayı göstermektedir.

Dental materyallerin *in vitro* koşullarda biyolojik özelliklerini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir.¹² Yeni biyomateryallerin özelliklerinin değerlendirilmesi çalışmalarında, dentin rejenerasyonu için büyük önem taşıyan ve farklı hücre popülasyonlarına sahip olan pulpa dokusundan elde edilen kök hücrelerden başarıyla yararlanılmaktadır.¹³ Çalışmamızda kullanılmak üzere; elde edilmesinin kolay olması, etik sorun yaratmaması, yüksek proliferasyon ve plastisite yeteneği, biyomateryaller ile dokuların yeniden yapılandırılmasında kullanımlarının mümkün olması ve uzun yaşam süreleri gibi nitelikleri dolayısıyla hDPSCs tercih edilmiştir.¹⁴⁻¹⁸

Test materyali bileşenlerinin difüzyonuna izin veren oluşumlar olan dentin tübüllerini simüle etmek amacıyla bariyer sistemleri geliştirilmiştir.^{19, 20} Bu sistemlerde, materyallerin insert membranlara yerleştirilerek, özel besi yeri bulunan plakalar içerisinde asılı bir şekilde

şekilde tutulması sağlanmaktadır. Bariyer görevi gören insert membranın alt kısmında bulunan porlar, bileşenlerin geçişine izin vererek besi yeri tabanında bulunan hücrelerle dolaylı temas etmesini sağlamaktadır.²¹⁻²³ Çalışmamızda 3 µm boyutlarında por büyüklüğü bulunan insert membran sistemi, ISO 10993 kriterlerine uygun şekilde kullanılmıştır. Üretici firmanın önerilerine uygun olarak hazırlanan materyaller Güven ve ark.'nın çalışmaları ile benzer şekilde insert membranların tabanına 3 mm yüksekliğinde yerleştirilmiştir.²⁴⁻²⁶

TOS değerlendirmesine göre, 24 ve 72 saat sonunda deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 1). İlk 24 saate kıyasla 72 saat sonunda hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma veya azalma bulunmamıştır ($p < 0.05$). Bu durumda materyallerin hücreler üzerinde meydana getirdiği serbest radikal seviyeleri arasında farklılık bulunmadığı sonucuna varılabilir.

Serbest radikallere karşı savunma kapasitesini belirleyen TAS değerlendirmesinde ilk 24 saatte, sadece ProRoot® MTA uygulanan hücrelerin antioksidatif koruyuculuk sergilediği, diğer grupların bu seviyenin altında kaldıkları tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Tüm materyallerin TAS değerlerinde, 72 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artma saptanmıştır ($p < 0.05$). Uzun dönemde ise, Biodentine™ ve propolis içerikli Pulpine Mineral materyallerinin en yüksek koruyuculuğa sahip oldukları gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).

Biodentin, pulpa kaplama materyali olarak kullanılan bir kalsiyum silikat simanıdır. Odontoblastik tabakanın parsiyel hasarında pulpa iyileşmesinde olumlu etkide bulunduğu belirtilen materyalin birçok hücre tipi üzerinde biyoyumlu olduğunu bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak hDPSC üzerine sınırlı sayıda araştırma mevcuttur.²⁷⁻³⁰ Zanini ve arkadaşlarının²⁷ fare dental pulpa kök hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında ise, Biodentin maruziyetinden 2 gün sonra hücrelerin canlılığında belirgin bir azalma olduğu ortaya konulmuştur. Yazarlar düşük canlılığın, ortama salınan Ca^{+2} iyonlarının toksik etki yaratması ve pH artışının fazla olması nedeniyle oluşabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, Biodentin™ grubunun TAS değerlerinin 72 saatteki anlamlı artışının nedeni, uzun dönemde ortamda birikmiş olan katyonlara karşı savunmaya yönelik oluşan antioksidan cevabı olabilir.

Aynı zamanda Minamikawa ve ark.'nın³¹ odontoblast benzeri hücreler üzerinde yaptıkları çalışmalarında, MTA grubunda özellikle 24 saat sonunda çalışmamızla benzer şekilde yüksek hücre canlılığı ortaya konulmuştur. Farklı sonuçlar, tercih edilen farklı hücre kültürleri veya temas yöntemleri ile ilgili olabilir.

Doğal bir antioksidan olduğu bilinen^{32,33} propolisin yeni pulpa kaplama ajanı olarak içeriğinde yer aldığı Pulpine Mineral materyalinin 24 saat sonunda MTA, Biodentine™ ve ZnOEU' dan daha az antioksidan özellik geliştirdiği tespit edilmiştir. Fakat 72 saatteki antioksidan savunmanın tüm materyallerden anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmektedir. Pulpine Mineral hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmasıyla birlikte hDPSCs üzerinde ilk kez gerçekleştirilen bu çalışma sayesinde, propolis içeren ajanların pulpa kaplaması için de iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varılabilir.

MTA, Biodentin, kalsiyumdan zenginleştirilmiş siman ve oktakalsiyum fosfat materyallerinin insan gingival fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği Farhadmollashahi ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında ise, insert membran yöntemi ile 24., 48. ve 168. saatlerde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. İlk 24 saatte, tüm materyallerde anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte geç dönemde, Proroot MTA® ve Biodentine™ grupları birbirleriyle benzer ve diğer materyallerden daha az toksik bulunmuştur. Çalışmamızda yer alan kalsiyum fosfat içerikli alternatif bir materyal olarak geliştirilen Endo Repair materyalinin iki zaman aralığında da diğer materyallerle karşılaştırıldığında antioksidan özelliğini tam olarak gösteremediği ve benzer şekilde Proroot MTA® ve Biodentine™ gruplarının daha etkili bir koruyuculuk sergilediği görülmektedir.

ZnOEU' un fenolik komponentinin antioksidan özelliğinin yüksek olduğu, öte yandan pulpa dokusuna direkt uygulandığında yüksek dozda öjenol serbestlenmesiyle birlikte sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir.^{34,35} Çalışmamızda, ilk 24 saatte ZnOEU' nun Proroot MTA® ve kontrol grubu haricindeki gruplara göre antioksidan aktivitesinin daha fazla olduğu ($p < 0.05$) fakat bu koruyucu etkinliğini 72 saate kadar devam ettiremediği ve 72 saat sonunda TAS değerinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$).

SONUÇ

Çalışmamızda kullanılan materyallerin 24 ve 72 saat sonunda hDPSCs üzerinde benzer bir oksidatif etki meydana getirdikleri tespit edilmiştir. İlk 24 saatte sadece ProRoot® MTA grubunun antioksidatif savunma mekanizmasının kontrol grubuyla benzer şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. Tüm grupların antioksidatif savunma düzeyinde 24. ve 72. saatler arasında artış meydana geldiği, en uzun süreli koruyuculuğun Biodentine™ ile propolis içerikli Pulpine Mineral gruplarında ve en zayıf koruyuculuğun ZnOEU grubunda olduğu tespit edilmiştir. Propolis içerikli pulpa kaplama materyalinin, kök hücrelerin antioksidan savunma kapasitesini arttırmaya yönelik olumlu etkisi nedeniyle kalsiyum fosfat içerikli ürünlere iyi bir alternatif olabileceği gösterilmiştir. Klinik açıdan başarılı materyallerin biyoyumluluklarını arttırmaya yönelik girişimlerin ön planda olduğu daha uzun süreleri kapsayan ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TeŖekkr

ÇalıŖma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel AraŖtırma Projeleri Koordinatörlüęü tarafından (PRJ2015/308) kodlu proje ile desteklenmiŖtir. Ŗili' de 4-7 Ekim 2017 tarihleri arasında düzenlenen Uluslararası Çocuk DiŖ Hekimliği Derneęi Kongresi (International Association of Paediatric Dentistry Congress)' nde 'Evaluation of Total Antioxidant-Total Oxidant Status of Various Pulp Capping Materials on Human Dental Pulp Stem Cells' konu baŖlıęı ile tebliğ edilmiŖtir. ÇalıŖmaya katkılarından dolayı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı' na ve Atatürk Üniversitesi DiŖ Hekimliği Fakültesi Çocuk DiŖ Hekimliği Anabilim Dalı' nda grev yapmakta olan Dr. ęr. yesi Fatih Ŗengl'e teŖekkrlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Schieber M, Chandel N. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014; 24:10: 453-62.
2. Noctor G, Mhamdi A, Foyer C. Oxidative stress and antioxidant systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell Environ* 2016; 39:5: 1140-60.
3. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37:4: 277-85.
4. Taso E, Stefanovic V, Stevanovic I, Vojvodic D, Topic A, Petkovic-Curcin A, et al. Influence of Dental Restorations on Oxidative Stress in Gingival Crevicular Fluid. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 1-17.
5. Oktay E, Tort H, Yıldız O, Ulusoy K, Topcu F, Ozer C. Dental resin curing blue light induces vasoconstriction through release of hydrogen peroxide. *J Photochem Photobiol B* 2018; 185: 41-5.
6. Gomes-Cornélio A, Rodrigues E, Salles L, Mestieri L, Faria G, Guerreiro-Tanomaru J, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J* 2017; 50(1): 39-47.
7. Bhat S, Hegde S, Adhikari F, Bhat V. Direct pulp capping in an immature incisor using a new bioactive material. *Contemp Clin Dent* 2014; 5(3): 393-6.
8. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran Endod J* 2018; 13(3): 285-92
9. Regoli F, Winston G. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxy nitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 156(2): 96-105.
10. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; 86(2): 203-9.
11. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996; 12(3): 186-93.
12. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2011; 21: 141-9.
13. Mestieri L, Gomes-Cornelio A, Rodrigues E, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru J, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci* 2015; 23(5): 467-71.
14. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *Acta Odontologica Turcica* 2012; 29: 115-9.
15. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25): 13625-30.
16. Verma K, Bains R, Bains V, Rawtiya M, Loomba K, Srivastava S. Therapeutic potential of dental pulp stem cells in regenerative medicine: An overview. *Dent Res J (Isfahan)* 2014; 11(3): 302-8.
17. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008; 4(1): 21-6.
18. Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, et al. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016; 1(2): 72-83.
19. Murray P, Godoy C, Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12(3): E258-66.
20. Sjögren G, Sletten G, Dahl J. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent* 2000; 84(2): 229-36.
21. Merdad K, Pascon A, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J Endod* 2007; 33(1): 24-7.
22. Saw T, Cao T, Yap A, Lee N. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(1): 145-54.
23. Browne R, Tyas M. Biological testing of dental restorative materials in vitro--a review. *J Oral Rehabil* 1979; 6(4): 365-74.
24. Guven G, Cehreli Z, Ural A, Serdar M, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *J Endod* 2007; 33(4): 447-50.
25. Farhadmollashahi N, Ghotbi F, Karkeabadi H, Havaei R. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2016; 10(2): 75-80.
26. Saberi E, Karkehabadi H, Mollashahi N. Cytotoxicity of Various Endodontic Materials on Stem Cells of Human Apical Papilla. *Iran Endod J* 2016; 11(1): 17-22.
27. Zanini M, Sautier J, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012; 38(9): 1220-6.
28. Koubi G, Colon P, Franquin J, Hartmann A, Richard G, Faure M, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth--a prospective study. *Clin Oral Investig* 2013 Jan; 17(1): 243-9.

29. Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V, Lymperi S, Panopoulos P, Anastasiadou E, et al. Interaction of dental pulp stem cells with Biodentine and MTA after exposure to different environments. *J Appl Oral Sci* 2016; 24(5): 481-6.
30. E Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2011; 37(9): 1240-6.
31. Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, et al. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2011; 37(5): 637-41.
32. Pascual C, Gonzalez R., Torricella R. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994; 41(1-2): 9-13.
33. Mujica V, Orrego R, Pérez J, Romero P, Ovalle P, Zúñiga-Hernández J. The role of propolis in oxidative stress and lipid metabolism: a randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017; 1-11.
34. Lee JH, Lee HH, Kim HW, Yu JW, Kim KN, Kim KM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effect of ZOE-based dental materials. *Dent Mater* 2017; 33(1): e1-e12.
35. Malkoç M, Demir N, Şengün A, Bozkurt Ş, Hakki S. Cytotoxicity of temporary cements on bovine dental pulp-derived cells (bDPCs) using realtime cell analysis. *J Adv Prosthodont* 2015; 7(1): 21-6.

Yazışma Adresi:

Seçkin AKSU
Mersin Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
Çocuk Diş Hekimliği AD
Çiftlikköy Kampüsü 33110 Yenişehir, Mersin
Tel : +90 324 361 00 35
GSM : +90 536 526 72 71
Faks : +90 324 361 03 69
E Posta: dtseckinaksu@gmail.com