

Alternatif bir Endodontik Şelatör Olarak Fitik Asidin Farklı pH Değerlerindeki Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi: Bir *in vitro* Çalışma

Evaluation of the Biocompatibility at Different pH Values of Phytic Acid as an Alternative Endodontic Chelator: An *in vitro* Study

Hilal ERDOĞAN^a, Funda KONT ÇOBANKARA^b

^aNevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, Nevşehir, Türkiye

^bSelçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, Konya, Türkiye

Bu çalışmanın özeti, Gevher Nesibe VII. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi'nde (16-17 Nisan 2021, Kayseri) sözlü olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: Kök kanal tedavisinde etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), şelasyon amacıyla ve rejeneratif tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal bir solüsyon olan fitik asit (FA) ise EDTA'ya alternatif olma potansiyeli bulunan bir şelatördür. Bu *in vitro* araştırmanın amacı, farklı pH değerlerindeki FA'nın insan fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek ve EDTA ile karşılaştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Araştırmada %17 EDTA-pH: 12 (orijinal), %1 FA-pH: 2 (orijinal), %1 FA-pH: 7 klinik koşulları yanıtılamak amacıyla MRC5 insan fibroblast hücrelerine 10 dk boyunca uygulandı. Kontrol grubu olarak kültür medyumunu kullanılan sitotoksosite değerlendirmesi için XTT testi kullanıldı. Hücre canlılıklarının % olarak elde edildiği verilerin istatistiksel değerlendirmeleri için "Kruskal-Wallis" ve "Bonferroni düzeltilmiş Dunn" testleri kullanıldı ($p<0,05$). **Bulgular:** Orijinal pH'deki EDTA (pH: 12) ve FA (pH: 2) solüsyonları için hücre canlılıklarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$). FA için pH: 2 ve pH: 7'de benzer sitotoksik etkiler izlendi ($p>0,05$). FA, pH: 7'de kontrol grubu ile benzer hücre canlılığı gösterdi. Tüm solüsyonlarda hücre canlılık oranının %50 ve üzerinde olduğu izlendi. **Sonuç:** Mevcut araştırma koşulları altında; irrigasyon solüsyonları pH'nin sitotoksik etkide belirleyici bir faktör olarak göz önüne alınması gerektiği ve FA için nötr pH'nin hücre canlılığını olumlu şekilde etkilediği söylenebilir. Ayrıca özellikle FA-pH: 7; biyouyumluluk açısından, EDTA'ya alternatif olabilecek özellikte doğal bir şelasyon ajanı olarak önerilebilir.

ABSTRACT Objective: Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) is widely used in root canal treatment for chelation and regenerative therapies. Phytic acid (FA), a natural solution, is a potential alternative chelator to EDTA. The aims of this *in vitro* study were to evaluate the effect of FA at different pH values on the viability of human fibroblast cells and to compare it with EDTA. **Material and Methods:** In the study, 17% EDTA-pH: 12 (original), 1% FA-pH: 2 (original), and 1% FA-pH: 7 were applied to MRC5 human fibroblast cells for 10 minutes to reflect clinical conditions. Cytotoxicity was evaluated using the XTT assay. Culture medium was used as a control. Cell viability was expressed as a percentage and statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and Dunn's tests with Bonferroni correction ($p<0.05$). **Results:** Cell viabilities for EDTA (pH: 12) and FA (pH: 2) solutions at the original pH were lower than the control group ($p<0.05$). Similar cytotoxic effects were observed for FA at pH: 2 and pH: 7 ($p>0.05$). FA showed similar cell viability as the control group at pH: 7. It was observed that the cell viability rate was 50% and above in all solutions. **Conclusion:** Under the current research conditions, it can be concluded that the pH of irrigation solutions should be considered as a determining factor for cytotoxic effect and neutral pH for FA positively affects cell viability. Also, especially FA-pH: 7 can be recommended as a natural chelating agent that could be an alternative to EDTA in terms of biocompatibility.

Anahtar Kelimeler: Fitik asit; etilen diamin tetraasetik asit; biyouyumluluk; sitotoksosite; şelasyon ajanı

Keywords: Phytic acid; ethylene diamine tetraacetic acid; biocompatibility; cytotoxicity; chelating agent

Correspondence: Hilal ERDOĞAN

Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD, Nevşehir, Türkiye

E-mail: hilalerdogan@nevsehir.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

Received: 06 Feb 2024

Received in revised form: 11 Apr 2024

Accepted: 08 May 2024

Available online: 23 May 2024

2146-8966 / Copyright © 2024 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Endodontik tedavi sürecinde kök kanal sisteminin etkili bir şekilde temizlenmesi ve dezenfeksiyonunun sağlanmasında irrigasyon oldukça önemlidir. Irrigasyon aşamasında kök kanallarının inorganik yapısını etkileyerek biyomekanik preparasyonun etkinliğini artırmak, smear tabakasının eliminasyonunu ve dentin duvarlarının dezenfeksiyonunu sağlamak amacıyla en sık olarak kullanılan şelasyon ajanı etilen diamin tetraasetik asittir (EDTA).¹

Endodontik tedavide 1957 yılından itibaren %17 konsantrasyonda 1-10 dk'lık uygulama sürelerinde kullanılan EDTA, antifungal özelliği bulunan ancak antibakteriyel etkinliği yetersiz bir solüsyondur.²⁻⁴ Sadece inorganik dokular üzerinde etki gösteren ve bu özelliği ile endodontik tedavi sırasında smear tabakasını uzaklaştırabilmek amacıyla son irrigasyon öncesi sodyum hipoklorit (NaOCl) ile birlikte kullanımı tavsiye edilen EDTA'nın sitotoksitesinin değerlendirildiği araştırmalarda, NaOCl'e göre daha yüksek veya daha düşük de olsa toksik etki gösterdiği bildirilmiş ve klinik uygulamalarda toksitesinin göz önünde bulundurulması tavsiye edilmiştir.^{2,5-7}

%17 EDTA'nın toksitesine ilişkin farklı bulgular olmakla birlikte EDTA'nın kök hücre dostu bir solüsyon olduğu ve rejeneratif endodonti sırasında kök hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını desteklemek ve ayrıca NaOCl ile kanal içi ilaçların sitotoksik etkilerini nötralize etmek için son irrigant olarak kullanılması tavsiye edilmektedir.^{5,8} EDTA, dentinden büyüme faktörlerinin salınmasını uyarabilmekte ve biyoyararlanımlarını artırabilmektedir.³ Ayrıca smear tabakasını uzaklaştırarak dentinin dezenfeksiyonunda rol almakta ve böylelikle kök hücrelerin adezyonunu artırabilmektedir.^{3,9,10} Irrigantların insan apikal papilla kök hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bir araştırmada, %17 EDTA'nın dental papilla kök hücreleri için en iyi desteği sağladığı bildirilmiştir.⁹ Kök hücrelerin kök yüzeylerine adezyonunda irrigasyon solüsyonları ve şelasyon ajanları etkili olup, tutunan kök hücre sayısı ile irrigantın sitotoksitesinin ilişkili olduğu ve kök hücrelerin adezyonunun artırılmasında biyoyumlu bir irrigantın önemli olduğu da belirtilmektedir.¹⁰ Dolayısıyla EDTA'ya alternatif olarak biyoyumluluğu yüksek ve antibakteriyel

etkinliği bulunan bir şelasyon ajanı rejeneratif endodontik tedaviler için umut vadeci olacaktır.

Aslen doğada bulunmayan EDTA; en çok etilendiamin, formaldehit ve sodyum siyanürden kimyasal olarak sentezlenir, ancak bu sentez sonucu zararlı kirleticiler oluşmaktadır.¹¹ Bu sentetik materyal suya boşaltılan ana organik kirleticilerden biri olarak kabul edilir ve aşırı kullanım sonucu nehir/göllerdeki konsantrasyonu artmaktadır.¹² EDTA biyolojik olarak parçalanamaz, bu nedenle endodontik uygulama sırasında periapikal dokulara taşınmasına özellikle dikkat edilmesi gerektiği belirtilmektedir.¹³ Bu nedenlerle günümüzde EDTA'ya alternatif olabilecek; smear tabakasına etkili, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyumluluk özelliği bulunan solüsyon arayışları hâlâ devam etmektedir.

Fitik asit (FA) (inositol heksakisfosfat, IP6) tahıllarda, sebzelerde, kabuklu kuru yemişlerde ve doğal yağlarda fosforun ana depolama şekli olarak bulunan bir organik asittir.¹¹ Merkezdeki inositol halkasının etrafında 6 fosfat grubu bulunur ve geniş pH aralığında yüksek derecede negatif yüklü benzersiz bir kimyasal yapıdadır.¹⁴ Negatif yükünün fazla olması nedeniyle divalent ve trivalent katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $Fe^{+2/+3}$, Zn^{+2} , Mn^{+2}) için çok yüksek afiniteye sahiptir ve bu minerallerin etkili şelasyonunu sağlar.^{11,14} Katyonlar ile kararlı kimyasal kompleksler oluşturabilir ve oksijensiz radikal üretimini engelleyebilir; bu özellikler FA'ya güçlü antioksidan etki kazandırır.¹⁵ Diş hekimliği uygulamalarında FA'nın restoratif materyallerin dentine bağlanma dayanımını artırabileceği ve hücre canlılığı üzerine en az zararlı etki göstererek cam iyonomer simanın sertleşme süresini kısaltabileceği bildirilmiştir.^{11,16} Ayrıca FA'nın düşük konsantrasyonlarda *Enterococcus faecalis*'e karşı antibakteriyel etkisi bulunmaktadır.¹⁷ Yüzde 1 FA'nın NaOCl uygulanmış dentinden smear tabakasını etkili bir şekilde uzaklaştırabildiği ve EDTA'ya kıyasla dentinin kimyasal bileşiminde belirgin değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.¹⁸ Ayrıca %17 EDTA'ya göre radikül dentin üzerinde daha az demineralizasyona neden olmaktadır.¹ Endodontide alternatif doğal kök kanal şelasyon ajanı olarak FA kullanımının değerlendirildiği araştırmalarda, smear tabakasını etkili bir şekilde uzaklaştırdığı, osteoblast hücrelerine daha biyoyumlu olduğu ve EDTA'nın

yerini alma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir.^{11,18}

Kök kanal tedavisinde kullanılan solüsyonların antimikrobiyal etkinliği, organik-inorganik doku çözücü özelliği ve smear tabakasını uzaklaştırabilme yeteneği gibi pek çok özelliğinin yanı sıra dokulara toksisite göstermemesi oldukça önemlidir. Tedavi sırasında kullanılan toksik solüsyonlar apikalden ekstrüze olduğunda periapikal dokuları tahriş ederek iyileşmeyi olumsuz etkileyebilmekte ve istenmeyen irrigasyon kazaları ciddi komplikasyonların gelişimine neden olabilmektedir. Bu nedenle dental materyallerin biyouyumluluğu oldukça önemlidir. Literatürde nispeten yeni bir doğal şelasyon ajanı olan FA solüsyonunun farklı pH değerlerinde sitotoksik etkilerini inceleyip karşılaştıran bir araştırma yoktur. Bu araştırmanın amacı, endodontik işlemler sırasında EDTA'ya alternatif şelasyon ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli bulunan FA'nın farklı pH değerlerinde insan fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek ve EDTA ile karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Endodontik tedavide şelasyon amacıyla sıklıkla kullanılan EDTA ile ona alternatif olma potansiyeline sahip FA'nın farklı pH değerlerindeki solüsyonlarının insan fibroblast hücreleri (MRC5) üzerindeki sitotoksik etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemek amacıyla planlanan araştırma için öncelikle Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesinden (tarih: 21 Nisan 2021; no: 6) etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma, Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yapılmıştır.

Araştırmada kök kanal irrigasyon solüsyonlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla insan fibroblastları kullanılarak daha önce belirtilen bir protokole benzer şekilde XTT sitotoksikite testi uygulandı.¹⁹ Yüzde 1 FA (593648, Sigma Aldrich, ABD) solüsyonu üreticinin talimatlarına göre testlerden hemen önce hazırlandı. Ticari olarak %50 konsantrasyonda bulunan solüsyonun %1'lik çözeltisini hazırlamak için 2 mL ticari solüsyona 98 mL ultra saf su eklendi. FA ve EDTA'nın (EDTA; Imicryl, Konya, Türkiye) orijinal pH değerleri pH metre (WTW, pH

315'i/SET; Weilheim, Almanya) ile ölçüldü ve bu değerler FA için 2, EDTA için 12 olarak belirlendi. FA'nın farklı pH değeri sodyum hidroksit ilave edilerek pH: 7 (nötr pH) olarak ayarlandı.

Sitotoksik etkinin değerlendirilmesinde kullanılan MRC-5 insan fibroblast hücre hattı (MRC-5 An1; 96101701, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) %10'luk fetal sıgır serumu (FBS; F9665, Sigma Aldrich, Avusturya) ve %1'lik penisilin, streptomisin, amfoterisin (PSA; L0010, Biowest Antibiotic-Antimycotic, Nuaille, Fransa) ile desteklenmiş Dulbecco Modifiye Eagle Medyumla (DMEM; D6421, Nutrient Mixture F-12 Ham with 15mM HEPES and sodium bicarbonate, without L-glutamine, Sigma Aldrich, Irvine, İngiltere) hazırlanan kültür medyumuyla 37 °C'de %5 karbondioksit ile nemlendirilmiş ortamda (CO₂ inkübatör, 11-01347, Binder, Almanya) inkübe edildi. Kültür medyumuna (%10 FBS ve %1 PSA ile desteklenmiş DMEM) kontrol grubu olarak kullanıldı.

Doksan altı gözlü plakların (F-Type, SPL Life Sciences, Kore) her bir gözüne 1x10⁴ hücre içeren 100 µL medyum ekildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası medyum uzaklaştırıldı ve klinik uygulama süresini yansıtmak amacıyla hücreler 10 dk süreyle 100 µL'lik kök kanal irrigasyon solüsyonlarına maruz bırakıldı (n=6). Sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan XTT test kiti (Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Beit Haemek, İsrail) testlerden hemen önce hazırlandı. Üretici firmanın talimatlarına uygun olarak protokol karanlık ortamda yürütüldü. Hücrelerin bulunduğu her bir göze 50 µL XTT solüsyonu uygulandı ve ilave 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı 460 nm absorbansta spektrometreyle (Biotek Elisa Reader, ABD) ölçüldü ve iki bağımsız test uygulandı. Kontrol grubundan hesaplanan absorban değerinin %100 hücre canlılığını gösterdiği kabul edildi ve her bir grubun hücre canlılık oranları kontrol grubuna oranlanarak hesaplandı. Elde edilen değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizleri için Kruskal-Wallis ve Bonferroni düzeltmeli Dunn testleri uygulandı (p<0,05). İstatistiksel analizde IBM SPSS 22 (ABD) paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Elde edilen XTT test sonuçlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi (Şekil 1). Hücre canlılığı oranının EDTA-pH: 12'de %50,01, FA-pH: 2'de %56,85 ve FA-pH: 7'de %88,42 olduğu ve sonuç itibarıyla test edilen tüm solüsyonlarda hücre canlılık oranlarının %50'nin üzerinde olduğu gözlemlendi. EDTA-pH: 12 ve FA-pH: 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmezken ($p>0,05$); her iki grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p<0,05$). FA-pH: 2 ve FA-pH: 7 arasında hücre canlılık oranlarının benzer olduğu belirlendi ($p>0,05$). FA-pH: 7'de hücre canlılığının yüksek olduğu ve kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Elde edilen bulgulara göre gruplardaki hücre canlılık oranları şu şekilde sıralanabilir; kontrol \geq FA-pH: 7 \geq FA-pH: 2 \geq EDTA-pH: 12.

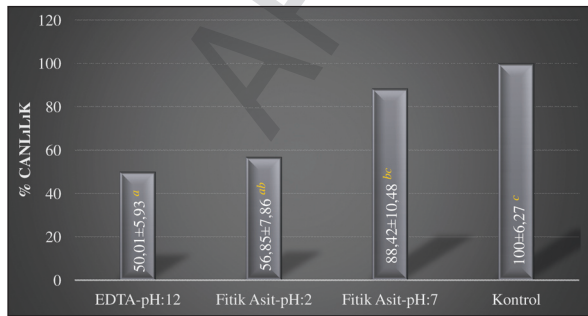
TARTIŞMA

Endodontik tedavide smear tabakasının uzaklaştırılması amacıyla NaOCl'le kombine olarak şelasyon özelliği bulunan farklı solüsyonlar kullanılmaktadır. Mevcut çalışmada, kök kanal tedavisinde şelasyon amacıyla sıklıkla kullanılan EDTA ile alternatif doğal solüsyon olarak farklı pH değerlerindeki FA'nın insan MRC-5 fibroblast hücre hattına sitotoksik etkileri XTT testiyle *in vitro* olarak incelenmiştir. Optimal bir endodontik irrigasyon solüsyonundan istenen önemli özelliklerden birisi, vital dokulara karşı düşük

sitotoksik etki göstermemesidir. Bu nedenle klinik kullanım öncesinde yapılan *in vitro* toksisite değerlendirmeleri ile biyouyumlulukları test edilmektedir. Bu amaçla pek çok yöntem kullanılmakla birlikte; yüksek doğruluk ve hızlı sonuç verme avantajları nedeniyle ikinci nesil bir tetrazolyum boyası olan XTT testi sıklıkla önerilmektedir.²⁰ Bu nedenle mevcut çalışmada da test edilen solüsyonların insan fibroblast hücrelerine sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde *in vitro* XTT testi tercih edilmiştir.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin toksisite testlerinde, primer hücre kültürlerinin hassasiyetinin fazla olması nedeniyle daha çok devamlı hücre hattı kullanımı tavsiye edilmektedir.²¹ Ayrıca hücrelerin biyokimyasal cevaplarının farklı olabileceği göz önüne alınarak insanlarda kullanılan materyallerle ilgili araştırmalarda hayvansal kaynaklı hücreler yerine insan kaynaklı hücrelerin kullanımı önerilmektedir.¹⁹ Irrigasyon solüsyonlarının kök kanal dışına ekstrüzyonu sonucu gelişen hücresel cevap tedavinin prognozunu etkileyebilmektedir. Fibroblastlar bağ dokusu ana bileşenleri olup, kollajen üretirler ve ayrıca salgıladıkları çeşitli maddeler inflamatuvar sürecin ilerlemesinde de etkilidir.²² Mevcut çalışmada, tüm bu hususlar dikkate alınarak; sitotoksikite testi için MRC-5 insan fibroblast devamlı hücre hattı kullanılmasına karar verilmiştir.

Mevcut çalışmada test edilen şelasyon ajanları klinik uygulamayı yansıtabilmesi amacıyla insan fibroblast hücrelerine 10 dk süreyle uygulanmıştır. Literatürde EDTA'nın 1 dk'dan 5 güne kadar farklı uygulama sürelerini içeren araştırmalar bulunmaktadır.^{2,5} Bazı çalışmalarda, irrigasyon solüsyonlarının 10 dk'lık uygulamasının klinik kullanımı yansıttığı belirtilirken, bu sürenin 30 dk olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur.^{23,24} Rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarında EDTA'yla 10 dk irrigasyon önerilmekte olup, EDTA'nın bu 10 dk'lık irrigasyonunun dental pulpa kök hücrelerinin adezyonu, migrasyonu ve farklılaşması üzerinde yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir.⁸ Ayrıca EDTA ile 10 dk'lık irrigasyonun insan dentininden çeşitli büyüme faktörlerinin salınmasını teşvik ettiği de ileri sürülmüştür.³ Maddeler *in vivo* şartlarda dolaşım sisteminin etkisiyle zamanla dilüe olarak ortamdaki uzaklaşmakta ve böylelikle maruziyet süresi ve sitotoksik etkisi azal-



ŞEKİL 1: EDTA ve farklı pH değerlerindeki fitik asitin XTT test sonuçlarına göre elde edilen % hücre canlılık oranlarının grafiksel gösterimi. Sütunlardaki aynı harfler istatistiksel olarak benzer olduğunu göstermektedir ($p>0,05$).

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit.

maktadır.²⁵ EDTA ile 10 dk'lık irrigasyonun aşırı dentin erozyonuna neden olabileceği ve dentin yüzeyinin bütünlüğünü olumsuz yönde etkileyebileceği de bildirilir, en uzun süreli uygulamamaya dikkat edilmesi tavsiye edilmektedir.⁶ Mevcut araştırmada tüm bu hususlar göz önüne alınmak suretiyle irrigasyon solüsyonları fibroblast hücrelerine 10 dk süreyle uygulanmıştır.

EDTA dış hekimliğinde pH: 5-12 değerlerinde kullanılabilir. ²⁶⁻²⁸ EDTA'nın kök kanal dentini üzerindeki etkinliğinde pH'sinin önemli rol oynadığı ve yüksek pH'nin şelasyon etkinliğini artırdığı belirtilmiş ve ayrıca EDTA'nın dokular üzerindeki biyoyoumluluğunun 7,3-7,4 gibi nötr pH değerlerinde değerlendirildiği çalışmalarda agresif etkisinin olduğu da bildirilmiştir. ²⁶⁻²⁸ Bu bilgiler göz önüne alınmak suretiyle ve ayrıca mevcut araştırmada kullanılan EDTA, endodontik kullanım için piyasada hazır bulunan bir solüsyon olduğundan pH'si değiştirilmeden klinik kullanıma uygun olarak orijinal ürün pH'sinde (pH:12) kullanılmıştır. FA ise nispeten yeni bir materyal olup, farklı kimyasal özelliklerdeki etkinliğinin değerlendirilmesine ihtiyaç duyulduğu için biyoyoumluluğu hem orijinal (pH: 2) hem de nötr pH'de değerlendirilmiştir.

Mevcut araştırmada %17 EDTA-pH: 12 ve %1 FA-pH: 2 şelasyon ajanlarında hücre canlılığının kontrol grubuna göre istatistik olarak daha düşük olduğu ancak canlılık oranının %50'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Toksikite değerlendirilmelerinde test edilen solüsyonun hücrelerin %50'sini etkileyen yoğunluğu, optimum konsantrasyon olarak değerlendirilmektedir. ¹⁹ Mevcut araştırmada, optimum konsantrasyon olarak değerlendirilebilecek 1/1 yoğunluktaki hücrelerde %50'nin üzerinde canlılık olduğu görülmüş olup, bu husus göz önüne alınarak farklı dilüsyonlar değerlendirilmemiştir.

Sjögren ve ark. hücre canlılığının yüzdesine göre sitotoksik etkiyi ciddi (<%30), orta (%30-59), hafif sitotoksik (%60-90) ve sitotoksik olmayan (>%90) olarak derecelendirmişlerdir. ²⁹ Dolayısıyla mevcut araştırma sonucu elde edilen verilerle %17 EDTA-pH: 12 (%50,01) ve %1 FA-pH: 2 (%56,85) şelasyon ajanlarının sitotoksik etkilerinin orta derecede olduğu söylenebilir. Literatürde EDTA'nın sitotoksitesi ile

ilgili farklı bulgular mevcuttur. Toksikitesinin düşük olduğu bildirilmiş olmakla birlikte farklı dilüsyonlarda dikkate değer sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirten araştırmalar da mevcuttur. ^{2,5-7} Yüzde 17 EDTA'nın osteoblast benzeri hücrelerin canlılığı ve alkalin fosfat aktivitesine etkisinin değerlendirildiği bir araştırmada; EDTA'nın konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisinin olduğu, hücrelerde morfolojik değişiklikler görüldüğü ve alkalin fosfat aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir. ¹¹ Farklı araştırmalarda da EDTA'nın fibroblast hücrelerine sitotoksik etkisi gösterdiği ve bu ajanın makrofajların hücre zarı yapısını ve işlevini bozarak iyileşme sürecini etkilediği belirtilmiştir. ^{7,13} EDTA'nın apikalden ekstrüzyonu periapikal kemiğin dekalsifikasyonuna neden olabilmekte ve düşük konsantrasyonlarda bile nöroimmün mekanizmaları olumsuz etkileyebilmektedir. ³⁰ EDTA'nın belirtilen bu toksik etkilerinin onun kimyasal özelliğiyle ilişkili olduğu belirtilmektedir. Güçlü bir metal şelatörü olan EDTA, Mg⁺² ve Ca⁺² gibi temel iki değerlikli metal iyonlarını kolayca uzaklaştırarak hücrelerin bağlantılarının bozulmasına ve ayrılmasına neden olabilir ve ayrıca bu iki değerlikli katyonların hücre zarında kofaktör olarak yer aldığı birçok enzimatik reaksiyonu etkileyerek apoptotik süreci hızlandırabilir. ¹³ Diğer yandan EDTA'nın periapikal dokularla teması, makrofajların fonksiyonlarını inhibe edebilir ve periapikal inflamatuvar reaksiyonları azaltabilir. ³¹ Mevcut araştırmada, EDTA'da gözlenen orta dereceli hücre canlılığı da bu özelliklerle ilişkilendirilebilir.

Mevcut araştırmada, FA için orijinal pH'deki (pH: 2) canlılığın %56,85 (orta sitotoksik) ve pH: 7'de ise %88,42 (hafif sitotoksik) olduğu görülmüştür. FA doğal bir şelasyon ajanı olup EDTA'ya alternatif bir irrigasyon solüsyonu olarak önerilmektedir. ¹¹ Nispeten yeni bir endodontik irrigasyon solüsyonu olan FA'nın sitotoksitesi ile ilgili literatürdeki araştırmalar sınırlıdır. %1 FA ve %17 EDTA'nın sitotoksik etkilerinin osteoblast benzeri hücrelerin canlılığı ve alkalin fosfat enzim aktivitesine etkisinin değerlendirildiği bir araştırmada; FA test edilen dilüsyonlarda toksik etki göstermezken, EDTA'nın düşük canlılık oranları gösterdiği ve hücrelerin morfolojisini bozduğu bildirilmiştir. ¹¹ Rejeneratif tedavi-

lerde %1 FA, %9 HEBP ve %17 EDTA'nın dental pulpa kök hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinin 1, 3 ve 5. günde değerlendirildiği bir çalışmada ise FA ve EDTA'nın kök hücre proliferasyonunu önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir.⁵ EDTA'da gözlenen hücre canlılığındaki artışın kullanılan test tekniği ve hücrelere olumlu etki gösteren büyüme faktörlerinin dentinden salınımının indüklemesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.³ FA'nın biyoyumluluğu, hücre kültüründe demir şelatörü ve fosfat kaynağı olarak görev alması ile ilişkilendirilmektedir.³² FA, hidroksil radikallerinin katalizatörü demire bağlanarak hücrelerde oksidatif hasarı önleyebilmektedir.³² Mevcut çalışmada, iki solüsyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiş olsa da FA'ya ait canlılık oranları EDTA'ya göre yüksektir ve her iki solüsyonda da canlılık oranları %50'nin üzerindedir. Bu nedenle, mevcut çalışmada özellikle pH'si 7 olan nötr FA'nın gösterdiği biyoyumluluk kısmen bu özelliklerle ilişkilendirilebilir. FA'nın biyoyumlu bir şelasyon ajanı olmasının yanı sıra kalsiyum fosfat ve minerin çözünmesini engelleyebilmesiyle karyostatik etkinliğe sahiptir. Bu özelliği nedeniyle siman, gargara gibi farklı ticari dental ürünlerin içeriğinde de bulunmaktadır.³³ Ayrıca endodontik tedavide sıklıkla başarısızlık nedeni olarak gösterilen *E. faecalis*'e karşı bakterisit etkinliği bulunmaktadır.¹⁷ Yüzde 1 FA'nın smear tabakasına etkili şelasyon özelliği, biyoyumluluğu ve *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliği göz önüne alındığında, EDTA'ya alternatif bir solüsyon olabileceği belirtilmektedir.^{11,17}

Mevcut çalışmada, FA-pH: 2'de nispeten düşük hücre canlılığı (%56,85) gözlenirken, FA-pH: 7'de hücre canlılık oranının (%88,42) yüksek olduğu ve kontrol grubuyla benzer hücre canlılık oranı sergilediği gözlenmiştir. Bu bulgulara göre pH değerinin hücre canlılığını etkileyerek sitotoksik etkilerin oluşmasında belirleyici role sahip olduğu söylenebilir. Dental materyallerdeki yüksek pH'nin komşu hücrelerde ve ortamdaki proteinlerde, denatürasyona ve yüksek konsantrasyonlarda yüksek sitotoksik etkinin oluşmasına neden olabileceği bildirilmiştir.³⁴ Mevcut çalışmada, EDTA-pH: 12'de diğer solüsyonlara göre hücre canlılığının nispeten düşük olması da bu durumla ilişkilendirilebilir. Ayrıca EDTA-pH: 12'ye (%50,01) göre FA-pH: 2'de (%56,85) gözlenen nis-

peten yüksek canlılık oranı dental materyallerin pH değerinin düşürülmesinin hücre hasarını azalttığını belirten çalışmalarla da uyumludur.³⁴ Mevcut çalışmada da FA-pH: 7'de oldukça yüksek canlılık değerleri (%88,42) gözlenmiş ve bu sonuçla pH değerinin nötr pH'ye yükselmesinin sitotoksik etkiyi azalttığı belirlenmiştir. Nitekim, endodontik tedavi sırasında konak dokular üzerindeki olası olumsuz etkileri önlemek için başlangıçta nötr pH'li kök kanal irrigantlarının kullanılması önerilmektedir.³⁵ Sonuç itibarıyla mevcut çalışma sonucunda FA-pH: 7'de gözlenen yüksek hücre canlılığının pH'nin nötr değerlere yakın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan fibroblast hücrelerinin kullanılması, solüsyonların tek zaman ve tek dilüsyonda uygulanması mevcut çalışmanın limitasyonlarını oluşturabilir. Ayrıca kök kanal irrigasyon solüsyonu olarak FA biyoyumluluk üzerindeki etkilerini değerlendiren sınırlı sayıda çalışmanın bulunması nedeniyle mevcut bulguları karşılaştırmanın yetersizliği bir diğer limitasyondur. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak, klinik kullanımın yansıtılması amacıyla 10 dk sürede solüsyonlar uygulanmış ve ayrıca uygulanan konsantrasyonlarda optimal canlılık gözlemlendiğinden solüsyonlar dilüe edilmemiştir. Dental materyallerin biyoyumlulukları test edilirken farklı hücre ve deney dizaynlarıyla uygulamaların yapılması literatüre katkı açısından önem taşımaktadır. Nispeten yeni bir materyal olan FA'nın kök hücreleri, osteoblastlar gibi farklı hücreler üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar göz önüne alınarak, literatüre katkı sağlamak amacıyla insan fibroblast hücreleri mevcut çalışmada tercih edilmiştir. FA'nın pH'sinin oldukça asidik olmasının kullanımı sırasında olası apikal taşma durumunda yan etkisinin de olabileceği göz önünde bulundurularak, gelecekteki çalışmalar için farklı dozlarda ve/veya sürelerde farklı hücre tipleriyle ve test teknikleriyle toksik etkisinin değerlendirilmesi önerilebilir. Mevcut çalışmayla *in vitro* biyoyumluluk açısından EDTA'ya alternatif şelasyon ajanı olma potansiyeli bulunduğu belirlenen FA'nın; *in vivo* biyoyumluluk, endodontik tedavilerdeki potansiyel rolü, dentinin yapısı ve kök kanal dolgu materyallerine farklı etkilerini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Mevcut araştırma koşulları altında FA için nötr pH'nin hücre canlılığını olumlu şekilde etkilediği ve bu nedenle irrigasyon solüsyonlarının pH'nin onların sitotoksik özelliklerinde belirleyici bir faktör olabileceği ve ayrıca biyouyumluluk özelliği açısından özellikle FA-pH: 7'nin, EDTA'ya alternatif olma özelliğine sahip bir doğal şelasyon ajanı olarak kullanımının uygun olabileceği sonuçlarına varılmıştır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma

ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyesi veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara; **Tasarım:** Hilal Erdoğan; **Denetleme/Danışmanlık:** Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Hilal Erdoğan; **Analiz ve/veya Yorum:** Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara; **Kaynak Taraması:** Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara; **Makalenin Yazımı:** Hilal Erdoğan; **Eleştirel İnceleme:** Funda Kont Çobankara; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara; **Malzemeler:** Hilal Erdoğan, Funda Kont Çobankara.

KAYNAKLAR

1. Zinge PR, Saraf PA, Ratnakar P, Karan S, Saraf SP, Hazari P. Assessment of effect of 1% phytic acid and 17% ethylenediaminetetraacetic acid on calcium ion loss of radicular dentin: An ex vivo study. J Conserv Dent. 2020;23(2):137-40. PMID: 33384484; PMCID: PMC7720757.
2. Karkehabadi H, Youseffakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of endodontic irrigants on human periodontal ligament cells. Iran Endod J. 2018;13(3):363-4. PMID: 30083212; PMCID: PMC6064024.
3. Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. J Endod. 2015;41(3):363-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0099239914011376>
4. Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;100(5):626-30. PMID: 16243251.
5. Deniz Sungur D, Aksel H, Ozturk S, Yılmaz Z, Ulubayram K. Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. Int Endod J. 2019;52(6):838-46. PMID: 30585644.
6. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozcelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. J Oral Sci. 2001;43(4):233-8. PMID: 11848188.
7. Giardino L, Bidossi A, Del Fabbro M, Savadori P, Maddaloni M, Ferrari L, et al. Antimicrobial activity, toxicity and accumulated hard-tissue debris (AHTD) removal efficacy of several chelating agents. Int Endod J. 2020;53(8):1093-110. PMID: 32344451.
8. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. Int Endod J. 2016;49(6):581-90. PMID: 26114662.
9. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. J Endod. 2011;37(8):1109-15. PMID: 21763903.
10. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. J Endod. 2008;34(12):1474-9. PMID: 19026877.
11. Nassar M, Hiraishi N, Tamura Y, Otsuki M, Aoki K, Tagami J. Phytic acid: an alternative root canal chelating agent. J Endod. 2015;41(2):242-7. PMID: 25453568.
12. Sillanpää M. Environmental fate of EDTA and DTPA. Rev Environ Contam Toxicol. 1997;152:85-111. PMID: 9297986.
13. Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. Int Endod J. 2007;40(5):338-43. PMID: 17403041.
14. Berikten D, Kivanç M. Fitazlar: çevreye etkisi, beslenme ve biyoteknolojideki önemi [Phytases: their effects on environment, nutritional and biotechnological importance]. Akademik Gıda. 2018;16(1):109-19. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida/issue/36746/417903>
15. Silva EO, Bracarense AP. Phytic acid: from antinutritional to multiple protection factor of organic systems. J Food Sci. 2016;81(6):R1357-62. PMID: 27272247.
16. Prosser HJ, Brant PJ, Scott RP, Wilson AD. The cement-forming properties of phytic acid. J Dent Res. 1983;62(5):598-600. PMID: 6341431.
17. Nassar RI, Nassar M. Antimicrobial effect of phytic acid on Enterococcus faecalis. The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents. 2016;6(4):1-7. https://www.researchgate.net/publication/314086379_Antimicrobial_effect_of_phytic_acid_on_Enterococcus_faecalis
18. Wang T-F, Cao X-X, Sa Y, Jiang T. Effect of phytic acid used as chelating agent on smear layer and chemical composition of dentin. J Oral Sci Res. 2016;32(4):374. <https://doi.org/10.13701/j.cnki.kqxyj.2016.04.014> Verilen linke erişim sağlanamamıştır kaynağa direkt erişim sağlanabilecek link bilgisi eklenmemiştir.
19. Erdogan H, Yildirim S, Cobankara FK. Cytotoxicity and genotoxicity of salicylate- and calcium silicate-based root canal sealers on primer human periodontal ligament fibroblasts. Aust Endod J. 2021;47(3):645-53. PMID: 34097343.

-
20. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* 2020;1(3):332-49. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fft2.44>
 21. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22(Supplement 2):S6-S11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0300571294900329?via%3DIihub>
 22. Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J*. 2012;45(1):49-56. PMID: 21910744.
 23. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(5):662-6. PMID: 21821446; PMCID: PMC4263027.
 24. Prado M, Silva EJ, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(2):158-63. PMID: 26018307; PMCID: PMC4428460.
 25. Ballal NV, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(4):633-8. PMID: 19716720.
 26. Serper A, Calt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. *J Endod*. 2002;28(7):501-2. PMID: 12126374.
 27. Sousa SM, Bramante CM, Taga EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. *Braz Dent J*. 2005;16(1):3-8. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402005000100001>
 28. Silveira NLD, Tavares T, Soares J. Potencial irritativo de soluções à base de EDTA. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent* 1994;48(5):1489-93. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-150244>
 29. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent*. 2000;84(2):229-36. PMID: 10946345.
 30. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod*. 1996;22(7):337-40. PMID: 8935056.
 31. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod*. 1997;23(4):205-8. PMID: 9594765.
 32. Xu Q, Kanthasamy AG, Reddy MB. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicology*. 2008;245(1-2):101-8. PMID: 18255213.
 33. Graf E. Applications of phytic acid. *J Am Oil Chem Soc*. 1983;60(11):1861-67. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02901539>
 34. Mukhtar-Fayyad D. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(6):e137-42. PMID: 21873087.
 35. Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Nikoo M, Lotfi M, Karamifar K, et al. The impact of pH on cytotoxic effects of three root canal irrigants. *Saudi Dent J*. 2011;23(3):149-52. PMID: 23960509; PMCID: PMC3723099.