

Albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının insan dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Investigation of the effects of albumin-gluteraldehyde tissue adhesive on human gingival fibroblast cells

Dr. Öğr. Üyesi Özge Doğanay

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0001-5273-7774

Arş. Gör. Sezen Atasoy

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0001-5063-5053

Dr. Öğr. Üyesi Nurettin Diker

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-7825-1083

Prof. Dr. Alper Alkan

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-7072-511X

Geliş tarihi: 13 Ocak 2020

Kabul tarihi: 17 Nisan 2020

doi: 10.5505/yeditepe.2020.71501

Yazışma adresi:

Dr. Öğretim Üyesi Özge Doğanay
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.,
Adnan Menderes Bulvarı Vatan Cad.
İskenderpaşa Mah. 34093 Fatih, İstanbul
Tel: +90 5301793971
E-posta: ozgedoganay87@gmail.com

ÖZET

Amaç: Albumin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı ilk olarak kardiyovasküler cerrahi uygulamalarında, daha sonra ciddi travmalarda dalak ve kalp yaralanmalarında ve bazı abdominal dokularda, zarar görmüş parankimi güçlendirmek ve/veya hemostaz sağlamak amacıyla geçmişten beri kullanılmaktadır. Diş hekimliğinde ise yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniğinde kullanılmaya başlayan albumin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının olası komplikasyonlarını tespit etmek amacıyla çalışmamızda, insan dişeti fibroblastı (HGF-1) hücre hattında çene cerrahisi alanında deneysel olarak çalışmaları yapılan albumin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı ile klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen kollajen membranın sitotoksik etkilerini in vitro karşılaştırdık.

Gereç ve Yöntem: İki farklı çalışma grubu oluşturularak, 1., 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerde albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısından ve kollajen membrandan toplanan süpernatantlar 24, 48 ve 72 saat süreyle insan dişeti fibroblast hücreleri üzerine eklenmiş ve inkübasyon sonrası süpernatantların sitotoksik analizi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Tüm ölçümlerde albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı grubunda hücre canlılık değerinin kollajen membran grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Süpernatantların bekleme süreleri arttıkça hücre canlılık oranlarının azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç: İnsan dişeti fibroblast hücreleri albumin-gluteraldehit doku yapıştırıcısından elde edilen süpernatantlara karşı sitotoksik davranış göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sitotoksikite, hücre kültürü, insan dişeti fibroblast, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, albumin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı.

SUMMARY

Aim: Albumin-gluteraldehyde tissue adhesive has been firstly used for cardiovascular surgery. After that, it has been applied to spleen, cardiac tissues and abdominal tissues to strengthen parenchyma and to provide hemostasis when damaged in severe trauma. In order to diagnose possible complications of albumin-gluteraldehyde tissue adhesive which has been previously used in guided bone regeneration technique in dentistry, we compared in vitro cytotoxic effects of albumin-gluteraldehyde tissue adhesive that is experimentally used in oral surgery with collagen membrane which is frequently used in clinical practice on human gingival fibroblast (HGF-1) cell line.

Material and Methods: Two groups were constituted to investigate cytotoxic effects of supernatants separately collected from albumin-gluteraldehyde tissue adhesive and collagen membrane on 1st, 3rd, 7th, 10th, 14th and 21st days. Supernatants were added to human gingival fibroblast cells for 24, 48 and 72 hours and then, the cytotoxicity was evaluated by MTT analysis.

Results: In all periods, cell viability was statistically significantly lower in the group of albumin-gluteraldehyde tissue adhesive than the group of collagen membrane ($p < 0.05$). It

was observed that as the exposure time of supernatants increases, cell viabilities decrease.

Conclusion: It was obviously seen that human gingival fibroblast cells showed cytotoxic behavior against supernatants gathered from the group of albumin-glutaraldehyde tissue adhesive.

Key words: Cytotoxicity, cell culture, human gingival fibroblast, guided bone regeneration, albumin-glutaraldehyde tissue adhesive.

GİRİŞ

Kemik defektleri çok sayıda hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve kemik hastalıklarının tedavisi için harcanan yıllık toplam maliyetin arttığı toplumumuzda kemik defektlerinin yönetimi rejeneratif tıp alanının en önemli konularından birini oluşturmaktadır.^{1,2}

Canlı organizmada herhangi bir etken sonucu meydana gelen eksikliğin giderilmesinde ve fonksiyon kazandırılmasında ya da bu eksikliğin organizma tarafından düzenli ve hızlı bir şekilde tamamlanmasında kullanılan mevcut materyaller, henüz kaybedilen dokuların geri kazanılmasını ya da kemik defektlerinin tamamen onarımını sağlayabilecek özelliklere sahip değildir.^{1,2}

Diş Hekimliği pratiğinde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu amacıyla sıklıkla kullanılan kollajen membranların erken dönemde yıkıma uğramaları, kontaminasyon riski, geniş boşluklarda defekt içerisine doğru göç etmeleri ve buna bağlı olarak defekt hacmini koruyamamaları gibi dezavantajlar farklı biyomateryal arayışına sebep olmuştur.¹⁻³ Son dönemde kullanımı yaygınlaşan doku yapıştırıcıları klinikte fiksasyon, tamir, bariyer ve hemostaz amaçlarıyla kullanılmaktadır.⁴⁻⁹ Bu materyaller arasında yer alan albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı, saflaştırılmış sığır kaynaklı serum albumin ve glutaraldehit komponentlerinin çapraz bağlanması sonucu üretilmiştir.¹⁰

Albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısının kemik iyileşmesine katkısının olmasına rağmen, çeşitli dokular üzerinde farklı etkilerinin görülmesi, polimerizasyondan sonra glutaraldehitin salınımı ve dolayısıyla temasta olduğu dokularda olası lokal toksik etkileri materyalin kullanımı hakkındaki soru işaretlerini gündeme taşımıştır.¹¹

Alifatik bir dialdehit olan glutaraldehitin farklı oranlarda kullanımı endüstriyel, bilimsel ve medikal uygulamalarda tercih edilmektedir.¹² Bakterisidal, dezenfektan, koruyucu ve fiksatif olarak yaygın kullanımı göz önüne alındığında glutaraldehitin dokularla olan teması önemli bir unsur haline gelmiştir.

Glutaraldehitin reaktif doğası gereği insan sağlığı üzerinde potansiyel olumsuz etkiler oluşturması endişe yaratmaktadır. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda daha önceden kullanılmış albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısının histopatolojik ve histomorfometrik inceleme sonuçları kemik iyileşmesini destekliyor olsa da,¹³⁻¹⁶ çene cerrahisi alanında yapılan araştırmalar deneysel nitelikte-

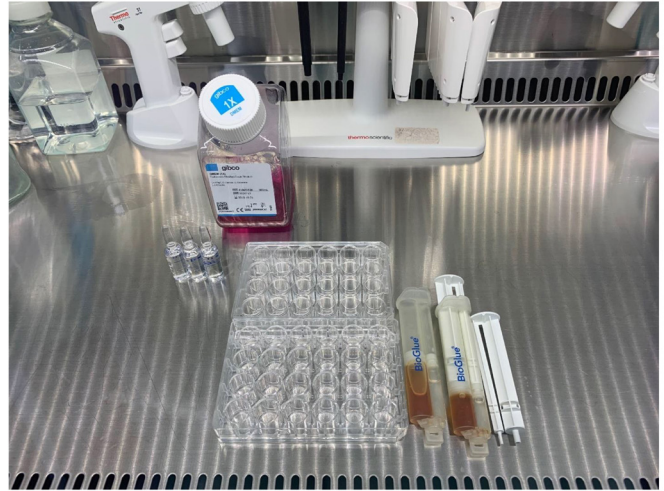
dir. Materyalin ağız içerisinde kullanımı sonrasında ortaya çıkabilecek toksik etkiler ve buna bağlı gelişebilecek komplikasyonların belirlenmesi için temasta olacağı dokular ile ilgili biyoyumluluk çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmadaki amacımız, son dönemde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu uygulamalarında kullanılmaya başlayan albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısının ve klinik pratikte sık kullanılan kollajen membranın insan dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini in vitro olarak değerlendirmek ve toksisitelerini karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından (12.2018/7) desteklenmiş ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.

Çalışmada iki farklı bariyer materyalinin insan dişeti fibroblast hücreleri üzerinde zamana bağlı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu değerlendirme için in vitro sitotoksikite testlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi kullanılmıştır.

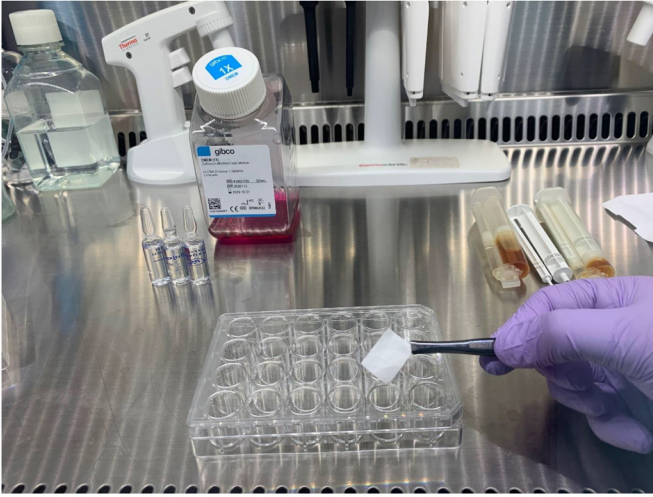
Albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı: Her bir volüm için %45 ağırlıkta sığır kaynaklı serum albumin, %10 ağırlıkta glutaraldehit içeren şırınga 4 e 1 oranında materyal içermektedir (%63 H₂O, %35 serum albumin, %2 glutaraldehit) (BioGlue®; CryoLife, Kennesaw, GA) (Resim 1).



Resim 1. Albumin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı ve uygulama uçları.

20- 30 saniye içinde polimerize olmaya başlar ve 2 dakika içinde tam sertliğine ulaşmaktadır (10).

Kollajen Membran: Üç boyutlu doğal kollajen matris yapısı içeren 15x20 mm ebatlarında 2 adet kollajen membran deney aşamalarında kullanılmıştır (Botiss Collprotect® Membran, Straumann®, İsviçre) (Resim 2).



Resim 2. Kollajen Membran, Botiss Collprotect® Membran, Straumann®

Hücre Kültürü: In vitro çalışmalar için insan dişeti fibroblast hücre hattı (HGF-1; ATCC® CRL-2014™, ABD) kullanılmıştır. Hücrelerin besiyeri, Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco CA, ABD) içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco CA, ABD) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Gibco CA, ABD) içerecek şekilde hazırlanmış ve 25 cm²'lik flasklarda 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde (Membert ICO150med, Schwabach, Almanya) kültüre edilmiştir. Hücreler kültür kabınının %80'ini doldurduklarında Tripsin/Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Gibco CA, ABD) ile pasajlanmıştır. Yapışan hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra çöken pellet besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Sayım için pelletteki hücreler 1:1 dilüsyon olacak şekilde Trypan Blue (Gibco CA, ABD) ile karıştırmış ve hemasitometre lamında sayım yapılmıştır. Lamın altında ve üstündeki 16 büyük karedeki canlı hücreler mikroskopta (Carl Zeiss Primovert, Jena, Almanya) sayılıp aritmetik ortalaması alınarak toplam hücre sayısı hesaplanmıştır.

Deney Gruplarının Oluşturulması ve Süpernatantların Hazırlanması: Çalışma için iki grup oluşturulmuş ve farklı bariyer materyallerinin uygulandığı grupların süpernatantları toplanmıştır. İlk gruba albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı ile, ikinci gruba ise kollajen membran ile muamele edilmiştir. 24 kuyucuklu plakaların tabanlarına albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı ve kollajen membran yerleştirilmiş, üstlerine daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan 1xDMEM besiyerinden eklenmiştir. Çalışmada süpernatantların kullanımının tercih edilme sebebi; 1. ve 2. gruptaki materyallerin flask tabanına yapışan hücrelerin üstlerine eklendiğinde hücrelerin çevre ile etkileşimini kesmesi, ayrıca flask tabanının materyal ile kaplanması durumunda ise hücrelerin yüzeye yapışmama ihtimalinin olmasıdır. 24 kuyucuklu plakalar 1, 3, 7, 10, 14 ve 21 gün süre ile 37°C, %5 CO₂'li inkübatör içerisinde bekletildikten sonra kuyucuklara eklenen besiyerleri ilgili günlerde toplanmış ve ependorf tüplere alınarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Toplanan örnekler bir sonraki işleme kadar -80°C'de bekletilmiştir. Materyallerin bekletilen süre

içerisinde besiyerine saldıkları olası toksik maddelerin değerlendirmeleri elde edilen süpernatantlar kullanılarak incelenmiştir.¹¹

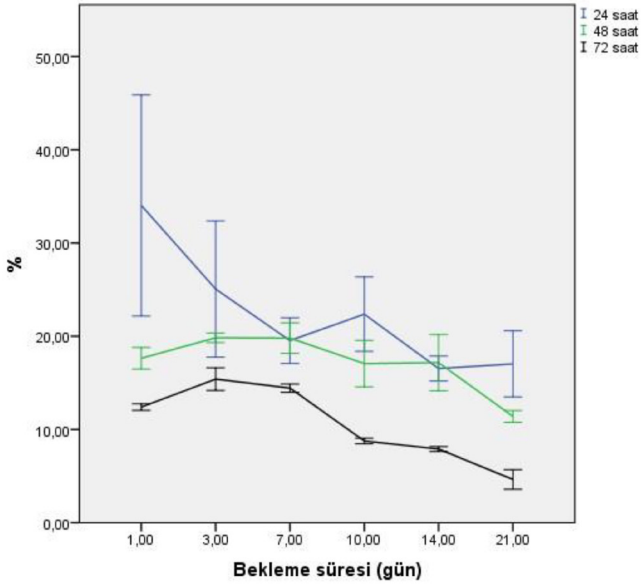
Hücre Canlılığının Belirlenmesi- MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetra-zolium bromid] yöntemi: Sitotoksitenin belirlenmesi için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazilyum bromid içeren MTT tozu (Invitrogen, Carlsbad, ABD) kullanılmıştır. 1 ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) içinde 5 mg MTT tozu olacak şekilde hazırlanan karışım, 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilerek ışık almayacak şekilde hazırlanmıştır. MTT testi uygulaması için; HGF-1 hücre hattı 96 kuyulu mikroplakalara her bir kuyuda 5x10³ hücre olacak şekilde ekilerek bir gün 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama yapılmış ve daha sonra her bir kuyucuğun üzerine 1, 3, 7, 10, 14 ve 21 gün bekletilen süpernatantlar her grup için üçlü tekrar olarak eklenmiştir. Mikroplakalar 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Kontrol kuyularına ise sadece besiyeri eklenmiştir. İnkübasyon süreleri tamamlanan grupların üstlerine 30 µl MTT eklenirken sonra 3 saat daha inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiş ve 10 dakika bekletildikten sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometre (BioTek Synergy H1, Vermont, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası yüzde canlılık değerleri; % Canlılık = [100× (Süpernatant ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama) / (Kontrol hücrelerinin absorbansı ortalaması-kör ortalama)] formülü kullanılarak hesaplanmıştır.¹⁷

İstatistiksel Analiz

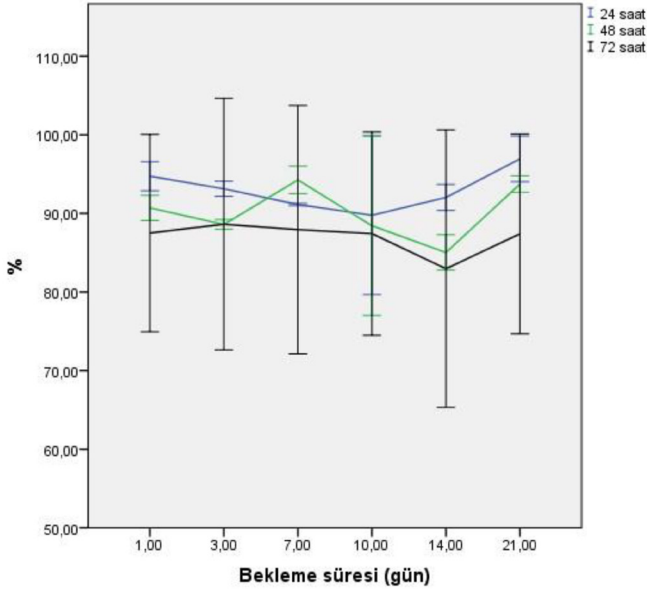
Çalışmada kullanılan değişkenlerin değerleri ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir. Canlılık verilerinin istatistiksel değerlendirmeleri için ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi, çoklu karşılaştırmalarda ise (24, 48, 72 saat inkübasyon süresi/ 1, 3, 7, 10, 14., 21. gün bekleme süresi) Kruskal Wallis ANOVA testi kullanılmış ve p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının ve kollajen membranların süpernatantları ile muamele edilen hücrelerin % canlılıklarının bekleme süresi ve inkübasyon süresine göre değişim grafikleri aşağıda gösterilmektedir (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 1. Albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısının insan dişeti fibroblast (HGF-1) hücre hattı canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri.



Şekil 2. Kollajen membranın insan dişeti fibroblast (HGF-1) hücre hattı canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri.

Yapılan ikili karşılaştırmalarda, tüm ölçümlerde albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı grubunda hücre canlılık değerinin kollajen membran grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 1).

Albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı grubunda bekleme süresine göre hücre canlılığının değişimi değerlendirildiğinde 48 ve 72 saat inkübasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). 24 saat inkübasyon grubunda hücre canlılık değerleri bekleme süresi arttıkça azalma gösterse dahi istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p: 0,3$) (Şekil 1). Kollajen membran gruplarında ise hücre canlılığının 24, 48 ve 72 saat inkübasyon uygulamalarında bekleme süresinden etkilenmediği görülmüştür. (24. saat $p:0,3$, 48. saat $p:0,1$, 72. saat $p:1$) (Şekil 2).

Tablo 1. Gruplardaki yüzde canlılık değerleri gösterilmiştir.

Bekleme Süresi (gün)	İnkübasyon Süresi (saat)	Albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı (%)	Kollajen membran (%)	p
1	24	34 ± 11,8	94,7 ± 1,8	< 0,05
	48	17,6 ± 1,2	90,7 ± 1,6	< 0,05
	72	12,4 ± 0,4	87,5 ± 12,5	< 0,05
3	24	25 ± 7,3	93,1 ± 1	< 0,05
	48	19,8 ± 0,5	88,6 ± 0,6	< 0,05
	72	15,4 ± 1,2	88,6 ± 16	< 0,05
7	24	19,5 ± 2,5	91 ± 0,2	< 0,05
	48	19,8 ± 1,6	94,3 ± 1,7	< 0,05
	72	14,4 ± 0,5	87,9 ± 15,8	< 0,05
10	24	22,4 ± 4	89,8 ± 10,1	< 0,05
	48	17,1 ± 2,5	88,4 ± 11,4	< 0,05
	72	8,8 ± 0,3	87,4 ± 12,8	< 0,05
14	24	16,5 ± 1,3	92 ± 1,6	< 0,05
	48	17,1 ± 3	85 ± 2,3	< 0,05
	72	7,9 ± 0,3	82,9 ± 17,5	< 0,05
21	24	17 ± 3,5	97 ± 3	< 0,05
	48	11,4 ± 0,6	93,7 ± 1	< 0,05
	72	4,6 ± 1,05	87,4 ± 12,7	< 0,05

Albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı grubunda 24, 48 ve 72 saat inkübasyon uygulamaları 6 farklı bekleme süresi için karşılaştırılmış ve 1. gün ($p: 0,03$), 10. gün ($p: 0,047$) ve 21. günde ($p:0,03$) anlamlı fark tespit edilmiştir (Şekil 1). Kollajen membran grubunda ise farklı günlerde toplanan süpernatantların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon uygulamaları arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 2).

TARTIŞMA

Çene ve yüz bölgesinde enfeksiyöz, dejeneratif, kistik, travmatik ve neoplastik lezyonlara bağlı olarak gelişen kemik defektlerinin onarımı maksillofasial cerrahinin en önde gelen uğraş alanlarından birisidir.¹⁸ Genellikle, yeni kemikle dolması gereken bölgeler kemik dokusunun kendini yenileme ve yeniden şekillendirme özelliğiyle iyileşmekte, bu işlevlerin yetersiz kaldığı durumlarda, kemik sınırlarının doğal anatomiye uygun olarak tekrar oluşturulması amacıyla çeşitli biyomateryaller kullanılmaktadır.¹⁹ Maksiller ve mandibuler kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda yeni kemik oluşumu için pıhtı stabilizasyonunun sağlanması önem taşımaktadır.²⁰ Bariyer membranların pıhtıyı stabilize ettiği, boşluğu koruduğu ve yeni kemik yapımı için gereken osteojenik hücrelerin sahaya göçünü kolaylaştırdığı bildirilmiştir.²¹ Günümüz çene cerrahisi pratiğinde; bu amaçla kullanılan biyomateryallerin dezavantajlarını²²⁻²⁵ azaltmak ve kemik iyileşmesini desteklemek amacıyla albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Albümin-glutaraldehit doku yapıştırıcısı ilk olarak kardiyovasküler cerrahi uygulamalarında Amerikan Gıda ve İlaç

Dairesi tarafından onaylanmış, daha sonra ciddi travmalarda, özellikle dalak ve kalp yaralanmalarda ve bazı abdominal dokularda, zarar görmüş parankimi güçlendirmek ve/veya hemostaz sağlamak amacıyla kullanılmıştır.^{10, 26-28} Literatürde, albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının kullanımını takiben gelişen yumuşak doku komplikasyonlarından bahsedilmektedir.²⁶⁻²⁹ Szafranek ve ark.³⁰ materyal ile ilgili kardiyak cerrahiden 7 ay sonra semptom veren kist benzeri bir oluşum bildirmiştir. Lemaire ve ark.³¹ deneysel çalışmalarında, epikardiyal uygulama sonrasında diyafragma paralizisi, akut sinir hasarı ve miyokardiyal nekroz gelişimi, Pasic ve ark.³² aort kapak implantasyonu sonrasında yara iyileşmesinde gecikme görüldüğünü rapor etmiştir. Ayrıca, bazı olgularda ciddi skar dokusu oluşumu tespit edilmiş ve sinir dokusuna yakın bölgelerde materyalin dikkatli kullanılması ve lokal toksisite açısından sorgulanması gerektiği bildirilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bildirilen komplikasyonlar yumuşak dokular ile ilgili olup, gluteraldehit bileşeni bu yan etkilerin bir kısmından sorumlu tutulmaktadır.^{11, 33}

Gluteraldehit, histolojide, doku fiksatif olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.¹¹ GLUMA (Bayer) ticari adı altında satılan ve gluteraldehit içeren yapıştırıcı ajan kültüre edilmiş ve insan yanak epitelinde ve fare odontoblast hücrelerinde sitotoksik etkili bulunmuştur.³⁴ In vivo çalışmalar ise insan olmayan primatlarda GLUMA'nın geniş nekroz ve ülserleşme oluşturduğunu göstermiştir.³⁵

Albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı içerisinde yer alan gluteraldehitin dokulara ve sentetik materyallere güçlü bir şekilde bağlandığı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldığında güvenli olduğu belirtilmektedir. Ancak, bazı olgu raporlarında polimerize olmuş materyalin rezorpsiyonu sonrasında gluteraldehitin tekrar serbest hale geldiği ve temasta olan dokulara lokal toksik etkilerinin olabileceği öne sürülmektedir.¹¹

Fürst ve Banerjee,¹¹ farklı hücre kültürlerine ekledikleri albümin-gluteraldehit süpernatantlarının hücre canlılıkları üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu gözlemlemiştir. Buna ek olarak, farklı doku türlerinin materyale ya da materyalin süpernatantına karşı göstereceği reaksiyonun da farklı olduğu ileri sürülmektedir.^{11, 27} Albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının in vivo uygulandığı çalışmalarda akciğer ve karaciğer dokularında yüksek dereceli inflamasyon, ödem ve nekroz görülürken, aort dokusunda hafif inflamasyon belirtilerinin görüldüğü bildirilmiştir.¹¹ Bildirilen komplikasyonların uzun dönem takipler sonrasında ortaya çıkması ve bazı dokuların materyale karşı daha fazla duyarlı olduğunun gösterilmesi her dokunun lokal toksisite açısından sorgulanması gerektiğini düşündürmüştür.

Literatür ile benzer olarak, çalışmamızda, albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısından elde edilen süpernatantların tüm zaman dilimleri içerisinde hücre canlılığını yüksek

ölçüde etkileyerek, kullanılan hücre hattında sitotoksisteye sebep olduğu tespit edilmiştir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniğinde bariyer amacıyla kullanılan kolajen membranlar biyouyumluluğu ve klinikte en sık tercih edilen materyal olması sebebiyle çalışmadaki kontrol grubumuzu oluşturmaktadır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısı ile kolajen membranın insan diş eti hücreleri ile farklı etkileşimleri sonucunda canlılıklarını etkilediği gözlenmiştir. Değişik zaman dilimlerinde inkübe edilen albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının hücre proliferasyonu üzerindeki negatif etkisi materyalin sitotoksik etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Süpernatantların bekleme süreleri arttıkça hücre canlılık oranlarının azalmasının sebebi zamanla serbestleşen gluteraldehit miktarındaki artış olarak düşünülebilir. Ayrıca, hücrelerin inkübasyon süreleri değerlendirildiğinde 24. saatte anlamlı bir değişiklik görülmezken, 48. ve 72. saatlerde hücre canlılık oranlarında görülen azalma, hücrelerin büyümesi için gerekli olan yapıtaşlarını içeren besiyerlerinin bu süre zarfında değiştirilmemesi sebebiyle, ortamda bulunan besin maddelerinin azalması ve toksik maddelerin artmasına bağlı olabileceğini de düşündürmektedir.

SONUÇ

İnsan dişeti fibroblast hücreleri albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısından elde edilen süpernatantlara karşı sitotoksik davranış göstermiştir. Sonuçlarımız ile birlikte tüm veriler değerlendirildiğinde; polimerizasyon sonrasında materyalden serbestlenen gluteraldehit bileşeni bu toksisiteden sorumlu tutulabilir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma, albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının insan dişeti fibroblast hücresi üzerindeki toksik etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Bu nedenle, albümin-gluteraldehit doku yapıştırıcısının kullanımı klinik pratiğinde yarar sağlar gibi görünse de, olası yan etkiler göz önünde bulundurulmalı ve uzun dönem takipli in vivo ve farklı in vitro çalışmalar yapılarak toksik etkiler gözlemlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev* 2019; 55: 26-32.
2. Neagu TP, Țiglic M, Cocoloș I, Jecan CR. The relationship between periosteum and fracture healing. *Rom J Morphol Embryol* 2016; 57: 1215-1220.
3. Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, et al. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontol* 2017; 105: 1-12.
4. Rezaei M, Jamshidi S, Saffarpour A, Ashouri M, Rahbarghazi R, et al. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Platelet-Rich Plasma, and Fibrin Glue for Periodontal Regeneration, *Int J Periodontics*

Restorative Dent 39: e32-e45

5. Liao HT, Chen CT, Chen CH, Chen JP, Tsai JC. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *J Trauma* 2011; 70: 228-237.

6. Wagner W, Wiltfang J, Pistner H, Yildirim M, Ploder B, et al. Bone Formation With a Biphasic Calcium Phosphate Combined With Fibrin Sealant in Maxillary Sinus Floor Elevation for Delayed Dental Implant, *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 1112-1117.

7. Wagner W, Wiltfang J, Pistner H, Yildirim M, Ploder B, et al. Bone formation with a biphasic calcium phosphate combined with fibrin sealant in maxillary sinus floor elevation for delayed dental implant. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23: 1112-1117.

8. Efe T, Füglein A, Heyse TJ, Stein T, Timmesfeld N, et al. Fibrin glue does not improve the fixation of press-fitted cell-free collagen gel plugs in an ex vivo cartilage repair model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012; 20: 210-215.

9. Visscher SH, van Minnen B, Bos RR. Closure of oroantral communications: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 68: 1384-1391.

10. Jones EL, Burlew CC, Moore EE. BioGlue hemostasis of penetrating cardiac wounds in proximity to the left anterior descending coronary artery, *J. Trauma Acute Care Surg* 2012; 72: 796-798.

11. Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity, *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 1522-1529.

12. Ballantyne B and Myers RC. The acute toxicity and primary irritancy of glutaraldehyde solutions. *Vet Human Toxic* 2001; 43:193-202.

13. Türer A and Önger ME. Effects of different tissue adhesives in treating calvarial bone defects. *J Craniofac Surg* 2017; 28: e682-e685.

14. Muhammad JK, Al Hashimi BA, Al Mansoor AB, Ali I. The Use of a Bioadhesive (BioGlue®) Secured conchal graft and mandibular distraction osteogenesis to correct pediatric facial asymmetry as result of unilateral temporomandibular joint ankylosis. *Craniofac Trauma Reconstr* 2013; 6: 49-56.

15. Sener I, Bereket C, Arslan G, Özkan N, Özdemir M, et al. The effect of hemostatic agents and tissue adhesive on injured peripheral nerve healing in rats- Part I. Electrophysiological study. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24: 23-29.

16. Doganay O, Tugrul M, Olgac V, Atalay B. Guided bone regeneration using bioglue as a barrier material with and without biphasic calcium phosphate: a histological and histomorphometric study. *J Craniofac Surg* 2019; 30: 1308-1313.

17. Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Hsu JC.

Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 1999; 46: 520-530.

18. Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: A comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 105-114.

19. Alfaro FH, Opispo CA, Biosca MJ. Bone grafting in oral implantology techniques and clinical applications, 1th edition, Quintessence books, Barcelona, 2006; p:9-24.

20. Machavariani A, Menabde G, Zurmukhtashvili M. Guided Regeneration Of Jaw Bone Defects With Combination Of Osteoplastic Materials And Stem Cells. *Georgian Med News.* 2019; 290: 131-135.

21. Calvo-Guirado JL, Ramírez-Fernández MP, Delgado-Ruiz RA. Influence of biphasic -TCP with and without the use of collagen membranes on bone healing of surgically critical size defects. A radiological, histological, and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25: 1228-1238.

22. Carbonell JM, Martín IS, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, et al. High-density Polytetrafluoroethylene Membranes in Guided Bone and Tissue Regeneration Procedures: A Literature Review, *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43: 75-84.

23. Cheon GB, Kang KL, Yoo MK, Yu JA, Lee DW. Alveolar Ridge Preservation Using Allografts and Dense Polytetrafluoroethylene Membranes With Open Membrane Technique in Unhealthy Extraction Socket. *J Oral Implantol* 2017; 43: 267-273.

24. Gielkens PF, Bos RR, Raghoobar GM, Stegenga B. Is There Evidence That Barrier Membranes Prevent Bone Resorption in Autologous Bone Grafts During the Healing Period? A Systematic Review, *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22: 390-398.

25. Korzinskas T, Jung O, Smeets R, Stojanovic S, Najman S, et al. In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration, *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2952.

26. Wang ND, Doty DB, Doty JR. BioGlue®: a protective barrier after pericardiotomy. *J Card Surg* 2007; 22: 295-299.

27. Erasmi AW, Sievers HH, Wohlschläger C. Inflammatory response after BioGlue application. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1025-1026.

28. Le Maire SA, Schmittling ZC, Coselli JS, BioGlue surgical adhesive impairs aortic growth and causes anastomotic strictures. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1500-1506.

- 29.** Le Maire SA, Conklin LD, Schmittling ZC. Chlorohexidine gluconate gel protects the myocardium and sinoatrial node during application of BioGlue surgical adhesive. *J Surg Res* 2001; 100: 290-291.
- 30.** Szafranek A, Podila SR, Al-Khyatt W et. al. Aseptic mediastinal cyst caused by BioGlue 7 months after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 1202-1203.
- 31.** Lemaire SA, Ochoa LN, Conklin LD et. al. Nerve and conduction tissue injury caused by contact with BioGlue. *J Surg Res* 2007; 143, 286-293.
- 32.** Pasic M, Unbehaun A, Drews T et. al. Late wound healing problems after use of bioglue for apical hemostasis during transapical aortic valve implantation. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2011; 13: 532-535.
- 33.** Biggs G, Hafron J, Feliciano J et. al. Treatment of splenic injury during laparoscopic nephrectomy with BioGlue, a surgical adhesive, *J Urol* 2005; 66: 882.
- 34.** Scheffel DLS, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Pashley D et. al. Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *Journal of dentistry*, 2015; 43: 997-1006.
- 35.** RD Jiang, H Lin, G Zheng, X M Zhang, Q Du, M Yang, *In Vitro Dentin Barrier Cytotoxicity Testing of Some Dental Restorative Materials*, *J Dent* 2017, 58, 28-33.