



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**ANTİBAKTERİYEL MADDE İÇEREN ADEZİVLER İLE
ANTİBAKTERİYEL İÇERMEYEN ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ
ORTAMINDA SİTOTOKSİSİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt Derya TÜREL SİLSÜPÜR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr Üyesi Elif Pınar Bakır

DİYARBAKIR- 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**ANTİBAKTERİYEL MADDE İÇEREN ADEZİVLER İLE ANTİBAKTERİYEL
İÇERMEYEN ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
SİTOTOKSİSİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt DERYA TÜREL SİLSÜPÜR

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr Üyesi Elif Pınar Bakır

DİYARBAKIR- 2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce 17.024 no'lu proje ile desteklenmiştir.

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ Anabilim Dalı

“ANTİBAKTERİYEL MADDE İÇEREN ADEZİVLER İLE ANTİBAKTERİYEL İÇERMEYEN ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA SİTOTOKSİSİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ” isimli Uzmanlık Tezi 17/01./2019 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek BAŞARILI bulunmuştur.

Uzmanlık Öğrencisi : DERYA TÜREL SİLSÜPÜR

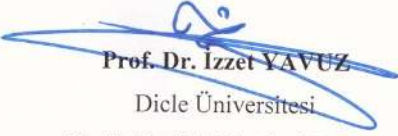
Tez Danışmanı : ELİF PINAR BAKIR

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	Kurumu
Başkan	Prof.Dr. Ahmet Dağ	DÜ Diş Hek. Fak. Periodontoloji AD 
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ömer Çellik	ADYÜ Diş Hek. Fak. Rest. Diş Ted. AD 
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Elif Pınar Bakır	DÜ Diş Hek. Fak. Rest. Diş Ted. AD 
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Şeyhmus Bakır	DÜ Diş Hek. Fak. Rest. Diş Ted. AD 

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

18/01/2019


Prof. Dr. İzzet YAVUZ

Dicle Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

17.01.2019

Derya TÜREL SİLSÜPÜR



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösterici olan ve tez çalışması süresince her konuda yardımcı olan değerli hocam ve danışmanım Dr Öğr Üyesi Elif Pınar Bakır'a

Eğitimim süresince emeği geçen ve her daim engin fikirlerine ihtiyaç duyduğum Dr Öğr Üyesi Şeyhmus Bakır ve Dr.Öğr.Üyesi Emrullah Bahşi'ye

Tezimin baştan sona her aşamasında benden desteğini ve emeklerini esirgemeyen güzel kalpli dönem arkadaşım Dt. Seda Erkan'a, eşim Serkan Silsüpür'e

Hayatım boyunca bana olan ilgi ve sevgilerini eksik etmeyen ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan aileme,

Tez çalışmalarımı tamamlamamda yardımları için DÜBAP' a,

Bölümdeki tüm mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

Canım oğlum Kaan'ıma va canım kızım Melis'ime sevgilerle

Dt Derya TÜREL SİLSÜPÜR

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TEŞEKKÜR	iv
SEMBOLLER/ KISALTMALAR	vi
RESİMLER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER.....	7
1.Adeziv Sistemler	7
2.Adezyon.....	8
2.1.Dişhekimliğinde adezyon:	9
2.2.Adezyonun başarısını etkileyen faktörler	9
3.MİNE/DENTİN BONDING SİSTEMLERİ:	11

4.ADESİV SİSTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI:	12
5.ETC AND RİSE ADEZİV SİSTEMLER	16
5.1. Üç Aşamalı Etch And Rinse Adeziv Sistemler (Etch+Primer+Bonding)	16
5.1.1. Mine Ve Dentin Yüzey Koşullarının Değiştirilmesi	17
5.1.1.a. Mine Dokusu	17
5.1.1.b. Dentin Dokusu	20
5.1.2. Adezyonu Güçlendiren Ajanların Kullanılması	22
5.1.2.a. Hibrit Tabaka	23
5.1.2.b MMP İnhibitörleri	26
5.1.3-Bonding ajanın demineralize mine/dentin yüzeyine infiltrasyonu	27
5.2. İki Aşamalı Etc-and-Rinse Adeziv Sistemler (5. Jenerasyon)	28
5.3. Self-Etch Adeziv Sistemler (6. ve 7. jenerasyon)	31
5.3.1. İki Aşamalı Self Etch Adeziv Sistemler (6. Jenerasyon)	33
5.3.2. Tek Aşamalı Self Etch Adezivler (7. Jenerasyon)	35
6. SELF-ETCH ADEZİV SİSTEMLERİN YAPISINDAKİ BİLEŞENLER	39
6.1.Monomerler	39
6.2 Başlatıcılar	40
6.3.İnhibitörler	40
6.4.Çözücüler	41
6.5.Doldurucular	41
6.6.Antimikrobiyal Maddeler	42
6.6.a.Metakriloksi Dodecyl Pridinyum Bromid(MDPB)	42
6.6.b. Klorheksidin	44
6.6.c. Gluteraldehit	46
7.BİYOUYUMLULUK	48
8. BİYOUYUMLULUK TEST YÖNTEMLERİ	48
9.İN-VİTRO TESTLER	49
10. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ	50
10.1. Hücre Kültürü Testleri	52
10.1.a. Direkt Hücre Kültürü Metodu	53

10.1.b. Bariyer Metodu.....	53
10.2. Agar difüzyon test yöntemi:	53
10.3. Filtre difüzyon test yöntemi:	54
10.4. Dentin bariyer test yöntemi:	54
11. SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME YÖNTEMLERİ	54
11.1.Hücre Canlılığının Belirleyen Testler	54
11.1.1. Tetrazolyum Tuzlarıyla Yapılan Testler	56
11.1.2. Luminesans Testleri	58
11.1.2.a. Alamar Mavisi Floresans Testi Ve Diğer Floresans Metodlar	58
11.1.2.b. ATP Biyoluminans Testi	59
11.1.2.c. Gerçek Zamanlı Bioluminans Testi	59
11.2.2. Proliferasyon Değerlendirme Testi.....	60
11.2.3. Genotoksisite, Mutojenite ve Karsiyonenite Testleri.....	60
12. HAYVAN DENEYLERİ	61
13. KLİNİK ÇALIŞMALAR (Kullanım Testleri)	62
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	64
Test Materyallerinin Hazırlanması	66
Hücre Kültürü Çalışması	66
1. XTT hücre proliferasyon ve canlılık tayin testi:	68
Test Materyallerinin Doz ve İnkübasyon Sürelerine Bağlı Olarak L929 Hücrelerinin Morfolojisi Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular	70
4. BULGULAR	77
1.XTT Testine Ait Bulgular.....	77
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR	101
7. KAYNAKLAR	103

8. ORJİNALLİK RAPORU	121
----------------------------	-----

9. ÖZGEÇMİŞ	122
-------------------	-----

SEMBOLLER/ KISALTMALAR

cm	: Santimetre
MTT	: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTS	: 3-(4,5dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sülfofenil)-2H-tetrazolyum
XTT	: 2,3-bis-(2metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5karboksianilid
WST	: 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum
GPDM	: glycerophosphoric acid dimethacrylate
NPG-GMA	: N-phenyglycine glycidylmethacrylate
TBB	: trbutyl borane
EDTA	: ethylen diamin tetra acidic acid
TEM	: geçirmeli elektron mikroskobu
SEM	: taramalı elektron mikroskobu
MMP	: matriks metalloproteinaz
Zn	: çinko
Ca	: kalsiyum
CRA	: clinical research associates
BPO	: Benzoyl peroksit
TBB	: tri-n-butyl borone
BHT	: butylated hidroksitolune
MEHQ	: monomethyle ether hydroquinane
MDPB	: metakriloksi dodecil pridinyum bromid
mm	: Milimetre
pH	: Ortamdaki hidrojen iyonlarının konsantrasyonu
HEMA	: Hidroksietil Metakrilat
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre

MPa	:	Megapaskal
MA	:	Metakrilik asit
MMA	:	Metil metakrilat
Bis-GMA	:	Bisfenol-A glisidil metakrilat
UDMA	:	Üretan dimetakrilat
TEGDMA	:	Trietilen glikol dimetakrilat
ISO	:	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
°C	:	Santigrat derece
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
TS EN	:	Türk Standartları Enstitüsü
HDPE	:	Yüksek Yoğunluklu Polietilen
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
FBS	:	Fetal Bovine Serum
MEM	:	Minimum Essential Medium
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ml	:	Mililitre
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagles Medium
CO₂	:	Karbondioksit
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
P	:	İstatistiksel anlamlılık

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Tez çalışmasında kullanılan adezivler.....	63
Resim 2: Hücrelerin büyütüldüğü inkübatör.....	66
Resim 3: Hücre pasajlamada kullanılan santrifüj cihazı.....	67
Resim 4: Ters ışık mikroskobu.....	69
Resim 5: Hücre deneyleri için steril ortam sağlayan biyogüvenlik kabini.....	69
Resim 6. Gluma self etch ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.....	71
Resim 7. Peak universal ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.....	72
Resim 8. Gluma 2 bond ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.....	73
Resim 9. Clearfil SE bond ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.....	74
Resim 10. Clearfil SE Protect ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.....	75

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1. Değim açısı (contact angle) .A, küçük değim açısı B:Büyük değim açısı.....	9
Şekil 2. Dentin smear tabakası (smear layer) ve smear tıkaçlar.....	12
Şekil 3. Total-Etc Adeziv sistemlerin sınıflandırılması.....	16
Şekil 4. Etch and rinse adeziv sistemlerin uygulama aşamalar.....	17
Şekil 5. Mine dokusunun birleşimi (hacimce).....	18
Şekil 6. Dentin dokusunun bileşimi (hacimce).....	20
Şekil 7. HEMA'nın kimyasal formülü.....	23
Şekil 8. Bonding ajanların mine dokusuna inter ve intraprizmatik penetrasyonu sonucu oluşan makro ve mikro taglar. A. İnterprizmatik penetrasyon (makro tag) B. İntraprizmatik penetrasyon (mikro tag).....	27
Şekil 9.İki aşamalı Etch and Rinse adeziv sistemlerin uygulama aşamaları.....	30
Şekil 10. İki aşamalı self-etch adeziv sistemlerin uygulama aşamaları.....	35
Şekil 11. Tek aşamalı adezivlerde kompozit-adeziv ara yüz boyunca oluşan su kabarcıkları.....	37
Şekil 12. Su ağacı şeklindeki görüntüler (Water-tree).....	37
Şekil 13. MDPB molelülü ve kontakt dezenfektan etkisi (Kuraray Co).....	43
Şekil 14. Antibakteriyel molekül MDPB'nin polimer ağında sabitlenmesi.....	43
Şekil 15: Klorheksidinin kimyasal yapısı.....	44

Grafik 1 .Gluma Self Etch’ nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	81
Grafik 2 .Peak Universal’ ın L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	82
Grafik 3 .Gluma 2 Bond’ un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	83
Grafik 4 .Clearfil SE Bond’ un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	84
Grafik 5 .ClearfilProtect Bond’un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	85
Grafik 6. Test materyallerinin 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	86
Grafik 7. Test materyallerinin 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	87
Grafik 8. Test materyallerinin 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik.....	87

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Kullanılan adeziv materyallerin karakteristik özellikleri.....	64
Tablo 2. Test materyallerinin L929 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık değerleri.....	76
Tablo 3. XTT testi sonuçlarına ait iki yönlü varyans analizi tablosu.....	78
Tablo 4. XTT testi sonuçlarına ait Bonferroni testi tablosu.....	79

ANTİBAKTERİYEL MADDE İÇEREN ADEZİVLER İLE ANTİBAKTERİYEL İÇERMEYEN ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA SİTOTOKSİSİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Derya Türel Silsüpür

Elif Pınar Bakır

Restoratif Diş Tedavisi A.D., Dişhekimliği Fakültesi, Dicle Üniversitesi,
Diyarbakır

ÖZET

Amaç: Bu tezin amacı; antibakteriyel bileşen içeren adeziv sistemler ile antibakteriyel bileşen içermeyen adeziv sistemlerin, sitotoksosite açısından kıyaslanarak değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda beş farklı adeziv sistem, hücre kültürü ortamında direkt temas yöntemiyle biyouyumluluk açısından karşılaştırılarak değerlendirildi. Test materyallerinin dört farklı dilüasyonu (%1, %0.1, %0.01, %0.001) L929 fare fibroblast hücre kültürü ortamına ilave edildikten sonra; üç farklı zaman periyodunda (24-48-72 saat) inkübe edilen test materyallerinin, hücre proliferasyonuna etkileri, XTT testi ile değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizinde, , iki yönlü varyans analizi ve Bonferoni post-testinden yararlanıldı.

Bulgular: Gluma self etch adeziv sistemin yüksek dozlarının hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı ,doz arttıkça hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmüştür. Öte yandan, bütün inkübasyon sürelerinde en yüksek dozda bile toksik etki düşük bulunmuştur. Clearfil SE Bond ve adeziv sistem, tüm inkübasyon sürelerinde, en yüksek dozda(%1) kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azaltmıştır. Peak Universal adeziv sistem, tüm dozlarda kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azaltmıştır. Gluma 2 Bond'un en yüksek dozda(%1) hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı, bu azalmanın zaman bağımlı olarak arttığı görülmektedir. Clearfil Protect Bond adeziv sistemin; tüm inkübasyon süreleri için, %1 ve %0,1

dozlarının hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı görülmektedir. Materyallerin hem 48 hem de 72 saatlik inkübasyonda anlamlılık dereceleri farklı olsa da benzer etkileri olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Adeziv sistemlere eklenen antibakteriyel bileşenlerin biyouyumluluğa olumsuz bir etkisi olmamıştır. En yüksek dozun hem antibakteriyel içeriğe sahip adeziv sistemlerde hem de antibakteriyel içeriğe sahip olmayan adeziv sistemlerde en toksik dozu oluşturduğu, bunun inkübasyon süresi ile artış gösterdiği gözlenmiştir.

Anahtar kelime: antibakteriyel bileşen içeren adeziv sistem, hücre kültürü, sitotoksosite

EVALUATION OF ADHESIVES CONTAINING ANTIBACTERIAL AGENTS AND ANTIBACTERIAL-FREE ADHESIVES IN TERMS OF CYTOTOXICITY IN CELL CULTURE MEDIUM

Derya Türel Silsüpür

Elif Pınar Bakır

Department of Restorative Dentistry Faculty of Dentistry, Dicle University,
Diyarbakir

ABSTRACT:

Objective: The aim of this thesis is to compare the adhesive systems containing antibacterial components and the antibacterial component-free in terms of cytotoxicity.

Materials and Methods: In our study, five different adhesive systems were evaluated in terms of biocompatibility by direct contact method in cell culture medium. Four different dilutions of the test materials (1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%) were added to the L929 mouse fibroblast cell culture medium and the effects of test materials incubated in three different time periods (24-48-72 hours) on cell proliferation were assessed by XTT test. . Two-way analysis of variance and Bonferoni post-test were used for statistical analysis.

Results: It was observed that high doses of Gluma self etch adhesive system significantly decreased cell viability compared to control and there was no statistically significant difference in cell viability as the dose increased. However, toxicity was low even at the highest dose in all incubation times. Clearfil SE Bond and adhesive system significantly reduced cell viability compared to control at the highest dose (1%) in all incubation times. Peak Universal adhesive system significantly reduced cell viability compared to control at all doses. It is observed that Gluma 2 Bond significantly reduces cell viability in the highest dose (1%), and this decrease increases with time. For all incubation times of the Clearfil Protect Bond adhesive system, doses of 1% and 0.1% significantly reduce cell viability.

Although both the 48 and 72 hour incubation levels of the materials differed significantly, they had similar effects.

Conclusion: The antibacterial components added to adhesive systems had no negative effect on biocompatibility. It was observed that the highest dose was the most toxic dose in both the adhesive systems with antibacterial content and in the adhesive systems without antibacterial content, which increased with incubation time.

Key Words: Adhesive system with antibacterial component, , cell culture, cytotoxicity



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, toplumdaki sağlık bilincinin artması, bireylerin dişhekiminden beklentilerini de arttırmıştır. Son yıllarda estetik, fonetik ve fonksiyonel ihtiyaçlara cevap verebilen, uzun ömürlü, aynı zamanda da sağlığa zarar vermeyen restorasyonların geliştirilmesi için yapılan araştırmalar artış göstermiştir. Ancak dişhekimliği alanında kullanılmak üzere yeni materyallerin üretilip piyasaya sürülmesi, bu materyallerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin incelenip değerlendirilme ihtiyacını ortaya koymaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar, klinisyen hekimler için hem etik uygulama açısından hem de tedavinin başarısı için doğru materyalin tespitinde yol gösterici olmakta aynı zamanda ileri bilimsel çalışmalar için rehber olmaktadır.

Adeziv sistemlerin ortaya çıkmasıyla, dişte madde kaybını en aza indiren minimal invaziv teknik geliştirilmiştir (1). İdeal bir restoratif materyal, diş dokularına güçlü adezyon göstermeli, mikrosızıntıyı engelleyebilmelidir. Mikrosızıntı; restoratif materyal ile kavite duvarı arasında bakteri geçişine sebep olur. Mikrosızıntının en önemli komplikasyonları, post operatif hassasiyet, marjinal renklenme, sekonder çürük, pulpa enflamasyonu ve nekrozudur (2). Restoratif materyal ve dentin adeziv sistemlerde kaydedilen ilerlemeye rağmen, mikrosızıntıyı tamamen engellemek mümkün olmamıştır. Önlenemeyen mikrosızıntı varlığında, diş-restorasyon arayüzünü istila eden mikroorganizmaları engellemek için çeşitli önlemler alınmalıdır. Bu amaçla adeziv sistemlere antibakteriyel ajan ekleyerek antibakteriyel etki oluşturmak yenilikçi ve umut vadeden bir yaklaşımdır (3).

Dişhekimliğinde yaygın olarak kullanılan adeziv sistemler farklı bileşenlere sahiptir. Adezivin içeriğindeki bileşenlerin canlı dokular üzerindeki etkisini belirlemek için, biyouyumluluk testleri yapılmaktadır. Biyouyumluluk, bir maddenin canlı doku ile teması sonucunda, lokal veya sistemik toksisite, alerjik, immuojenik, mutajenik ve karsinojenik konak cevabı oluşturmama durumudur (4). Adeziv sistemlerin kullanım kolaylığı, güçlü bağlantı, antimikrobiyal etkinlik gibi özelliklerinin üzerinde durulurken, bu sistemleri meydana getiren bileşenlerin özellikleri, birbirleriyle ve canlı dokuyla etkileşimleri biyouyumluluk açısından önemli olup incelenmelidir (5).

Adeziv sistemlerin bileşenleri; Bisfeneol Aglisidil metakrilat(Bis-GMA), halosfosfor esterleri, poliüretan ve etil metakrilattır. Yeni geliştirilen sistemlerin içeriğine antibakteriyel etkiye sahip maddeler eklenmekte ve daha iyi sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktadır. İçeriği geliştirmek için eklenen bu antibakteriyel bileşenlerin biyouyumluluğu değerlendirilirken, sırasıyla in-vitro, in-vivo (hayvan deney testleri) ve klinik kullanım testleri olmak üzere üç aşama izlenir (6,66) Adeziv sistem, deney hayvanlarında ve sonrasında insanlarda kullanılmadan önce mutlaka invitro sitotoksitite testlerinden geçmiş olmalıdır.

Restoratif materyallerin biyoyuyumluluğunun değerlendirildiği bir invitro test yöntemi olan hücre kültürü yönteminde, hücre canlılığı, hücre morfolojisindeki değişiklikler ve hücrelerdeki mediyatör aktiviteleri araştırılmaktadır (4). Kullanılan hücre kültürü materyalin insan vücudunda kullanılacağı doku tipinden üretilmelidir. Diş pulpasının elde edilmesi zor olduğu için, pulpaya en yakın bağ doku hücresi olan L 929 hücreleri (fare fibroblast hücresi) tercih edilmektedir.

Bu çalışmada antibakteriyel madde (gluteraldehit, klorhekzidin ve MDPB) içeren üç farklı self-etch adeziv (Peak universal bond, Clearfil protect bond, Gluma 2 bond) ile antibakteriyel madde içermeyen iki farklı self-etch adezivin (Gluma self etch bond, ,Clearfil SE Bond) sitotoksik etkisinin direkt kontakt yöntemiyle XTT testi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

1.Adeziv Sistemler

Dişhekimliğinde restorasyonların amacı; dişlerin fonksiyon, fonasyon ve estetik ihtiyaçlarını yerine getirmesidir. Restoratif dişhekimliğinde ise özellikle estetik son yıllarda önem kazanmakta yapılan çalışmalarda restoratif materyallerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve diş sert dokularına adezyonla bağlanmasının artırılması amaç edinilmiştir (7).

Adezyonun artırılması ile restorasyon ve diş sert dokuları arasındaki mikrosızıntının önüne geçilir ve böylece hassasiyet, sekonder çürük, renklenmenin azaltılması sağlanarak tedavinin başarı oranını yükseltilir (8). Restorasyonların klinik ömürlerini uzatmak, dünya çapında yürütülen dental materyal araştırmalarının ana amacıdır (9). Restorasyonun her değişimi sağlam diş dokusunun bir miktar daha kaybedilmesine ve daha karmaşık restorasyonlara ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır. Akıcı kıvamdaki rezinin bağlayıcı sistem olarak kullanıma girmesi, rezinlerin diş dokusuna mikro mekanik olarak bağlanabilmesini sağlamıştır (10, 11). Mikro mekanik kenetlenme sayesinde oral sıvıların, bakteri ve bakteri ürünlerinin geçişi önlenerek işlem sonrası hassasiyet, kenar renklenmesi, sekonder çürük gibi klinik problemler minimuma indirilebilmektedir (12). Günümüzde, üretilen adeziv sistemler, mine ve dentine bağlanma amacıyla kullanılmaktadırlar (10).

İdeal bir dentin bağlayıcı sistem aranılan özellikler şöyle sıralanabilir:

1-Mine ve dentine mikro mekanik ve kimyasal yolla bağlanmalı (gap-free bond)

2- Mine ve dentin dışında metal ve porselene de bağlanabilmeli (multisurface bond)

3-Nemli yüzeylere kolay uygulanabilmeli (wet bonding)

4-Mikro sızıntıyı ve ikincil çürükleri önlemeli

5-Dentin kanallarının tümünü ya da bir bölümünü kapatarak operasyon sonrası duyarlılıkları önlemeli

6-Biyouyumlu ve uygulaması kolay olmalı, ağız ortamında uzun dönem stabilitesini korumalı

7-Polimerizasyon büzülmesi sonucu oluşan streslere karşı koyabilmeli, çiğneme kuvvetlerinin oluşturduğu streslere karşı koyabilmeli

8- Bitirme ve parlatma işlemlerine izin vermek amacıyla kısa sürede maksimum bağlanma dayanımına ulaşmalı

9- Kalınlığı 20 µm' den az olmalıdır (13).

Adezyonla ilgili çalışmalarda ilk adım, asitle pürüzlendirme olurken bunu adeziv sistemler (mine/dentin bonding sistemleri) takip etmiştir ve diş hekimliğinde adeziv sistemler ortaya çıkmıştır.

2.Adezyon

Adezyon, farklı moleküller arasındaki çekim kuvvetine denir. Adezyonu oluşturan maddeye *adeziv* denir. Adezivin bağlandığı maddeye *adherent* denir. Başarılı bir adezyon için adeziv ve aderent arasında tam temas gereklidir (14).

Adezyon türlerine göre dört farklı şekilde incelenebilir (15).

➤ **Mekanik adezyon:** Adeziv ve aderentin yüzeylerindeki girinti ve çıkıntılara kilitlenmesi ile oluşur. Yüzey pürüzlülüğü ve akıcılık mekanik adezyonu etkileyen faktörlerdendir.

➤ **Adsorbisyon adezyonu:** Adeziv ve aderent arasında kimyasal bağ ile oluşur. Primer ve sekonder olmak üzere iki çeşit kimyasal bağ oluşur. Primer bağ daha güçlü olup iyonik, kovalent ve metalik olmak üzere üç bağdan meydana gelir. Sekonder bağ ise hidrojen ve Van der Waals bağlarından meydana gelir.

➤ **Difüzyon adezyonu:** Hareketli moleküller arasındaki kilitlenmeden meydana gelir.

➤ **Elektrostatik adezyon:** Farklı yüzeydeki elektrostatik etkileşimler arasında meydana gelen zayıf bir bağıdır.

2.1. Dişhekimliğinde adezyon:

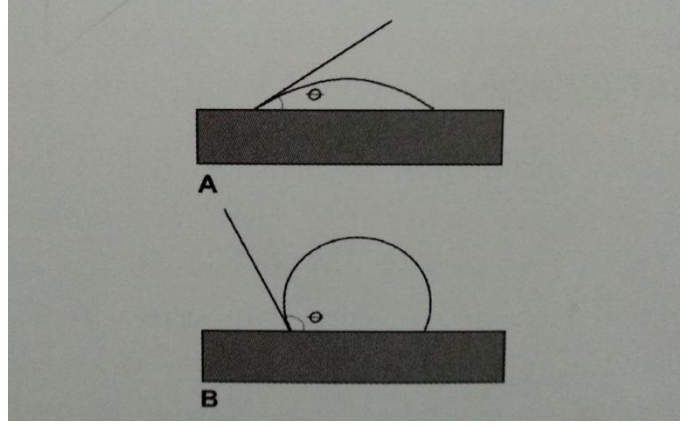
Bağlanma olarak da adlandırılan adezyon, dental restoratif materyallerde, diş sert dokularının inorganik kısmı ile rezin monomerlerinin yerdeğiştirmesi esasına dayanır (14).

Asitle pürüzlendirme sonrası diş sert dokuların yüzeyinden kalsiyum ve fosfatın uzaklaşması ile girinti ve çıkıntılar oluşur. Rezin monomerin bu pürüzlendirilmiş yüzeylere penetrasyonu ile mekanik ve kimyasal adezyon oluşurken, dentin tübülleri ve rezin taglar arasında difüzyon adezyonu, dişin organik yapısı (Tip 1 kollajen) ve inorganik yapısı (hidroksiapatit) arasında adsorbisyon adezyonu meydana gelir (16).

2.2. Adezyonun başarısını etkileyen faktörler

1-Temiz yüzey: Yüzeylerdeki artık maddeler adeziv ve aderent arasındaki bağları ve teması olumsuz etkiler.

2- Islanabilirlik: Adezivin akıcılığı ile ilgili olup, aderentin yüzeyine ne kadar iyi akar ve ıslatırsa o kadar adezyon güçlenir. Islanabilirlik değim açısı (Ø) ile ölçülür. Bu açı aderent yüzeyine konulan adesivin meydana getirdiğı küre parçasına her iki maddenin temas noktasından çizilen teğet ile aderent yüzeyi arasındaki açıdır. Islanmanın artması ile değim açısı sıfıra doğru yaklaşır. İdeal olarak ıslanmanın tam yani değim açısının sıfır dereceye yakın olması istenir. Aderent yüzeyindeki morfolojik düzensizlikler değim açısını değıştirir ve böylece adeziv ile temas eden yüzey alanını artar ve mekaniksel adezyonu meydana gelir. Bu durum adezyona olumlu katkı sağlar (17).



Şekil 1:Değim açısı (contact angle) .A, küçük değim açısı B:Büyük değim açısı

Diş sert dokuları ile kompozit rezin arasında oluşan adeziv bir bağlanma, daha konservatif kavite preparasyonun yeterli olması ve mikrosızıntıyı azaltarak hassasiyeti gidermesi nedeniyle gereklidir. Bu bağlanma mine ve dentin yüzeyinin asitle pürüzlendirilmesi ile oluşan morfolojik düzensizliklerin arasına rezinin penetre olması ile gerçekleşir.

Asitle pürüzlendirme yöntemi ilk defa Buonocore tarafından 1955 yılında geliştirilmiş olup, mikromekanik kavramının adeziv dişhekimliğine girmesini sağlamıştır. Başarılı klinik sonuçlar nedeniyle günümüzde klinik dişhekimliğinin klasik uygulaması haline gelmiştir (18).

Asitle pürüzlendirme yönteminin hem mine hem de dentin dokusuna aynı anda uygulanmasına Total Etch Yöntemi denilmekte olup ilk defa 1979 yılında Fusayama ve Kanca tarafından uygulanmıştır. Yöntem, restoratif diş hekimliğine adezyon konusunda yeni bir bakış açısı kazandırmıştır ve günümüzde rutin kullanılır duruma gelmiştir (19).

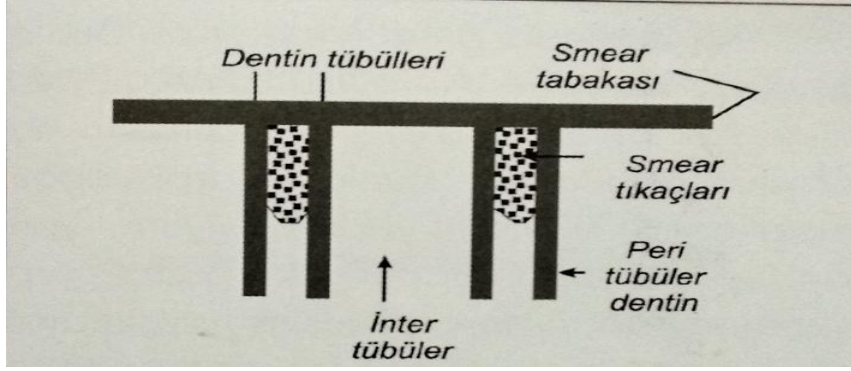
Kompozit rezinler visköz yapılarından dolayı asitle pürüzlendirilmiş yüzeylerde meydana gelen mikroskobik girinti ve çıkıntılara penetrasyon gösteremezler. Penetrasyonu kazandırmak için polimer matriksden oluşan ve diğer polimerlerle dilue edilerek akıcılığı sağlanan bonding sistemler üretilmiştir (16).

3.MİNE/DENTİN BONDİNG SİSTEMLERİ:

Adeziv bağlanmayı sağlamak amacı ile üretilen mine/dentin bonding sistemlerine adeziv sistemler de denilmektedir. Bu sistemlerden beklenen bazı özellikler vardır:(20)

- Mine ve dentin dokusuna mikromekanik ve kimyasal yolla bağ kurmalıdır.
- Mine ve dentin dokusundan ayrı porselen ve metale de bağlanabilmelidir.
- Nemli yüzeylere uygulanabilmelidir.
- Mikrosızıntı ve sekonder çürükleri önlemelidir.
- Polimerizasyon büzülmesi ve çiğneme kuvvetleri ile oluşan streslere karşı koyabilmelidir.
- Uygulaması kolay olmalıdır
- Kalınlığı 20 µm' den az olmalıdır
- Dentin kanallarının tümünü veya bir kısmını örterek operasyon sonrası duyarlılıkları önlemelidir.
- Biyouyumlu olmalıdır.

Kavite preparasyonu esnasında frez veya kesici el aletleriyle yapılan kesme ve aşındırma işlemleri neticesinde dentin dokusunun yüzeyi tükürük, kan, bakteri, hidroksiapatit kristalleri ve denature kollajenlerden meydana gelen *smear tabakası* ile kaplanır. Eick ve ark. 1970 yılında çalışmalarının sonucunda, smear tabakasının yapısı altındaki dentin dokusunun yapısını yansıtır ve kullanılan aletin tipine göre değişiklik gösterir (21). Dentin ve pulpa dokusunu irritasyonlara karşı bariyer oluşturan bu tabaka yaklaşık 0,5-2 µm kalınlıkta, amorf ve gözenekli görünümündedir. Smear tabakası difüzyon bariyeri olarak rolalır; tübüllerdeki sıvı hareketini ve dentin geçirgenliğini azaltır. Dentin yüzeyinden çalkalama ya da sürtme işlemi ile uzaklaştırılmaz. Ayrıca bu tabakanın dentin tübüllerinin ağzını kısmen tıkaması ile 1-2 µm uzunluğunda smear tıkaçları oluşur (22).



Şekil 2.Dentin smear tabakası (smear layer) ve smear tıkaçlar

Adeziv bağlanmada önemli olan bu tabakanın uzaklaştırılması ya da modifiye edilmesi konusunda farklı görüşler mevcuttur. Bir kısım araştırmacı, smear tabakasının mikroorganizmaların veya toksinlerinin pulpaya ulaşmasında bir engel teşkil ettiğini ve bu tabakanın kaldırılması sonucunda dentin geçirgenliğinin 5-10 kat artacağını iddia etmişlerdir. Bir kısmı ise smear tabakasının mikroorganizmaların yerleşmesi ve üremesi için bir ortam olduğunu savunmaktadırlar (23, 24).

4.ADESİV SİSTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI:

Uygulama yöntemlerine göre dört başlıkta sınıflandırılabilir (24);

- Smear tabakasının üzerine uygulanan adeziv sistemler
- Smear tabakasını modifiye eden adesiv sistemler
- Smear tabakasını ortadan kaldıran adeziv sistemler
- Smear tabakasını çözen adeziv sistemler

Smear tabakası üzerine uygulanan adeziv sistemler:

Bu adeziv sistemler (1. ve 2. Jenerasyon) smear tabakasına direk bağlandığından dolayı düşük bir bağlanma değeri (10 MPa) ortaya çıkmış ve beklenen klinik başarıyı sağlayamamıştır

Smear tabakasını modifiye eden adeziv sistemler:

Bu adezivler (3.jenerasyon) smear tabakasında değişikliğe yol açar ve dentin dokusu ile etkileşimleri çok yüzeyel olduğu için dentin dokusuna olan penetrasyonları sınırlıdır. Dentin tübüllerinin smear tabakası ile örtülmüş olduğu görülmektedir. Klinik olarak yeterli düzeyde bir bağlanma oluşturamadığı için uzun süreli kullanımı mümkün olmamıştır. Kompomerlerin (Poliasit modifiye kompozit rezinlerin) uygulamasındaki primer örnek olarak verilebilir.

Smear tabakasını ortadan kaldıran adeziv sistemler:

Bu adezivlere etch-and-rinse adeziv sistemler de denilmekte olup dentin geçirgenliğini azaltan ve difüzyon bariyeri oluşturan smear tabakasını uzaklaştırmayı hedef alırlar. Üç aşamalı (4.jenerasyon) ve iki aşamalı (5. Jenerasyon) şekilde uygulanan bu adeziv sistemlerde farklı olan durum, mine ve dentin dokusunun aynı anda pürüzlendirilmesidir.(Total –etch)

Smear tabakasını çözen adeziv sistemler:

Yapılan son çalışmalarda adezyon için smear tabakasının uygun bir yapı oluşturduğu düşüncesi oluşmuştur. Bu sistemlerin özelliği smear tabakası ortadan kaldırılmaksızın asit ve primer aşamaları mine ve dentine aynı zamanda uygulanır. Smear tabakası ve hemen altındaki dentin dokusunun kısmi demineralizasyonu ile monomerin dentin dokusuna infiltre olması sağlanmış olur. Bu sistemler iki aşamalı (6.jenerasyon) ve tek aşamalı (7.jenerasyon) şeklinde uygulamaktadırlar.

Kronolojik olarak 7 başlık altında sınıflandırılır:

1. Jenerasyon adesiv sistemler:

İlk kez 1956 yılında Buonocore, hidroklorik asit ile pürüzlendirilmiş dentin yüzeyine GPDM' nin (glycerophosphoric acid dimethacrylate) bağlanabildiğini ortaya koymuştur.(25) GPDM rezin bağlarının su varlığında hidrolize olduğu görülmüştür. Sonrasında Bowen, N-fenil glisin glisidil metakrilat'ın (NPG-GMA-N-phenyl glycidyl methacrylate) dentindeki

kalsiyum ile rezin şelasyonunun bağlantı dayanıklılığını arttıracakı düşünülerek geliştirilmiştir.. Üretici firmalar 1962 yılında birinci kuşak dentin adezivler olan NPG-GMA kökenli dentin bonding ajanları üretmeye başlamışlardır. Bu adezivler hidroksiapatit kristallerine iyonik, kollajene ise kovalent bağlarla adezyon sağlarlar ve hidrofobik özelliklerinden dolayı bağlanma dayanımları (2-6 MPa) zayıftır.(26) Bu sisteme örnek olarak Cervident (SS White Lakewood, New jersey) verilebilir.

2. Jenerasyon adeziv sistemler:

Bu sistem 1980 yılında geliştirilmiş olup, dentin dokusu asitlenmez;rezin bağlantısı smear tabakası üzerinden gerçekleştirilir. Bis-GMA veya HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) gibi rezinlerin halo fosfat esterleridir.(26, 27) Bağlanmaları, rezindeki negatif yüklü fosfat grupları ile hidroksiapatit kristallerindeki pozitif yüklü kalsiyum iyonları arasında oluşan iyonik bağ ile gerçekleştirirler ancak yeterli bağlanma dayanıklılığı (1-10 MPa) gösteremezler. Birinci ve ikinci kuşak adezivler dentin dokusunun inorganik yapısına bağlanabilme amacıyla üretildiğinden beklenen klinik başarıya ulaşamamıştır. Sonraki çalışmalarda adezivlerin içeriğine gluteralehit ve HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) monomeri eklenerek dentin kollajenlerinin amino grupları ile bağ kurulması sağlanmış ve böylece bağlanma değeri (10-14MPa) arttırılarak klinik başarı oranı yükseltilmiştir (26, 28).

3. Jenerasyon adeziv sistemler:

Bu sistem 1984 yılında geliştirilmiş olup rezinin dentine penetrasyonu smear tabakası modifiye edilmesi veya ortadan kaldırılması ile gerçekleşir (29). Öncesinde fosforik asitle pürüzlendirme 1979 da Fusayama ve ark. tarafından kullanılmış ancak bonding ajanın hidrofobik yapısı bağlanma dayanıklılığını olumsuz etkilemiştir (19). Dentinin asitle pürüzlendirilmesinin pulpada enflamasyona neden olabileceği endişesiyle asit kullanımına ara verilmiştir. 1982 yılında Bowen ve ark. %6.8 demir oksalatın dentine uygulandığında tübüleri tıkadığını belirtmişler fakat renklenmeye neden olması onun yerine alüminyum oksalatın kullanımı gündeme gelmiştir. Daha sonra NPG-GMA (N-

Phenylglycine glycidylmethacrylate) ile karışmış PMDM (Pyromellitic acid diethyl methacrylate) nin aseton solüsyonu uygulanmasının bağlanmayı arttırdığı görülmüştür. 1982 Nakabayashi' nin geliştirdiği hem hidrofobik hemde hidrofilik grup içeren 4-META (4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride) ile yapılan çalışmalarda dentin %10 luk sitrik asit, %3 lük demir klorid ile pürüzlendirildikten sonra %35 lik HEMA, 4-META, MMA ve polimerizasyon aktivatörü TBB (trbutyl borane) uygulanmıştır. Ayrıca smear tabakasını uzaklaştırmak için EDTA (ethylen diamin tetra acidic acid) kullanılmış ama bağlantı yeterli olmamıştır (3-8 MPa) (17).

Sonrasında smear tabakayı uzaklaştırmadan modifiye etmek üzere hafif asidik ve hidrofilik monomer içeren 2 etil fenil hidrojen fosfat veya dipentaeritol penta akrilat monofosfat gibi üçüncü jenerasyon ürünleri tatmin edici sonuçlar vermemiştir (30).

Günümüzde adezivlerin hidrofilitesi arttırılarak dentin dokusuna kimyasal ve mikromekanik bağlanmasına çalışılmaktadır.

Diğer (4. 5. 6. 7.) Jenerasyon adeziv sistemler

Güncel sistemler olmakla birlikte mine ve dentin dokusu aynı anda pürüzlendirildiği için Total-Etch adeziv sistemler de denir. Etki mekanizma ve uygulama yöntemlerine göre üçe ayrılır;

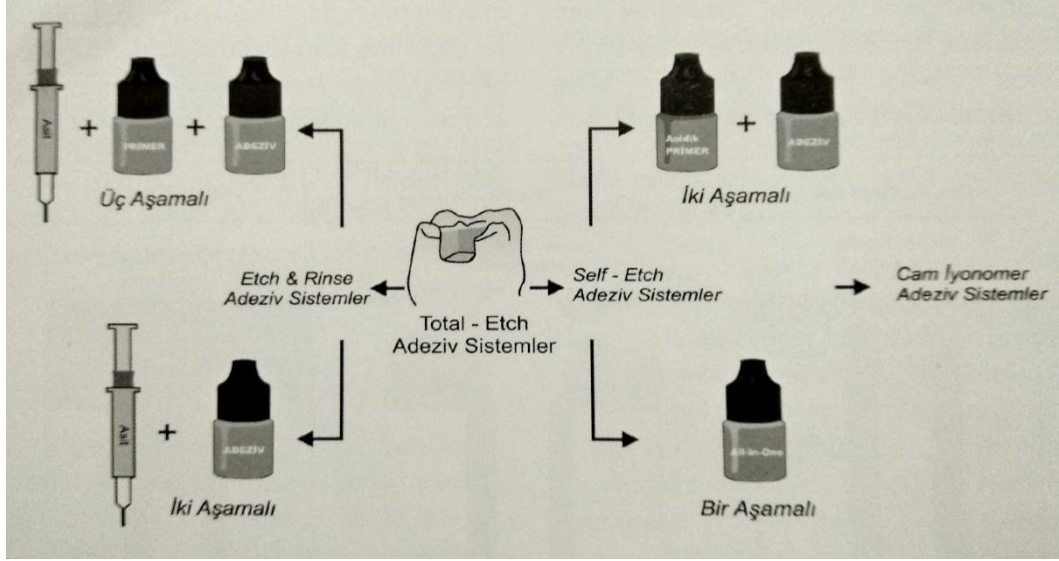
➤ Etch and rinse adeziv sistemler

- Üç aşamalı (4. Jenerasyon)
- İki aşamalı (5. Jenerasyon)

➤ Self-etch adeziv sistemler

- İki aşamalı (6. Jenerasyon)
- Tek aşamalı (7. Jenerasyon)

➤ Cam iyonomer adeziv sistemler



Şekil 3. Total-Etch Adeziv sistemlerin sınıflandırılması

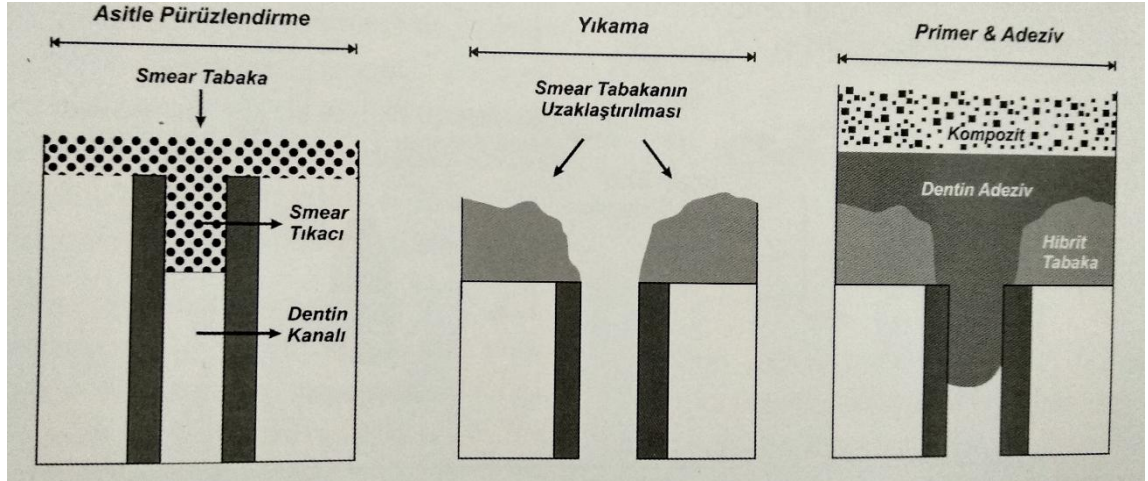
5.ETCH AND RİSE ADEZİV SİSTEMLER

Smear tabakasının uzaklaştırıldığı bu sistemde %30-40 konsantrasyonda fosforik asit mine ve dentin dokusuna aynı anda uygulanır. Oluşan hibrit tabakasının kalınlığı 5µm' dir. Üç aşamalı veya iki aşamalı olabilir.

5.1. Üç aşamalı Etch and rinse adeziv sistemler (Etch+primer+bonding)

Yapılan çalışmalarda mineye 20-50 MPa ve dentine 13-80 MPa bağlanma dayanımı göstermiş olup ardarda üç aşamada kullanılır;(26, 31)

1. Aşama: Mine ve dentin yüzey koşullarının değiştirilmesi (asitle pürüzlendirme)
2. Aşama: Adezyonu güçlendiren ajan kullanımı (Primer uygulanması)
3. Aşama: Bağlayıcı ajanın demineralize mine ve dentin yüzeyine filtrasyonu (bonding ajan kullanılması)



Şekil 4. Etch and rinse adeziv sistemlerin uygulama aşamaları(şematik olarak)

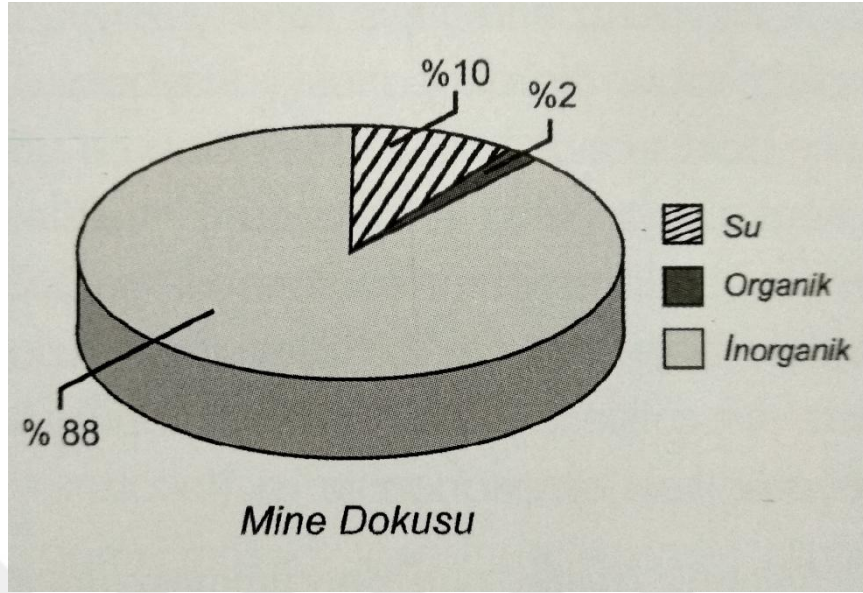
5.1.1. Mine ve dentin yüzey koşullarının değiştirilmesi

Bu uygulamadaki amaç bonding ajanın kimyasal ve mikromekanik bağlanması için uygun mine\dentin yüzeyi oluşturulmasıdır. Yüzey koşulları kimyasal (asitler ve kalsiyum şelatörleri), ısısal (lazer), mekanik (mikroabrazyon) yöntemlerle değiştirilebilir (32).

5.1.1.a Mine dokusu, ağırlık olarak %95 inorganik, %1 organik ve %14 su. Hacim olarak %88 inorganik, %2 organik, %10 su ve diğer maddeler vardır.

İnorganik kısmın büyük bölümü hidroksi apatit, organik kısım ise kollajenden oluşur. Ağız ortamında üzerinde pelikül tabakası bulunur. Kavite preparasyonunda bu tabaka kalkar fakat smear tabakası oluşması nedeniyle kritik yüzey gerilimi (KYG 28 dynes/cm) değişmez

Asitle pürüzlendirme sonucunda yaklaşık 10 µm kalınlığında smear tabakası kalkar, 5-50 µm derinliğinde çok sayıda irili ufaklı mikroskobik girintiler oluşturulması ile yüzey alanı artırılır ve kritik yüzey gerilimi 72 dynes/cm ye yükseltilir. Böylece düşük vizikoliteli adezivin adaptasyonu artarak tutuculuğa ve mikrosızıntının azalmasına katkı sağlanır (33).



Şekil 5. Mine dokusunun birleşimi (hacimce)

Asitle pürüzlendirme öncesi diş yüzeyinin pelikül, plak ve renklenmelerden temizlenmesi gerekir. Asit etkisi ile mine dokusunun organik matriksi retzius çizgileri boyunca çözünür. Oluşan porözite kristalitlerin merkezine asidin girmesiyle oluşan yerdeğişmedir. Kristalitlerin çekirdeklerindeki yerdeğiştirme olayı, c aksına paralel olanların parçalanması ve organik matriksin ortadan kalması ile artan hacme bağlı olarak gelişen yüksek iç basınçların kristalitleri çatlatması biçimindedir.

Silverstone ve ark. Ortofosforik asitin konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak mine yüzeyinde üç tip pürüzlendirme olduğunu SEM ile yaptıkları çalışmada ortaya koymuşlardır;(34)

1. *Tip pürüzlendirme:* Mine prizmalarının iç kısmının çözünüp uzaklaşması ile bal peteği şeklinde bir görüntü oluşmuştur.
2. *Tip pürüzlendirme:* Mine prizmalarının periferlerinin çözünüp uzaklaşması ile kaldırım taşı şeklinde bir görüntü oluşmuştur.

3. *Tip pürüzlendirme:* Mine prizmalarının morfolojisine uyum göstermeyen daha silik bir çözünme meydana gelmiştir.

Asitle pürüzlendirmede mikroskopik olarak en karakteristik görüntü bal peteği, balık kuyruğu ve anahtar deliği benzeri şekillerdir.

Asitle pürüzlendirmede etkili faktörler;

- Asidin konsantrasyonu
- Asidin türü
- Süre ve uygulama yöntemi
- Mine ve dentin dokusunun yapısı
- Hastanın yaşı

Yapılan çalışmalarda %50 lik fosforik asidin 60 sn boyunca mineye uygulanmasının, yıkanarak uzaklaştırılan monokalsiyum fosfat monohidrat, %27 fosforik asidin ise yıkanarak uzaklaştırılması güç olan dikalsiyum fosfat dihidrat oluşturduğunu, mine yüzeyinde kalsiyum çözünmesi ile oluşan derinliğin asit konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Günümüzde asit konsantrasyonu azaltılmaya çalışılarak ideal konsantrasyon %37-40 olarak kabul görmektedir (35).

Asitlerin kullanım yerlerine göre kullanılacak biçimleride ayrı değişkenlik gösterir. Örneğin solüsyon biçimi geniş yüzeylerde, veneer yapımında, sealent uygulamalarında kullanılırken jel biçimi kavite duvarı gibi sınırlı bölgelerde tercih edilirler. Yarı jel biçimi mine yüzeyini daha iyi ıslatırlar ve BAC (benzalchonium chlorid) içerdikleri için antibakteriyel özellikleri mevcuttur.

Yeterli pürüzlendirme için ideal süre mine dokusu için 30 sn belirlenmiş olup, gençlerde ve çürük aktivitesi fazla olanlarda azaltılabilir. Buna karşın yaşlılarda ve flor uygulanmış minede arttırılabilir. Konsantrasyon ve sürenin çok artırılması fazla derinlik ve çözünen kalsiyum miktarında artışa sebep olur ki bu istenmeyen bir durumdur (33, 35).

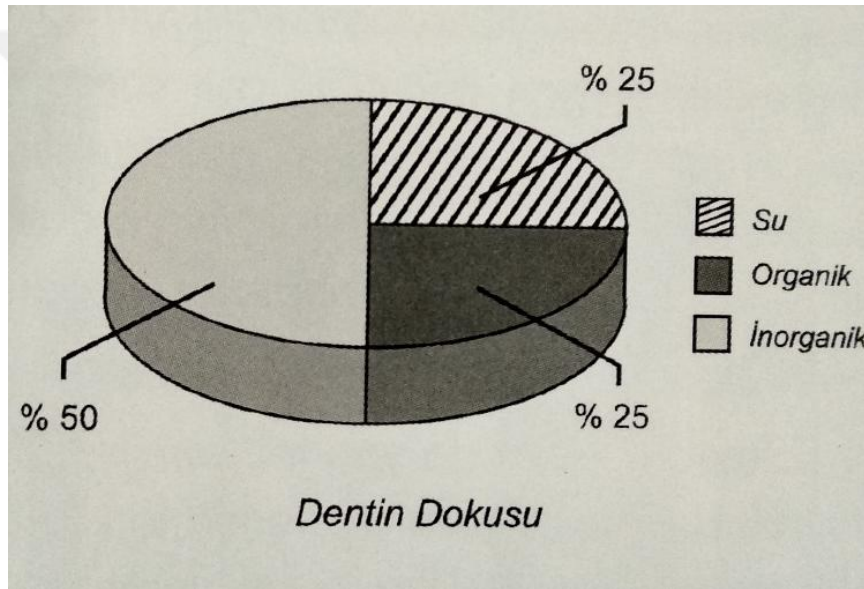
Pürüzlendirme sonucu asit kalıntıları monokalsiyum fosfat kristalleri oluşturarak polimerizasyonu engeller. Bu nedenle 10-15 sn su ile yıkanır

ardında 5-10 sn hava ile kurutulur. Jel biçiminde olanların uzaklaştırılması zor olduğundan 20-30 sn yıkanması daha uygundur.

Pürüzlendirilen yüzey tükürükle temas etmemelidir, yoksa işlem tekrarlanır. Pürüzlendirilen mine yüzeyinin gözle görünümü parlaklığı kaybolmuş, mat ve tebeşirimsi görünümünde olmalıdır.

5.1.1.b Dentin dokusu;

Ağırlıkça %70 inorganik, %18 organik, %12 su; hacimce %50 inorganik, %25 organik, %25 su ve diğer maddelerden meydana gelir.



Şekil 6. Dentin dokusunun bileşimi (hacimce)

Inorganik yapının büyük kısmı hidroksiapatit kristallerinden organik kısmın ise Tip 1 kollajen ve proteoglikanlardan oluşur.

Hidroksi apatit kristalleri minede düzenli iken, dentinde rastgele dağılım gösterir. Ayrıca daha küçük ve daha az kalsiyum karbonat içerirler. Dolayısıyla mineralizasyonu mineden az, sement ve kemikten fazladır.

Dentin içerisinde pulpadan başlayıp mineye doğru uzanan çok sayıda tübül vardır. İçi sıvı dolu bu tübüller iyi mineralize peritübüler dentin ile sarılmış olup aralarında ise daha az mineralize intertübüler dentin bulunmaktadır. Tübüller radyal seyrettiğinden pulpa sınırındaki tübül sayısı mine

sınırındakinden daha fazladır. İçerisindeki sıvı 25-30 mm civa basıncı ile pulpadan mineye doğru itilir. Bu nedenle dentin yüzeyi her zaman nemlidir. Dentinin protein oranı da yüksektir. Bu nedenle yüzey enerjisi düşük olup (KYG 44.8 dynes/cm) , bu durum ıslanabilirliği azaltıp bağlanmayı güçleştirir. Dentin adezyonundaki başlıca etkenler;(32)

- Dentin içeriği (tübül yoğunluğu, çapı, peritübüler/peritübüler dentin oranı)
- Dentin kalınlığı
- Smear tabakası
- Yaş

Tübüller pulpa yakınında dentinin hacimce %28 ini mine yakınlığında ise %4 ünü oluşturur. Ayrıca pulpa sınırında tübül sayısı mm²'de ortalama 45000 ve çapı 25µm iken mine sınırında tübül sayısı 25000 ve çapı 0.8 µm olup daha fazladır. Bu nedenle pulpaya yaklaştıkça bağlanma azalır (32).

Kanca ve ark.(1991), dentine uygulanan asidin mineye uygulanandan daha düşük konsantrasyonda ve daha kısa süreli uygulanması gerektiğini belirtmiş, %10 luk fosforik asit uygulamasının % 37 lik asitten daha başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir (36).

Brannstrom ve ark. %37 lik fosforik asidin 5 saniyede smear tabakasını uzaklaştırdığını, 30 saniyede dekalsifikasyona, 60 saniyede ise pulpa irritasyonuna sebep olduğunu göstermiştir. %10 luk konsantrasyon pulpada irritasyona neden olmamıştır (37).

Dentine asit uygulanması ile smear tabakası uzaklaştırılır ve dentin geçirgenliği 5-20 kat artar. Ayrıca asit hidroksi apatit kristallerini çözer ve kollajen lifler mineral desteğini kaybeder. Tübüllerin ağız kısmını huni şeklinde açar, peritübüler dentini ortadan kaldırarak intertübüler dentinin 3-7 µm derinliğinde çözünmesine neden olur. Böylece porözite artar, kollajen ağ açılarak monomerlerin tübüllerin içine infiltrasyonu kolaylaşır. Bu infiltrasyonda dentin sıvısının varlığı etkilidir. İntertübüler dentinin dekalsifikasyonu ise rezinin kollajen lifler arasındaki su ile yerdeğiştirmesini

sağlayarak intertübüler infiltrasyon oluşur. Bunda ise yüzeyel pörözite etkilidir. İntratübüler ve intertübüler infiltrasyon sonucu oluşan hibrit tabaka ve rezin taglar bağlanma dayanımını oldukça etkiler.

Fusayama ve ark. çalışmalarında monomerlerin etkili olmaları için 10µm lik dekalsifikasyon derinliğinin yeterli olduğunu göstermiş ve yüzey sertliğinin tam bir gösterge olduğunu bildirmişlerdir.(38)

Dentin dokusuna asit uygulamasında ideal olan 15 sn asit uygulanmasını takiben 10-15 sn su ile yıkayıp 5-10 sn hafif bir hava ile kurutulması (hafif nem kalacak şekilde) şeklindedir.

Dentin yüzey işlemleri için asitlerden başka şelatörler de kullanılır. Bunlar smear tabakasını dentinde dekalsifikasyon oluşturmadan uzaklaştırırlar. En yaygın kullanılanı EDTA (ethylen diamin tetra acidic acid) dır (39).

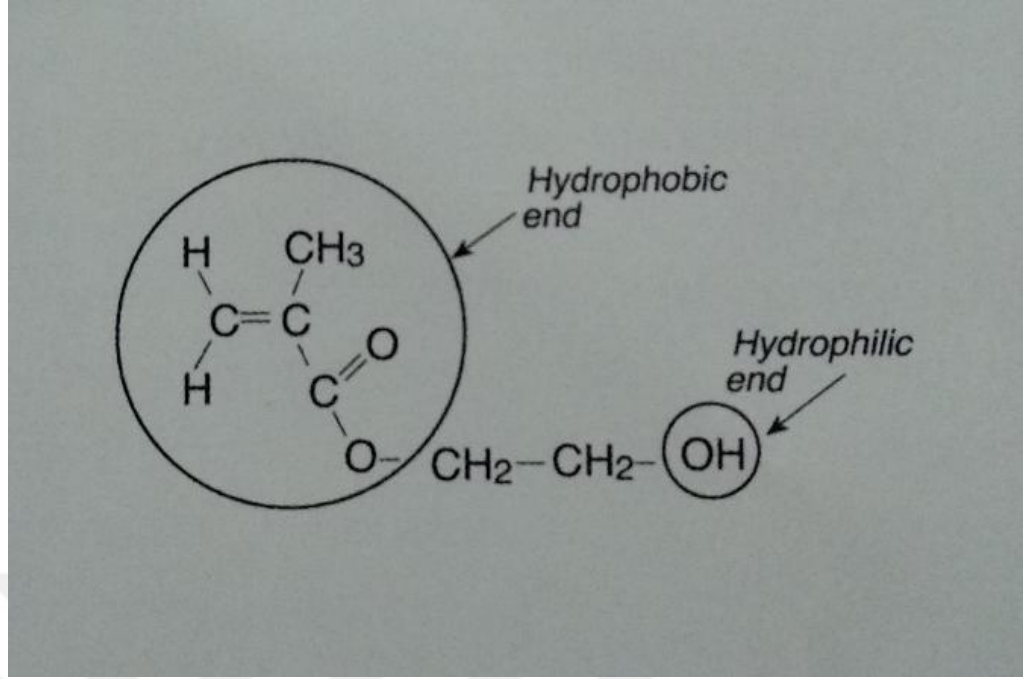
Dentin yüzey koşullarını değiştiren bir başka yöntem ise lazer uygulamasıdır. Bu işlem için sert doku lazeri (Nd:YAG) kullanılır. Dentinde oluşan mikroskobik değişiklikler saniyede 10-30 çarpma sonucu oluşan ısının dağılımı ile gerçekleşir (40).

Bir diğer yöntem ise mikroabrazyon yöntemidir. Alüminyum oksit partiküllerinin aşındırıcı etkisinden faydalanılır. Partikül büyüklüğü (abrazyon için 0.5µm den büyük olmalı) ve hızı önemlidir (41).

5.1.2. Adezyonu güçlendiren ajanların kullanılması (2. Aşama)

Yüzey koşulları değiştirilmiş mine/dentin doku yüzeyine yüzey enerjisini arttırmak amacıyla ıslanabilirliği yüksek hidrofilik hidroksietil metakrilat monomeri (HEMA, hydroxyethyl methacrylate) içeren primer uygulanır. HEMA en sık kullanılan primer olmakta olup, % 35'lik konsantrasyonda kullanılır ve %50-65 oranında su içerir.

Causton 1982 yılında tanıttığı primer bipolar olup hidrofobik ve hidrofilik grup içerirken, hidrofilik grup nemli dentinle, hidrofobik grup ise adeziv ile etkileşime girer (42).



Şekil 7. HEMA'nın kimyasal formülü

Primerler su, etanol ve aseton gibi çözücülerde çözülmüş halde bulunur. Su ve etanol güçlü hidrojen bağ yapabilen hidroksil grubu, aseton ise keton grubu içerir.

Asitle pürüzlendirme sonrası primer en az iki tabaka ve parlak yüzey elde edilinceye kadar fırça ile sürülür. Ardından 5-10 sn hafif hava ile kurutulur. Kurutma işleminde çözücü artıklarının uzaklaşmaması halinde rezin penetrasyonunu engelleyerek hibrit tabakanın polimerizasyonunu engellediği çalışmalarda gösterilmiştir. Deri ile teması alerjik reaksiyon oluşturabilir.

5.1.2.a.Hibrit Tabaka :

Hibrit tabaka, dentinin yüzey koşullarının demineralizasyon ile değiştirildikten sonra bu bölgeye giren düşük viskoziteli monomerlerin polimerize olmasıyla oluşan dış sert dokularındaki yapıya denir.

Başka bir deyişle, kollajen, kopolimer ve polimer ile sarılmış hidroksiapatitten oluşan rezinle güçlendirilmiş, aside dirençli tabakaya **hibrit tabaka**, oluşma sürecine de **hibridizasyon** denir. Bu sayede mikromekanik retansiyon sağlanır. Hibrit tabakanın fiziksel ve kimyasal özellikleri dış

yapısından çok farklıdır. Bu yapı diş dokusunun özellikle organik komponenti ile adeziv rezinin karışımından oluşmuş bir tabakadır (43).

Hibrit tabaka kenar sızıntısını engeller, asitlere dirençlidir ve sekonder çürük ihtimalini azaltır. Hibrit tabaka aynı zamanda rezin esaslı dolgu materyali ve dentin arasında orta dereceli bir elastisite modülüne sahiptir olup dolgu materyali ile dentin arasındaki stresi azaltır. Bu durumda, dentine bağlantının korunarak restorasyonların kalıcılığı sağlanmakta ve marjinal bütünlük devamlı hale getirilmektedir (44,45). Günümüz adeziv sistemlerinde, ana adezyon mekanizması olan hibrit tabaka; geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi görüntüleme tekniklerinde farklı kalınlık ve morfolojide izlenebilir. Bu durum uygulanan materyale, dentin bölgesine ve dentinde oluşturulan demineralizasyon derinliğine bağlıdır. Adeziv sistemlerin içeriğinde var olan ya da uygulama aşamalarında kullanılan çeşitli asitlerin etkisiyle oluşan demineralizasyon derinliği hibrit tabakanın kalınlığına etki edebilir. Bu bölgenin morfolojik karakteristiğine, mineral yoğunluğuna, kimyasal kompozisyonuna bağlı olarak farklı düzeyde gerçekleşir.

Kaliteli bir hibrit tabakanın oluşumu rezin ve dentin arasındaki güçlü bağlantıda önemlidir. Hibrit tabakanın kalitesini olumsuz etki eden etkenlerden biri, güçlü ve uzun süreli asit uygulamasıyla oluşan kollajen denatürasyonunun veya açılmış kollajen ağın smear tabakasının, rezinin kollajen fibriller arasına tam olarak girmesini engellemesidir (43,46). Yeterli derecede polimerize olmamış rezin monomerler demineralize dentine girmişse bile de rezin-dentin bağlantısının sürekliliği bozulur ve bu durum dentin-rezin bağlantısının gücünü ve sürekliliğini etkiler. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar rezin-dentin bağlanmasında zamanla bozulma meydana geldiğini göstermektedir (47). Dentine olan bağlanma, başlangıçta iyi olsa da, adeziv arayüzün ömrü fiziksel ve kimyasal etkenlere bağlı olarak kısalabilir. Yüksek oranda hidrofilik monomer içeren iki aşamalı etch&rinse adezivlerin oluşturduğu hibrit tabaka, poröz bağlanan yüzeyle sonuçlanır ki bu tabaka, reaksiyona girmeyen monomerlerin elüsyonuna, su emilimine ve rezin hidrolizisine izin veren

geçirgen bir membran gibi davranır. Ayrıca, dentin organik matriksinde bulunan endojen kollajenolitik faktörlerin aktivasyonu, hibrit tabakanın en altında bulunan, açığa çıkmış tip I kollajen fibrillerin bozulmasına neden olabilir. Matriks metalloproteinaz ailesine ait olan bu enzimler, ekstrasellüler matriks içeriklerinin bozulmasına neden olan bağ dokusu elemanlarıdır. MMP'ler diş gelişimi esnasında mineralize edilmiş dentin matriksi içerisinde sıkışık kalan çinko (Zn) ve kalsiyum(Ca) bağımlısı endopeptidazlardır (48-50).

MMP'ler yara iyileşmesi, morfogenezis, dokuların yeniden yapılanması ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynadıkları gibi metastaz, anjiyogenezis ve tümör hücresi invazyonu gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (51-53).

Oral çevrede MMP'ler; dental dokuların (54, 55), periodontal hastalıklar gibi patolojik süreçlerin (56), çürüklerin (48) ve dental pulpa inflamasyonunun (57, 58) gelişimi gibi çeşitli olaylarda rol almaktadırlar. Yüksek miktarda kollajenaz (özellikle MMP 8'in) varlığı ve aktivitesinin istenmeyen doku yıkımıyla ilişkisine en iyi örnek periodontitis ve periimplantitistir. MMP'lerin oral kanser ve çürükle olan ilişkisi de tespit edilmiştir (59). Tükürük direkt olarak çürük dentine ulaşabildiği için, tükürükten izole edilen MMP'ler de, yıkım sürecine etkilidirler. Çürük oluşumunda, dentin ECM'nin yıkımında bakteriyel proteazlar ana sorumlu olarak görülmüştür (60). Ancak; birçok çalışma, çürüğün kontrolü ve gelişiminde bakteriyel asitlerin yaptığı demineralizasyonu takiben konak kaynaklı MMP'lerin de dentin yıkımında rol aldığını göstermektedir (47).

İn vitro çalışmalar; karyojenik bakterilerin yalnızca dentin yüzeyinde demineralizasyona neden olduğunu; ancak kavite oluşumu için gerekli olan dentin kollajen matriksinin parçalanmasına neden olmadıklarını göstermiştir (61). Ayrıca çürük aktif bireylerden alınan tükürük örneklerinden izole edilen bakterilerin jelatinolitik aktivite göstermedikleri saptanmıştır. Tükürükteki asit miktarı MMP'nin aktivasyonunu artırır bu da demineralize dentin matriksinin bozunmasına neden olur (47).

Son dönem bulguları MMP-2,-3,-8,-9 ve -20'nin, insan dentin matriksi içerisinde bulunduğunu göstermektedir (62, 63). Bu enzimler, dentinogenezis ve çürük ilerleme mekanizmalarında yer almalarına rağmen, dentinde bulunan MMP'lerin olgun dentindeki rolü hala tam olarak açık değildir. Farklı pH'lara sahip adeziv sistemler ile temas ettiklerinde, dentin matriksinde farklı kollajenolitik ve jelatinolitik aktiviteler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, adeziv sistemlerin, asitle pürüzlendirilen dentin yüzeyine uygulaması, dentinde bulunan MMP'leri aktive ederek, hibrit tabakayı etkileyecek olan otolitik fenomeni başlatabilir. MMP'ler hidrolitik degradasyona neden olarak rezin-dentin bağlanma kuvvetlerinde azalmaya yol açarlar. Dentin kollajenolitik ve jelatinolitik aktiviteleri, proteaz inhibitörleri ile baskılanabilir (64).

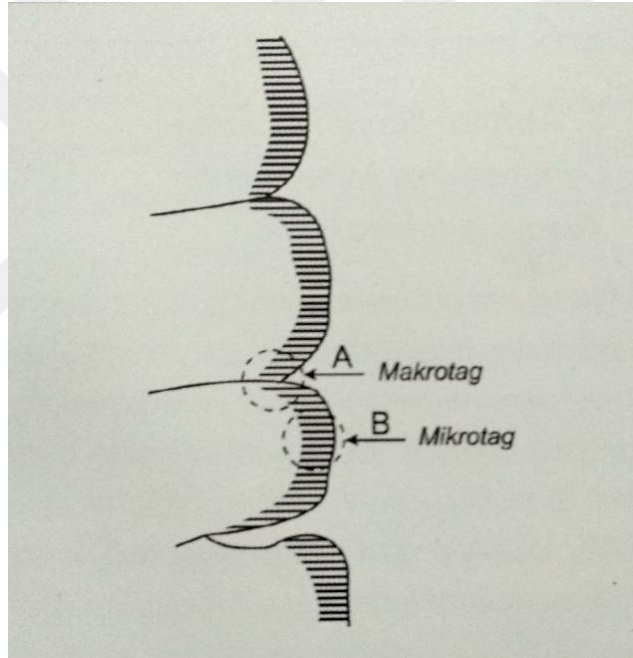
5.1.2.b MMP İnhibitörleri:

MMP'ler hidrolitik degradasyona neden olarak rezin-dentin bağlanma kuvvetlerinde azalmaya yol açarlar. Dentin kollajenolitik ve jelatinolitik aktiviteleri, proteaz inhibitörleri ile baskılanabilir (64-66) Bir biguanid antimikrobiyal ajan olan klorheksidin, MMP-2, MMP-8 ve MMP-9'un aktivitelerini başarıyla baskılayabilmiştir (66) Araştırmacılar, bir diğer MMP inhibitörü olarak GM 6001 (galardin)'i etch&rinse adezivlerin uygulanması sırasında, asitle pürüzlendirme sonrasında deneysel bir primer olarak kullanmışlardır (67) Polivinilfosfonik asit ve benzalkonyum kloritin de MMP etkinliğini baskılayabildiği bildirilmiştir (68). Kimyasal olarak modifiye edilen tetrasiklinler de etkili spesifik olmayan MMP inhibitörleridir. Deneysel çürük ve periodontal hastalık modellerinde kullanılmışlardır; fakat tetrasiklinin fotooksidasyonu sonrası, dişi mor renkte boyayabileceğinden, hibrit tabakanın bozulmasının önlenmesinde kullanımı önerilmemiştir (69).

Doğal terapiler: MMP inhibisyonu yapan avakado ve soya fasulyesi in vitro ortamda gösterilmiştir(70) Yeşil çay, özellikle MT-1 MMP aktivitesini azaltarak proMMP 2 değerlerinde de düşmeye neden olma potansiyeline sahiptir (71, 72). Dentin çürüğünün ilerlemesinin yavaşlatılmasında bu doğal maddelerin baskılayıcı etkisiyle olabilir (73).

5.1.3-Bonding ajanın demineralize mine/dentin yüzeyine infiltrasyonu (3.aşama)

Bonding ajanlar hem yüzey koşulları değiştirilmiş mine/dentin yüzeyine, hem primere hem de rezine bağlanırlar. UDMA, Teg-DMA, Bis-GMA gibi vizikositesi düşük hidrofobik monomerlerden meydana gelirler. Uygun primer tercihi ıslanabilirliği açısından önemlidir. Demineralize dokuya uzanan çıkıntılarına **rezin tag** adı verilir. Tagların uzunluğu 10-30 µm olup mikromekanik tutuculuktan sorumludurlar. İnterprimatik boşluklara penetre olanlara makrotag, intraprizmatik boşluklara penetre olup ağ yapısı gösterenlere mikrotag denir. Değim alanlarının genişliği ve sayıca fazla olmaları nedeniyle mikrotaglar tutuculukta daha etkilidirler.



Şekil 8. Bonding ajanların mine dokusuna inter ve intraprizmatik penetrasyonu sonucu oluşan makro ve mikro taglar. A. İnterprizmatik penetrasyon (makro tag) B. İnterprizmatik penetrasyon (mikro tag)

Bonding ajanların intertübüler dentine penetre olup polimerize olmaları sonucunda tübüler rezin taglar oluşur. Tübüllerin ağız kısmını 5-10 µm kadar kapatarak hem sızıntılara bariyer oluşturur hem de rezin ile dentin bağıını güçlendirir. Bonding ajanların demineralizasyon derinliğine kadar ulaşmaması, rezin tagların tübüllere penetrasyonunun tam olmaması ile hibrit tabakanın alt

kısımlarındaki kollajen lifler çevresinde nano boşluklar oluşur ve bağlanma dayanımını düşürür. Adaptasyonu tam olan bonding ajanların tagları 10 µm uzunluğunda ve 22-35 MPa değerinde bağlanma dayanımı elde edildiği çalışmalarda gösterilmiştir (32, 41).

Uygulamasında, primerden sonra fırça ile sürülür ardından hafif kurutularak ince bir tabaka elde edilir ve polimerize edilir. Bonding ajanın rezin uygulanmadan önce polimerizasyonu sağlanmalıdır. Böylece bonding ajanın yüzeyinde havadaki oksijenin polimerizasyonu inhibe etmesi sonucunda kalsiyum, fosfat, buharlaşmamış su ve asidik fonksiyonel grup içeren oksijen inhibisyon tabakası adı verilen ince (2-6 µm) yapışkan tabaka oluşur. Bu tabaka bonding ajan rezin arasındaki bağlanmada etkilidir.

Her kompozit rezinin kendine özgü bonding ajanı vardır. Bunların bir kısmı kimyasal, bir kısmı ışıkla bir kısmı da hem kimyasal hem de ışıkla polimerize olur. Primer uygulandıktan sonra oluşan hibrit tabaka bonding ajan ile polimerize olur. Bu nedenle bonding ajan hibrit tabakanın polimerize olabileceği kalınlıkta olmalıdır. Böylece polimerizasyon büzülmesine direnç sağlanmış olur.

5.2. İki Aşamalı Etch-and-Rinse Adeziv Sistemler (5. Jenerasyon)

Asit uygulama, yıkama ve kurutma aşamalarını takiben tek şişede birleştirilmiş olan primer ve bonding uygulanır.

Günümüzde uygulama kolaylığı ve pratik olması nedeniyle hekimler tarafından iki aşamalı sistem üç aşamalı sistemden daha çok tercih edilmiştir. Bu sistemde primer ve bonding ajan uygulama aşaması birleştirilmiş, hidrofilik ve hidrofobik monomerler aynı şişede aseton ve etanol gibi organik çözücülerde çözünmüştür. Mine dokusuna bağlanma dayanıklılık değeri (35-45 MPa) üç aşamalı adeziv sistemle aynı olmasına rağmen dentin dokusuna bağlanma değerleri (30-35 MPa) mineden daha düşüktür (74).

Klinik uygulama:

İlk aşamada; %30-40 fosforik asit pürüzlendirmek amacıyla mineye 30 sn, dentine 15 sn uygulanır. Sonrasında 10-15 sn su ile yıkanır ve ardından minede mat görüntü oluşana kadar (5-10sn) kurutulur, dentinde ise hafif nemli kalması için 5-10 sn hafif kurutulur veya kuru pamuk pelet 2-5 sn uygulanır.

İkinci aşamada; Tek şişede birleştirilen primer ve bonding ajan en az iki kat olacak şekilde parlak yüzey elde edilene kadar fırça ile uygulanır. Hafif hava sıkılarak (5-10sn) ince tabaka oluşturup yayılması sağlanır. Ardından polimerize edilir(10 sn).

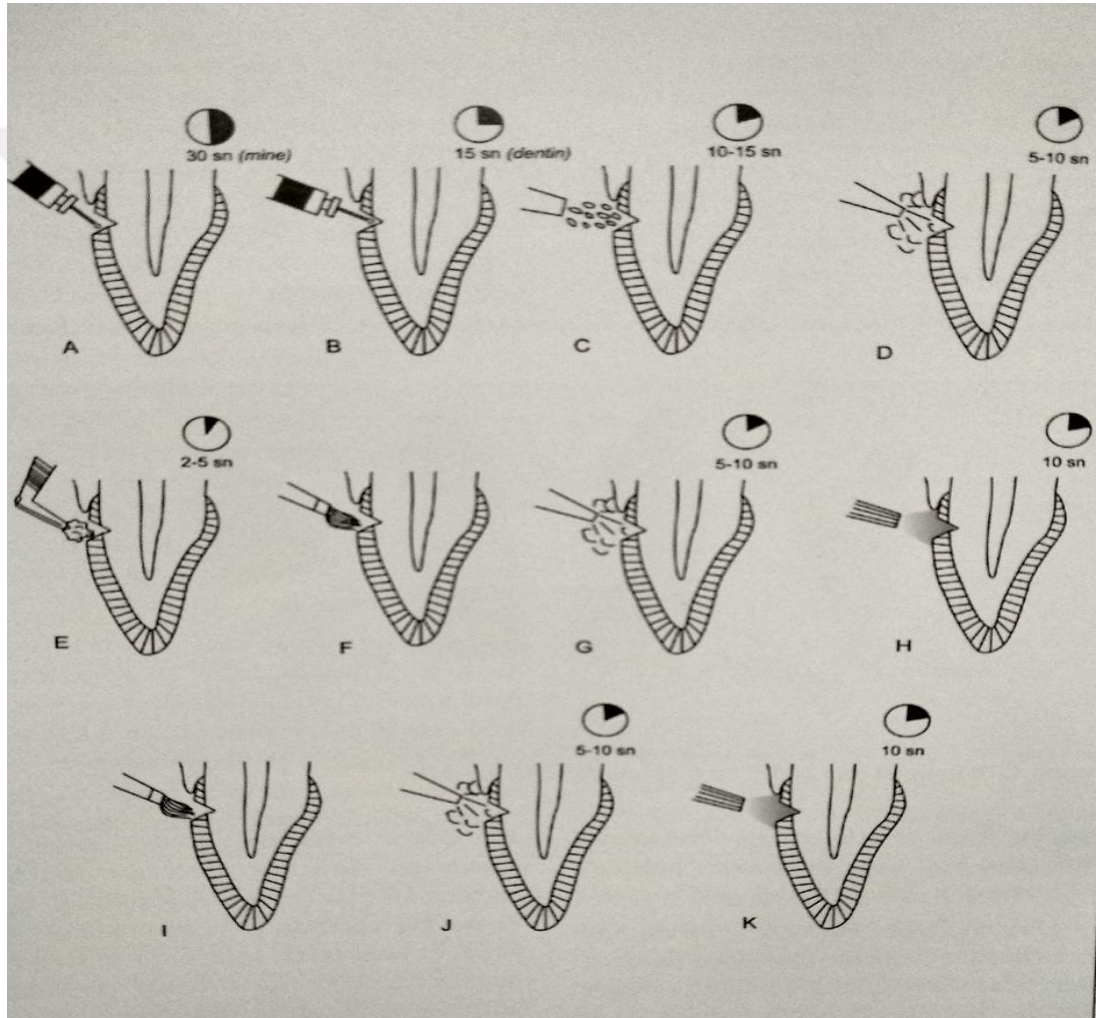
Demineralize dentin aşırı kurutulduğunda kollajene destek veren su buharlaşır ve kollajen ağında 1/3 oranında büzülme olur, lifler arası boşluk daralır, monomer penetrasyonu kısıtlanır ve hibrit tabakasının oluşması engellenir.

Nemli bağlanma bu duruma çözüm getirmiş ve ilk defa 1991 yılında Kanca tarafından ortaya konmuştur. Gwinnett de çalışmalarında bu görüşü desteklemiş özellikle aseton esaslı adeziv sistemlerin dentine bağlanmada yüzeydeki nem miktarına bağlı olduğunu göstermiştir.

Nemli dentin dokusu (33MPa) kuru dentine (22MPa) oranla daha güçlü bağlanma oluşturur. Primer içindeki polialkenoik asidin dentin kalsiyumu ile bir bağ oluşturduğu ve nem varlığının iyon alışverişini kolaylaştırdığı kabul edilmiştir. Nem liflerin asit sonrası artan elastisite modülünü düşürerek esneklik kazandırmakta, liflere destek olmakta ve lifler arasındaki nano boşlukları genişleterek monomer infiltrasyonunu kolaylaştırmaktadır.

Nem hem iç kaynaklı (tübüllerden gelen dentin sıvısı) hem de dış kaynaklı (havanın nemi, hava su spreyinden gelen su, adezivin içerdiği su) olabilir. Aşırı nem ise yüzeydeki pörözitenin su ile kaplanır ve monomerin su ile yer değiştirmesi güçleşir. Yumuşak bir hidrojel bağlanmayı zayıflatır.

Nemli bağlanmada asit ile 15 sn pürüzlendirilen dentin su ile 10-15 sn yıkanır ve hafif hava (5-10sn) veya kuru pamuk peletle (2-5 sn) kurutulur. Aşırı kurutulursa (mat görüntü) nemli bir pamuk peletle (10sn) tekrar nemlendirilmesi gerekir. Gerekli nem miktarı adezivdeki çözücüye, hekimin uygulama yöntemine ve dentin dokusuna (derin dentin, sklerotik dentin, etkilenmiş dentin) göre farklılık gösterir. Aseton bazlı adezivler etanol bazlılar göre daha az su içerdiğinden daha kısa süreli kurutulmalıdır. (14, 32, 39)



Şekil 9. İki aşamalı Etch and Rinse adeziv sistemlerin uygulama aşamaları

A,B. Mine (30sn) ve dentin dokusunun (15 sn) asitle pürüzlendirilmesi

C. Yıkama (10-15sn)

D,E. Hafif hava (5-10 sn) ya da pamuk pelet ile (2-5 sn) aşırı nemin alınması

F. Adezivın uygulanması

G. Hava sıkılarak kaviteye yayılması(5-10 sn)

H. Işıkla polimerizasyon (10-20 sn)

I. İkinci tabaka adezivın uygulanması

J. Hava sıkılarak kaviteye yayılması (5-10sn)

K. Işıkla polimerizasyon (10-20 sn)

5.3. Self-Etch Adeziv Sistemler (6. ve 7. jenerasyon):

Smear tabakasının bakteriyel bariyer oluşturmaması, dentin sıvısının hareketini ve geçirgenliğini azaltması yönündeki görüşler sonucunda, bu tabakayı kaldırmak yerine çözen self-etch adezivler geliştirilmiştir.

Bu sistemde ayrı bir asitle pürüzlendirme, yıkama ve kurutma işlemlerinin yapılmaması klinik uygulama aşamalarını azaltmıştır ve vakit kazancı sağlamıştır. Nemli bağlanma yöntemine ihtiyaç duyulmadığı için işlemsel hata payı azaltılmıştır.

Bu sistemde kullanılan zayıf asit (pH:0.2-0.8) smear tabakasını ortadan kaldırmadan minimum düzeyde çözünmesine ve dentin yüzeyini kısmen demineralize ederek monomerin dentine infiltre olmasını sağlar.

Demineralizasyon ve infiltrasyonun eş zamanlı gerçekleşmesi, demineralizasyon derinliği ve monomer infiltrasyonu arasında bir farklılık oluşturmamıştır. Böylece kollejen arası boşluklar oluşmadan dentin tübüllerin kapatılması, etc-and-rinse adeziv sistemine oranla muhtemel duyarlılık ihtimalini azaltmış olmaktadır.

Bu sistemde oluşan hibrit tabakasının kalınlığı etc-and-rinse adeziv sistemine oranla daha incedir(0.5-1.5µm). Bağlanma mekanizması smear tabakası ile iç içe geçen hibrit tabakasının oluşturduğu hibridizasyon temeline dayanır. Hibrit tabakasının üst kısmı (hibridize smear tabakası) rezin monomerlerin demineralize smear tabakasına infiltrasyonu sonucu oluşurken, gerçek hibrit tabakası olan alt kısmı daha ince olup, rezin monomerlerin kollejen ağına infiltre olması ile oluşur.

Bu sistemlere smear tabakasını çözmesi amacıyla 4-metakril oksietil trimellitik asit, 10-metakriloksi dihidrojen fosfat ve 2-metakriloksi etil fenil hidrojen fosfat gibi hidrofilik asidik monomerler eklenmiştir. Bu monomerlerin karboksil ve fosfat grupları kollejen lifler arasındaki hidroksi apatit artıklarında bulunan kalsiyum ile kimyasal bir bağlanma gerçekleştirir. Hidroksi apatit ile monomer arasındaki bu kimyasal bağlanma önemlidir.

Hem mikro mekanik hem de kimyasal bağ oluşturan bu adezivler, mikro mekanik bağlanma ile ani streslere direnç gösterirken, kimyasal bağlanma ile hidrolitik bozulmalara karşı korunma sağlarlar. Bağlanmanın devamlılığında, adezivin bileşimi kadar primerin pH' ı, smear tabakasının kalınlığı, vizikositesi, monomer/kalsiyum bağın hidrolitik stabilitesi de önemlidir.

Bu sistemlerde dentin dokusuna bağlanmanın iyi olduğu fakat mine dokusuna bağlanması etch-and-rinse adeziv sistemine oranla daha zayıf olduğu yapılan çalışmalarda iddia edilmiştir.

Self-etch adezivler smear tabakasını uzaklaştırmadığı için bakteriyel bariyer olmasının yanısıra içerdiği 12-metakriloksidopridinium bromid (MDPB) ile polimerizasyondan sonrada etkisini sürdüren kuvvetli antibakteriyel özellik gösterirler. Bu nedenle aktif kök çürüklerinde, yaşlı hastalarda, dentin duyarlılığının giderilmesinde hatta direk pulpa kaplamasında kullanımını öneren çalışmalar mevcuttur.

Self-etch adezivler, dentin dokusu ile etkileşim derecelerine göre

➤ Kuvvetli

- Orta derecede kuvvetli
- Hafif etkili
- Zayıf etkili şeklinde sınıflandırılırlar.

Kuvvetli self-etch adezivler, asiditesi yüksek olup ($\text{pH} < 1$) diğerlerine göre daha derin demineralizasyon oluştururlar. Kalınlığı 3-4 μm olan hibrit tabakanın üstünde gevşek yapıda kollejen fibril ağı görülür. Hidrofilik olan bu adezivlerde tüm hidroksi apatit kristallerinin çözünmesi sonucunda kollejen liflerin açığa çıkması ve lateral tübül ve tübül hibridizasyonu olduğu gözlenir. Mine dokusuna bağlanmaları kabul edilebilir seviyede olsa da dentin dokusuna bağlanmaları, arayüzde kalan uzaklaştırılamayan su gibi çözücülerin etkisiyle etc-and-rinse adeziv sistemine göre daha zayıf olduğu görülmüştür.(75)

Orta derecede etkili self-etch adezivler, hafif etkili self adezivlerden daha asidik oldukları için ($\text{pH} < 1.5$), mine dokusuna dentin dokusuna olduğu kadar iyi bir bağlanma sağlarlar. Hibrit tabakasının alt kısmında kısmen üst kısmında ise tam bir demineralizasyon görülür. Hibrit tabakasının kalınlığı kuvvetli self-etch adezivlere oranla daha az olup, alt kısmında hidroksi apatit kristal artıklarına rastlanır.

Hafif etkili self-etch adezivler, asiditesi düşük olduğu için ($\text{pH} > 2$), dentin dokusunda kısmi demineralizasyon oluşturabilirler. Bu nedenle kavite preparasyonunda, pürüzlendirmeye dirençli aprizmatik mineyi uzaklaştıran bizotaj yapılması önerilir. Smear tabakasında 2 μm , dentin dokusunda ise 1 μm olması gereken monomer infiltrasyon derinliği bu sistemde 1 μm ' nin altında olduğu görülür. Kollejene bağlı hidroksi apatit artıklarının bulunduğu hibrit tabakanın kalınlığı, kuvvetli self-etch adezivler ve etc-and-rinse adeziv sistemlere oranla daha azdır ancak etkili bağlanma için bunun önemli olmadığı kanıtlanmıştır.

Zayıf etkili self-etch adezivlerde, dentin tübüllerini tıkayan smear tabakasına rastlanırken kollejen fibrillerinin açığa çıkmadığı görülür. Hibrit tabakasının kalınlığı 0.2 μm olan bu adezivler, asiditesi zayıf olup, dentin dokusu ile yüzeyel etkileşime girerler ve düşük bağlanma dayanımı gösterirler.

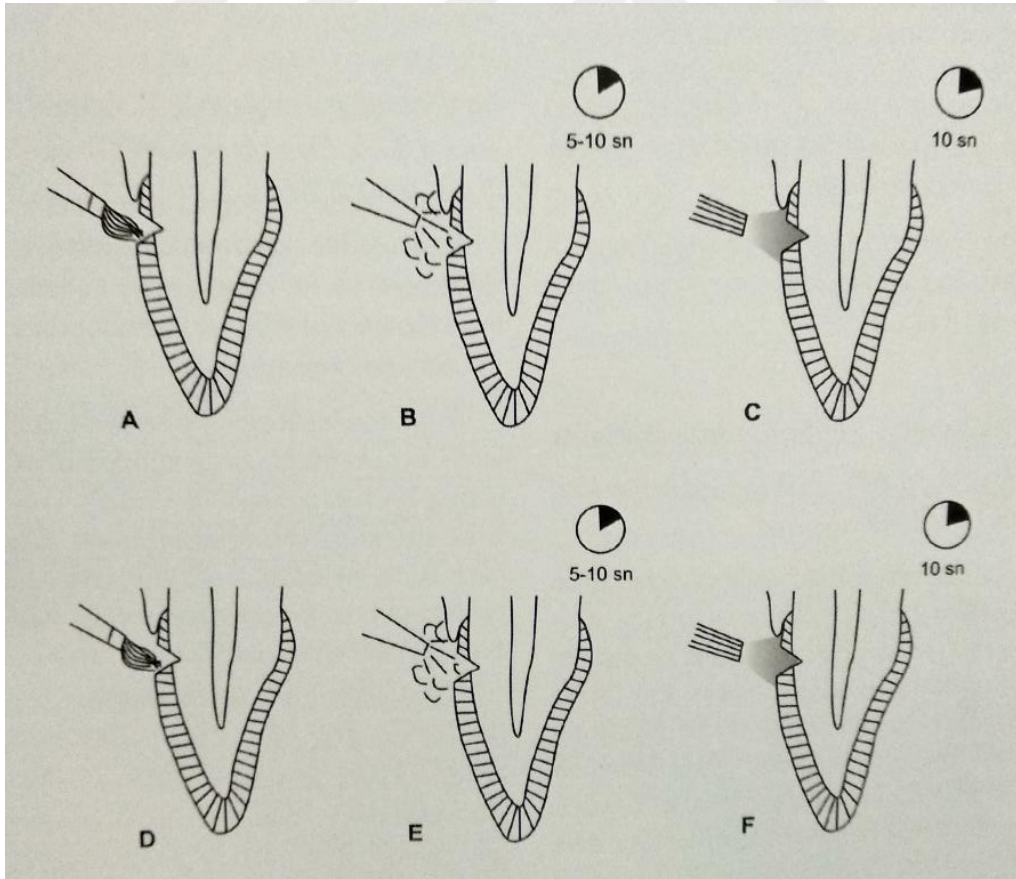
Self-etch adeziv sistemler iki aşamalı (6. Jenerasyon) veya tek aşamalı (7. Jenerasyon) olabilirler.(76)

5.3.1. İki Aşamalı Self-etch Adeziv Sistemler

Bu sistemde asidik primer ve adeziv iki aşamada uygulanır.

İlk aşamada, primer smear tabakası kaplı dentine birkaçkat sürülür. İlk kat sürüldükten sonra smear tabakasının çözünmesi ve primerin kollejen arası boşluklara penetre olması için bir süre beklenir, hafif basınçlı hava ile kaviteye yayılmasının ardından ışıkla polimerize edilir. Bu işlem üretici firma önerisine göre birkaç kez tekrarlanır. Böylece shock absorber adı verilen kalın bir tabaka oluşturulur.(77, 78)

İkinci aşamada polimerize olmuş primer yüzeylere adeziv uygulanarak ışıkla polimerizasyonu sağlanır.



Şekil 10. İki aşamalı self-etch adeziv sistemlerin uygulama aşamaları

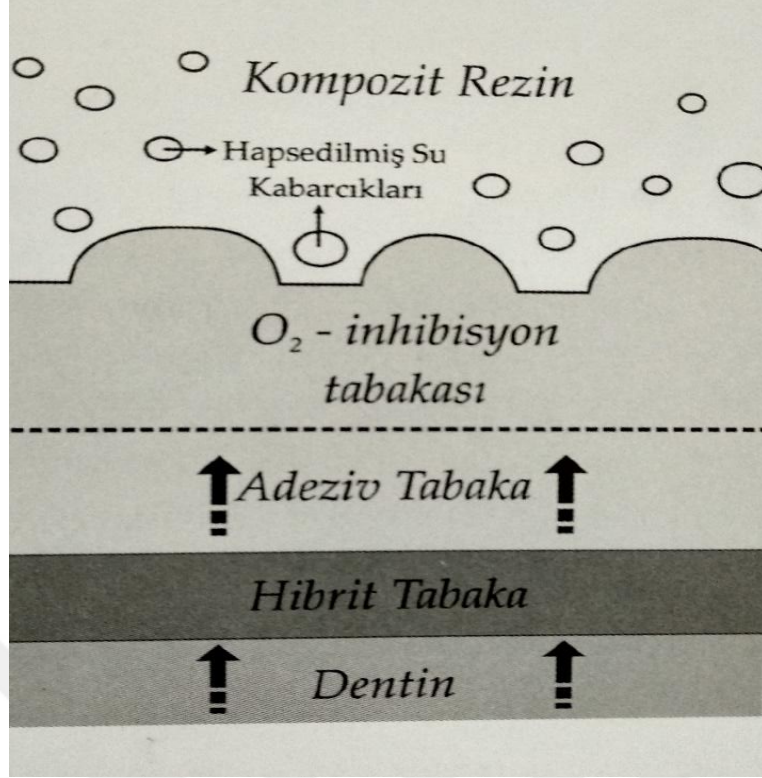
- A. Self-etch primerin uygulanması
- B. Hava sıkılarak kaviteye yayılması (5-10 sn)
- C. Işıkla polimerizasyon (10-20 sn)
- D. Adezivin uygulanması
- E. Hava sıkılarak kaviteye yayılması (5-10 sn)
- F. Işıkla polimerizasyon (10-20 sn)

5.3.2. Tek Aşamalı Self-etch Adeziv Sistemler

Bu sistemde asit, primer ve adeziv tek bir şişede aynı anda uygulanarak hekime klinikte kolaylık ve zaman kazandıran bir yöntem olmuştur. Bu adezivler dentin dokusunu demineralizasyonu için asiditesi yüksek hidrofilik monomer ve monomerlerin iyonize olmasını sağlayan %5-50 oranında su içerirler. Port operatif hassasiyetlerin giderilmesinde de kullanılan bu adezivler iki komponentli ve tek komponentli olarak sınıflandırılırlar.(75)

İki komponentli (Tip 1) olanda öncesinde karıştırma işlemi yapılırken, tek komponentli (Tip 2) olanda ise karıştırma işlemine ihtiyaç yoktur.

Tek aşamalı self-etch adezivler çok hidrofilik özellikte oldukları için polimerizasyon sonrası yarı geçirgen membran gibi davranırlar. Bu geçirgenlik dentin sıvısının geçişine izin vererek, adeziv kompozit ara yüz boyunca hidrolitik bozulmaya neden olan su kabarcıkları oluşmasına izin verir. Su kabarcıkları, kurutma sırasında polimerize adezivin içinde kalan yeterli oranda buharlaşmamış suyun belirtisidir. (79, 80)

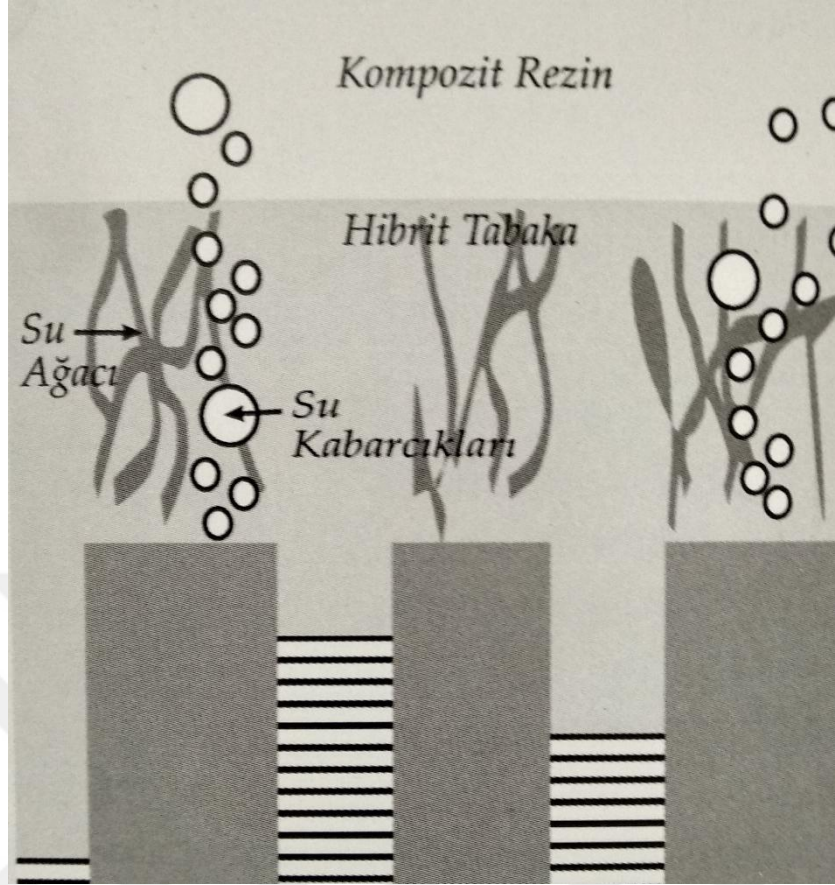


Şekil 11. Tek aşamalı adezivlerde kompozit-adeziv ara yüz boyunca oluşan su kabarcıkları

Polimerizasyon öncesi rezinin infiltre olmasını tam gerçekleştiremediği bölgelerdeki bu mikroskobik oluşumlara ilk kez Sano ve ark rastlamışlardır(81)

Tay ve Pashley ise bu oluşumların adeziv dentin arayüzüne tutunan, adezivin hidrofilik derecesine ve adezivin kalınlığına göre değişkenlik gösteren su ağacına benzeyen su kitleleri olduğunu bildirmişlerdir. (82)

Bu su kitleleri hibrit tabakasından adeziv-kompozit arayüzüne kadar ulaşır ve hibrit tabakada su hareketine izin vermesi nanosızıntı oluşumuna neden olur. Ayrıca polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesini ve HEMA' nın hidrojel formasyonunu tamamlamasını engellerler.



Şekil 12. Su ağacı şeklindeki görüntüler (Water-tree)

TEM (Transmission electron micrographs) mikroskopunda, bu su kitlelerin benekli veya ağsı yapı oluşturdukları gösterilmiştir. Ağsı yapının su ile yerdeğiştirmenin gerçekleşemediği (rezin infiltrasyonunun tam olmadığı) bölgelerde, benekli yapının ise geçirgenliği artan hibrit tabakada rastlanır. (83)

Bu su kitlelerinin oluşum nedenleri;(84)

- Resin infiltrasyonunun yetersiz olması
- Çözücünün tam uzaklaştırılamaması
- Kollejen veya resin polimerin hidrolize olması
- Kollejenin yeterli ıslanamaması
- Resin ile kaplanamayan ekspoz kollejenlerin olması
- Polimerizasyon esnasında meydana gelen ısı

Tek aşamalı self-etch adezivlerin polimerizasyon öncesi içeriğindeki suyun tam olarak uzaklaştırılamaması, oksije inhibisyon tabakasına ait çözünmüş iyonlardan kaynak alan osmotik blister adı verilen bir su hareketini başlatabilir. Bu nedenle bu adezivlerin, hidrofobik bir adeziv rezin veya ince bir tabaka akışkan kompozitle kullanılması önerilir.

Tek aşamalı self-etch adezivlerin kimyasal olarak sertleşen kompozitlerle kullanılması, reaksiyona girmemiş asidik monomerlerin tersiyer aminlerini nötralize eder ve polimerizasyonu olumsuz etkiler. Dual-cure adezivlerin üretilmesiyle bu sorun çözümlenmiştir. İki aşamalı self-etch adezivlerin daha az geçirgen ve daha hidrofobik olmalarında dolayı bu soruna rastlanmamıştır.(85)

Endodontik tedavi görmüş dayanıklılığı zayıflamış dehidrate dişlerin restorasyonlarında mine dokusunun asitle pürüzlendirilmesi veya self-etch yerine etch-and-rinse adezivlerin kullanımı önerilir. Ayrıca su içeriği ve geçirgenliği azalmış çürükten etkilenmiş dentinde, trikalsiyum fosfat kristalleri ile tübülleri daralmış sklerotik dentinde ve kanama nedeniyle kanalların plazma proteini ile kontamine olan dentinde de bu yöntem önerilir. Sonuç olarak aşamaların basitleştirilmesinin rezin-dentin bağlantı kalitesi ve dayanımına etkili olmadığı görülmüştür.

Son yıllarda adeziv sistemler CRA (Clinical Research Associates) kriterlerine göre dörde ayrılır;

- Tip 1; Üç aşamalı etch-and-rinse adeziv sistemler
- Tip 2; İki aşamalı etch-and-rinse adeziv sistemler
- Tip 3; İki aşamalı self-etch adeziv sistemler
- Tip 4; Tek aşamalı self-etch adeziv sistemler

6. SELF-ETCH ADEZİV SİSTEMLERİN YAPISINDAKİ BİLEŞENLER

Adezivin içeriğindeki her bir kimyasalın amacını bilmek adezivin karakterini öğrenmek ve doğru kullanmak açısından önemlidir. Self-etch adezivlerin içeriğinde (86);

- Monomerler
- Başlatıcılar
- İnhibitörler
- Doldurucular
- Çözücüler
- Antimikrobiyal maddeler mevcuttur.

6.1.Monomerler

Kompozit yapısında olduğu gibi self-etch adezivlerin yapısında da monomer mevcut olup kompozitle kovalent bağ oluşumunda görev alır. Adezivin yapısında matriks gibi yapı oluşturan monomerler, fiziksel ve kimyasal olarak adezive desteklik sağlarlar. Bu nedenle adezivin temel bileşeni kabul edilirler. Monomerler, self-etch adezivlerde üç fonksiyonel gruba ayrılırlar ;(86)

1. Self-etch adeziv monomer bileşenleri (HEMA- PO4)
2. Monofonksiyonel monomerler(HEMA)
3. Çapraz bağlı monomerler(TEGDMA, PENTA)

Self-etch adeziv monomer bileşenleri;

Düşük pH değerine sahip olup, mine ve dentinde demineralizasyon oluştururlar. Mine ve dentin dokusuna eş zamanlı olarak demineralizasyon ve primerin dentine infiltrasyonunu sonucunda, mine ve dentin dokusu ile adeziv arasında bağlanmada görev alırlar.

Monofonksiyonel monomerler;

Asidik olmayan metakrilat monomerlerdir. HEMA (2-hidroksietil metakrilat) en yaygın kullanılan monomer olmakla birlikte iyi biyouyumluluk sergiler. Polimerize olmamış HEMA su, aseton ve etanol gibi çözücülerde iyi çözünmekte ve çok az çözücülerden buharlaşabilmektedir. Ayrıca hidrofilik özelliği adezyonun güçlenmesine katkı sağlar. Dentinin ıslanmasını artırması ve rezinin kollejen arasına infiltrasyonu sonucunda bağlanma kuvvetini güçlendirir. Dezavantajı restorasyon ve diş yüzeyi arasında hidrojel halde su tutması ve bu suyun uzaklaştırılmasının zor olmasıdır.(87)

Çapraz bağlı monomerler;

Dimetakrilat monomerlerdir ve polimerizasyon oranını artırırlar. En yaygın kullanılan çapraz bağlayıcı monomerler, Di-metakrilatlardan Bis-GMA (bisfenol-A glisidil metakrilat), TEGDMA (tri-etilen glikol dimetakrilat) ve UDMA (üretan dimetakrilat) olup polimerler arasında sıkı çapraz bağlar oluşturarak adeziva mekanik güç oluştururlar. Akışkandırılar, suda çözünürler ve polimerizasyon büzülmesi gösterirler.(86, 87)

6.2 Başlatıcılar

Monomerlerin polimerleşmesi, polimerizasyon reaksiyonu sonucunda gerçekleşir. Başlatıcılar bu reaksiyonun başlamasında görev alırlar. Kimyasal ve foto başlatıcılar olarak ikiye ayrılırlar.

Kimyasal başlatıcılar etanol ve asetonunda (suda çok az) çözünmektedir. En sık kullanılanları Benzoil peroksit (BPO) ve tri-n-butylborone (TBB) dur.(33)

Foto başlatıcılar ise geniş spektrumlu (360-510 nm dalga boyunda) ışığı absorbe edince fonksiyon görür. En yaygın kullanılan foto başlatıcılar, Komforokinon ve 1-phenyl-1,2 propanedione (Diketon PPD) dir.(88)

6.3.İnhibitörler

Adezivin taşınma ve saklama koşullarında kendiğinden polimerizasyona girmesini önlemek amacıyla eklenen antioksidan maddelerdir. Bu işlemi

zamansız aktive olan başlatıcılardan kaynaklı serbest radikalleri temizleyerek yerine getirirler. En sık kullanılan inhibitörler Butylated Hydroksitoluene (BHT) ve Monomethyle ether hydroquinone (MEHQ) dur.(89)

6.4.Çözücüler

Dentin yüzeyinin nemli bir tabaka olması, hidrofilik bağlayıcı sistemlerin kullanımını gerektirir. Ayrıca asidik momomerlerin demineralizasyon işlemi sırasında da su gerekli olmaktadır. Bu nedenle self-etc adezivlerin su bazlı olması gerekir. Bu amaçla kullanılan çözücülerden en yaygın olanları su, etanol ve asetonur.(90)

Adeziv Sistemlerde Kullanılan Üç Çözücü Materyalin Temel Özellikleri :

Aseton:

- Yüksek uçuculuk kolay buharlaşma
- mükemmel su uzaklaştırıcı
- güçlü kurutma etkisi(over-drying riski)
- saklama ve hazırlama problemleri

Etanol:

- Mükemmel penetrasyon kabiliyeti
- buharlaşması kabul edilebilir sınırlarda
- ekspoze kollajen ağın ıslatılması iyi yüzey enerjisi sağlama

Su:

- İyi penetrasyon kabiliyeti
- yavaş buharlaşma, zor uzaklaşma
- uzaklaştırılamayan suyun rezin penetrasyonuna ve polimerizasyonuna zarar vermesi

6.5.Doldurucular

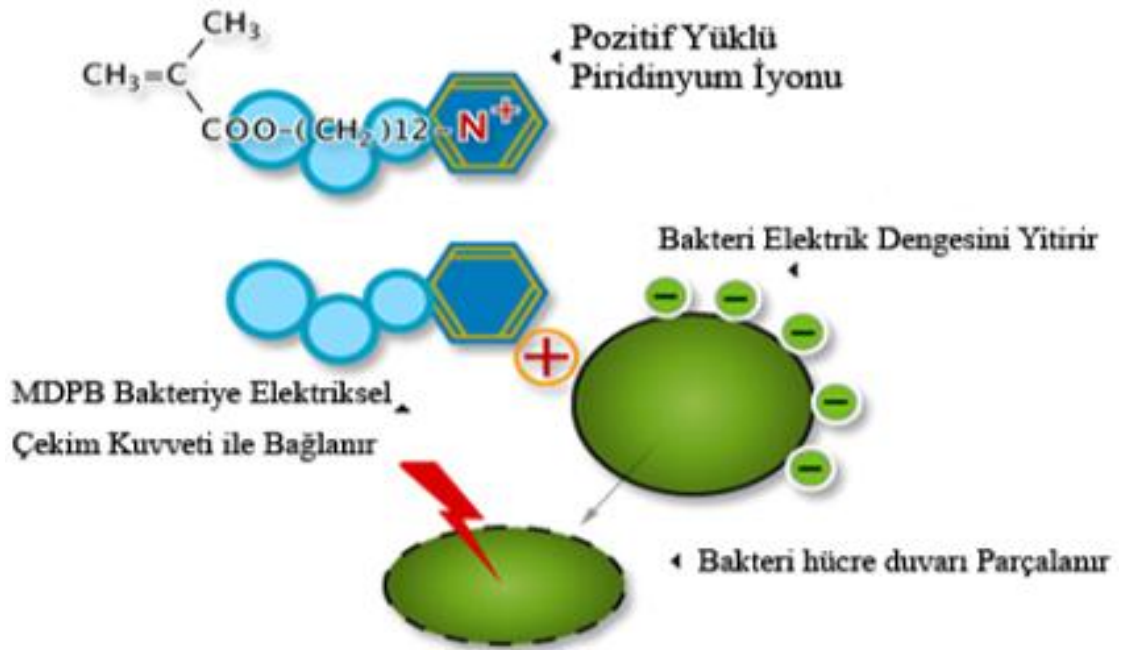
Adeziv sistemin bağlanma kuvvetini ve fiziksel özelliklerini arttırdığı gerekçesiyle ilave edilmektedir. Buna karşın adezivin penetrasyonunu azalttığı düşünülmektedir. En sık silika, flor salan doldurucular ve radyopak doldurucular kullanılmaktadır.(91)

6.6.Antimikrobiyal Maddeler

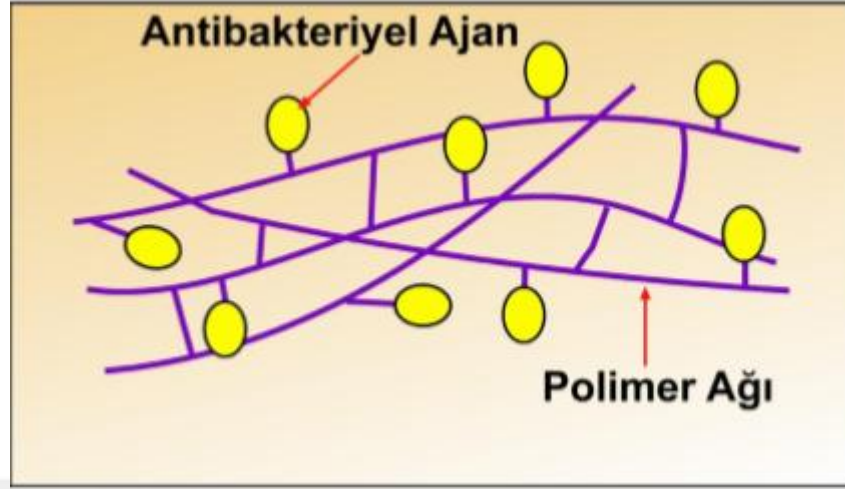
6.6.a.Metakriloksi dodecil pridinyum bromid(MDPB):

Adezive antimikrobiyal maddeler eklenerek, dezenfektan özelliği kazandırılması ve dentin kanalındaki bakterilere etki etmesi amaçlanmıştır. .En sık Metakriloksi dodecil pridinyum bromid (MDPB) maddesi bu amaçla kullanılmaktadır.(86)

Polimerize edilebilen bir ajan(metakrilol grubu seçilmiş) ile antibakteriyel bir ajanının kombinasyonundan oluşan MDPB; diğer monomerlerle birlikte polimerize olur ve polimerizasyondan sonra polimer ağında sabit bir şekilde kalır. (Şekil 14) Bu antibakteriyel monomer polimerizasyondan sonra materyalden salınmayıp,. sadece bakteriyle kontağa geldiği zaman bakteriye zarar verir .Bu etkiye ‘kontakt dezenfektan’ denilmektedir (92)(şekil 13)



Şekil 13. MDPB molekülü ve kontakt dezenfektan etkisi (Kuraray Co)



Şekil 14. Antibakteriyel molekül MDPB'nin polimer ağına sabitlenmesi

MDPB, bir metakrilol grup ile antibakteriyel ajan olan dörtlü amonyumdan sentezlenmiştir.(93) Hücre duvarına katyonik olarak bağlanan dörtlü amonyum bileşikler; membran fonksiyonunu bozar ve stoplazmik materyalin dışarı sızmasına sebep olurlar. Güçlü bakterisid etki göstererek bakteri hücrelerinin lizisine neden olurlar.. MDPB de bir dörtlü amonyum türevidir ve bunun polimerize edilmemiş halinin dörtlü amonyuma benzer bir mekanizma ile bakterisit etki gösterdiği düşünülmektedir. (93) %5 MDPB içerikli primerin polimerizasyondan önce 30 s temas ile tüm *S. mutans*'ları öldürdüğü in-vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Polimerize edildikten sonra ise sabitlenen antibakteriyel ajan yüzeyleri üzerindeki bakterileri inhibe eder. Bu sayede MDPB içerikli dentin adezivin hem kavitede kalan bakterileri öldürdüğü hem de diş restore edildikten sonra rezin-dentin arayüzüne invaze olabilecek bakterileri engellediği iddia edilmektedir (93-95). İlaveten, MDPB ilave edilmiş olan self-etching primerin, çürük dentinde bakterilerin eliminasyonu için kullanışlı olduğu bildirilmiştir .(96, 97)

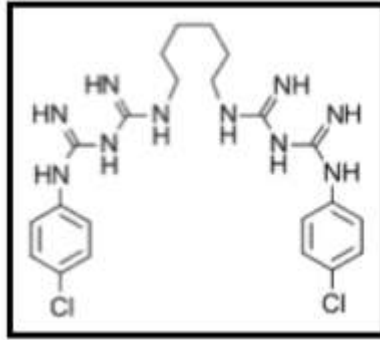
Tek katlı hücreler kullanılarak yapılan direk kontakt testlerinde, MDPB'nin 10 µg ml-1 veya daha az konsantrasyonlarda pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik olmadığı klinikte kullanılan diğer monomerlerle benzer olduğu bildirilmektedir. Hücrelerin canlılığını devam ettirebilirliği üzerinde

MDPB'nin 20 µg ml konsantrasyonunun etkisi fazla değildir. %5 MDPB içeren örneklerde bile konsantrasyon 20 µg ml-1'den daha azdır.(97) MDPB'nin içine katıldığı rezin esaslı dental materyalin biyouyumluluğu üzerine herhangi bir yan etki göstermeksizin bakterisit etki sağladığı bildirilmektedir. (98, 99)

Clearfil Protect Bond (CPB; Kuraray, Japan) adlı antibakteriyel dentin adeziv sistem MDPB'nin dentin adeziv sistemlerin içeriğine eklenerek piyasaya sürülmüştür. CPB'nin antibakteriyel etkisini invitro çalışmalarla bildirilmiştir. (100-103)

6.6.b. Klorheksidin:

1940'lı yıllarda sentetik bir kemoterapötik ajan olarak üretilen klorheksidin, 1950'lerden beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal adı 1,1Hexamethylenebis [5-(4-chlorophenyl) biguanide] olan klorheksidin (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀), en çok diasetat, dihidroklorit, ve diglukonat tuzları şeklinde bulunur. Diş hekimliğinde ise sıklıkla klorheksidin diglukonat formu kullanılmakta ve dental plağın kimyasal kontrolünde, diş çürüklerinin önlenmesinde faydalanılmaktadır



Şekil 15: Klorheksidin kimyasal yapısı

Klorheksidin, bis-biguanid bileşiği olup kuaterner amonyum yapılıdır. Geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip olup, gram (+), daha az oranda gram (-) fakültatif anaerob ve aerob mikroorganizmalar üzerine bakteriyostatik ve bakteriosidal etki gösterir. Mantarlar ve Enterococcus faecalis karşı da etkili

bir antiseptiktir. Mikobakteriyumlar, sporlu bakteriler ve bazı viruslara karşı ise etkisizdir. Laktobasillerden özellikle *L. casei*'nin klorheksidine karşı oldukça dirençli olduğu bildirilmektedir. Etkinliği 5.2'nin altında oldukça azalırken pH 7-8 arasında en fazladır. Katyonik özellikte olup (pozitif yükü nedeniyle) ve hidroksiapatit, bakteri hücre duvarı, pelikül, ekstrasellüler polisakkaritler, tükürük müsinleri ve oral mukoza gibi negatif yüklü yüzeylere afinite gösterir (104)

Klorheksidin uzun süreli salınım özelliği, hidroksiapatit ve tükürük müsinleri gibi yapılara olan abzorbsiyonuna bağlıdır. Klorheksidin, bağlandığı bu dokulardan yavaşça salınarak uzun süreli etkinlik gösterir. Klorheksidin glukonatın molekül yapısı bipolar olup; katyonik gruplarından biri diş veya mukozaya bağlanırken, ikincisi bakteri hücre duvarı üzerinde tahrip edici etki gösterir (80). Klorheksidin, hızlı bir şekilde bakteriyel yüzeylere abzorbe olur ve yüzey özelliklerini değiştirir. 200µg/ml'ye kadar olan konsantrasyonlarda membran geçirgenliğini azaltarak; hücre membranı enzimlerini inhibe eder. Bu etki "bakteriostaz" olarak adlandırılır. Bu mekanizmada; katyonik yapıdaki klorheksidin bakteri yüzeyindeki anyonik yapılara, örneğin gram (+) bakterilerde fosfat gruplarına, gram (-) bakterilerde yüzeydeki lipopolisakkaritlere bağlanır. Bu bağlantı bakteri yüzeyinin bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Sitoplazmik membran zarar gördüğünde ilk gözlenen madde potasyum iyonudur. Sitoplazmik membranın geçirgenliğinin değişmesi, sitoplazmik proteinlerin çökmesini artırır, hücrel osmotik dengeyi değiştirir, metabolizmayı, hücre büyüme ve bölünmesini zarara uğratar. Ayrıca membran Adenozin Trifosfatazını (ATP-az) ve anaerobik süreci inhibe eder. Klorheksidin düşük konsantrasyonlardaki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Oral streptokokların şeker transportunda kullandıkları fosfotransferaz sistemini inhibe ederek etkili olduğu düşünülmektedir (105, 106)

Klorheksidin, uzun süreli kullanımında metalik tat, dil ve dişte renklenme, tat alma duyusunda bozulma, eritem, ürtiker, nasal konjesyon, bronkospazm, öksürük gibi aşırı duyarlılık semptomları, glosit, stomatit,

konjiktiva ve muköz membran iritasyonları gibi yan etkileri mevcuttur. Klorheksidinin mutans streptokoklara ve dentin çürüklerine karşı etkili kemoterapötik ajanlardan olduğu bilindiğinden(81) çürük uzaklaştırıldıktan sonra kavitenin dezenfeksiyonu amacıyla kullanılabilir. Klorheksidin glukonat esaslı solüsyonların, preparasyon sonrası kavitede kalan rezidüel mikroorganizmaların azaltılmasında ya da eliminasyonunda kullanılabileceği öne sürülmüştür(107, 108)

Bir MMP inhibitörü olarak klorheksidinin, tam olarak rezin infiltre olmamış kollajen fibrillerin bozulmasında rol oynayan hibrit tabakadaki MMP'lerin baskılanmasında etkili olduğu bildirilmektedir. Böylece adeziv restorasyonların ömürleri uzamaktadır (109)

Etch&rinse adeziv uygulamasından önce, asitle pürüzlendirilen dentine klorheksidinin dezenfeksiyon amacı ile kullanımı, antimikrobiyal özelliğinin yanı sıra, kollajen fibrillerin bozulmasını da önlemektedir (110)

Klorheksidin, MMP-2, -8 ve -9'u inaktive edebilmektedir. MMP-9 aktivitesini baskılayan minimum klorheksidin konsantrasyonu %0,002'dir. Bununla beraber, MMP-2'ler daha duyarlıdır ve bunları baskılayabilen konsantrasyon %0,0001'dir. MMP-8'yi baskılayabilen klorheksidin konsantrasyonu ise %0,02'dir(86) Matrix metalloproteinazların inhibisyonu kollojen çökmesini önleyerek bondun dayanıklılığını artırdığı rapor edilmiştir.(111, 112)

6.6.c.Gluteralehit:

Antibakteriyel etkiye sahip bir diğer bileşik gluteralehittir. Gluma adeziv bond (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Germany) firması tarafından üretilmiş olup aldehit grubu içeren ilk bonding ajan olup adeziv solüsyon içinde konsantrasyonu yaklaşık olarak %5 olmalıdır. Gluteralehid geniş spektrumuna ve etki gücüne ilave olarak, koroziv (aşındırıcı) etkisinin olması sağlık alanında kimyasal sterilizasyon ve yüksek düzey dezenfeksiyonda tercih edilir olmuştur. Hafif kokulu, sarı, asit karakterde bir sıvıdır. Mikroorganizmaların karboksil,

hidroksil sülfidril, amino gruplarına ve dış tabakasına kuvvetli şekilde bağlanarak gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre duvarı ile ilişkiye girer. Bakterilerin transport işlemlerini engelleyerek, proteinlerdeki aminoasitlerin çapraz bağlanmasına sebep olur. Dehidrogenaz aktivitesini ve permeazları inhibe eder, RNA, DNA ve protein sentezini önler.

Glutaraldehitin virüsler üzerine etkisi kapsidde yapmış olduğu değişiklikler, virüs proteinlerine ve DNA'ya çapraz bağlanmasına bağlanmaktadır (113). Keskin ve ark (114) %10 'luk polivinil prolidonu, % 2" lik sodyum hipokloridi, % 2" lik glutaraldehiti antimikrobiyal ajan olarak kullanarak bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada mikroorganizmalar kanal eğelerine, elmas frez ve ultrasonik dıştaşı temizleyici uçları üzerine bulaştırılmıştır. Dezenfektanların bu mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri iki deney grubu üzerinde değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre % 2 lik glutaraldehid diğer dezenfektanlar ile karşılaştırıldığında mikroorganizmalar üzerinde daha etkili bulunmuştur(114)

Dentin hassasiyet gidericilerinin sitotoksitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada glutaraldehid içerikli hassasiyet gidericisi olan Gluma" nın çok düşük konsantrasyonlarda hücreler üzerinde kontrol grubuyla aynı morfolojik değişikliklere neden olduğu ve sitotoksik etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır (115) Gluma, % 5 glutaraldehit, % 35 hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve % 60 su içeren bir primerin marka adıdır.(116) Gluma (Heraeus Kulzer GmgH, Hanau, Almanya) 1991'den beri dentin duyarsızlaştırıcı olarak kullanılmıştır.(117) Duyarsızlaştırma özelliklerine ek olarak, glutaraldehit, kollajenazlar tarafından enzimatik bozulmaya karşı çapraz bağlanmamış veya hafif çapraz bağlı kollajen matrislerinin direncini arttırdığı bilinen güçlü bir antimikrobiyal ve çapraz bağlanma ajanıdır.(118,119)

Glutaraldehitin, ilişkiye girdiği tüm proteinleri birkaç dakika içinde çapraz bağladığı bilinmektedir.(120) Glutaraldehit, dentinal sıvıda albumin ile çapraz bağlanırken (118), dentinal sıvıdaki herhangi bir esteraz, kallikrein veya MMP'yi çapraz bağlayabilir, belki de enzimatik aktivitelerini inaktive edebilir.

Glutaraldehit çapraz bağlanmasının mekanizmasının, proteinlerin amino grupları ve glutaraldehidin aldehit grupları arasındaki kovalent bağların oluşumuna bağlı olduğu bilinmektedir.

7.BİYOUYUMLULUK

Biyoyumluluk, bir maddenin canlı doku ile teması sonucunda, lokal veya sistemik toksisite, alerjik, immunojenik, mutajenik ve karsinojenik gibi konak cevabı oluşturmama durumudur (121). Biyoyumlu olmayan maddenin canlı doku ile teması sonrasında dokuda fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu yaşamsal faaliyetlerin bozulmasına, hücrelerin dejenerasyonuna hatta ölümüne sebebiyet verebilmektedir (122). Biyoyumluluk dinamik bir süreçtir ve zamana ve şartlara bağlı olarak değişebilir.

Dental materyallerin biyoyumlu olduğunu göstermesi için bazı kriterlere ihtiyaç vardır. (123):

1. Pulpada ve yumuşak dokuda hasar oluşturmamalıdır.
2. Lokalize veya sistemik toksik cevaba yol açmamalıdır.
3. Alerjik reaksiyona yol açmamalıdır.
4. Karsinojenik ve mutojenik etki göstermemelidir.

Dental materyaller ağız içindeki yumuşak dokuyu, pulpa dokusunu, kök kanallarını, dişin sert dokusunu ve ağız dışını etkileyebilen materyallerdir (122, 124).

8. BİYOUYUMLULUK TEST YÖNTEMLERİ

Biyoyumluluk testlerinin amacı; materyal ile canlı doku teması sonrasında oluşabilecek reaksiyonları, canlı dokunun fonksiyon ve yapısal değişiminin nitelik ve niceliğini öngörmektir. Diğer bir ifadeyle; materyalin canlı doku yapısında değişiklik meydana gelebilecek değişiklikleri belirlemek ve bu değişimlerin geri dönüşümlü olup olmadığını değerlendirmektir. Dental materyallerin biyoyumluluk

değerlendirmelerinde kullanılan testler 3 aşamada incelenir(121);

1. İn-vitro (birincil) testler,
2. İn-vivo hayvan deney (ikincil) testleri
3. İnsan deney (kullanım) testleri(66,83,88).

9.İN-VİTRO TESTLER

Biyouyumluluk test yöntemleri içerisinde, en temel ve ilk başvuru olan yöntemdir. Bu test yönteminde test materyali ile canlı organizmaya ait olmayan bir dokunun teması sonucunda meydana gelebilecek biyolojik cevap değerlendirilir. Hücre kültürü çalışmalarında, materyale maruz kalan hücrelerin sayısı, büyüme oranı, gelişim hızı, metabolik veya hücresel fonksiyonları ölçülerek değerlendirilmektedir. İn-vitro testler ex-vivo testlerden farklıdır. Ex-vivo testlerde, bir kültür ortamında 24 saatten kısa süre korunan, bozulmamış doku örnekleri kullanılmaktadır. İn-vitro testler ise; laboratuarda özel kültür ortam şartları kullanılarak gerçekleştirilmektedir .(125, 126)

Günümüzde, bu testler ile gen ekspresyonu, protein ekspresyonu, sinyal aktivasyonu, inflamasyon aktivasyonu, hücre döngüsü ve bölünmesi, oksidatif stres gibi hücre fonksiyonlarıyla canlının metabolizma durumu değerlendirilebilmektedir.(127, 128)

İn-vitro testler diğer testlere göre avantajları;

- Hücrelerin etrafı ile materyalin ara yüzlerinin kontrol edilebilmesi
- Hücre cevabını detaylı olarak ölçebilmesi
- Hücresel reaksiyonların tanımlanması
- Daha ekonomik,
- Uygulama kolaylığı,
- Haha hızlı,
- Deneysel açıdan kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olması,
- Diğer testlerde meydana gelebilen etik ve yasal sorunlarla karşılaşılması

Bu testlerin en önemli dezavantajı, standardizasyon gerekliliğidir. Materyale karşı verilen in vitro sonuçlarla invivo hücresel yanıtların farklılık

gösterebilme ihtimali nedeniyle standartlaşma gereklidir. Hatta bilgisayarlı modelli teknikler biyolojik cevapları öngörmeye başarılı olmakla birlikte gelecekteki çalışmalarda bu tekniklerin geliştirilmesi, biyoyuymumluluk değerlendirmelerinde önemli rol üstleneceğini göstermektedir (126, 129).

Sitotoksiste, sistemik toksiste, inhalasyon toksisitesi, hemolizis, teratojenite, karsinojenite testleri, Ames mutajenite testi, Styles hücre transformasyon testi gibi farklı in vitro test olarak kullanılmaktadır.(130)

10. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

Dental klinik uygulama öncesi materyalin biyoyuymumluluk açısından önemli noktalarından biri, oral dokulara zararlı olabilecek materyal kaynaklı bileşiklerin sitotoksitelerinin belirlenmesidir.

İn-vitro sitotoksiste testlerinin amacı; vücut dokularına uygulanan materyalin doku üzerinde oluşturduğu cevabın laboratuvar ortamında belirlenmesidir (131-133). Bu testlerde, hücre canlılığı ve morfolojisi, hücre metabolizması ve organelleri, hücre gelişimi, bölünmesi ve sayısı, çeşitli enzim aktiviteleri, hücre membran geçirgenliği ve hasarı ile DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu değerlendirilmektedir.

Bu test biyoyuymumluluk testleri açısından en çok başvurulanan test yöntemi (124, 125, 134) olmakla birlikte;

1. Test materyalinin diğer metabolizmalardan bağımsız, hücre metabolizmasındaki etkisi spesifik bir fonksiyon üzerinde test edilebilmektedir.
2. Düşük maliyetlidir.
3. Çok sayıda örnek oluşturma ve kısa sürede test etme şansı vardır.
4. Kantitatif sonuçlara ulaşılır.
5. Standardize edilebilir

Bu testlerde tek tür hücre kullanılmakta olup, kültür hücreleri ile konak doku hücreleri arasında farklılıklar olabilmektedir. Ayrıca kültür ortamında alınan metabolik sonuçlar in vivo şartlarda meydana gelen bulgularla uyumlayabilir. Bununla birlikte uzun dönem metabolik cevap ölçülememektedir (125, 134).

Bu testlerde hücre kültürü ve organelleri, ile doku ve organ kültürleri kullanılabilir. Dental materyallerin sitotoksikite testlerinde hücre kültürü en sık kullanılan yöntemdir (125).

Bu amaçla kullanılmakta olan hücre kültürleri insan, fare, maymun, tavşan gibi canlıların akciğer, böbrek, amniyon zarı gibi dokularından temin edilmektedirler. Besleyici sıvılarda süspansiyon edilen bu hücreler steril tüpte bekletildiklerinde kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme neticesinde hücre kültürü denen yapı oluşur ve seri olarak devam eden kültür işlemlerinin ardından süresiz çoğalabilme özelliğinde devamlı hücre hatları meydana getirilir. Bu hücreler değişime uğramış primer hücrelerdir ve daha stabildirler. ISO kriterleri çerçevesinde en çok kullanılan devamlı hücre hatları; fare fibroblastları (L-929, Balb/3T3 ve WI38), primer insan hücreleri ile insan epitel (HeLa) hücreleridir (132, 135-137).

Bu testlerde kültür ortamındaki hücrelere test materyali uygulanması sonrasındaki hücre büyüme hızı ve hücre sayısı değerlendirilir. Uygulamada önce hücrelerin kültür kabına yapışması sağlanır. Ardından test materyali uygulanır. Belli bir süre sonrasında canlı hücre sayısı ve hücre çoğalmasının değerlendirilmesi yapılır. Zamanla hücre sayısı ve çoğalmasındaki azalma, materyalin sitotoksik olduğunu, hücre sayısı ve çoğalmasındaki artış ise, materyalin proliferatif olduğunu gösterir (138).

İn-vitro sitotoksikite değerlendirmelerinde kullanılan ISO çerçevesindeki uygulama yöntemleri:

1. Hücre kültürü testleri
 - a. Direkt hücre kültürü metodu
 - Direkt temas testi
 - Ekstrakt testi
 - b. Bariyer test metodu
2. Agar difüzyon testi
3. Filtre difüzyon testi
4. Dentin bariyer testi

10.1. Hücre Kültürü Testleri

Hücre kültürü yöntemiyle; kısa zamanda in vivo ortamda değerlendirilmesi mümkün olmayan bir materyalin fiziksel, kimyasal, mutajenik etkileri ile hücrenin yapısı ve fizyolojisi incelenebilir(139).

Bu yöntemin avantajları; uygulamaların standardize edilebilmesi, tekrarlanabilmesi, kısa süreli reaksiyonların incelenebilmesi ve ortam şartlarının kontrol edilebilmesidir. Dezavantajları ise; hücre üretim maliyeti, hijyenik koşullara hassasiyet göstermesi, işlemler sırasında hücrelerin farklılaşabilmesi veya ölmesidir(140).

Dental materyallerin sitotoksitesini belirlemede çok sayıda hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerdeki temel uygulama, test edilecek dental materyalin yapısındaki bileşenlerin tek-tabaka kültürdeki hücreler üzerine direk yerleştirilmesinin ardından belirli sürelerde ve doz-cevap eğrisi ile bileşenlerin sitotoksite değerlerinin karşılaştırılarak belirlenmesidir.

Hücre kültürleri primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri olarak üç farklı teknikte uygulanmaktadır;

Primer hücre kültürleri, doğrudan canlı dokudan elde edilmekle birlikte gerçek doku hücreleriyle benzer özellikler göstermektedirler. Primer hücre kültürleri ilk pasajda üretildikten sonra bir kültür ortamından diğerine aktarılmakta ve bu işleme subkültür adı verilmektedir. Yeni üretilen hücreler fonksiyonel özellikleri aynı olan hücre hatlarını meydana getirirler. Sonraki günlerde orijinal özellikleri değişebilmektedir. Primer hücre kültürleri toksik materyale karşı daha duyarlıdır(141, 142).

Diploid hücre kültürleri, bazı hücrelerin kromozom yapıları kaybolup farklı yapıda kromozom gelişebilmektedir. Bu hücrelere pseudodiploid hücre de denilmektedir. Bu hücre kültürleri homojenize edilebilme, standardize edilebilme ve tekrarlanabilme özelliklerine sahiptirler (143).

Devamlı hücre kültürleri, subkültürü sınırsız sayıda alınabilen, genetik ve metabolik yapıları orijinal dokudan farklı geliştirilmiş kültürlerdir. Hücrelerin % 85' i orijinal doku hücrelerinin genetik ve metabolik özellikleri ile benzerlik göstermektedir.

10.1.a. Direkt hücre kültürü metodu

Bu yöntem test materyali veya bileşenlerinin, kültür hücreleri üzerine doğrudan ve 24 saat gibi kısa süre zarfında uygulanması esasına dayanır. Suda çözünebilir materyallerin hücre ile teması oldukça başarılı iken, suda çözünmeyen materyaller ise, sıvı bir çözücünde ayrışması sonucunda hücrelerle teması sağlanarak sitotoksiteleri incelenir. Çözücü ortamının, klinik kullanım ortamına uygun olması ve materyalin yapısında değişiklik meydana getirmemesi beklenir (131, 133, 144).

10.1.b. Bariyer test metodu

Test materyali ile pulpa arasında dentin dokusu bir bariyer görevi gördüğünden dolayı, direkt temas testleri klinik ortamı tam olarak taklit edememektedir. Bariyer test yöntemin ise, dentini taklit eden ve bazı bileşenlerin difüzyonuna izin veren çeşitli insert sistemleri bariyer olarak kullanılmaktadır. Uygulamada, insert içine koyulan materyal medyum içinde asılı konumda bulunur ve insertin altında bulunan pöröz membran, bariyer oluşturarak çözünen bileşenlerin geçmesine ve medyum tabanında yer alan hücrelerle temas etmesine imkan sağlar (133, 145).

10.2. Agar difüzyon test yöntemi:

Bu yöntem sitotoksite çalışmalarında en uzun süre kullanılan yöntemidir. Bu yöntemde, test materyalinin bileşenlerinin kültür hücrelerinin üstündeki %1,5'luk agar besiyerinden difüze olmasının ardından toksisiteleri değerlendirilir. Uygulama kolaydır ve maliyeti düşüktür. Dezavantajı, çözünen materyal bileşenleri sitotoksik olsa bile, agar tabakasından diffüze olamazsa hücre hasarına yol açamayacaktır. Toksisitesi incelenecek olan test materyali, agarın üzerine 24 saat süreyle yerleştirilir. Ölü hücrelerin tespitinde boyama

tekniki kullanılır. Ölü hücreleri boyayan tripan mavisi veya canlı hücrelerde depolanarak membran hasarında dışarı salınan nötral kırmızı boyası kullanılır. Birkaç kez tekrarlanan testlerde, hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz bulguları incelenerek materyallere verilen reaksiyonlar belirlenir ve materyallerin sitotoksiteleri hakkında değerlendirme yapılır (133, 146, 147).

10.3. Filtre difüzyon test yöntemi:

Bu yöntemde selüloz asetattan yapılmış filtre kullanılmakta olup filtrenin bir tarafına hücreler diğer tarafına test materyali yerleştirilir. Sitotoksite tespiti için materyalin, 0.45µm kalınlığındaki filtreden difüze olup hücrelere ulaşması beklenir. Hücrelerdeki hasarı belirlemek için nötral kırmızısı ile boyama yapılır ve boya yoğunluğuna göre değerlendirme yapılır (131, 133, 148, 149).

10.4. Dentin bariyer test yöntemi:

Bu yöntemde test materyali ve hücreler arasında bariyer olarak dentin dokusu kullanılır. Bu amaçla, insan veya sığır dentin diski kullanılmaktadır. İnsan dentinin avantajı, in vivo ortama benzerliği, dezavantajı ise yeterli sayıda insan dişinin temin edilme güçlüğü ve dentin kesitlerinin geçirgenliklerinde çok çeşitlilik görülmesidir. Preslenmiş dentin talaşlarının, doğal dentin yapısı ile uyuşmadığı bildirilmektedir. Sığır dişi kullanımının avantajı; gereken miktarda elde edilebilmesi ve geçirgenlik özellikleri bakımından insan dentinine oranla daha az çeşitlilik görülmesidir. Dentin bariyeri yöntemi, diğer yöntemlere kıyasla oral ortamı daha iyi taklit etmektedir (131, 150-152).

11. SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME YÖNTEMLERİ

11.1. Hücre canlılığını belirleyen testler

Hücre canlılığının belirlenmesi için birçok test yöntemi uygulanır. Önemli olan çalışmanın tipinden ziyade çalışma sonundaki canlı ve ölü hücre miktarlarının belirlenmesidir (153).

Sitotoksitede hücre canlılığını belirlemede genelde kolorimetrik,

lümİnesans ve enzimatik yöntemler kullanılır (154-156).

Kolorimetrik metodlarda;

- Tetrazolyum tuzları
 - (MTT) 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
 - (MTS)3-(4,5dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sülfofenil)-2H-tetrazolyum
 - (XTT)2,3-bis-(2metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5karboksianilid
 - (WST)2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum

➤ *Kristal viyole*

➤ *Nötral kırmızısı*

gibi boya maddeleri ile hücrelerin spesifik boyanmasının ardından ölçümler yapılmaktadır (157-159).

Floresans ve biyolümİnesans olmak üzere Luminometrik metodlar ikiye ayrılır. Floresans metodlarda, floresans özellikteki maddeler kullanılmakta iken, biyolümİnesans metodlarda ise özel enzimler (lusiferaz) ve bunların substratları kullanılarak canlı ve ölü hücre tespiti yapılmaktadır. Daha gelişmiş biyolümİnesans metodlarda (gerçek zamanlı biyolümİnesans), hücrelerin sitotoksik maddeye maruz kalması, sadece testin yapıldığı sürede değil, maruziyet süresince incelenebilme imkanı verir (160).

Hücre hasarının veya ölümünün ardından vasata sızan enzimler de ölü hücre sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerden stabilite özelliğine sahip laktat dehidrojenaz (LDH), canlılık testlerinde hücre ölümü belirteci olarak kullanıma geçmiştir (161).

Hücre sayısı tespitinde başvuru olan metotlar içerisinde, mikroskopi (tripan mavisi ile boyama thoma lamı) veya elektronik sayıcı aracılığıyla otomatik sayım gibi metodlar, özellikle rutin hücre kültürü işlemlerinde kullanılmaktadırlar. Ancak bu metodlar çok vakit aldığı için, sayıca fazla numune içeren çalışmalarda (mikropleyt formatı) kullanımı uygun değildir (162). mikropleytlar ve bunları içeren testlerin geliştirilmesiyle çok sayıda

numunenin kısa zamanda incelenmesi mümkün olmuştur ve “ekle-karıştır-ölç” prensibiyle hem zaman tasarrufu hem de uygulama kolaylığı elde edilmiştir (163, 164).

11.1.1. Tetrazolyum tuzlarıyla yapılan testler

Tetrazolyum tuzları, heterosiklik organik yapıda bileşikler olup günümüze kadar binden fazla üyesi sentezlenmiş ve tanımlanmıştır(165). Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri ve formazan diye adlandırılan yapıya dönüşmeleri sonucunda renk değişikliği meydana gelir. Tetrazolyum halkası aktif mitokondri tarafından kırılabilirdiği için sadece canlı hücrelerde renk reaksiyonunu meydana gelebilmektedir. Ölü hücrelerde ise, tetrazolyum bileşikleri indirgenemediği için herhangi bir renk değişimine rastlanmamaktadır (163, 165).

Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilen MTT testinden sonra, XTT, MTS, WST-1, WST-8 gibi farklı özellikler içeren tetrazolyum bileşikleri geliştirilerek kolorimetrik metodlara ilave olmuşlardır (166-169). Araştırmalarda, fazla sayıda tetrazolyum formazan kullanılmasına rağmen bunlardan yalnız birkaçının kabul görmesiyle biyolojik sistemlere uyarlanması sağlanmıştır (165, 167). Bu bileşikler, hücre içine girebilme ve vasatta çözünme özelliklerine göre ikiye ayrılırlar.

İlk grupta bulunan MTT, pozitif yüke sahip bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranından kolayca infiltre olarak hücre içinde indirgenebilir fakat indirgenme neticesinde oluşan formazan, suda çözünemez ve vasatta kristal yapıda çökelmektedir.

İkinci grupta yer alan MTS, XTT ve WST bileşikler ise negatif yüke sahip olup hücre membranını geçemezler. Bu nedenle ilgili bileşiklerle ara elektron alıcı moleküllerin (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) kullanılması gerekliliği ortaya çıkar. Elektron alıcı molekül, hücre içerisine infiltre olarak sitoplazmadan veya plazma membranından elektron alması sonrasında vasata geri dönerek tetrazolyum bileşiğini indirger. İndirgenme sonucu meydana gelen formazan ise suda ve dolayısıyla vasatta çözünebilir özelliktedir (163).

Tetrazolyum bileşikleri kullanılan canlılık testleri, üç aşamada gerçekleşmektedir.

İlk aşamada hücreler belirli bir zaman toksik maddeye maruz kalırlar. İkinci aşamada toksik madde ortamdan uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği vasata ilave edilir ve ortalama 1-4 saat süresince inkübe edilir. Bu sırada canlı hücreler ilgili bileşikler indirgeyerek formazana dönüştürür ve renk değişikliği gerçekleşir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometre ile ölçülerek canlı ve ölü hücre sayısı tespit edilir (170).

MTT bileşiği sarı renkli, formazan ise mor renkli olup suda çözünmez özelliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi amacıyla uygun bir çözücüde çözdürülmelidir (171) tarafından, MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımını önermiştir. Çözücü olarak genellikle DMSO tercih edilirken hücreler üzerine toksik etkisi bulunmaktadır. Bu durum test güvenilirliğini azaltmaktadır (168). Ayrıca çözdürmek için yapılan pipetleme sırasında formazan kristallerinin hasar görmesi de test hassasiyetini azaltan diğer bir etkidir (172).

XTT, MTS ve WST testlerinde ilave bir çözdürme işlemine ihtiyaç yoktur ve deney boyunca çeşitli zamanlarda absorbansın kaydedilmesine olanak sağlanır. Böylece canlılığın değerlendirilmesinde daha detaylı ve hücre sayısı hakkında MTT testine oranla daha hassas bilgi verir. Bu gruptaki tetrazolyum tuzları, kimyasal özellikleri nedeniyle kendileriyle birlikte elektron bağlayıcı ajanların (electron coupling agent, PES) kullanımını gerektirirler (163, 167).

LDH Enzim Salıverilmesi Testi:

Bu test, hasarlı ve ölü hücrelerden vasata salınan laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır (161, 173). Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerde mevcut sitoplazmik bir enzimdir. Toksik etkenlere maruz kalan hücrelerin plazma membran bütünlükleri bozulur ve sonrasında LDH enzimi hücrelerden dışarı sızarak vasata geçer. Böylece LDH enzim aktivitesinin ölçülmesi ve hücre hasarı değerlendirilmesi mümkün olur (163, 174) LDH testi ile ölçülen enzimatik aktivitenin zamanla doğal yıkımlanmaya uğrayabilmesi, pH ve vasat kompozisyonundan etkilenebilmesi

dezavantajlarından bazılarıdır (175). Hücreler hasar aldıktan veya öldükten sonra vasata salınan LDH'nın yarı ömrü 9-10 saat civarındadır. Toksik maddeye uzun süreli maruz kalma gerektiren çalışmalarda, LDH'nın yarı ömrü ve hücrelerin çoğalmasıyla değişen LDH oranı gibi faktörler, hassasiyeti düşürmektedir. Değişik hücre hatlarından köken alan ve vasata salınan LDH'nın stabilitesi değişiklik göstermektedir. Özellikle fibroblastların endojen LDH oranları düşük olması sebebiyle bu hücre hattıyla LDH testinin kullanımı doğru değildir (176).

11.1.2.Lüminesans Metodlar:

11.1.2.a.Alamar Mavisi Floresans Testi ve Diğer Floresans Metodlar:

Alamar mavisi testi, ilk kez 1950 yılında Erb ve Ehlers (177) tarafından, biyolojik sıvılara ve süte bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılmışlardır. Sonrasında Ahmed ve ark.1994 yılında bu testi radyoaktif [3H]timidin birleşme testine alternatif olması amacıyla hücre kültürüne uyarlamıştır (178).

Alamar mavisi (resazurin) adlı bileşiğin, canlı hücrelere geçip indirgenmesi neticesinde resorufin adı verilen floresans özellikli pembe renkli bileşiğine dönüştürülmesi bu metodun temel prensibini oluşturur. Ölü hücreler, metabolik aktivitelerini kaybettiklerinden dolayı resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali meydana getiremezler. Oluşan sinyal, florometre ile tespit edilir ve canlı hücre sayısı artınca sinyal güçlenir (178-180).

Alamar mavisi testinde, lizis, ekstraksiyon ve yıkama gibi zaman ve çaba gerektiren prosedürler yoktur ve pH değişikliklerine karşı dayanıklıdır. Alamar mavisi testinde, renk değişikliği oluşmasının ardından, hücreler vasattan uzaklaştırılsa veya sonradan ölse bile renk değişimi sabit kalır ve bu durum kullanımını sınırlayan nedenlerdendir. alamar mavisi hücrelerin üreme ve gelişmeleri esnasında ortama saldıkları metabolitler ve vasat kompozisyonundan oldukça etkilendiği için, hücreler öldükten sonra metabolitleri halen vasatta bulunduğundan dolayı tekrar eski okside formuna

dönemez ve bu da testin başarısını olumsuz etkiler (178, 181).

Proteaz ve esteraz enzim aktivitesini ölçen alamar mavisi dışında iki floresans metodu daha bulunmaktadır. Bu metodlar, proteaz ve esteraz aktivitesi ile canlı ve ölü hücrelerin ayrılması esasına dayanır (182, 183). Proteaz aktivitesine dayalı metotta, hücre membranını geçebilen florojenik proteaz substratı (glisilfenilalanil-aminoflorokumarin; GF - AFC), canlı hücreler içine girerek, sitoplazmik aminopeptidazlar vasıtasıyla glisin ve fenil amino asitlerinin uzaklaştırılarak floresans sinyali yayan aminoflorokumarine (AFC) dönüştürülür ve neticesinde canlı hücre sayısı belirlenebilir. Diğer metotta ise ester formulu substrat halinde bulunan kalsein-asetoksi-metilester (CAM) adı verilen madde, yalnız canlı hücrelerin ester bağlarını kırarak hücre canlılığını belirlenmesini sağlar. Ester bağının yıkımı sonucu oluşan serbest kalsein, hücre içerisinde floresans etki gösterir ve oluşan sinyal florometre ile ölçülür (183).

11.1.2.b. ATP Biyoluminesans Testi:

Adenozin trifosfat (ATP) molekülü biyolojik sistemlerde enerji kaynağıdır ve metabolizması aktif tüm hücrelerde bulunur (154). Hücre ölümü ile ATP sentez edilemez ve endojen ATPazlar ATP'yi hızlı bir şekilde yıkarlar. Bu nedenle intrasellüler ATP içeriği, hücre canlılığının temel göstergesi olarak görülmüştür. Bu test, multipleytlerde yapılan canlılık testlerinde en hızlı, en hassas ve en kolay metot olarak belirtilmiştir (184).

Test, toksik maddeye maruz kalan hücrelerin lize edilmesi, açığa çıkan ATP'nin, lusiferin-lusiferaz ile reaksiyona girmesi ve oluşan lüminesans sinyalinin luminometre ile ölçülmesi esasına dayanır (154, 163). Lüminesans sinyali, alternatif olan bazı florometre modelleri ile de ölçülebilir ancak bunlar luminometre kadar hassas değildir (185). Luminometre cihazı, her laboratuvarında bulunmaması ve test maliyeti, en önemli dezavantajı olmaktadır (153).

11.1.2.c. Gerçek Zamanlı (Real Time) Biyolüminesans Testi:

Canlılık testlerinin çoğunluğu, hücreleri yok olmasına sebep olan ya da daha ileri incelemelere izin vermeyen son test formatındadır. Bu durum toksik maddenin kinetiğini ve gerçek zamanlı analizini olanaksız kılar. Toksisite zaman ve doza bağlı olduğundan, farklı doz aralıklarının etkileri ancak farklı zamanlarda incelenmesi ile doğru sonuçlar çıkarılabilir. Bu testte de ATP biyolüminesans testindeki gibi lusiferaz enzimi kullanılır fakat farklı bir canlıdan temin edilir. Lusiferaz prosubstratı olarak ise koelenterazin adında bir madde kullanılır (160). Koelenterazin, hücre içine serbestçe girebilme özelliğine sahiptir ve üzerinde bazı kimyasal modifikasyonlar yapılarak, lusiferaz ile etkileşemez hale getirilmiştir. Toksik maruziyet sonrası hücreler üzerine eklenen koelenterazin, canlı hücreler tarafından asıl formuna döndürülür ve lusiferaz ile etkileşerek oksidasyonu neticesinde koelenteramide dönüşür. Koelenteramid 480 nm dalga boyunda ve mavi renkte maksimum absorbans veren ışınım yapar. Ölü hücreler, metabolik aktiviteleri olmadığından koelenterazini esas formuna dönüştüremez ve sinyal oluşturamazlar. Canlı hücre sayısı ile sinyal doğru orantılıdır. Bu metottaki Renilla lusiferazı ile ATP biyolüminesans metodundaki Firefly lusiferazı arasındaki en önemli fark, Renilla lusiferazının ATP'ye ihtiyacı yoktur. Böylece hücreleri lize etmeye lüzum kalmadan, gerçek zamanlı inceleme yapılabilmektedir. Bununla birlikte son test formatında olmayan bu metod, diğer testlerle kombine edilme durumu dolayısıyla daha detaylı sonuç alınabilmektedir (155, 160, 186). Bu testin dezavantajları, yüksek maliyeti ve vasata ilave edilen prosubstratın, canlı hücreler tarafından metabolize edilmesi ile bir süre sonra tüketilmesidir (185).

11.2.2.Proliferasyon Değerlendirme Testleri:

Test materyalinin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesinde, kültürdeki hücrelerin sonraki günlerdeki sayımından elde edilen bir büyüme eğrisine bakılıp değerlendirme yapılır. Bu analiz, az sayıda numune olduğunda

kullanılması uygundur. Bu yöntemde en sık başvuru alan testler; ^3H -timidin ve Bromodeoksiuridin immuno-histokimyasal tekniktir (132).

11.2.3.Genotoksisite, Mutajenite ve Karsinojenite Testleri

Genotoksisite, Mutajenite ve Karsinojenite, test materyalinin sistemik biyoyoumluluğunu değerlendiren parametrelerdir.

Bu kapsamda yapılan testler, deney numunelerinin gen mutasyonlarına, kromozom yapısındaki değişikliklere veya diğer DNA veya gen değişikliklerine neden olup olmadığını tayin etmek amacıyla memeli veya memeli olmayan hücrelerin (bakteri, maya veya mantarlar) kullanıldığı testlerdir. En sık kullanılan test AMES testidir. Bu yöntemde, genetik yapısı değiştirilmiş, özel agar kültüründe çoğalmayan ve koloni oluşturmayan bakteriler kullanılmaktadır.

Gluteraldehit içeren dentin bonding sistemlerin, mutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir. UDMA ve Bis-GMA bileşiklerinin memeli hücreleri üzerlerinde mutajenik olmamakla beraber, TEGDMA'nın ise orta derecede mutajenik olduğu bildirilmiştir fakat hastaların maruz kaldığı doz mutajenik etkinin görülmesi için çok düşük seviyededir.

Genotoksik etki tespitinde kullanılan Alkaline Filter Elution testi (AFE), genotoksik materyallerin yol açtığı DNA dizilerindeki hasarları kolayca ortaya koyabilmektedir (187-190).

12. HAYVAN DENEYLERİ

Hayvan deneyleri; insanlarda kullanım testleri neticesinde meydana gelebilecek olumsuz etkileri ve bu etkilerin oluşum mekanizmaları konusunda yardımcı olmaktadır. Test materyallerinin hayvanlarda kullanımı, insanda kullanılamayacak kadar yüksek dozlarda kullanılabilmesi ve insanlarda inceleme yapılma şansı mümkün olmayan embriyonal veya çocukluk gibi dönemlerde yapılabilmesi avantajları önceden tahmin etmeye yardımcı olmaktadır. Genellikle fare, rat, kedi, köpek, koyun, keçi veya maymun gibi

memelilerin kullanıldığı hayvan deneyleri; değişkenlerin kontrol edilememesi, ekonomik olmaması, deney tamamlanma süresinin uzunluğu, hayvan hakları ve uygulama esnasındaki etik sorunlar ile biyolojik yanıtın kantitatif ifadesinin zor olması nedeniyle daha az tercih edilirler. Ayrıca, hayvan deneylerinde; test materyalinin şekli, hayvanın materyale maruz bırakılma yöntemi, temas süresi, biyolojik yanıtların değerlendirilme şekli ve hayvanların türü, yaşı, cinsiyeti gibi değişkenlerin kontrolü gerekmektedir. Esas dezavantajı ise, insan vücudunun vereceği biyolojik yanıt ile hayvan türünün vereceği doku cevabının benzerliği tartışmalıdır. Bu deneylerde, biyouyumluluk testi yapılacak dental materyalin piyasa öncesi formu kullanılmakta ve spesifik olmayan lokal toksik etkilerin incelenebilmesi için doku içerisine implantasyonu gerçekleştirilir. Test materyalleri hayvanların deri altı, kas içi yada kemik içine yerleştirilmesinin ardından bir hafta veya bir kaç ay süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak dokular incelenmektedir (139, 148, 187, 190-193).

Diğer bir teknik, üzeri delikli polietilen tüpler içerisine konulan test materyalinin implantasyonudur. İmplantasyon neticesinde, polimerize olan materyallere oranla polimerize olmamış materyallerin çoğunda daha fazla toksik reaksiyona rastlanmıştır. Amalgam ile kompozit rezininin deri altı doku cevaplarının kıyaslandığı çalışmalarda kompozit rezine karşı daha fazla doku reaksiyonu meydana gelmiştir. Parçalar halinde yerleştirilen kompozit rezine karşı, 8 hafta sonrasında bile inflamasyon varlığı tespit edilmiştir (188, 190, 194).

13. KLİNİK ÇALIŞMALAR (Kullanım Testleri)

Deney hayvanlarına ya da gönüllü insanlara uygulanan kullanım testleri, klinik ortamı her bakımdan taklit etmelidir. Bu yöntem; laboratuvar ve hayvan deneyleri sonucunda güvenilir olduğu düşünülen bir materyalin insanlar üzerinde kullanılması sonrasında, materyale verilen cevapların gözlenmesi esasına dayanmaktadır.

Materyallerin biyouyumluluğu ile ilgili en doğru sonuçları bu test yöntemiyle elde etmek mümkündür. Klinik ncesi materyalin alerjik özellikleri, deney hayvanları üzerinde deri hassasiyet testi uygulanmasıyla belirlenir. Alerjik zelliklerin belirlenmesinde kullanılan diğer testler; Maksimizasyon ve Buhler yöntemleridir. Farklı içerik ve özelliklere sahip birçok dental materyal; diş dokuları, alveol kemiği, yumuşak doku ve sıvılarla temas etmektedir.

Yapılacak klinik çalışmalarda; pulpa reaksiyonları, gingiva ve periodonsiyum ile biyouyumluluk, oral mukozada irritasyon ve plak oluşumu gibi biyolojik parametreler değerlendirilmektedir. Histolojik olarak incelenen dişlerin pulpasında akut veya kronik iltihap ile odontoblast reaksiyonları değerlendirilir. Bu testlerle ilgili çok sayıda komplikasyon mevcuttur. Kontrolü ve değerlendirmesi zor olan bu testler, pahalı ve zaman alıcı olmasının yanında yasal ve etik açılardan da oldukça önemlidir. Klinik testler sadece biyouyumluluk testlerinin ilk üç fazını başarılı bir şekilde geçmiş materyallerle yapılabilmektedir (131,133,144,187,192,193,195).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda klinikte rutin olarak kullanılan beş farklı adeziv materyal doz/inkubasyon süresinin sitotoksik etkisi XTT testi ile değerlendirilmiştir. Mikroskopik çalışmalar Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji kurumunda yapılmıştır.

İn-vitro sitotoksik aktiviteleri değerlendirilen adeziv materyaller Resim 1 de gösterilmiştir.



Resim 1: Tez çalışmasında kullanılan adezivler

Kullanılan adeziv materyallerin karakteristik özellikleri (üretici firmaları, lot numaraları ve kimyasal içerikleri) Tablo 1’de verilmiştir. İki basamaklı adeziv sistemlerin sadece primerleri çalışmaya dahil edildi. Sistemlerin adeziv rezinlerinin çalışmaya dahil edilmemesinin sebebi, primer ve adezivin karıştırılması sonucu bazı komponentlerin birbiriyle etkileşimi söz konusu olacağından, deney sonucunu etkileyebilecek durumları elimine etmektir.

Tablo 1. Kullanılan adeziv materyallerin karakteristik özellikleri

Adeziv restoratif sistemler	Uretici firma	Lot numarası	Kimyasal içeriği
Gluma self etch bond	Heraus Kulzer,Hanau ,Germany	010912	UDMA(Urethane dimethacrylate),4-META/Acidic monomer, acetone, water fillers,photoinitiators, stabilizers
Gluma 2 bond	Bayer AG	010512	Etanol,2-hidroksietil metakrilat,poli(metakrılık-oligo-akrılıkasit),4-methacryloxyethyltrimellitit asid anhidrad,glutaral,amorf silika
Clearfil SE bond	Kuraray, Okayama, Japonya	Primer lot no 450247	Primer: 2-hidroksietilmetakrilat,10-methacryloyloxydecylhidrojen fosfat,hidrofilikalifatik dimetakrilat,kamferokinon,su,hızlandırıcılar Bond: Bis-Gma, Hema, Hydrophobic dimethacrylate, camphorquine,N-N-Diethanol-p-toluidine,colloidal silika
Clearfil SE Protect bond	Kuraray, Okyama, Japonya	Primer lot no 3E0068	Primer: 2-hidroksi etil metakrilat,10-methacryloyloxydecylhidrojen fosfat, hidrofilikalifatik Bond: Bis-Gma, Hema, Hydrophobic dimethacrylate, camphorquine,N-N-Diethanol-p-toluidine,colloidal silika
Peak universal bond		010912	Etıl alkol,2-hidroksıl metakrilat,methacrylic acıd,% 0.2 klorheksidin

Test Materyallerinin Hazırlanması

Materyallerin Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) içerisinde maksimum çözünmesinin sağlandığı %1'lik ana stok çözeltileri hazırlandı ve 0,2 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek çözeltiler steril edildi. Bu stok çözeltilerden alınan örnekler, DMEM içerisinde 1/10 oranında üç kez seri dilüsyon ile seyreltilerek test dilüsyonları (%0,1, %0,01 ve %0,001) hazırlandı. Böylece, sitotoksikite analizinde test materyallerinin dört farklı dozu kullanılmış oldu. Test materyallerinin eklenmediği hücre içeren kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanıldı.

Hücre Kültürü Çalışması

Materyallerin sitotoksik potansiyellerini değerlendirdiğimiz XTT testinde, ISO standartlarının bu yöntem için önerdiği hücre hatlarından biri olduğu ve memeli sistemleri temsil etmeye uygunluğu nedeniyle, fare deri altı bağ dokusundan elde edilen, fibroblast kökenli ve L Strain hücrelerinden türetilmiş L929 fare fibroblastlarından oluşan klonal hücre hattı kullanıldı.

L929 fare fibroblast hücreleri DMEM besiyeri (% 10'luk fetal sığır serumu ve 100 U/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin içeren) içinde T75 hücre kültür kaplarında 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde üretildi.(Şekil 16) Yapışkan hücreler, hücre kültür kabının %75-80'ini kapladığında tripsin enzimi kullanılarak flaskın tabanından kaldırıldı. 100 µl homojenize hücre süspansiyonu %0,04 Trifan mavisi ile 1:1 oranında dilüe edildi. Hemositometre ile sayım yapıp 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.



Resim 2: Hücrelerin büyütüldüğü inkübatör



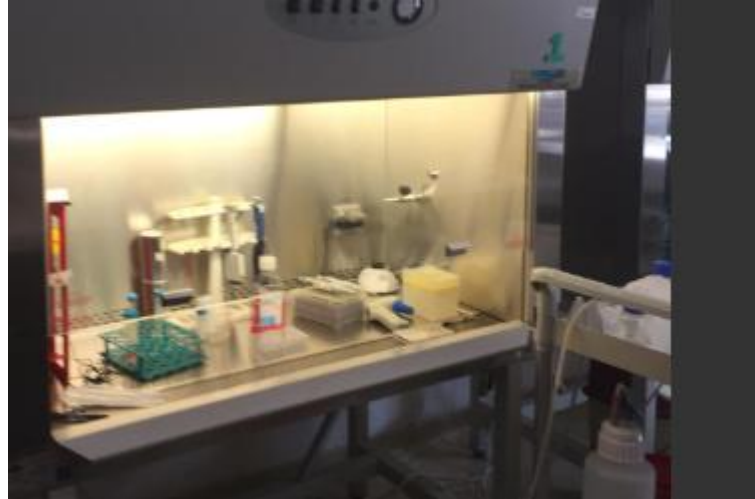
Resim 3: Hücre pasajlamada kullanılan santrifüj cihazı

1. XTT hücre proliferasyon ve canlılık tayin testi: XTT sodyum tuzu (*sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate*) hücrelere aktif olarak absorbe olan bir tetrazolyum tuzudur. XTT metabolik aktivite gösteren hücrelerde mitokondriyal dihidrogenaz enzimleri tarafından biyoindirgenme reaksiyonları sonucunda turuncu renkli suda çözünen formazan bileşiklerine indirgenir. Sadece canlı hücrelerde mitokondri XTT tuzunu indirgeyerek oranj renkli suda çözünebilen bir boyaya dönüştürebilir. Oluşan boyanın yoğunluğu belirlenen dalga boyunda (450 nm-500 nm) spektrofotometre cihazı ile ölçülür. XTT yönteminde steril düz tabanlı 96 kuyulu plaklar kullanıldı. Her kuyuya 10×10^3 L929 hücresi 100 µl besiyeri içinde ekildi ve 37 °C'de %5 CO₂'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, yaklaşık %75 konfluense ulaşan hücrelerin besiyeri madde eklemeyen hemen önce uzaklaştırıldı. Belirlenen kuyulara DMEM içerisinde seri dilüsyon yapılarak hazırlanmış farklı dozlarda (%1, %0,1, %0,01 ve %0,001) numune içeren süspansiyonlar 100 µl hacimde eklendi. Hiç madde eklenmeyen sadece hücre içeren kuyular negatif kontrol (hücre kontrol), sadece besiyeri içeren hücre ve madde içermeyen kuyular (blank: medyum kontrol) ve sadece madde içeren hücre içermeyen kuyular (madde kontrol) kontrol grupları olarak belirlendi. Her bir madde için 24 saat, 48 saat ve 72 saat olacak şekilde 3 farklı zaman diliminde 37 °C'de %5 CO₂'li ve % 95 nemlendirilmiş etüvde hücreler inkübe edildi. İnkübasyonlardan sonra hücrelerin ters mikroskop ile x10 (Şekil 17) büyütmede morfolojik incelemeleri yapıldı. Sonrasında XTT kiti ile hücre proliferasyon testi yapıldı. XTT solüsyonu kit protokolüne göre bir adet 96 kuyulu plak için 5 ml solüsyon A (XTT solüsyonu) ile 100 µl solüsyon B (aktivatör solüsyonu) karıştırılarak steril ortamda hazırlandı. Her bir kuyuya XTT solüsyonu (50 µl/kuyu) eklendi. Plaklar 37 °C'de en az 4-5 saat bekletildi. İnkübasyon sonrasında, kromojenik ürünün 460 nm (referans dalga boyu 650 nm) dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) ile optik yoğunluğu (OD: *Optical density*) ölçüldü. Her bir test

materyalinin her bir dilüsyonu için 10 kuyucuk kullanıldı ve deneyler iki kez tekrarlandı.



Resim 4: Ters ışık mikroskobu

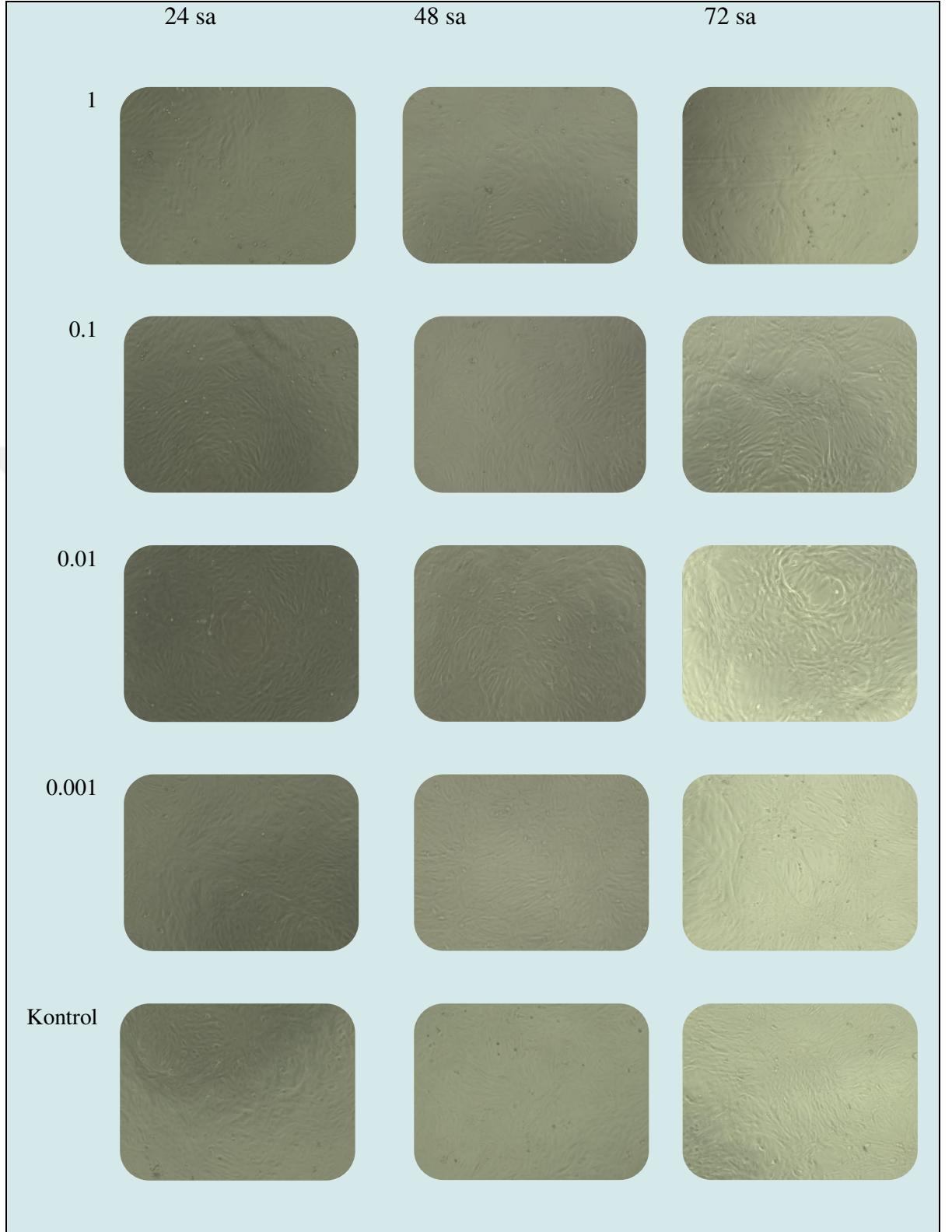


Resim 5: Hücre deneyleri için steril ortam sağlayan biyogüvenlik kabini

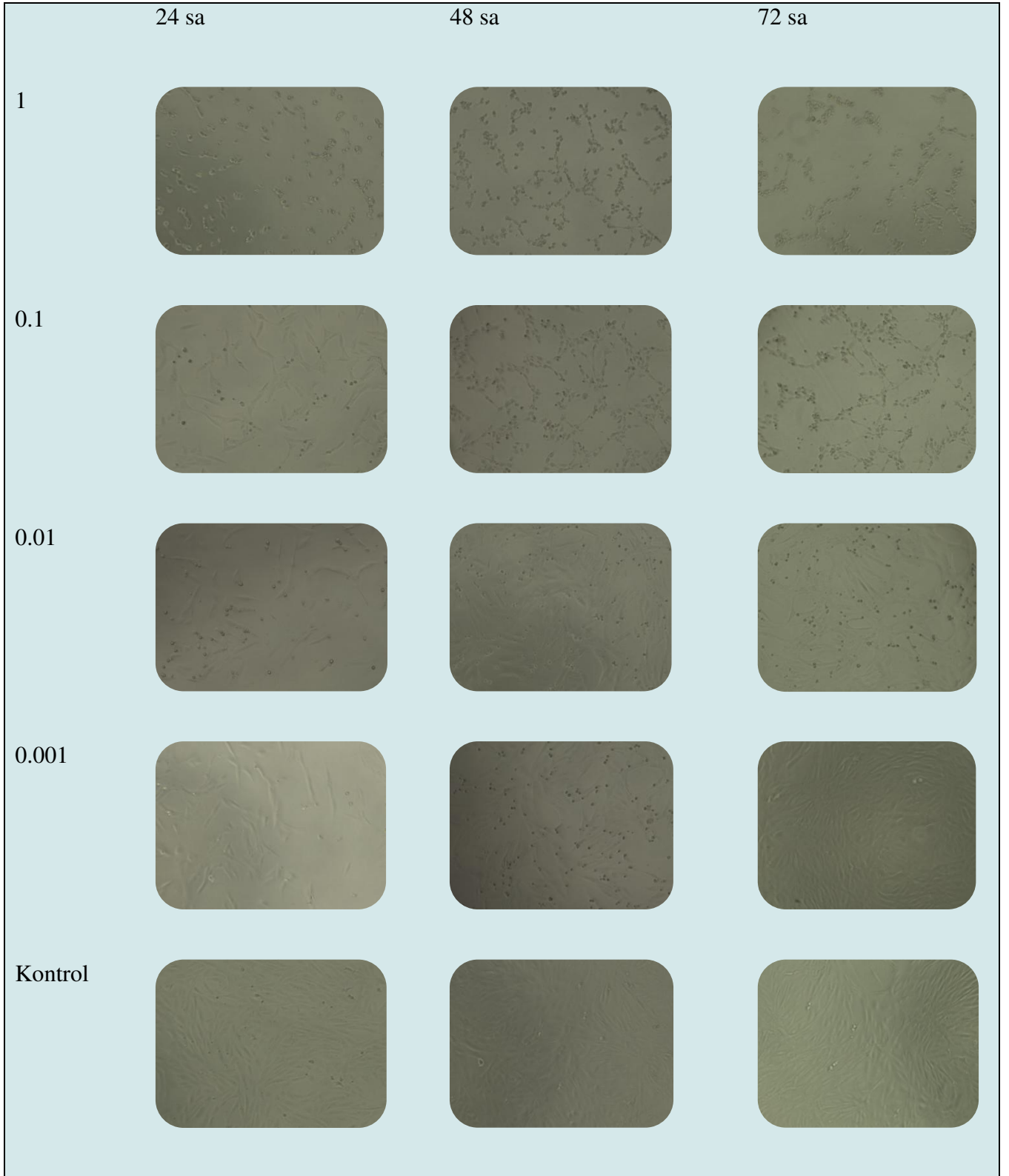
Test Materyallerinin Doz ve İnkübasyon Sürelerine Bağlı Olarak L929 Hücrelerinin Morfolojisi Üzerindeki Etkilerine Ait Bulgular

Çalışmamızda test edilen beş farklı dental adeziv L929 hücreleri ile dört farklı dilüsyonda (%0.001, %0.01, %0.1 ve % 1) ve üç farklı inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) sonundaki sitotoksik aktiviteleri tespit edildi. . XTT testi için oluşturulan mikropaklar, bu teste tabi tutulmadan önce İnkübasyonlardan sonra hücrelerin ters mikroskop ile x10 büyütmede morfolojik incelemeleri yapıldı. (Resim 6-10) Sonrasında XTT kiti ile hücre proliferasyon testi yapıldı.

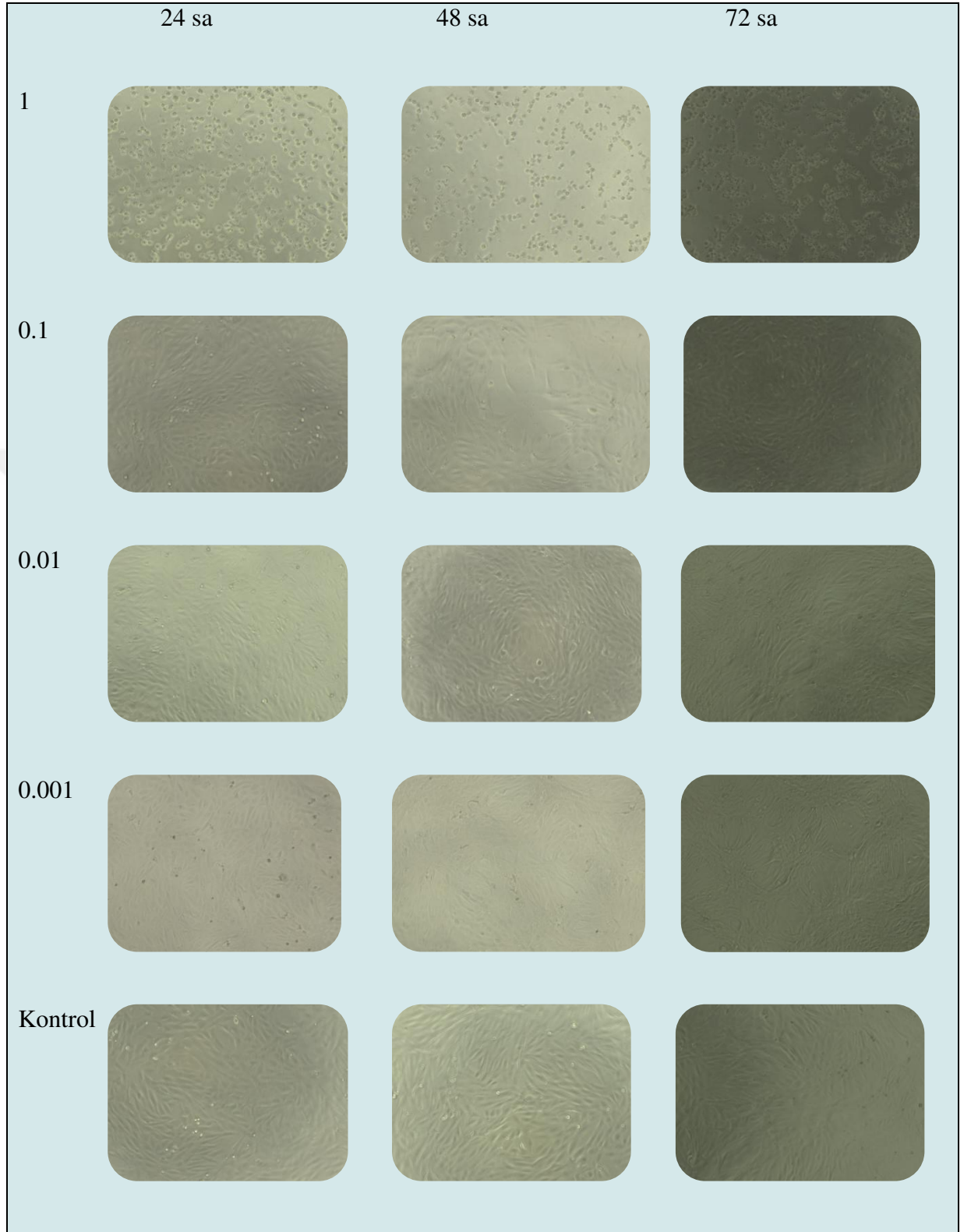




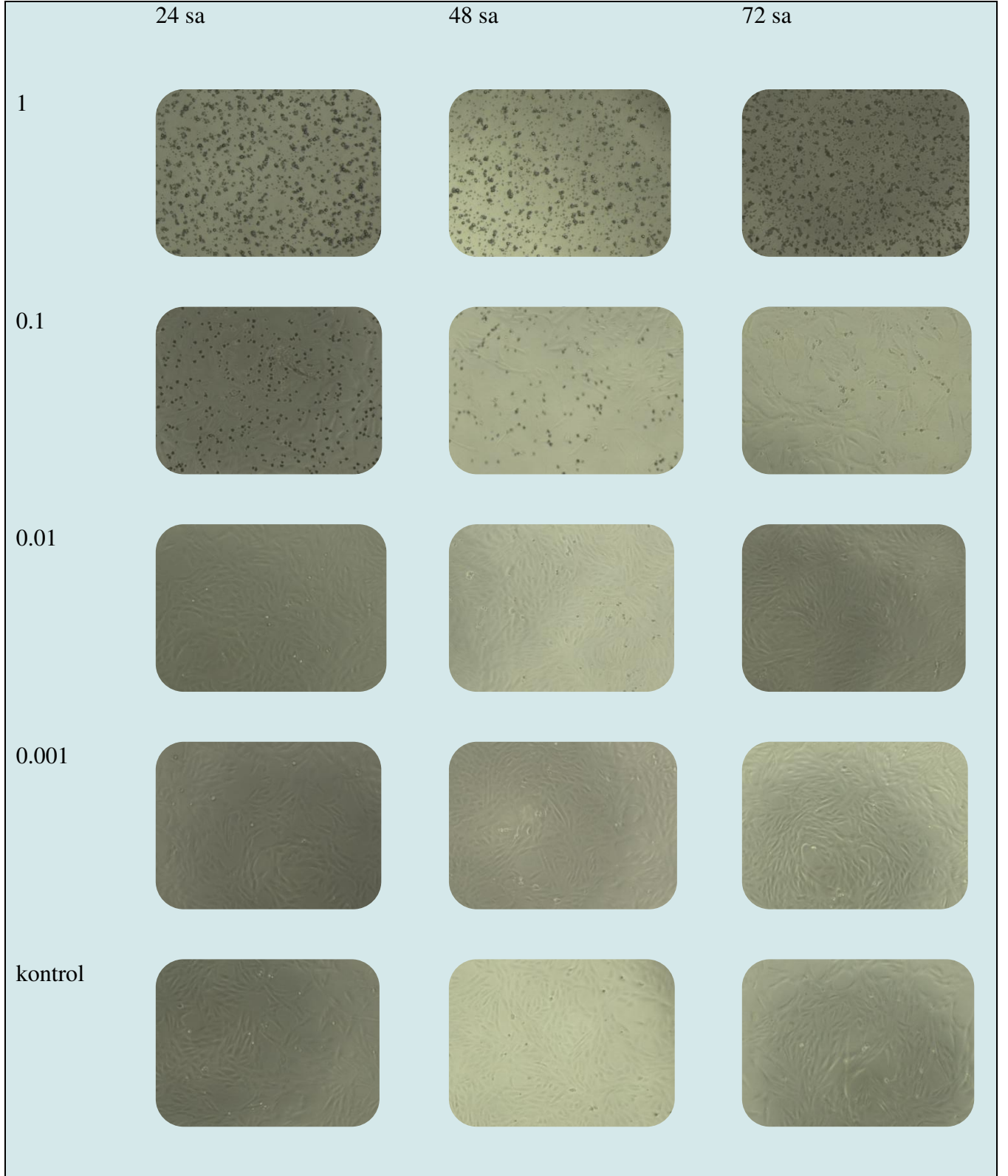
Resim 6. Gluma self etch ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



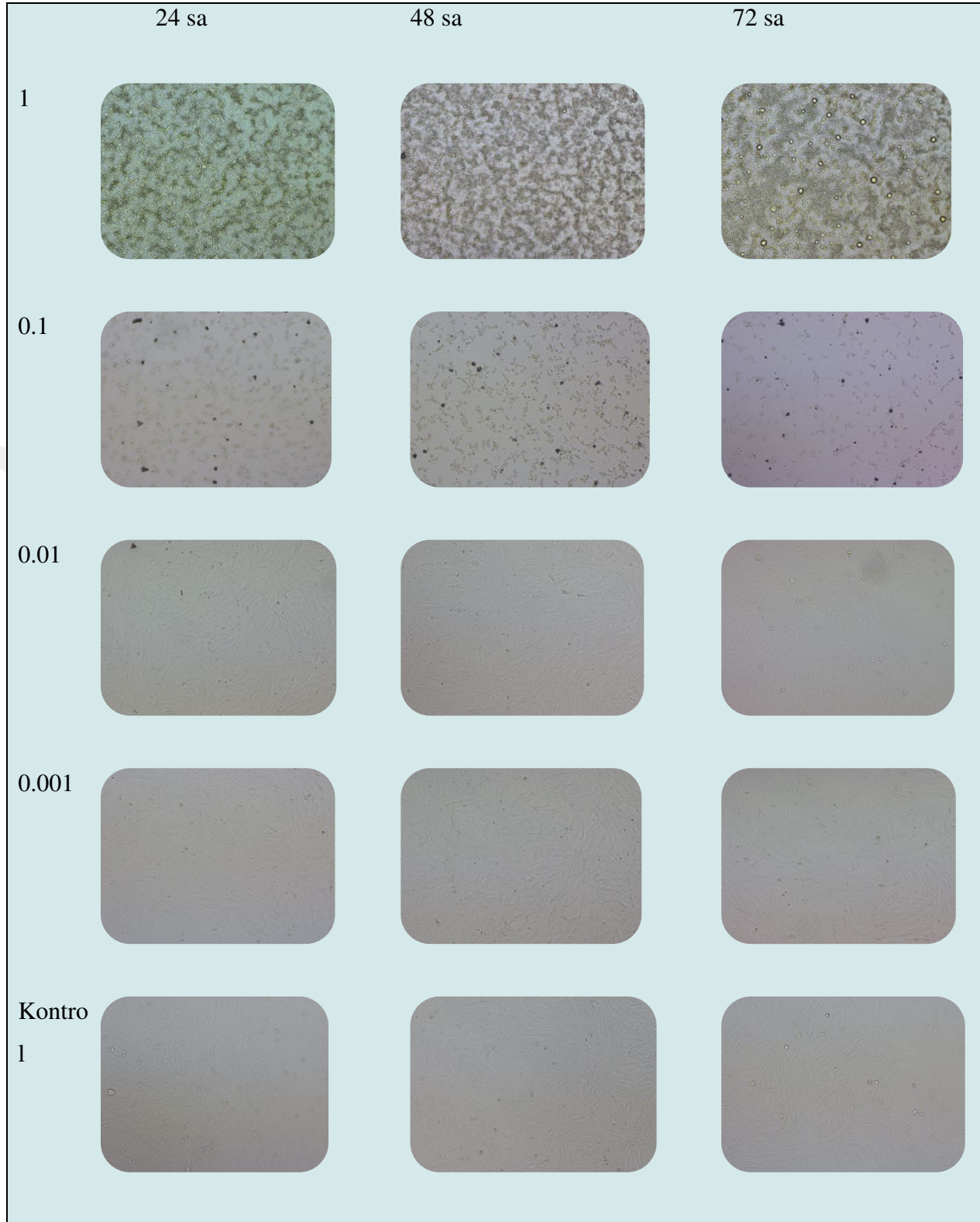
Resim 7. Peak universal ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.



Resim 8. Gluma 2 bond ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



Resim 9. Clearfil SE bond ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



Resim 10. Clearfil SE Protect ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişimler.

İstatistiksel Analiz:

Uygulanan test materyallerinin farklı doz ve inkübasyon sürelerinin, hücre canlılığına etkisini değerlendirilmek amacıyla, tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi uygulandı. Anlamlı bulunan gruplarda, etkinin hangi etken ve etkileşim grubundan kaynakladığının belirlenmesi için, Bonferoni post-testi uygulandı ($p=0.05$).



4. BULGULAR

Çalışmamızda 3 tanesi antibakteriyel etkiye sahip (Gluma 2 Bond/gluteraldehit, Clearfil SE Protect/MDPB ve Peak Universal Bond/klorheksidin) ve benzer kompozisyona sahip fakat antibakteriyel içeriği olmayan 2 bond (Gluma Self Etch ve Clearfil SE Bond) sitotoksiteleri XTT testi ile değerlendirildi.

1.XTT Testine Ait Bulgular

Test materyallerinin in-vitro sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hücre canlılığını belirleyen yöntemlerden biri olan XTT testi uygulanmıştır. Bu amaçla L929 fare fibroblast hücreleri test materyallerinin 4 farklı dozu (%0.001, %0.01, %0.1 ve %1) ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Test materyallerinin doz ve inkübasyon süresi sonucu elde edilen canlılık değerlerinin (%) ortalamaları standart sapmalarıyla birlikte Tablo 2’de gösterilmiştir.

Uygulanan test materyalinin dozu ve inkübasyon süresinin hücre canlılıklarına etkisinin değerlendirilmesi için iki yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Anlamlı bulunan gruplarda etkinin hangi etken ve etkileşim grubundan kaynakladığının belirlenmesi için de Bonferoni post-test uygulanmıştır. XTT testine ait istatistiksel değerlendirmeleri gösteren veriler Tablo 3 ve 4’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Test materyallerinin L929 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık değerleri

MATERYALLE		İNKÜBASYON SÜRELERİ		
R	DOZ	24 saat	48 saat	72 saat
Gluma Self Etch	Kontrol	100,00±4,62	100,00±3,08	100,00±3,82
	%0.001	100,29±11,54	95,36±3,48	94,12±3,46
	%0.01	95,82±8,11	90,72±4,99	80,47±4,67
	%0.1	99,90±5,37	86,60±4,71	75,87±4,07
	%1	103,19±3,53	91,42±3,94	78,03±4,69
Peak Universal	Kontrol	100,00±8,85	100,00±6,63	100,00±6,71
	%0.001	76,27±16,81	61,80±28,10	90,10±33,34
	%0.01	65,94±9,60	55,25±26,73	68,89±33,66
	%0.1	74,07±10,93	7,67±4,31	14,22±24,76
	%1	19,09±7,70	9,38±5,87	6,08±1,43
Gluma 2 Bond	Kontrol	100,00±8,28	100,00±11,06	100,00±14,18
	%0.001	137,36±20,24	124,12±16,03	128,23±17,25
	%0.01	138,28±17,21	121,10±11,18	129,30±7,49
	%0.1	138,63±17,25	118,81±14,23	124,99±11,42
	%1	29,45±4,74	8,12±1,45	6,43±1,40
Clearfil SE Bond	Kontrol	100,00±20,97	100,00±14,15	100,00±16,92
	%0.001	102,49±19,68	117,47±14,51	116,06±17,56
	%0.01	88,35±8,86	107,90±20,60	116,60±13,62
	%0.1	84,00±15,07	88,38±35,34	101,48±15,18
	%1	4,82±1,04	6,09±2,10	4,81±0,91
ClearfilProtect	Kontrol	100,00±8,28	100,00±8,95	100,00±7,06
	Bond %0.001	95,64±5,26	98,69±6,28	98,35±7,73
	%0.01	99,07±7,80	92,54±5,76	102,58±8,46
	%0.1	2,02±0,94	2,55±0,84	0,81±0,71
	%1	3,77±1,86	3,53±2,75	1,09±1,01

Tablo 3. XTT testi sonuçlarına ait iki yönlü varyans analizi tablosu

Değişkenlere ait kaynak	Df	SS	MS	F	p
Gluma Self Etch					
Zaman x Doz	8	5006	625,8	20,33	< 0.0001***
Zaman	2	10000	5000	162,5	< 0.0001***
Doz	4	6775	1694	67,70	< 0.0001***
Hata (Residual)	95	2377	25,02	0,8130	
Peak Universal					
Zaman x Doz	8	44850	5607	18,22	< 0.0001***
Zaman	2	20590	10300	33,45	< 0.0001***
Doz	4	296800	74190	180,1	< 0.0001***
Hata (Residual)	95	39130	411,9	1,338	
Gluma 2 Bond					
Zaman x Doz	8	4780	597,5	4,349	< 0.0001***
Zaman	2	11220	5612	40,85	< 0.0001***
Doz	4	588100	147000	669,1	< 0.0001***
Hata (Residual)	95	20870	219,7	1,600	
Clearfil SE Bond					
Zaman x Doz	8	7112	889,1	3,109	0,0025**
Zaman	2	7329	3665	12,82	< 0.0001***
Doz	4	461900	115500	420,3	< 0.0001***
Hata (Residual)	95	26100	274,7	0,9607	
ClearfilProtect Bond					
Zaman x Doz	8	1209	151,2	4,499	< 0.0001***
Zaman	2	61,48	30,74	0,9150	0,4023
Doz	4	667200	166800	5187	< 0.0001***
Hata (Residual)	95	3055	32,16	0,9573	

Df (degrees of freedom): serbestlik derecesi, SS(Sum-of-squares), MS (Meansquare), F (F value): F değeri, p: anlamlılık düzeyi (***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.01$, *: $P < 0.05$ değerlerinde veriler anlamlı, $P > 0.05$ değerlerinde veriler istatistiksel olarak anlamlı değildir.).

Tablo 4. XTT testi sonuçlarına ait Bonferroni testi tablosu

ETKİLEŞİM GRUPLARI	Gluma self etch		Peak Universal		Gluma 2 Bond		Clearfil SE Bond		ClearfilProtect Bond	
	T	P	t	P	t	P	t	P	t	P
Kontrol/ %0,001										
24saat	0,1719	P > 0.05	4,054	P<0.001***	9,201	P<0.001***	0,4681	P > 0.05	2,398	P > 0.05
48saat	2,730	P < 0.05*	6,527	P<0.001***	5,940	P<0.001***	3,289	P<0.01**	0,7237	P > 0.05
72saat	3,463	P<0.01**	1,692	P > 0.05	6,079	P<0.001***	3,023	P<0.01**	0,9037	P > 0.05
Kontrol/%0,01										
24saat	2,463	P < 0.05*	5,821	P<0.001***	9,428	P<0.001***	2,193	P > 0.05	0,5132	P > 0.05
48saat	5,461	P<0.001***	7,646	P<0.001***	5,198	P<0.001***	1,487	P > 0.05	4,100	P<0.01**
72saat	11,50	P<0.001***	5,316	P<0.001***	8,038	P<0.001***	3,124	P<0.01**	1,421	P > 0.05
Kontrol/%0,1										
24saat	0,06122	P > 0.05	4,431	P<0.001***	9,516	P<0.001***	3,012	P<0.01**	53,84	P<0.001***
48saat	7,891	P<0.001***	15,78	P<0.001***	4,634	P<0.001***	2,187	P > 0.05	53,55	P<0.001***
72saat	14,21	P<0.001***	14,66	P<0.001***	6,154	P<0.001***	0,2782	P > 0.05	54,51	P<0.001***
Kontrol/%1										
24saat	1,879	P > 0.05	13,82	P<0.001***	17,38	P<0.001***	17,92	P<0.001***	52,88	P<0.001***
48saat	5,053	P<0.001***	15,48	P<0.001***	22,63	P<0.001***	17,68	P<0.001***	53,01	P<0.001***
72saat	12,94	P<0.001***	16,05	P<0.001***	23,05	P<0.001***	17,92	P<0.001***	54,35	P<0.001***
%0,001/%0,01										
24saat	2,635	P < 0.05*	1,766	P > 0.05	0,2267	P > 0.05	2,662	P < 0.05*	1,885	P > 0.05
48saat	2,732	P < 0.05*	1,119	P > 0.05	0,7425	P > 0.05	1,803	P > 0.05	3,376	P<0.01**
72saat	8,037	P<0.001***	3,623	P<0.01**	1,960	P > 0.05	0,1015	P > 0.05	2,324	P > 0.05
%0,001 vs %0,1										
24saat	0,2331	P > 0.05	0,3772	P > 0.05	0,3147	P > 0.05	3,480	P<0.01**	51,44	P<0.001***
48saat	5,162	P<0.001***	9,248	P<0.001***	1,306	P > 0.05	5,476	P<0.001***	52,83	P<0.001***
72saat	10,74	P<0.001***	12,96	P<0.001***	0,07562	P > 0.05	2,745	P < 0.05*	53,60	P<0.001***
%0,001 vs %1										
24saat	1,707	P > 0.05	9,770	P<0.001***	26,58	P<0.001***	18,39	P<0.001***	50,48	P<0.001***
48saat	2,324	P > 0.05	8,957	P<0.001***	28,57	P<0.001***	20,97	P<0.001***	52,29	P<0.001***
72saat	9,472	P<0.001***	14,36	P<0.001***	29,13	P<0.001***	20,94	P<0.001***	53,45	P<0.001***
%0,01 vs %0,1										
24saat	2,402	P > 0.05	1,389	P > 0.05	0,08794	P > 0.05	0,8187	P > 0.05	53,33	P<0.001***
48saat	2,430	P < 0.05*	8,129	P<0.001***	0,5638	P > 0.05	3,674	P<0.001***	49,45	P<0.001***
72saat	2,705	P < 0.05*	9,341	P<0.001***	1,884	P > 0.05	2,846	P < 0.05*	55,93	P<0.001***
%0,01 vs %1										
24saat	4,342	P < 0.05*	8,004	P<0.001***	26,81	P<0.001***	15,72	P<0.001***	52,37	P<0.001***
48saat	0,4080	P > 0.05	7,838	P<0.001***	27,83	P<0.001***	19,16	P<0.001***	48,91	P<0.001***
72saat	1,435	P > 0.05	10,73	P<0.001***	31,09	P<0.001***	21,04	P<0.001***	55,77	P<0.001***
%0,1 vs %1										
24saat	1,940	P > 0.05	9,393	P<0.001***	26,89	P<0.001***	14,91	P<0.001***	0,9628	P > 0.05
48saat	2,838	P < 0.05*	0,2909	P > 0.05	27,27	P<0.001***	15,49	P<0.001***	0,5396	P > 0.05
72saat	1,270	P > 0.05	1,392	P > 0.05	29,20	P<0.001***	18,20	P<0.001***	0,1555	P > 0.05

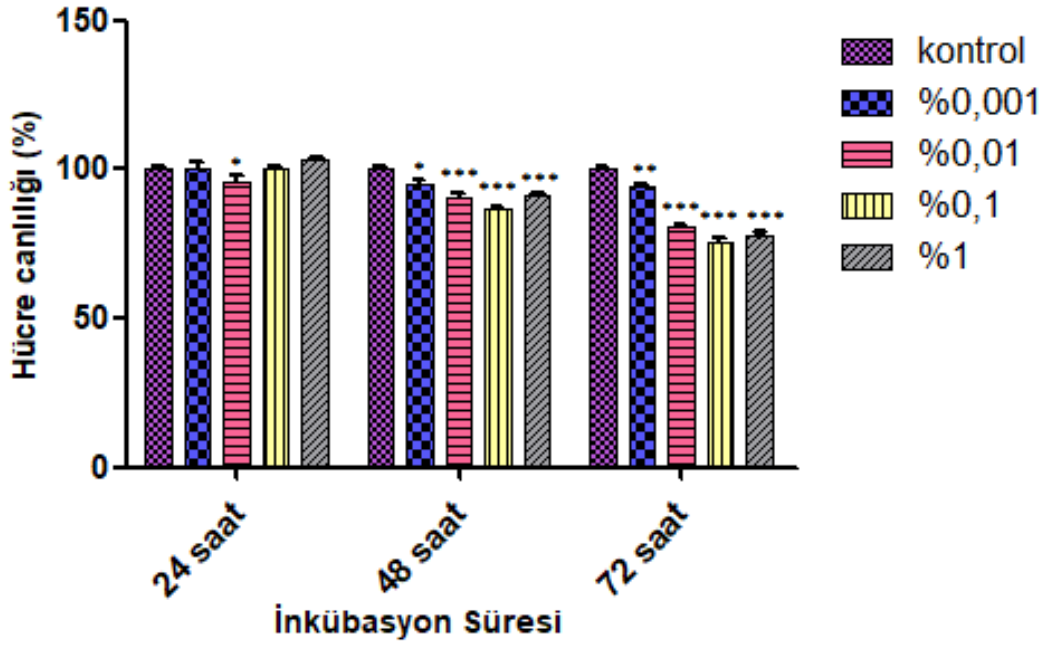
t (t value): t değeri, p: anlamlılık düzeyi (***: p<0.0001, **: p<0.01, *: P < 0.05* değerlerinde veriler anlamlı, P > 0.05 değerlerinde veriler istatistiksel olarak anlamlı değildir).

Test materyallerinin her birinin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisi **Grafik 1-5** arasındaki; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda doz bağımlı etkisi ise **Grafik 6-8** arasındaki grafiklerde gösterilmiştir.

“**Gluma self etch**”e ait XTT verileri iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de dozinkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P<0.001^{***}$) olduğu görülmektedir. **Gluma self etch** ile muamele edilen L929 hücrelerinde doz ve inkübasyon süresindeki artışın % canlılık oranını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı görülmektedir. Ancak bununla birlikte denenen en yüksek dozda bile hiçbir inkübasyon süresinde hücre canlılığının %50’nin altına düşmemiş olması gluma self etchnin toksik etkisinin oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan Bonferoni analizinde ise,

24 saatlik inkübasyonda, doz grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz arttıkça canlılığın önemli ölçüde azalmadığı görülmektedir.

48 saatlik ve 72 saatlik inkübasyonda materyalin yalnızca yüksek dozlarının hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı görülürken, %0,01 dozdan itibaren doz arttıkça hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmektedir.



Grafik 1. Gluma Self Etch’ nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

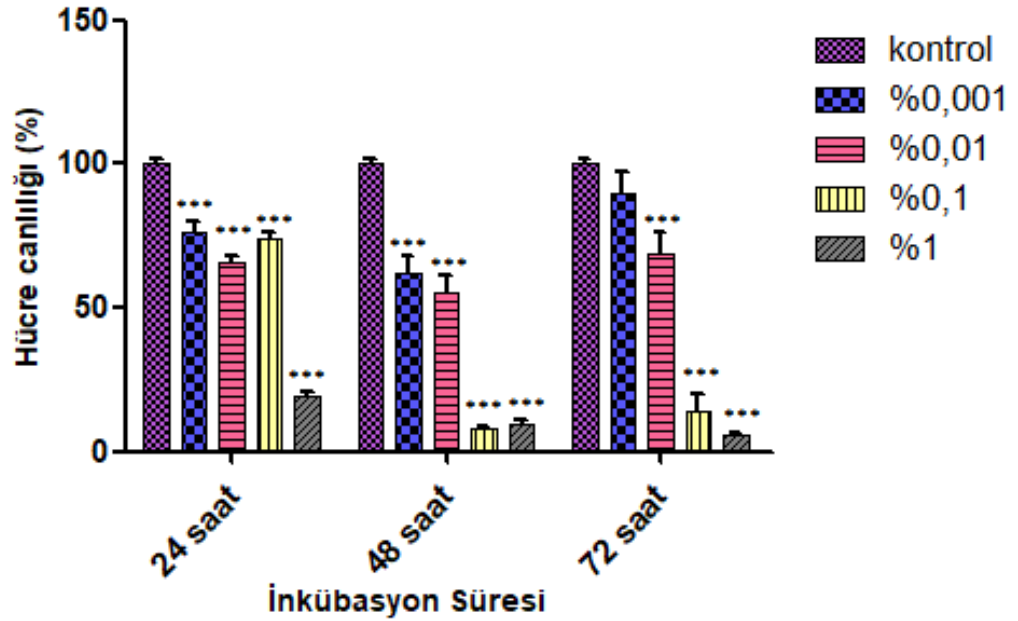
“PeakUniversal”e ait XTT verileri iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P < 0.001^{***}$) olduğu görülmektedir. Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan Bonferoni analizinde ise,

Tüm inkübasyon süreleri için, denenen tüm dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir ($P < 0.001^{***}$).

24 saatlik inkübasyonda yalnızca en yüksek dozlar olan %0,1 ve %1 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülürken, düşük dozlara gidildikçe hücre canlılığının önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir.

48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde ise %0,01 ve %0,1 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülürken, gerek %0,001/%0,01, gerekse %0,1/%1 doz grupları arasında hücre canlılığının önemli ölçüde değişmediği görülmektedir.

Ayrıca yüksek dozlar olan %0,1 ve %1 dozlarında inkübasyon süresindeki artışın canlılığı önemli ölçüde azalttığı görülürken düşük dozlarda inkübasyon süresindeki artış ile hücre canlılığındaki azalmanın paralel olmadığı görülmüştür.

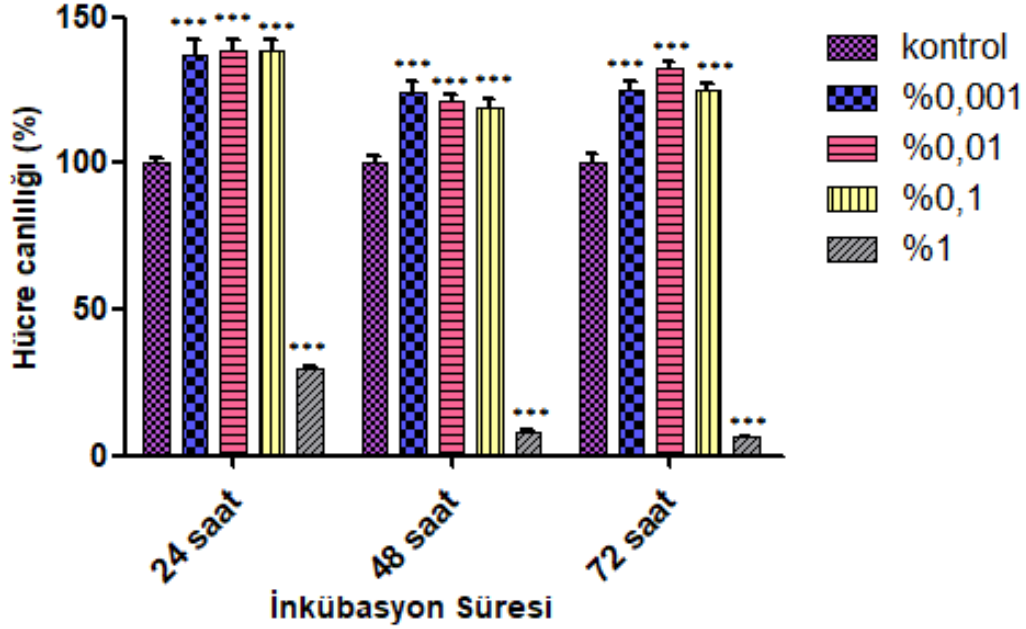


Grafik 2. Peak Universal’ ın L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

“Gluma 2 Bond”a ait XTT verileri iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P < 0.001^{***}$) olduğu görülmektedir. Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan Bonferoni analizinde ise,

24 saatlik, 48 saatlik ve 72 saatlik inkübasyonda, doz grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz arttıkça canlılığın önemli ölçüde azalmadığı görülmektedir. Materyalin yalnızca en yüksek doz olan %1 konsantrasyonda hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı, bu azalmanın zaman bağımlı olarak arttığı görülmektedir. %0,1 dozdan itibaren hücre

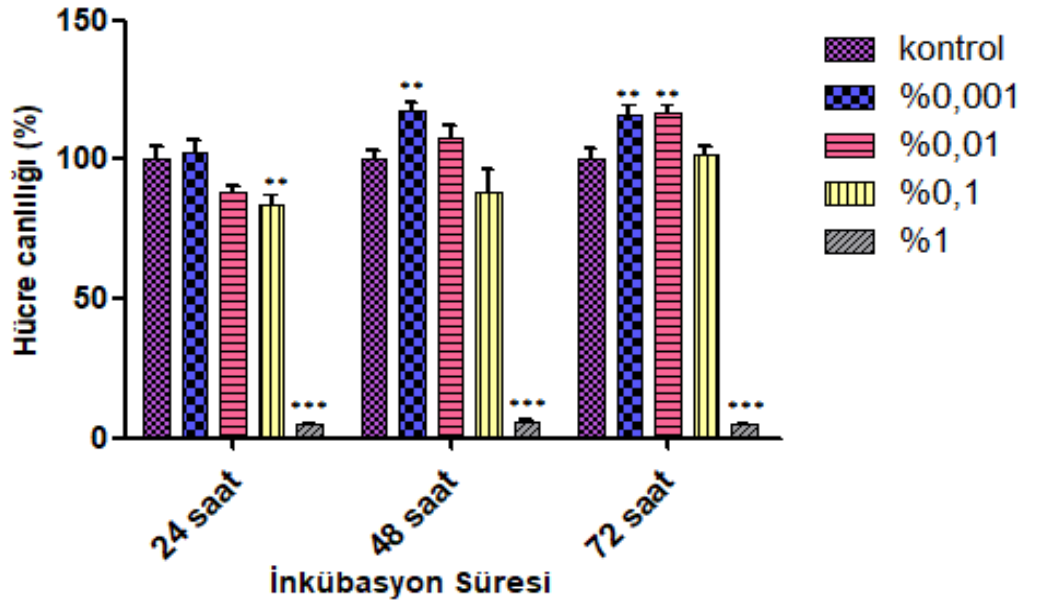
canlılığının azalmadığı hatta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı da dikkat çekmektedir.



Grafik 3. Gluma 2 Bond' un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

"ClearfilSEBond"a ait XTT verileri iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri arasında yüksek ölçüde anlamlı farklılık ($P<0.001^{***}$) görülürken, doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında daha düşük düzeyde de olsa anlamlı farklılık ($P<0.05^{**}$) olduğu görülmektedir. Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan Bonferoni analizinde ise,

Tüm inkübasyon süreleri için, materyalin denenen en yüksek dozu olan %1 konsantrasyonda kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir ($P<0.001^{***}$). Buna karşın daha materyalin düşük dozlarında kontrole hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel olarak azaltmadığı hatta en düşük iki dozda arttırdığı ($p<0,01$) görülmüştür. Ayrıca hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olan tek doz olan %1 de azalmanın zaman bağımlı olmadığı görülmektedir.

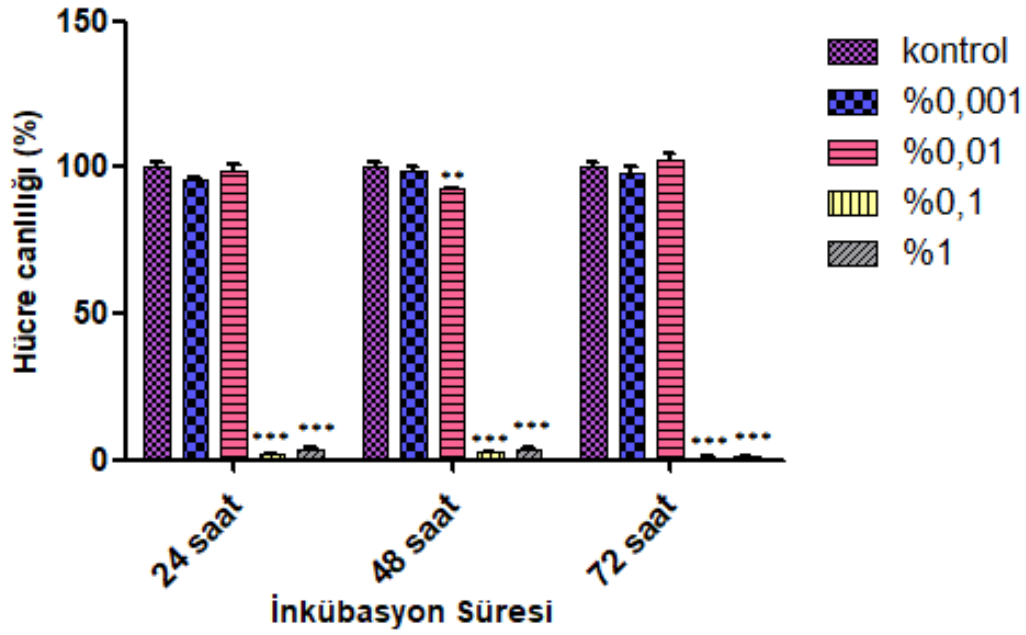


Grafik 4. Clearfil SE Bond' un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

ClearfilProtect Bond'a ait XTT verileri iki yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hücre canlılığında dozlar arasında anlamlı farklılık ($P < 0.001^{***}$) görülürken inkübasyon süreleri arasında anlamlı farklılık ($P = 0,4023$) görülmemiştir. Buna rağmen doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P < 0.001^{***}$) olduğu görülmektedir. Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan Bonferoni analizinde ise,

Tüm inkübasyon süreleri için, yalnızca %1 ve %0,1 dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir ($P < 0.001^{***}$). Ancak bu azalmanın inkübasyon süresi arttıkça artmadığı belirlenmiştir. %1 ve %0,1 dozlarındaki hücre canlılığının ise benzer oranda azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı da görülmüştür.

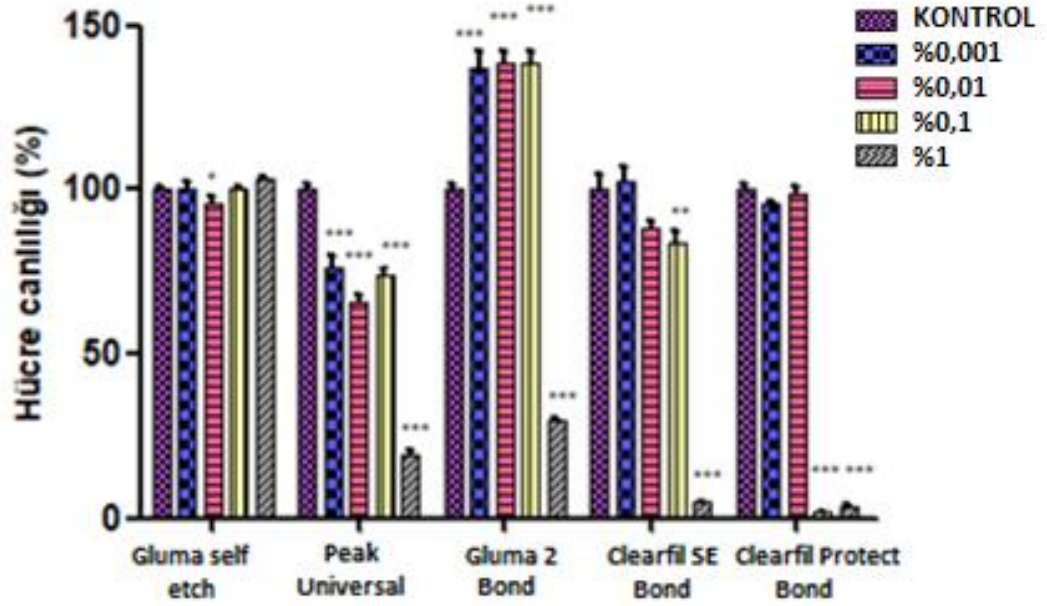
Yine tüm inkübasyon sürelerinde %0,01 ve %0,001 dozların, inkübasyon süresi bağımsız olarak hücre canlılığında hem birbirlerinden hem de kontrolden istatistiksel olarak ($p > 0,05$) anlamlı ölçüde fark yaratmadığı görülmektedir.



Grafik 5. ClearfilProtect Bond'un L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

5 adet adeziv materyalin kendi aralarındaki sitotoksik etkileri zaman bağımlı olarak değerlendirilecek olursa;

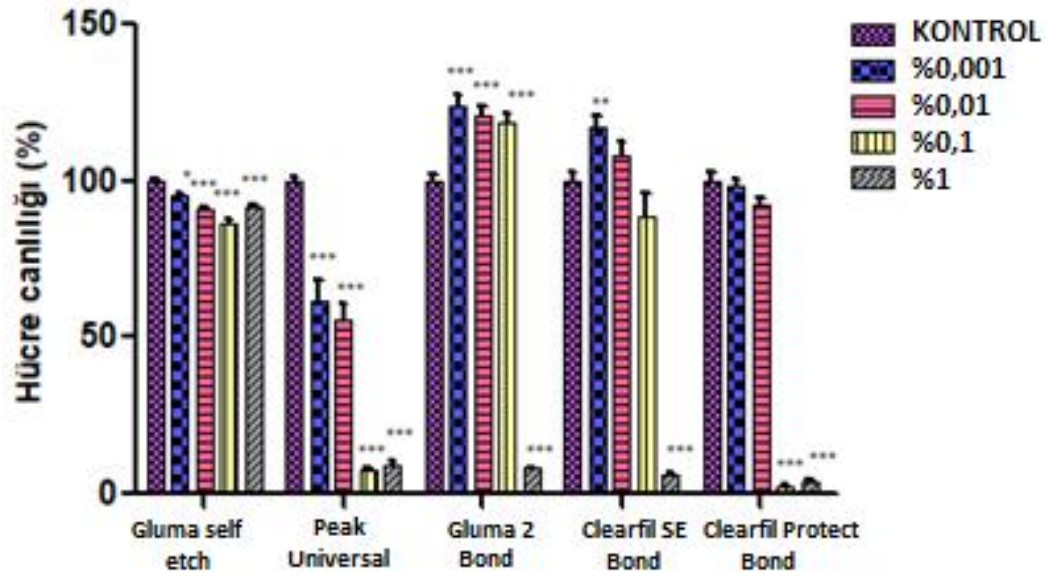
24 saatlik inkübasyonda Clearfil SE Bond ve Clearfil Protect Bond adezivlerinin en yüksek iki konsantrasyonu, Gluma Bondun ise sadece en yüksek konsantrasyonu anlamlı derecede sitotoksikite gösterirken ($p < 0.05$), Gluma Self Etch materyalinin hücreler üzerinde etkisi olmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. Buna karşılık sadece Peak Universal materyalinin ise denenen tüm konsantrasyonlarının anlamlı derecede etkili olduğu ve bu etkinin doz bağımlı olduğu görülmüştür. (Grafik 6)



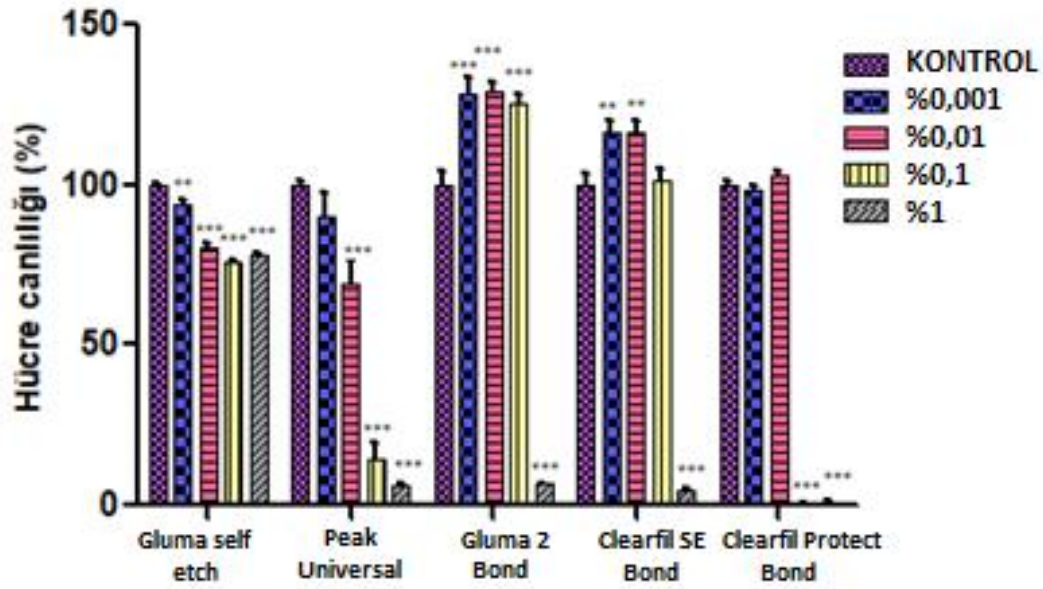
Grafik 6. Test materyallerinin 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik

Hem 48 saatlik ve hem de 72 saatlik inkübasyonda ise sadece Gluma Self Etch ve Peak Universal adezivlerinin doz bağımlı olarak sitotoksik etkiyi artırdığı görülmüştür ($p<0.05$). En düşük %0.001' lik konsantrasyonunda bile sitotoksik etkili olduğu görülen Peak Universal'in ise etki derecesinin yüksek derecede anlamlı olduğu ($p<0.001$), Gluma 2 Bond ve Clearfil SE Bond materyallerinin ise sadece en yüksek konsantrasyonlarının (%1) etkili olduğu görülürken Clearfil Protect Bond materyalinin en yüksek iki konsantrasyonunun (%0.1 ve %1) hem 48 hem de 72 saatlik inkübasyonda kontrole göre yüksek anlamlı fark yarattığı ($p<0.001$) görülmüştür (Grafik 7 ve 8).

Yukardaki bulgular neticesinde; 5 materyalin hem 48 hem de 72 saatlik inkübasyonda anlamlılık dereceleri farklı olmak ile birlikte benzer etkileri olduğu söylenebilir.



Grafik 7. Test materyallerinin 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik



Grafik 8. Test materyallerinin 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik

5. TARTIŞMA

Dişhekimliği alanında kullanılmak üzere günden güne yeni materyallerin üretilip piyasaya sürülmesi, bu materyallerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin incelenip değerlendirilme ihtiyacını ortaya koymaktadır.

Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin özelliklerinin değerlendirilmesinde başvurulacak önemli aşamalardan birisi biyouyumluluktur. Biyouyumluluk materyalin canlı dokular üzerinde toksik, alerjik, genetik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik gibi etkiler meydana getirmemesi durumudur. Biyouyumlu bir materyal canlı dokular üzerinde tamamen etkisiz olmayacağı için, meydana gelebilecek doku reaksiyonları standart ölçülerde belirlenmelidir. Böylece materyallerin biyouyumlulukları birbirleri ile kıyaslanarak doğru bir değerlendirme yapılabilir. Materyalin tipi, bileşenleri, konsantrasyonu, uygulama süresi, uygulandığı bölge ve fonksiyonu gibi biyouyumluluğu etkileyen birçok değişken vardır.

Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin canlı dokuda reaksiyon oluşturan etkilerinden biri olan toksisite, lokal ve sistemik olarak iki şekilde meydana gelebilir. Lokal toksisite dental materyalin uygulandığı bölgeye komşu pulpa, dişeti, alveol kemiği, ağız mukozası gibi canlı dokularda meydana gelirken sistemik toksisite ise ağız ortamına salınan dental materyal veya bileşenlerinin tükürük ya da solunum yoluyla dolaşıma geçmesi ile vücudun diğer canlı dokularında meydana gelir. Bir gün sonunda akut sistemik toksisite, üç ay sonrasında ise kronik sistemik toksisite görülür.

Dental materyaller dört tip alerji reaksiyonundan tip 1 ve tip 4 alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Alerjik reaksiyon meydana getiren doz toksik dozdaki çok daha azdır.

Dental materyal veya bileşenlerinin, hücre DNA' sında hasar meydana getirmesi genetik etkisi ile bu hasarın sonraki hücre nesline aktarılması mutajenik etkisi ile, tümör oluşturma karsinojenik etkisi ile, embriyonun gelişimi esnasındaki oluşturduğu malformasyonlar ise teratojenik etkisi ile meydana gelir.

Dental adezivlerin uygulandığı bölge nedeniyle pulpaya komşu olması ile lokal sitotoksosite, ağız sıvılarıyla dolaşıma karışması ile sistemik sitotoksosite ihtimali bu alanda çalışma yapmayı gerekli kılmaktadır.

Biyouyumluluk test yöntemleri in vitro testler, hayvan testleri, kullanım testleri olarak aşamalara ayrılırken, her birinin birbirine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Her biri reaksiyonları tek bir açıdan değerlendirdiği için tek başına tam doğru sonuç vermesi beklenemez. Genellikle inceleme temel olan invitro test yöntemleriyle başlar, daha maliyetli ve uzun zaman alan hayvan testleri ile devam eder, istenilen sonuçlar elde edildiğinde daha kapsamlı kullanım testleri ile sonuçlanarak genel bir değerlendirme yapılır.

In vitro test yönteminin in vivo ortamla ilişkisi tartışmalı olsa da, hızlı sonuç alınması düşük maliyet, standardize edilebilmesi, deney ortamının kontrol edilebilmesi ve geniş bir skalada değerlendirme yapılabilmesi nedeniyle biyouyumluluk test yöntemleri için temel oluşturan bu yöntem çalışmamızda tercih edilmiştir. Invitro yöntemlerden de sitotoksosite çalışmalarda en çok başvurulan yöntemdir.

In vitro sitotoksosite test yöntemleri içerisinde en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir. Uygulanan test materyalinin kültürdeki hücreyle temas şekillerine göre direkt temas (74)ve ekstrakt testi(75) ya da arada bir bariyerin bulunduğu indirekt temas testi (76) kullanılmaktadır. İndirekt temas testinde, kalan dentin dokusunu taklit eden bir bariyerin kullanılmış olmasının avantajı karşısında, dentin geçirgenliğinin değişkenlik göstermesi, bariyer test düzeneğinin oluşturulmasındaki güçlükler ve maliyet nedeniyle direkt temas testi sıklıkla tercih edilmektedir (75, 76). Bu sebeplerden ve diğer testlere temel oluşturması açısından çalışmamızda direkt temas testi kullanılmıştır.

Materyallerin test edilme aşamalarını standartize etmeye çalışan kurumlar içerisinde en çok başvurulan ISO olmaktadır ve bu nedenle çalışmamızda ISO 7405 (73) ve ISO 10993:5 (57)'da in vitro sitotoksosite testlerinde kullanılması önerilen direkt temas testi kullanılmıştır.

Adeziv sistemler pulpa dokusuyla direkt temas etmemesine karşın, çürüğün temizlenmesi sırasında pulpaya yaklaşılması, dentin tübüllerinin çaplarının giderek artmasına ve dolayısıyla pulpa dokusunun rezin içerikli sistemlerin akut toksik

etkilerine maruz kalmasına neden olmaktadır(6). Bu toksik etki de, pulpa nekrozuna, apoptoza (programlanmış hücre ölümüne) ve sağlıklı pulpa gelişiminin engellenmesine sebebiyet vermektedir(7). Çalışmamızda adeziv sistemlerden elde edilen 1/100, 1/1000, 1/10000 oranlarındaki seri dilüsyonlar hücrelerin inkübe edildikleri kuyucuklara yerleştirilmiş ve test materyali ile hücreler direkt olarak temas ettirilmiştir. Bu sayede dentin geçirgenliğindeki değişiklikler elenmesi ve adeziv materyalinin farklı oranlardaki seri dilüsyonlarının hücreler üzerindeki sitotoksitesinin gözlemlenmesi mümkün olmuştur.

Materyal ekstraktlarının bir diğer avantajı ise, seri dilüsyonlar hazırlanmasıyla doz-cevap ilişkisinin gözlemlenebilmesi ve hücreler üzerindeki ideal konsantrasyonun belirlenmesine yardımcı olmasıdır(77).

Direkt temas testinde, hücre ve materyalin direkt teması, klinik uygulamalara kıyasla daha yüksek değerlerde sitotoksik etki ortaya koyabilmesine karşın, bu yöntem tarama ve değerlendirme testleri olarak kabul görmektedir (44).

İn vitro hücre kültürü testinde hücre tipi seçimi önemli bir faktördür(57). Çalışmalarda devamlı hücre hatları HELA, 3T3 ve L 929 hücreleri ve primer/diploid hücre hatları olan gingival, mukozal ve pulpal fibroblastlar kullanılmaktadır (53). Dental adezivin uygulandığı bölgedeki pulpa dokusundaki reaksiyonlar araştırıldığı için, pulpanın esas hücreleri olan fibroblastlar ya da odontoblastlar bu çalışmalar için en uygun hücre tipleridir (78, 79)<ç. Diş pulpası kök hücrelerinin kolayca temin edilebilmesi ve deneyler için gerekli hücre sayısına ulaşılabilmesinden dolayı sıklıkla kullanılabilir. Shafei ve arkadaşları rezinlerin sitotoksik etkilerini incelemek için pulpa fibroblastlarını ve diş pulpası kök hücrelerini kullandıklarında pulpa fibroblastlarının daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşmışlardır (54) Bu nedenle çalışmamızda L929 fare fibroblast hücreleri (80) kullanılmış ve test materyalinin diş pulpası hücreleri üzerindeki etkisine yakın ve hassas sonuçlar elde edilmesi hedeflenmiştir.

Hücre kültürü çoğaltılması ya da ticari yoldan temin edilebilen devamlı hücre hatları, ideal ortam oluşturulması durumunda devamlı üreme potansiyeline sahip olabilmektedir(53) fakat primer hücre hatları yavaş ürerler ve yaşam süreleri kısıtlıdır(44). Ayrıca primer hücre hatları esas doku hücrelerine benzemeleri sebebiyle, spesifik metabolik cevap olarak canlı organizmaya en yakın ortam

oluşturulabilmektedir(55). Bu sebeple çalışmamızda primer hücre hatları kullanılmıştır.

Farklı organizmalardan aynı tür doku hücreleri üzerinde çalışılmasına rağmen hücre kültürü ortamında farklı reaksiyonlar alınabilmektedir. Moule ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada, pulpa fibroblast hücrelerinin, proliferatif aktiviteleri sırasında yüksek değerde çeşitlilik olduğunu görmüşlerdir. Bu çeşitliliğin bireyin yaşı, elde edilen dokunun kaynağı ve pasaj sayısı ile ilgili olmadığını bildirmişlerdir (81). Bu sorunlar karşısında çözüm olarak diğer hücre dizinleri kullanılabilir fakat bu hücreler orijinal doku hücresine benzemediği için, spesifik metabolik cevap oluşturmalarının güç olabileceği belirtilmiştir. Bu sebeple, çalışmamızda orijinal dokuya benzeri primer fibroblast hücre hatlarının kullanımı tercih edilmiştir.

Test materyallerinin hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları, kalan canlı hücrelerin sayısının belirlenmesi, hücrelerin proliferasyon oranlarının tespiti ve hücrelerdeki moleküler sentez veya enzim aktivitesinin incelenmesidir(71).

Hücre kültüründe kalan canlı hücre sayısını belirlenmesinde, membran bütünlüğü bozulması sonucu hücre içine giren tripan mavisi, eritrosin, naftalin siyahı veya membran bütünlüğü bozulmadan hücre içine girebilen diasetil florasan, nötral kırmızı gibi boyar maddeler kullanılmaktadır. Hücre canlılığının belirlenmesinde metabolik aktiviteyi baz alan testlerin başında; MTT, LDH ve Alamar mavisi tesleri gelmektedir. Günümüzde oldukça popüler bu testler hücre metabolizmasındaki değişimleri ayırt edebilir. Yüksek hassasiyeti, ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle öne çıkan MTT testi sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez niteliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmelidir. (Martın ve Clynes,1983) tarafından, MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir.(141)

Çözücü olarak tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksiktir ve bu da test güvenilirliğini azaltmaktadır.(168) Ayrıca çözdürmek için yapılan pipetleme esnasında formazan kristallerinin zarar görmesi de test hassasiyetini düşürür.(172) XTT testinde ise, ek bir çözdürme işlemine gerek duyulmamasının yanında, deney

süresince çeşitli zamanlarda absorbansın kaydedilmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede canlılığın değerlendirilmesi hakkında daha detaylı ve hücre sayısı hakkında MTT testine nazaran daha hassas bilgi sunarlar.(163, 167) Bu nedenle çalışmamızda sitotoksikite değerlendirmesinde XTT testi kullanılmıştır.

Dental adeziv sistemlerinin sitotoksik etkilerinin değişkenlik göstermesinde, materyalin uygulandığı bölge, dentin kalınlığı, konsantrasyon oranı, temas şekli ve temas ettiği süre, içeriğindeki bileşenler ve birbirleri ile etkileri, konak savunması gibi çok etken rol oynamaktadır.

Li ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada (2013); beş farklı adeziv materyalin (Super-Bond, Clearfil SE Bond, G-Bond, Single Bond 2, ve Adper Easy One), farklı konsantrasyonlarının (%100, %50 ve %25), farklı zaman periyotlarında (24, 48 ve 72 saat) insan periodontal ligament hücreleri (HPDLCs) üzerine sitotoksik etkilerini MTT testi ile değerlendirmiştir. Kullanılan materyallerin sitotoksik etkilerini; Super Bond<Clearfil SE Bond<G-Bond<Adper Easy One<Single Bond2 şeklinde açıklamışlardır. Adezivlerin sitotoksik etkilerinin farklı konsantrasyonlardan (%25 < %50 < %100) ve uygulama zamanlarından (24 < 48 < 72 saat) etkilendiğini belirtmişlerdir. 24 ve 48 saatlik süreçlerin sonuçları arasında anlamlı bir farklılık ($P<0.05$) tespit etmişlerdir. 48 ile 72 saatlik süreçlerin sonuçları arasında ise anlamlı bir farklılık görülmediğini ($P>0.05$) rapor etmişlerdir (147).

Chen ve arkadaşları 1/1000, 1/2000 ve 1/4000 oranlarında kullandıkları dentin bağlayıcı sistemlerin pulpa fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada 1/1000 oranındaki dilüsyonlarda sitotoksik etkiyi en yüksek değerde bulmuşlardır. Ayrıca monomerlerin birbiriyle etkileşimlerini de farklı pulpa reaksiyonlarını açıklayabileceğini belirtmişlerdir. Operatif işlemler, kalan dentin kalınlığı ve dentin geçirgenliğine bağlı olarak pulpal yanıtın değişebileceğini bildirmişlerdir (88). Dentin bariyer testleri ile yapılan in-vitro sitotoksikite çalışmalarının sonucunda; $>500\mu\text{m}$ dentin tabakası varlığının, pulpayı korumak için yeterli olduğu ve düşük pH'ya sahip sistemlerin pulpa hasarı oluşturmadığı kanaatine varılmıştır. Dentin kalınlığının yeterli olduğu sık kavitelere ya da dentin geçirgenliğinin azaldığı sklerotik dentine sahip kavitelere risk oluşmazken; dentin tübüllerinin yoğun ve geniş çaplı olduğu pulpaya yakın kavitelere risklerde

artmaktadır. Yapılan bazı araştırmalarda, derin kavitelere total-etching adeziv uygulanmasının, insan pulpasında kronik inflamasyon ve granülamatöz reaksiyon ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Self-etch adeziv sistemlerin, pulpaya doğru polimerize olmamış monomerlerin difüzyonunu sınırlayan smear tabakası ve tıkaçlarını bırakması dolayısıyla; genç, derin ve geçirgen dentinde kullanılmaları tavsiye edilmiştir. Adeziv ajanların ince olması ve polimerizasyonun oksijen ile inhibisyonu klinik önem arzeder. Işık düzeyinin yetersizliğine bağlı olarak rezin tagların derin bölgelerinde ve nemli dentin ortamında, monomer dönüşümü tam olarak gerçekteşememektedir. Genel olarak, iyi bir polimerizasyonun biyolojik riskin azalmasına sebep olduğu düşünölmektedir. Monomerlerin polimerlere %100 dönüşümü teorik olarak mümkün olmakla birlikte, metakrilat monomerlerin çift bağlarının %25-50'sinin reaksiyona hiç girmeden kaldığı tespit edilmiştir. Yapılan bir araştırmada, geleneksel ışık kaynaklarıyla polimerize edilen adezivlerde dönüşüm oranının en fazla %70 olduğu bildirilmiştir. Adeziv rezin kullanılan direk pulpa kuafajı, genellikle enfeksiyon veya nekrozla sonuçlanmaktadır. Hayvan ve insan çalışmalarında hafif derecede pulpa enflamasyonundan, ciddi pulpa değişimine kadar hücre apoptozisi tespit edilmiştir. Bu durum, oksijen varlığının rezinlerin polimerizasyonunu engellemesiyle ilgilidir. Bundan dolayı, adeziv rezinlerin doğrudan pulpa üzerine uygulanmasının sitotoksik etki oluşturma potansiyelinin yanı sıra, monomerlerin polimere dönüşümünü de engelleyebildiği bildirilmiştir. Güçlü ışık kaynakları tarafından hızlı bir polimerizasyon sayesinde, monomerlerin polimere dönüşüm oranının artması beklenir. Bununla birlikte dental adeziv veya kompozit rezinlerin ışıkla polimerizasyonu sırasında oluşan ısı nedeniyle, dentin sıvısının pulpaya doğru yer değiştirdiği ve polimerize olamayan monomer partiküllerin pulpaya ulaştığı rapor edilmiştir. Ayrıca, bu durumun rezinin polimerizasyonunu geliştirmediği ve aksine aşırı ısıdan dolayı pulpaya olan riskleri arttırdığı da gösterilmiştir. Bundan dolayı yapılan araştırmalarla, ısı oluşurmayan LED (blue-emitting diodes) ışık kaynakları geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Zamanla sitotoksik etkide anlamlı derecede düşüş göröldüğu bildirilmiştir (97). Dentin bağlayıcı sistemlerin dentin tabakasına uzun süreli temas etmesi ile içeriğindeki monomerlerin etkisini arttırdığı bildirilmiştir. Monomerlerin temas

etme süresinin dentin bağlayıcı sistemlerin toksisitesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (61). Bu nedenle çalışmamızda kısa, orta ve uzun dönemde meydana gelen sitotoksik etkinin değerlendirilmesi amacıyla test materyalleri üç farklı zaman diliminde (24,48 ve 72 saat) uygulanmıştır. Dentin bağlayıcı sistemlerin süreye bağlı olarak sitotoksik etkilerinin değişkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Cal ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir araştırmada; beş farklı dentin adezivinin (Admira Bond, Adper Single Bond Plus, Clearfil SE Bond, Clearfil S3 Bond,ve Heliobond) insan gingival fibroblast hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri, farklı zaman periyotlarında değerlendirilmiştir. Tüm materyallerin; ilk 24 saat içerisinde, %6-24 arasında değişen hücre canlılık oranlarıyla, ciddi sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Adper Single Bond Plus materyali haricinde, diğer tüm bileşiklerin toksisitesinin 28 gün süresince devam ettiği vurgulanmıştır (145).

Kullandığımız adeziv sistemlerin sitotoksik etkisinin zamana bağlı olarak değişkenlik gösterdiği (24, 48 ve 72 saat) sonucuna ulaşılmıştır. Temas süresinin adeziv sistemlerin toksisitesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (61). Bu nedenle çalışmamızda kısa, orta ve uzun dönemde meydana gelen sitotoksik etkinin değerlendirilmesi amacıyla test materyalleri üç farklı zaman diliminde (24,48 ve 72 saat) uygulanmıştır.

Çalışmamızda iki basamaklı self etch adezivlerin sadece primer kısımları gerçek klinik durumu yansıtmaları açısından hücre kültür insertlerine uygulanmıştır. Sistemlerin adeziv rezinlerinin çalışmaya dahil edilmemesinin nedeni, primer ve adezivin karıştırılması sonucu bazı komponentlerinin birbiriyle etkileşimi söz konusu olacağından, deney sonucunu etkileyebilecek durumları elimine etmektir.

Chen ve ark. (2003) farklı konsantrasyonlarda dilüe ettikleri bağlayıcı ajanların 24 saatlik süreden sonra pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler ve konsantrasyon arttıkça sitotoksik etkinin de arttığını bildirmişlerdir.(196)

Ratanasathien ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmanın sonucu olarak materyalin konsantrasyonu azaldıkça sitotoksitesinin de azaldığını bildirmişlerdir.(150)

Materyallerin sitotoksik etkilerinde çok farklı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle,

materyallerde hücresel yapılarla etkileşimlerden sorumlu bileşiklerin tespit edilmesi için çalışmalar yoğunlaştırılmış ve bu materyallerin sitotoksik etkiye sahip monomerleri, ko monomerleri tespit edilmiş ve bunlar arasındaki ilişkiler belirlenmiştir (197) Adeziv sistemlerde bulunan TEGDMA ve HEMA gibi monomerler dentin tübülleri aracılığıyla pulpaya ulaşabilir ve yüksek konsantrasyonlarda pulpada hasar oluşturabilir (61).

Rezinler tam polimerize olmadıkları zaman bir süre sonra degradasyon başlar ve dentin bağlayıcı ajanlar, taglardan süzülerek çeşitli konsantrasyonlarda olmak üzere pulpaya ulaşırlar. Spahl W, Geurtsen W ark. (1998) kromatografik incelemeler sonucunda, HEMA, BisGMA, UDMA, TEGDMA gibi bağlayıcı ajan komponentlerinin polimerizasyon sonrasında aköz yapıda bulunduğu tespit edilmiştir.(198)

Gerzina ve Hume (1994) polimerizasyondan yüz gün sonra bile dentinden geçerek pulpal dokuya ulaşan TEGDMA ve HEMA varlığını tespit etmişlerdir. (199)

Geurtsen ve ark. (1998) otuzbeş farklı komponenti inceledikleri çalışmalarında, molekül ağırlığı ve sitotoksikite derecesi arasında direkt bir ilişki tespit etmişler, HEMA gibi molekül ağırlığı daha az olan moleküllerin, daha ağır Bis-GMA ve TEGDMA gibi moleküllere göre daha az sitotoksik etkisi olduğunu bildirmişlerdir.(167)

Ratanasathien ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada UDMA' nın HEMA'dan daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve sitotoksik etkide bağlayıcı ajanların konsantrasyonları yanında içeriklerindeki maddelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin de etkili olduğunu bildirmişlerdir. (150)

Issa ve ark (2003) gingival fibroblastlar üzerinde yaptıkları çalışmada, 24 saat süreyle monomerler ile temas halinde kalan hücreler üzerinde en fazla sitotoksik etkinin Bis-GMA tarafından meydana getirildiğini, sonrada sırasıyla TEGDMA ve HEMA'nın geldiğinin göstermişlerdir. (200)

Geurtsen W. ve ark (1991) yaptıkları bir çalışmada UDMA'nın sitotoksik etkisini incelemişler ve UDMA'nın hücre siklusunu etkileyen sitopatik bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. (201)

Sonuç olarak, bağlayıcı ajanların içerisindeki komponentlerin sitotoksik

etkilerinin incelendiği birçok çalışmada Bis-GMA'nın en toksik yapı olduğu bunu sırasıyla UDMA, TEGDMA, HEMA ve MMA'nın izlediği sonucuna varılmıştır.(197, 202, 203)

HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın yüksek toksisitesi TEGDMA'nın yüzey aktif madde gibi davranarak hücre membranındaki lipit tabakası ile etkileşime girme potansiyeli ve/veya TEGDMA'nın lipit peroksidasyonuna neden olma potansiyeli ile açıklanmıştır(204). Ayrıca TEGDMA'nın HEMA'ya oranla yağ dokusunda yüksek çözünülebilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir(202) HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın yüksek toksisitesinin diğer bir nedeni de glutasyon ile etkileşime girmesi olarak açıklanmıştır.

Szep ve ark. yaptıkları çalışmada Bis-GMA ve HEMA içeriğine sahip Optibond Solo dentin bağlayıcı sistemin, Bis-GMA, UDMA ve HEMA içeriğine sahip Scotchbond 1 dentin bağlayıcı sistemden daha az sitotoksik olduğunu açıklamışlardır.(205)

De Souza Costa ve ark. polimerize edilmeden uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin meydana getirdiği erken sitotoksik etkinin nedenini bu materyallerin içerdikleri asidik ajanlar olduğunu belirtmişlerdir. Test materyallerinin hücre kültürü içerisindeki medyumun rengini kırmızıdan sarıya dönüştürmesini materyallerin asidik içerikleriyle açıklamışlardır(206)

Çalışmamızda kullandığımız antibakteriyel ajan içeren adeziv sistemlerden ilki iki aşamalı self-etch adeziv Clearfil Protect Bond'dur (CPB). Bu adeziv sistem primeri içinde bulunan MDPB monomeri sayesinde antibakteriyel etki gösterir. Konu hakkında yapılan in-vitro çalışmalarda MDPB içerikli CPB'nin in-vitro koşullarda istatistiksel olarak anlamlı antibakteriyel özellik sergilediği bildirilmiştir.(102, 103) İn-vivo koşullarda yapılan tek çalışma olan Imazato ve ark'larının (2004) köpek dişleri üzerinde yaptıkları araştırmada CPB'un S.mutans'a karşı antibakteriyel etkinliği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde başarılı bulunmuştur.(99)

Grobler ve ark.farklı dentin bağlayıcı sistemlerin (Clearfil Protect Bond, Adper ScotchBond1, Xeno III, Prime & Bond NT) sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında Xeno III isimli dentin bağlayıcının en fazla toksisiteye sahip olduğunu bunu Clearfil Protect Bond'un izlediğini saptamışlardır. Araştırmacılar Clearfil Protect Bond primer kısmının bond kısmından 3 kat daha fazla toksik olduğunu belirtmişler ve primer kısmın MDPB monomeri içermesinin buna neden olabileceğini bildirmişlerdir (207)

Wiegand ve ark.dentin hassasiyet giderici ajanların sitotoksik etkisini dentin bariyer test yöntemi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında Clearfil Protect Bond dentin bağlayıcı ajanın diğer test materyallerine oranla anlamlı düzeyde sitotoksik olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar Clearfil Protect Bond'un sitotoksik etkisini bu materyalin içerdiği MDPB monomeriyle açıklamışlardır. MDPB antibakteriyel bir kimyasal madde olduğu belirtilmiştir. Bu maddenin diş hekimliğindeki materyallerde kullanılan diğer monomerlere benzer ya da daha düşük sitotoksik etki potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmüştür (98, 100) Diğer yandan Safa Tuncer 'ın tez çalışmasından çıkan sonuçta Protect Bond'un primer kısmı dışında bağlayıcı kısımlardan ayrı olarak uygulanan diğer primerlerinde benzer şekilde daha fazla sitotoksik sergilemesi, toksik etkinin sadece MDPB içeriği ile açıklanamayacağını düşündürmektedir.

Tezimizde kullandığımız MDPB içerikli bond Clearfil SE Protect (Kuraray Noritake Dental Inc, Kurashiki, Japan) sonucuna göre ; tüm inkübasyon süreleri için, yalnızca %1 ve %0,1 dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir ($P<0.001^{***}$). Ancak bu azalmanın inkübasyon süresi arttıkça artmadığı belirlenmiştir. %1 ve %0,1 dozlarındaki hücre canlılığının ise benzer oranda azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı da görülmüştür.

Yine tüm inkübasyon sürelerinde %0,01 ve %0,001 dozların, inkübasyon süresi bağımsız olarak hücre canlılığında hem birbirlerinden hem de kontrol grubundan istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı ölçüde fark yaratmadığı görülmektedir.

Koulaouzidou ve ark (2009) 6 farklı bonding ajanının sitotoksitesini monolayer hücre kültürleri kullanarak karşılaştırmıştır (Admira Bond, Clearfil

Liner Bond 2V ED Primer II, Fuji Bond LC, Gluma Comfort Bond ve NanoBond). Bu çalışmanın sonuçlarına göre hücre kültürleri üzerinde en fazla sitotoksik etkiyi Gluteraldehid içerikli Gluma Comfort Bond göstermiştir. Araştırmacılara göre monolayer hücre kültürlerinde gluteraldehid HEMA" dan daha sitotoksiktir ve bu sonuç Gluma Comfort Bond" un içeriğindeki HEMA ve gluteraldehide bağlı oluşmuş olabilir.

Bizim tezimizde kullanılan glutealdehit içerikli bond olan Gluma 2 Bond'un (Heraus Kulzer GmbH, Hanau, Germany) 24 saatlik, 48 saatlik ve 72 saatlik inkübasyonda, doz grupları kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz arttıkça canlılığın önemli ölçüde azalmadığı görülmektedir. Materyalin yalnızca en yüksek doz olan %1 konsantrasyonda hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı, bu azalmanın zaman bağımlı olarak arttığı görülmektedir. %0,1 dozdan itibaren hücre canlılığının azalmadığı hatta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı da dikkat çekmektedir. Yani özellikle gluteraldehide bağlı bir sitotoksosite söz konusu değildir.

Hanks ve ark iki farklı dentin bağlayıcı sistem ve içeriklerinin (Gluma/gluteraldehit, Scotchbond2/HEMA) BALB/3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Yüksek konsantrasyonda bu materyallerin mitokondride matriks enzimlerini değiştirdiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar gluteraldehitin HEMA"dan daha toksik olduğunu fakat iki bağlayıcı sisteminde benzer sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (208)

Bizim tez çalışmamızda gluteraldehit içerikli olarak Gluma 2 Bond kullanılmış olup doz arttıkça canlılıkta önemli bir azalma olmadığı görülmüştür. Yalnızca en yüksek dozda %1 de canlılık kontrol grubuna göre zaman bağımlı anlamlı azalmıştır.

Tezimizde kullandığımız antibakteriyel etkili Bondlardan bir diğeri klorheksidin içerikli Peak universal bond(Ultradent products Inc, South Jordan ,UT, USA) olup bununla ilgili bir çalışma bulunamamıştır. Bizim tez çalışmamızdan çıkan sonuç ise Peak UniversalinBond'un; tüm inkübasyon süreleri için, denenen

tüm dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir ($P<0.001^{***}$).

24 saatlik inkübasyonda yalnızca en yüksek dozlar olan %0,1 ve %1 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülürken, düşük dozlara gidildikçe hücre canlılığının önemli ölçüde değişmediği belirlenmiştir.

48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde ise %0,01 ve %0,1 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülürken, gerek %0,001/%0,01, gerekse %0,1/%1 doz grupları arasında hücre canlılığının önemli ölçüde değişmediği görülmektedir. Ayrıca yüksek dozlar olan %0,1 ve %1 dozlarında inkübasyon süresindeki artışın canlılığı önemli ölçüde azalttığı görülürken düşük dozlarda inkübasyon süresindeki artış ile hücre canlılığındaki azalmanın paralel olmadığı görülmüştür .

6. SONUÇLAR

1. Dişhekimliğinde kullandığımız bağlayıcı sistemler canlı dokular üzerinde sitotoksik etkilere sahiptirler. Sitotoksik etkileri, kullanılan konsantrasyonlarına, canlı dokuyla temas şekline ve süresine, içerdikleri yapıların cinsine ve birbirleriyle olan etkileşimlerine bağlıdır.
2. Materyal ile canlı doku arasında bir bariyer bulunduğunda ki diş dokuları için bu bariyer dentindir, sitotoksik etki yine görülmektedir. Dentin tübüllerinden geçerek, canlı dokuya ulaşan materyal komponentleri, sitotoksik etkiler meydana getirebilmektedir. Bariyerin kalınlığı arttıkça görülen sitotoksik etki de azalmaktadır.
3. Derin kavitelerde (1 mm veya daha az dentin varlığında) rezinin pulpaya olan zararlı etkilerini önlemek amacıyla kalan dentin dokusunun üzerine kaide materyali konulmalıdır.
4. Adeziv rezinler, direkt kuafaj materyali olarak kullanılmamalıdır.
5. Minimal invaziv tedavilerin önemi bir kez daha karşımıza çıkmaktadır. Hekimin kavite preparasyonu sırasında sağlam dentini korumasıyla kullanılan materyallerin canlı dokular için o kadar az sitotoksik olacağı unutulmamalıdır.
6. Yetersiz ya da düşük polimerizasyonun artık monomer salınımına neden olduğu bilindiğinden ışık kaynakları geliştirilmeli ve düzenli bakımları yapılmalıdır.
7. Yeni geliştirilen materyaller, hekimler tarafından kullanılmadan önce diğer özelliklerinin yanında biyouyumlulukları da çeşitli testlerle incelenmeli ve rutin kullanıma daha sonra sunulmalıdır. Günümüzde hızla gelişmekte olan dişhekimliğinde geliştirilmiş mekanik ve fiziksel özellikler yanında doku dostu biyomateryallerin kullanılmasıyla restorasyonun estetiğinin ve dayanıklılığının yanında dişin uzun ömürlülüğü de sağlanacaktır.
8. Gluma self etch adeziv sistemin; yalnızca yüksek dozlarının hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı görülürken, %0,01 dozdan itibaren doz arttıkça hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık olmadığı görülmektedir. Ancak bununla birlikte denenen en yüksek dozda bile hiçbir inkübasyon süresinde hücre canlılığının %50'nin altına düşmemiş olması gluma self etch sistemin toksik etkisinin oldukça düşük olduğunu göstermiştir.

9. Clearfil SE Bond adeziv sistemin; Tüm inkübasyon süreleri için, materyalin denenen en yüksek dozu olan %1 konsantrasyonda kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir
10. Peak Universal adeziv sistemin; Tüm inkübasyon süreleri için, denenen tüm dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir.
11. Gluma 2 Bond adeziv sistemin; Materyalin yalnızca en yüksek doz olan %1 konsantrasyonda hücre canlılığını kontrole göre anlamlı ölçüde azalttığı, bu azalmanın zaman bağımlı olarak arttığı görülmektedir.
12. Clearfil Protect Bond adeziv sistemin; Tüm inkübasyon süreleri için, yalnızca %1 ve %0,1 dozların kontrole göre anlamlı ölçüde hücre canlılığını azalttığı açıkça görülmektedir

Yaptığımız tezin sonuçlarına göre adeziv sistemlere eklenen antibakteriyel içeriklerin biyouyumlulukla olumsuz bir etkisi olmamıştır. En yüksek dozun hem antibakteriyel içeriğe sahip adeziv sistemlerde hem de antibakteriyel içeriğe sahip olmayan adeziv sistemlerde en toksik dozu oluşturduğu görülmüş olup bunun inkübasyon süresi ile artış gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca diğer antibakteriyel adeziv sistemlere göre klorheksidin içerikli adeziv sistem olan Peak Universal Bond için daha fazla araştırma yapma gerekliliğini ortaya koymuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry-a review* FDI Commission Project 1–97. *Int Dent J* 2000;50(1):1-12.
2. Mali P, Deshpande S, Singh A. Microleakage of restorative materials: an in vitro study. *J Ind Soc Pedod Prevent Dent* 2006;24(1):15.
3. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27(21):3995-4002.
4. Kidd E, Ricketts D, Beighton D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: a clinical and microbiological study. *Brit Dent J* 1996;180(8):287.
5. MALI, P., DESHPANDE, S., SINGH, A. (2006). Microleakage of restorative materials: an in vitro study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, 24: 15-18.
6. Al-Dawood A, Wennberg A. Biocompatibility of dentin bonding agents. *Dent Traumatol* 1993;9(1):1-7.
7. Akarslan ZZ, Sadik B, Erten H, Karabulut E. Dental esthetic satisfaction, received and desired dental treatments for improvement of esthetics. *Ind J Dent Res* 2009;20(2):195.
8. Erdemir U, Yaman Bc. Diş Hekimliğinde Mikrosizinti Ve Mikrosizinti Araştırma Yöntemleri/Microleakage In Dentistry And Microleakage Evaluation Techniques. *J Ist Uni Fac Dent* 2011;45(1):25-35.
9. Perdigao J. Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin* 2002;46(2):277-301.
10. Swift EJ, Perdigao J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int-English Edition-* 1995;26:95-95.
11. Swift EJ. Dentin/enamel adhesives: review of the literature. *Ped Dent* 2002;24(5):456-461.
12. Duke E. Adhesion and its application with restorative materials. *Dent Clin North Am* 1993;37(3):329-340.

13. Ruiz J, Mitra S. Using cavity liners with direct posterior composite restorations. *Compend Newtown*. 2006;27(6):347.
14. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo EDS. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.
15. Marshall SJ, Bayne SC, Baier R, Tomsia AP, Marshall GW. A review of adhesion science. *Dent Mater*. 2010;26(2):e11-e16.
16. Martínez-Insua A, da Silva Dominguez L, Rivera FG, Santana-Penín UA. Differences in bonding to acid-etched or Er: YAG-laser-treated enamel and dentin surfaces. *J Prost Dent* 2000;84(3):280-288.
17. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res Part A* 1982;16(3):265-273.
18. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955;34(6):849-853.
19. Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res* 1979;58(4):1364-1370.
20. Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater* 1995;11(2):117-125.
21. Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res* 1970;49(6):1359-1368.
22. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(6):658-666.
23. Violich D, Chandler N. The smear layer in endodontics—a review. *Int Endod J* 2010;43(1):2-15.
24. Sofan E, Sofan A, Palaia G, Tenore G, Romeo U, Migliau G. Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Ann Stomatol* 2017;8(1):1.
25. İlday Agdnö, Urvasizoğlu Agdn, Seven N. İndirekt Kompozit İnley Restorasyonlar İle Direkt Kompozit Restorasyonların Mikrosizinti Yönünden

Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2009;2009(2).

26. Barkmeier W, Cooley R. Laboratory evaluation of adhesive systems. Operativ Dent 1992;50-61.

27. Lopez JJ. Retentive shear strengths of various bonding attachment bases. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1980;77(6):669-678.

28. Phillips R. Skidders Science of Dent Mater ', 9th edn, W. Saunders Co (Philadelphia), pp215-248 1991.

29. Fagan TR, Crall J, Jensen M, Chalkley Y, Clarkson B. A comparison of two dentin bonding agents in primary and permanent teeth. University of Iowa; 1984.

30. Bouvier D, Duprez J, Nguyen D, Lissac M. An in vitro study of two adhesive systems: third and fourth generations. Dent Mater 1993;9(6):365-369.

31. Miyazaki M, Platt J, Onose H, Moore B. Influence of dentin primer application methods on dentin bond strength. Operativ Dent 1996;21:167-172.

32. Ayaz Df, Tağtekin D, Yanikoğlu F. Dentine bağlanma ve değerlendirme metodları. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2011;2011(4).

33. Köroğlu Agda, Ekren Do, Kurtoğlu C. Geleneksel ve adeziv dental simanlar hakkında bir derleme çalışması. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2012;2012(2).

34. Silverstone L, Saxton C, Dogon I, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. Caries Res 1975;9(5):373-387.

35. Xiong G, Cui Y, Chen L, Jiang H. Influence of hydrochloric acid etching on bond strength between concrete substrate and repair materials. Cem Concr Compos 2004;26(1):41-45.

36. Kanca III J. A method for bonding to tooth structure using phosphoric acid as a dentin-enamel conditioner. Quintessence Int. 1991;22(4).

37. Brannström M, Nordenvall KJ. The effect of acid etching on enamel, dentin, and the inner surface of the resin restoration: a scanning electron microscopic investigation. J Dent Res 1977;56(8):917-923.

38. Fusayama T. Total etch technique and cavity isolation. J Esthet Restor Dent 1992;4(4):105-109.

39. Asmussen E, Munksgaard E. Bonding of restorative resins to dentine promoted by aqueous mixtures of aldehydes and active monomers. *Int Dent J* 1985;35(2):160-165.
40. Franke M, Taylor A, Lago A, Fredel M. Influence of Nd: YAG laser irradiation on an adhesive restorative procedure. *Operativ Dent* 2006;31(5):604-609.
41. Barutçigil Ç, Barutçigil K, Kürklü D, Harorlı OT. Güncel dentin bağlayıcı ajanların ve uygulama yöntemlerinin makaslama bağlanma dayanımlarının karşılaştırılması. 2013.
42. Causton BE. Primers and mineralizing solutions. In: *Biocompatibility of Dent Mater* . CRC press Boca Raton, FL; 1982. p. 125-141.
43. Van BM, Vanherle G, Lambrechts P, Braem M. Dentin-and enamel-bonding agents. *Curr Opin Dent* 1992;2:117-127.
44. Uno S, Finger WJ. Function of the hybrid zone as a stress-absorbing layer in resin-dentin bonding. *Quintessence Int.* 1995;26(10).
45. Velazquez E, Vaidyanathan J, Vaidyanathan TK, Houpt M, Shey Z, Von Hagen S. Effect of primer solvent and curing mode on dentin shear bond strength and interface morphology. *Quintessence Int.* 2003;34(7).
46. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int.* 1993;24(9).
47. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82(2):136-140.
48. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto V-J, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77(8):1622-1629.
49. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials: 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* 2003;66(1):287-298.

50. Van Strijp A, Jansen D, DeGroot J, Ten Cate J, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37(1):58-65.
51. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-839.
52. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(3):207.
53. Kıran AÖ. Üç farklı adeziv sistemi ve klorheksidinin, dentinin fonksiyonel matriks metalloproteinaz aktivitelerine ve mikrotensile bağlanma dayanımına etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.
54. Fukae M, Kaneko I, Tanabe T, Shimizu M. Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. *Arch Oral Biol* 1991;36(8):567-573.
55. Caron C, Xue J, Sun X, Simmer J, Bartlett J. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 2001;80(7):1660-1664.
56. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23(12):1127-1132.
57. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Abstract. *Int Endod J* 2002;35(11):897-904.
58. De Souza A, Gerlach R, Line S. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16(2):103-108.
59. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(6):311-318.
60. Sognnaes RF. Introduction to the problem of caries. *Ann N Y Acad Sci* 1965;131(2):687-689.
61. Katz S. In-vitro root surface caries studies. *J Oral Med* 1987;42:40-48.
62. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65(1):1-13.

63. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26(4):320-325.
64. Pashley DH, Tay F, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho R, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83(3):216-221.
65. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011;90(8):953-968.
66. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(3):437-439.
67. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26(6):571-578.
68. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *Acta Biomaterialia* 2010;6(10):4136-4142.
69. Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J* 2007;40(4):282-289.
70. Huet E, Cauchard J-H, Berton A, Robinet A, Decarme M, Hornebeck W, et al. Inhibition of plasmin-mediated prostromelysin-1 activation by interaction of long chain unsaturated fatty acids with kringle 5. *Biochem Pharmacol* 2004;67(4):643-654.
71. Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;1478(1):51-60.
72. Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 2002;64(2):229-237.

73. Erkli H, Ersöz E. Matriks metalloproteinazlar: diş dokuları ve çürük üzerine etkileri. *Cumhuriyet Dent J* 2011;14(3):246-257.
74. Tam L, Yim D. Effect of dentine depth on the fracture toughness of dentine-composite adhesive interfaces. *J Dent* 1997;25(3-4):339-346.
75. Ozer F, Blatz MB. Self-etch and etch-and-rinse adhesive systems in clinical dentistry. *Compend Contin Educ Dent* 2013;34(1):12-14.
76. Knobloch LA, Gailey D, Azer S, Johnston WM, Clelland N, Kerby RE. Bond strengths of one-and two-step self-etch adhesive systems. *J Prost Dent* 2007;97(4):216-222.
77. Bishara SE, Ajlouni R, Laffoon JF, Warren JJ. Comparison of shear bond strength of two self-etch primer/adhesive systems. *Angle Orthod* 2006;76(1):123-126.
78. Peumans M, De Munck J, Van Landuyt K, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dent Mater* 2010;26(12):1176-1184.
79. Hosaka K, Nakajima M, Takahashi M, Itoh S, Ikeda M, Tagami J, et al. Relationship between mechanical properties of one-step self-etch adhesives and water sorption. *Dent Mater* 2010;26(4):360-367.
80. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Mena-Serrano A, Reis A. Effect of 3-year water storage on the performance of one-step self-etch adhesives applied actively on dentine. *J Dent* 2011;39(8):578-587.
81. Sano H, Yoshikawa T, Pereira P, Kanemura N, Morigamui M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999;78(4):906-911.
82. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems: I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001;17(4):296-308.
83. Hannig M, Bock H, Bott B, Hoth-Hannig W. Inter-crystallite nanoretention of self-etching adhesives at enamel imaged by transmission electron microscopy. *Eur J Oral Sci* 2002;110(6):464-470.
84. Tay F, Pashley DH, Su B, Hiraishi N, Yiu C. Water treeing in simplified dentin adhesives *Operativ Dent-University Of Washington-* 2005;30(5):561.

85. Cheong C, King N, Pashley DH, Ferrari M, Toledano M, Tay F. Incompatibility of self-etch adhesives with chemical/dual-cured composites: Two-step vs one-step systems. *Operativ Dent* 2003;28(6):747-755.
86. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel–dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 2005;21(10):895-910.
87. Proença JP, Polido M, Osorio E, Erhardt MCG, Aguilera FS, García-Godoy F, et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mater* 2007;23(12):1542-1548.
88. Özdemir E, Lin W-S, Erkut S, Tuncer AH. Interfacial evaluation of endodontically treated teeth restored with selected adhesive materials and glass fiber posts: An SEM analysis. *J Dent Sci* 2013;8(4):365-372.
89. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005;113(6):525-530.
90. Sadr A, Shimada Y, Tagami J. Effects of solvent drying time on micro-shear bond strength and mechanical properties of two self-etching adhesive systems. *Dent Mater* 2007;23(9):1114-1119.
91. Aasen, Steven M., et al. Self-etching emulsion dental compositions and methods. U.S. Patent No. 7,699,605. (10.01.2019)
92. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent* 1998;26(3):267-271.
93. Kenawy E-R, Worley S, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 2007;8(5):1359-1384.
94. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater* 2003;19(4):313-319.
95. Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials* 2003;24(20):3605-3609.
96. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *Am J Dent* 1998;11(3):106-108.

97. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 2001;28(4):314-319.
98. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 1999;20(9):899-903.
99. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y, Ebisu S. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Operativ Dent-University Of Washington-*. 2004;29(4):369-375.
100. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater* 2006;22(6):527-532.
101. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006;114(4):349-353.
102. Özer F, Karakaya Ş, Ünlü N, Erganiş O, Kav K, Imazato S. Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. *J Dent* 2003;31(2):111-116.
103. Kaya AA, Ömürlü H, Sultan N, Sipahioğlu B. Farklı dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal özelliklerinin in vitro değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*;25(3):15-22.
104. Kidd E. Role of chlorhexidine in the management of dental caries. *Int Dent J* 1991;41(5):279-286.
105. Marsh P, Keevil C, McDermid A, Williamson M, Ellwood D. Inhibition by the antimicrobial agent chlorhexidine of acid production and sugar transport in oral streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 1983;28(3):233-240.
106. Niessen LC. Chlorhexidine varnish, sodium fluoride varnish, and silver diamine fluoride solution can prevent the development of new root caries in elders living in senior homes in Hong Kong. *J Evid Based Dent Pract* 2012;12(2):95-96.
107. Borges FMC, de Melo MAS, Lima JPM, Zanin ICJ, Rodrigues LKA. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: in vitro and in situ study. *J Conserv Dent* 2012;15(1):22.

- 108.Arslan S, Yazici AR, Gorucu J, Ertan A, Pala K, Antonson YUA, et al. Effects of Different Cavity Disinfectants on Shear BondStrength of a Silorane-based Resin Composite. *J Contemp Dent Pract* 2011;12(4):279-286.
- 109.Kato M, Leite A, Hannas A, Buzalaf M. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res* 2010;89(5):468-472.
- 110.Campos EAd, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems.*Braz Oral Res* 2009;23(3):340-345.
- 111.Löe H, Rindom Schiott C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970;5(2):79-83.
- 112.Fardai O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986;112(6):863-869.
- 113.Saniç A. Aldehidler ve Sterilizan Etkili Dezenfektanlar, 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun 2003.
- 114.Keskin Y, Kansu G. Farklı Yöntemlerle Polimerize OlanKaide Rezinlerinin Boyutsal Stabiliteleri Üzerine Sterilizasyon Yöntemlerinin Etkisi. *Türkiye Klinikleri J Dent Sci* 1999;5(2):92-98.
- 115.Sengun A, Buyukbas S, Hakki S. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials: 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* 2006;78(1):131-137.
- 116.Asmussen E. Adhesion of restorative resins to dentin: chemical and physicochemical aspects. *Oper Dent* 1992;17(5):68-74.
- 117.Felton DA, Bergenholtz G, Kanoy B. Evaluation of the desensitizing effect of Gluma Dentin Bond on teeth prepared for complete-coverage restorations. *Int J Prosthodont* 1991;4(3).
- 118.Qin C, Xu J, Zhang Y. Spectroscopic investigation of the function of aqueous 2-hydroxyethylmethacrylate/glutaraldehyde solution as a dentin desensitizer. *Eur J Oral Sci* 2006;114(4):354-359.

- 119.Ma DH-K, Lai J-Y, Cheng H-Y, Tsai C-C, Yeh L-K. Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 2010;31(25):6647-6658.
- 120.Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy today* 2000;8(1):8-13.
- 121.Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prost Dent* 2001;86(2):203-209.
- 122.Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prost Dent* 1993;69(4):406-415.
- 123.Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. *Phillips' science of Dent Mater* . Elsevier Health Sciences; 2013.
- 124.Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996;12(3):186-193.
- 125.Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of Dent Mater — advantages and limitations. *J Dent* 1994;22:S6-S11.
- 126.Spangberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1973;35(3):389-401.
- 127.Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Evaluation of biologic effects of Dent Mater using four different cell culture techniques. *Eur J Oral Sci* 1977;85(4):291-296.
- 128.Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12(3):258-266.
- 129.Aldridge W. The biochemical principles of toxicology. *Exp Toxicol* 1993;5:56-78.
- 130.Wennberg A, Mjör I, Hensten-Pettersen A. Biological evaluation of dental restorative materials—a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res Part A* 1983;17(1):23-36.
- 131.Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* 2005;25(2):101-108.

- 132.Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of Dent Mater . Toxicology in vitro 2005;19(1):145-154.
- 133.Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons; 2015.
- 134.Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. In: Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology. Springer; 2001. p. 9-26.
- 135.Powers J, Sakaguchi R. Impression materials. Craig's restorative Dent Mater . Elsevier Mosby 2006;294:95.
- 136.Wataha J, Hanks C. Biocompatibility testing-what can we anticipate. Trans Acad Dent Mater 1997;10:109-120.
- 137.Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. Int Endod J 1988;21(2):89-99.
- 138.Craig RG. Prosthetic applications of polymers. Restorative Dent Mater 1997;9:502-550.
- 139.Schmalz G. Agar overlay method. Int Endod J 1988;21(2):59-66.
- 140.Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. Int Endod J 1988;21(2):143-154.
- 141.Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dent Mater 2002;18(4):318-323.
- 142.Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. J Prost Dent 1990;63(5):513-521.
- 143.Stanley H. Biological evaluation of Dent Mater . Int Dent J 1992;42(1):37-46.
- 144.Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. Clin Oral Investig 1998;2(3):125-129.
- 145.Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. J Endod 2001;27(2):96-102.
- 146.Schmalz G, Hiller K-A, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. J Endod 2001;27(1):23-30.

147. Dufrane D, Cornu O, Verraes T, Schecroun N, Banse X, Schneider Y-J, et al. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *Eur Cell Mater* 2001;1:52-58.
148. Browne R. Animal tests for biocompatibility of Dent Mater —relevance, advantages and limitations. *J Dent* 1994;22:S21-S24.
149. Kuşdemir M. Farklı dentin bağlayıcı ajanların dentin bariyer testi kullanılarak 1929 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin incelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2007.
150. Ratanasathien S, Wataha J, Hanks C, Dennison J. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995;74(9):1602-1606.
151. Ciapetti G, Grachi D, Verri E, Savarinot L, Cavadagna D, Pizzoferrato A. A staining method for evaluating the cytotoxicity of medical implants. *Biomater* 1996;17:1259-1264.
152. Ulreich JB, Chvapil M. A quantitative microassay for in-vitro toxicity testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res Part A* 1981;15(6):913-922.
153. Riss TL, Moravec RA, O'Brien MA, Hawkins EM, Niles A. Homogeneous Multiwell Assays for Measuring Cell Viability, Cytotoxicity, and Apoptosis. *Handbook of Assay Development in Drug Discovery* 2006:385.
154. Crouch S, Kozlowski R, Slater K, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993;160(1):81-88.
155. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2007;5(1):127-136.
156. Longo-Sorbello G, Saydam G, Banerjee D, Bertino J. Cytotoxicity and cell growth assays. In “Cell biology: a laboratory handbook”, Ed; Celis JE. In.: Elsevier Academic Press, Burlington; 2006.
157. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters* 1985;24(2-3):119-124.
158. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016;2016(4):pdb.prot087379.

- 159.O'Connor R, Heenan M, Duffy C, Clynes M. Miniaturized In Vitro Methods in Toxicity Testing. In: Animal cell culture techniques. Springer; 1998. p. 423-433.
- 160.Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, et al. Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Technol* 2015;13(8):456-465.
- 161.Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983;64(3):313-320.
- 162.Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem* 1986;152(1):136-140.
- 163.Riss TL, Moravec RA. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In: *Cell Biology* (Third Edition). Elsevier; 2006. p. 25-31.
- 164.Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005;288(2):369-376.
- 165.Altman F. Tetrazolium salts: a consumer's guide. *Histochem J* 1976;8(5):471-485.
- 166.Ishiyama M. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In Vitro Toxicol*. 1995;8:187-190.
- 167.Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg & Medl Chem Letters* 1991;1(11):611-614.
- 168.Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera WA, et al. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocyc Chem* 1988;25(3):911-914.
- 169.Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytic Commun* 1999;36(2):47-50.

170. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol* 2004;2(1):51-62.
171. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986;89(2):271-277.
172. Martin A, Clynes M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnol* 1993;11(1):49-58.
173. Decker T, Lohmann-Matthes M-L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988;115(1):61-69.
174. Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtti A, Syrjänen S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharma Res* 1994;11(8):1127-1131.
175. Galluzzi L, Aaronson S, Abrams J, Alnemri E, Andrews D, Baehrecke E, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009;16(8):1093.
176. Zucco F, Angelis D, Stamatii A. Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M. In.: Springer Verlag, Germany; 1998.
177. Erb R, Ehlers M. Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Fertilizing Capacity. *J Dairy Sci* 1950;33(12):853-864.
178. Ahmed SA, Gogal Jr RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994;170(2):211-224.
179. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *The FEBS J* 2000;267(17):5421-5426.

- 180.Silva FS, Starostina IG, Ivanova VV, Rizvanov AA, Oliveira PJ, Pereira SP. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Curr Protoc Toxicol* 2016;2.24. 21-22.24. 15.
- 181.Squatrito RC, Connor JP, Buller RE. Comparison of a novel redox dye cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. *Gynecol oncol* 1995;58(1):101-105.
- 182.Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem* 2007;366(2):197-206.
- 183.Sali N, Nagy S, Poór M, Kőszegi T. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J Pharma Toxicol Methods* 2016;79:45-54.
- 184.Tokur Orhan, Aksoy Abdurrahman. In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg*, 2017. 6: 112-118.
- 185.Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Cell Viabil Assays*. 2016.
- 186.Verhaegen S, Coyle S, Connolly L, O'loughlin CM. Cell cycle and cell death mechanism. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M. In.: Springer Verlag, Germany; 1998.
- 187.Powers J, Sakaguchi R. Craigs. *Restorative Dent Mater* . 12th ed. St. Louis: Mosby 2006:236-240.
- 188.Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 1998;106(2p2):696-706.
- 189.Murray Pe, Franquin J-C, Remusat M, Smith Aj. Restorative Pulpal And Repair Responses. *J Am Dent Assoc* 2001;132(4):482-491.
- 190.Nadarajah V, Cohen RE, Neiders ME, Aguirre A. Cellular inflammatory responses to implanted Dent Mater . *The J Prost Dent* 1996;75(5):552-561.
- 191.Hensten-Pettersen A. Skin and mucosal reactions associated with Dent Mater . *Eur J Oral Sci* 1998;106(2p2):707-712.
- 192.Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dent Mater* . Springer; 2009.

193. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critic Rev Oral Biol & Med* 2000;11(3):333-355.
194. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996;22(5):244-248.
195. Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Critic Rev Oral Biol & Med* 2000;11(4):467-480.
196. Chen R-S, Liu C-C, Tseng W-Y, Jeng J-H, Lin C-P. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 2003;31(3):223-229.
197. Hanks C, Strawn S, Watahai J, Craig R. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991;70(11):1450-1455.
198. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent* 1998;26(2):137-145.
199. Gerzina T, Hume W. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil* 1994;21(4):463-468.
200. Issa Y, Watts D, Brunton P, Waters C, Duxbury A. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 2004;20(1):12-20.
201. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Materials Res: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* 1998;41(3):474-480.
202. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 1997;37(4):517-524.
203. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand* 1999;57(6):316-322.
204. Reichl F-X, Walther U, Durner J, Kehe K, Hickel R, Kunzelmann K-H, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dent Mater* 2001;17(2):95-101.

- 205.Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives—in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res: 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* 2002;63(1):53-60.
- 206.de Souza Costa C, Vaerten M, Edwards C, Hanks C. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999;15(6):434-441.
- 207.Grobler SR, Oliver A, Moodley D, Van Wyk Kotze TJ. Cytotoxicity of recent dentin bonding agents on mouse fibroblast cells. *Quintessence Int.* 2008;39(6).
- 208.Hanks C, Wataha J, Parsell R, Strawn S. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod* 1992;18(12):589-596.

8. ORJİNALLİK RAPORU

Derya Türel Silsüpür Uzmanlık Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

%16

BENZERLİK ENDEKSİ

%15

İNTERNET
KAYNAKLARI

%8

YAYINLAR

%4

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

dergipark.gov.tr
İnternet Kaynağı

%4

2

acikarsiv.ankara.edu.tr
İnternet Kaynağı

%2

3

core.ac.uk
İnternet Kaynağı

%1

4

dfd.atauni.edu.tr
İnternet Kaynağı

%1

5

www.dent.ege.edu.tr
İnternet Kaynağı

%1

6

docs.neu.edu.tr
İnternet Kaynağı

%1

7

YILDIRIM, Zehra Süsgün, BAKIR, Elif Pınar,
BAKIR, Şehmus and AYDIN, Mehmet Salih. "ÖZ
Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve
değerlendirme yöntemleri", Selçuk Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi, 2017.
Yayın

%1

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Derya	Soyadı	Türel Silsüpür
Doğum Yeri	Muğla	Doğum Tarihi	26/02/1981
Uyruğu	T.C.	Tel	05519761724
E-posta	dtderser@hotmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi	2004
Lise	Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi	1999

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Dişhekimisi	muayenehane	2005-2007
Dişhekimisi	ADSM	2007-2014
Dişhekimisi	ADSM	2014-2015
Dişhekimliği uzmanlık öğrencisi	Dicle Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi A.D.	2016-

Yabancı Dil Sınav Notu								
DS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
50.0	64.25							