



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**BEŞ FARKLI TEK AŞAMALI SELF ETCH
ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
SİTOTOKSİSİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dt. Zehra SÜSGÜN YILDIRIM

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Yrd. Doç. Dr. ŞEYHMUS BAKIR**

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2016

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**BEŞ FARKLI TEK AŞAMALI SELF ETCH
ADEZİVLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA
SİTOTOKSİSİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dt. Zehra SÜSGÜN YILDIRIM

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Yrd. Doç. Dr. ŞEYHMUS BAKIR**

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2016

**Bu Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: DİŞ.15.026

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**“BEŞ FARKLI TEK AŞAMALI SELF ETCH ADEZİVLERİN
HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA SİTOTOKSİSİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ”**

Yukarıda belirtilen uzmanlık tezi 25.11.2016 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şeyhmus BAKIR

Tezi Teslim Eden: Dt. Zehra SÜSGÜN YILDIRIM

JÜRİ ÜYESİNİN

Ünvanı	Adı Soyadı
Başkan	: Doç. Dr. Bayram İNCE
Üye	: Doç. Dr. Güvenç BAŞARAN
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hakan KAMALAK
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Şeyhmus BAKIR
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Elif Pınar BAKIR

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur

...../...../.....

Prof. Dr. Remzi NİĞİZ
Dicle Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

İlk olarak tezimin hazırlık ve sunum aşamasında her türlü yardımı esirgemeyen, yol gösteren ve beni akademik hayata hazırlayan saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Şeyhmus BAKIR'a, her zaman minnettar kalacağım çok değerli bölüm hocalarım ve sevgili asistan arkadaşlarıma, tüm eğitim ve öğretim hayatımda ellerinden gelenin fazlası ile destek olan ve hayatlarını kızlarının eğitime adayan canım annem ve babama, çok sevdiğim kız kardeşlerime ve son olarak her an desteğini ve bana olan güvenini eksik etmeyen sevgili eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Dt. Zehra SÜSGÜN YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	
Onay Sayfası.....	I
Teşekkür Sayfası.....	II
İçindekiler Dizini.....	III
Şekiller ve Resimler Dizini.....	V
Tablolar ve Grafikler Dizini.....	VI
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	VII
Özet.....	VIII
Abstract.....	IX
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
1. MİNERİN YAPISI.....	3
2. DENTİNİN YAPISI.....	3
2.1. Dentin Geçirgenliği ve Monomer Difüzyonunu Etkileyen Faktörler.....	5
3. DIŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN ADEZİV SİSTEMLER.....	5
3.1. Adeziv Sistemlerin Sınıflandırılması.....	6
3.1.1. Total-etch Adeziv Sistemler.....	7
3.1.2. Self-etch Adeziv Sistemler.....	10
3.1.3. Cam İyonomer Adeziv Sistemler.....	12
4. DENTAL ADEZİVLERİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ.....	12
4.1. Akrilik Resin Monomerler.....	12
4.2. Başlatıcı Sistemler.....	13
4.3. İnhibitörler	14
4.4. Çözücüler.....	15
4.5. Doldurucular.....	15
5. BİYOUYUMLULUK.....	16
6. DIŞ HEKİMLİĞİNDE BİYOUYUMLULUK.....	16
6.1. Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi	18
6.1.1. Hasta güvenliği.....	19
6.1.2. Diş hekimi ve sağlık personelinin güvenliği.....	20

6.1.3. Hukuki sorumluluk.....	20
6.2. Materyallerin Biyolojik Testlerinde Etik İlkeler ve Standartlar.....	21
7. DENTAL MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUK DEĞERLENDİRMELERİ.....	23
8. BİYOUYUMLULUK TEST YÖNTEMLERİ.....	24
9. İN-VİTRO TESTLER.....	24
9.1. Sitotoksisite Testleri.....	26
9.1.1. Hücre Kültürü Testleri.....	27
9.1.1.a. Direkt hücre kültürü metodu.....	29
9.1.1.b. Bariyer test metodu.....	29
9.1.2. Agar difüzyon test yöntemi.....	29
9.1.3. Filtre difüzyon test yöntemi.....	30
9.1.4. Dentin bariyer test yöntemi.....	30
9.2. Sitotoksisite Değerlendirmenin Belirleyici İşaretleri.....	31
9.2.1. Canlılık Değerlendirme Testleri.....	32
9.2.2. Yaşam Değerlendirme Testleri.....	32
9.2.3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri.....	32
9.2.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri.....	33
9.3. Genotoksisite/Mutajenite ve karsinojenite testleri.....	33
9.4. Histolojik prosedürler ve pulpal reaksiyonların analizi.....	34
10. HAYVAN DENEYLERİ.....	34
11. KLİNİK ÇALIŞMALAR (Kullanım Testleri).....	35
12. ADEZİV RESTORATİF DİŞ HEKİMLİĞİNDE BİYOUYUMLULUK.....	36
GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
1. Sitotoksik Etkinin Kalitatif Olarak Değerlendirilmesi.....	40
2. Sitotoksik Etkinin Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi.....	43
BULGULAR.....	48
TARTIŞMA.....	66
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	90
EKLER.....	91

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil I: Van Meerbeek ve arkadaşlarına (2003) göre adezivlerin sınıflandırılması

Şekil II: Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri için klasik paradigma

Şekil III: *İn-vitro* sitotoksosite çalışmamızın özeti

Şekil IV: Direkt temas testinin uygulanması

Şekil V: MTT testinin uygulanması

RESİMLER

Resim 1: *İn-vitro* sitotoksosite testlerinde kullanılan adeziv materyaller

Resim 2: A:Thoma lamının genel görünüşü

B: Thoma lamındaki sayım alanının büyütülmüş görüntüsü

C: Tripan mavisi boya atılım yönteminin mikroskopik görüntüsü

Resim 3: PB-OS ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler

Resim 4: OB-AIO ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler

Resim 5: GB ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler

Resim 6: CUB ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler

Resim 7: SBU ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler

TABLÖLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

TABLÖLAR

Tablo 1: Tıbbi cihazların biyolojik değerdendirme standardının (ISO-10993) bölümleri

Tablo 2: Test edilen adeziv materyaller ve özellikleri

Tablo 3: Sitotoksisite testleri esnasında uygulanan standartlar

Tablo 4: Test materyallerinin direkt temas testinde oluşturduğu reaksiyon zonunun tanımlanması

Tablo 5: Reaksiyon zonuna göre değerdendirilen numunelerin sitotoksisite dereceleri

Tablo 6: Test materyallerinin L929 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyonu sonucu elde edilen canlılık değerdeleri (%)

Tablo 7: MTT testi sonuçlarına ait iki yönlü varyans analizi tablosu

Tablo 8: MTT testi sonuçlarına ait Bonferroni testi tablosu

GRAFİKLER

Grafik I: PB-OS'nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

Grafik II: OB-AIO'nun L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

Grafik III: GB' nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

Grafik IV: CUB' nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

Grafik V: SBU' nun L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik

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

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

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

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cm	:	Santimetre
MTT	:	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
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
FDA	:	Food and Administration - Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ISO	:	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
⁵¹Cr	:	Sodyum kromat
°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

ÖZET

Beş Farklı Tek Aşamalı Self Etch Adezivlerin Hücre Kültürü Ortamında Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi

Diş hekimliğinde kullanılan adeziv rezinlerin, restorasyonları diş dokusuna güçlü bir şekilde bağlaması ve canlı dokular üzerine toksik etkili olmaması gerekmektedir. Günümüzde klinik kullanımı gittikçe artan self-etch adeziv sistemlerin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde, genellikle materyalin hücreler ile direkt temasta olduğu *in-vitro* sitotoksikite testleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde; test edilen materyalin hücre canlılığı, morfolojisi, membran bütünlüğü ve metabolik aktivite üzerinde meydana getirdiği değişiklikler değerlendirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan, polimerize edilmemiş beş farklı tek aşamalı self-etch adezivin [Prime&Bond One Select (PB-OS), Optibond All-in-One (OB-AIO), G-bond (GB), Clearfil Universal Bond (CUB), Single Bond Universal (SBU)] sitotoksik potansiyellerinin, hücre kültürü ortamında direkt temas yöntemiyle kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırılmasıdır.

Araştırmamızın ilk aşamasında; adeziv materyaller maymun böbrek epitelyal hücrelerine [CCL81(Vero)] direkt temas yöntemi ile uygulandı. Hücrelerin yoğunluğu ve morfolojilerindeki değişim ile birlikte, kültür ortamında oluşan reaksiyon zonları tanımlanarak sitotoksikite kalitatif olarak değerlendirildi. Sonuç olarak; SBU, CUB, GB ve OB-AIO gruplarında, test materyali etrafında veya altında 1cm'yi aşan zon oluşumu belirlendi. PB-OS grubunda ise zon sınırları 1cm'ye yakın bulundu.

İkinci aşamada ise; test materyallerinin dört farklı dilüsyonu (%1, %0.1, %0.01 ve %0.001) L929 fare fibroblast hücre kültürü ortamına ilave edildi. Üç farklı zaman periyodunda (24, 48 ve 72 saat) inkübe edilen test materyallerinin hücre proliferasyonuna etkileri MTT testi ile değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde; 24 saatlik inkübasyon süreci sonunda CUB'nin, 48 saatlik inkübasyon süreci sonunda GB ve SBU'nun, 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda ise OB-AIO'nun en sitotoksik materyaller olduğu belirlendi. Tüm adezivlerin sitotoksik etkisinin doza bağımlı olarak anlamlı derecede arttığı ve zamana bağlı olarak değişiklik gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Self-etch adezivler, hücre kültürü, sitotoksikite.

ABSTRACT

Evaluation of Cytotoxicity of Five Different One-Step Self-Etching Adhesives in Cell Culture Medium

Adhesive resins used in dentistry must strongly bond the restorations to the dental tissue and should not be toxic for vital tissues. In-vitro cytotoxicity tests in which cells directly contacted with material are usually used in determining cytotoxic effect of self-etch adhesive systems that are increasingly used in clinics today. By these methods; the changes caused on the cell vitality, morphology, membrane integrity and metabolic activity have been evaluated.

The purpose of this study is to make comparison of potential for cytotoxicity of five different one-step self-etching adhesives [Prime&Bond One Select (PB-OS), Optibond All-in-One (OB-AIO), G-bond (GB), Clearfil Universal Bond (CUB), Single Bond Universal (SBU)] that are widely used in dentistry with direct contact method as qualitative and quantitative in the cell culture medium.

In the first phase of our research; the adhesive materials were applied on monkey's kidney epithelial cell line [CCL81 (Vero)] with direct contact method. Cytotoxicity was assessed qualitatively by defining the reaction zones formed in the culture medium with changes in the density and morphology of the cells. As a result; in the SBU, CUB, GB, and OB-AIO groups, zone formation exceeding 1cm around and under the test material was identified. In the PB-OS group, zone formation borders were found about to 1 cm.

In the second phase; four different dilutions (1%, 0.1%, 0.01% and 0.001%) of the test materials were added to the L929 mouse fibroblast cell culture medium. The effects on cell proliferation of the test materials which was incubated in three different time periods (24, 48 and 72 hours) was assessed by MTT assay. In the statistical analysis of obtained results; it was found that after 24 hours period CUB, after 48 hours period GB and SBU, after 72 hours period OB-AIO were the most cytotoxic materials. It was observed that the cytotoxic effect of all adhesives significantly increased depending on dose and showed variety depending on time.

Key words: Self-etching adhesives, cell culture, cytotoxicity.

GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlık konusunda toplumsal bilinç düzeyinin ve estetik görünüme verilen önemin artması, özellikle restoratif diş hekimliğinde hasta ve hekim beklentilerini karşılayacak materyallerin geliştirilmesine sebep olmuştur. Böylece, diş dokularına daha güçlü bağlanabilen, çiğneme kuvvetlerine karşı dirençli ve düşük mikrosızıntıya sahip dental materyallerin üretilmesi yoluna gidilmiştir. Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyaller hem diş dokuları hem de çevre dokularla doğrudan veya dolaylı yoldan temas etmektedir. Bu nedenle; kullanılacak restoratif materyallerin canlı dokular üzerinde toksik olmaması, pulpanın canlılığını sürdürmesine yardımcı olması ve bakteri penetrasyonunu engelleyecek şekilde diş dokusuna güçlü bir şekilde bağlanması hedeflenmiştir.

Dental restoratif materyallerin neden olduğu sistemik, alerjik ve toksik reaksiyonlar oldukça nadirdir. Lokal olarak gelişen yan etkiler, genellikle materyale karşı aşırı hassasiyet ya da iltihabi değişikliklerdir. Konuyla ilgili yapılan araştırmalarda; gümüş, kalay, bakır, civa, krom ve nikel başta olmak üzere, kompozit rezinlerin organik bileşenleri ile bozunma ürünlerine karşı alerjik reaksiyonların gelişebildiği belirtilmiştir. Kompozit rezinlerin polimerizasyonu sonrası veya sonrasında birtakım artık monomerlerin salındığı tespit edilerek, sitotoksik etkilerinin artık monomerlerden kaynaklandığı iddia edilmiştir. Dentin üzerine direkt olarak uygulanan rezin materyallerin, pulpa ve dişetiyle yakın temasta olduklarından canlı dokular üzerinde biyouyumlu olmaları önem arz etmektedir.

Diş hekimliği teknolojisindeki tüm gelişmelere rağmen üstün mekanik özelliklere sahip, antimikrobiyal etkili ve biyouyumluluğu yüksek materyal ihtiyacı günümüzde halen devam etmektedir. Son yıllarda, asitleme ve primerleme aşamalarını ortadan kaldıran, kullanımı kolaylaştırılmış, diş sert dokularına kimyasal ve mikromekanik yolla bağlanabilen, kimyasal yolla ve ışıkla sertleşebilen self-etch karakterli kompozit rezin esaslı adeziv materyaller geliştirilmiştir. Günümüzde, diş dokularına iyi bağlanma ve klinik uygulama kolaylıkları nedeniyle diş hekimleri tarafından gün geçtikçe daha fazla kullanılan self-etch adeziv sistemlerin, uygulama aşamalarının sayısı azaltılmıştır. Adeziv sistemlerin içerdiği bileşenlerin, canlı diş dokuları üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için biyouyumluluklarının incelenmesi gerekmektedir. Bu materyallerin klinik olarak

yaygın şekilde kullanılmadan önce, çeşitli sitotoksosite testlerini başarıyla geçmeleri ve kabul edilebilir biyouyumluluğa sahip olanların kullanımına izin verilmesi gerektiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, adeziv materyallerin fiziksel özelliklerinin yanı sıra biyouyumluluklarının da arttırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Restoratif materyallerin biyouyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda genellikle; hücre kültürü yöntemi, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar kullanılmaktadır. Farklı *in-vitro* sitotoksosite test yöntemleri bulunmakla birlikte, restoratif materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarında; hücre canlılığı, morfolojideki değişiklikler, membran bütünlüğü ve metabolik aktivite araştırılmıştır.

In-vitro hücre kültürü yöntemleri; hızlı, uygulanması kolay, kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve maliyeti düşük olan testlerdir. Ancak bu test sonuçlarının, *in-vivo* şartlarla uyumluluğu henüz tartışmalıdır. Çünkü, canlı organizmalarda kullanılan materyale karşı kompleks biyolojik cevaplar gelişmektedir. Yabancı bir maddenin neden olacağı ilk hücresel cevap, immün sistem tarafından verilmektedir. Materyalin kompozisyonu ve sitotoksitesi gibi faktörler, enflamasyona ve doku hasarına neden olur. Sitotoksik bir materyal, hücre büyümesi ve çoğalmasını engelleyerek apoptozis veya nekroza yol açabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan, beş farklı tek aşamalı self-etch adeziv materyalin (Prime&Bond One Select, Optibond All-in-One, G-bond, Clearfil Universal Bond, Single Bond Universal) sitotoksitelerinin hücre kültürü ortamında kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesidir.

GENEL BİLGİLER

Modern diş hekimliğinde; sağlıklı diş dokusu korunarak, çiğneme kuvvetlerine ve polimerizasyon büzülmesine karşı koyabilen ve hastaların estetik beklentilerini karşılayabilen restorasyonların elde edilmesi amaçlanmaktadır. Günümüzde minimal madde kaybını esas alan ve diş yapısını korumayı öngören daha konservatif yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Teknolojinin ilerlemesi ve adeziv diş hekimliğinde yeni materyallerin gelişmesiyle beraber, çürük tedavisi konusunda oldukça büyük değişiklikler gerçekleşmiş, daha beyaz dişlere ve estetik gülüşe sahip olma arzusu artmıştır. Adeziv sistemler sayesinde, sağlıklı diş dokusunun kaldırılması önlenmiş, kavite boyutları küçültülmüş, diş dokuları ve restoratif materyal arasında gerçekleşen mikromekanik kenetlenme sayesinde oral sıvıların, bakteri ve bakteri ürünlerinin geçişi engellenebilmiştir. Bu sayede klinik başarıyı olumsuz etkileyen; hassasiyet, kenar renklenmesi, sekonder çürük gibi problemler en az seviyeye indirilmiştir. Adeziv sistemlerin klinik başarısında; mine ve dentin yüzeyleri ile restoratif materyal arasındaki bağlanmanın niceliği ve niteliği büyük önem arz etmektedir. Güncel adeziv sistemlerin temelini, diş dokularındaki inorganik yapının adeziv sistemlerdeki rezin monomerlerle yer değişim özelliğine dayanması, hem diş dokularının yapısının hem de adeziv sistemlerin çok iyi anlaşılmasını zorunlu kılmaktadır (1, 2).

1. MİNERİN YAPISI

Minerin kimyasal içeriğini ağırlıkça yaklaşık olarak %96 oranında inorganik, %1 oranında organik yapı ve geri kalanını da su oluşturmaktadır. Minerin inorganik yapısı hidroksiapatit yapısında olan kalsiyum-fosfat kristallerini, sodyum, magnezyum, karbonat, klor, potasyum, çinko, silisyum, stronsiyum ve flor gibi elementleri ihtiva etmektedir. Hekzagonal şekilli olan hidroksiapatit kristalleri bir araya gelerek minerin ana yapısını oluşturan prizmaları meydana getirmektedir. Organik yapı ve su, mine prizmalarını oluşturan hidroksiapatit kristalleri arasında dağılmış şekilde bulunmaktadır (3, 4).

2. DENTİNİN YAPISI

Dentin dokusu; birbirine paralel, kalsiyumdan fakir, karbonattan zengin apatit

kristalleriyle dolu kollajen matriksten meydana gelmiş olup, dişin hacimsel olarak en büyük bölümünü oluşturmaktadır. Dentinin kimyasal kompozisyonunun %50'sini mineral, %20'sini plazma sıvısına benzer sıvı ve %30'unu Tip I kollajenlerin oluşturduğu organik matriks oluşturmaktadır. Ağırlıkça %70 inorganik materyal, %20 organik materyal, %10 su ve diğer maddelerden meydana gelmektedir. İnorganik yapının büyük bölümünü hidroksiapatit kristalleri oluşturmaktadır. Dentinin en önemli yapı elemanlarından biri de odontoblast hücrelerinin uzantısı şeklinde pulpa odasından mine-dentin birleşimine kadar uzanan ve dentin boyunca sıvı difüzyonunun gerçekleştiği tübüllerdir. Tübüllerin içinde odontoblastik uzantılar ile beraber dentin sıvısı vardır. Pulpa odasına doğru birbirlerine yaklaşan tübüller, mine-dentin sınırında sayıca azalmaktadır. Dentin, tübüllerden geçerek pulpal reaksiyonlara neden olabilecek maddelerin konsantrasyonlarını azaltma işlevini gerçekleştiren bir bariyer işlevi görmektedir (5, 6).

Dentin dokusunun geçirgenliği, materyallerin dentine bağlanması ve pulpa üzerindeki biyolojik etkileri bakımından önemlidir. Dentin geçirgenliği en fazla pulpa yakınında veya pulpa boynuzları civarında görülmektedir. Pulpaya yaklaşıldıkça mm^2 'deki tübül sayısı ve çapının artış göstermesi, tübüller arası kollajenin derin dentinde daha az olması bu geçirgenlik farklılığını açıklamaktadır. Dentinin geçirgenliğini azaltan faktörlerden biri ise kavite preparasyonu sırasında meydana gelen, organik ve inorganik yapılardan oluşan smear tabakasıdır. Dentin geçirgenliği iki farklı şekilde tanımlanmaktadır. İlki, dentin hassasiyetinden veya ağrıdan sorumlu tutulan ve sıvının dentin tübülleri içinden akışı olarak tarif edilen intratübüler geçirgenliktir. Bu tür geçirgenliğe örnek olarak; maddelerin dentin sıvısı ile dolu tübüllerden difüzyon yoluyla pulpaya ulaşması veya rezin monomerlerin dentin tübülleri içine doğru penetre olması verilebilir. İkinci tip geçirgenlik ise, monomerlerin intertübüler dentine difüzyonu olarak tarif edilen intertübüler dentin geçirgenliğidir. Bu tür geçirgenlikte monomer infiltrasyonu ve sonucunda hibrit tabakanın oluşması için, kollajen fibrillerin açığa çıkması ve demineralize olması gerekmektedir. Monomerlerin, demineralize olmuş dentinin kollajen fibrilleri arasındaki boşluklara infiltrasyonu difüzyon yoluyla gerçekleşmektedir. Monomerlerin difüzyonunda, primer veya bağlayıcı ajan içindeki farklı molekül ağırlığına sahip monomerlere ve zamana bağlı farklılıklar görülmektedir.

Demineralize mine ve dentin içine düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin difüzyon oranı daha fazla iken, uzun süre zarfında difüzyon oranı daha az olan monomerler bile daha derinlere difüze olabilmektedir (7-9).

2.1. Dentin Geçirgenliği ve Monomer Difüzyonunu Etkileyen Faktörler

Yüksek su miktarı ve asidik pH gibi durumlarda, kollajen fibrillerin çapı ve uzunlukları artmakta, fibriller arası boşluk azalarak monomerlerin kollajen ağının içine infiltrasyonu zorlaşmaktadır. Hava ile kurutma ve çözücülerin dehidratasyon yapması gibi durumlarda ise, kollajen fibrillerin çapları azalarak küçülmekte ve fibriller arası boşluklar artmaktadır. Monomerlerin demineralize dentin matriksi içine difüze olmaları ve polimere dönüşümü, intertübüler dentin içindeki suyun miktarına bağlı olarak değişmektedir. Yüzeydeki su uzaklaştıktan sonra pulpadan tübüllere doğru daha çok sıvı akışı olacağı için, pulpayla direkt bağlantılı olan bölgelerin dehidrate olması zorlaşacaktır. Adeziv monomerlerin difüzyonu; çözücü içerisindeki çözünabilirliklerine, konsantrasyonlarına, penetrasyon için verilen zamana, monomerin difüzyon katsayısına ve substrata karşı olan afinitesine bağlı olarak farklılaşmaktadır. Hibrid tabakasını oluşturan monomerlerin infiltrasyonunda, tübüllerin sahip olduğu lateral yan dalların rezinler tarafından doldurulması da önemlidir (10-12).

3. DIŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN ADEZİV SİSTEMLER

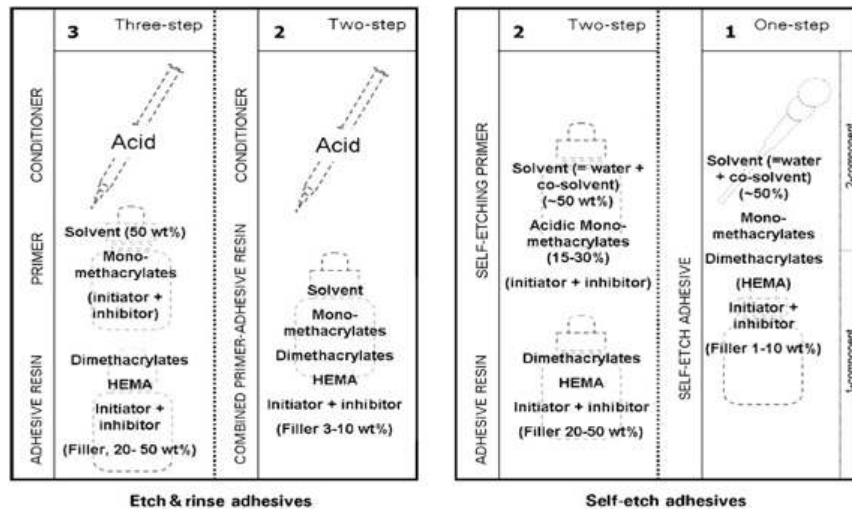
Adeziv diş hekimliğinin temeli, diş dokularındaki inorganik yapının bağlayıcı ajanlardaki sentetik rezinlerle yer değiştirme özelliğine dayanmaktadır. Dental adezivlerin bağlanma kapasitesi, iki katlı adezyon temeline dayanır. İlk olarak mineye ve dentine bağlanan adeziv, ikinci olarak kompozit tabakasına bağlanır. Mine ve dentine bağlanma mikromekanik adezyon ile açıklanırken, kompozite bağlanma oksijen inhibisyon tabakasındaki artık ikili bağların ko-polimerizasyonu ile ifade edilmektedir. Bu durum, polimerizasyon sırasında rezin monomerler ile inorganik diş yapısının birbirine sıkıca kenetlenmesiyle sağlanır. Mikromekanik retansiyon; bir difüzyon süreci olup, minede meydana gelen boşlukların ve dentinde korunmasız kalan kollajen ağının rezin ile basit bir kenetlenmesidir. Mikromekanik kenetlenme sırasıyla; demineralizasyon, rezin infiltrasyon ve polimer düzenlenmesi şeklinde

oluşmaktadır. Mine ve dentinin belli bir miktar deminerilize olmasının yanında, rezin bileşenlerin ıslatma, difüzyon, penetrasyon ve polimerizasyon kapasiteleri de oldukça önemlidir (13-16).

Mikromekanik adezyon, diş sert dokuları ile restoratif materyallerin bağlanması için temel faktör olarak kabul edilir. Dental adeziv kullanımının asıl amacı; diş dokuları ve adeziv rezin arasında gerçekleşen mikromekanik kenetlenme sayesinde, kompozit dolgu ya da rezin simanlara retansiyonu sağlamaktır. Restorasyonların klinik başarısızlığı; retansiyon kaybına bağlı mikrosızıntı, hassasiyet, kavite marjinlerinde renk değişikliği ve sekonder çürük olarak karşımıza çıkmaktadır. İyi bir adeziv restorasyon, mekanik kuvvetlere dirençli olmanın yanı sıra, özellikle kompozit tabakasından kaynaklanan büzülme streslerinin kavite kenarlarında neden olduğu mikrosızıntıyı önleyebilmelidir (17, 18).

3.1. Adeziv Sistemlerin Sınıflandırılması

Adeziv sistemler, geçmişte üretim süreçleri dikkate alınarak yedi farklı jenerasyon şeklinde veya bağlayıcı sistemlerin smear tabakasıyla ilişkisine göre; smear tabakasını modifiye eden, tamamen kaldıran veya çözen bağlayıcı ajanlar olarak sınıflandırılmıştır. Günümüzde geçerli olan sınıflamada ise, klinik uygulama basamakları göz önünde bulundurulmuş ve ayrıca diş dokularıyla etkileşim ön planda tutulmuştur. Dental adeziv sistemler bu sınıflamaya göre; total-etch, self-etch ve cam iyonomer adeziv sistemler adı altında üç ana başlıkta incelenmektedir (Şekil I) (19, 20).



Şekil I: Van Meerbeek ve arkadaşlarına (2003) göre adezivlerin sınıflandırılması.

3.1.1. Total-etch Adeziv Sistemler

Genel olarak smear tabakasının uzaklaştırılmasını hedefleyen bu sistemler; yüzeyel dentinde demineralizasyon alanları oluşturarak mikromekanik adezyon ve difüzyon temeline dayalı bir bağlanma sağlamaktadır. Total-etch tekniğinde 4. ve 5. kuşak adeziv sistemler kullanılmaktadır. 4. kuşak adezivler; asit + primer + adeziv rezin uygulamalarını içeren üç basamaklı bir sistemdir. 5. kuşak adezivler ise; asit + primer ve adeziv rezin uygulamalarının tek basamakta toplandığı iki basamaklı bir sistemdir. 5. kuşak sistemlerde; çözücü ve monomer rezin içeriğinin tek şişede toplanması ve organik çözücünün suyla hızla yer değiştirmesi nedeniyle primer solüsyonunun uygulanmasına gerek kalmaz. Su, etanol veya aseton gibi çözücülerde çözünmüş olan primer solüsyon dış yüzeyine adezyonu arttırmaktadır. Primerin içerisinde, kollajen ağının ıslanabilirliğini ve tekrar genleşmesini sağlayan ve adeziv rezinin bağlanma gücünü arttıran hidrofilik HEMA (Hidroksietil metakrilat) monomeri bulunmaktadır. Çözücü içermeyen hidrofobik monomerlerden oluşan adeziv rezin ise doldurucu partiküller içermektedir. Adeziv rezin, kollajen lifler arasındaki boşluğu doldurarak polimerizasyon işleminin ardından rezin tagların oluşumunu sağlar ve mikromekanik bağlanmayı gerçekleştirir (6, 21-23).

Günümüzde çoğunlukla iki aşamalı olarak kullanılan total-etch sisteminde ilk aşama, pürüzlendirme ve yıkama (etch and rinse) şeklindedir. Mine ve dentin dokuları aynı anda fakat farklı sürelerde pH değeri 0.1-0.4 ve konsantrasyonu %34-37 arasında değişen fosforik asit jeli ile pürüzlendirilmektedir. Total-etch adeziv sistemler minede etkin ve uzun süreli bağlanma başarısına sahip iken, dentin uygulamaları oldukça yüksek teknik hassasiyet gerektirmektedir. Dental restoratif materyaller ile mine dokusu arasında adeziv bir bağlantı gerçekleştirebilmek ve mine yüzeyinde mikroskobik seviyede pürüzlülük oluşturabilmek için, belirli konsantrasyonda asit uygulanmasına ihtiyaç vardır. Böylece minenin temizlenmesi, pürüzlülüğün sağlanması ve yeterli monomer infiltrasyonu gerçekleştirmek için mine yüzey enerjisinin artırılması gerekmektedir. Bu durum, mine yüzey geriliminin azalmasına neden olur. Yüzey ıslanabilirliğinin artmasından dolayı, düşük viskoziteli rezinin mikroboşluklara penetrasyonu daha kolay gerçekleşmektedir. Ayrıca, bu uygulama sayesinde mikroorganizma sayısında %75-95 oranında bir azalma görülmektedir. Mine yüzeyinde oluşan pürüzlülük yapısı; kullanılan asidin

çeşidi, formu, konsantrasyonu ve uygulama süresinin yanı sıra, minenin kimyasal yapısı, prizmaların varlığı, içerdiği florür ve demineralizasyon miktarı gibi birçok etkene bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Mine yüzeyini pürüzlendirmeyi takiben uygulanan bağlayıcı ajanlar sonrasında, mine prizmalarının etrafında makrotaglar, mine prizmalarının iç yüzeylerinde mikrotaglar izlenmektedir (24, 25).

Kavite preparasyonu esnasında; debris, denature kollajen, hidroksiapatit ve mikroorganizmalardan meydana gelen, ortalama 0.5-2µm kalınlığında bir smear tabakası ve dentin tübülleri içinde 1-3µm'lik smear tıkaçları oluşmaktadır. Smear tabakası ve tıkaçları, dentin sıvısının hareketini ve dentin tübüllerine veya intertübüler dentine difüzyonu azaltan doğal bir dentin bariyeri olarak davranır. Bu nedenle, total pürüzlendirmeli adeziv sistemlerde bağlayıcı ajandan önce asit uygulaması ile tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir. Böylece, intertübüler ve peritübüler dentin demineralize olurken, 3-10µm'lik derinlikte kollajen ağının açığa çıkması sağlanır. Dentinde fosforik asitle 15sn'lik asitleme işlemi sonucunda, kollajen yapısına zarar verilmeden yüzeyel kollajen fibrillerinin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Total-etch sistemler kullanıldığında, dentinde kollajen ağının çökmemesi için bir miktar neme ihtiyaç vardır. Bunu sağlamak amacıyla, iki farklı yaklaşım önerilmektedir. İlk yaklaşım, asit uygulanmış dentinin havayla kurutulmasının ardından çöken kollajen ağının, primer uygulaması sonucu tekrar geliştirilmesidir. Diğer yaklaşım ise, yıkama işleminin ardından dentinin tümüyle kurutulmayarak hafif nemli bırakılmasıdır. Bununla birlikte, gereğinden fazla bırakılan nem, rezinin bağlanma dayanıklılığını olumsuz yönde etkilemektedir (22, 26-28).

Dentinin asitle muamelesi; kollajen ağını açığa çıkartarak, hidroksiapatitleri ortamdaki uzaklaştırır ve rezinin açığa çıkmış kollajen ağı içine infiltrasyonu ve hibridizasyonu sayesinde hibrit tabakası ile bağlantı gerçekleşir. Ancak, burada bir kimyasal bağlantıdan söz etmek mümkün değildir. Çünkü monomerlerin fonksiyonel gruplarının, hidroksiapatitin uzaklaştığı kollajene çok zayıf bir afinitesi vardır. Düşük viskoziteli adeziv rezin, açığa çıkarılan kollajen içerisine penetre olur ve bunun polimerizasyonu ile birlikte yüzeyel dentin ve tübül duvarlarında mikromekanik kenetlenme gerçekleşir. Böylece oral sıvılar ve asitlere karşı dirençli bir hibrit tabakası meydana gelir. Bağlayıcı ajanın dentin tübülleri içerisine sızarak polimerize

olması bağlantı kuvvetini arttırmanın yanı sıra, rezin-dentin ara yüzündeki bağlanma alanında bir hasar oluşması halinde tübül ağzlarını tıkayarak muhtemel pulpa hasarını önleyebilecektir. Asitle pürüzlendirmenin diğer bir önemi ise, çürükten etkilenmiş dentinde bakteri sayısını oldukça azaltmasıdır. Pürüzlendirme amacıyla uygulanan asitlerin hipertonic yapıda olması, dentin sıvısının pulpadan mine-dentin sınırına doğru hareketini desteklemektedir. Böylece, tübüllerden dışarı akan sıvı hem asidi seyreltmekte hem de dentine daha az infiltre olmasına neden olmaktadır. Kullanılan asidin tipi, uygulama süresi, konsantrasyonu, pH'sı ve viskozitesi de demineralizasyon derinliğini etkileyen diğer faktörlerdir (24, 29, 30).

Asit uygulamasını takiben ikinci aşama; aseton, etanol veya su gibi organik bir çözücü ve bifonksiyonel rezin monomerler içeren bir primer ajan uygulanmasıdır. Bifonksiyonel yapıdaki monomerler; hidrofilik özellikleri sayesinde açığa çıkan kollajen fibriller arasına penetre olabilmekte, hidrofobik özellikleri ile de adeziv rezinle birlikte polimerize olabilmektedir. Bununla birlikte primer ajan; açığa çıkmış kollajeni desteklemenin yanı sıra, HEMA gibi hidrofilik bir monomer ile kaplayarak kollajen ağ fibrilleri arasında bulunan 15-20nm'lik doğal mesafeyi korumaktadır. Böylece primer, nemli kollajen ağdaki su ile yer değiştirirerek, nano boşluklara monomer infiltrasyonunu gerçekleştirmektedir (31, 32).

İdeal bir penetrasyon ve hibridizasyon sağlamak amacıyla, asitle pürüzlendirme ve yıkama işlemlerinden sonra bağlayıcı ajanın nemli dentin üzerine uygulanması (wet bonding) gerektiği bildirilmiştir. Aşırı kurutma sonucunda, kollajen ağın çökecek olmasından dolayı, uygulanan adeziv rezinin kollajen ağ içine penetrasyonu kısıtlanacak ve ideal bir hibrit tabaka oluşamayacaktır. Bununla birlikte, klinik ortamda ideal bir nem düzeyinin elde edilmesi, teknik hassasiyet gerektirdiğinden her zaman mümkün olamamaktadır. Dentin yüzeyinde arta kalan fazla suyun, bağlanmayı olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Demineralize dentine infiltre olmuş ve çözücüsü uzaklaşmış monomerlerin arasına giren fazla su, hibrit tabaka içerisindeki bazı bölgelerin sudan zengin ancak rezinden fakir hale gelmesine ve dolayısıyla nanosızıntıya neden olmaktadır. Nanosızıntı bölgeleri; rezinle kaplanmamış korunmasız kollajen alanlar oluşturarak, zaman içerisinde bağlanma bölgesinde bozulmalar meydana getirmektedir (33-35).

3.1.2. Self-etch Adeziv Sistemler

Uygulama süresini ve teknik hassasiyeti azaltmak amacıyla total-etch sistemlere alternatif olarak, ilk kez 1990'lı yılların başında piyasaya sürülen self-etch adeziv sistemler; diş yüzeyini kendiliğinden asitle pürüzlendirme özelliğine ve yıkama ve kurulama işlemi gerektirmeyen polimerize olabilen monomer içerikli primerlere sahiptir. Self-etch sistemlerde; total pürüzlendirme sistemlerinde oldukça sık karşılaşılan dentinin aşırı pürüzlmesi, çöken mineraller sebebiyle monomer infiltrasyonunun kısıtlanması, kollajen ağın çökmesi, post-operatif hassasiyet ve düşük bağlanma gibi sorunlarla daha az karşılaşılmaktadır. Bu sistemlerde; klinik uygulama zamanı kısalmış, nemli bağlanma tekniğini kullanma mecburiyeti ortadan kalkmış ve böylece teknik hassasiyet gerekliliği azalmıştır. Asidik monomerlerin mine ve dentin yüzeylerinde pürüzlendirme ve primer uygulama işlemleri eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Self-etch adeziv sistemlerde; mine ve dentinde demineralizasyon oluşturularak smear tabakası modifiye edilmekte, monomerin infiltrasyonu ve polimerizasyonu ile interdifüzyon alanı oluşmakta ve yüzeyel dentindeki kalsiyum ile kimyasal bağlanma sağlanabilmektedir. Monomer difüzyonu, açığa çıkan kollajenin etrafını sararak hibrit tabakayı oluşturmaktadır. Smear tabakasının kalınlığı, primerin pH'sı, viskozitesi ve nemlendirme kapasitesi gibi faktörler self-etch adeziv sistemlerin infiltrasyon ve demineralizasyon derinliğini etkilemektedir. Asit ve primer işlevi görebilen bu sistemlerin asiditesi, dentin sıvısının tamponlama potansiyelini aşacak kapasiteye sahip olmalıdır. Ayrıca, smear tabakasına difüze olduğunda suyla yer değiştirebilecek yeterli monomer içermelidir (20, 22, 36-38).

Self-etch adezivler; iki ve tek basamaklı olabildikleri gibi, asiditelerine göre zayıf, orta ve güçlü olarak sınıflandırılırlar. İlk üretilen self-etch adezivler, dentin ve mine yüzeyinin self-etch primer ile düzenlenmesini takiben adeziv rezin uygulanması şeklinde kullanıma sunulmuştur. İki basamaklı self-etch sistemler; asit ve primer işlevi gören hidrofilik primerle kombine edilmiş asidik monomerin ve hidrofobik adeziv rezinin yer aldığı iki farklı şişeden oluşur. Çözücü içeriği sudan ibaret olan, asidik primer ve adeziv rezin solüsyonlarının dişe ayrı ayrı uygulandığı tiplerinin yanı sıra, ayrı şişelerdeki asidik primer ve adezivin eşit miktarlarda karıştırılarak tek aşamada dişe uygulandığı tipleri vardır. Total-etch tekniğine oranla mineda daha az

etkili olan bu sistemlerle, yüzeyel dentine 25MPa civarında bağlanma kuvvetleri elde edilebildiği bildirilmiştir. Tek aşamalı self-etch adeziv sistemlerde ise; asit, primer ve adeziv rezin uygulama basamakları birleştirilerek, günümüzde “all-in-one” self-etch sistemler üretilmeye başlanmıştır. Bu sistemler; yapılarındaki hidrofilik asidik rezin monomerin fazla olması sebebiyle nemli dentin yüzeyi oluşturmada oldukça etkili olsalar bile, bu durum uzun dönemde hidrolitik degradasyona neden olmaktadır. Tek basamaklı self-etch sistemlerin avantajı, hidrofobik ve hidrofilik monomerlerin aynı şişede toplanması ve böylece klinik uygulama basamağı ve süresinin azaltılmasıdır. Bununla birlikte, düşük olan bağlanma kuvvetleri sorun oluşturmakta ve su dentin yüzeyinden tamamen uzaklaştırılamadığı için rezinin polimerizasyonu olumsuz yönde etkilenerek nanosızıntı riski artmaktadır (22, 39-41).

Self-etch adeziv sistemler, pH değerlerine ve asitleme potansiyellerine göre; güçlü ($\text{pH} < 1$), orta ($1 \leq \text{pH} \leq 2$) ve zayıf ($\text{pH} > 2$) olarak sınıflandırılmaktadır. Asitle pürüzlendirmede; uygulanan asidin konsantrasyonu, formu, uygulama süresi ve yöntemi, diş dokusunun mineral içeriği ve geçirgenlik düzeyi oldukça önemlidir. Genellikle %32-40’lık fosforik asit veya buna alternatif olarak %20’lik poliakrilik asit, %10’luk piruvik ya da sitrik asit, %2,5-10’luk maleik asit, %1,5-3,5’luk oksalik asit, %2,5’luk nitrik asit, sialik veya benzoik asit kullanılmaktadır. Mine yüzeyinde en iyi sonuçların %37’lik fosforik asit uygulamasıyla elde edildiği, zayıf asiditeli self-etch sistemlerin smear tabakasını kaldırmada yetersiz kaldığı belirtilmiştir. Düşük pH değerine sahip olan self-etch adezivler; dentinde total pürüzlendirmeli adeziv sistemlere benzer bir demineralizasyon sağlayarak hidroksiapatitleri dentin yüzeyinden tamamen uzaklaştırmaktadır. Düşük hidrolitik stabiliteye sahip çözülmüş kalsiyum fosfatın yıkanarak uzaklaştırılamaması ve rezin monomerlerin derin demineralize bölgelere tam olarak sızamamasından dolayı birtakım mikro-boşluklar meydana gelmektedir. Ayrıca, kollajenle stabil bir kimyasal etkileşim gerçekleşmemesinden dolayı, eksik hibridizasyon sonucu bağlanma kuvvetleri ciddi bir şekilde zayıflamaktadır. Orta asiditeli self-etch primer uygulamasıyla, hibrit tabakanın en üst kısmı tamamen, tabanı ise kısmen demineralize olmaktadır. Orta asiditeli self-etch sistemlerde, hibrit tabakanın en derin bölgesi dahi hidroksiapatit içerdiği için, hibrit tabakadan altındaki etkilenmemiş dentine kademeli bir geçişin gözlenmesi önemli bir avantajdır. Hibrit tabakanın tabanında bulunan hidroksiapatit,

kimyasal bağlanmayı mümkün kılmaktadır. Bu tür adezivler, zayıf asiditeli self-etch sistemlere oranla mine ve dentine daha iyi bir mikromekanik kilitlenme sağlamaktadır (6, 22, 26, 42).

3.1.3. Cam İyonomer Adeziv Sistemler

Cam iyonomerler; diş yüzeyine herhangi bir uygulama yapılmadan ve bir aracı madde gerektirmeden kendiliğinden kimyasal olarak bağlanabilen tek restoratif materyal olma özelliğini korumaktadır. Ancak, zayıf polialkenoik asit ile bir ön muamele yapılmasının bağlanma etkinliğini arttırdığı belirtilmektedir (43).

4. DENTAL ADEZİVLERİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ

Adezivler geleneksel olarak; akrilik rezin monomerler, başlatıcılar, inhibitörler, çözücüler ve bazı doldurucu partiküller içermektedir. Her bir komponent özel bir fonksiyona sahiptir ve bunların bilinmesi adezivin potansiyelini belirlemek açısından oldukça önemlidir.

4.1. Akrilik Rezin Monomerler

Dental adezivler, kompozit tabakasıyla iyi bir kovalent bağ oluşturabilmesi amacıyla, kompozit materyallere benzer olarak rezin monomerler içermektedir. Adezivlerde matriks olarak adlandırılan polimerize olmuş rezinler, kimyasal süreklilik ve fiziko-mekaniksel özellikler bakımından omurga işlevi görmektedir. Bu nedenle monomerler, adezivlerin en önemli bileşeni olarak düşünülmelidir. Monomerler temel olarak, çapraz bağlayıcılar ve fonksiyonel monomerler olmak üzere ikiye ayrılırlar. En yaygın monomerler, akrilatlar ve metakrilatlardır. Akrilat ve metakrilatlar arasındaki temel farklılık; akrilatların ikili bağlarının çok daha duyarlı olması ve bu nedenle biyouyumluluk ve raf ömrü sorunu oluşturmalarıdır (44, 45).

Bu monomerlerden metakrilik asit (MA) güçlü iritan ve koroziv etkisi nedeniyle, metil metakrilat (MMA) ise alerjik reaksiyon oluşturma riski yüksek olduğu için adezivlere çok nadir eklenmektedir. Diş hekimliği dışında da yaygın kullanım alanı olan HEMA (2-hidroksietil metakrilat), nispeten iyi biyouyumluluk sergileyen bir monomerdır. Polimerize olmamış HEMA; su, etanol ve/veya asetonla iyi çözünmekte ve az da olsa adeziv solüsyonlardan buharlaşabilmektedir.

HEMA'nın diğerk bir önemli özelliğı, deminerilize ajan olarak kullanılması da hidrofilik yapısı nedeniyle mükemmel bir adezyon arttırıcı olmasıdır. Dentinin ıslanmasını arttırarak, bağlanma kuvvetini önemli ölçüde geliştirir. Di-HEMA-fosfat ve HEMA-fosfat monomerleri, mine ve dentinde derin deminerilizasyon oluşturan, düşük bir pH sergilemektedirler. Di-metakrilatlardan Bis-GMA (bisfenol-A glisidil metakrilat), UDMA (üretan dimetakrilat), ve TEGDMA (trietilen glikol dimetakrilat); adeziv sistemlerde en sık kullanılan çapraz bağlayıcı monomerlerdir. Doğrudan sıkı çapraz bağlı polimerler oluşturarak adeziv sistemlere mekanik güç sağlarlar (23, 45-49).

Monomerlerin serbest uçları; hem fonksiyonel hem de polimerize olabilen grupları tutması haricinde, polimerlerin özellikleri üzerine önemli etkiye sahiptir. Elde edilen polimerlerin fiziko-mekanik kuvvetlerinin belirlenmesinde, dönüşüm oranları önemli yer tutar. Dönüşüm nadiren tamamlanır, genellikle dental kompozitlerde ve özellikle basitleştirilmiş adezivlerde dönüşüm derecesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Düşük dönüşüm oranları; düşük mekanik kuvvetler haricinde, yüksek geçirgenlik, daha fazla su emme, nanosızıntının artması, dış-kompozit bağlantısının bozulması, polimerize olmamış artık monomerlerin daha fazla sızması ve dolayısıyla dental adezivlerin daha az biyouyumluluğı ile sonuçlanmaktadır. Son yıllarda, rezin monomerlerin biyouyumlulukları konusu sıklıkla gündeme gelmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, artık monomerlerin polimerizasyon sonrası tükürükte çözünebileceğı ve rezin bozulmasının ağız içinde monomerlerin daha fazla salınmasına yol açabileceğı gösterilmiştir. Monomerlerin sitotoksik etkilerinin yanı sıra, potansiyel endokrin-yıkıcı etkileri de endişeleri arttırmıştır (44, 50, 51).

4.2. Başlatıcı Sistemler

Rezindeki monomerlerin polimerleşmesi, radikal bir polimerizasyon reaksiyonu sayesinde gerçekleşir. Bu reaksiyonun meydana gelmesi için, polimerizasyon reaksiyonları sırasında harcanacak olan başlatıcıların küçük bir miktarı yeterlidir. Oluşan radikaller, radikal polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirmektedirler. Radikaller bir dizi termal, fotokimyasal ve redoks yöntemleriyle üretilebilmektedir. Redoks başlatıcılar başka bir bileşen karışımına ihtiyaç duyarken (kimyasal ya da kendiliğinden polimerizasyon), foto-aktive

başlatıcılar elektromanyetik enerjiyi absorbe ederler (ışıkla polimerizasyon). Foto-aktivasyon ve kendiliğinden polimerizasyon arasındaki seçim, adeziv sistemin amacına bağlıdır. Işık ile başlatılan polimerizasyonun asıl avantajı, reaksiyonun başlamasının kolay kontrolüdür. Bununla birlikte, ışığın adezive ulaşmasının engellendiği zamanlarda, self-polimerizasyon sistemi daha iyi bir seçimdir. Adeziv sistemler foto-başlatıcılar kullanan kompozit dolguların bağlanması için üretilirken, rezin-bazlı simanlar kimyasal-başlatıcılara dayanır. Hem foto-başlatıcılar, hem de kimyasal-başlatıcılar eklendiği zaman, adeziv sistem “dual-cure” olarak adlandırılır. Dual-cure rezinlerde iki mekanizmanın birlikte kullanılmasının amacı, başlangıçta polimerizasyonu arttırmak ve sonrasında özellikle ışık kaynağından uzak ve gizli kalan bölgelerde daha yüksek bir dönüşüm derecesi sağlamaktır. Birçok bileşen ışık enerjisini emerek radikallerine ayrışabilir. Serbest radikaller, birkaç mekanizma tarafından üretilebilmesine rağmen, genellikle gerekli dalga boyunun emilmesi (uyarılma) sonrasında, serbest radikal ürünlerine ayrışırlar. Bazen de serbest radikalleri oluşturmak amacıyla, ikinci bir molekül (ko-başlatıcı) ile foto-başlatıcı bir biyomoleküler reaksiyona girebilirler (44, 52, 53).

Başlatıcıların eklenmesi; sitotoksikite ile ilişkili serbest radikalleri oluşturmalarından dolayı, adezivlerin biyoyumluluğunu azaltmaktadır. Ko-başlatıcı olarak kullanılan aminlerin biyoyumluluğunun sınırlı olduğu, hem toksik hem de mutajenik oldukları bildirilmiştir. Adeziv ve kompozitlerde en sık kullanılan foto-başlatıcılar arasında ko-başlatıcılar ile birleştirilmiş kamforokinon bulunmaktadır. Ancak, bu başlatıcı genellikle çok az miktarlarda (%0.03-0.1) kullanılsa bile, adeziv rezinin rengini önemli derecede etkileyecek şekilde sarımsı-kahverengi bir renge sahiptir (47, 54, 55).

4.3. İnhibitörler

Zamanından önce tepkimeye giren başlatıcılardan kaynaklanan serbest radikalleri temizleyebilen inhibitörler, aslında dental rezinlere ilave edilen anti-oksidanlardır. Adezivlerde en sık kullanılan inhibitörler; butillenmiş hidroksitoluen veya butilhidroksitoluen ve monometil eter hidrokinondur. Her iki inhibitörün de rezinlerden ayrıştırıldığı gösterilmiş olduğundan, bu bileşiklerin biyoyumluluk için dikkatli değerlendirmeleri gerekmektedir (44, 56).

4.4. Çözücüler

Çözücüler bir veya daha fazla maddeyi çözebilen ya da ayrıştırabilen maddelerdir. Adezivlerde yaygın olarak kullanılan çözücüler su, etanol ve asetondur. Bu organik çözücülerin adezivlerdeki yaygın kullanımları ucuzlukları, geniş ölçüde ulaşılabilirlikleri ve birçok diğer çözücülerin toksik olmasından dolayı uygun biyouyumlulukları ile açıklanabilmektedir (57, 58).

4.5. Doldurucular

Kompozit rezinlerin tamamı doldurucu partikül içermesine rağmen, bu durum adeziv rezinler için geçerli değildir. Restorasyonu diş dokusuna direkt bağlayan adeziv sistemler, geleneksel olarak doldurucu partiküller içermektedir. Doldurucular, adezivlere birkaç sebepten dolayı eklenebilmektedir. Kompozit dolgu ve diş arasında konumlanan adeziv rezin tabaka, düşük gerilme kuvveti ve düşük elastik modülünden dolayı zayıf bir bağlantı olarak değerlendirilmektedir. Kompozit ile karşılaştırıldığında, birçok yazar doldurucu eklendiğinde adeziv tabakanın kuvvetlenebileceğini önermişlerdir. İkinci olarak, üreticiler sıklıkla adezivin viskozitesini değiştirecek doldurucu partiküller eklerler. Oldukça ince bir adeziv tabaka oksijen inhibisyonundan dolayı, tam gerçekleşmeyen rezin polimerizasyonuna maruz kalabilmektedir. Böylece hava ile inceltme sonrası dolduruculu adezivlerin daha kalın bir adeziv tabakası sağladığı gösterilmiştir (59, 60).

Üreticiler bazen özel malzemeler de kullanmaktadırlar. Özel bileşiklerden en önemlisi; birçok medikal alanda çoğunlukla fiksator ya da dezenfektan olarak kullanılan glutaraldehidir. Dental adezivlerde kullanılmasının amacı; dayanıklılığı geliştirmek için hibrit tabakadaki kollajen fibrillerin stabilizasyonunu sağlamak ve post-operatif ağrının engellenmesidir. Günümüzde, adezivlerin formülüne antibakteriyel maddelerin eklenmesi giderek daha popüler hale gelmektedir. Çürüğün tamamen kaldırılmasını engelleyen klinik durumlar ve kompozit dolgu altında sekonder çürüklerin oluşumunun engellenmesi bakımından antibakteriyel maddelerin ilavesi tavsiye edilmiştir. En önemli antibakteriyel bileşikler; MDPB monomeri (12-methacryloyloxy-dodecyl-pyridinium bromide), florid ve parabenlerdir. Adeziv rezin matriks ile birlikte polimerize olan antibakteriyel monomerlerin aksine, polimer matriksten bağımsız kalan antibakteriyel ajanlar adeziv rezinlerin dışına

sızabilmektedir. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar, adezivlere eklenen antibakteriyel bileşiklerin olumlu klinik etkinliği bulunduğunu belirleyememiştir. Kalıcı antibakteriyel etkileri haricinde, bu bileşiklerin biyouyumluluk problemleri oluşturmaları da söz konusudur (61-63).

Son yıllarda uygulama prosedürleri daha basit olan adeziv sistemler geliştirilerek başarılı tedaviler gerçekleştirilebilmiştir. Klinik başarının yanı sıra, dentine yakın temasta olan dental adeziv sistemlerin biyouyumluluğu da oldukça önem arz etmektedir (64).

5. BİYOUYUMLULUK

Biyoyumluluk veya doku uyumluluğu ifadesi; bir materyalin canlı organizmayla temas halindeyken sergilediği biyolojik performansı belirtmek için kullanılır. Diğer bir deyişle; kullanılan malzemenin vücudun yumuşak ve sert dokuları üzerinde allerji, lokal veya sistemik toksisite ya da immunojenik, trombojenik, mutajenik ve karsinojenik doku reaksiyonu oluşturmaması şeklinde açıklanabilir. Bu görüş; materyallerin sadece bazı fonksiyonları sağlamaması değil, aynı zamanda bir biyolojik yanıt meydana getirebileceğinin farkına varılması fikrini doğurmuştur. Canlı bir dokuya yerleştirilen materyal ile biyolojik sistem arasında oluşan etkileşim neticesinde, birtakım biyolojik cevaplar meydana gelmektedir. Materyalin konağı etkilemesinin yanında, konağın da materyali etkilemesi söz konusudur. Zamana ve şartlara bağlı olarak değişebilen biyouyumluluk, dinamik bir süreçtir. Bunun anlamı, başlangıçta biyouyumlu olan bir materyalin zaman içerisinde şartların değişimiyle uyumsuz hale gelebilmesidir. Vücudumuz, karmaşık biyolojik bir çevre olarak düşünüldüğünde, herhangi bir biyolojik cevaba neden olmayan yabancı bir madde saf olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, biyolojik olarak uyumlu olan materyaller biyomateriyal olarak adlandırılmaktadır (65-68).

6. DIŞ HEKİMLİĞİNDE BİYOUYUMLULUK

Restoratif materyallerin biyouyumluluğunun geleneksel tanımı, oral dokular üzerine zararlı etkilerinin azlığı olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, canlı dokular üzerinde olumsuz etki sergilemeyen materyal yok denecek kadar azdır. Bu bilgidan yola çıkılarak biyouyumluluk; hasta, kullanılan materyal ve materyalin beklenen

fonksiyonu arasındaki etkileşim olarak da tarif edilebilir. Uygulanan materyalin biyoyoumlu olarak kabul edilebilmesi için, bu üç faktörün uyum içinde olması gerekmektedir. Dental materyallerin canlı dokuya yerleştirilmesi durumunda etkileşimin derecesi; hastaya, materyalin fonksiyonuna, yerleştirildiği koşullara ve gücüne bağlıdır. Vücut; hastalık veya yaşlanmayla, materyal ise; korozyon, yorgunluk, yük, oklüzyondaki değişiklikler veya beslenme nedeniyle değişebilmektedir. Bunlardan herhangi birinin zamanla değişmesi durumunda, başlangıçta verilen biyolojik yanıt da değişebilmektedir (69, 70).

Biyoyoumluluk aynı zamanda materyalin çevresi ile etkileşimine de bağlıdır. Yerleşim ve fonksiyonu tanımlanmadan bir materyal biyoyoumlu olarak kabul edilemez. Sözgelimi; titanyum implant alaşımı uygun koşullarda zamanla çene kemiğiyle kaynaşmaktadır. Ancak benzer durumda, yani aynı hasta, aynı yük ve teknikle krom-kobalt alaşımı yerleştirildiğinde osseointegrasyon oluşmamaktadır. Bununla birlikte, titanyum alaşımı kalça eklemi protezi olarak kullanıldığında sonuç başarısız olmaktadır. Benzer vakalarda krom-kobalt alaşımı çok az aşınma sergileyerek daha başarılı olmaktadır. Bu durumda; alaşımlardan birini biyoyoumlu, diğerini ise biyoyoumlu olmayan materyal olarak tanımlayamayız (71).

Kullanılan materyale vücudun biyolojik yanıtını belirlemede, hastanın sağlığı ve çevresi göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin; hastanın diyabetik olması veya sigara içme alışkanlığı, bir restorasyonun dişeti yanıtını etkileyebilmektedir. Hastanın asidik sıvılar içmesi, dental alaşımların korozyon özelliklerini ve doku yanıtını değiştirebilir. Ayrıca hastanın devamlı olarak gözlenmesi de önem arz etmektedir. Sözgelimi, ağız yoluyla nikel ile temasa maruz kalan bir hastanın bugün allerjisi yokken, gelecekte olabilmektedir (71).

Son yıllarda vücudun değişik bölümlerinin onarımı ve yenilenmesi amacıyla metal, seramik ve polimerler sıklıkla kullanılmasına rağmen, kullanılan materyallerden kaynaklanan sorunlar hala aşılamamıştır. Bununla birlikte; genetik mühendisliği, nanoteknoloji, bilişim teknolojileri ve fabrikasyon yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte daha uyumlu biyomateryallerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (67).

Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin ağız içerisinde mine, dentin, pulpa, periodonsiyum, dişeti, dil, dudak ve yanak gibi çeşitli dokularla direkt

teması; bu dokularda birtakım toksik, alerjik, mutajenik, karsinojenik ve iltihabi reaksiyonlara neden olabilmektedir. Hastanın oklüzyon ve diyetindeki değişiklikler veya materyalin çözünmesi ya da korozyonuyla salınan çeşitli bileşenler materyalin biyoyumluluğunu belirleyen faktörler arasındadır. Dental bir materyalin biyoyumluluğu; tipi, uygulandığı bölge ve fonksiyonuna bağlıdır. Dental materyallerden salınan komponentler, materyalin uygulandığı bölgeye komşu dokularda lokal veya sistemik toksisiteye neden olabilmektedir. Salınan bu maddeler enflamasyonu arttırarak hücrelere de zarar verebilmektedir. Hücre yapısında hasara neden olabilen bu bileşenler, bazı proteinlerin sentezlenmesine ya da iltihabi reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonu, farklı zaman periyotlarında çeşitli organ fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. Örneğin; 24 saat içerisinde akut sistemik toksisite gösteren materyal, 3 ay sonra subakut ve daha uzun sürede kronik sistemik toksisite sergileyebilir. Örneğin; amalgam dolgulardan salınan cıvanın; tükürük ve kan gibi vücut sıvılarındaki cıva seviyesinde artışa neden olarak farklı dokularda birikmesi sonucunda, oksidatif doku hasarına bağlı toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (66-68).

Kompozit rezinlerde ise hava ile temas eden yüzeyde tam bir polimerizasyon gerçekleşmemektedir. Oksijen inhibisyon tabakası olarak adlandırılan bu yüzey materyalin kendisinden farklı mekanik özelliklere sahiptir. Bu nedenle, ağız sıvılarının etkisiyle kompozit rezinlerden artık monomer, doldurucu partikül ve diğer bileşenler ağız ortamına salınabilmekte ve materyalin yapısı kolayca bozulabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, kompozit rezinlerin yetersiz polimerizasyonu sonucunda; matriks yapısından Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, HEMA ve MMA salındığı tespit edilmiştir. Materyallerin yüzey özellikleri de biyoyumluluğu etkileyen diğer bir faktördür. Materyallerin yüzey özellikleri gram negatif bakterilere ait bazı toksinlerin dış plağına tutunmasını arttırarak dişeti ve periodontal problemlere yol açabilmektedir (67, 72, 73).

6.1. Biyoyumluluğun Değerlendirilmesi

Piyasaya sürülecek her dental materyalin, hasta üzerinde kullanılmadan önce mutlaka biyolojik riskler yönünden araştırılması gerekmektedir. Dental bir materyalin biyoyumluluk değerlendirmesi; çeşitli biyolojik testleri, korozyon gibi

fiziksel özellik testleri ve risk-fayda analizini içeren komplike bir konudur. Bu amaçla yapılacak analizlerin, materyallerden salınan komponentlerin canlı dokularla her türlü ilişkisini ortaya koyması önemlidir. Hücreler üzerindeki lokal toksisitenin, doku kültür testleri ve klinik çalışmalarla değerlendirilmesi mümkündür. Biyouyumluluk değerlendirmelerinin temel prensibi; biyomateriyal ve biyolojik sistem arasındaki aktif ara yüzeyin tanımlanmasına dayanır (74, 75).

Materyal vücutta bir cevap meydana getirirken, vücut da materyalde bir yanıt meydana getirmektedir. Tüm materyaller biyolojik çevre içerisinde korozyon, kimyasal modifikasyon, madde birikimi veya bozulma gibi mekanizmalarla belirli değişiklikler meydana getirmektedir. Materyal ve biyolojik dokularda meydana gelen değişiklikler, diğer değişimleri tetikleyebilmektedir. Bu durum, ara yüzün ömür boyunca değişebileceğini gösterir. Böylece, materyal ve doku ara yüzünde kurulan denge de birtakım farklılıklara maruz kalır. Materyal-doku arasındaki etkileşim, temel olarak her çevrede farklı olacaktır. Belirli bir çevrede uygun olan biyolojik yanıt, diğer çevrelerde aynı şekilde meydana gelmeyebilir. Vücut için yabancı olan biyomateriyallere karşı yabancı doku reaksiyonları oluşmaktadır. Son yıllarda materyallerin geliştirilmesinde, yabancı cisim reaksiyonlarından kaçınmak ya da sınırlandırmak temel amaç olmuştur. Materyallerin dokular üzerindeki uzun süreli etkilerini belirlemek amacıyla, materyal-doku ara yüzünün optimize edilmesi ve özelleştirilmesi gerekir (65, 66, 76, 77).

Dental materyallerin biyouyumluluk testleri, hasta ve sağlık ekibinin güvenliğini sağlamaya yönelik bir çabadır. Diş hekimlerinin biyouyumluluk konusundaki yükümlülüklerini şu şekilde incelemek mümkündür:

6.1.1. Hasta güvenliği

Diş hekimliğinde hasta güvenliği ile ilgili asıl sorun, dental materyallere karşı aşırı duyarlılıktır. Dental materyallerin kullanılması öncesinde hastaların allerji öyküsü olup olmadığı dikkate alınarak mevcut bulgular ve riskler değerlendirilmelidir. Dental materyallerin yan etki potansiyeli yüksek olmamasına rağmen bazı alaşımlara, rezinlere veya simanlara karşı hassasiyet oluşabildiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, nikel ya da metakrilatlara karşı allerji üzerine odaklanılmıştır. Erkeklerle kıyasla kadınlarda daha çok rastlanan nikel allerjisinin

görülme sıklığı %10-20 arasında değişmektedir. Hastaların rezin bazlı materyallere ve latekse karşı aşırı duyarlılığı daha nadir olmakla birlikte, oldukça ciddi reaksiyonlar da bildirilmiştir. Son yıllarda, dental materyallerin özellikle çocuklarda oluşturduğu hassasiyet artışına dikkat çekilmiştir. Yapılan bir araştırmada, çocukların %49'unda bazı dental materyallere duyarlılık tespit edilmiştir (78-80).

6.1.2. Diş hekimi ve sağlık personelinin güvenliği

Dental biyomateriyallerin manipülasyonu esnasında diş hekimi ve yardımcı sağlık personelinin zarar görme potansiyeli hastalara oranla çok daha yüksektir. Bu tür sorunlar özellikle amalgam, döküm alaşımlar, rezinler ve protetik dental materyaller için söz konusudur. Sağlık personelinin lateks veya rezin materyallerle teması sonucunda, genel irritasyondan alerjik yanıtlara kadar değişen riskler mevcuttur. HEMA, TEGDMA ve kamforokinon gibi bazı rezin komponentlerin immün hücreleri doğrudan aktive edebildiğine dair bulgular mevcuttur. Dental materyallerin birçoğuna karşı gerçekleşen reaksiyonlar oldukça ciddi ve hatta hayatı tehdit edici olabilmektedir (79-81).

6.1.3. Hukuki sorumluluk

Materyallerin korozyon ürünleri ve bu ürünlere biyolojik cevaplar hakkında bilinmeyen gerçekler nedeniyle, hiçbir materyal biyolojik olarak %100 güvenilir kabul edilmez. Yapılan birçok çalışma, materyallerden korozyon yoluyla salınan maddelerin yan etki potansiyeli oluşturduğunu göstermiştir. Dental materyallerin kullanımı sırasında, hasta ve yardımcı personelin sağlığını etkileyebilecek risklerden yasal olarak diş hekimi sorumludur. Biyouyumluluk konusunda birtakım yasal düzenlemeler mevcuttur. Örneğin lateks eldiven kullanılmasına yönelik veya dental atıklardan civa ve diğer zararlı partiküllerin eliminasyonuna ilişkin yasal tedbirler alınmıştır. Biyomateriyallerin hastaya verebileceği zararlarla ilgili başlatılan hukuksal işlemler fazla olmamakla birlikte, bu tür problemlerin ortaya çıkması diş hekimini duygusal ve finansal olarak etkilemektedir (80, 82, 83).

6.2. Materyallerin Biyolojik Testlerinde Etik İlkeler ve Standartlar

Geçmişte tıp ve diş hekimliğinde, insanların tıbbi deneylerde kullanılmasıyla hasta hakları ve etik kuralların ihlal edildiği belgelenmiştir. Bununla birlikte, tıp ve diş hekimliği alanlarında etik kuralların oluşturması, ancak yirminci yüzyılda gerçekleşmiştir. 1947 Nuremberg kodu, 1948 Cenevre, 1964 ve 2008 Helsinki Deklarasyonları; yapılacak araştırmalarda insan kullanımının etik ilkelerini düzenleyen belgeler olmuştur. Ayrıca, 1979 yılında yayınlanan Belmont Raporu, tüm etik usul ve esaslarının ana hatlarını içermektedir. Bu rapor; günümüzde sıklıkla kullandığımız aydınlatılmış onam, risk ve yararların adil ve objektif değerlendirilmesi, ‘zarar verme’ direktifi ve savunmasız tür popülasyonunun korunması gibi konuları kapsamaktadır. 1981 de FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) gıda ve ilaçların geliştirilmesi, insan deneklerinin korunması, halk sağlığı ve araştırma prosedürleri ve kurumsal denetlemelere imkan veren düzenlemeleri yayınlamıştır (84).

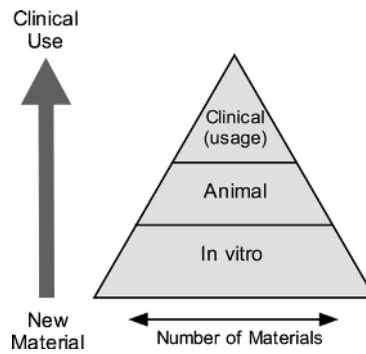
Günümüz diş hekimliğinde geçerliliğini koruyan etik ilkelerin en önemlisi, zarar vermeme prensibidir. Etik kavramı, aynı toplumun değişik kültür grupları arasında bile farklı yorumlanabilmektedir. Bu nedenle insan üzerinde yapılacak bilimsel araştırmalar konusunda, uluslararası standartlara ihtiyaç duyulmuştur. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), ulusal standartlar organlarının (ISO üye kuruluşlar) dünya çapında bir federasyonudur. Uluslararası Standardizasyon çalışmalarını yürüten teknik komitelerin kabul ettiği Taslak Uluslararası Standartlar, oylama için üye ülke kuruluşlarına gönderilir. Bir Uluslararası Standardın yayınlanması için oy veren üye ülkelerin en az %75’inin onayı gerekmektedir. Günümüzde dental materyallerin ve ilişkili medikal cihazların biyouyumluluk değerlendirmesinde kullanılan test yöntemleri için hazırlanmış ulusal ve uluslararası bazı standartlar mevcuttur. Bu standartlardan bazıları özel olarak dental materyallerle (ISO 7405) ilgiliyken, diğerleri dental materyallerle diğer tıbbi malzeme ve cihazların test yöntemleri (ISO 10993) hakkındadır. “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi” başlığı altında sunulan ISO 10993 standardı, cihaz güvenliği ve dental/tıbbi materyallere karşı oluşacak biyolojik cevabı değerlendirmede kullanılacak test yönteminin seçimi hakkında kapsamlı bir rehberlik sunmaktadır ve aşağıdaki tabloda verilen bölümlerden oluşmaktadır (Tablo 1) (85, 86).

ISO 10993-1	Bir risk yönetim sürecinde değerlendirme ve deney
ISO 10993-2	Hayvan sağlığı özellikleri
ISO 10993-3	Genotoksisite, karsinojenisite ve üreme toksisitesi için deneyler
ISO 10993-4	Kan ile etkileşim deneylerinin seçimi
ISO 10993-5	Vücut dışı (<i>in-vitro</i>) sitotoksisite deneyleri
ISO 10993-6	İmplantasyon sonrası yerel etkiler için deneyler
ISO 10993-7	Etilen oksitle sterilizasyon kalıntıları
ISO 10993-9	Potansiyel bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için ön çalışma
ISO 10993-10	İrritasyon ve aşırı duyarlılık deneyleri
ISO 10993-11	Sistemik toksisite deneyleri
ISO 10993-12	Numune hazırlama ve referans malzemeler
ISO 10993-13	Polimer tıbbi cihazların bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktar tayininin yapılması
ISO 10993-14	Seramiklerden kaynaklanan bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi
ISO 10993-15	Metaller ve alaşımlarından kaynaklanan bozunma ürünlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi
ISO 10993-16	Bozunma ürünleri ve özütlenabilir ürünler için toksikokinetik çalışma tasarımı
ISO 10993-17	Süzülebilir maddeler için izin verilebilir sınırların tespiti
ISO 10993-18	Malzemelerin kimyasal özellikleri
ISO 10993-19	Malzemelerin fiziko-kimyasal, morfolojik ve topoğrafik karakterizasyonu (Teknik Şartname)
ISO 10993-20	Tıbbi cihazların immünotoksikoloji deney prensipleri ve yöntemleri (Teknik Şartname)

Tablo 1: Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi standardının (ISO 10993) bölümleri.

7. DENTAL MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUK DEĞERLENDİRMELERİ

Diş hekimliğinde kullanılacak restoratif materyaller geliştirilirken; dayanıklılık, estetik ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerin yanı sıra, biyouyumluluğunun da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Yeni bir dental materyalin biyouyumluluğu değişik yöntemlerle değerlendirilmelidir. Dental materyallerin biyolojik değerlendirmesinde kullanılan test programları, hiyerarşik düzende ilerleyen dört farklı prosedürden oluşmaktadır. Başlangıç testleri (faz I ve II); kısa süreli, basit ve ekonomik yöntemlerdir. Ancak bu testler uygun bir şekilde tamamlandıktan sonra, sırasıyla hayvan deneyleri (faz III) ve sınırlı sayıda hasta ile sürdürülen klinik çalışmalar (faz IV) yapılabilir. Dental materyallerin biyouyumluluklarını belirleyen klinik testler, fazla çaba ve para harcamayı gerektiren yöntemlerdir. Bununla birlikte, günümüzde bu testlerin yeterince ve geniş ölçüde uygulanamaması gibi temel problemler söz konusudur. Son yıllarda, farklı standardizasyon kuruluşları ve bazı uluslararası organizasyonlar yeni dental materyallerin klinik olarak biyolojik performanslarını belirlemek amacıyla; *in-vitro* testler, hayvan deneyleri ve klinik uygulama aşamalarını düzenleyen bir paradigmayı onaylamışlardır (Şekil II). İlk olarak 1970 yılında, hasta tedavisinde yeni biyomateriyallerin güvenli girişimlerini sağlamak amacıyla kabul edilen bu paradigma; etik yönden sağlam, finansal olarak uygulanabilir, etkin ve verimli değerlendirme işlemlerine sahiptir. Aşamalı olarak gerçekleştirilen bu prosedürlerin temel ilkesi; her bir test aşamasında uygun olmayan yüksek riskli materyallerin tespit edilerek daha fazla kullanılmadan değerlendirme dışı bırakılmasıdır. Böylece, hem zaman ve para tasarrufu sağlanmış, hem de insan ve hayvanlar acı çekme potansiyeline karşı korunmuş olurlar (66-68, 87).



Şekil II: Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri için klasik paradigma.

8. BİYOUYUMLULUK TEST YÖNTEMLERİ

Biyouyumluluk testlerinin temel prensibi; materyal ile biyolojik sistemin teması sonucunda meydana gelebilecek reaksiyonları, canlıdaki fonksiyonel ve yapısal değişimin niteliğini ve niceliğini önceden belirlemektir. Başka bir ifadeyle; materyalin etkisiyle biyolojik sistemin yapısında değişiklik meydana gelip gelmediğini belirlemek ve bu etkinin geri dönüşümlü olup olmadığını ortaya çıkarmaktır. Dental materyallerin biyolojik olarak incelenmesinde çok sayıda teknik kullanılmaktadır. Biyouyumluluk testleri; *in-vitro* (birincil) testler, *in-vivo* hayvan deneyleri (ikincil testler) ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar (kullanım testleri) olmak üzere 3 bölümde incelenir (66, 83, 88).

9. İN-VİTRO TESTLER

Dental materyallere biyolojik yanıtların ölçülmesinde kullanılan en temel yöntemdir. *İn-vitro* testlerin amacı; canlı organizma dışında çeşitli hücre veya doku üzerine ya da içine yerleştirilen bir materyalin temasıyla ortaya çıkan biyolojik reaksiyonların test edilmesidir. Test edilen materyal, genellikle bakteri veya hücrelerle kontak halindedir. Bu yöntemleri, dental bir materyalin belirli bir bakteri türü üzerinde mutasyona neden olan özelliklerini belirlemede (Ames testi) kullanılabildiği gibi, hücrelerin bir petri kabında üretilerek dental bir materyalden salınan likitlere maruz bırakılması da söz konusudur. Hücre kültürü çalışmalarında, materyale maruz kalan hücrelerin sayısı, büyüme oranı, gelişim hızı, metabolik veya hücresel fonksiyonları ölçülerek değerlendirilmektedir. Hücre kültür testleri ile yapılan değerlendirmeler ile hayvan implantasyon testleri arasında görülen yorumsal farklılıklar, sitotoksite testlerinin kullanımında uluslararası düzeyde standartlaşmaya gidilmesini sağlamıştır. *İn-vitro* biyouyumluluk testleri, çok çeşitli olmakla birlikte hücre ve hücre bileşenlerinin kültürleri kullanılarak canlı bir organizma dışında test tüpleri içerisinde gerçekleştirilir. *İn-vitro* testler bu yönüyle; *ex-vivo* testlerden farklıdır. *Ex-vivo* testlerde, bir kültür ortamında kısa bir süre için (genellikle 24 saatten az) korunan, bozulmamış doku ya da organ kullanılmaktadır. *İn-vitro* testler ise; çoklu hücreleri, bariyerleri ya da *in-vivo* durumları taklit etmek için, özel kültür ortam şartları kullanılarak laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir (83, 87, 89, 90).

1926 yılında, doku ve hücre kültürü tekniklerinin ortaya çıkmasından yaklaşık 30 yıl sonra geliştirilen *in-vitro* testler, materyallere karşı biyolojik yanıtların belirlenmesinde kullanılan deney stratejilerinden biridir. 1968’de, dental materyalleri de içeren sitotoksikite deneyleri için doğrudan hücre kültürü yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Birkaç yıl sonrasında ise, amalgam, silikat simanlar, rezinler ve altın bazlı alaşımlardan standart boyutlarda hazırlanan disklerin biyoyumluluk değerlendirmelerinde, L-929 fare fibroblast hücrelerinin kullanıldığı bildirilmiştir. 1973’de, *in-vitro* biyolojik yanıtların ilk nicel ölçüm değerlendirmeleri ⁵¹Cr (sodyum kromat) kullanılarak yapılmıştır. Bununla birlikte, *in-vivo* şartları taklit etmek amacıyla materyal ve hücre arasına bir bariyer yerleştirme fikrinden hareketle agar overlay testinin geliştirilmesi bir dönüm noktası olmuştur. *In-vitro* testler, zamanla şaşılacak derecede geliştirilmiş ve kullanımı hızla artmıştır. Hücresel ve hücre içi fonksiyonların birçok boyutunu ortaya çıkaran hücre kültür teknikleri, son 40 yıl içerisinde hücresel biyoloji alanında devrim yaratmıştır. Günümüzde, bu testler sayesinde gen ekspresyonu, sinyal aktivasyonu, hücre döngüsü ve bölünmesi, enflamasyon aktivasyonu, protein ekspresyonu, oksidatif stres vb. hücre fonksiyonları ile metabolizmanın yaklaşık durumu değerlendirilebilmektedir (89, 91-93).

In-vitro testlerin temel özelliği; materyal ara yüzleri ve hücrelerin çevrelerini kontrol edebilmesi, hücre yanıtını hassas ve detaylı bir şekilde ölçebilmesidir. Bu testler; hücresel yanıtların tanımlanması için oldukça uygundur. Bununla birlikte; diğer test türlerine kıyasla nispeten ucuz, uygulaması kolay, daha hızlı, deneysel olarak kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olma, insan ve hayvan deneylerinde karşılaşılan etik ve yasal sorunları önleme gibi birtakım avantajlara sahiptir. Bu testlerin en önemli dezavantajı, sağlıklı bir organizma dışında uygulanan materyalin ağız içindeki etkilerine dair duyulan kuşkulardır. *In-vivo* sonuçlar ile karşılaştırıldığında materyale karşı oluşan biyolojik cevapla ilgili araştırmacıyı yanıltan sonuçlar verebilmektedirler. Bu nedenle, uygulanan *in-vitro* test yöntemlerinin standartlaştırılması gereklidir. Biyolojik yanıtları tahmin etmek amacıyla bilgisayar modellenen teknikler de önerilmiştir. Geliştirilmiş bilgisayar modellerinin, biyoyumluluk değerlendirmelerinde gelecekte önemli bir rol oynaması beklenmektedir (66, 87, 94)

In-vitro deneyler; sitotoksisite, sistemik toksisite, inhalasyon toksisitesi, hemolizis, teratojenite, karsinojenite testleri, Ames mutajenite testi, Styles hücre transformasyon testi gibi farklı yöntemleri kapsamaktadır (95).

9.1. Sitotoksisite Testleri

Dental materyallerin biyouyumluluğu konusunda en önemli faktör, materyalin hücrenin canlılığını sürdürmesi üzerine olan etkisidir. Hücresel bozulmayı tetikleyen çok fazla sebep olduğundan, sitotoksisiteyi tam olarak tanımlamak oldukça zordur. Sitotoksisite, hücre yapısı ve fonksiyonlarında belirgin hasarlar meydana gelmesi şeklinde ifade edilmektedir. Restoratif diş hekimliğinde, klinik kullanım öncesinde uygulanacak materyalin biyouyumluluk yönünden oral dokular üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin belirlenerek, materyalden salınan bileşiklerin sitotoksisitelerinin değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Materyallerin hayvanlar üzerinde denenmesi oldukça pahalı, zaman alıcı ve etik olarak tartışılır bir yöntemdir. *In-vitro* sitotoksisite testlerinin amacı; vücut dokuları içine veya üzerine uygulanan materyalin, doku üzerinde meydana getireceği reaksiyonların laboratuvar ortamında belirlenmesidir (85, 86, 96, 97).

Bu yöntemin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in-vitro* ortamda yaşamasını ve üremesini değerlendirmektir. Bu amaçla kullanılan hücre kültürleri insan, maymun, fare, tavşan gibi canlıların böbrek, akciğer, amniyon zarı gibi dokularından elde edilmektedir. Çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon edilen bu hücreler, 36°C’de steril tüp içerisinde bekletildiklerinde kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucu oluşan yapıya hücre kültürü adı verilmektedir. Bir seri kültür işleminden sonra, süresiz çoğalabilme özelliğine sahip devamlı hücre hatları elde edilir. Bunlar transformasyona uğramış primer hücreler olup, daha stabildirler. ISO kriterlerine göre standart sitotoksisite testlerinde en çok kullanılan devamlı hücre hatları; fare fibroblastları (L-929, Balb/3T3 ve WI38) gibi hücre serilerinin yanı sıra, primer insan hücreleri ve insan epitel (HeLa) hücreleridir (98-100).

Dental materyallerin sitotoksisite testlerinde; hücre canlılığı ve morfolojisi, hücre gelişimi, bölünmesi ve sayısı, hücre metabolizması ve organelleri, hücre membran geçirgenliği ve hasarı, çeşitli enzim aktiviteleri, DNA, RNA ve protein

sentezinin inhibisyonu değerlendirilmektedir. Bu testlerde; dental materyalin kendisi veya yapısından salınan bileşenlerin hücre kültürü ile direkt veya indirekt kontağı sağlanmaktadır. Direkt temas yöntemi; hücrelerin test edilen örnekler üzerine direkt yerleştirilmesi ve hücrelerin materyalin yanında veya üzerinde büyümesi prensibine dayanır. Materyal direkt temas yoluyla sitotoksik etkilerini araştırmada, biyolojik hücre ölümleri değerlendirilir. Uygulaması basit ve ucuz olan bu testlerin, diğer testlerle kombine şekilde uygulanması önerilmektedir (101).

Tavsiye edilen sitotoksisite testlerinden biri de indirekt temas yöntemidir. *In-vitro* çalışmalarda materyal ile hücreler arasında dentin gibi bir bariyer kullanıldığında, *in-vivo* koşullara daha yakın cevaplar elde edilebileceği düşünülmüş ve daha gelişmiş test yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. İndirekt temas yönteminde ilk adım, dental materyal ile hücre arasında agar, agaroz, selüloz asetat filtre veya dentin gibi bariyerlerin kullanılmasıdır. Bu metod; uygulama yönünden basit ve sonuçları yorumlama bakımından kolay olduğundan oldukça başarılıdır. Bariyer test yöntemlerinde; *in-vitro* olarak düzenlenen yapay pulpa odalarında, test materyalinin dentin tübülleri boyunca difüzyon veya absorpsiyon kabiliyetini test etmek için çok ince bir dentin bariyeri kullanılmaktadır (85, 86, 102).

ISO standartlarına göre, *in-vitro* sitotoksisite değerlendirmeleri için tavsiye edilen test yöntemleri şunlardır:

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

9.1.1. Hücre Kültürü Testleri

Dental materyallerin sitotoksisitesini değerlendirmede yirmiden fazla hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerdeki uygulama, dental materyalleri oluşturan özel bileşenlerin tek-tabaka kültürdeki hücreler üzerine doğrudan

yerleştirilerek kısa bir süre içerisinde sitoksisitelerinin değerlendirilmesi ve sonrasında doz-cevap eğrisi sayesinde hangi materyal bileşenlerinin potansiyel sitotoksik olduğunun belirlenmesidir. Bununla birlikte dentin dokusunun üzerine uygulanan dental materyallerin fiziksel ve biyolojik özelliklerini, dentinin değiştirebilme özelliğine sahip olması bu yöntemin etkinliği üzerinde şüpheler oluşturmuştur. Bu metod, canlı dokulardan mekanik yollarla ayrılmış doku parçalarının *in-vitro* koşullarda üretilmesi ve yaşatılması prensibine dayanır. Değişik canlılardan alınan doku örnekleri spontan migrasyon, mekanik ve enzimatik parçalanma ile hücrelere ayrılır ve laboratuvar ortamında kültür kaplarında uygun besiyerlerinde üretilir ve elde edilen yapı hücre kültürü olarak isimlendirilir. Özellikle hayvanlardan elde edilen hücrelerin üretilmesi için kullanılan bir yöntemdir (101, 103-105).

Hücre kültürü çalışmalarında primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri kullanılmaktadır. Dokularından alınarak, *in-vitro* hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan kültürlere primer hücre kültürü adı verilmektedir. Gingival ve pulpal fibroblastlar gibi primer hücre kültürleri; hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilmektedir. Primer hücre kültürlerinin insandan izole edilmesi zor olmakla birlikte, hücrelerin yaşam süreleri sınırlıdır ve değişik bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları farklı yansıtmaktadır. Elde edilen primer hücre kültürlerinin, başka bir kültür ortamında çoğaltılmasıyla subkültürler oluşturulur ve böylece diploid hücre kültürleri elde edilir. Primer hücre kültürlerine oranla homojen olan, standardize edilebilen ve tekrarlanabilen diploid hücre kültürleri, asıl köken özelliklerinin en az %75'ini yansıtmaya devam eder. Günümüzde, hücre kültürleri genellikle dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonlarıyla yapılmaktadır. Bununla birlikte birçok doku hücresi bölünmek ve çoğalmak için plastik doku kültür kapları gibi katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Hücre kültürü yöntemiyle; *in-vivo* şartlarda kısa sürede incelenmesi mümkün olmayan bir materyalin fiziksel ve kimyasal etkileri, ilaçların ve biyomateryallerin mutajen faktörleri, yapısal ve kromozomal bozuklukları araştırılabilir. Hücrenin yapısı, fizyolojisi ve patojen hücre ilişkileri değerlendirilir (105).

Hücre kültürü yönteminin avantajları; uygulamaların standart şartlarda tekrarlanabilmesi, kısa süreli etkileşimlerin incelenebilmesi, hücreler üzerindeki

etkilerin direkt gözlenerek standart ölçüm yapılabilmesi ve hücrelerin pH, ısı, osmotik basınç, nem, oksijen ve karbondioksit miktarının kontrol edilebildiği ortamlarda saklanabilmesidir. Dezavantajları ise; hücre üretme vasatları ve diğer malzemelerin pahalı olması, hijyenik koşullardan etkilenebilmesi, primer kültür sonrası birbirini takip eden pasajlarda hücrelerin farklılaşabilmesi veya ölmesidir (106).

9.1.1.a. Direkt hücre kültürü metodu

Bu yöntem dental materyal veya bileşenlerinin, kültür içerisindeki hücrelerin üzerine doğrudan ve kısa sürelerde (>24 saat) uygulanmasıdır. Suda çözünebilir materyallerde materyal-hücre teması çok iyi sağlanırken, suda çözünmeyen materyallerde direkt temas farklı yollarla sağlanmaktadır. Ekstrakt yoluyla temas testinde, sıvı bir çözücüde ayrıışan materyal bileşenleri hücrelerle temas ettirilerek sitotoksiteleri incelenir. Ekstraksiyon ortamının, klinik kullanımı taklit etmesi ve materyalin kimyasal yapısında değişiklikler yapmaması arzu edilir (85, 86, 96).

9.1.1.b. Bariyer test metodu

Dentin dokusu, dental materyal ile pulpa arasında bir bariyer görevi gördüğü için direkt temas testleri klinik durumu tam olarak yansıtamamaktadır. Bundan dolayı, bariyer test yönteminde dentini taklit eden ve bazı bileşenlerin difüzyonuna izin veren çeşitli hücre kültür insert sistemleri bariyer olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, insert içine yerleştirilen materyal medyum içinde asılı bir şekilde tutulmaktadır. Insertin alt kısmında bulunan poröz bir membran, bariyer görevi görerek materyalden çözünen bileşenlerin geçişine ve medyum tabanında bulunan hücrelerle temas etmesine olanak sağlar (96, 107).

9.1.2. Agar difüzyon test yöntemi:

Toksisite deneylerinde en uzun süre kullanılan test yöntemidir. Bu yöntemde, kültürdeki hücrelerin üzerini örten %1,5'luk agar besiyerinden difüze olabilen bileşenlerin toksisitesi incelenir. Uygulaması kolay ve ucuz olan bu yöntemle, agarda çözünemeyen veya difüze olamayan materyal veya bileşenlerinin etkinliği değerlendirilemez. Dolayısıyla, materyallerin ve bileşenlerinin tek tabakalı hücreleri kaplayan agar boyunca difüze olma zorunluluğu gibi bir dezavantaja sahiptir. Bundan dolayı, çözünen materyal bileşenleri klinik olarak kullanıldığında sitotoksik

olmasına rağmen, agar boyunca difüze olamayarak hücre hasarına yol açamayacaktır. Toksisitesi incelenecek olan test materyali, agarın üzerine 24 saat süreyle yerleştirilir. Membran geçirgenliği, ölü hücreleri boyayabilen tripan mavisi ya da canlı hücrelerde depolanarak membran hasar gördüğünde dışarı salınabilen nötral kırmızı boyasıyla belirlenmektedir. Agardan difüze olan materyalin sitotoksik etkisini belirlemek için, hücreler canlı dokuyu boyayan nötral kırmızı ile boyanır. Nötral kırmızı deneyinde, hücre membranındaki geçirgenliğe bağlı olarak penetre olan nötral kırmızı boyası lizozomal matrikste birikir ve spektrofotometre ile kantitatif olarak değerlendirilir. Sızan toksik bileşenlerin varlığı, hücresiz alanlardaki boyanma kaybı ile belirlenir. En az dört kez tekrarlanan testlerde, hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı verilen yanıtlar belirlenir ve materyallerin sitotoksisiteleri hakkında sonuca varılır (96, 108, 109).

9.1.3. Filtre difüzyon test yöntemi:

Fibroblastlar veya epitelyal hücrelerin kullanıldığı bu testte, herhangi bir materyalin hücre üzerinde sitotoksik etki gösterebilmesi için, 0.45µm filtre boyunca difüze olması gerekir. Filtre olarak selüloz asetatın (milipor) kullanıldığı bu yöntemde, filtrenin bir tarafına test materyali diğer tarafına primer hücreler yerleştirilir. Bu yöntem, ağız içi temas durumunu tanımlamaktadır. Filtreden difüze olabilen bileşenlerin sitotoksik etki sonucu hücrelerde meydana getirdiği hücre hasarı; nötral kırmızı ile yapılan boyama sonucunda dekolorizasyon alanı veya boyanma yoğunluğunun incelenmesiyle belirlenir (85, 96, 102).

9.1.4. Dentin bariyer test yöntemi:

Dentin bariyer testinde; restoratif tedavide kullanılan materyallerden salınan monomerler ile hedef hücreler arasında, dentin dokusunun bariyer görevi yapması söz konusudur. Bu amaçla, insan dentin dokusunun yanı sıra bu dokuya benzerliğinden dolayı sığır dentin diskleri de kullanılmaktadır. Dentin diskinin pulpaya bakan tarafı asitle dağlanarak, paslanmaz çelik bir tutucu yardımıyla bölümlü odaya yerleştirilmekte, ardından test materyali silikon bir tüp içinde dentin diskinin üst kısmına uygulanmaktadır. Dentin kesitleri genellikle, insanların üçüncü büyük azı dişi veya preslenmiş dentin tozu talaşlarından elde edilmektedir. İnsan

dentini kullanılmasının avantajı, *in-vivo* dokuyu taklit etmesi, dezavantajı ise çok miktarda kullanılması gereken çalışmalarda yeterli sayıda insan dişinin bulunamaması ve dişlerden alınan kesitlerin geçirgenlik özelliklerinde çok çeşitlilik görülmesidir. Preslenmiş dentin talaşlarının, dentinin doğal anatomik yapısıyla uyuşmadığı belirtilmektedir. Sığır dişi kullanılmasının en önemli avantajı; istenilen miktarda elde edilebilmesi ve geçirgenlik bakımından insan dentinine kıyasla daha az çeşitlilik göstermesidir. Dentin bariyerinin kullanılması, diğer test yöntemlerinden farklı olarak oral çevreyi daha fazla taklit etmektedir. Böylece dentin boyunca dentin geçirgenliğinin azalması ya da artmasından etkilenen ve pulpal etkilerden sorumlu olan spesifik bileşenlerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (85, 110-112).

9.2. Sitotoksite Değerlendirmenin Belirleyici İşaretleri

Biyomateriyaller uygulandıkları bölgedeki hücreler üzerinde bazı etkiler meydana getirirler. Bunlar; membran yapısında meydana getirdikleri bozukluklar, kromozom yapısında oluşturdıkları etkiler ve metabolik faaliyetlerde neden oldukları bozukluklardır. Bu etkiler incelenirken kullanılan test yöntemleri, statik ve dinamik olmak üzere iki grupta toplanır. Statik inceleme metodları; hücre canlılık oranlarının belirlenmesi, hücre sayısının tespiti, hücre ölümü, hücre tutunmasının inhibisyonu ve koloni oluşumu yöntemleri ile yapılır. Dinamik inceleme yöntemleri ise; 3H-Timidin ile otoradyografi metodu ve ⁵¹Cr salınım yöntemi, 3H-Lösin ile işaretleme metodu, sitometrik analiz yöntemi ve mitokondri dehidrojenaz aktivitesini ölçmeye yönelik testlerdir. Sitotoksik değerlendirmelerde; hücre sayma, boyama, metabolik bozukluklar veya membran bütünlüğü yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında hücre veya kolonilerin doğrudan sayımı, güvenilirliği en az olan yöntemdir. İdeal olan, sonuçların sınıflandırılabilmesi için belirleyici işaretlerin kesin kriterlerle doğrulanmasıdır. Bu nedenle, bir test materyalinin sitotoksik ölçümü yapılırken ilgili element sayısı en aza indirilir. Bu durum, laboratuvarlar arasındaki farklı sonuçları karşılaştırmak için istikrarlı bir temel oluşturmakta, daha çok tekrarlanabilir değerlendirmelere ve böylece daha güçlü sitotoksik deney formlarının oluşturulmasına imkan vermektedir. Sitotoksiste değerlendirme yöntemleri; canlılık, yaşam, hücre proliferasyonu ve metabolik sitotoksiste değerlendirme testleri olmak üzere dört başlık altında incelenebilir (100, 113, 114).

9.2.1. Canlılık Değerlendirme Testleri:

Bu yöntem, hücre dışı molekülleri sızdırmaz şekilde tutan hücrelerin kabiliyetlerini ölçer. Bu testler, kolorimetrik ya da floresans ölçümleri kapsamaktadır. Metabolik bozukluk değerlendirmelerinden daha az yapay doku kullanımı eğilimindedir. Kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılan bu testlerde; membran bütünlüğü bozulan hücre yapısına giren tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile ya da membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerin içerisine alınan diasetil florasin veya nötral kırmızı gibi boyalar kullanılmaktadır. Bu tekniklerde, inkübasyon sonrasında sızabilir toksik maddelerin mevcudiyeti, membran parçalanmasından dolayı hücrelerin boyama kaybı olarak görülmektedir. Bu yöntemlere alternatif olarak, sadece canlı hücreler tarafından alınabilen diasetil floresin ya da radiochromium testi gibi bazı boya veya izotoplar da kullanılmaktadır. Genel olarak hücre-materyal temasına doğrudan izin veren bu yöntemlerin kullanımı; membran geçirgenliğini ölçmek üzere sınırlandırılmış olup, ölen hücrelerin son evrelerinden biri olan sub-letal hücre değişikliklerini ölçemez. Vital ve non-vital boyaların kullanıldığı test yöntemlerinde materyallerin sitotoksik etkileri spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Flow sitometri veya floresan mikroskobu ile yapılan değerlendirmede ölü hücreler floresan görüntü vermektedir (100,108, 115).

9.2.2. Yaşam Değerlendirme Testleri

Sadece ölü hücrelerin değerlendirildiği kısa dönem testleri, oldukça hızlı ve kolay uygulanabilen yöntemlerdir. Ancak, hücrelerin maruz kaldığı toksik etkiler uzun vadede de görülebilmektedir. Bu nedenle, canlılık oranının belirlenmesinde uzun dönem testleri daha yararlı olmaktadır. Hücre yaşamının belirlenmesinde, düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma kabiliyeti test edilmektedir (100).

9.2.3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri:

Materyal bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisini belirlemede, kültür içerisindeki hücrelerin birkaç gün sonraki sayımından elde edilen bir büyüme eğrisinden yararlanılmaktadır. Bu analiz, az sayıda örnek olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Bu yöntemde en çok kullanılan testler; ^3H -timidin ve Bromodeoksiuridin immuno-histokimyasal tekniktir (90, 100).

9.2.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri:

Bu yöntemle, toksik zararı takiben metabolit konsantrasyonu ve enzim aktivite bozulması ölçülerek değerlendirilir. Bu metodlar genellikle, membran bütünlüğü değerlendirmelerinden daha karmaşık olup, çok hassas çalışmayı gerektirir. Normalden en küçük sapmalar bile, ciddi değerlendirme hatalarına yol açmaktadır. Hücre metabolizmasının azalması ve normal seviyelerini ayırt edebilen metabolik bozukluk değerlendirmeleri oldukça popülerdir. Hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçen bu testlerde, hücre canlılığı mikropilaya okuyuculu spektrofotometre yardımı ile tespit edilir. Kısa dönem zararlardan daha çok uzun sürede oluşacak toksisitenin değerlendirildiği, hem ucuz hem de hızlı olan bu testlerden başlıcaları; MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), LDH (laktat dehidrogenaz) ve Alamar mavisi testidir (100, 116).

Dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde, kolorimetrik MTT testi oldukça sık kullanılır. Oldukça hassas olan MTT deneyi; mitokondride süksinat dehidrogenaz enzimi ile sarı tetrazolyum tuzunun koyu mor renkli formazona indirgenmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin haricindekilerde mavi renkli formazan oluşmamaktadır. Formazanın oluştuğu hücreler elektron mikroskopuyla belirlenmekte veya optik yoğunluk spektrofotometre ile ölçülmektedir. LDH test yönteminde; hücredeki membran hasarı veya sitolizis durumunda açığa çıkan laktat dehidrogenazın ölçümü yapılarak sitotoksikite belirlenmektedir. Metabolik aktivitenin alamar mavisi boyası ile belirlendiği, hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği test yöntemi ise, MTT'ye kıyasla daha pahalı bir yöntemdir. Bu boya toksik olmadığı için, yapılan çalışmalarda birden fazla boyama imkanı sağlamaktadır (90, 100).

9.3. Genotoksikite/Mutajenite ve karsinojenite testleri

Hücre genetiğinde meydana gelen değişiklik olarak tanımlanan genotoksik hasar, hücrelerin sahip olduğu bazı mekanizmalar sayesinde onarılabilir. Oluşacak genetik hasarın bir sonraki nesle aktarılmasıyla oluşan etkiye mutajenite adı verilmektedir. Genotoksikite ve karsinojenite, materyallerin sistemik uyumluluğunu değerlendirme parametreleridir. Uygulanan materyalin bakteri veya memeli hücre DNA'sına olan etkisini inceleyen yöntemlerden en sık kullanılanı

AMES testidir. Bu yöntemde, genetik yapısı değiştirilmiş, özel agar kültüründe çoğalmayan ve koloni oluşturmeyen bakteriler kullanılmaktadır. Gluteraldehit içeren dentin adeziv sistemlerin, mutajenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bis-GMA ve UDMA'nın memeli hücreleri üzerlerinde mutajenik olmamakla beraber, TEGDMA'nın subtoksik konsantrasyonlarının orta derecede mutajenik olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, mutajenik etkinin görülmesi için gereken konsantrasyon hastalara uygulanan dozdan daha fazladır. Genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan Alkaline Filter Elution testi ile genotoksik materyallere karşı DNA dizilerindeki kırılmalar kolayca belirlenebilmektedir (114, 117-119).

9.4. Histolojik prosedürler ve pulpal reaksiyonların analizi:

Restoratif tedaviye pulpal tepkileri belirlemede, kalsiyum hidroksit ile restore edilen dişler kontrol grubu olarak kullanılmaktadır. Yapılan birçok araştırmada; test edilen restoratif materyallere ilişkin reaksiyonların 3, 7, 14, 30 ve 60 günlük zaman periyotlarıyla gösterilmesi tavsiye edilmektedir. Pulpal enflamatuvar aktivite ve pulpal nekrozları ISO kriterleriyle standardize edilmiştir. Sıfır; enflamatuvar hücrelerin yokluğunu ifade eder. Hafif; sınırlandırılmış enflamatuvar hücre lezyonlarını ifade eder. Orta; koronal pulpanın üçte birinden daha azında polimorfonükleer lökositler lezyonların varlığını ifade eder. Ciddi; koronal pulpanın üçte birinden daha fazlasında polimorfonükleer lökositler lezyonlarının varlığını ifade eder. Test materyalinin klinik öncesi aşamayı başarıyla geçmesi için hücresel aktivitenin sıfır olması, enflamasyon ve pulpa nekrozu kategorisinde ise hücresel aktivitenin orta ya da ciddi olmaması beklenir. (85, 86, 120, 121).

10. HAYVAN DENEYLERİ

Dental materyallerin hayvanlar üzerinde uygulanması; insanlarda kullanım testleri sonucu oluşabilecek muhtemel olumsuz etkiler ve bu reaksiyonların oluşum mekanizmaları hakkında fikir verebilir. Hayvanların insanlara kıyasla bazı materyallerin etik olmayan dozlarına ya da metabolize ürünlerine maruz bırakılması söz konusudur. Ayrıca hayvanlar, insanlar üzerinde embriyonal ya da çocukluk gibi farklı yaşam aşamalarında yapılması mümkün olmayan araştırmalarda da denek olabilmektedir. Hayvan deneylerinin yapılması, insanlarda karşılaşılabilecek

muhtemel toksik tehlikeleri önceden tahmin etmeye yardımcı olmaktadır. Genellikle fare, rat, köpek, kedi, 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; materyalin şekli, hayvanın materyale nasıl maruz bırakılacağı, materyalin temas süresi, biyolojik cevapların nasıl değerlendirileceği ve hayvanların türü, yaşı, cinsiyeti, vb. değişkenlerin kontrol edilmesi gerekmektedir. En önemli dezavantajı ise, insan vücudunun vereceği biyolojik yanıtı temsil etmek üzere bir hayvan türünün uygunluğu hakkında soru işaretlerinin var olmasıdır. Bu deneylerde, biyouyumluluğu test edilecek dental materyalin piyasaya sürülmeden önceki formu kullanılmakta ve spesifik olmayan lokal toksik etkilerin incelenebilmesi amacıyla doku içerisine implante edilmektedir. Test materyalleri deney hayvanlarının deri altı, kas içi veya kemik içine yerleştirilerek bir hafta - bir kaç ay arasında dokular makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmektedir (83, 87, 90, 105).

Diğer bir alternatif, üzerinde delikler bulunan polietilen tüpler içerisine yerleştirilen test materyalinin implantasyonudur. İmplantasyon çalışmaları sonucunda, polimerize olan materyallere oranla polimerize olmamış birçok materyalde daha fazla toksik reaksiyon görülmüştür. Amalgam ile kompozit rezininin deri altı doku reaksiyonlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda kompozit rezine karşı daha fazla doku reaksiyonu belirlenmiştir. Parçalar halinde yerleştirilen kompozit rezine karşı, 8 hafta sonra bile enflamasyon görülmüştür (114, 118, 122).

11. KLİNİK ÇALIŞMALAR (Kullanım Testleri)

Yeni bir materyalin seçiminde, mekanik ve fiziksel özelliklerin yanında biyolojik özellikler de büyük bir öneme sahiptir. Hayvanlar (köpek ve maymun gibi büyük olanlar) veya gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilen kullanım testleri, klinik ortamı her bakımdan taklit etmelidir. Bu yöntem; laboratuvar ve hayvan deneylerinde güvenilir bulunan bir materyalin insanlar üzerinde kullanılması sonrasında, materyale verilen cevapların gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Materyallerin biyouyumluluğuyla ilgili en doğru sonuçları bu test yöntemiyle elde

etmek mümkündür. Test edilecek materyallerin klinik öncesi alerjik özellikleri, deney hayvanları üzerinde deri hassasiyet testi uygulanarak belirlenir. Alerjik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan diğer testler; Maksimizasyon ve Buhler yöntemleridir. Farklı içerik ve özelliklere sahip birçok dental materyal; diş dokuları, alveol kemiği, yumuşak doku ve sıvılarla (tükürük, dişeti oluğu sıvısı) temas etmektedir. Yapılacak klinik çalışmalarda; pulpa reaksiyonları, gingiva ve periodonsiyum ile biyouyumluluk, oral mukozada irritasyon ve plak oluşumu gibi biyolojik parametreler değerlendirilmektedir. Histolojik inceleme için hazırlanan dişlerin pulpasında meydana gelen akut veya kronik iltihap ile odontoblast reaksiyonları değerlendirilir. Kullanım testleri ile ilgili birçok komplikasyon ve sorun mevcuttur. Kontrolü ve değerlendirmesi zor olan bu testler, pahalı ve zaman alıcı olmasının yanı sıra yasal ve etik açılardan da oldukça komplekstir. Klinik testler sadece ISO kuralları tarafından tavsiye edilen biyouyumluluk testlerinin ilk üç fazını başarılı bir şekilde geçmiş materyallerle yapılabilmektedir (85-87, 96, 123).

12. ADEZİV RESTORATİF DİŞ HEKİMLİĞİNDE BİYOUYUMLULUK

Günümüzde yapılan çalışmalar, dişlerin restorasyonunda kullanılan birçok materyalin biyolojik dokular üzerinde yan etkiye neden olabilecek maddeler saldıgını göstermektedir. Rezin esaslı materyallerin; postoperatif hassasiyete, alerjik reaksiyonlara, lokal immünolojik etkilere, sistemik östrojenik etkilere, apoptotik reaksiyonlara, kanserojenik etkilere ve uzun dönemde pulpal enflamasyona neden olduğu bildirilmiştir. Rezin esaslı restoratif materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde ilk adım içerisindeki maddelerin zararlı etkilerini belirlemek, ikinci adım materyalden salınan kimyasalların dozunu tespit etmek ve son adım doza verilen cevabı gözlemlemektir. Dentinin kalınlığı yeterli ise, dentin adezivleri pulpa iltihabına neden olmazlar. Açık pulpanın üzeri sızıntı ve oral kontaminasyonu engelleyecek şekilde kapatıldığı takdirde, hücre reorganizasyonu ve dentin köprüsü oluşumuyla tam tıkanma kapasitesine sahiptir (83, 86, 124, 125).

Adeziv rezinlerin difüzyonu ve buna bağlı sitoksisitesini etkileyen faktörler; kavitenin hazırlanması, kalan dentin kalınlığı, adezivin seçimi, polimerizasyon miktarı, restoratif maddenin bileşenleri ve yıkılmasıdır. Özellikle derin dentine yerleştirilen adezivlerden sonra görülen enflamasyon ve nekrozun asıl nedeni; steril

olmayan uygulamaların yanı sıra, dentin tübülleri yoluyla gerçekleşen bakteriyel mikrosızıntıdır. Dentin, iltihabi ajanların difüzyonunu sınırladığından, kavite açılırken gereksiz yere kaldırılmasından kaçınmak gerekir. Dentin kalınlığı azaldıkça, tübüllerin çapı ve sayısı artarak daha fazla geçirgenliğe neden olacak ve pulpa restoratif materyallerin toksik etkilerine maruz kalabilecektir. Rezin esaslı dental materyaller; HEMA, BisGMA, TEGDMA ve UDMA gibi farklı monomerler içerir. Dentin içerisindeki su ile yer değiştirebilen HEMA monomerini içeren adeziv sistemlerin biyouyumluluğu, pulpaya yakın bölgede yer alan dentin tübüllerinin sayısının ve çapının artması bakımından oldukça önemlidir. Dentinin asitlendiği durumlarda, artan geçirgenlik nedeniyle polimerize olmamış bileşenlerin toplanmasında artış olabilmektedir. Polimerize olmamış monomerler diş pulpası için potansiyel risk oluşturmaktadır. Artık monomerlerin biyolojik risk oluşturabilmesi için, birtakım faktörlerin de mevcut olması gerekmektedir. Sözgelimi, artık monomerlerin polimer yapıdan serbestleşebilmeleri, pulpaya difüze olabilmeleri için kolayca çözünebilmeleri, toksik reaksiyon oluşturabilecek doza ve kimyasal özelliğe sahip olmaları gerekmektedir. Bununla birlikte, rezin monomerlerin fibroblastların mitokondriyal aktivitelerini değiştirdiği ve pulpa dokusundaki hücreleri etkileyerek enflamatuvar medyatörlerin salınmasına neden olduğu bildirilmiştir (114, 125, 126).

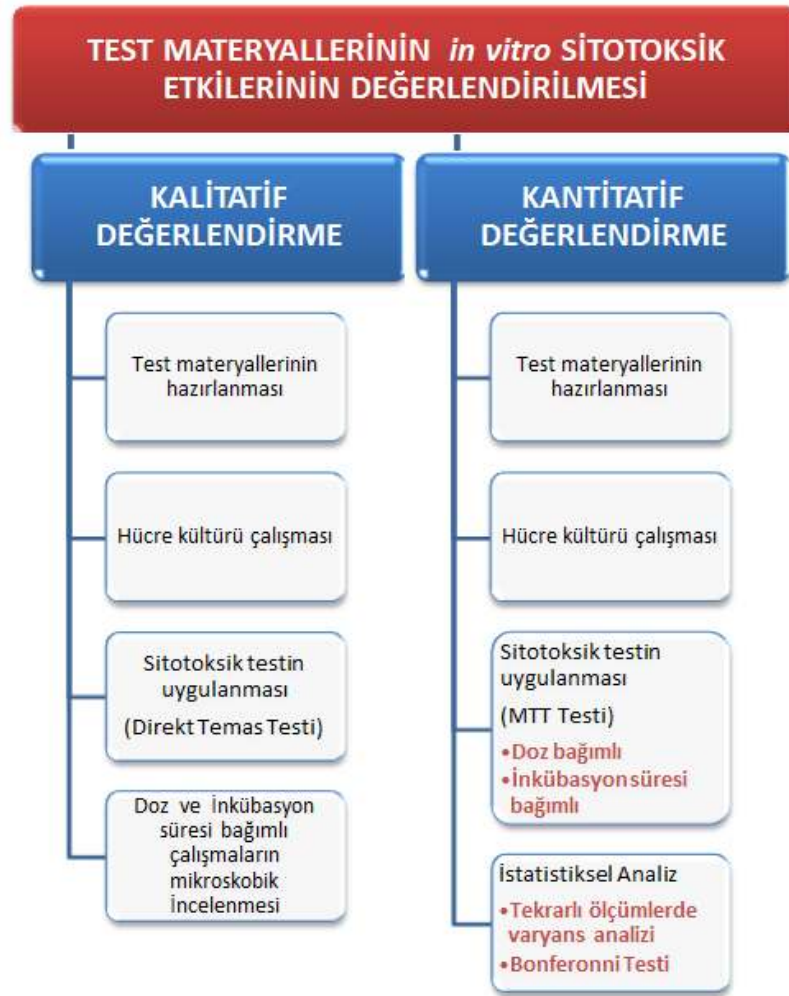
Rezin materyalden ayrılan ve özellikle polimerize olmayan bileşenlerin pulpanın vereceği cevabı etkileyebildiği belirtilmektedir. Bu nedenle; total-etch adeziv sistemlerin yüzeyel kavitelere, self-etch adeziv sistemlerin ise genç, derin ve geçirgenliği artmış kavitelere kullanılması tavsiye edilmektedir. Self-etch adezivler, polimerize olmamış monomerlerin pulpaya difüzyonunu sınırlayan smear tıkaçlarını etkilemez. Rezin esaslı materyallerin sistemik toksisiteye sebep olduğunu gösteren sonuçlara ulaşılamamıştır. Restoratif materyallerin pulpa, diş eti ve oral mukozada sebep olduğu reaksiyonlar kısa süreli olabildiği gibi, yerleştirilen materyal ve kullanılan ajanın miktarına bağlı olarak uzun sürebilmektedir. Şiddetli ve uzun süreli irritasyonlar pulpada daimi hasarlara yol açabilmektedir. Rezin esaslı materyaller ve adeziv ajanlar pulpa üzerinde lokal toksik reaksiyon oluşturma potansiyeline sahiptirler (124, 125, 127, 128).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda; klinikte rutin olarak kullanılan, beş farklı tek aşamalı self-etch adeziv materyalin sitotoksik potansiyelleri kalitatif ve kantitatif olarak iki aşamada değerlendirildi. Çalışmanın ana şeması Şekil III’de verilmiştir.

❖ Kalitatif değerlendirme aşaması, Hacettepe Teknokent Teknoloji Transferi AR-GE Danışmanlık Enerji Sağlık Çevre İletişim Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi (HT-TTM) aracılığı ile Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirildi.

❖ Kantitatif değerlendirme ile kalitatif aşamaya ait doz/inkübasyon süresinin sitotoksositeye etkisini inceleyen mikroskopik çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.



Şekil III: *In-vitro* sitotoksosite çalışmamızın özeti.

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



Resim 1: *İn-vitro* sitotoksik testlerinde kullanılan adeziv materyaller.

Kullanılan adeziv materyallerin karakteristik özellikleri (üretici firmaları, lot numaraları ve kimyasal içerikleri) Tablo 2’de verilmiştir.

Adeziv materyaller	Kodu	Üretici Firması	Lot Numarası	Kimyasal İçeriği
Prime&bond® One Select	PB-OS	Dentsply DeTrey Konstanz, Almanya	150500080	Bifonsiyonel Akrilat, Asit Akrilat, Fonksiyonalize Fosforik Asit Esteri, Tersiyer Bütanol, Başlatıcı, Stabilizatör, Su.
Optibond® All-in-One	OB-AIO	Kerr Scafati, İtalya	5501566	Self-Etching Adeziv Monomeri Gliserol Fosfat Dimetakrilat (GPDM), Mono- ve Di-Fonksiyonel Metakrilat Monomerlerini içeren Ko-Monomerler, Nano-Boyutlu Doldurucular, Sodyum Hekza Flora Silikat ve İterbiyum Florit Salan Doldurucular, Kamforokinon Bazlı Fotobaşlatıcılar, Etanol, Aseton ve Su.
G-bond® Universal	GB	GC Tokyo, Japonya	1504201	Dimetakrilat, 4-Metakriloksietil Trimellitat Anhidrit (4-META), Fosforik Asit Ester Monomeri, Silikon Dioksit, Fotobaşlatıcı, Aseton, Su.
Clearfil® Universal Bond	CUB	Kuraray Okayama, Japonya	3D0007	MDP Fosfat Monomeri, Bisfenol-A Diglisidilmetakrilat (Bis-GMA), HEMA, Hidrofilik Alifatik Dimetakrilat, Kolloidal Silika, Silan, dl-kamforokinon, Etanol, Su.
Single® Bond Universal	SBU	3M ESPE Neuss, Almanya	580934	10-metakriololoksidil dihidrojen fosfat (MDP), Dimetakrilat rezinler, 2-Hidroksietil Metakrilat (HEMA), Vitrebond™ Kopolimer, Doldurucu, Silan, Başlatıcılar, Etanol, Su.

Tablo 2. Test edilen adeziv materyaller ve özellikleri.

Sitotoksik aktivitenin tüm değerlendirme aşamaları, ISO standartları kapsamında yapılmış olup, uygulanan standartlar Tablo 3’de verilmiştir.

TS EN ISO 10993	Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi
TS EN ISO10993-1 (2014)	Bir Risk Yönetim Sürecinde Değerlendirme ve Deney
TS EN ISO10993-5 (2010)	Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri
TS EN ISO10993-12 (2013)	Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler

Tablo 3: Sitotoksikite testleri esnasında uygulanan standartlar.

1. Sitotoksik Etkinin Kalitatif Değerlendirmesi

Çalışmamızın bu aşamasında, materyallerin in-vitro sitotoksik potansiyelleri; “TS EN ISO 10993-12 ve TS EN 10993-5” standartlarına uygun olan direkt temas yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde, test materyalleri ISO standartlarıyla belirlenen negatif kontrol, pozitif kontrol ve reaktif kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı.

Negatif kontrol grubu: Sitotoksikite testlerine tabi tutulduğunda deney sistemi içerisinde tekrarlanabilir olan ve sitotoksik cevap oluşturmeyen herhangi bir malzeme ve/veya madde olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda negatif kontrol grubu olarak yüksek yoğunluklu polietilenin test numunesi (HDPE) ve aynı şekilde kültür vasatı ile hazırlanan ekstresi kullanıldı.

Pozitif kontrol grubu: Sitotoksikite testiyle değerlendirildiğinde deney sistemi içerisinde tekrarlanabilir olan ve sitotoksik cevap oluşturan herhangi bir malzeme ve/veya madde olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı.

Reaktif kontrol (kör numune) grubu: Deney numunesinin bulunduğu kaba benzer bir kap içerisinde tutulan ve deney numunesinin özütlenmesi esnasında maruz bırakıldığı şartlara maruz bırakılan deney malzemesi içermeyen özütleme aracı olarak tanımlanmaktadır. Kör numunenin amacı; özütleme kabı, özütleme aracı ve özütleme işlemine bağlı muhtemel bozucu etkileri değerlendirmektir. Reaktif kontrol grubu olarak, test materyallerinin bulunmadığı kültür vasatı kullanıldı.

1.1. Test Materyallerinin Hazırlanması

Materyaller herhangi bir işleme tabi tutulmadan (ekstre almadan) direkt olarak teste alındı. Bu amaçla, test edilecek adezivler inert absorban bir filtre kağıdına emdirilerek hücre kültürüne uygulandı. Filtre kağıtları, testlerden en az 1 gün önce, mikroplağın bir kuyucuğunun 1/10'u (24 kuyucuklu mikropalak için 0.2cm^2) büyüklüğünde yuvarlak şekilde kesilip kapalı cam petri içerisinde sterilize edildi. Aynı zamanda, filtre kağıtlarını mikroplağa uygularken kullanmak üzere test materyali sayısı kadar twizer çift kat alüminyum folyoya sarılarak otoklavlandı.

1.2. Hücre Kültürü Çalışması

Materyallerin sitotoksik potansiyellerini kalitatif olarak değerlendirdiğimiz direkt temas testinde, ISO standartlarının bu yöntem için önerdiği, maymun böbrek epitelyal hücre [CCL81 (Vero)] hattı ve kültür ortamı olarak %5 fetal bovine serum (FBS) içeren minimum essential medium (MEM) kullanıldı.

- Hücreler; karbondioksit inkübatöründe $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilerek flasklarda üretildi ve flasktaki hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında, her bir kuyucuğu 1ml olan 24 kuyucuklu mikroplağa pasajlandı.
- Flasktaki hücreler 1xTripsin/EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit) ile kaldırıldıktan sonra, 24 kuyucuklu mikropalak için steril falkon tüpte %5 FBS içeren 25ml hücre kültür ortamı hazırlandı.

1.3. Direkt Temas Testinin Uygulanması

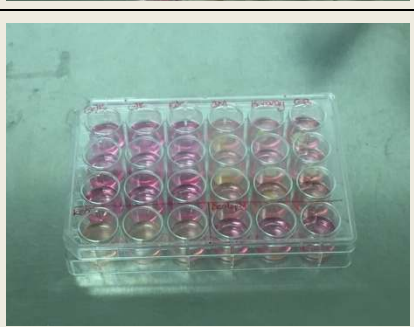
➤ Hücre kültür ortamı içinde dağıtılan hücreler, 5ml'lik steril serolojik pipetle 24 kuyucuklu mikroplağın her bir kuyucuğuna 1ml olacak şekilde yerleştirildi. Bütün kuyucuklar tamamlandıktan sonra mikropalak, yatay rotasyon hareketleriyle sallanarak hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

➤ Mikropalak inkübatöre kaldırılıp hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra, hücrelerin yoğunluğu mikroskop altında kontrol edildi. Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında numuneler uygulandı.

➤ Kontrol grupları ve steril filtre kağıtlarına emdirilmiş adeziv materyaller, taze kültür ortamı eklenen kuyucuklara her biri 3 kuyucuk olacak şekilde uygulandı.

➤ Mikropalaklar, 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopla gözlemlendi.

Testin uygulanış basamakları Şekil IV’de özetlenmiştir.

Adeziv test numuneleri ve hücre kültürü hazırlanan 24 kuyucuklu mikropalak	
Hücre kültürü hazırlanan 24 kuyucuklu mikropalağın test numunelerine göre ayrılması	
Adeziv test numunesinin steril filtre kağıdına damlatılması	
Adezivi emen steril filtre kağıtlarının hücre kültürlerine direkt uygulanması	
Mikropalağın tüm kuyucuklarına kontrol ve test gruplarının yerleştirilmesi	

Şekil IV: Direkt temas testinin uygulanması.

➤ 24 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelerin yoğunluğu ve morfolojileri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı. Böylece, test numunelerinin oluşturduğu biyolojik reaksiyonun şiddeti 0–4 değerleri arasında değişen skalaya göre değerlendirildi. Hücre kültüründe oluşan reaksiyon zonunun derecesi 2’den yüksek ise numune sitotoksik olarak kabul edildi [Tablo 4 (ISO 10993-5: 2010)].

Derece	Reaksiyon	Reaksiyon Zonunun Tanımlanması
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm’e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm’den daha fazla aşmış

Tablo 4: Test materyallerinin direkt temas testinde oluşturduğu reaksiyon zonunun tanımlanması.

2. Sitotoksik Etkinin Kantitatif Değerlendirmesi

Çalışmamızın bu aşamasında, materyallerin *in-vitro* sitotoksik potansiyelleri; “TS EN ISO 10993-12 ve TS EN 10993-5” standartlarına uygun olan MTT testi ile değerlendirildi.

2.1. Test Materyallerinin Hazırlanması

Materyallerin Dulbecco’s Modified Eagles Medium (DMEM) içerisinde maksimum çözünmesinin sağlandığı %1’lik stok çözeltileri hazırlandı ve 0.2µm’lik filtrelerden geçirilerek steril edildi. Bu stok çözeltilerden alınan örnekler, kültür ortamının içerisinde 1/10 oranında üç kez seri seyreltilerek test dilüsyonları (%0.1, %0.01 ve %0.001) hazırlandı. Böylece, test materyallerinin dört farklı dozu kullanılmış oldu. Test materyalinin eklenmediği kuyucuklar kontrol grubu olarak değerlendirildi.

2.2. Hücre Kültürü Çalışması

Materyallerin sitotoksik potansiyellerini kantitatif olarak değerlendirdiğimiz MTT testinde; ISO standartlarının bu yöntem için önerdiği hücre hatlarından biri

olan 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. Bu hücre Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Çalışma boyunca bu hücre hattının 37-40. pasajları kullanıldı.

➤ ***Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücre Hattının Çoğaltılması***

L929 hücreleri; %10 FBS (Lonza, Belçika) ve %1 penisilin/streptomisin (Lonza, Belçika) ile desteklenmiş yüksek glukozlu DMEM [HyClone, Utah, USA] ile hazırlanmış kültür ortamında, 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde aseptik koşullarda üretildi. Bu amaçla 25cm² ve 75cm²'lik hücre kültürü kapları kullanıldı.

24-72 saat inkübasyon süresince; hücre yoğunluğu ve hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutulumu alttan aydınlatmalı ışık mikroskobuyla (Olympus) incelendi.

➤ ***Hücrelerin Pasajlanması***

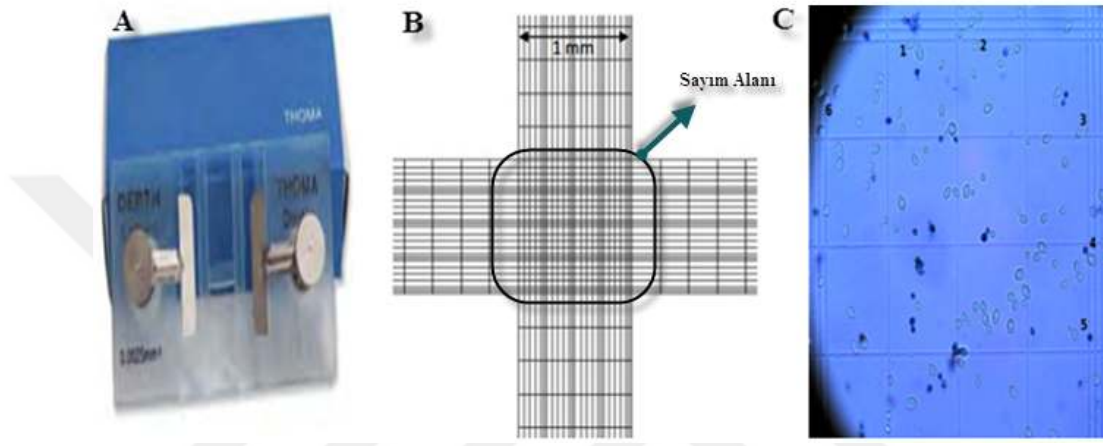
%80-90 hücre yoğunluğuna ulaşmış hücreler pasajlanarak çoğaltıldı. Bu amaçla besiyeri; hücrelerin tutunmadığı yüzeyden pipetör ile toplanarak atık kabına boşaltıldıktan sonra, hücreler PBS (Phosphate buffered saline) ile 2 kez yıkandı. 1ml tripsin-EDTA (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) çözeltisi kültür kabına eklenip, hücrelerin yüzeyden ayrılması için 5 dakika süreyle 37°C'lik etüvde (Sanyo) inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra, 5ml DMEM kültür kabına eklenip, 5 dakika süreyle 800rpm (rounds per minute)'de santrifüj (Hanil-Combi 514-R) edildi. Daha sonra süpernatant atılıp, santrifüj tübü alt çeperinde peleti oluşturan hücreler hafifçe kaldırıldı. 10ml kültür ortamı içinde süspanse edildi. Daha sonra hücre süspansiyonu eşit olarak 2 ayrı kültür kabına bölünüp, kültür kapları %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki etüvde inkübasyona bırakıldı. Bir sonraki pasajlama işlemine kadar kültür kabı içerisindeki kültür ortamı 2-3 günde bir tazelandı.

➤ ***Canlı Hücre Sayımı (Tripan Mavisi Boya Atılım Testi)***

Çalışmamızda kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya atılım yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde; hücre süspansiyonu %0.4'lük

tripan mavisi (Sigma, USA) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, thoma lamı üzerine yüklenerek mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Ölü hücreler, hücre membranlarını kaybettikleri için boyayı içine alarak mavi renkte, canlı hücreler ise boya almadığı için şeffaf şekilde izlendi (Resim 2).

Sayım alanındaki tüm bölmeler sayılarak, hücre konsantrasyonu (hücre/ml) $A \times SF \times 10^4$ formülüne göre hesaplandı (A: Sayım alanında sayılan hücre sayısı, SF: Sulandırma faktörü).



- A: Thoma lamının genel görünüşü.
 B: Thoma lamındaki sayım alanının büyütülmüş görüntüsü.
 C: Tripan mavisi boya atılım yönteminin mikroskopik görüntüsü

Resim 2: Tripan mavisi boya atılım testi.

2.3. MTT Testinin Uygulanması

L929 hücre hattı, “hücre kültürü çalışması” bölümünde ayrıntılı şekilde belirtildiği üzere çoğaltıldı. Yukarıda bahsedildiği gibi, thoma lamında hücre sayımı yapılarak 10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu mikrotiplerdeki her bir kuyucuğa $100\mu\text{l}$ (10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde) eklendi. Hücrelerin yüzeye tutunması için mikrotipler, %5 CO_2 ve %95 nem içeren 37°C 'deki etüvde 24 saat süreyle inkübe edildi.

24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve dört farklı dilüsyonda (%0.001, %0.01, %0.1 ve %1) test materyallerini içeren $100\mu\text{l}$ kültür ortamı ile muamele edildi. Böylece, test materyallerinin L929 hücreleri üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkilerine ait plak

düzeni oluşturuldu. Tüm işlemler, toplamda üç adet mikropolağa benzer şekilde uygulandı. Hazırlanan üç mikropalak, üç farklı sürede (24, 48 ve 72 saat) 37°C’de, %5 CO₂’li nemli ortamda inkübe edilerek, test materyallerinin L929 hücreleri üzerindeki süreye bağlı sitotoksik etkilerine ait çalışma düzeneği oluşturuldu.

İnkübasyonlardan sonra hücrelerin, alttan aydınlatmalı optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında ve x10 büyütmede morfolojik incelemeleri gerçekleştirildi. Mikroskoba bağlı dijital kamera (Olympus C-400, Japonya) ile fotoğraflandı. Aynı koşullar altında, hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı.

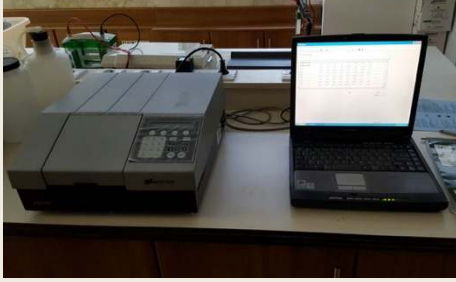
Test materyalinin eklenmediği grup, kontrol grubu olarak kullanıldı. Test materyallerinin farklı dozlarını içeren ve farklı inkübasyon sürelerinde inkübe edilen hücre kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara 100µL serumsuz besi ortamı ve 10µL MTT (2,5mg/ml steril PBS) çözeltisi eklendi. Mikropalaklar, bu şekilde %5 CO₂ içeren 37°C’deki inkübatörde üç saat daha inkübe edildi.

MTT solüsyonunun, canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristallerine dönüştürülmesi ve formazan kristallerinin isopropanol içinde çözündürülerek absorbans değerlerine bakılması sonucu, hücre canlılığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlandı. Üç saatin sonunda, örnekler üzerindeki ortam çekilerek yerine 200µL isopropanol (0,04 mol Hidroklorik asit içeren) eklendi ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi beklendi. Bu sürenin sonunda, hücrelerin optik yoğunlukları 690nm referans olmak üzere, 570nm’de mikropalak okuyuculu (BioTek-µQuant) spektrofotometre ile ölçüldü (Şekil V).

Materyallerle muamele edilen kuyucuklardaki optik dansite (OD) değerleri, kontrol kuyucukların OD değerleriyle karşılaştırıldı ve adezivlerin her bir dilüsyonu için canlılık değerleri (%) şu şekilde formüle edildi:

$$\% \text{ Canlılık} = \text{OD}_{(\text{Örnek})} / \text{OD}_{(\text{Kontrol})} \times 100$$

Her bir test materyalinin, her bir dilüsyonu için üç kuyucuk kullanıldı ve deneyler iki kez tekrarlandı. Elde edilen verilerin ortalamaları alınarak analizler tamamlandı. Test edilen her dilüsyon için hesaplanan canlılık değerleri (%), standart sapmaları ile birlikte değerlendirildi.

Hücrelerin hazırlanması ve test materyallerinin uygulanması	
L929 hücrelerinin inkübasyonu ve optik mikroskop ile hücrelerin görüntülenmesi	
MTT çözeltisinin eklenmesini takiben mikroplak okuyucu ile spektrofotometrik analiz	

Şekil V: MTT testinin uygulanması.

2.4. İstatistiksel Analiz

MTT testinden elde edilen canlılık verilerinin (%) istatistiksel değerlendirmesi, Graphpad Prism5 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. 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, Bonferroni post-testi uygulandı ($p=0.05$).

BULGULAR

Çalışmamızda, beş farklı tek aşamalı self-etch adezivinin sitotoksisite testleri, *in-vitro* direkt temas testi ile kalitatif ve MTT testi ile kantitatif olarak değerlendirildi.

1. Direkt Temas Testine Ait Bulgular

Test edilen materyallerin, maymun böbrek epitelyal hücreleri (CCL81) üzerine direkt temas metodu ile uygulanması sonucunda belirlenen biyolojik reaksiyonunun şiddeti Tablo 5’de gösterilmiştir.

Gruplar	Sitotoksisite Derecesi			Reaksiyon	Reaksiyon Zonunun Özelliği
	1.Tekrarda	2.Tekrarda	3.Tekrarda		
Negatif Kontrol	0	0	0	Yok	Test materyali etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
Reaktif Kontrol	0	0	0	Yok	Test materyali etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
PB-OS	3	3	3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’e kadar aşmış
OB-AIO	4	4	4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’den daha fazla aşmış
GB	4	4	4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’den daha fazla aşmış
CUB	4	4	4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’den daha fazla aşmış
SBU	4	4	4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’den daha fazla aşmış
Pozitif Kontrol	4	4	4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1cm’den daha fazla aşmış

Tablo 5: Reaksiyon zonuna göre değerlendirilen numunelerin sitotoksisite dereceleri.

Direkt temas testi sonuçlarına göre;

- ❖ Test edilen 8 grupta (kontrol grupları ve beş farklı adeziv) yapılan ölçümler üçer kez tekrarlandı ve her tekrarda aynı sonuç alındı.
- ❖ Negatif ve reaktif kontrol gruplarında, test materyali etrafında veya altında reaksiyon zonu belirlenmedi.
- ❖ PB-OS ile muamele edilen kültür ortamında, zon oluşumunun numune sınırlarını 1cm'e kadar aştığı tespit edildi.
- ❖ SBU, CUB, GB ve OB-AIO ile muamele edilen kuyucuklarda zon oluşumunun numune sınırlarını 1cm'den daha fazla aştığı görüldü.

Her bir adeziv için uygulanan *in-vitro* sitotoksikite testlerinin sonuç raporları Ek 1, Ek 2, Ek 3, Ek 4, Ek 5 ve Ek 6 olarak verilmiştir.

2. MTT Testine Ait Bulgular

Test materyallerinin *in-vitro* sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, hücre canlılığını belirleyen yöntemlerden biri olan MTT 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 6'da gösterilmiştir. Ortalamalar her değişkenin üç tekrarlı yapıldığı, iki bağımsız deneyin sonuçlarını temsil etmektedir.

Uygulanan test materyalinin doz 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 Bonferroni post-testi uygulanmıştır. MTT testine ait istatistiksel değerlendirmeleri gösteren veriler Tablo 7 ve 8'de özetlenmiştir.

MATERYALLER	DOZ	İNKÜBASYON SÜRELERİ					
		24 saat		48 saat		72 saat	
PB-OS	Kontrol	100.00	± 2.01	100.02	± 5.43	100.03	± 8.32
	%0.001	99.77	± 1.33	97.27	± 4.55	69.11	± 11.72
	%0.01	102.28	± 1.74	102.25	± 4.46	56.72	± 5.56
	%0.1	100.47	± 1.72	78.63	± 5.01	26.59	± 3.40
	%1	20.00	± 1.69	14.62	± 1.00	13.54	± 1.44
OB-AIO	Kontrol	100.00	± 2.01	100.02	± 5.43	100.03	± 8.32
	%0.001	94.47	± 7.91	85.32	± 16.66	63.51	± 4.83
	%0.01	92.50	± 4.53	76.08	± 8.45	52.10	± 7.69
	%0.1	76.67	± 10.86	52.12	± 7.90	33.45	± 2.64
	%1	28.69	± 3.80	19.83	± 3.12	17.27	± 2.68
GB	Kontrol	100.00	± 2.01	100.02	± 5.43	100.03	± 8.32
	%0.001	95.33	± 6.36	68.96	± 6.17	71.87	± 5.77
	%0.01	89.98	± 1.89	66.69	± 5.02	61.64	± 3.11
	%0.1	71.39	± 7.46	65.57	± 5.65	58.84	± 4.37
	%1	35.29	± 0.80	19.07	± 2.78	16.78	± 1.24
CUB	Kontrol	100.00	± 2.01	100.02	± 5.43	100.03	± 8.32
	%0.001	72.21	± 1.02	70.60	± 5.44	79.60	± 3.71
	%0.01	65.76	± 6.12	63.64	± 3.28	65.77	± 4.36
	%0.1	58.06	± 3.98	60.55	± 3.39	37.57	± 4.18
	%1	35.86	± 2.72	19.63	± 1.20	19.19	± 2.05
SBU	Kontrol	100.00	± 2.01	100.02	± 5.43	100.03	± 8.32
	%0.001	85.15	± 10.04	67.41	± 8.16	87.61	± 8.32
	%0.01	75.16	± 2.67	62.49	± 7.42	79.26	± 6.78
	%0.1	72.41	± 1.45	59.72	± 8.15	52.16	± 2.19
	%1	26.91	± 1.85	17.52	± 0.82	16.07	± 0.68

Tablo 6: Test materyallerinin L929 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyonu sonucu elde edilen canlılık değerleri (%).

*Tabloda görülen canlılık değerleri (%) 6 tekrarın ortalamasını ± standart sapmasını ifade etmektedir.

Değişkenlere ait kaynak	Df	SS	MS	F	p
PB-OS					
Zaman x Doz	8	15960	1995	29,43	< 0.0001
Zaman	2	18490	9245	136,4	< 0.0001
Doz	4	118000	29510	377,7	< 0.0001
Hata (Residual)	70	4746	67,80		
OB-AIO					
Zaman x Doz	8	6591	823,8	20,70	< 0.0001
Zaman	2	11340	5669	142,5	< 0.0001
Doz	4	100400	25110	536,9	< 0.0001
Hata (Residual)	70	2786	39,79		
GB					
Zaman x Doz	8	2604	325,5	12,14	< 0.0001
Zaman	2	4803	2402	89,56	< 0.0001
Doz	4	90450	22610	606,0	< 0.0001
Hata (Residual)	70	1877	26,81		
CUB					
Zaman x Doz	8	3150	393,8	22,82	< 0.0001
Zaman	2	589,6	294,8	17,08	< 0.0001
Doz	4	93120	23280	856,0	< 0.0001
Hata (Residual)	70	1208	17,26		
SBU					
Zaman x Doz	8	3563	445,4	13,17	< 0.0001
Zaman	2	2029	1014	30,00	< 0.0001
Doz	4	100700	25170	654,5	< 0.0001
Hata (Residual)	70	2367	33,81		

Tablo 7: MTT testi sonuçlarına ait iki yönlü varyans analizi tablosu.

**Df (Degrees of freedom): serbestlik derecesi, SS(Sum-of-squares): Kareler toplamı, MS (Mean square): Kareler ortalaması, F (F value): F değeri, p: anlamlılık düzeyi.

ETKİLEŞİM GRUPLARI	SBU		OB-AIO		GB		CUB		SBU	
	t	P	t	P	t	P	t	P	t	P
Kontrol/ %0,001										
24saat	0,09828	P > 0.05	1,759	P > 0.05	1,764	P > 0.05	12,69	P<0.001	5,137	P<0.001
48saat	0,7053	P > 0.05	4,707	P<0.001	11,63	P<0.001	13,36	P<0.001	11,34	P<0.001
72saat	7,545	P<0.001	11,55	P<0.001	10,57	P<0.001	9,221	P<0.001	2,166	P > 0.05
Kontrol/%0,01										
24saat	0,5492	P > 0.05	2,444	P < 0.05	6,230	P<0.001	15,47	P<0.001	8,584	P<0.001
48saat	0,5492	P > 0.05	7,549	P<0.001	12,50	P<0.001	16,53	P<0.001	13,01	P<0.001
72saat	10,13	P<0.001	15,23	P<0.001	14,30	P<0.001	14,87	P<0.001	6,589	P<0.001
Kontrol/%0,1										
24saat	0,1041	P > 0.05	7,391	P<0.001	10,70	P<0.001	18,94	P<0.001	9,560	P<0.001
48saat	8,030	P<0.001	15,18	P<0.001	12,68	P<0.001	17,96	P<0.001	13,87	P<0.001
72saat	17,82	P<0.001	20,92	P<0.001	15,16	P<0.001	28,20	P<0.001	16,30	P<0.001
Kontrol/%1										
24saat	21,41	P<0.001	24,88	P<0.001	26,56	P<0.001	31,88	P<0.001	27,73	P<0.001
48saat	22,88	P<0.001	27,88	P<0.001	33,12	P<0.001	40,15	P<0.001	31,24	P<0.001
72saat	23,14	P<0.001	28,80	P<0.001	34,09	P<0.001	40,21	P<0.001	31,70	P<0.001
%0,001/%0,01										
24saat	0,5472	P > 0.05	0,5783	P > 0.05	3,775	P<0.001	2,355	P > 0.05	2,913	P < 0.05
48saat	1,060	P > 0.05	2,402	P > 0.05	0,7340	P > 0.05	2,673	P < 0.05	1,408	P > 0.05
72saat	2,189	P > 0.05	3,114	P<0.01	3,146	P<0.01	4,774	P<0.001	3,738	P<0.001
%0,001 vs %0,1										
24saat	0,1710	P > 0.05	4,760	P<0.001	7,550	P<0.001	5,283	P<0.001	3,738	P<0.001
48saat	6,191	P<0.001	8,852	P<0.001	0,8913	P > 0.05	3,883	P<0.001	2,136	P > 0.05
72saat	8,687	P<0.001	7,918	P<0.001	3,880	P<0.001	16,04	P<0.001	11,94	P<0.001
%0,001 vs %1										
24saat	17,48	P<0.001	18,83	P<0.001	20,21	P<0.001	14,70	P<0.001	18,11	P<0.001
48saat	18,14	P<0.001	18,63	P<0.001	16,68	P<0.001	20,87	P<0.001	15,39	P<0.001
72saat	12,18	P<0.001	13,20	P<0.001	18,43	P<0.001	24,67	P<0.001	24,06	P<0.001
%0,01 vs %0,1										
24saat	0,3762	P > 0.05	4,181	P<0.001	3,775	P<0.001	2,928	P < 0.05	0,8253	P > 0.05
48saat	7,251	P<0.001	6,450	P<0.001	0,1573	P > 0.05	1,209	P > 0.05	0,7282	P > 0.05
72saat	6,498	P<0.001	4,804	P<0.001	0,7340	P > 0.05	11,27	P<0.001	8,205	P<0.001
%0,01 vs %1										
24saat	18,06	P<0.001	18,21	P<0.001	16,17	P<0.001	12,18	P<0.001	15,00	P<0.001
48saat	19,27	P<0.001	16,06	P<0.001	15,89	P<0.001	18,02	P<0.001	13,88	P<0.001
72saat	9,836	P<0.001	9,867	P<0.001	15,06	P<0.001	19,56	P<0.001	20,06	P<0.001
%0,1 vs %1										
24saat	17,66	P<0.001	13,74	P<0.001	12,14	P<0.001	9,050	P<0.001	14,12	P<0.001
48saat	11,52	P<0.001	9,166	P<0.001	15,72	P<0.001	16,72	P<0.001	13,10	P<0.001
72saat	2,889	P < 0.05	4,732	P<0.001	14,28	P<0.001	7,519	P<0.001	11,29	P<0.001

Tablo 8: MTT testi sonuçlarına ait Bonferroni testi tablosu.

***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).

MTT testi ile, *in-vitro* sitotoksik etkileri incelenen test materyallerinin her birinin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisi sırasıyla değerlendirilmiştir.

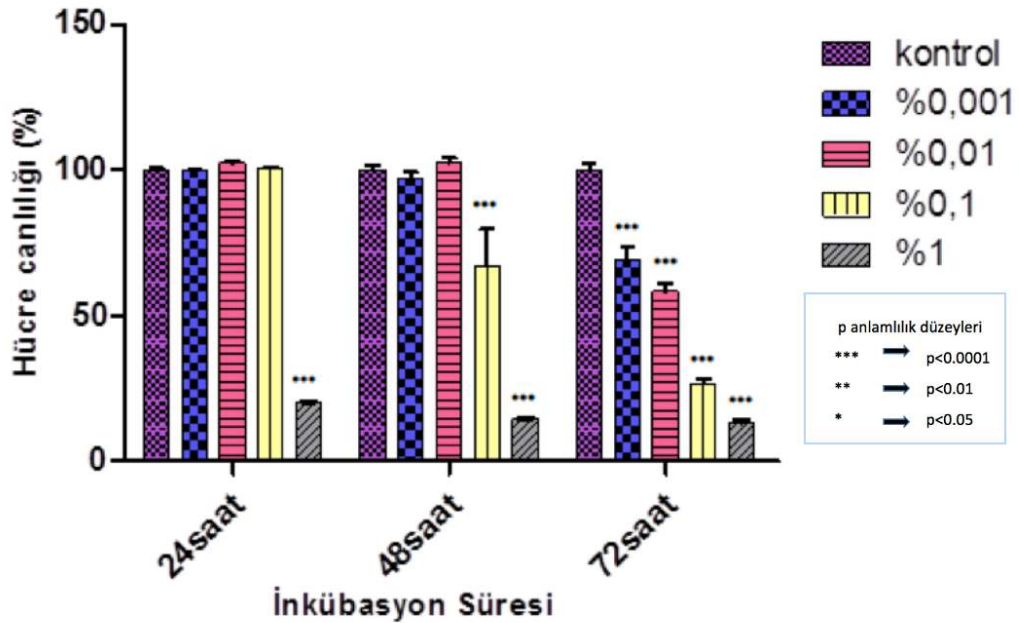
1- PB-OS adeziv materyaline ait MTT verileri *iki yönlü varyans analizi* ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P<0.001$) olduğu tespit edildi. PB-OS ile muamele edilen L929 hücrelerinde doz ve inkübasyon süresindeki artışın, canlılık oranını (%) önemli ölçüde azalttığı görüldü (Grafik I).

Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan *Bonferroni analizinde*;

24 saatlik inkübasyonda, yalnızca %1'lik adeziv dilüsyonunun kontrol grubu ve diğer tüm dozlardan anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi. %1'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

48 saatlik inkübasyonda, %1 ve % 0,1'lik adeziv dilüsyonlarının kontrol grubu ve diğer tüm dozlardan anlamlı derecede farklı olduğu görüldü. %0,1'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı izlendi ($p<0.05$).

72 saatlik inkübasyonda ise, uygulanan tüm dozların kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğu görüldü. Ayrıca en düşük iki doz dışındaki dozlar arasında anlamlı fark bulundu. En düşük uygulama dozu olan %0,001'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).



Grafik I: PB-OS'nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

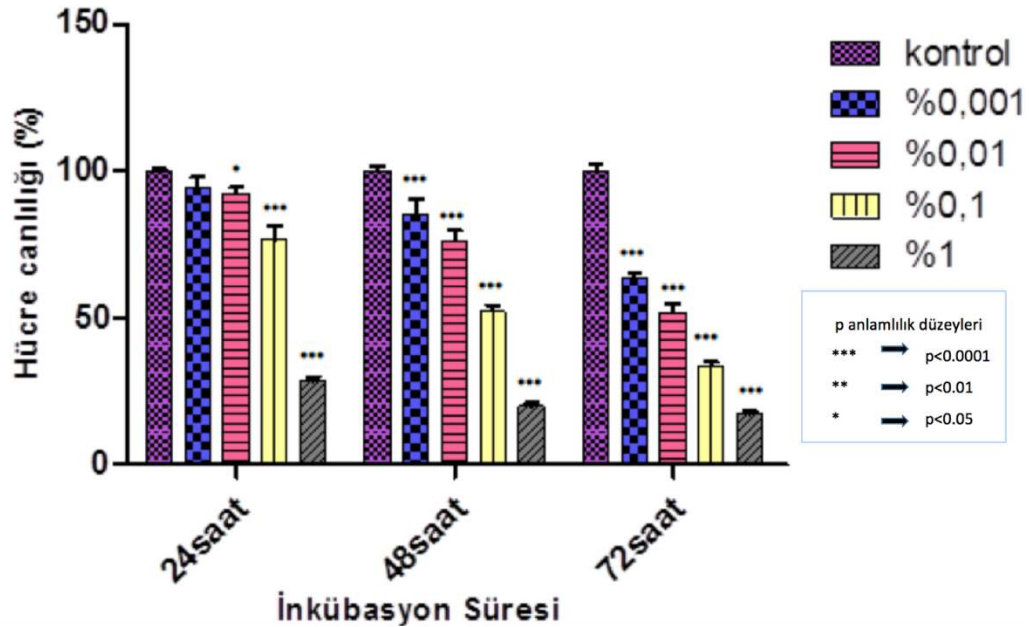
2- OB-AIO adeziv materyaline ait MTT verileri *iki yönlü varyans analizi* ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P<0.001$) belirlendi. OB-AIO ile muamele edilen L929 hücrelerinde doz ve inkübasyon süresindeki artışın canlılık oranını (%) önemli ölçüde azalttığı tespit edildi (Grafik II).

Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan *Bonferroni analizinde*;

24 saatlik inkübasyonda, %0,1 ve %1'lik dilüsyonların kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu görüldü. En düşük iki doz arasında anlamlı fark görülmezken, diğer dozlar arasındaki fark anlamlı bulundu. %0,01'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

48 saatlik inkübasyonda, test edilen tüm dozların kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğu belirlendi. En düşük iki doz arasında anlamlı fark görülmezken, diğer dozlar arasındaki fark anlamlı bulundu. %0,001'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).

72 saatlik inkübasyonda ise, uygulanan tüm dozların kontrol grubu ve birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu görüldü. %0,001'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).



Grafik II. OB-AIO'nın L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

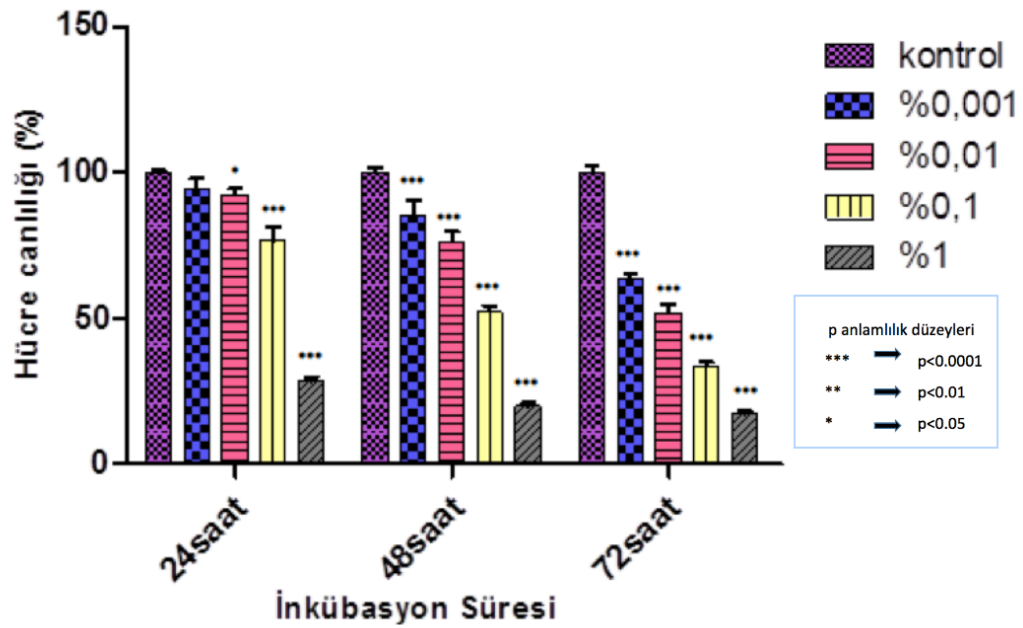
3- GB adeziv materyaline ait MTT verileri *iki yönlü varyans analizi* ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P<0.001$) olduğu görüldü. GB ile muamele edilen L929 hücrelerinde doz ve inkübasyon süresindeki artışın canlılık oranını (%) önemli ölçüde azalttığı görüldü (Grafik III).

Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan *Bonferroni analizinde*;

24 saatlik inkübasyonda, %0,001'lik dilüsyon dışındaki tüm dozların kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, denenen tüm dozlar arasında da anlamlı fark olduğu görüldü. %0,01'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

48 saatlik inkübasyonda, test edilen tüm dozların kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğu görüldü. Yalnızca %1'lik dilüsyon ile diğer dozlar arasında anlamlı fark bulundu. Düşük dozlarda hücre canlılık oranında (%) önemli bir değişiklik olmadığı belirlendi ($p<0.05$).

72 saatlik inkübasyonda ise, uygulanan tüm dozların kontrol grubu ve birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu gözlemlendi. %0,001'lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).



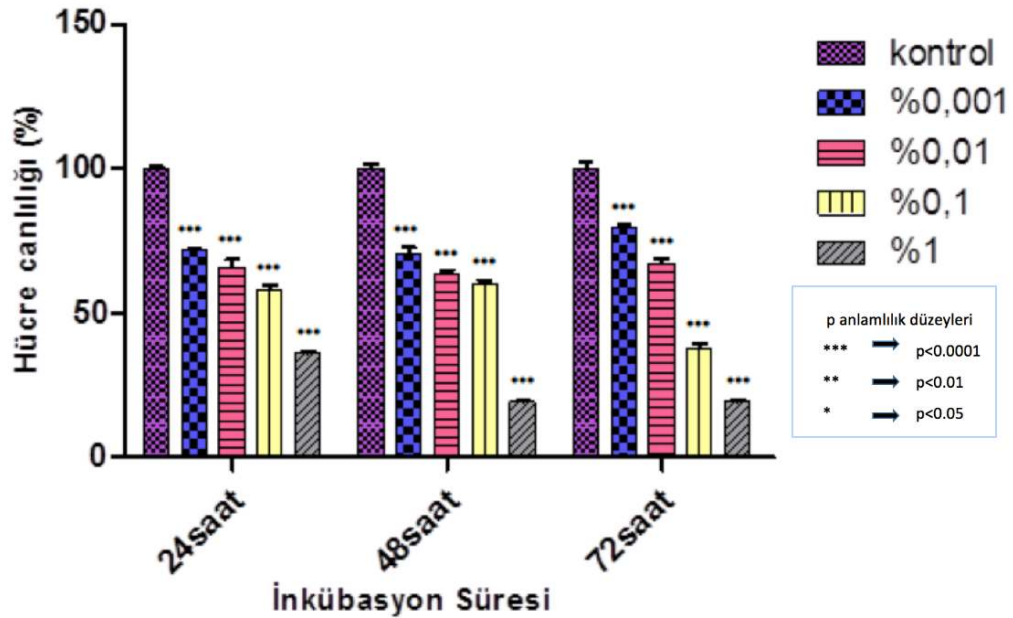
Grafik III: GB' nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

4- CUB adeziv materyaline ait MTT 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 görüldü. CUB ile muamele edilen L929 hücrelerinde dozdaki artışın canlılık oranını (%) önemli ölçüde azalttığı belirlendi. %0,001 ve %0,01’lik dilüsyonlarda sitotoksik etkinin inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak artmadığı, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda izlenen etkinin diğer inkübasyon sürelerine oranla daha az olduğu tespit edildi (Grafik IV).

Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan *Bonferroni analizinde*;

24 saatlik inkübasyonda, test edilen tüm dozların kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğu görüldü. En düşük iki doz dışındaki tüm dozlar arasında da anlamlı fark olduğu belirlendi. Test edilen tüm dilüsyonların canlılığı (%) anlamlı oranda azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).

48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda, test edilen tüm dozların kontrol grubu ve birbirlerinden anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi. %0,001’lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı izlendi ($p<0.05$).



Grafik IV: CUB’ nin L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

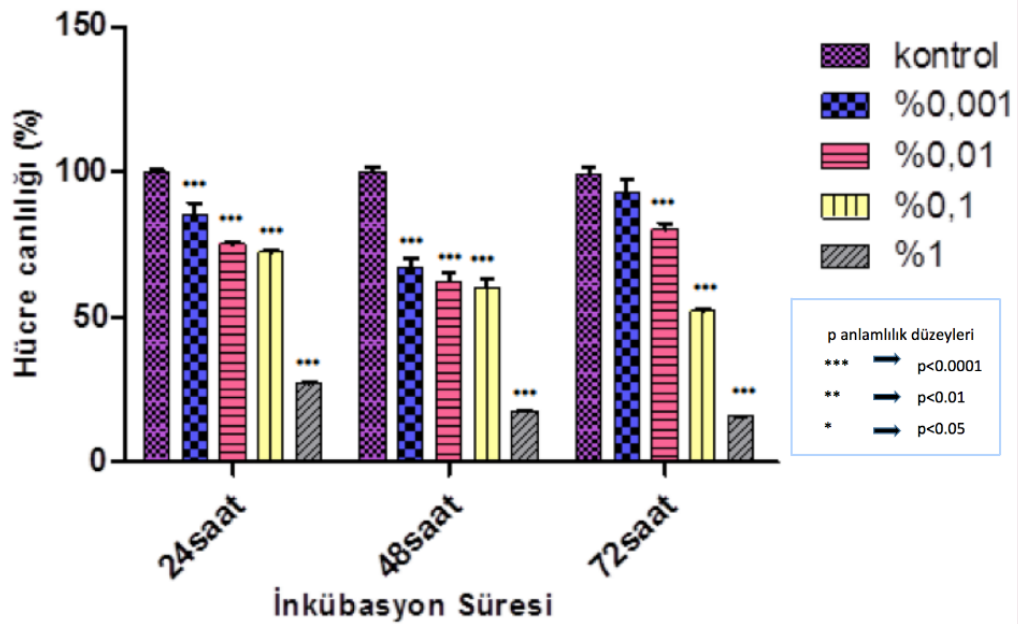
5- SBU adeziv materyaline ait MTT verileri *iki yönlü varyans analizi* ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; hem tek başlarına doz ve inkübasyon süreleri hem de doz x inkübasyon süresi etkileşim grupları arasında anlamlı farklılık ($P<0.001$) olduğu görüldü. SBU ile muamele edilen L929 hücrelerinde dozdaki artışın canlılık oranını (%) önemli ölçüde azalttığı belirlendi (Grafik V). %0,001 ve %0,01’lik dilüsyonlardaki sitotoksik etkinin inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak artmadığı, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda izlenen etkinin diğer inkübasyon sürelerine oranla daha az olduğu tespit edildi.

Farklılığı yaratan grupların tespiti için yapılan *Bonferroni analizinde*;

24 saatlik inkübasyonda, test edilen tüm dozların kontrol grubu ve birbirlerinden önemli ölçüde farklı olduğu görüldü. %0,001’lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

48 saatlik inkübasyonda, test edilen tüm dozların kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi. Düşük dozlar arasında anlamlı fark görülmezken, yalnızca %1’lik dilüsyonun diğer dozlarla arasındaki fark anlamlı bulundu. En yüksek dozda canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı izlendi ($p<0.05$).

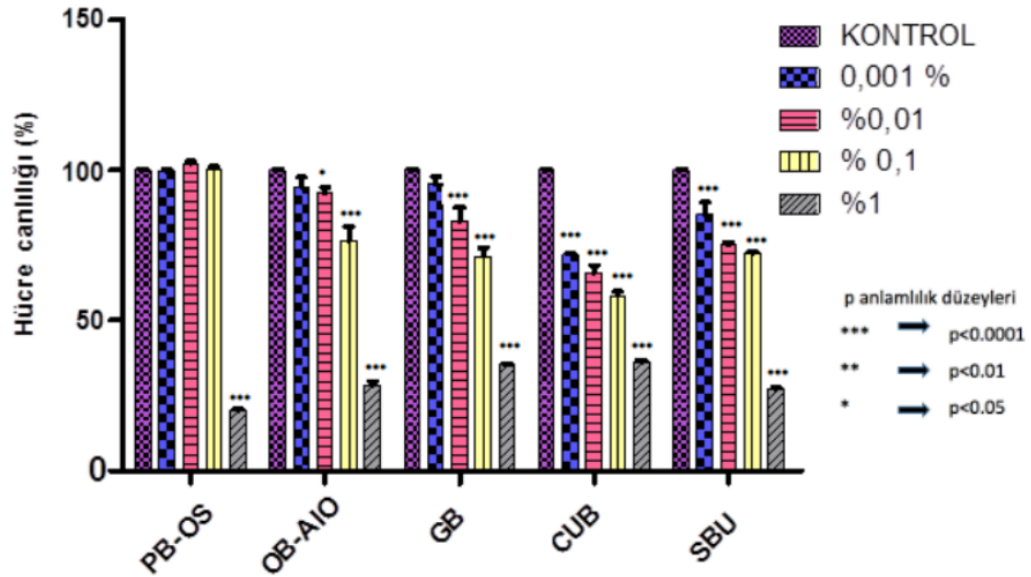
72 saatlik inkübasyonda, %0,001’lik dilüsyon dışındaki tüm dozların kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğu gözlemlendi. Test edilen tüm dozlar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. %0,01’lik dilüsyondan itibaren canlılığın (%) anlamlı oranda azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



Grafik V: SBU’ nun L929 hücreleri üzerindeki süre ve doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

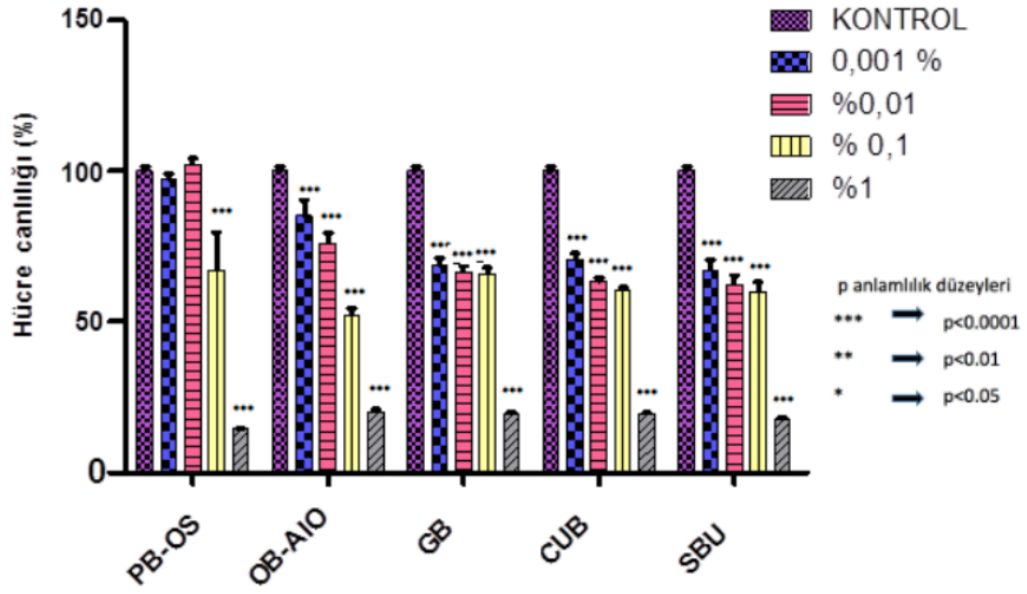
MTT yöntemiyle *in-vitro* sitotoksik etkileri incelenen test materyallerinin her birinin farklı dört dozunun; L929 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri ile muamelesi sonucunda, hücreler üzerindeki süre ve doza bağımlı etki değerlendirilmiştir.

1- Adeziv materyallerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda; GB, CUB ve SBU gruplarında sitotoksik etkinin doza bağımlı olarak belirgin şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). PB-OS ve OB-AIO adezivlerinde sitotoksik etkinin en yüksek doz dışında benzer olduğu belirlendi. En düşük dozda, en sitotoksik materyalin CUB olduğu tespit edildi (Grafik VI).



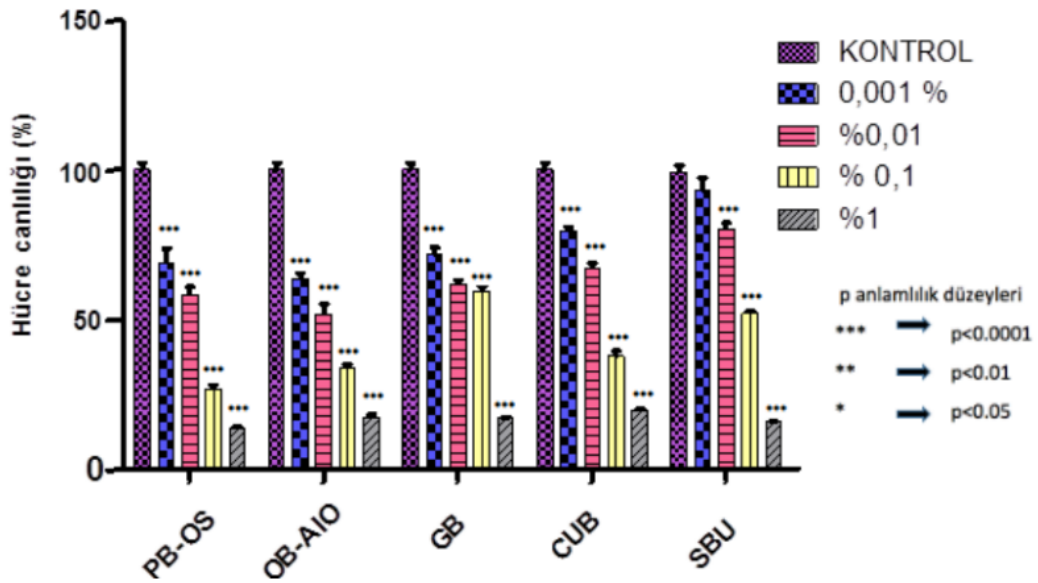
Grafik VI: Test materyallerinin 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

2- Adeziv materyallerin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda; OB-AIO'nun sitotoksik etkisinin doza bağımlı olarak belirgin biçimde arttığı görüldü. Diğer adezivlerin sitotoksik etkisinin, en yüksek doz dışında benzer olduğu tespit edildi. En sitotoksik materyallerin GB ve SBU olduğu belirlendi (Grafik VII).



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

3- Adeziv materyallerin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda; tüm adezivlerin sitotoksik etkisinin doza bağımlı olarak belirgin şekilde arttığı görüldü. En düşük dozda, en sitotoksik materyalin OB-AIO olduğu tespit edildi (Grafik VIII).



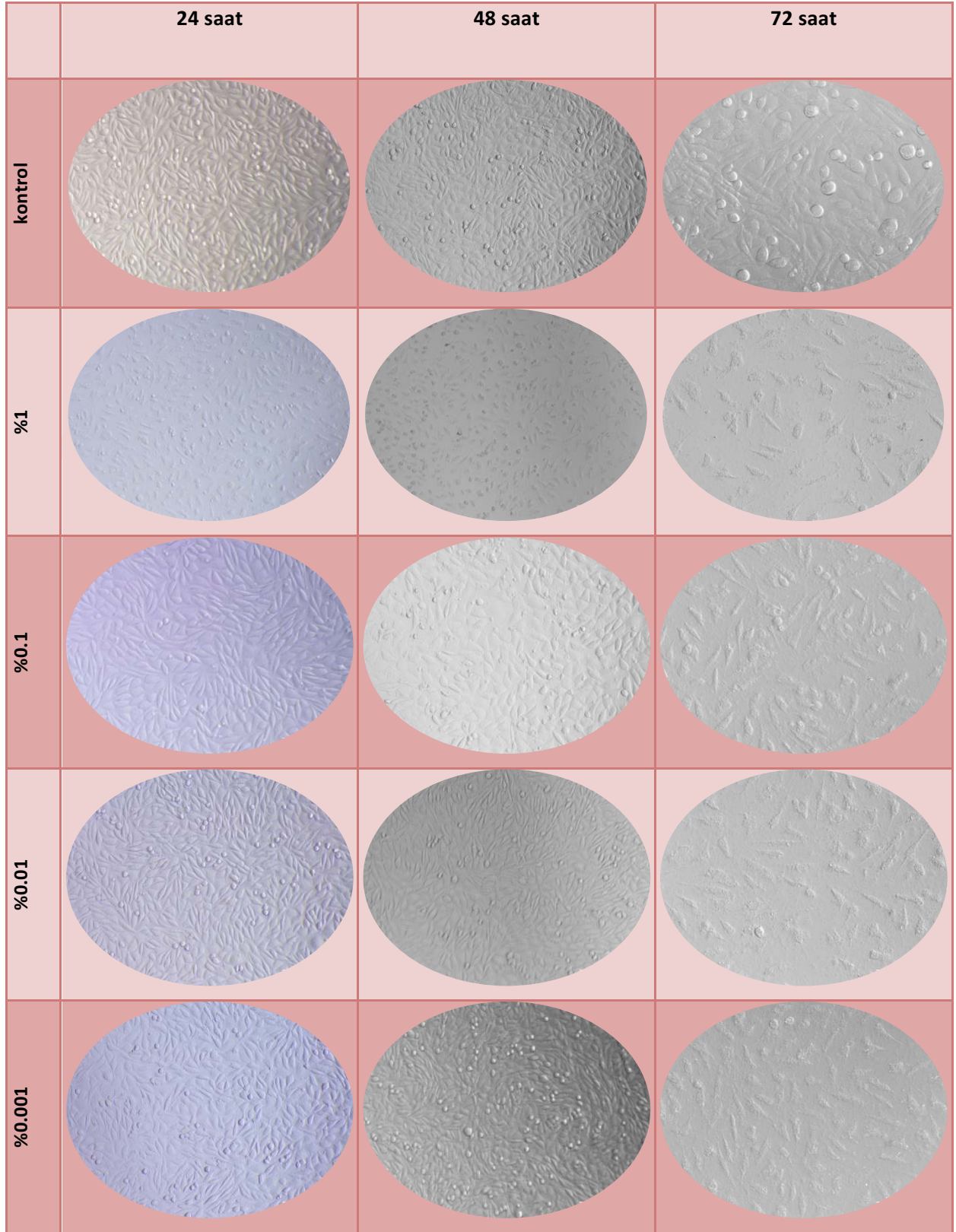
Grafik VIII: Test materyallerinin 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda L929 hücreleri üzerindeki doz bağımlı etkisini gösteren grafik.

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

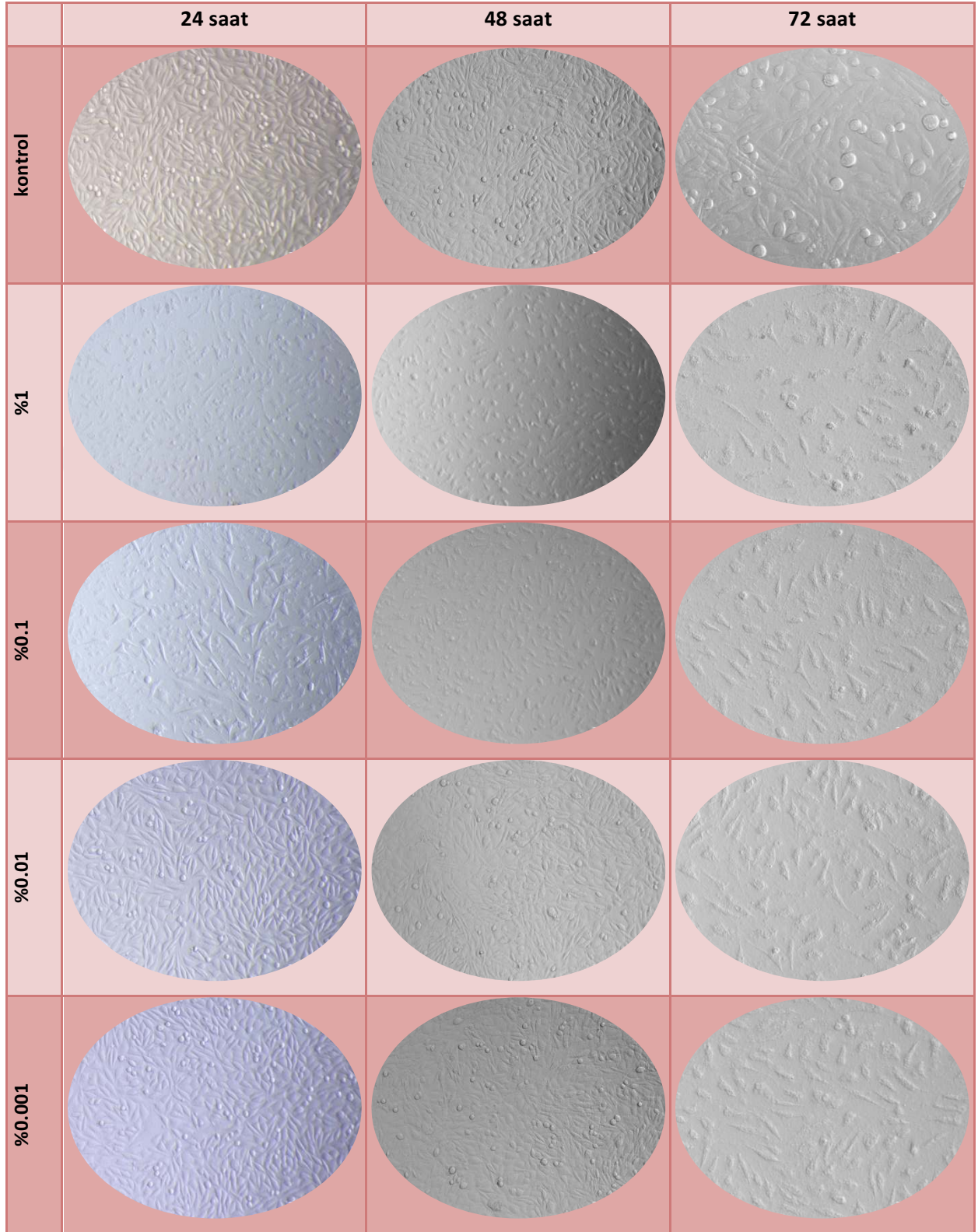
Çalışmamızda test edilen beş farklı adezivin, L929 hücreleri ile dört farklı dilüsyonda (%0.001, %0.01, %0.1 ve % 1) ve üç farklı inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) sonundaki sitotoksik aktiviteleri tespit edilmiştir. MTT testi için oluşturulan mikropalaklar, bu teste tabi tutulmadan önce alttan aydınlatmalı mikroskop ile x10 büyütmede incelendi ve test materyallerinin hücre morfolojisi ve proliferasyonu üzerindeki etkileri fotoğraflandı (Resim 2-6).

Elde edilen görüntüler incelendiğinde;

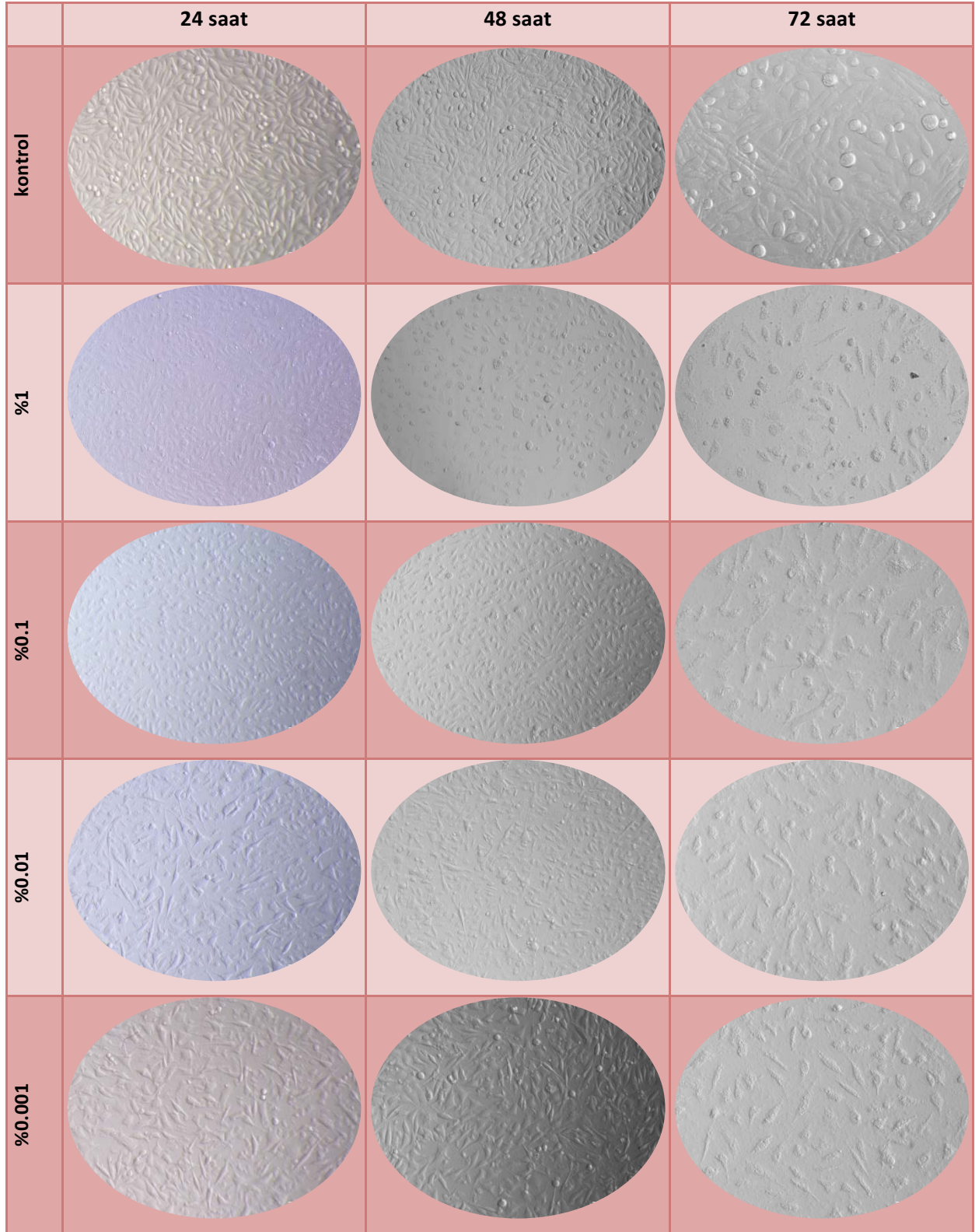
- ❖ Her bir test materyalinin, hücre proliferasyonunu doz ve zamana bağımlı olarak azalttığı görüldü.
- ❖ Tüm test materyallerinin uygulanan en yüksek dozunun (%1), hücrelerin yüzeye tutunmalarını zamana bağımlı olarak büyük ölçüde azalttığı belirlendi.
- ❖ Her bir test materyalinin en yüksek ilk iki dozunda, hücre zarlarının yapılarında bozulmalar izlendi.



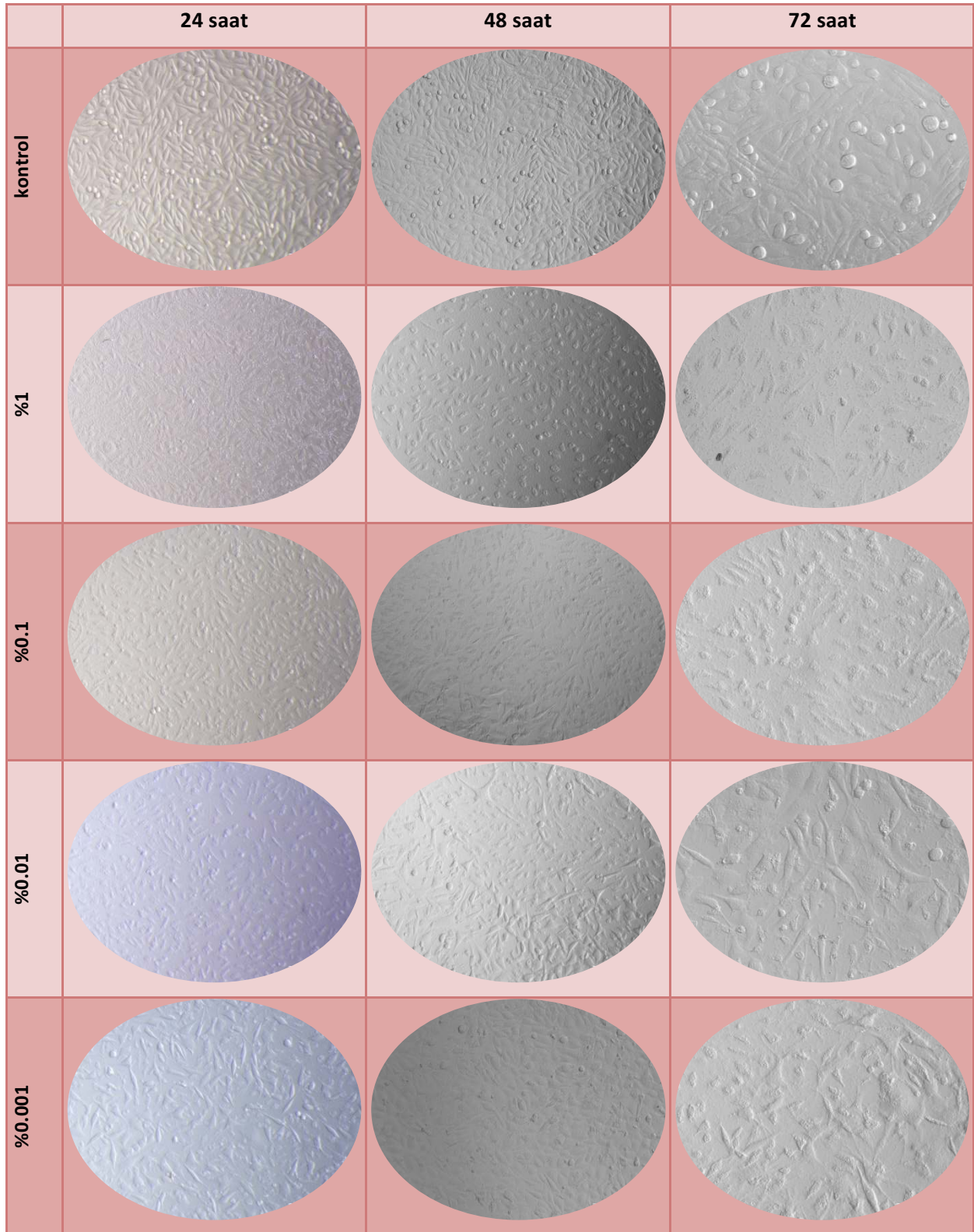
Resim 3: PB-OS ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



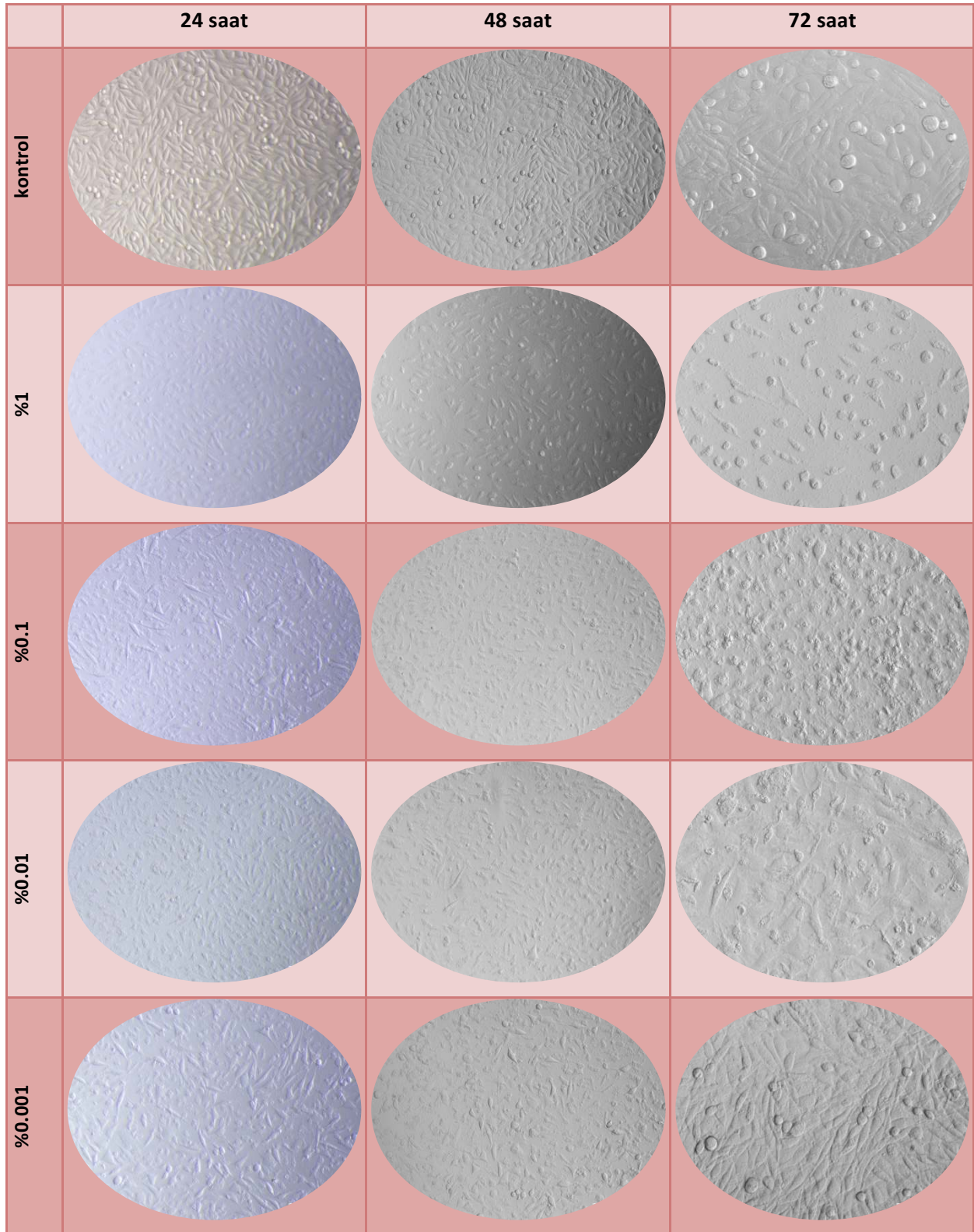
Resim 4: OB-AIO ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



Resim 5: GB ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



Resim 6: CUB ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.



Resim 7: SBU ile muamele edilen L929 hücrelerinde süre ve doz bağımlı olarak izlenen morfolojik değişiklikler.

TARTIŞMA

Diş hekimliğinde, piyasaya sürülen dental materyallerin klinik kullanım öncesinde, dentin-pulpa kompleksine etkileri ve güvenilirliklerinin değerlendirilmesi büyük öneme sahiptir. Üreticilerin adezivlerin mekanik ve fiziksel özelliklerini geliştirebilmek için yaptıkları çalışmalarda, birçok adeziv materyal yeterli *in-vitro* ve *in-vivo* çalışma yapılmadan piyasaya sürülmektedir. Bu nedenle, diş hekimi yeni bir materyali kullanmaya karar verirken, tarafsız araştırmacılarca yayınlanmış sonuçları takip etmeli, hastaların dental ihtiyaçları ve estetik arzuları, sağlık öyküsü ve risk toleransını dikkate almalı ve bir risk-yarar analizi yapmalıdır.

Son yıllarda, *in-vitro* testler ve hayvan deneylerinin diş hekimliği uygulamaları üzerinde minimal etkiye sahip olduğu düşüncesiyle, klinik testlere daha fazla öncelik verilmesi fikri kabul görmüştür. Ancak, dental materyallerin klinik değerlendirmesinde karşılaşılan yasal, etik ve bilimsel bazı engeller nedeniyle, laboratuvar testlerini tümüyle yok saymak mümkün değildir. Klinik testleri esnasında hasta güvenliğini sağlayabilmek maksadıyla, öncelikle *in-vitro* ve hayvan deneyleriyle tehlike-risk profilinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Günümüzde, piyasadaki materyalleri klinik riskler açısından karşılaştırarak değerlendirmek amacıyla, *in-vitro* ve hayvan deneyleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (129).

Dental bir materyalin biyoyumluluğunu değerlendirmek için; *in-vitro* testler → hayvan deneyleri → klinik kullanım testleri şeklinde, sıralı klasik bir paradigma kullanmak her zaman başarılı sonuçlar vermeyebilir. Bunun nedeni, *in-vitro* ve hayvan testlerinin klinik çevreyi yeterince taklit etme hususundaki eksiklikleridir. Klinik olarak yararlı olduğu düşünülen bazı materyaller *in-vitro* testler ya da hayvan deneyleri aşamasında başarısız performans sergileyebilmekte veya bunun tam tersi olabilmektedir (66, 98).

Biyoyumluluk konusunda yapılan pek çok araştırma sonucunda; *in-vitro*, hayvan ve kullanım testleri arasında doğrusal ilişki problemi olduğu bildirilmiştir. Örneğin; yapılan klinik çalışmalarda pulpa üzerine yan etkisi olmadığı görülen çinko oksit ojenol simanların, *in-vitro* testlerde önemli toksisiteye ve hayvan deneylerinde (subkutanöz implantasyon) ciddi bir enflamasyona neden olabildiği gösterilmiştir. Bu ve benzeri çelişkilerden dolayı, bazı araştırmacılar dental biyomateryalleri değerlendirmek amacıyla, kullanım testi dışındaki testlerin yararlılığını

sorgulamaktadır. Ancak, günümüzde yetkili kurumlar ve araştırmacılar çoğu dental materyallerin biyolojik değerlendirmesinde, *in-vitro* ve hayvan testlerinin önemli yeri olduğunu kabul etmektedir (69, 98, 130).

Son zamanlarda, dental materyallerin biyoyumluluk değerlendirme yöntemleri ile ilgili en etkili ve ekonomik yolun *in-vitro*, hayvan ve kullanım testlerini bir arada kullanmak olduğu görüşü ağırlık kazanmış olup; primer, sekonder ve kullanım testleri olmak üzere bir piramit tablosu önerilmiştir. Primer testler; genel hücre toksisitesi, hayvanlarda sistemik toksisite, bakteriyel mutajenik testler ve diğer *in-vitro* testlerden oluşmaktadır. Sekonder testler; hayvanlarda allerji, mukozal irritasyon ve enflamasyon testlerinden meydana gelmektedir. Kullanım testleri ise, klinik çalışmalar ile eşdeğerdir. Sadece piramidin bir alt seviyesini geçen örnekler, bir ileri test için kabul edilmektedir (69, 131).

Materyallerin biyolojik özelliklerini değerlendirmek için, 1979'da ANSI/ADA aracılığıyla tanıtılan standart test kriterleri, günümüzde ANSI (Amerikan Ulusal Standartlar Enstitüsü) aracılığı ile ADA (Amerika Dış hekimleri Birliği), ASTM (Amerika Deney ve Materyaller Derneği), CEN (Avrupa Standardizasyon Komitesi) ve en önemlisi ISO gibi birçok kuruluş tarafından geliştirilen biyolojik test standartları şeklinde sürdürülmektedir. FDA ise genellikle düzenleyici kararlar alırken, bu kuruluşlardan alınan standartları kullanmakta ve sürekli güncellemektedir. Biyoyumluluk testleri için düzenlenmiş olan bu standartların en önemli özellikleri, deney boyunca uygun kontrolleri temin etmesi, test sapma olasılıklarını azaltması ve tüm bölümler tarafından bilginin en iyi şekilde yorumlanmasını sağlamasıyla test metotlarında istikrarın sağlanmasıdır (85, 86, 132).

Bu bilgiler ışığında; çalışmamızda, adeziv materyallerin biyoyumluluklarını değerlendirmek için ilk adım olan *in-vitro* sitotoksosite testlerinin uygulanması tercih edildi. Seçilen hücre hatları, hazırlanan kültür ortamları, testlerin uygulama basamakları ve sonuçların değerlendirilmesi ISO (TS EN ISO 10993) standartlarına göre gerçekleştirildi.

Dental biyomateryallerin meydana getirdiği hücre hasarını değerlendirmek amacıyla, sitotoksosite testlerinde birçok farklı hücre kültürü ve sitotoksosite belirleyici metodlar kullanılmaktadır. Genel olarak günümüzde yapılan çalışmalarda, adeziv ajanların hücreler ile direkt kontaklı yerleştirildiği *in-vitro* bir model

kullanılmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda, özellikle doğrudan dentine uygulanan ya da pulpayı kaplama ajanı olarak kullanılan adeziv ajanların polimerize olmamış monomerlerinin, pulpa enflamasyonu ve nekrozdan sorumlu olabileceği bildirilmektedir. Polimerize olmamış adeziv materyallerin, kültür ortamına direkt olarak yerleştirilmesiyle hücrelerde canlılık, morfolojik değişiklikler, membran bütünlüğü, metabolizma ve enzim aktivitesinin değerlendirilmesi sonucu sitotoksitesite belirlenmektedir. Konuyla ilgili bazı çalışmalarda ise, sitotoksitesite test edilen adeziv ajanlar taklidi pulpa odası üzerine yerleştirilen bir bariyere uygulanmaktadır (114, 133-136).

Çalışmamızda; polimerize olmayan adeziv ajanlar, ISO standartlarına önerilen maymun böbrek epitelyal hücre hattı ve sıkça kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı ile hazırlanan iki farklı hücre kültürü ortamına direkt temas yöntemi ile uygulandı.

In-vitro sitotoksitesite değerlendirme yöntemleri; test edilen materyallerin hücre canlılığı, morfolojisi, hücre aktivitesi, proliferasyon oranı ve membran bütünlüğü üzerinde meydana getirdiği değişiklikleri belirlemektedir. Kültürde canlı kalan hücre oranını belirleyen yöntemlerde; membran bütünlüğü bozulan hücrenin yapısına giren tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar kullanılmaktadır. Bununla birlikte, membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerin içerisine girebilen diasetil florasan veya nötral kırmızı gibi boyalar da uygulanmaktadır. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan ve metabolik aktiviteyi esas alan testlerden başlıcaları; MTT, LDH ve Alamar mavisi testidir. Hücre metabolizmasındaki değişimleri ayırt edebilen metabolik bozukluk değerlendirme testleri, günümüzde oldukça popülerdir. Uygulama kolaylığı, yüksek hassasiyeti, ucuz ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle öne çıkan MTT testi; çözünebilir sarı renk tetrazolyum tuzunun, mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından üretilen çözünmeyen mavi renk formazana indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde, hücre canlılığı mikropalak okuyuculu spektrofotometre ile tespit edilmektedir (100, 116).

Çalışmamızın ilk aşamasında, hücrelerin yoğunluğu ve morfolojilerindeki değişimi direkt temas yöntemi ile kalitatif olarak değerlendirildi. Kantitatif değerlendirmede ise MTT yöntemiyle hücre proliferasyonu belirlendi.

Dental materyallerin biyouyumluluğu ve sitotoksiteleri üzerinde yapılan uzun süreli *in-vivo* çalışmalar, materyallerin kimyasal aktivitelerinin pulpa irritasyonuna sebep olabileceğini göstermiştir. Ancak, bazı araştırmacılar pulpa-dentin kompleksi üzerine uygulanan materyallerin pulpal dokuda herhangi bir irritasyona sebep olmadığını, bu durumun mikrosızıntıdan kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Dolayısıyla, dentin-pulpa kompleksine karşı oluşan riskleri, mikrobiyolojik sızıntılardan (indirekt biyolojik risk) ve materyallerin toksik özelliklerinden (direkt biyolojik risk) kaynaklananlar şeklinde incelemek doğru olacaktır (135-137).

Post-operatif hassasiyet, pulpitis ve sekonder çürük gibi sorunların, rezinlerin polimerizasyon büzülmesi sonucunda meydana gelen boşluklardan mikroorganizmaların penetrasyonuna bağlı olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, marjinal boşlukların elimine edilmesi ve etkili bir tıkama için, dentin veya mineye adeziv rezin uygulanmasının mikrosızıntı kaynaklı biyolojik riskleri büyük ölçüde azaltacağı düşünülmektedir. Dentin ve rezin arasındaki ideal bağlanmanın gerçekleşmesi; sızdırmazlığın sağlanması, mikrobiyolojik risklerin azaltılması ve polimerizasyon büzülme streslerine karşı koyulabilmesi açısından oldukça önemlidir. Dentin adezivlerin dentin ve minede bağlanma başarısızlığı, mikrosızıntı veya nanosızıntı ile sonuçlanmaktadır. Okluzal kuvvetler veya hidrolitik degradasyon dolayısıyla zaman içerisinde gerçekleşen mikrosızıntı, rezinin polimerizasyonu sonucu meydana gelen hacimsel büzülmeden kaynaklanmaktadır. Mikrosızıntının aksine nanosızıntı, diş ve rezin arasındaki bağlanma tam olsa bile meydana gelebilmektedir. Bazı adeziv sistemler diğerlerinden daha çok nanosızıntı sergilesele de, tüm adeziv sistemler bir dereceye kadar nanosızıntıya sahiptirler (138-140).

Total-etch sistemlerde, asidin yıkanması ve dentinin ideal derecede kurulanması nanosızıntı açısından oldukça önemlidir. Aksi takdirde, fazla suyun bulunduğu bölgelere primer ve adeziv yeterince infiltre olamayacak ve tam polimerizasyon gerçekleşemeyecektir. Bununla birlikte, aşırı kuru bölgelerde kollajen ağı büzüleceği için etkili bir penetrasyon derinliğine ulaşamayacaktır. Ayrıca, primerde aseton gibi organik bir çözücünün kullanılması, kollajen fibrillerin büzülmesini arttırmaktadır. Primerlenmiş dentine yüksek molekül ağırlıklı, dolduruculu rezin monomerlerin uygulanması; yeterli difüzyon süresi olmadığından,

tam olmayan penetrasyon ile sonuçlanmaktadır. Açıkta kalan ve uzun dönemde hidrolitik degradasyona maruz kalacak korunmasız kollajen ağı oluşturduğu için, bu durumların tamamı nanosızıntı ile sonuçlanmaktadır (12, 141).

Yapılan çalışmaların sonucunda; üç aşamalı total-etch adezivlerin kompozitin dentine bağlanmasında en iyi olduğu, iki aşamalı total-etch ve self-etch sistemlerin yeterli derecede bağlanma kuvveti sağladığı belirtilmiştir. Rezin içerikli dental adezivlerden diş pulpasına doğru sızabilen monomerlerin, potansiyel biyolojik risk oluşturdukları düşünülmektedir. Son yıllarda, self-etch adezivlerden salınan asidik ve rezin monomer bileşenlerin sitotoksik etkisi nedeniyle, pulpa irritasyonlarını gerçekleştirmesine dair endişeler artmıştır (40, 142-144).

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 (145).

Beş farklı tek aşamalı self-etch adezivin direkt temas metoduyla sitotoksitesinin kalitatif olarak değerlendirildiği test aşamasında; negatif ve reaktif kontrol gruplarında biyolojik reaksiyon gözlenmezken, pozitif kontrol grubunda şiddetli reaksiyon gerçekleşmiştir. Bu durum, kontrol gruplarının test edilen adezivler ile karşılaştırılabilir olduklarını göstermiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, SBU, CUB, GB ve OB-AIO'nun sitotoksik (reaksiyon derecesi=4) olduğu, PB-OS'nin ise diğer dört adezive göre daha az sitotoksik etki (reaksiyon derecesi=3) göstermesine rağmen sitotoksik (>2) olduğu tespit edilmiştir.

Sun ve arkadaşları (2016), tek aşamalı self-etch dental adezivlerin (Adper Easy One, iBond, Clearfil S³ Bond ve G-Bond) insan periodontal ligament fibroblast hücre kültürü üzerine potansiyel sitotoksik etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; tüm adezivlerin hücre canlılığında azalmaya, hücre morfolojisinde değişime ve hücre kayıplarında artışa neden olduklarını bildirmiştir (146).

Bizim çalışmamızda da; farklı inkübasyon süreleri sonunda adeziv materyallerin bulunduğu mikropalaklar, alttan aydınlatmalı mikroskop ile incelenmiş ve materyallerin hücre morfolojisi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Adeziv test

materyallerinin tümünde en yüksek ilk iki dozun, hücre zarlarının yapısında bozulma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre proliferasyonunun doz ve zamana bağımlı olarak azaldığı ve özellikle uygulanan en yüksek dozun, hücrelerin yüzeye tutunmalarını büyük oranda azalttığı görülmüştür.

Li ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada (2013); beş farklı adeziv materyalin (Super-Bond, Clearfil SE Bond, G-Bond, Single Bond2, ve Adper Easy One), farklı konsantrasyonlarının (100%, 50% ve 25%), farklı zaman periyotlarında (24, 48 ve 72 saat) insan periodontal ligament hücreleri (HPDLCs) üzerine sitotoksitelerini MTT testi ile değerlendirmiştir. Kullanılan materyallerin sitotoksik etkilerini; Super Bond<Clearfil SE Bond<G-Bond<Adper Easy One<Single Bond2 şeklinde açıklamışlardır. Adezivlerin sitotoksitelerinin farklı konsantrasyonlardan (25% < 50% < 100%) ve uygulama zamanlarından (24 < 48 < 72 saat) etkilendiğini belirtmişlerdir (147).

Materyallerin hücre canlılığına etkisini belirlemek amacıyla, L929 fare fibroblast hücre kültürüne test materyallerinin 4 farklı dozunu (%0.001, %0.01, %0.1 ve %1) üç farklı zaman periyodunda (24, 48 ve 72 saat) uygulayıp, MTT testi ile değerlendirdiğimiz çalışmamızda; Li ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu sonuçlar elde edildi.

Dental materyallerin klinik başarısı, sadece fiziksel ve kimyasal özelliklerine değil, aynı zamanda biyolojik güvenilirliklerine de bağlıdır. Rezin-bazlı materyaller hakkında rapor edilen biyolojik problemlerin az sayıda oluşu biyouyumlu olduklarını düşündürse de, bazı materyallerin sistemik östrojenik etkilerinin yanı sıra, alerjik ya da karsinojenik olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, rezin esaslı restoratif materyallerin klinik uygulama öncesinde, biyouyumluluk bakımından farklı testlerle değerlendirilmesi gerekmektedir (148).

Dental rezinlerin organik matriksi, farklı biyolojik reaksiyonlara neden olabilecek bileşiklerin kaynağıdır. Rezin esaslı maddelerden salınan akrilik monomerler ve epoksi rezin bileşiklerin çoğu, sitotoksikite için potansiyel teşkil eder. Bu materyallere karşı pulpa, dişeti ve ağız mukozası gibi dokularda sistemik, alerjik ya da lokal toksik reaksiyonlar oluşabilmektedir. Diş hekimliğinde çalışan personelde; cilt hastalıkları, alerjik veya tahriş edici kontakt dermatit gibi etkiler sıklıkla rapor edilmiştir (125, 149, 150).

Rezin monomerlerin hücresel sistem üzerine uzun dönem etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, bir hafta sonrasında kalıcı sitotoksosite gözlenmiştir. Yapılan bazı klinik deneylerde ise; self-etch adezivler ile bağlanan kompozit restorasyonların altında kavite derinliğine bakılmaksızın, postoperatif hassasiyet ve pulpa enflamasyonu varlığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, dentin bariyer testleri ile yapılan *in-vitro* sitotoksosite çalışmalarının sonucunda; >500µm dentin tabakası varlığının, pulpayı korumak için yeterli olduğu ve düşük pH'ya sahip sistemlerin pulpa hasarı oluşturmadığı kanaatine varılmıştır. Ayrıca, materyallerin polimerize edildikleri zaman sitotoksositeyi neredeyse hiç uyarmadıkları rapor edilmiştir. Farklı çalışmalarla test edilen adeziv ajanların yeterli bariyerleme olmadığı durumlarda, ciddi reaksiyonlar oluşturduğu ve en sık görülen lokal yan etkinin pulpa enflamasyonu olduğu görülmüştür (133, 142, 143, 151).

Konuyla ilgili Vajrabhaya ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları bir çalışmada; self-etch sistemlerin primer ve adezivlerinin (Optibond Solo Plus SE primer, Xeno III ve i Bond) sitotoksisitelerini, dentin bariyeri kullanarak MTT testi ile değerlendirmişlerdir. Böylece, Optibond Solo Plus SE primer, Xeno III ve i Bond materyallerinin hücre sağ kalım oranları sırasıyla; %99.66, %72.59 ve %10.65 olarak belirlenmiştir. Araştırmanın sonucuna göre; iBond en fazla toksik materyal olarak tespit edilmiş ve Optibond Solo Plus SE primerin pulpa dokusuna 0.5mm ya da daha az dentin kaldığı vakalarda seçilmesi gerektiği iddia edilmiştir (152).

Benzer bir araştırmada, Kuşdemir ve arkadaşları (2011), self-etch sistemlerin primer ve adezivlerinin L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesini direkt temas ve dentin bariyer test yöntemleri kullanarak değerlendirmişlerdir. Araştırmalarında iki aşamalı self-etch sistemlerden; Clearfil SE Bond (CSE), Clearfil Protect Bond (CPB), Prime&Bond NT/NRC (PB) materyallerini ve tek aşamalı self-etch adezivlerden; Reactmer Bond (RB), Clearfil Tri-S Bond (CTS) ve Adper Prompt L-Pop (AP) materyallerini değerlendirmişlerdir. Direkt temas testinde, adeziv sistemlerin her birinin hazırlanan dilüe formlarını (%1, %10, %20 ve %50), dentin bariyer testinde ise 0.5mm ve 1.5mm kalınlığında insan dentin disklerini kullanmışlar ve MTT testi sayesinde sonuçları yorumlamışlardır. Materyallerin toksik etkilerinin dentin kalınlığının artması ile azaldığını belirtmişlerdir. Bu sonuç bize, pulpaya dentin tübülleri ile ulaşabilen adeziv monomerlerin, artan dentin

kalınlığına bağlı olarak dentin sıvısı ile dilüe olabileceklerini ve monomerlerin pulpaya ulaşma sürecinde sitotoksik etkilerinin azalabileceğini düşündürmüştür (153).

İki aşamalı self-etch sistemlerde dentini asitleyen asidik monomerler ile primerler aynı anda uygulandığından, adeziv rezinin demineralizasyon derinliğine ulaşması daha kolaydır. Böylece self-etch adezivlerde, nanosızıntı riski minimuma indirgenmiştir. Bununla birlikte, asit veya çözücü monomer kalıntıları, rezin monomerlerin tam polimerizasyonunu önleyebilmektedir. Tek aşamalı self-etch adezivlerde meydana gelen hibrit tabaka, materyalin yüksek hidrofilitesinden dolayı yarı-geçirgen bir membran gibi davranmaktadır. Bunun neticesinde all-in-one sistemlerde, hem mikrosızıntı hem de nanosızıntı belgelenmiş olup, pulpa üzerine mikrobiyolojik riskleri olduğu düşünülmektedir (138, 154).

Ancak, da Silva ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada; dört farklı jenerasyonda yer alan adeziv sistemlerin (Multi-Purpose, Single Bond, Adper SE Plus, Easy Bond) hem bağlanma dayanımları hem de biyouyumlulukları değerlendirilmiştir. Adeziv materyallerin canlı dokular üzerine hem toksik etkili olmaması hem de bakteri penetrasyonunu engelleyecek şekilde diş dokusuna güçlü bir şekilde bağlanması gerektiği savunulmuştur. Test edilen adezivlerin 200 µm/500 µm dentin varlığında hücre canlılık oranları; üç-aşamalı total-etch sistemin %92/93, iki-aşamalı total-etch sistemin %71/64, iki-aşamalı self-etch sistemin %85/71 bulunmuş ve tek-aşamalı self-etch adezivin dentin kalınlığına bakılmaksızın bu testte hücre canlılığını azaltmadığı görülmüştür. Sonuçlar, tek aşamalı sistemlerin yeterli bağlanma dayanımı performansı ve pulpa hücrelerine en az sitotoksik etkiye sahip olduklarını göstermiştir (155).

Yapılan çalışmalarda kullanılan adeziv sistemler seyreltilerek ya da seyreltilmeden kullanılmıştır. Çalışmamızda adezivlerin sitotoksik etki meydana getiren dozlarını belirlemek adına; L929 fare fibroblast hücre hattı ile hazırlanan hücre kültürü ortamına, beş farklı adezivi dört farklı dilüsyonda (%0,001, %0,01, %0,1 ve %1) uyguladık. Adezivlerin hücresel sistem üzerine uzun dönem etkilerini, üç farklı zaman periyodunda (24, 48 ve 72 saat) değerlendirdik.

Çalışmamızda olduğu gibi, doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkiyi araştıran Gürpınar ve arkadaşları (2006) L929 fibroblastları üzerine dört iki-aşamalı self-etch sistemin (Clearfil SE bond, Clearfil Protect bond, Mac bond ve FL bond)

sitoksisitesini değerlendirmiştir. Her bir adeziv sistemin primer ve bondu 1:1000 ve 1:4000 oranlarında dilüe edilmiş ve sitotoksisiteleri 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlerinde değerlendirilmiştir. Mikroskop altında fiziksel ve patolojik hücre değişikliklerinin incelendiği tüm adeziv sistemlerin değişik derecelerde sitotoksik olduğu ve en fazla toksisitenin düşük dilüe solüsyonlarında görüldüğünü bildirmişlerdir (156).

Yapılan alışmalar ile uyumlu olan bulgularımız aşağıdaki gibi özetlenebilir;

24 saatlik inkübasyon süreci sonunda; GB, CUB ve SBU adezivlerinin neden olduğu sitotoksik etkinin doza bağımlı olarak belirgin şekilde arttığı görülrken ($p<0.05$), PB-OS ve OB-AIO adezivlerinde bu etkinin en yüksek doz dışında benzer olduğu tespit edildi. Bu bağlamda 24 saat sonunda; tüm test grupları arasında, en düşük dozda bile sitotoksik etki gösteren CUB adezivin en sitotoksik materyal olduğu söylenebilir.

48 saatlik inkübasyon süreci sonunda; OB-AIO adezivin neden olduğu sitotoksik etkinin doza bağımlı olarak belirgin şekilde arttığı görülrken, diğer adezivlerde en yüksek doz dışında benzer olduğu görüldü. Bu bağlamda 48 saat sonunda; tüm test grupları arasında GB ve SBU adezivlerinin en sitotoksik materyaller olduğu söylenebilir.

72 saatlik inkübasyon süreci sonunda; tüm adezivlerin sitotoksik etkilerinin doza bağımlı olarak belirgin şekilde arttığı görülrken, en düşük dozda bile sitotoksik etki gösteren OB-AIO adezivin en sitotoksik materyal olduğu söylenebilir.

Rezin esaslı dental materyallerin sitotoksisite mekanizmaları; ilk 24 saat içinde oral sıvılar veya alınan diyet ürünleri ile çözünen ve polimerizasyonunu tamamlayamayan serbest monomerlere bağlıdır. İkincil etkenler ise; ısı, ışık, mekanik veya kimyasal etkilerle meydana gelen degradasyon ve erozyon olayları sonucunda rezinlerden artık monomerlerin salınmasıdır. Kimyasal degradasyon, hidroliz veya enzimatik kataliz ile oluşur. Su ya da diğer çözücüler polimerlere girerek biyodegradasyon ürünlerinin salınmasına, yani hidroliz sonucu oligomerler ve monomerlerin oluşmasına neden olur. İnsan tükürüğünden kaynaklanan esterazlar, resin materyallerin biyodegradasyonunu enzimatik olarak gerçekleştirmektedir. Sonuç olarak, serbest monomerlerin uzun dönem difüzyonunu kolaylaştıran organik

matriks yumuşaması, çözücülerin çok kolay penetre olmasına ve polimer ağına çözünmesine izin vermektedir (157, 158).

Polimerize olmayan ya da degradasyona uğrayan bileşiklerden kaynaklanan direkt biyolojik risk birçok faktöre bağlıdır. Bunlardan ilki, pulpal dokulara difüze olmak için polimerlerin serbestleşmesi gerektiğidir. İkinci faktör, bileşenlerin pulpaya difüzyonunu arttıracak çözünürlüğe sahip olmasıdır. Üçüncü etken, pulpayı etkileme dozu ve süresinin, bir biyolojik reaksiyon meydana getirecek seviyede olmasıdır (159, 160).

Rezin esaslı materyallerin bazı bileşenlerinin sitotoksik etkili olduğu kabul edilmekte ve bu sonuçtan HEMA, TEGDMA ve UDMA monomerleri sorumlu tutulmaktadır. Ancak bu etki, civa klorür veya metil-civa klorürün etkisinden daha düşüktür. Rezin bazlı materyallerin biyolojik risklerini belirlemek amacıyla çok sayıda *in-vivo* çalışma yapılmış olmasına rağmen, elde edilen bilgilerin büyük bölümü *in-vitro* çalışmalara aittir (125, 161).

Yapılan bazı çalışmalarda, dentin adezivlerde bulunan değişik monomerlerin *in-vitro* sitotoksitesiteyi farklı etkileyebildiği bildirilmiştir. Test edilen self-etch adezivlerin tümü, farklı monomerle karıştırılan HEMA içerdiği halde, test grupları arasında hücre morfolojisi ve hücre canlılığı açısından farklılıklar görülmüştür. Örneğin, UDMA ve TEGDMA ile HEMA'nın birleşimi primer ve adeziv komponentlerinde ciddi sitotoksik yanıt ile sonuçlanmıştır. Bis-GMA ve TEGDMA ile HEMA'nın birleşimi fibroblastlar üzerinde daha az sitotoksik etki sergilemiştir. TEGDMA, Bis-GMA ve UDMA gibi hidrofobik monomerler, HEMA ile birlikte kullanıldıklarında, HEMA'nın hidrofilik özelliği sayesinde karışımın difüzyonu yeterli düzeyde olmaktadır. Birçok primer ve adeziv rezinin içerdiği HEMA monomeri, düşük molekül ağırlığı ve sudaki yüksek çözünürlüğü sayesinde pulpaya ulaşabilmektedir. Bu monomerlerin pulpa hücreleri üzerindeki etkilerinden biri, artık monomer dozuna bağlı olarak programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) uyarılmasıdır (162-164).

Ayrıca, yüksek konsantrasyondaki TEGDMA, Bis-GMA, UDMA ve bisfenol A'nın immunosupresyona yol açtığı ifade edilmektedir. Fare fibroblastları üzerinde yapılan *in-vivo* bir çalışmada; HEMA, Bis-GMA, TEGDMA, UDMA ve bunların kombinasyonlarına 24-72 saatlik maruziyet sonrası sitotoksitesite oranları; Bis-GMA >

UDMA > TEGDMA >>> HEMA (en az toksik) şeklinde bulunmuştur. Mevcut çalışmalara bakıldığında, test edilen self-etch primer-adeziv sistemlerin, L929 fare fibroblast hücreleri üzerine belirli oranlarda sitotoksik etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Dentin adezivlerde bulunan foto-başlatıcı kamforokinonun, sadece bir sitotoksik ajan olmayıp, aynı zamanda mutajen olduğu da belgelenmiştir. (114, 165, 166).

Doğal steroid hormonların etkisini taklit edebilen Bis-GMA, bisfenol-A dimetakrilat ve Bisfenol A gibi endokrin bozucu kimyasal bileşiklerin neden olduğu olası sağlık problemleri endişe vericidir. Bisfenol A'nın dişi farelerde fertilitateye ve yumurtalıklar üzerinde yan etkilere neden olduğu görülmüştür. HEMA, TEGDMA ya da BisGMA'nın subletal konsantrasyonlarda kullanıldığı takdirde 5-6 hafta sonunda, hücresel mitokondriyal aktivite ve total protein içerik yüzdesini değiştirdiği belirlenmiştir. Çözücü olarak BisGMA kullanıldığında, HEMA'nın neden olduğu sitotoksik etkinin artacağını bildiren çalışmalarda, HEMA'nın sitotoksikite oluşturmaya yetecek konsantrasyonda dentin boyunca hızlıca difüze olabildiği belirlenmiştir (167-169).

Son yıllarda, rezin monomerlerin insan tükürük bezlerinde tümör başlangıcı konusunda olası risk faktörü olduğundan bahsedilmektedir. Rezinlerden salınan monomerler, böbrek hücrelerinde toksisitenin artmasına yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada, HEMA'nın hücre büyümesini inhibe ettiği ve siklus bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir araştırmada, TEGDMA'nın mitokondrial hasarı uyardığı, hücre büyümesi ve toplam polar lipid sentezini engellediği bildirilmiştir. TEGDMA; oral dokulara karışmakta, membranlara penetre olmakta ve hücre içi moleküllerle reaksiyona girebilmektedir. TEGDMA'nın akciğer hücreleri için, HEMA'dan 2-5 kat daha toksik olduğu belirtilmiştir. TEGDMA'nın memeli hücrelerinde, büyük DNA delesyonlarına (genotoksikite) sebep olduğu gösterilmiştir (155, 170-173).

296 hasta üzerinde, dental materyallere karşı alerjik yanıtların test edildiği 4 yıllık bir araştırmada; hastaların %23'ünün altın, %9'unun palladyum, %6'sının civa ve %8'inin bir veya daha fazla rezin içerikli materyallere pozitif yanıt verdiği belirlenmiştir. Cilt ve mukozada meydana gelen bazı reaksiyonlar dental materyallerle ilişkilendirilmektedir. Diğer bir çalışmada, hastaların %12'si ve dişi

hekimliği personelinin %27'sinde kontakt allerji sonucu görülen egzema benzeri cilt semptomları tespit edilmiş ve bunların %2'sinin rezin materyallerden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, diş hekimlerinin %7'sinde rezin bazlı materyallere karşı cilt semptomları görülmüştür. Diş hekimliği personelinin metakrilatlara allerjisinin %1-2 civarında olduğu belirlenmiştir (174, 175).

Benzer çalışmalarda; HEMA'nın kontakt dermatite ve gecikmiş aşırı duyarlılığa neden olduğu belirtilmiştir. Ortodontik tedavi amaçlı kompozit restorasyon uygulamasından sonra, oral mukoza ile dudaklarda vezikül ve ödeme rastlanmıştır. TEGDMA içeren sealantların yerleştirmesi sonrasında; bacaklarda, gövdede ve yüzde ciddi dermatitis ve alerjik reaksiyonların (bronkospazm, vücutun tamamında ürtiker, yüz, kulak ve dudakların kabarması) görüldüğünü bildiren olgu sunumları mevcuttur. Oral kaviteye ait liken reaksiyonlarının rezinlerle yakın ilişkisi belirlenmiştir (176-178).

Rezin esaslı materyallerden salınan monomerlerin difüzyonuna ve toksisiteyi etkileyen diğer faktörlere (kalan dentin kalınlığı, geçirgenliği ve lokalizasyonu vb.) bağlı biyolojik riskleri, bazı klinik önlemler sayesinde azaltmak mümkündür. Normalde, pulpadan dışarıya doğru olan ve maddelerin girişini azaltan dentin sıvı basıncı, vital dişlerin lokal anestezi altında tedavileri yapılırken azalmaktadır. Ayrıca çürük uzaklaştırılması sırasında enfekte dentin altında bulunan hipermineralize dentin tabakası korunmazsa, pulpaya doğru monomerlerin difüzyonu kolaylaşabilmektedir. Kavite preparasyonu sırasında bu özelliklere dikkat edilmesi, rezin-bazlı materyallerin direkt biyolojik risklerini azaltacak tedbirlerdir (179).

Adeziv sistemin klinik duruma göre seçilmesi, rezin-bazlı materyallerin direkt biyolojik risklerini azaltan diğer bir faktördür. Dentin geçirgenliğinin azaldığı sklerotik dentine sahip olan veya kalan dentin kalınlığının yeterli olduğu sık kaviteler büyük bir risk oluşturmazlar. Bununla birlikte, dentin tübüllerinin yoğun ve geniş çaplı olduğu pulpaya yakın kavitelere ıslaklık ve geçirgenlik arttığı için, biyolojik riskler de artmaktadır. Yapılan bazı araştırmalarda, derin kavitelere total-etch adeziv uygulanmasının, insan pulpasında kronik enflamasyon ve granülatöz 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 (128, 160, 180).

Adeziv ajanların ince olması ve polimerizasyonun oksijen ile inhibisyonu klinik önem arz eder. Işık düzeyinin yetersizliğine bağlı olarak rezin tagların derin bölgelerinde ve nemli dentin ortamında, monomer dönüşümü tam olarak gerçekleşmemektedir. Genel olarak, iyi bir polimerizasyonun biyolojik riskin azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir. 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 (162, 181-183).

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 geliştirmedeği ve aksine aşırı ısıdan dolayı pulpaya olan riskleri arttırdığı da gösterilmiştir. Bundan dolayı yapılan araştırmalarla, ısı oluşturmeyan LED (blue-emitting diodes) ışık kaynakları geliştirilmeye çalışılmaktadır (184-186).

SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Direkt temas testinde, tüm adezivlerin biyolojik reaksiyon gösterdiği ve MTT testinde ise tüm adezivlerin farklı derecelerde sitotoksik olduğu, adezivlerin dozu arttıkça sitotoksik etkilerinin de arttığı ve materyallerin sitotoksisitesinin zamana bağlı olarak değiştiği tespit edildi.

2- Mikroplakların mikroskop altında incelenmesi ile her bir test materyalinin doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı, tüm materyallerin en yüksek dozunun hücrelerin yüzeye tutunmalarını zaman içerisinde azalttığı ve yine tüm materyallerin en yüksek ilk iki dozunun hücre zarlarının yapılarında bozulmaya neden olduğu görüldü.

3- Klinik uygulamalar esnasında, diş ve çevre dokulara zarar vermemek için alabileceğimiz önlemleri şu şekilde özetleyebiliriz:

a. Rezin monomerlerin düşük polimerizasyon oranları artık monomer salınımına neden olabildiğinden, polimerizasyonu arttıracak girişimlerde (ışık kaynaklarının geliştirilmesi ve oksijen inhibisyon tabakasının zararlı etkilerini azaltacak deneysel çalışmaların tasarlanması vb.) bulunulmalıdır.

b. Adeziv rezinler, direkt kuafaj materyali olarak kullanılmamalıdır.

c. Derin dentin kavitetlerinde (0.5mm veya daha az dentin varlığında), restorasyon ile dentin arasına, rezinin pulpaya zararlı etkilerini önleyecek kaide materyalleri uygulanmalıdır.

d. Yeterli kalınlıktaki dentin bariyerin, adezivlerin sitotoksitesini azalttığı gözlenmiştir. Farklı kalınlık ve geçirgenliğe sahip dentin kesitlerinin kullanıldığı dentin bariyer metodu çalışmaları planlanmalıdır.

e. Dişhekim ve yardımcı sağlık personeli adeziv materyallerin sürekli cilt temasından korunmalı, klinik uygulamalarda hastanın dişeti ve mukozasını koruyacak tedbirler alınmalıdır.

f. Kullandığımız adezivlerin kimyasal içerikleri ve pH değerleri sitotoksitesilerini etkileyebildiğinden, sitotoksitesi yüksek monomerler ve sitotoksik pH aralığı tespit edilerek, materyal seçimi yapılması önerilmektedir.

g. İntertübüler kollajenler arası su miktarının fazla olması, rezinin seyrelmesine neden olarak polimerizasyonun tamamlanmasını engellediğinden, klinisyenlerin adeziv sistemleri uygulamadaki teknik hassasiyetlere özen göstermesi tavsiye edilir.

KAYNAKLAR

1. Lutz F, Krejci I. Quality guidelines of operative dentistry: The Swiss approach. In: Advances in operative dentistry: challenges for the future. Vol. 2. Roulet JF, Wilson NHF, Fuzzi M, editors. Chicago: Quintessence Publishing Co: 2001. pp. 305-326.
2. Roulet JF, Degrange M. Adhesion - The silent revolution. Chicago: Quintessence Publishing Co: 200. pp. 11.
3. Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW. Biologic considerations. Fundamentals of Operative Dentistry A Contemporary Approach. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc: 1996. pp. 126.
4. Avery J. Enamel. Essentials of Oral Histology and Embryology. St. Louis: Mosby Inc: 1992. pp. 84-92.
5. Ozawa M, Ikeda H, Suda H. The effect of pulpward pressure on the response to % 50 lidocaine applied to exposed dentine in cats. Arch Oral Biol 2002; 47: 333-6.
6. Dayangaç B. Bonding Sistemleri “Kompozit Rezin Restorasyonlar”, Güneş Kitabevi Ltd Sti, Ankara. 2000.
7. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. J Dent 1997; 25: 441-58.
8. Bath-Balogh M & Fehrenbach M. Illustrated dental embryology, histology and anatomy, WB Saunders Company, 1st Edition: 1997.
9. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentin. J Oral Rehabil 1994; 21: 475-87.
10. Nakabayashi N & Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues, Tokyo Quintessence Publishing Co, Ltd, Tokyo: 1998.
11. Mjör IA & Nordhal I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. Arch Oral Biol 1995; 41: 401-12.
12. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free, acetone based, single bottle primer/adhesives. Dent Mater 1996; 12: 236-44.
13. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res 1955; 34(6): 849-53.
14. Bowen RL. Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues. II. Bonding to dentin promoted by a surface-active comonomer. J Dent Res 1965; 44(5): 895-902.
15. Nakabayashi N, Pashley DH. Acid conditioning and hybridization of substrates. Hybridization of dental hard tissues. Osaka: Quintessence Publishing Co, Inc: 1998. pp. 37-56.
16. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent 2003; 28(3): 215-35.
17. Gaengler P, Hoyer I, Montag R, Gaebler P. Micromorphological evaluation of posterior composite restorations - a 10 year report. J Oral Rehab 2004; 31(10): 991-1000.
18. Opdam NJ, Loomans BA, Roeters FJ, Bronkhorst EM. Five-year clinical performance of posterior resin composite restorations placed by dental students. J Dent 2004; 32(5): 379-83.

19. Kugel G and Ferrari M. The science of bonding: From first to sixth generation. *JADA* 2000; 131: 20-5.
20. Peumans M, Kanumili P, De Munck J, et al. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005; 21: 864-81.
21. Hashimoto M, de Gee AJ, Kaga M, Feilzer AJ. Contraction stress in dentin adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2006; 85: 728-32.
22. Van Landuyt K, De Munck J, Coutinho E, et al. Bonding to Dentin: Smear layer and the process of hybridization In: G. Eliades DC, Watts T. Eliades, eds. *Dental Hard Tissues and Bonding*. Chapter 5. Springer-Berlin: 2005. pp. 89-118.
23. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater* 1992; 8: 125-30.
24. Van Meerbeek B, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. Enamel and dentin adhesion. *Fundamentals of Operative Dentistry A Contemporary Approach*. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc: 1996. pp. 141-86.
25. Lambrechts P, Van Meerbeek B, Perdigao J, Vanherle G. Adhesives: Dos and Don'ts. Adhesion: The silent revolution in dentistry. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc: 2000. pp. 45-60.
26. Swift EJ. Dentin/enamel adhesives: review of the literature. *Pediatric Dentistry* 2002; 24(5): 456-61.
27. Lambrechts P, Van Meerbeek B, Perdigao J, Vanherle G. Adezyon. In: Wilson NHF, Roulet JF, Fuzzi M. eds. *Operatif diş hekimliğinde gelişmeler*. Cilt 2. Quintessence Yayıncılık: 2006. pp. 142-3.
28. Gwinnett AJ, Tay FR, Wei SHY. Bridging the gap between overdry and overwet bonding phenomenon-optimization of dentin hybridization and tubular seal. In: Shimono M, Maseda T, Suda H, Takayashi K, eds. *Dentin/pulp complex*. Tokyo, Quintessence: 1996. pp. 359-63.
29. Mjor IA, Odont D. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 2: initial reactions to preparation of teeth for restorative procedures. *Quintessence Int* 2001; 32(7): 537-51.
30. Kanca J. Wet bonding: Effect of drying time and distance. *Am J Dent* 1996; 9: 273-6.
31. Perdigao J, Lopes M. Dentin bonding-state of the art 1999. *Compendium on Continuing Education in General Dentistry* 1999; 20(12): 1151-8, 60-2; quiz 64.
32. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997; 25(5): 355-72.
33. Tyas MJ, Burrow MF. Adhesive restorative materials: a review. *Aust Dent J* 2004; 49(3): 112-21; quiz 54.
34. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, et al. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res* 2004; 83(11): 843-8.
35. Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res* 2003; 82(7): 537-41.
36. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: A systematic review. *Dent Mater* 2005; 21: 895-910.

37. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dental Materials* 2001; 17(4): 296-308.
38. Pashley DH, Tay FR. Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater* 2001; 17(5): 430-44.
39. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and Results. *J Dent Res* 2005; 84 (2): 118-132.
40. Bouillaguet S, Gysi P, Wataha JC, et al. Bond strength of composite to dentin using conventional, one-step, and self-etching adhesive systems. *J Dent* 2001; 29: 55-61.
41. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res* 2002; 81: 472-6.
42. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, et al. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011; 27(1): 17-28.
43. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res* 2000; 79(2): 709-14.
44. Odian G. Principles of polymerization. New York: Wiley Inter-science; 2004.
45. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105(2): 97-116.
46. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004; 83(6): 454-8.
47. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(3): 333-55.
48. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000; 79(7): 1458-63.
49. Soderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc* 1999; 130(2): 201-9.
50. Cadenaro M, Antoniolli F, Sauro S, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(6): 525-30.
51. Nomura Y, Ishibashi H, Miyahara M, et al. Effects of dental resin metabolites on estrogenic activity in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(4): 307-10.
52. Yoshida K, Greener EH. Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *J Dent* 1994; 22(5): 296-9.
53. Matyjaszewski K, Davis TP. Handbook of radical polymerization. New York: Wiley Interscience; 2002.
54. Janda R, Roulet JF, Kaminsky M, Steffin G, Latta M. Color stability of resin matrix restorative materials as a function of the method of light activation. *Eur J Oral Sci* 2004; 112(3): 280-5.
55. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of composition on rate of polymerization contraction of light-curing resin composites. *Acta Odontol Scand* 2002; 60(3): 146-50.
56. Reed M, Fujiwara H, Thompson DC. Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices. *Chem Biol Interact* 2001; 138(2): 155-70.
57. Morrison RT, Boyd RN. Organic chemistry. Boston: Allyn and Bacon; 1973.
58. Ohhashi M, Chigira H, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S. Effects of polyvalent alcohol solutions as dentine primers. *J Dent* 1997; 25(2): 161-6.

59. Bae JH, Cho BH, Kim JS, et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74(2): 822-8.
60. Frankenberger R, Lopes M, Perdigao J, Ambrose WW, Rosa BT. The use of flowable composites as filled adhesives. *Dent Mater* 2002; 18(3): 227-38.
61. Ritter AV, Bertoli C, Swift Jr EJ. Dentin bond strengths as a function of solvent and glutaraldehyde content. *Am J Dent* 2001; 14(4): 221-6.
62. Zeiger E, Gollapudi B, Spencer P. Genetic toxicity and carcino-genicity studies of glutaraldehyde-a review. *Mutat Res* 2005; 589(2): 136-51.
63. Schweikl H, Schmalz G, Gottke C. Mutagenic activity of various dentine bonding agents. *Biomaterials* 1996; 17(14): 1451-6.
64. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, et al. Systematic Review of The Chemical Composition of Contemporary Dental Adhesives. *Biomaterials* 2007; 28: 3757-85.
65. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29: 2941-53.
66. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practioners. *J Prosth Dent* 2001; 86: 203-9.
67. Schmalz G, Bindsvlev DA. *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer: 2009.
68. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials*. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier: 2006. pp. 97-125.
69. Wataha JC, Hanks CT. Biocompatibility testing-what can we anticipate? *Trans Acad Dent Mater* 1997: 109-20.
70. Browne RM. Animal tests for biocompatability of dental materials relevance, advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22: 21-4.
71. Lemons JE. Dental implant biomaterials. *J Am Dent Assoc* 1990; 121: 716-9.
72. Senawongse P, Pongprueksa P. Surface roughness of nanofill and nanohybrid resin composites after polishing and brushing. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2007; 19: 265-73.
73. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental Materials* 2006; 22: 1086-92.
74. Shcmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigastion* 1997; 1: 154-62.
75. Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA, et al. In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investig* 1999; 3: 144-9.
76. Ratner BD, Bryant SJ. *Biomaterials: where we have been and where we are going*. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 41-75.
77. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Sci* 2001; 31: 81-110.
78. Vamnes JS, Morken T, Helland S, Gjerdet NR. Dental gold alloys and contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 128-33.
79. Hensten-Pettersen A. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 707-12.
80. McCann D. Future of latex debated in states. *Am Dent Assoc News* 1998; 29(1): 10-11.

81. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod* 1999; 25: 114-7.
82. Luz C. State societies can help with amalgam waste issues. *Am Dent Assoc News* 1999; 22: 6-9.
83. Hanks CT, Wataha JC, Sun ZL. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996; 12: 186-93.
84. Clarke JH. Dentistry in western civilization 3500 B.C. to 1905 A.D. Oregon Health Sciences University: 1981. pp. 63-76.
85. ISO 7405. Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials. International Standards Organization; 1996.
86. ISO 10993. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization. 1992.
87. Cao T, Saw TY, Heng BC, et al. Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins, *Journal of Applied Toxicology* 2005; 25: 101-8.
88. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22: 6-11.
89. Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig* 1998; 2: 125-9.
90. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* 2009; 2(2): 514-48.
91. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968; 18: 443-67.
92. Spangberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 35: 389-401.
93. Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 291-6.
94. St. John KR. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 747-60.
95. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 1988; 21: 89-99.
96. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12(3): 258-66.
97. Aldridge WN. The biochemical principles of toxicology. *Exp. Toxicol* 1993; 5: 56-78.
98. Wennberg A, Mjor IA, Hensten-Pettersen A. Biological evaluation of dental restorative materials- a comparison of different test methods. *J Biomed Mat Res* 1983; 17: 23-36.
99. Saw TY, Tong C, Yap AUJ, NG MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assesment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 145-54.
100. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, Haboken; John Wiley & Sons: 2005. pp. 1-216.
101. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, et al. Adhesive resin induces apoptosis and

- cell-cycle arrest of pulp cells. *Journal of Dental Research* 2003; 82: 592-6.
102. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 1-8.
 103. About I, Camps J, Burger AS, et al. Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dent Mater* 2005; 21: 156-63.
 104. Schmalz G. A cell culture method for the screening the biocompatibility of dental materials, In 'Biomaterials'. John Wiley and Sons LTD, New York. 1982; 321-6.
 105. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011; 21: 141-9.
 106. Aydınтуğ YS. Hücre Kültürü ve diş hekimliğindeki uygulamaları, Doktora Semineri, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü: 2003.
 107. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 1999; 45(3): 214-22.
 108. Stanford JW. Recommended standard practices for cytotoxicity testing. FDI World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dent J* 1980; 30: 141-73.
 109. Schmalz G. The agar overlay method. *Int. Endod. J*, 1988; 21: 59-66.
 110. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int J Endod J* 1988; 21: 143-54.
 111. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod* 2001; 27: 96-102.
 112. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001; 27: 23-30.
 113. Dufrane D, Cornu O, Verraes T, et al. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *European Cells and Materials* 2001; 1: 52-8.
 114. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995; 74: 1602-6.
 115. Ciapetti G, Grachi D, Verri E, et al. A staining method for evaluating the cytotoxicity of medical implants. *Biomater* 1996; 17: 1259-64.
 116. Ulreich JB, Chwapi M. A quantitative microassay for in vitro toxicity testing of biomaterials. *J Biomat Res* 1981; 15: 912-22.
 117. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. *Oral Oncol* 2007; 43: 933-9.
 118. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *EurJ Oral Sci* 1998; 106: 696-706.
 119. Schweiki H, Schmalz G. Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents are mutagens in mammalian cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 284-8.
 120. Kitasako Y, Shibata S, Pereira PNR, Tagami J. Short-term dentin bridging of mechanically exposed pulps capped with adhesive resin systems. *Operat Dent* 2000; 25: 155-62.
 121. Murray PE, About I, Franquin J-C, Remusat M, Smith AJ. Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132: 482-91.

122. Nadarajah V, Cohen RE, Neiders ME, Aguirre A. Cellular inflammatory responses to implanted dental materials. *J Prosthet Dent* 1996; 75: 552-61.
123. Bayne SC. Dental restoration for oral rehabilitation-testing of laboratory properties versus clinical performance for clinical decision making. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 921-32.
124. Murray PE, About I, Lumiey PJ, et al. Cavity remaning dentin thickness and pulpal activity. *Am J Dent* 2002; 15: 41-6.
125. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 47-60.
126. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 1996; 22: 244-8.
127. Bergenhoitz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 467-80.
128. Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashiey DH. Effect of smear layers on the bonding of self-etching primer to dentin. *J Adhes Dent* 2000; 2: 99-116.
129. Mjör IA. Practice-based dental research. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 913-20.
130. Mjör IA, Hensten-Pettersen A, Skogedal O. Biological evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int Dent J* 1977; 27: 124-9.
131. Schmalz G. Modern concepts in biocompatibility testing of restorative materials. *Trans Acad Dent Mater* 1996; 9: 170-9.
132. Mjör IA. Minimum requirement for new dental materials. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 907-12.
133. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, et al. The in Vitro Toxicity of Eluates from Dentin Bonding Resins and their Effect on Tyrosine Phosphorylation of L929 Cells. *Dent Mater* 2001; 17: 333-9.
134. Wataha J. Biocompatibility of dental materials. In: Craig and Powers. *Restorative dental materials*. Mosby: 2002. pp. 125-62.
135. Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials* 2000; 16: 188-97.
136. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003; 28: 440-4.
137. Staehle HJ. Minimally invasive restorative treatment. *J Adhes Dent* 1999; 1: 267-284.
138. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of Dental Research* 2006; 85: 870-7.
139. Davidson CL, Feilzer AJ. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent* 1997; 25: 435-40.
140. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, et al. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995; 20: 18-25.
141. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003; 82: 136-40.
142. Inoue S, Van Meerbeek B, Vargas M, et al. Adhesion mechanisms of self-etching adhesives. In: *Advanced adhesive dentistry. 3rd International Kuraray symposium*, 2000.

143. Yoshikawa T, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Pashley DH. Effects of dentin depth and cavity configuration on bond strength. *J Dent Res* 1999; 78: 898-905.
144. Bouillaguet S, Degrange M, Cattani M, Godin C, Meyer JM. Bonding to dentin achieved by general practitioners. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2002; 112: 1006-11.
145. Cal E, Guneri P, Atay A, Cetintas VB. Cytotoxicity of dentin bonding agents. *Gen Dent* 2014; 62(6): 11-4.
146. Sun F, Mao P, Wang C, et al. Cytotoxic effects of one-step self-etching dental adhesives on human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Adhes Dent* 2016; 18(2): 99-109.
147. Li JL, Wang WM, Ge JY, Ji J, Wang TC. A comparative study of the cytotoxicity of five dental bonding agents to human periodontal ligament cells. *Shanghai journal of stomatology* 2013; 22(6): 628-33.
148. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 1999; 27: 557-64.
149. Ortengren U. On composite resin materials. Degradation, erosion and possible adverse effects in dentists. *Swed Dent J Suppl* 2000; 141: 1-61.
150. Alanko K, Susitaival P, Jolanki R, Kanerva L. Occupational skin diseases among dental nurses. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 77-82.
151. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater* 2002; 18: 576-80.
152. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Bosl C, Schmalz G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 86-90.
153. Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, et al. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dental Materials Journal*. 2011; 30 (6): 799-805.
154. Tay FR, King NM, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent* 2002; 30: 371-82.
155. da Silva JMF, Rodrigues JR, Camargo CHR, et al. Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clin Oral Invest* 2014; 18(2): 607-13.
156. Gulpinar A, Onur MA, Cehreli ZC, Tasman F. Cytotoxicity of Two-step Self-etching Primer/Adhesives on L929 Cells. *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 2006; 21: 55-69.
157. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 136-51.
158. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials* 2002; 23: 1707-19.
159. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 172-9.
160. Mjör IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int* 2002; 33: 35-63.

161. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 2002; 28: 188-92.
162. 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 Mater Res* 1998; 41: 474-80.
163. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, et al. Stimulation of Glutathione Depletion, ROS Production and Cell Cycle Arrest of Dental Pulp Cells and Gingival Epithelial Cells by HEMA. *Biomaterials* 2005; 26: 745-53.
164. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd B, Soheili-Majid E, Goldberg M. TEGDMA-induced Toxicity in Human Fibroblasts is Associated with Early and Drastic Glutathione Depletion with Subsequent Production of Oxygen Reactive Species. *J Biomed Mater Res* 2003; 66: 476-82.
165. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Variability of Cytotoxicity and Leaching of Substances from Five Dentin Adhesives. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 772-7.
166. Al-Hiyyasat AS, Darmani H, Elbetieha AM. Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 267-72.
167. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281-7.
168. Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res* 2004; 83: 222-6.
169. Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, et al. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 2000; 16: 213-7.
170. Franz-Xaver R, Jürgen D, Kai K, et al. Synergistic effects of H₂O₂ with components of dental restorative materials on glucogenesis in rat kidney tubules. *Biomaterials* 2003; 24: 1909-16.
171. Kehe K, Reichl FX, Durner J, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 2001; 22: 317-22.
172. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Biomaterials* 2006; 27: 1762-70.
173. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005; 26: 5130-7.
174. Schmalz G, Garhammer P. Biological interaction of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater* 2002; 18: 396-406.
175. Garhammer P, Schmalz G, Hiller KA, Reitingner T. Metal content of biopsies adjacent to dental cast alloys. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 92-7.
176. Katsuno K, Manabe A, Kurihara A, et al. The adverse effect of commercial dentine-bonding systems on the skin of guinea pigs. *J Oral Rehabil* 1998; 25: 180-4.
177. Issa Y, Duxbury AJ, Macfarlane TV, Brunton PA. Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *Br Dent J* 2005; 198: 361-6.

178. Blomgren J, Axell T, Sandahi O, Jontell M. Adverse reactions in the oral mucosa associated with anterior composite restorations. *J Oral Pathol & Med* 1996; 25: 311-3.
179. Kim S, Dörscher-Kim J. Haemodynamic regulation of the dental pulp. In: *Dynamic aspects of the dental pulp. Molecular biology, pharmacology and pathophysiology.* Inoki R, Kudo T, Olgart L, editors. London: Chapman and Hall Publishing: 1990. pp. 167-88.
180. Gwinnett AJ, Tay F. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *American Journal of Dentistry* 1998; 11: 35-44.
181. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araujo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 2005; 21: 599-607.
182. Schuurs AHB, Gruythuysen RJM, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 240-50.
183. Schmaltz G, Schuster U, Koch A. Cytotoxicity of Low pH Dentin-Bonding Agents in a Dentin Barrier Test In Vitro. *J Endodont* 2002; 28: 188-92.
184. Nomura Y, Teshima W, Tanaka N, et al. Thermal analysis of dental resins cured with blue light-emitting diodes (LEDs). *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2002; 63: 209-13.
185. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dent Mater* 2001; 17: 178-83.
186. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *Journal of Dental Research* 1998; 77: 2012-9.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana’da doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Adana’da tamamladıktan sonra, 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başladım. 2012’de yüksek lisans eğitimimi bitirdikten sonra, 2013 Aralık’ta Dicle Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı’na Diş Hekimliğinde Uzmanlık sınavı ile başlamış olup, halen devam etmekteyim.





TEKNİK BİLGİLER

Sözleşme Numarası: BU-2016/11A

UYGULANAN STANDART

TS EN ISO 10993: Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi
TS EN ISO 10993-1:2014 Bir Risk Yönetim Sürecinde Değerlendirme ve Deney
TS EN ISO 10993-5:2010 Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri
TS EN ISO 10993-12:2013 Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler

Testte Kullanılan Numune Miktarı: 1 adet

Test Başlangıç Tarihi: 16.08.2016

Test Bitiş Tarihi: 19.08.2016

ÇALIŞMA TASARIMI

Uygulama*:

DİREKT TEMAS	X	EKSTRE	-	AGAR DİFÜZYON	-
TS EN ISO 10993-12 "Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler" ve TS EN ISO 10993-5 "Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri" standartlarına göre sıvı test numunesi kullanılır.		Ekstraksiyon Metodu: Katı test numunesi ekstresi TS EN ISO 10993-12 "Numune hazırlama ve referans malzemeler" standartındaki "Standart yüzey alanları ve özüt sıvı hacimleri" çizelgesine göre hazırlanır. Test numunesi içeren kültür vasatının 37°C'lik %5 CO ₂ (V/V) inkübatöründe 24 saat boyunca inkübasyonu.		TS EN ISO 10993-12 "Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler" ve TS EN ISO 10993-5 "Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri" standartlarına göre test numunesi filtre kağıdı ile uygulanır.	
*UYGUN OLAN SEÇENEK "X", UYGUN OLMAYAN SEÇENEK "-" İLE İŞARETLENMİŞTİR.					

Kültür Vasatı: Minimum Essential Medium (%5 FBS'li)

Agar Difüzyon için: Minimum Essential Medium (%5 FBS'li) / Agar (1:1)

Hücre Hattı: CCL 81 (Vero-African Monkey Kidney Cell Line)

Negatif Kontrol: Yüksek Yoğunluklu Polietilen

Pozitif Kontrol: Dimetil sülfoksit

Reaktif Kontrol: Kültür Vasatı





SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11A

Müşteri Adı/Adresi: T.C. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü
Dış Hek. Fak. Restoratif Dış Tedavisi Anabilim Dalı

Numunenin Adı: Prime&bond one select

Numunenin Lot No'su: 1505000890, CE:0123

Testin Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye Ankara, Türkiye

Numune Geliş Tarihi: 28.07.2016

Rapor Tarihi: 19.08.2016

Eki: Teknik Bilgiler

SONUÇ

Test numunesi "Prime&bond one select (Lot 1505000890, CE:0123)" **sitotoksik kabul edilmektedir.**

İDARİ YÖNETİCİ

Prof. Dr. Serdar Uma

KOORDİNATÖR

Prof. Dr. İnci Erdemli



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.



SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11A

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

"Direkt Temas" ve "Agar Difüzyon" için Tablo 1, "Ekstre" için Tablo 2 kullanılmıştır. Kostarlar 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopta gözlemlenir. Biyolojik reaktivite, 24 saatlik inkübasyonun ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 0 – 4 arasında değişen skalaya göre değerlendirilir;

TABLO 1:

DERECE	REAKSİYON	REAKSİYON ZONUNUN TANIMLANMASI
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'den daha fazla aşmış

TABLO 2:

DERECE	REAKSİYON	KÜLTÜRLERİN DURUMLARI
0	Yok	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
1	Çok az	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
2	Hafif	Yuvarlak hücre sayısı %50'den daha az, sitoplazma içi granül yok, aşırı hücre yıkımı yok, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla değil
3	Orta	Yuvarlak veya yıkıma uğramış hücre sayısı hücre katmanının %70'inden daha fazlası değil, hücre katmanları tamamen parçalanmış değil, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla
4	Şiddetli	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

Sonucun sayısal değeri 2'den büyükse numune sitotoksik kabul edilir.

SONUÇ

24 saat sonunda **orta (+3)** derecede biyolojik reaktivite gözlemlendi.

DEĞERLENDİRME

BU-2016/11A kodlu test numunesi **sitotoksik kabul edilmektedir.**



Prof. Dr. Pelin Kelicen Uğur

Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

EK.2.



SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11B

Müşteri Adı/Adresi: T.C. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü
Diş Hek. Fak. Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

Numunenin Adı: Clearfil Universal Bond

Numunenin Lot No'su: 3D0007, CE:0197

Testin Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye Ankara, Türkiye

Numune Geliş Tarihi: 28.07.2016

Rapor Tarihi: 19.08.2016

Eki: Teknik Bilgiler

SONUÇ

Test numunesi "Clearfil Universal Bond (Lot 3D0007, CE:0197)" **sitotoksik kabul edilmektedir.**

İDARİ YÖNETİCİ

Prof. Dr. Serdar Uma

KOORDİNATÖR

Prof. Dr. İnci Erdemli



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.



SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11B

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

"Direkt Temas" ve "Agar Difüzyon" için Tablo 1, "Ekstre" için Tablo 2 kullanılmıştır.
Kostarlar 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopta gözlemlenir.
Biyolojik reaktivite, 24 saatlik inkübasyonun ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 0 – 4 arasında değişen skalaya göre değerlendirilir;

TABLO 1:

DERECE	REAKSİYON	REAKSİYON ZONUNUN TANIMLANMASI
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'den daha fazla aşmış

TABLO 2:

DERECE	REAKSİYON	KÜLTÜRLERİN DURUMLARI
0	Yok	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
1	Çok az	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
2	Hafif	Yuvarlak hücre sayısı %50'den daha az, sitoplazma içi granül yok, aşırı hücre yıkımı yok, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla değil
3	Orta	Yuvarlak veya yıkıma uğramış hücre sayısı hücre katmanının %70'inden daha fazlası değil, hücre katmanları tamamen parçalanmış değil, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla
4	Şiddetli	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

Sonucun sayısal değeri 2'den büyükse numune sitotoksik kabul edilir.

SONUÇ

24 saat sonunda **şiddetli (+4)** derecede biyolojik reaktivite gözlemlendi.

DEĞERLENDİRME

BU-2016/11B kodlu test numunesi **sitotoksik kabul edilmektedir.**

TEST SORUMLUSU

Prof. Dr. Paim Kefken Uğur



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

EK.3.



SİTOTOKSİSİTE
TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11C

Müşteri Adı/Adresi: T.C. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü
Diş Hek. Fak. Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

Numunenin Adı: Optibond All-in-one

Numunenin Lot No'su: 5501566, CE:0086

Testin Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye Ankara, Türkiye

Numune Geliş Tarihi: 28.07.2016

Rapor Tarihi: 19.08.2016

Eki: Teknik Bilgiler

SONUÇ

Test numunesi "Optibond All-in-one (Lot 5501566, CE:0086)" **sitotoksik kabul edilmektedir.**

İDARİ YÖNETİCİ

Prof. Dr. Serdar Uma

KOORDİNATÖR

Prof. Dr. İnci Erdemli



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.



SİTOTOKSİSİTE
TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11C

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

"Direkt Temas" ve "Agar Difüzyon" için Tablo 1, "Ekstre" için Tablo 2 kullanılmıştır.
Kostarlar 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopta gözlemlenir.
Biyolojik reaktivite, 24 saatlik inkübasyonun ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 0 – 4 arasında değişen skalaya göre değerlendirilir;

TABLO 1:

DERECE	REAKSİYON	REAKSİYON ZONUNUN TANIMLANMASI
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'den daha fazla aşmış

TABLO 2:

DERECE	REAKSİYON	KÜLTÜRLERİN DURUMLARI
0	Yok	Aynı sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
1	Çok az	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
2	Hafif	Yuvarlak hücre sayısı %50'den daha az, sitoplazma içi granül yok, aşırı hücre yıkımı yok, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla değil
3	Orta	Yuvarlak veya yıkıma uğramış hücre sayısı hücre katmanının %70'inden daha fazlası değil, hücre katmanları tamamen parçalanmış değil, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla
4	Şiddetli	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

Sonucun sayısal değeri 2'den büyükse numune sitotoksik kabul edilir.

SONUÇ

24 saat sonunda **şiddetli (+4)** derecede biyolojik reaktivite gözlemlendi.

DEĞERLENDİRME

BU-2016/11C kodlu test numunesi **sitotoksik kabul edilmektedir.**



Prof. Dr. Pelin Kelicen Uğur

Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

EK.4.



SİTOTOKSİSİTE
TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11D

Müşteri Adı/Adresi: T.C. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü
Diş Hek. Fak. Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

Numunenin Adı: G-bond universal

Numunenin Lot No'su: 1504201, CE:0086

Testin Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye Ankara, Türkiye

Numune Geliş Tarihi: 28.07.2016

Rapor Tarihi: 19.08.2016

Eki: Teknik Bilgiler

SONUÇ

Test numunesi "G-bond universal (Lot 1504201, CE:0086)" **sitotoksik kabul edilmektedir.**

İDARİ YÖNETİCİ

Prof. Dr. Serdar Uma

KOORDİNATÖR

Prof. Dr. İnci Erdemli



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.



SİTOTOKSİSİTE
TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11D

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

"Direkt Temas" ve "Agar Difüzyon" için Tablo 1, "Ekstre" için Tablo 2 kullanılmıştır.
Kostarlar 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopta gözlemlenir.
Biyolojik reaktivite, 24 saatlik inkübasyonun ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 0 – 4 arasında değişen skalaya göre değerlendirilir;

TABLO 1:

DERECE	REAKSİYON	REAKSİYON ZONUNUN TANIMLANMASI
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'den daha fazla aşmış

TABLO 2:

DERECE	REAKSİYON	KÜLTÜRLERİN DURUMLARI
0	Yok	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
1	Çok az	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
2	Hafif	Yuvarlak hücre sayısı %50'den daha az, sitoplazma içi granül yok, aşırı hücre yıkımı yok, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla değil
3	Orta	Yuvarlak veya yıkıma uğramış hücre sayısı hücre katmanının %70'inden daha fazlası değil, hücre katmanları tamamen parçalanmış değil, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla
4	Şiddetli	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

Sonucun sayısal değeri 2'den büyükse numune sitotoksik kabul edilir.

SONUÇ

24 saat sonunda **şiddetli (+4)** derecede biyolojik reaktivite gözlemlendi.

DEĞERLENDİRME

BU-2016/11D kodlu test numunesi **sitotoksik kabul edilmektedir.**

TEST SORUMLUSU

Prof. Dr. Pelin Kelicen Uğur



Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

EK.5.



SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11E

Müşteri Adı/Adresi: T.C. Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü
Diş Hek. Fak. Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

Numunenin Adı: 3M Single Bond Universal

Numunenin Lot No'su: 580934, CE:0123

Testin Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye Ankara, Türkiye

Numune Geliş Tarihi: 28.07.2016

Rapor Tarihi: 19.08.2016

Eki: Teknik Bilgiler

SONUÇ

Test numunesi "3M Single Bond Universal (Lot 580934, CE:0123)" **sitotoksik kabul edilmektedir.**

İDARİ YÖNETİCİ

Prof. Dr. Serdar Uma

KOORDİNATÖR

Prof. Dr. İnci Erdemli



SİTOTOKSİSİTE TEST RAPORU FORMU

Sözleşme Numarası: BU-2016/11E

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

"Direkt Temas" ve "Agar Difüzyon" için Tablo 1, "Ekstre" için Tablo 2 kullanılmıştır. Kostarlar 24 saatlik inkübasyonun ardından mikroskopta gözlemlenir. Biyolojik reaktivite, 24 saatlik inkübasyonun ardından aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 0 – 4 arasında değişen skalaya göre değerlendirilir;

TABLO 1:

DERECE	REAKSİYON	REAKSİYON ZONUNUN TANIMLANMASI
0	Yok	Numune etrafında veya altında saptanabilir bir zon yok
1	Çok az	Numune altında bazı şekli bozuk veya parçalanmış hücreler var
2	Hafif	Sadece numune altında zon oluşumu var
3	Orta	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'e kadar aşmış
4	Şiddetli	Zon oluşumu numune sınırlarını 1 cm'den daha fazla aşmış

TABLO 2:

DERECE	REAKSİYON	KÜLTÜRLERİN DURUMLARI
0	Yok	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
1	Çok az	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
2	Hafif	Yuvarlak hücre sayısı %50'den daha az, sitoplazma içi granül yok, aşırı hücre yıkımı yok, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla değil
3	Orta	Yuvarlak veya yıkıma uğramış hücre sayısı hücre katmanının %70'inden daha fazlası değil, hücre katmanları tamamen parçalanmış değil, gözlemlenebilir hücre inhibisyonu %50'den daha fazla
4	Şiddetli	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

Sonucun sayısal değeri 2'den büyükse numune sitotoksik kabul edilir.

SONUÇ

24 saat sonunda **şiddetli (+4)** derecede biyolojik reaktivite gözlemlendi.

DEĞERLENDİRME

BU-2016/11E kodlu test numunesi **sitotoksik kabul edilmektedir.**



Prof. Dr. Pelin Kelicen Uğur

Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

Bu belge resmi makamlara sunulmak üzere hazırlanmıştır, belgenin yayınlanması ve kopyalanması yasaktır. Test sonuçları.

EK.6.