

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANA BİLİM DALI

**FARKLI DENTİN BAĞLAYICI SİSTEMLERİN ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN VE GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Alev Ateşgaoğlu KAYA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hüma ÖMÜRLÜ

ANKARA

Mayıs 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANA BİLİM DALI

**FARKLI DENTİN BAĞLAYICI SİSTEMLERİN ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN VE GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Alev Ateşgaoğlu KAYA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hüma ÖMÜRLÜ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-11/2004-02 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Mayıs 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : Alev Ateşoğlu KAYA
ANABİLİM DALI : Diş hastalıkları ve Tedavi ABD.
SINAV TARİHİ : 24.05.2007
TEZ KONUSU : Farklı Dentin Bağlayıcı Sistemlerin
Antimikrobiyel Özelliklerinin ve Genotoksik Potansiyellerinin in vitro
Değerlendirilmesi

KARAR : BAŞARILI

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine : —
Kabulüne : EVET
Reddine : —

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE :

Prof. Dr. Tayfun Ateşoğlu
JURİ BAŞKANI
ÜYE Prof. Dr. Hüsnü Çiğirli
ÜYE Prof. Dr. Baki Barış
ÜYE Prof. Dr. Gökçe Gökçüoğlu
ÜYE Prof. Dr. Nedim Sultan

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Dentin Bağlayıcı Sistemler (DBS)	4
2.1.1.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması	9
2.1.2.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Tarihsel Gelişimi	10
2.1.3.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Uygulama Sayılarına Göre Sınıflandırılması	14
2.2.Diş Onarım Maddelerinin Biyouyumluluk Testleri	17
2.2.1.Biyouyumluluk Testlerindeki Yeni Yaklaşımlar	19
2.3.Maddelerin İnhibitör Özelliklerini Belirleyen Yöntemler	23
2.3.1.Agar Disk Difüzyon Testi	23
2.3.2.Sıvı Dilüsyon Testi	25
2.4.Diş Çürüğünde Rol Oynayan Mikroorganizmalar	26
2.4.1.Ağız Streptokokları	26
2.4.2.Ağız Mayaları	28
2.4.3.Laktobasiller	30
2.5. Maddelerin Genotoksik Özelliklerini Belirleyen Yöntemler	32
2.5.1.Tek Hücre Jel Elektroforez “Comet” Yöntemi	32
3.GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1.Kullanılan Dentin Bağlayıcı Sistemler (DBS)	34
3.2.DBS’lerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi	35
3.2.1.Agar Disk Difüzyon Testi	35
3.2.2.Bakterisid Aktivite Testi	36

3.3.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Genotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.3.1.Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi	37
3.3.2.Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	37
3.3.3.Lenfositlerde DNA Hasarının Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği ile in vitro Tayini	39
4.BULGULAR	42
4.1.Agar Disk Difüzyon Testi Bulguları	42
4.2.MİK ve MBK Ölçüm Bulguları	49
4.3.Genotoksisite Testi Bulguları	51
5.TARTIŞMA	62
6.SONUÇ	77
6.1.Antimikrobiyal Aktivite Testi Sonuçları	77
6.1.1.Agar Disk Difüzyon Testi Sonuçları	77
6.1.2.MİK/MBK Ölçüm Sonuçları	80
6.2.Genotoksisite Testi Sonuçları	81
7.ÖZET	83
8.SUMMARY	85
9.KAYNAKLAR	87
10.ÖZGEÇMİŞ	98

Şekiller, Resimler, Grafikler

Şekil 1.Hasar Oluşmamış Hücre Görüntüsü	60
Şekil 2.Orta Hasarlı Hücre Görüntüsü	61
Şekil 3.Çok Hasarlı Hücre Görüntüsü	61
Resim 1.Clearfil Protect Bond primer, Clearfil Protect Bond bağlayıcı, SL bond ve i-Bond'un agar plak üzerinde <i>S.mutans</i> 'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	43
Resim 2. Clearfil SE Bond primer, Clearfil SE Bond bağlayıcı, klorheksidin ve serum fizyolojik solüsyonun agar plak üzerinde <i>S.mutans</i> 'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	43
Resim 3.i-Bond, SL bond, Clearfil Protect Bond bağlayıcı ve Clearfil Protect Bond primerin agar plak üzerinde <i>L.casei</i> 'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	44
Resim 4.Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil SE Bond primer, serum fizyolojik ve klorheksidinin agar plak üzerinde <i>L.casei</i> 'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	44
Resim 5.Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil SE Bond primer, serum fizyolojik ve klorheksidinin agar plak üzerinde <i>C.albicans</i> 'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	45
Resim 6. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, Clearfil Protect Bond primer, i-Bond ve SL Bond'un agar plak üzerinde <i>C.albicans</i> 'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu	45
Grafik 1. 1:Klorheksidin (pozitif kontrol), 2:serum fizyolojik (negatif kontrol), 3:Clearfil SE Bond bağlayıcı, 4:Clearfil SE Bond primer, 5:SL Bond, 6:Clearfil Protect Bond primer, 7:Clearfil Protect Bond bağlayıcı, 8:i-Bond'un, <i>L.casei</i> , <i>C.albicans</i> ve <i>S.mutans</i> 'a karşı oluşturduğu ortalama inhibisyon zonlarının ölçüleri	46
Grafik 2.Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk uzunluğu değerleri	53
Grafik 3.Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri	54
Grafik 4.Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk momenti değerleri	55

Tablolar

Tablo 1: Kuşaklarına göre dentin bağlayıcı sistemler **13**

Tablo 2: *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı dentin bağlayıcı sistemler ile negatif kontrol (SF) ve pozitif kontrolün (klorheksidin) oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapları **42**

Tablo 3: Bağlayıcı sistemlerin, *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans* için MİK=MBK değerleri **49**

Tablo 4: Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki DNA hasarı (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ortalamaları) **52**

Semboller, Kısaltmalar

ADA	: American Dental Association
AFNOR	: Associaton Française de Normalisation
ANSI	: American National Standards Institute
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyonu
Bis-GMA	: Bisphenol glycidyl methacrylate
BPDM	: Bisphenyl dimetacrylate
DBS	: Dentin Bağlayıcı Sistemler
DIN	: Deutsches Institut für Normung
ESP	: Ekstrasellüler Polisakkarit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EN	: Avrupa Standartları
FDI	: World Dental Federation
FTF	: Fruktoziltransferaz
GTF	: Glukoziltransferaz

HEMA	: 2- Hydroxyethyl methacrylate
H₂O₂	:Hydrogen Peroxide
ISO	: International Organization for Standardization
LASER	: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	: Light Emitting Diode
LMPA	: (Low Melting Point Agar) Düşük Erime Noktalı Agar
MBC (MBK)	:Minimal Bakterisid Konsantrasyon
MDD	: (Medical Device Development) Medikal ürün geliştirilmesi
10-MDP	: 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate monomer
MDPB	: 12- methacryloyloxydodecylpyridinium bromide
4-META	: 4-Metacryloxyethyl trimellitate anhydride
MIC (MİK)	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MS	: Mutans Streptokokları
NPG-GMA	: N-phenylglycine glycidyl methacrylate
NMPA	: (Normal Melting Point Agar) Normal Erime Noktalı Agar
PAC	: Plasma Arc curing light
PBS	: Fosfatla Tamponlanmış Salin Solüsyonu
PENTA	: Dipentaerythritol penta-acrylate monophosphate
Phenyl-P	: 2-(Methacryloxy) ethyl phenyl hydrogen phosphate
ROS	: Reaktif oksijen molekülleri
TEGDMA	: Triethylene glycol dimetacrylate
UDMA	: Urethane dimetacrylate

Önsöz

Yüzyılı aşkın süredir GV Black adlı araştırmacı tarafından geliştirilen kavite hazırlama kuralları doğrultusunda çok az değişikliklerle çürük dişler tedavi edilmiş ve ağızda tutulmaya çalışılmıştır. Ancak, çürük teşhis ve tedavi yaklaşımının ve onarım maddelerinin günümüzdekinden oldukça farklı olması küçük lezyonların bile genişletilmesi prensibine dayanan makro kavitelerin açılmasına neden olmuştur. Günümüzde ise, diş çürüğünün belirlenmesi, ileri operatif yöntemlerin bulunması ve çürük önleme bilgilerinin artması, çürük tedavisi felsefesinin giderek değişmesine yol açmıştır. Son yıllarda, diş çürüğü tedavisi yaklaşımında, sağlıklı diş yapısını minimal kavite tasarımları ile mümkün olduğunca korumayı hedefleyen mikro dişhekimliğinin giderek benimsenmesi sevinçle karşılanacak devrim niteliğinde gelişmelerdendir. Bu kavram doğrultusunda geliştirilen, kavite yüzeyine uygulandığında diş yapılarına bağlanabilme özelliği olan dentin bağlayıcı sistemlerin, dokuyla uyumlu ve kavitedeki bakterilere karşı antimikrobik özellikte olmaları da tedavinin başarısı için önemlidir.

Bu nedenle biz de araştırmamızda, dokular üzerinde minimal hasar oluşturan ve kavitedeki mikroorganizmalara karşı bakterisid/fungusid etki gösterebilen dentin bağlayıcı sistem seçimine yol gösterici olması amacıyla maddeleri, antimikrobiyal aktiviteleri ve genotoksik potansiyelleri açısından değerlendirmeye çalıştık.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde ve doktora eğitimimde büyük katkıları olan, değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hüma ÖMÜRLÜ'ye,

Akademik hayatım süresince engin bilgisi, manevi desteği ve güleryüzü ile yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Tayfun ALAÇAM'a,

Çalışmalarım sırasında her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan çok sevgili hocam Doç. Dr. Mine Betül ÜÇTAŞLI'ya,

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı olanaklarının kullanılmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nedim SULTAN'a ve bu tezin mikrobiyoloji deneylerinde büyük emeği geçen Dr. Bilge SİPAHİOĞLU'na,

Bu araştırmanın genotoksisite analizlerinin yapılmasında her türlü destek ve imkanı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN'a ve bitmez tükenmez enerjisiyle bana her zaman moral veren ve

alışmalarında çok büyük katkısı olan Doç. Dr. Ülkü NDEĞER ve uzman eczacı Sevtap AYDIN'a,

Bu çalışmanın istatistiksel verilerinin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü ğretim yesi Prof. Dr. Semra Oral ERBAŞ'a,

Bugüne gelmemde manevi ve maddi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, sevgisini ve desteğini sürekli olarak hissettiğim çok sevgili kardeşıme, sabrı ve anlayışından dolayı sevgili eşım Nejat'a ve çok sevgili ailesine sonsuz teşıekkrlerimi sunuyorum.

Alev Ateşıağaoğlu KAYA

1.GİRİŞ

Günümüzde estetiğe olan ilginin artması ve amalgam dolgunun güvenilirliği ile ilgi endişeler araştırmacıların dokuyla uyumlu, ağız ortamında etkin bir şekilde fonksiyon gören, doğal görünüşe en iyi uyum sağlayabilecek dişhekimliğiyle ilgili onarım maddelerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmalarına neden olmuştur ¹.

Son yıllarda diş hekimliğinde kullanıma sunulan dentin bağlayıcı sistemler, kompozitlerin diş dokusuna bağlanma özelliklerini geliştiren ve kavitenin tutuculuk özelliğine bakılmaksızın bağlantı sağlayan kimyasal etkenlerdir. Bu bağlayıcı sistemlerin kullanılmasıyla enfekte dentinin tamamen uzaklaştırılıp dolgu maddesi ile doldurulmasını içeren geleneksel diş hekimliği yerini çürük tedavisi için kavitenin boyutlarının küçültülmesini ve diş dokularını koruyan kavite tasarımı oluşturulmasını sağlayan minimal invaziv işlemlerin yapıldığı koruyucu/konservatif ya da ultra konservatif diş hekimliğine bırakmaktadır ^{2,3}.

Dentin bağlayıcı sistemlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri yaygın olarak araştırılmakla beraber biyolojik özellikleri üzerine pek fazla çalışma mevcut değildir ^{2,4}.

Uygun konak yanıtı varlığında bir maddenin özel uygulamada fonksiyon gösterebilme kabiliyeti olarak tanımlanan biyouyumluluk, diş dokusuna direkt olarak uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biridir ¹.

Yeni geliştirilen, biyoaktif fonksiyonlu maddelerin yeterli antimikrobiyal özellikte olmalarının yanı sıra, içerdikleri bu antimikrobiyal etkili komponent yoğunluğu da uygulandıkları dokuda minimum hasara neden olmalıdır.

Biyouyumlu bir madde, 1996'da yayımlanan Avrupa Standartlarına göre hiçbir risk taşımamalıdır. Ağız boşluğu içinde kullanılacak olan dolgu maddeleri diş ve çevre dokularına zararsız, sistemik toksisite yaratacak toksik maddeler içermeyen, potansiyel alerjenik yanıt geliştirmeyen ve kanser yapıcı nitelikte olmayan maddeler olmalıdır ⁵.

Tedavide kullanılan maddelerin biyouyumluluklarının belirlenmesinde sitotoksisite, genotoksisite, kanser yapıcı özellik gibi pek çok parametre kullanılmaktadır ⁶. Bu yaklaşımlar, gerekmedikçe hayvan deneylerinden kaçınarak hızlı ve maliyeti düşük, planlı ve yapılandırılmış test yöntemlerine dayandırılmalıdır ¹.

Başarılı bir tedavi için kavite içinde kalan bakterilerin neden olabileceği sekonder çürük ve pulpa hasarı gibi etkilerin ortadan kaldırılması önemlidir. Bu nedenle son yıllarda, biyoaktif fonksiyonlu yeni bir dentin bağlayıcı sistem (MDPB) geliştirilmiştir. Antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilen bir monomer olan MDPB (12-methacryloyloxydodecylpyridinum bromide) dentin bağlayıcı sistemlerde primer içerisine katılarak, dolgunun yerleştirilmesi esnasında kavite içindeki bakterilerin etkisizleştirilmesi hedeflenmiştir.

Diş dolgu maddelerinin en fazla reaktif oldukları dönem olan kaviteye uygulama döneminde, diş pulpası ve diş eti/ mukoza ile temasa geçip yan etki yapabilme olasılıkları yüksektir ⁷. Genotoksik etki de bu olası hasarlardan biridir. Ancak dentin bağlayıcı sistemlerin genotoksisiteleri üzerine yapılmış çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı yeni geliştirilen, antimikrobiyal özelliği olduğu ileri sürülen dentin bağlayıcı sistem (MDPB) ile farklı özelliklere sahip diğer dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal aktivitelerinin ve genotoksik potansiyellerinin in vitro olarak değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Restoratif diş hekimliğinde başarılı bir tedavi elde etmek için doğru teşhis ile doğal diş fonksiyonu ve görünümünü yeniden kazandıracak uygun dolgu maddelerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla değişik dolgu maddeleri kullanılmış olmakla beraber 150 yılı aşkın bir süreli geçmiş ile amalgam, bilinen en eski dolgu maddesidir.

İlk olarak 1826 yılında Fransa'da kullanılmaya başlanan amalgam dolgu maddesi; geniş kullanım alanı olması, kolay uygulanabilmesi, düşük maliyeti, klinik ömrünün uzun olması, aşınma özelliklerinin diş minesine yakın olması, çok az miktarda boyutsal değişime uğraması, çiğneme basıncına karşı dayanıklı olması ve uygulama sırasında nem kontaminasyonundan çok az etkilenmesi gibi avantajlara sahiptir.

Amalgam dolgu maddesinin tüm bu avantajlarına rağmen son yıllarda süregelen en belirgin eleştiri civarın alerjik ve toksik etkileridir ^{8,9,10,11,12}. Bu alarımın hasta, hekim ve diş hekimliği personeli ağısından bir sağlık tehlikesi oluşturup oluşturmayacağı tartışma konusudur ^{8,13,14}.

Amalgam dolgu maddesindeki bu endişeler, hasta ve hekimlerin estetik dolgu maddelerine olan ilgisini arttırmıştır.

Dentin bağlayıcı sistemlerin tarihçesi, Bounocore'un reğinelerin mineye bağlanması keşfi ile en belirgin dönüm noktasını oluşturduğu 1950'li yılların başlarına denk gelmektedir.

Bağlayıcı sistemlerin geliştirilmesi ile yaygın kavite preperasyonları yerini, enfekte dentini dikkatli bir şekilde uzaklaştırarak sağlam diş dokusunu korumayı amaçlayan daha konservatif tekniklere bırakmıştır.Minimal preperasyon tekniği çürük belirleyici solüsyonlar ve dentin bağlayıcı sistemlerin geliştirilip uygulanması ile başarıya ulařmıřtır¹⁵.

Kompozit reçine ve dentin bağlayıcı sistemlerdeki son gelişmelere rağmen polimerizasyon büzülmesi ve bunun sonucu olarak diş ile onarım maddesi birleşimindeki aralıktaki meydana gelen bakteri kolonizasyonu halen diş hekimliğinin önemli bir sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca minimal preperasyon tekniğinde, çürük uzaklaştırma işlemi genelde dentinin rengi ya da kıvamına bakılarak subjektif olarak yapılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar dentinde hem renklenmiş hem de renk değişimi olmayan bölgelerin benzer şekilde az miktarda bakteri iğerdiğini ve minimal düzeyde enfekte olduğunu göstermektedir ⁵.

Kavite içinde kalan ya da mikrosızıntı yoluyla büzülme aralığında kolonize olan bakterilerin, antimikrobiyal özellik taşımayan dolgu maddelerinin altında uzun süre canlı kalarak çoğaldıkları ve rekürrent çürük, pulpa yangısı gibi istenmeyen etkilerin gelişmesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir.

Diş hekimleri, çürük tedavisinde diş dokularının minimal uzaklaştırılmasını hedef almakta, bazen de dekalsifiye dentini remineralize etmeye çalışmaktadır. Bu durumda, lezyon ya da kavite içindeki bakterilerin tam olarak belirlenmesi, tercih edilen tedavi yönteminin başarılı olmasında çok önemli bir faktördür. Ayrıca, biyoaktif fonksiyonlu yeni maddeler daha iyi bir prognoz sağlamada faydalı olabilir ⁵. Tüm bunların neticesinde, dolgu maddesi yerleştirmeden önce, hazırlanan kavite yüzeyine direkt olarak uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerde, bakterilere etkili inhibitör özellik taşıyacak bir yapı gerekli görülmüştür ¹⁶.

Son yıllarda, dolgu maddelerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesinin yanı sıra dişin sert dokularına bağlanmasıyla ilgili araştırmalara olan ilgi giderek artmaktadır.

Diş onarım maddelerinin karmaşık yapıları ve farklı biyolojik yan etkilerinden dolayı antimikrobiyal aktiviteleri ile biyouyumluluk değerlendirmesinde önemli bir ölçüt olan genotoksik potansiyellerinin tespit edilmesi büyük öneme sahiptir ^{1,6,17}.

2.1.Dentin Bağlayıcı Sistemler (DBS)

Günümüzde dişe başarılı bağlanma; kimyasal bağlanmayla birlikte hem mine hem de dentine mikromekanik bağlanmayı ifade etmektedir. Bu amaçla, diş hekimliğinde kullanıma sunulan dentin bağlayıcı sistemler, hazırlanan kavitenin tutuculuk özelliğine bakılmaksızın bağlantı sağlayan kimyasal etkenler olarak, kompozit onarımların diş dokusuna bağlanma özelliklerini geliştirmişlerdir ^{3,18,19,20}.

Bağlanma (Adezyon)

Bağlanma farklı moleküller arasındaki çekim kuvvetidir. Çekim kuvvetini kimyasal veya fiziksel kuvvetler meydana getirir. Bağlanmayı oluşturan maddeye “bağlayıcı” (adeziv), uygulandığı maddeye ise “aderent” denir. Bağlanmanın fiziksel, kimyasal ve mekanik türleri vardır. Mekanik bağlantıda bağlayıcı, aderent yüzeyindeki girinti ve çıkıntılara tutunur. Bağlantı yüzey pürüzlülüğü mikrometre boyutlarında ise, buna “mikromekanik tutuculuk” denir. Kimyasal bağlanma, farklı yapıdaki yüzeylerin atomları arasında oluşan sınırlı ve zayıf bir bağlanmadır. Fiziksel bağlanma ise, Van der Waals kuvvetleri veya diğer elektrostatik

etkileşimler sonucu farklı yapıdaki düz yüzeyler arasında gerçekleşen oldukça zayıf bir bağlanma türüdür^{3,18,19}.

Bağlayıcının aderent yüzeyini (mine veya dentin yüzeyi) etkili bir şekilde ıslatabilmesi için bağlayıcının yüzey geriliminin, aderentin serbest yüzey enerjisinden daha düşük olması gerekmektedir. Mine yüksek enerjiye sahip inorganik hidroksiapatit kristallerinden oluşurken, dentin büyük oranda düşük serbest yüzey enerjisine sahip, kollajen ve sudan oluşmaktadır³.

İyi bir dentin bağlayıcı sistemde aşağıdaki özellikler aranmalıdır;

- *Biyouyumlu olmalı, özellikle de pulpaya zarar vermemeli,
- *Mine ve dentine mikromekanik ve kimyasal yolla bağlanmalı,
- *Mine ve dentin dışında metal ve porselene de yapışmalı,
- *Dentin kanallarının tümünü ya da bir bölümünü kapatarak uygulama sonrası duyarlılığı önlemeli,
- *Çiğneme kuvvetlerinin ve polimerizasyon büzülmesinin oluşturduğu streslere karşı koyabilmeli,
- *Termal genleşme ve büzülmeye karşı dayanıklı olmalı,
- *Nemli yüzeylerde kolay uygulanabilmeli,
- *Mikrosızıntıya dirençli olmalı, sekonder çürükleri önlemeli,
- *Raf ömrü uzun olmalı,
- *Kolay uygulama olanağı ve mümkün olduğunca az işlem basamağı olmalı,
- *Film kalınlığı minimal düzeyde olup 20 µm'den az olmalı,
- *Uzun süreli klinik çalışmalarda denenmiş olmalıdır^{3,18,19,21}.

Dentin bağlayıcı sistemlerin uygulama alanları;

- olarak,
- 1)Kompozit ve kompomer onarımlar için bağlayıcı etken
 - 2) Amalgam dolgunun bağlanması,
 - 3)Duyarlılık ve/veya açığa çıkan kök yüzeylerinin tedavisinde,
 - 4)İndirekt onarımlar için kaide maddesi olarak,
 - 5)Porselen inley ve onley onarımların simantasyonudur.

Dentinde Tutuculuk

Dentin dokusu ağırlıkça %50 inorganik (hidroksiapatit kristalleri), %30 organik (kollajen) %20 su ve diğer maddelerden oluşur. Dentinin heterojen yapısından dolayı dentinde iyi bir tutuculuk sağlamak mineye göre daha güçtür.

Dentin içerisinde içi sıvı dolu çok sayıda tübül ve kanalcık vardır. Dentin yapısındaki dentin tübülleri, dentin lenfi, odontoblast uzantıları ve intertübüller dentin ile dolu olup pulpa ile direkt olarak ilişki

içindedir. Dinamik yapıda olan dentinde devamlı bir sıvı alışverişi vardır. Odontoblast uzantıları, hücre gövdeleri pulpa odası çeperlerine sıralanmış protoplazmik uzantılardır. Odontoblastın hücre membranı, dentin kanalı içindeki uzantıyı da çevreleyerek kanal içine devam eder. Dentin tübülleri intertübüler dentine göre daha iyi mineralize olmuş peritübüler dentin ile çevrilidir. Peritübüler dentinde intertübüler dentine göre daha az lif mevcuttur. Bu yüzden minerede uygulanan ve tutuculuğu artıran asit ile pürüzlendirme veya mekanik retansiyonlar dentinde başarılı olmaz. Ayrıca yüksek protein oranı nedeni ile düşük yüzey enerjisine sahip olması, ıslanabilirliğini azaltır ve bağlanmayı güçleştirir ^{3,18,19,20,22}.

Dentin bağlanmasında rol oynayan başlıca etkenler dentin içeriği, dentin tübüllerinin yoğunluğu, çapı, peritübüler ve intertübüler dentin oranı, dentin kalınlığı, dentinin yapısı (demineralize veya sklerotik), smear tabakası ve yaştır ^{3,19,20,22}.

Kavite preperasyonu sırasında, frez ya da kesici aletler ile yapılan kesme ve aşındırma işlemleri sonucunda dentin yüzeyi kan, tükürük, bakteriler, apatit kristalleri ve denatüre kollajenden oluşan 1–5 µm kalınlığındaki smear tabakası ile kaplanır. Smear tabakasının dentin tübüllerinin ağzını kısmen tıkamasıyla 1–2 µm uzunluğunda smear tıkaçları oluşur.

Bağlanmada etkili olan smear tabakasının uzaklaştırılması ya da modifiye edilmesiyle ilgili bazı görüşler vardır. Dentin preperasyonu esnasında meydana gelen smear tabakası, asit ile uzaklaştırılabilen bir tabakadır. Ancak asitin direkt olarak dentin yüzeyinde uygulanması bazı araştırmacılar tarafından sakıncalı olarak görüldüğünden smear tabakası ile dolgu maddesi arasında kimyasal bir bağ oluşturulması düşünülmüştür ve smear tabakasını kaldırmayan ancak modifiye edebilen etkenler geliştirilmiştir. Günümüzde dentin bağlayıcı sistemlerde dentine uygulanan zayıf asitlerin sağlıklı bir pulpaya zararı olmadığı kabul edilmektedir ^{3,18,19,22}.

Dentin tübüllerinin ağızlarının tıkalı olması mikroorganizmaların pulpaya girmesini engeller ancak toksinlerin pulpaya girmesini engelleyemez. Bunun dışında smear tabakası bakterilerin yerleşmesi ve çoğalması için son derece elverişlidir. Ayrıca tübüllerin tıkanması dentin lenfinin sirkülasyonunu da etkiler ^{3,19}.

Dentin lenfi pulpa kaynaklı ekstrasellüler bir sıvı olup tübülleri odontoblast uzantıları ile doldurur. Dentin lenfinin akış yönü tıkalı olmayan tübüllerde ve vital dişlerde intrapulpal basınç ve kapillarite nedeni ile dışa doğrudur. Herhangi bir nedenle dentin dokusu açıldığında pulpa basıncı nedeni ile dentin kanalları içerisindeki sıvı genellikle dışarıya doğru hareket ederek kavitenin nemlenmesine neden olur. Kavitenin ne kadar nemli

olacağı yani dentinin geçirgenliği, kanalların çapına, sayısına, kalan dentinin kalınlığına, dentin sıvısının konsantrasyonuna, içinde çözünmüş bulunan maddelere ve smear tabakasının varlığına bağlıdır. Dentin, dentin lenfi yüzünden hidrofilik özelliktedir, bu yüzden hidrofobik olan kompozit maddeler ile teması sorunludur^{3,18}.

Dentin bağlayıcı sistemler genel olarak üç aşamada uygulanır. Bunlar;

* Dentin yüzey koşullarının değiştirilmesi (dentin hazırlayıcı uygulaması, dentin conditioning)

*Adezyonu güçlendiren etkenlerin kullanılması (primer uygulaması)

*Bağlayıcı etkenin demineralize dentin yüzeyine infiltrasyonu (bağlayıcı uygulaması)

Dentin Yüzey Koşullarının Değiştirilmesi

Dentin hazırlayıcı (conditioner) uygulanması, dentin yüzeyinin ve tübüllerinin demineralizasyonunu sağlayıp kollajen yapının ortaya çıkarılmasını sağlar. Bu işlemde smear tabakası ya tamamen kaldırılır ya da modifiye edilir. Dentin hazırlayıcı aynı zamanda peritübüler dentini ortadan kaldırıp, dentin yüzeyini demineralize eder böylece hidroksiapatit yapı çözülür ve dentin tübüllerinin açılması ile 4 µm derinliğinde bir yüzey oluşur^{3,21}.

Dentin hazırlayıcılar; %10'luk fosforik asit, %2,5'lik maleik asit, %10'luk sitrik asit veya %2,5'lik nitrik asittir. Asit solusyonlarına demir klorür, kalsiyum klorür, alüminyum oksalat gibi maddeler eklenebilir. Bunlar smear tabakasının uzaklaştırılma hızını etkiler ve reçine bağlanma dayanıklılığını arttıırırlar. Dentin hazırlayıcı genellikle kaviteye 15–25 saniye(sn) uygulanır ve bol su ile yıkanır. Daha sonra hava ile 3–5 sn kurutulur^{3,19,21}.

Aşırı hava ile kurutma kollajen liflerin çökmesine neden olduğundan ileride bağlayıcı penetrasyonunu da etkileyebilir. Ayrıca uzun süre hava spreyi ile kurutmak, dentin sıvısının buharlaşıp yok olmasına ve dolayısıyla odontoblast hücrelerinin dentin tübülleri içine aspire olmasına neden olur. Dentin yüzey koşulları EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) gibi şelatörler, lazer veya mikroabrazyon ile de değiştirilebilir. Mikroabrazyon yöntemi dentin yüzey koşullarını mekanik olarak değiştirebilir. Bu yöntemde alüminyum oksitin aşındırıcı etkisinden faydalanılır³.

Adezyonu Güçlendiren Etkenlerin Kullanılması

Dentin yüzeyine, ıslanabilirlik dolayısıyla yüzey enerjisini arttırmak amacıyla hidrofilik, 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) monomeri içeren primerler uygulanır; açık dentin tübüllerine yayılarak tübüllerini doldurur ve tübül ağzlarında bir tabaka oluşur. Bu şekilde dolu olan tübüller hem dentinde tutuculuk sağlar hem de pulpaya girişi engeller^{3,19}.

Primerler su, etanol veya aseton gibi çözücülerde çözünmüş bağlantıyı geliştirici maddelerdir.

Demineralize olmuş dentindeki artık smear tabakası arasından geçen primer, eriyen hidroksiapatit kristallerinin bıraktığı boşlukları doldurur ve intertübüler dentindeki kollajenler çevresinde ağ biçiminde 1–5 µm kalınlığında bir tabaka oluşur. Kollajen, kopolimer ve polimer ile sarılmış hidroksiapatitten oluşan reçine ile güçlendirilmiş, aside dirençli bu tabakaya “hibrit tabaka” adı verilmiştir^{3,18,19,21}.

Primerin uygulanması pamuk peletlerle yapılmamalıdır. Bu işlemde ya küçük sünger parçacıkları ya da tek kullanımlık fırçalar kullanılmalıdır. Primerin bir özelliği de dentinin ıslanabilirliğini artırmak ve yüzeyel mikroporözitelere penetrasyonu kolaylaştırmaktır. Primer uygulandıktan sonra kavite su ile yıkanmaz. Yaklaşık 20–30 sn yerinde bırakılır ve sonra 10 sn hava ile kurutulur.

Bağlayıcı Etkenin Demineralize Dentin Yüzeyine İnfiltrasyonu

Primer uygulanmış dentin yüzeyine hem dentin hem de reçineye bağlanabilen bağlayıcı etkenler uygulanır. Bağlayıcının içeriği; Bisphenol glycidyl methacrylate (Bis-GMA), Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), HEMA ve Urethane dimethacrylate (UDMA) olabilir^{3,19,21}.

Dentin bağlayıcı etkenlerin kollajen liflerle karışması, monomerin elastikiyetini değiştirir ve böylece kompozitin polimerizasyon büzülmesini azaltır. Bağlayıcı uygulamasından sonra, bağlayıcı madde primer ile birleşir ve kimyasal bir tutuculuk sağlar. Bağlayıcı etken hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliğe sahip olup daha sonra uygulanacak olan kompozit madde ile birleşir. Primere yapışan bağlayıcının, kompozit dolgu maddesinin uygulanmasından evvel sertleşmiş olması gerekir. Bazı ürünlerde primer ve bağlayıcı tek bir şişe içerisinde birleştirilmiştir. Bu maddeler kaviteye tek kullanımlık fırça ile uygulandıktan sonra kuru hava ile kurutulup yaklaşık 10–20 sn ışık uygulanır^{3,19}.

Bağlayıcı etkenlerin intertübüler dentine penetrasyonları sonucu tübüler reçine uzantıları oluşur. Reçine uzantılarının dentin tübüllerine adaptasyonu tam değilse hibrit tabaka ile primer arasında ve kollajen lifler çevresinde boşluklar oluşur. Bu boşluklar reçinenin bağlanma kalitesini etkiledikleri gibi nanosızıntıya (nanoleakage) neden olurlar^{3,23}.

İlk kez 1995 yılında Sano ve arkadaşları²³ tarafından gösterilen nanosızıntı, uzun süreli yapılan asit ile pürüzlendirme işleminden kaynaklanır ve özellikle sıvı geçişine izin verip nano düzeyde bir sızıntıya neden olur. Dolayısıyla mikrosızıntı gibi büyük olmadığı için mikroorganizmaların geçişinde hiçbir etkisi yoktur. Klinik önemi postoperatif ağrı ve pulpa irritasyonlarıdır.

Nanosızıntı, hibrit tabakasında dentin ve bağlayıcı etkenin arasında gerçekleştiğinden kenar sızıntısı (mikrosızıntı) ile hiçbir ilişkisi yoktur. Nano düzeydeki bu sızıntıyı etkileyen faktörler arasında kullanılan bağlayıcı etkenin türü, uygulama tekniği, uygulama süresi ve dentinin nem oranı belirleyici olabilir. Nanosızıntı üzerinde etkisi olan bu faktörler aşağıdaki gibi açıklanabilir;

*Aseton içeren primerin akıcılığı, su içerikli primerlere göre daha yüksek olduğundan dentinde daha az poröziteye ve daha az nanosızıntı oluşumuna neden olur.

*Nemli bağlanma nanosızıntı oluşumuna daha az olanak verir.

*Asit ile pürüzlendirmenin 15 saniye üstüne çıkması hibrit tabakanın kalınlığını artırıp bağlanmayı azaltır ve nanosızıntıyı fazlalaştırır.

*Smear tabakasının tüm olarak kaldırılmadığı sadece modifiye edildiği yöntemlerde, kompozit ve dentinin bağlanması daha az olmakta ancak nanosızıntı da daha az oluşmaktadır^{3,18,23}.

2.1.1.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması

Kompozit dolgu yerleştirilmesinden önce yapılan işlemlerde (minenin asit ile pürüzlendirilmesi, dentin hazırlayıcı, primer, dentin bağlayıcının ve mineye bağlayıcı uygulanması) çeşitli üretici firmaların sunduğu farklılıklar olabilir.

Kompozit dolgu maddelerini mine ve dentine bağlamak için kullanılan dentin bağlayıcı sistemler tarihsel gelişimine göre, kimyasal, mekanik, uygulama teknikleri ve klinik etkinlikleri gibi pek çok değişikliklerden geçerek farklı kuşak bağlayıcı sistemler geliştirilmiştir. Son

geliştirilen dentin bağlayıcı sistemlerdeki eğilim ise içerik ve klinik uygulama sayısını azaltmaktır.

2.1.2.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Tarihsel Gelişimi

Dentin bağlayıcı sistemlerin farklılıklarından doğan karışıklıkları gidermek için bağlayıcılar, kuşaklarına göre sınıflandırılmışlardır.

1.Kuşak DBS: 1960'larda ve 1970'lerin başında kullanılan birinci kuşak dentin bağlayıcı sistemler, dentinin asitlenmesini önermezken, bağlanmaları smear tabakasına tutunmaya dayanmıştır. Bu sistemler, Komonomer N-phenylglycine glycidyl methacrylate'ın (NPG-GMA) geliştirilmesiyle hidroksiapatit kristallerine iyonik, kollajene ise kovalent bağlarla tutunmuşlardır. Fakat hidrofobik özelliklerinden dolayı bağlanma dayanımlarının düşük olması, smear tabakasına zayıf tutunmaya (2MPa–6MPa) klinikte de kenar renklenmesine neden olan dentin sızıntısına ve tedavinin başarısız olmasına neden olmuştur. Örnekler; Sevitron, Cosmic Bond ^{3,18,19,22}.

2.Kuşak DBS: 1970'li yılların başında geliştirilmiş bu sistemlerin çoğu Bis-GMA veya HEMA'nın halo fosfat esterleri olup, adezyonları reçine içindeki negatif yüklü fosfat grup ile smear tabakasındaki pozitif yüklü kalsiyum arasında polar bağlantı sağlamak şeklindeydi. Bu tür DBS'lerin en önemli dezavantajı dentine değil smear tabakasına bağlanmalarıydı. Ancak smear tabakasının kohesiv dayanıklılığı düşük ve bu tabakanın dentine bağlanması zayıf olduğu için bu etkenler yeterli bir bağlanma sağlayamamışlardır. Bağlanma güçleri, kompozitlerin polimerizasyon büzülmesi kuvvetlerine karşı koyamadığından kenarlarda boşluklar oluşmuştur. Örnekler; Prisma Universal Bond, Creation bonding agent, Clearfil Bond, Bondlite, Scotchbond ^{3,19,20,22}.

3.Kuşak DBS: 1980'lerin 3.kuşak sistemleri, dentine uygulanan fosforik asit ile smear tabakasını modifiye etmiş ve ardından uygulanan fosfat ester tip bağlayıcı etken ile bağlanma gerçekleştirilmiştir. HEMA, 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate monomer (10-MDP), Dipentaerythritol penta-acrylate monophosphate (PENTA) ve 2-(Methacryloxy) ethyl phenyl hydrogen phosphate (Phenyl-P) gibi asidik monomer, maleik asit ve metakrilik asit, etanol gibi farklı komponentler içeren bu sistemler smear tabakasını tamamen yok edip veya modifiye edip reçinenin dentin içerisine penetrasyonunu hedeflemiştir. Scotchbond 2 gibi sistemler bağlanma gücünü 12 MPa ile 15 MPa'a kadar arttırmışlardır ve dentin kenar başarısızlıklarını azaltmıştır. Bununla beraber, reçinenin açık olan dentin tübülleri içine akışına rağmen, bağlayıcı reçinenin hidrofobik özelliği yüzünden asit ile dağlama işlemi dentine

bağlanma gücünde belirgin bir artış meydana getirmemiştir. Ayrıca bu sistemlerde, zamanla oluşan kenar renklenmesi klinik başarısızlığa neden olmuştur. Örnekler; Scotchbond 2, Tenure Bond, Gluma, Prisma Universal Bond 3, Syntac, XR Bond, Probond^{3,18,19,20,22}.

4.Kuşak DBS: 1990'ların başlarındaki 4.kuşak bağlayıcı sistemler, asitle dağlanmış dentinde kullanılmak üzere tanıtıldılar. Bu sistemler, 3 basamaklı olup, %10 ya da %32 oranında fosforik asit içeren asit jel, etanol, aseton ya da su içinde HEMA gibi bir hidrofilik monomer içeren primer solüsyon, doldurucu içermeyen bağlayıcı etken içerir. Primer ve bağlayıcı etken asitlenmiş dentine uygulanınca, intertübüler dentine penetre olup, reçine-dentin arası difüzyon zonu ya da diğer adıyla "hibrit tabakası" oluşmaktadır.

Fusayama²⁴ ve Nakabayashi²⁵ reçinenin dentine penetrasyonunu yüksek bağlanma gücü ve dentin kapaticılığı elde etmek olarak tanımlarken, Kanca²⁶ bu sistemlerle nemli bağlanma fikrini getirmiştir. Dentinin asitlenmesi sadece smear tabakasını uzaklaştırmakla kalmaz, ayrıca dentin yüzeyindeki mineral apatit yapının büyük çoğunluğunu çözerek kollajenlerin açığa çıktığı bir tabaka oluşturur. Kanca'nın geliştirdiği nemli bağlanma uygulamasında, açığa çıkan kollajen yapının doğal hali korunarak, bağlayıcının penetrasyonu ile hibrit tabakasının oluşması sağlanır.

Dördüncü kuşak dentin bağlayıcı sistemlerin dentine bağlanma gücü düşükten orta dereceye (20 MPa) kadar değişiklikler göstermiş ve daha önceki kuşak dentin bağlayıcı sistemlerle karşılaştırıldığında kenar sızıntısını azaltmıştır²⁷. Bu etkenler, Multi purpose bağlayıcılar, ayrıca metal ve porselene de bağlanabilmektedir. Örnekler; Mirage Bond, Opti Bond FL, Scotchbond 2, All Bond 2, Clearfil Liner Bond, Scotchbond Multi Purpose Plus, Pro Bond, AmalgamBond, Bayer 2000^{3,18,19,20,22}.

5.Kuşak DBS: Birçok sayıda şişe ve basamağın klinik kullanımı diş hekimlerinin daha sadeleştirilmiş bağlayıcı sistemleri sorgulamasına neden olmuştur.

1990'ların ortasına doğru tanıtılan 5.kuşak dentin bağlayıcı sistemler yüksek bağlanma gücü göstererek primer ve bağlayıcıyı tek bir sistemde (Tek Şişe, One Bottle) birleştirdi²⁷. Genelde aseton esaslı olup nemden etkilenmezler. İçeriklerinde Bis-GMA, BPDM (Biphenyl dimethacrylate) veya HEMA bulunur. Kontrollü asitleme işlemi, yüzey nemliliği ve reçine yerleştirme işlemi ise bu sistemlerde de klinik bir sorun olarak devam etmiştir. Örnekler; Prime&Bond NT, Syntac Single Conponent, Opti-Bond Solo, Single Bond, Excite, Solobond M^{18,19,20,22}.

6.Kuşak DBS: 2000'in başlarında tanıtılan metakrilat fosforik ester esaslı, 6.kuşak dentin bağlayıcı sistemlerde dentin hazırlayıcı, primer ve bağlayıcı uygulaması tek basamakta birleştirilmiştir. Fakat bu sistemler uygulamadan önce karıştırmayı gerektiren iki komponentli sistemlerdir.

Bu tip sistemlerin önceki sistemlere göre tedavi sonrası duyarlılığı azalttığı tespit edilmiştir. Fakat mine ve dentine bağlanma gücü 4. ve 5. kuşak dentin bağlayıcı sistemlerden daha düşük olarak belirlenmiştir ²⁸. Örnekler; Promopt L-Pop, One-Up Bond.

7.Kuşak DBS: Bu kuşaktaki dentin bağlayıcı sistemler 2002'nin sonlarına doğru tanıtılmış ve asit, primer ve bağlayıcı tek bir şişede birleştirilmiştir. Bu sistemler aseton/su çözücüsü içinde UDMA ve 4-Methacryloxyethyl trimellitate anhydride (4-META) içeriğine dayanır ve uygulama öncesi karıştırmaya gerek yoktur, direkt uygulanabilmektedir ^{28,29}.

Laboratuvarda yapılan çalışmalar bağlanma gücü ve kenar örtücülüğünün 6. kuşak sistemlerle eşit olduğunu göstermektedir ²⁹. Örnek; i-Bond, Clearfil S³ Bond, Optibond All-In-One, Xeno IV, G-Bond.

Kuşaklarına göre dentin bağlayıcı sistemler, klinik uygulama basamakları, içerikler, uygulama şekilleri ve örnekleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Kuşaklarına göre dentin bağlayıcı sistemler

Kuşak	Basamak sayısı	İçerikler	Uygulama Şekli	Örnekler
1.	2	NPG-GMA,	Mineyi asitle, bağlayıcıyı uygula	Cosmic Bond, Sevriton
2.	2	Bis-GMA, HEMA	Mineyi asitle, bağlayıcıyı uygula	Clearfil Bond, Scotchbond
3.	3	HEMA, 10-MDP, PENTA, Phenyl-P	Mineyi asitle, primeri uygula	Tenure, Scotchbond 2, Probond
4.	3	Asit jel HEMA-primer Bis-GMA, HEMA-bağlayıcı	Total asitle, primeri uygula	ALL-BOND 2, Scotchbond MP
5.	2	Bis-GMA, BPDM, HEMA	Total asitle, bağlayıcıyı uygula	Prime&Bond, One-Step, Single Bond, Optibond, Clearfil LBII & SE Bond
6.	1	Metakrilat Fosforik Ester	Kendinden asitli bağlayıcıyı uygula	Prompt L-Pop, One-Up Bond
7.	1	UDMA, 4-META	Kendinden asitli bağlayıcıyı uygula	i-Bond, Clearfil S ³ Bond, Optibond All-In-One, Xeno IV, G-Bond

2.1.3.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Uygulama Sayılarına Göre Sınıflandırılmaları

A- Üç Aşamalı Bağlayıcı Sistemler

Üç aşamalı sistemler, çok basamaklı ya da 4.kuşak bağlayıcı sistemlerdir. Bu sistemler, ilk olarak mine ve dentinin fosforik asit ya da diğer uygun bir asitle dağlanması takiben, primerin uygulanması ve daha sonra bir bağlayıcı reçinenin yerleştirilmesini içerir.

Kullanılan fosforik asitlerin çoğu jel formundadır ve pH değeri; %10'luk konsantrasyonda 0,8, %32'lik konsantrasyonda 0,1 ve %37'lik konsantrasyonda -0,1'dir. %32 ve %37'lik konsantrasyonda fosforik asit için minede uygulanma süresi 15 sn olarak bildirilmiştir.

Asitle dağlama işleminin ardından bir fırça ya da aplikatör yardımıyla mine ve dentin yüzeyine primer uygulandıktan sonra, çözücü ve suyun buharlaşması için yüzey hafifçe kurutulur. Etanol çözücü ve suyu uzaklaştırmak için, aseton çözücü ve suyu uzaklaştırmaktan daha fazla zamana ihtiyaç vardır. Primerin uygulanmasıyla dentin ile bağlayıcı reçine arasında kuvvetli bir bağlantı oluşturulur. Primerin içinde kullanılan hidrofilik ve iyonik olan monomerler, aseton ya da etanol gibi bir çözücünün içinde çözünmüş halde bulunur. Primerin hidrofilik özelliği sayesinde, nemli ağız ortamında bulunan mine ve dentin yüzeyi çok iyi bir şekilde ıslatılmış olur. Bazı sistemlerde, kendinden sertleşebilen başlatıcıyı diğer monomerlerden ayırmak amacıyla primerler iki ayrı şişeden oluşmaktadır.

Bağlayıcı reçine, primer ile uygulanan kompozit dolgu arasındaki boşlukları kapatmak için kullanılır. Primerin üzerine uygulanan bağlayıcı reçine, ışık uygulanarak polimerize edilir. Bağlayıcı reçineler hidrofilik primerle iyi bir temas ve bağlantı sağlayabilmek için hidrofilik karakterde olmalıdır. Bu yüzden HEMA gibi hidrofilik monomer içerir.

Üç aşamalı sistemlerin avantajı; primer asidik monomer (hidrofilik, iyonik) içerirken, bağlayıcı reçine hidrofilik monomer olarak HEMA (iyonik olmayan, nötral) içerir. Işıkla sertleştirmeyi takiben, bağlayıcı reçine, asidik monomer içeren primer/bağlayıcıdan çok daha az hidrofilik özellikte bir tabaka oluşturur. Bu şekilde çok daha nemli bir bariyer elde edilmiş olur. Bu tip nötral bağlayıcı reçinenin oksijen inhibe edilmiş tabakası, kendinden sertleşen kompozitlerle uyumsuzluğa neden olmaz^{3,19,21}.

Bu sisteme örnekler; ALL-BOND2, Optibond FL, PermeQuik ve Scotchbond MP Plus'tır.

B- İki Aşamalı Bağlayıcı Sistemler

Bağlayıcı sistemlerin kullanımını kolaylaştırmak amacıyla 2 aşamalı sistemler geliştirilmiştir. Günümüzde iki farklı tipte, 2 aşamalı

sistem mevcuttur; 1)Total asitleme sistemi, 2) Kendinden asitli sistem. Sistemler arasındaki farklılık asit uygulama aşamasından kaynaklanmaktadır.

1) Total asitleme sistemi

İlk geliştirilen 2 aşamalı sistemlerde primer ve bağlayıcı reçine birleştirilmiştir (örnek; Prime&Bond, ONE-STEP). Dentin tübülleri ve açığa çıkmış kollajende yeterli ıslatma ve penetrasyonu sağlayabilecek derecede gereken viskoziteyi azaltmak için aseton ve etanol gibi çözücüler kullanılmıştır. Bu sistemlerin avantajı kullanım kolaylığı iken, dezavantajı ise ışık uygulaması gerekliliğidir. Bu sistemlerin kendinden asitli sistemlere göre avantajı ise mineyi güçlü bir şekilde dağlama özellikleridir.

İki aşamalı, total asitleme tekniğine sahip bağlayıcı sistemlerden bazıları; Bond 1, Cabrio, Dentastic UNO, Excite, Integra Bond, One-Coat Bond, ONE-STEP, Optibond Solo Plus, PQ1, Prime&Bond NT, Snap Bond, STAE ve Single Bond'dur ^{3,19}.

2) Kendinden asitli sistem

Son zamanlarda 2 aşamalı sistemlerde primer ile asit birleştirilip, kendinden asitli primer ya da yıkanmayan dentin hazırlayıcı elde edilmiştir. Bu primer, kopolimerize olabilen, çok kuvvetli olmayan bir organik asit, HEMA ve suyun birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Pek çok orta derecede kendinden asitli primerler de (pH'sı 2,0'nin üstünde) dentin smear tabakası değiştirilmekte fakat minede asit uygulaması çok etkili olmamaktadır ^{3,19}.

Orta dereceli 2 aşamalı kendinden asitli sistemlerde, en sık kullanılanlardan biri Clearfil SE Bond'dur. Bu ışıkla sertleştirilen, kendinden asitli primer ve bağlayıcı reçine içeren bir sistemdir. Orta dereceli kendinden asitli sistemlerden diğerleri; Adhese, FL Bond, Liner Bond 2V, S/E Optibond Solo Plus, Panavia, SE Bond, SE Bond Plus, Unifil Bond'dur.

Bu sistemlerin avantajı, smear tabakasının uzaklaştırılmayıp, değiştirilmesidir. Böylece tedavi sonrası duyarlılığın azaldığı bildirilmiştir. Asitle dağlama ve primer uygulaması aynı derinlikte penetrasyon oluşturmaktadır. Kendinden asitli primer uygulanmadan önce kavite kurutulmaktadır. Bu da total asitleme tekniğindeki, nemliliği tespit etmedeki güçlüğü ortadan kaldırmaktadır.

Dezavantajı ise, primerin asiditesinin sklerotik dentin, tersiyer dentin ve kesilmemiş minede yetersiz olmasıdır. Bu yüzden pit&fissür örtücülerinin yerleştirilmesi ve ortodontik uygulamaların bağlanması

kullanılamaz. Kesilmemiş mine alanlarına bağlantı sağlanması için, SE Bond sistem, ilk aşamada fosforik asitin kullanılmasını önermektedir. Ayrıca, uzaklaştırılmamış smear tabakasının, çürük lezyonu, bakteri, kan, artık tükürük proteinleri ve kesilmiş diş yapılarından debris içerebilmesi de diğer bir dezavantajdır. Kendinden asitli sistemlerin direkt uygulanan, ışıkla sertleşen reçine kompozitlerde ve kompomerlerde kullanımının sınırlı olduğu belirtilmiştir. Buna ilave olarak direkt yapılmayan onarım işlemlerinde de kullanılması önerilmemektedir ^{3,19}.

Orta derecede kendinden asitli primerlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için 2002 yılında, daha agresif sistemler olan TYRIANSPE/ONE-STEP PLUS ve Simplicity tanıtılmıştır. Orta dereceli kendinden asitli sistem olan Clearfil SE Bond primerin pH değeri 2,7 iken, TYRIANSPE/ONE-STEP PLUS sistemde primerin pH'sı 0,4 ve Simplicity primerin pH'sı 0,4 olarak bildirilmiştir ³⁰.

C-Tek Aşamalı Bağlayıcı Sistemler

Bağlayıcı sistemlerdeki en son gelişme, kendinden asitli primer ile bağlayıcı reçinenin tek bir sistemde birleştirilmesidir.

Bu sistemlerle ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Uygulama öncesi asit ile reçine karıştırıldığından, asidik bileşiğin camphorquinone ile kullanılan amine üzerindeki olumsuz etkisinin üstesinden gelinmesi için fotoinitiyator sistemde değişiklikler yapılması gereklidir. Yapılacak modifikasyonların bir tanesi, CQ-amine sistemi tamamlamak için Na aryl-sulfinate gibi bir katalizör sistemin yerleştirilmesidir. Diğer bir olasılık da, fotoinitiyator olarak phosphine oxides kullanımıdır, fakat bu uygulama LED (Light Emitting diode), LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ve bazı PAC (Plasma Arc curing light) ışık sistemlerinin kullanılmasını sınırlandırır.

Bu sistemlerin kullanım kolaylığının olması en önemli avantajıdır. Dezavantajı ise, sistemin yüksek hidrofilik ve asidik özelliği yüzünden, yüksek su geçirgenliği ve kendinden sertleşen kompozit ve kaide maddeleri ile uyumsuz olmasıdır. Bununla birlikte bazı vakalarda da, sistemin asiditesinin sklerotik dentin ve minede dağlama oluşturmak için yetersiz olduğu gösterilmiştir ^{29,31}.

Tek aşamalı sistemler; AQ Bond, Etch&Prime, Futura Bond, i-Bond, One Up Bond F, Adper Prompt L-Pop, Reactmer Bond, Xeno CF Bond, Xeno 3'tür ^{3,19}.

2.2.Diş Onarım Maddelerinin Biyouyumluluk Testleri

Biyouyumluluk, bir maddenin özel bir uygulamada belirli bir konak savunması varlığında fonksiyon göstermesi olarak tanımlanır. 1996'da yayınlanan Avrupa Standartlarına göre biyouyumlu bir madde hiçbir risk taşımamalıdır.

Ağız boşluğu içinde kullanılacak olan madde ideal olarak, diş eti, mukoza, pulpa ve sert dokulara zararsız olmalıdır. Ayrıca, sistemik toksik yanıt ile teratojenik ve karsinojenik etkilere neden olabilecek, kan dolaşımınca absorbe edilecek toksik özellikte, açığa çıkan ya da diffüz olabilen maddeler içermemelidir. Bunların yanı sıra duyarlılık ve alerjik yanıt geliştirebilecek nitelikte olmamalıdır.

Tedavi amacıyla kullanılan maddelerin biyouyumluluğunun belirlenmesinde sitotoksite, genotoksisite, mutajenite, karsinojenite ve histouyumluluk gibi pek çok parametre kullanılmaktadır^{5,6}.

Diş onarım maddelerin farklı biyolojik yan etkilerinden dolayı biyouyumluluk değerlendirmesi tek bir teste dayandırılmayıp planlı ve yapılandırılmış yaklaşımlar üzerine kurulmalıdır. İlk olarak, maddenin yaptığı olası hasar, eldeki veriler, uygun ve yapılabilir biyolojik test yöntemleri dikkate alınmalıdır. Bu amaçla modern deney yaklaşımlarında, üzerinde çalışılacak test maddesine uygun testleri yapabilecek uzman kişilere ihtiyaç vardır. Genelde, standartların kullanımı daha iyi karşılaştırma yapabilmek için tercih edilmektedir. Diğer test yöntemleri de uygun ise seçilebilir¹.

Modern bilimsel biyouyumluluk test yaklaşımları, gerekmedikçe hayvan deneylerinden kaçınarak, hızlı ve maliyeti düşük test yöntemleri üzerine kurulmaktadır. Önceden in vitro deneylerde, maddenin kullanıldığı özel klinik koşullar dikkate alınmadığından, günümüzde modern yaklaşımlarda in vivo koşulların önemli parametrelerini mümkün olduğunca benzer biçimde taklit etmeye çalışılmaktadır. Bu, madde ve hedef hücre arasına uygun bir bariyer yerleştirilerek ya da maddenin yarattığı biyolojik etkileri ölçmek için klinik olarak uygun işaretleyicileri seçerek sağlanabilmektedir. Bu yaklaşımdan, hayvan testleri sayısının azalabileceği sonucu doğmaktadır. Bu yöntemlerin kullanımı ayrıca, biyolojik reaksiyonların arkasında yatan mekanizmaların (mekanik yaklaşım) daha iyi anlaşılabilmesi ile diş onarım maddelerin biyouyumluluklarının tanımlanmasında yardımcı olabilmektedir¹.

In vitro biyouyumluluk testlerinin amacı; bir maddenin vücudun herhangi bir dokusu üstüne ya da içine yerleştirilince oluşacak biyolojik reaksiyonları göstermektir. Bu yöntemler, yeni geliştirilen bir maddenin, hayvanların kullanıldığı deneylere nazaran maliyeti daha düşük olacak şekilde incelenmesini sağlar ve böylece klinik uygulamalardaki

beklenmeyen etkiler önceden tespit edilmiş olur. Maddenin ilk olarak laboratuvarda test edilmeden, hayvanlar üzerinde denenmesi hem zaman alıcı ve maliyeti artırıcı hem de etik değildir ¹⁷.

İn vitro biyouyumluluk modellerinin geliştirilmesinde bazı sorunlar vardır. En önemli problemler;

- 1- Benzetim deneylerinin tasarlanması için belirgin in vivo biyolojik reaksiyonların tanımlanması
- 2- Uygulaması basit ve laboratuvar sonuçları birbirleriyle uyumlu in vitro çalışmaların tasarlanmasıdır ¹⁷.

En eski yöntemlerden olan sitotoksosite testleri, diğerlerine nazaran tasarlanması oldukça kolay ve hayvan modellerine göre daha az komplikasyonların olduğu testlerdir. Sitotoksosite testleri, biyolojik süreci gösteren diğer pek çok test yöntemleri olmasına rağmen, hala sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Diğer yöntemlerde, sitotoksik reaksiyonlara nazaran, doku reaksiyonları çok daha uzun bir süreçte görülür. Bu diğer süreçler;

- * yangı (inflamasyon)
- * bağışıklık (immün) reaksiyonları
- * mutajenitedir ¹⁷.

Bir değerlendirme yöntemi seçerken, sorulması gereken soru, in vitro testlerden hangisinin en kullanışlı ve kolay olacaktır. Sitotoksosite testleri, toksik maddeyle 12–24 saat temas eden hücrelerdeki sınırlı etkileri ölçebilir. Konak hücreler, kimyasal yaralanmadan sonra iyileşebilir ya da ölebilir. Fakat bazı in vivo biyolojik reaksiyonlar sitotoksik değildir ve 24 saat sonunda oluşurlar. Örneğin; iltihabi ve immün reaksiyonlar. Bu yüzden, hayvan modellerinde, sitotoksosite testi ile pulpa reaksiyonları arasında zayıf bir ilişki vardır ¹⁷.

2.2.1. Biyouyumluluk Testlerindeki Yeni Yaklaşımlar

i.Basit (tek) Testler

Diş onarım maddeleri için, diş pulpası ve diş eti/mukoza dokuları ilk hedef dokulardır. Farklı hayvan deneylerinde maddelerin bu dokulara etkisi incelenmiştir. Sıkça kullanılan bir test yöntemi olan pulpa/dentin kullanımı testi, Langeland ve arkadaşları tarafından

geliştirilmiştir ³². Test maddesi hazırlanan sınıf 5 kavitelere yerleştirilir. Pulpa reaksiyonu, farklı zaman aralıklarında, histolojik olarak değerlendirilir. Kalan dentin miktarı, maddeyle oluşan etkinin azaltılmasında önemli rol oynar. Bu testlerde ayrıca, test maddesi ile kavite tabanı arasındaki bakteri tabakasının etkisi de değerlendirilebilir. Bu test, büyük ölçüde klinik koşulları yansıtabilen test yaklaşımlarından biridir¹.

Aution ³³, küçük laboratuvar hayvanlarında, farklı hücre kültür teknikleri uygulamıştır. Maddeler intramusküler ya da subkutan olarak yerleştirilmiştir. Yapılan pek çok çalışmada elde edilen sonuçlar birleştirilmiş ve toksisite değerlendirilmiştir. Maddelerin kullanıldığı testler, hücre kültür ya da implantasyon testleri, diş onarım maddesinin lokal etkileri üzerine örneğin, sitotoksik reaksiyon ya da iltihabi cevaplar üzerine yoğunlaşmaktadır. Fakat biyolojik maddeler alerjik, mutajenik, tümörjenik, teratojenik ya da organa özgü toksik reaksiyonlara da neden olabilmektedir¹.

ii.Tarama Testleri

Sistemli bir yaklaşımı ilk olarak Aution ³³, 3 seviyeli olarak bildirmiştir;

- 1) Spesifik olmayan toksisite (hücre kültürü ya da küçük laboratuvar hayvanları)
- 2) Spesifik toksisite (uygulama testi, örneğin subhuman primatlarda)
- 3) İnsanlarda kullanım testleri.

Aution'a ³³ göre, spesifik olmayan yöntemde, maddenin uygulanmasının klinik koşulları teste yansıtılmamalıdır. Spesifik yöntemde ise biyolojik model kullanımı ile maddenin gerçek klinik kullanım koşulları taklit edilmektedir.

Langeland ³⁴, 1984'te, ISO (International Organization for Standardization) Teknik Raporu 7405'te onaylanmış, FDI (World Dental Federation) Standartlarındaki önerisinde;

- 1)Başlangıç testleri (sitotoksikite, sistemik toksisite, mutajenite),
- 2)İkincil testler (duyarlılık, ekin (implantasyon) testleri, mukoza irritasyon),
- 3)Kullanım testlerinin yapılmasının gerekli olduğunu belirtmiştir.

Her iki yaklaşımda da, diş onarımı için kullanılan madde, sırayla basitten karmaşığa doğru, in vitro'dan hayvan deneylerine, preklinikten insanlardaki klinik çalışmalara doğru test edilmelidir. Yeni geliştirilen bir madde birinci basamakta başarılı olduğu takdirde ikinciye geçebilmeli ve üçüncüde de başarılı olabilmelidir. Bu işleme göre, toksik

olan bir madde birinci basamakta elenirken, başarılı olanı diğer testlere gidebilmektedir.

Fakat klinikte başarılı bir şekilde kullanılırken, birinci seviyede şiddetli toksisite gösteren, örneğin çinko oksit ile öjenol gibi mevcut diş onarım maddeleri vardır ³⁵. Bu iki yaklaşıma göre, bu tipte işe yarar değerli maddeler kullanım dışı kalmaktadır, dolayısıyla diş hekimliği için uygun olmamaktadır.

iii.Düzenleyici Testler

Avrupa Birliği 93/42 (Tıbbi ürün geliştirilmesi; Medical Device Development, MDD) Önergesi, tıbbi ürünler için kabul edilebilir bir güvenlik, etkinlik ve kalitenin garantilenmesini sağlamaktır.

MDD'e göre, güvenilirlik sadece hasta ile sınırlı değildir, kullanıcı ve üçüncü şahısları da ilgilendirmektedir. Çünkü bulgular, diş hekimliği personelinin, biyolojik olarak aktif, katılaşmamış maddeler ile yakın temasıyla, yüksek oranda risk grubuna girdiğini, deri irritasyonları ve alerjik reaksiyonların olduğunu göstermektedir. Özellikle kompozit reçineler ve dentin bağlayıcı etkenlerle, eldiven giymenin tam bir koruma sağlamadığı açıktır ^{36,37}. Ayrıca, medikal bir ürünün güvenlik değerlendirmesi bir risk analizidir. Bu bir rehber ya da standart eşliğinde gerçekleştirilebilir. Fakat işlem sistemli yaklaşımda olduğu gibi mekanik değildir, her madde konuyla ilgili bir uzman tarafından değerlendirilmelidir¹.

iv.Standart Testler

Diş hekimliğinde kullanılan maddelerinin biyolojik olarak test edilmesi için ADA (American Dental Association), ANSI (American National Standards Institute), DIN (Deutsches Institut für Normung), AFNOR (Association Française de Normalisation) ve ISO (International Organization for Standardization) standartları, MDD (Avrupa Birliği Önergesi) aktif hale gelmeden önce geliştirilmiştir. Bu bilgiler tıbbi ürün biyolojik testleri için ISO standart serisi 10990 gibi yeni standartlar gelişmesine neden olmuştur. Bu standartlar, horizontal standartlar olarak gelişmiş olup tüm tıbbi ürünler için uygulanabilir niteliktedir. Sadece test seçimi için rehberlik etmekle kalmaz aynı zamanda sitotoksite, mutajenite, sistemik toksisite ve duyarlılığı test etmek için yeni yöntemler de içerir. Klinik testler ve risk analizi gibi diğer standartlarla tamamlanır. Viyana antlaşmasına göre, mevcut ISO standartları, Avrupa Standartlarına (EN) uygun olduğunda uyarlanabilir fakat diğer ülkelerle EN standartları arasındaki uyumsuzluklar dikkate alınmalıdır.

Tıbbi ürünler 400.000'den fazla farklı madde içerir. Bu yüzden tıbbi ürünlerin spesifik gruplarının biyouyumluluklarını araştıran özel ekipmanlar gereklidir ve semihorizontal standartlar içinde değerlendirilmelidir.

Diş onarım maddelerinin biyouyumluluklarının değerlendirilmesi için, ISO 7405 standardı henüz kabul edilmiş olup, bu semi horizontal standartlara dahildir ve tıbbi ürünler (diş hekimliği maddeleri grubu) için basılmıştır. ISO 7405; Avrupa Birliği Diş hekimliği Madde Standardı 1641'in bir parçasıdır ve bu yüzden MDD regülasyonu içinde uygulanabilir. Vertikal standartlar, implantlar gibi özel ürün grupları için uygulanabilir¹.

Diş onarım maddeleri için farklı standartların koordinasyonu, ISO 10993 bölüm 1'in kabülü ile teminat altına alınmıştır, bu standart horizontal, semi horizontal ve vertikal standartlardan test seçimi için temeli oluşturur.

Bu sistemde, bazı standartlar test şekline genel yaklaşım (*stratejik standartlar) diğerleri de önerilen test yöntemleridir (*yöntem standartları)¹.

*Stratejik Standartlar

Risk analizlerini saptamak için rehber EN 1441 ile sağlanmıştır. Risk analizleri, ürün için mevcut tüm verileri dikkate almalıdır. Örneğin, kimyasal veriler (çözünürlük, korozyon), fizikomekanik veriler (sertlik, sızıntı) gibi ve ayrıca canlı dokular üzerine yapmış olduğu etkileri bildiren histolojik bilgileri de önemsemelidir. Ayrıca, ürün kullanımından oluşabilecek olası zarar tespit edilmelidir. Diş onarım maddeleri için, diş pulpa ya da diş eti/mukoza dokuları için olası zarar ve alerjik ve/veya diğer sistemik reaksiyonlar dahil edilmelidir¹.

Risk analizleri yapılırken, sonuç hatalı çıkabilir. Doğru bilgiye ulaşabilmek için ilave testler seçilmelidir. Bu test seçimleri için ISO 10993, bölüm 1 rehberlik eder.

ISO 10993–2 deney hayvanlarının korunması üzerinedir. Test amaçlı hayvan kullanmadan önce, hücre kültür yöntemlerinin kullanılmasını vurgulamaktadır. Helsinki Deklarasyonuna dayanan, klinik testler için standartlar, insanlar üzerinde test yapılmadan önce diğer modellerin kullanılmasının tartışılması gerekliliğinin altını çizmektedir. Sistemli yaklaşımın tersine, ISO 10993–1 ve EN 1441 sadece karar verme aşamasında rehberlik eder. Son karar uzman görüşüne dayanır. Bu yüzden bu yaklaşımda uzman çok önemli bir role sahiptir.

*Yöntem Standartları

Yöntem standartlarının örnekleri ISO 10993 bölüm 3–6, 10 ve 11'dir. Ayrıca degradasyon üzerine standartlar ISO 10993 standartları içinde hazırlanmıştır. Bu standartlar horizontaldır. Semi horizontal ISO 7405 standartları ile birleştirilerek diş hekimliğindeki onarım maddeleri için hazırlanmıştır ¹.

ISO 7405; ISO 10993'te değinilmeyen, kullanım testleri üzerinde yoğunlaşır. Diş onarım maddeleri için pulpa/dentin testi ve endodontik maddeler için pulpa kaplama/pulpektomi testini içerir. Tüm test yöntemleri genelde maymun, minyatür pig ya da yaban gelinciği gibi hayvanlar üzerinde yapılır.

Hücre kültür yöntemleri ISO 10993 bölüm 1'de belirtilmiştir. ISO 10993-5'te testler çok genel terimlerle tanımlanmış ve pek çok farklı yöntem ve işlem içermektedir. Fakat bu diş hekimliğinde kullanılan maddeler için yapılan özel hücre kültüründeki bilgileri tam olarak yansıtmaz. İşlemlerin detaylı tanımlanması, sonuçların daha iyi bir şekilde karşılaştırılabilmesini sağlayarak, standartların oluşması aşamasında öncelikli olarak önem taşır. Bu yüzden ISO 7405 içinde, diş maddelerinin test edilmesine ilişkin oldukça fazla bilgi içeren, özel kültür testleri dâhil edilmiştir. Eğer uzman, bir maddeyi incelerken yaptığı testi yetersiz bulursa, ISO 10993-5'in içinde yer alan herhangi bir alternatif testi kullanabilir. Ayrıca, ISO 7405, diş onarım maddelerinin hücre kültür testinde, diş, dentin bariyeri gibi anatomik koşulları da dikkate alarak yeni test yaklaşımları içermektedir.

ISO 10993–3; genotoksisite, karsinojenite ve toksisite testlerini içerir. Bu yöntemler son yıllarda çok fazla dikkat çekmektedir. Karsinojenik etkinin, klinikte görülebilmesi için uzun süreli temas gerekir ve bu etki üstüne sistemik araştırmalar yoktur. Bakteri ve memeli test sistemleri içinde in vitro mutasyon testleri önceliklidir. Bunun nedeni, önemli karsinojenlerin mutasyon testlerinde tespit edilebilmesidir ³⁶. Bazı dentin bağlayıcı sistemler mutajen bulunmuştur ^{38,39}. Bu tip testlerde, gluteralehit ve boran ürünleri pozitif sonuç vermiştir. Diğer araştırmacılar da, kompozit reçinedeki bazı komponentlerin genotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu verilerin nasıl yorumlanacağı ise günümüze dek belirsiz kalmıştır. Fakat test sistemlerinde kullanılan madde miktarı, klinikte kullanılandan daha yüksek olduğu için hasta için risk minimal görünmektedir. Yine de, diş hekimliği personeli problemler hakkında bilgi sahibi olmalı ve maddeye dokunmadan uygulama yapmalıdırlar.

Standartların avantajı, farklı laboratuvarlardan gelen verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesiyle üretimin artmasını sağlamasıdır. Diğer bir yandan, standardizasyon testlerinin seçimi ve resmi onay verilmesi için

oldukça zaman alıcı aşamalar gerekmektedir. Modern yaklaşımlara göre standart testler uygun olunca, standart olmayan testler ise özel bir problemi çözmeye daha uygun ise yapılabilir ¹.

Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin genotoksik özelliklerini değerlendirmek amacıyla in vitro olarak insan lenfositlerinde, maddelerin kültürde kullanılan elüsyon madde miktarları ile çalışılmıştır. Dentin bağlayıcı sistemlerin elüsyonları ISO 10993-12 standartına göre hazırlanmıştır ⁴⁰.

2.3.Maddelerin İnhibitör Özelliklerini Belirleyen Yöntemler

2.3.1.Agar Disk Difüzyon Testi

Maddelerin bakteriyostatik veya inhibitör etkinliğini saptamaya yönelik bir test olan agar disk difüzyon testinde, standart bakteri inokulumu, agarda, belirli konsantrasyonlarda test maddesi emdirilmiş steril kağıt disklerle karşılaştırılır. Agar, besiyerinin katılaştırılması amacıyla kullanılan bir besiyeri bileşenidir. Agar, besiyerlerine amaca göre % 0,05-3 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilmektedir. Besiyeri bileşiminde agar haricinde su, pepton ve tuz, ayrıca gerekli görüldüğünde bazı besiyerlerinde kan, serum, maya özütü gibi zenginleştirici maddeler, antibiyotik, metilen mavisi, malaşit yeşili, eosin, bizmut gibi inhibitörler ve pH indikatörleri de bulunabilmektedir ⁴¹.

Agar disk difüzyon testinde kullanılacak olan bakteriler, Brain Heart Infusion (beyin kalp infüzyonu, BHI) sıvı besiyerine pasaj yapılarak canlandırılır. Standart bakteri inokulumu 0,5 McFarland standardı bulanıklılığıyla karşılaştırılarak ayarlanır. Steril pamuk uçlu eküvyon ile 350 µl alınarak, BHI agar yüzeyine homojen bir şekilde yayılır. Daha sonra, test edilecek madde emdirilmiş diskler agar yüzeyine yerleştirilir. Disklerin birbirinden en az 2,5 cm mesafede olmasına dikkat edilir. Bakteri ekilecek disklerin yerleştirildiği plaklar 37°C'de 15 dakika süreyle kurutulup, 37°C'de 48 saat süreyle uygun etüvde inkübe edilir. Inkübasyon süresi sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zon çapları (üreme önlenim alanı) "mm" olarak belirlenir ⁴¹.

Maddenin moleküler büyüklüğü ve elektrik yükü, agar içindeki difüzyon derecesini etkilemektedir. Bu nedenle, antimikrobiyal etkinliği ölçülen her maddenin farklı büyüklükte üreme önlenim zonu oluşturabileceği bilinmektedir ¹⁶.

Agar disk difüzyon testi tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen bazı dezavantajları da vardır;

1)En önemli dezavantajı dış hekimliğinde kullanılan maddelerin bakteriyostatik ya da bakterisid olduğunu ayırt edememesidir.

2)Ayrıca test edilen mikroorganizmaların canlılığı hakkında da bir fikir veremez ¹⁶.

Agar disk difüzyon testini etkileyen faktörler ise şunlardır ¹⁶;

- Moleküler Ağırlık: Test maddesinin içindeki anti bakteriyel etkenin moleküler ağırlığı, jel içinde difüzyonuna uygun olmalıdır.

- Difüzyon: Antimikrobiyal etkenin jel içinde difüzyon yeteneği sadece molekül yapısına bağlı değildir. Taşıdığı elektrik yüküne, konsantrasyonuna, agar jelin viskozitesine, ısı ve besiyerinin iyon konsantrasyonuna da bağlıdır.

- İnokulum Yoğunluğu: Doğru ve kesin sonuçlar elde edebilmek için inokulum yoğunluğunun kontrol edilmesi ve standardize edilmesi çok önemlidir.

- Zaman: İnhibisyon zon büyüklüğü, mikroorganizmalar belirli bir yoğunluğa ulaşmadan önce, antimikrobiyal etkenin inhibitör konsantrasyonunun agar besiyeri içine doğru diffüz olabilmesi için gereken zamana bağlıdır.

- Besiyeri: Uygun besiyerinin seçimi de, agar besiyerinin besleyici kapasitesinin test mikroorganizmalarının büyüme oranına olan etkisinden dolayı çok önemlidir. Test mikroorganizmalarının çok hızlı üremelerine imkân tanıyan agar besiyeri de en iyisi değildir. Çünkü bu besiyeri yanlışlıkla inhibisyon zon büyüklüğünü azaltabilir. Ayrıca test mikroorganizmalarının yavaş oranda üremesini sağlayan besiyeri de uygun değildir. Mikroorganizmanın üremesi çok yavaş ise test maddesi tarafından çok geniş inhibisyon zonları oluşabilir, bu da test edilen maddenin antimikrobiyal özelliği ile ilgili yanlış bilgi verir.

Her bir plağa dökülen besiyerinin hacmi standartlara uygun olmalıdır. Agar besiyerinin derinliğinin yaklaşık olarak 4mm olması önerilmektedir. Bunun nedeni test maddesinden agar içine diffüz olacak olan antimikrobiyal etkenin 3 yönlü diffüz olmasıdır. Plak üzerindeki agarın derinliği aşırı fazlaysa, lateral yönde diffüz olabilecek antimikrobiyal etken az olduğundan yanlışlıkla küçük inhibisyon zonları oluşabilir. Bunun tam tersi, agar besiyerinin derinliği çok ince olduğunda da geçerlidir. Bu durumda da yanlışlıkla geniş inhibisyon zonları oluşabilir ²².

- Isı: Agar disk difüzyon testinde inoküle edilen plaklar 37°C'de enkübe edilmelidir. Optimum ısıya ulaşmadaki bir gecikme test mikroorganizmalarının büyümesine ve çoğalmasına neden olacaktır.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre, test maddesini yerleştirmeden önce, taze olarak inoküle edilen plakların 37°C'de 15 dakika süreyle kurutulması gereklidir.

- Ölçüm: Önceden yapılan çalışmaların çoğu inhibisyon zon çapı ölçümünü test maddesinin antimikrobiyal etkisinin bir göstergesi olarak değerlendirmiştir.

Inhibisyon zonu dairesel görünümde olmaktadır. Zon çapları mm olarak, diski ortalayacak şekilde zonun bir kenarından diğer kenarına olan uzaklık şeklinde ölçülmektedir.

- Test Edilen Mikroorganizma: Farklı araştırmacılar değişik besiyerleriyle birlikte pek çok farklı mikroorganizma türleri üzerinde çalışmışlardır. Bu yüzden test maddesinin in vitro ve in vivo antimikrobiyal etkisini ya da bir çalışmayı diğeriyle karşılaştırmak oldukça güçtür.

Agar disk difüzyon testi için tüm bu değişkenler dikkatli bir şekilde kontrol edilirse birbiriyle uyumlu ve tekrar edilebilir sonuçlar elde edilebilir. Agar disk difüzyon testi, dış hekimliğinde kullanılan maddelerin antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek için eğer standart bir yöntem olarak kabul edilecek olursa, özellikle test mikroorganizma türleri ve besiyeri standart hale getirilmelidir ¹⁶.

Bu tip çalışmalarda, Gram(+) ve Gram(-) bakterileri temsil eden birer bakteri ve ayrıca mantarları temsil eden bir maya ile çalışılması tercih edilmelidir. Bu şekilde elde edilecek sonuçlar mikroorganizmaların çoğu için geçerli olabilecektir.

2.3.2.Sıvı Dilüsyon Testi

Sıvı dilüsyon testi inhibitör aktivite ile ilgili, kantitatif bir duyarlılık testidir. Mikroorganizmaların minimal inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) (minimum inhibitory concentration, MIC) ve minimal bakterisid konsantrasyonlarının (MBK) (minimum bactericidal concentration, MBC) hesaplanması mikrodilüsyon yöntemi ile yapılır. MİK; test edilen maddenin bakteri üremesini inhibe eden en düşük yoğunluğunu belirtirken, MBK; bakterileri öldüren test edilen maddenin en düşük yoğunluğunu ifade eder.

Sıvı dilüsyon yönteminin 2 şekli vardır. 1) Makrodilüsyon testinde; sıvı dilüsyon yöntemi tüplerde, en az 2 mL hacim içinde yapılır.

2) Mikrodilüsyon testi 80/100 kuyucuklu, 500 mL kapasiteli olan 96 kuyucuklu mikrop plaklarda uygulanır ⁴¹.

2.4. Diş Çürüğünde Rol Oynayan Mikroorganizmalar

Nötrale yakın pH'sı ve sabit ılık ısı ile nemli ağız ortamı, çok çeşitli mikroorganizmaların büyümesini desteklemektedir. 300'den fazla mikrop türü ağız boşluğunda karma bir şekilde yaşamaktadırlar. Büyük bir çoğunluğu ağız yüzeylerine kolonize olur. Bazı türler diş yüzeylerine öncelikli olarak tutunurken bazıları da döküntülü epitele tutunurlar. Türlerin çoğunluğu kommensal ilişki içindedir. Bu türler nispeten iyi huylu iken, *Streptococcus mutans* gibi bazı türler de patojeniktir ⁴².

2.4.1. Ağız streptokokları

Streptokoklar ağız boşluğu içinde asıl popülasyonu oluşturmaktadır. Doğumdan sonra ağız boşluğu içinde ilk kolonize olan bakteriler streptokoklardır. Genel olarak da *Streptococcus salivarius*'tur. Ağız streptokokları streptokok cinsinin, normal insan florasını oluşturan ve bazen de diğer bölgelerden izole edilen bir türüdür.

Viridans streptokok terimi, koloniler etrafında hemoliz yapmasıyla karakterizedir, bazen ağız streptokokları ile birlikte eş anlamlı olarak kullanılır. Fakat viridans streptokoklara ait olan türlerin hepsi ağız florasında konakçı değildir. Ağız streptokokları, ağız kavitesi içinde ve üst solunum yolunda kommensal olarak barınırlar. Streptokoklar ağız içinde ya da diğer bölgelerde, özellikle immün yetmezliği olan hastalarda fırsatçı yangı yapabilme kabiliyetindedirler. Ağız streptokokları ayrıca kalp kapağı protezi taşıyan hastalarda bakteriyel endokardit oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Bu tip yangılarla ilişkili olan türler *S.sanguis*, *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.gordonii*'dir. Diğer streptokoklar gibi ağız streptokokları, 0,5–2,0 µm'lik çapla, yuvarlak ya da ovoid hücrelerdir. Gram pozitif boyanırlar ve sıvı besiyeri içinde büyütüldüklerinde çiftler ya da zincirler halinde görülürler ^{42,43,44}.

Ağız streptokokları 4 alt gruba ayrılır;

*anginosus: *S.anginosus*, *S.constellatus*, *S.intermedius*

*mitis: *S.mitis*, *S.oralis*, *S.sanguis*, *S.gordonii*, *S.parasanguis*, *S.preumoniae*

*mutans: *S.mutans*, *S.sobrinus*, *S. cricetus*, *S.rattus*, *S.downei*, *S.macacae*

*salivarius: *S.salivarius*, *S.vestibularis*, *S. thermophilus*

Sınıflandırma kemotaksonomik ve genotipik verilere dayanılarak yapılır, özellikle DNA-DNA esaslı çiftleştirme ve 16 S rRNA gen ardışık analizi temel alınır. Biyokimyasal test yöntemlerine dayanan farklı sınıflandırmalar da vardır. Tüm ağız streptokoklarının ortak özellikleri besinle alınan karbonhidratları fermente edebilme ve asit (özellikle laktat) üretebilme yeteneğinde olmalarıdır. Streptokokların mutans grubunda, asit çok çeşitli karbonhidratlardan üretilmektedir ^{42,43}.

Mutans streptokokları: Mutans streptokokları(MS), insanlar ve deneysel hayvanlarda diş çürüklerinin asıl etkeni olarak nitelendirilir. Mutans streptokoklarından en sık rastlanılanı ve virülan türü olan *S.mutans*, ilk olarak diş biyofilminden izole edilir.

Diş çürüğünden sorumlu temel patojen olan *S.mutans*, biyofilm oluşturma kapasitesine sahip bir bakteri türüdür. Mutans streptokokları fakültatif anaerobtur ve diş çürüğüyle ilgili biyofilm oluşturma ortamı asit hale getirmeleri virülans özellikleridir. Bunu besinle alınan karbonhidratın metabolizması ve takip eden asit üretimi, özellikle laktik asit, izler ^{42,43,45,46,47,48}.

Mutans Streptokokları asidik ortamı iyi tolere eder ve bu yüzden asidojenik ve asitüriktir. Mutans Streptokokları koloni oluşturmaları için, dişlere ve onarım maddeleri gibi hücrel döküntü üretmeyen yüzeylere bağlanmaya gereksinim duyar ^{42,49}.

Svensater ve arkadaşları ⁵⁰, yaptıkları bir çalışmada, sadece mutans streptokokların değil, *S.anginosus*, *S.intermedius*, *S.oralis* ve *S.mitis* gibi diğer ağız streptokok türlerinin de çürük lezyonları için tipik olan pH değerlerinde çoğalabilme kabiliyetine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Mutans Streptokokları arasındaki farklılıklar biyokimyasal reaksiyonlara, fizikokimyasal yüzey özellikleri ve ayrıca moleküler tekniklerdeki tanımlara örneğin DNA- hibridizasyonuna dayanır ⁴².

Mutans Streptokokları sekiz farklı serotiptir, serotip c (*S.mutans*'ı simgeler) insan tükürük ve biyofilminde predominanttır.

S.mutans (serotip c,e ve f) ve *S.sobrinus* (serotip d ve g) insanlarda en sık rastlanılan türlerdir. *S.mutans* en sık rastlanılanıdır ve dişten sıklıkla izole edilir. *S.sobrinus* genellikle *S.mutans* ile birlikte izole edilir. Molar dişlerde, *S.sobrinus* ön dişlerden daha fazla kolonize olur. *S.sobrinus*'ün sıklığı farklı çalışmalara ve popülasyonlara göre %30'a kadar değişmektedir ^{42,43,44,51}.

Sakkaroz varlığında mutans streptokokları ekstrasellüler polisakkarit (ESP, glukan) sentezler. Bu glukoz homopolimerleri bağlayıcı yapışkan koloni oluşumuna neden olur ve bakteri adezyonunu ilerletir. Bu

türlerin virulansında önemli bir faktör olarak tanımlanır. *S.mutans*'ın üç farklı glukoziltransferaz enzimi (GTF), glukozu suda çözünemeyen ya da suda çözünabilen glukan polimerlerinin heterojen gruplarına polimerize eder. Suda çözünabilir tipleri özellikle düz yüzey çürükleriyle ilişkilidir.

Glukan sentezine ilave olarak, *S.mutans* ayrıca fruktoziltransferaz (FTF) enzimi üretir. Bu enzim fruktoz polimerleri (fruktan) sentez edebilme kabiliyetine sahiptir. *S.mutans* bağlanması hücre yüzey proteinleri aracılığıyla olurken *S.sobrinus* ESP'ler yoluyla yapışır. GTF ve FTF'nin aktivitesinin artması diş çürüğü görülmesinde artış ile ilişkilidir.

Mutans streptokoklarının tükürük konsantrasyonları, diş biyofilmindeki sayılarıyla uyumludur. Ayrıca kişisel tükürük *S.mutans* bağlayıcı proteinleri, biyofilm ve tükürükte mutans streptokokları seviyeleri ile ilişkilidir ^{42,43,44}.

2.4.2.Ağız Mayaları

Mantar(maya) vücudun çeşitli bölgelerinde bulunan ökaryotik tek hücreli organizmalardır. Bunlar normal floranın üyeleridir fakat fırsatçı patojenler gibi enfeksiyonlara neden olabilecek kapasitetelerdir.

Kandida türleri insanda yüzeysel hastalıklardan, hayatı tehdit eden yaygın mukozitlere kadar çeşitli yangılara neden olmaktadır. Candida türleri sağlıklı insanlarda ağız boşluğu, gastrointestinal sistem, anüs, inguinal bölge, vajinal kanal ve vulvada bulunur ^{42,52}.

Klinik olarak en önemli ağız mantarları *Saccharomyces* ailesine ve *Candida* ailesine aittir. Oral maya türünden *Candida albicans* en dominant türdür. Bunu *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondi*, *C.inconspicua*, *C.parapsilosis* ve *C.dubliniensis* türleri takip eder ^{42,43,52}.

Ağız boşluğunda maya bulunma oranı, yaşa ve popülasyonun sağlık durumuna göre değişir. Sağlıklı insanların % 34,4'ünde maya bulunur. Mayaların ağız içi yerleşimi, bölgesel olarak özeldir ve dilin dorsumu *C.albicans*'ın primer olarak yerleştiği bölgedir. Ayrıca, mukoza, diş eti, dentin, kök ve periodontal ceplerde sekonder olarak kolonize olur.

Mayaların çoğalması ve bağlanması için uygun çevresel koşullara ve maddelere ilave olarak, mikotik bir yangının gelişmesi için lokal ve/veya genel hazırlayıcı faktörlere gereksinim vardır. Ağız boşluğu içinde örneğin yaşlı hastalarda azalmış tükürük sekresyonu, maya kolonizasyonlarının artmasına ve mikotik yangıların gelişmesine neden olabilir ^{43,52}.

Kanidaların yaptığı hastalığa “kandidiyaz” (kandidiyoz) veya “monilyaz” denir. Oral kandidiyaz için hazırlayıcı faktörler; travma, oklüzyon, derinin maserasyonu (örneğin nem ile) gibi lokal faktörler, yaş gibi fiziksel nedenler, Xserostomi, Sjögren Sendromu, antibiyotik tedavisi ya da baş-boyun radyasyonu gibi tükürüğü etkileyen faktörler, yüksek karbonhidratlı diyetler, diyabet, hipotiroidizm, hiperparatiroidizm gibi hormonal faktörler, sigara tiryakiliği, beslenme bozukluğu, hücrel immün yetmezlikler, nötropeni, bazı ameliyatlar (organ transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal kanal ameliyatları), ciddi yanıklar, damar kateterleri, AİDS, kronik yatağa bağlayıcı hastalıklar ve damarda narkotik kullanımı olarak bildirilmiştir^{43,53}.

Mayaların hastalık oluşturulmasında patojenitelerinin önemi büyüktür. Patogeneze ilişkili olduğu düşünülen mekanizmalar; çeşitli çevresel koşullara uyum sağlayabilme, çeşitli yüzeylere yapışabilme, hidrolitik enzimler üretme, morfolojik değişim, biyofilm oluşturma ve konak savunmasını aşma ve immün sisteme uyumdur⁴³.

Kandida hücreleri özel (ligand-reseptör interaksiyonlar) ve özel olmayan (elektrostatik şarj, Van der Waals kuvvetleri) mekanizmalar ile dentin dahil olmak üzere çeşitli doku tiplerine bağlanabilirler. Dentine olan invazyon afinitesinden dolayı *C.albicans*, dentinofilik bir mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. *C.albicans*’ın dentin çürüğü lezyonunda sıklıkla görüldüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir⁵⁴.

Mikroorganizmaların ağız-diş dokularına tutunabilmelerinin dışında birbirlerine tutunabilmelerine “koagregasyon” denir. Kandida türleri bazı ağız bakterileriyle koagregasyon köprüleri oluşturmaktadır. Pek çok ağız streptokok türü özellikle *S.sanguis* ve *S.gordonii*, *C.albicans* ile koagregasyon gösterir.^{47,54,55}

S.sanguis ve diğer streptokokların *C.albicans* ile koagregasyonlarının lektin benzeri bağlanmaya ilave olarak pek çok diğer mekanizmalarla da gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu tip koagregasyonların kendi aralarında oluşturdukları ağ, diş biyofilminin etyolojisinde önemli rol oynamaktadır^{47,54}.

C.albicans türleri 3–6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) olarak görülürler. Ayrıca, yalancı hif(psöдохif) de oluştururlar. Yalancı hif, arka arkaya tomurcuklanan blastosporların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücreler zinciridir. Kandida türleri arasında *C.albicans* blastospor ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir^{53,56}.

C.albicans bileşiminde karbonhidrat (%41), protein (%5), fosfor ve heksozamin içeren bir ekstrasellüler matriks sentezleyerek, hücre dışında birikir. Bu matriks hidrofobiktir ve konak doku proteinlerine tutunabilir. Bu tutunmayı takiben üzerine sırasıyla serum proteinleri, deskuame epitelyum hücreleri, ölü lökositler ve psödohifalar yerleşir. Antifungallere daha dirençli olan ve birbirlerinin yaşam faaliyetlerini destekleyen kandidiyal elementlerden oluşan, çamursu yapıdaki bu tabakaya “kandidiyal biyofilm” denir. *C.albicans*’ın özellikle invaziv olmayanlarının biyofilm oluşturma özellikleri, hem başka kandidalar hem de invaziv *C.albicans* türlerine göre daha fazladır ⁵².

2.4.3.Laktobasiller

Laktobasiller gram pozitif ve sporsuzdur. Uzun silindir şeklinde, zincir yapabilen çomaklardır. Büyük kısmı mikroaerofilik bazıları zorunlu anaeroptur. Ender olarak bazı türleri hareketlidir.

Sütte bulunan bir disakkarit olan laktozu fermente edebiliyor olduğu için bu bakteriye “laktobasil” ismi verilmiştir ^{43,51,52,57}.

Hem üredikleri ortamda asit oluştururlar ve hem de asit ortamda daha kolay ve bol ürerler (hem asidürik hem de asidofiliktir). Ortamdaki pH’yı 4,0’ın altına düşürebilirler. Sukrozdan ekstrasellüler dekstran sentezlerler. Katalaz, indol, H₂S yapmazlar. Kazeini sindiremezler. Üredikleri ortamda amino, yağ ve nükleik asitler, mineraller ile bilhassa B vitaminleri bulunması gereklidir. Domatesli besiyerinde daha kolay ürerler (ManRagossa jelozu gibi).

Sağlıklı insanların göz, barsak, ağız, deri ve vajina florasında daima bulunurlar. Hepsinin hücre zarında glycerol teichoic acid (RTA), D-glucosyl (Glc), L-Rhamnose (Rha), D-Galactosyl(Gal), meso veya L-diaminopimelic asit bulunur ve bunların hepsi antijeniktir ^{43,51,52}.

İnsanda hastalık yapabilmesi için bireyin duyarlılığı ve konak dokunun travmatize olması gerekir. Bu bakteriler bulundukları florada genellikle fırsatçı patojendir. Kurutulmuş et ve balık ürünleri, sebzelerde bulunur, ayrıca su kontaminantıdır. Doğum kanalında bulaşarak, B grubu streptokoklar ile birlikte yenidoğanın ağızına ilk yerleşen bakterilerdendir. 6. ayda ilk diş sürmesini takiben diş eti oluşu ve interdental yüzeylere bolca kolonize olur ⁵².

Laktobasiller dil, yanak gibi yumuşak dokuların mekanik sürtünmelerinden korunan dişlerin arayüzlerine ve fissür tabanına yerleşir. Diş minesine tutunması ya kendi sentezlediği dekstran ile mümkün olur ya da sitofilik olup hücre gövdesi ile yapışır. Bulunduğu yerde bakteriler

arasında koagregasyon köprüleri oluşturarak başka bakterilerin de konağa tutunmasına aracılık eder^{43,52}.

Laktobasiller, streptokoklar ile birlikte diş çürüğünden birinci derecede sorumludur. Bu iki genusun üyeleri, çürük oluşmasının hem bakteriyel kolonizasyon hem de asit üretimi safhalarından birebir sorumludur^{43,46,47,52,48,57,58,59}.

Makroskopik olarak diş çürüğü ilk tespit edildiğinde kavite tabanında en yüksek sayıda bulunan bakteriler laktobasillerdir. *L.casei* en yüksek sayıda bulunmaktadır. Derin dentin çürüğünde laktobasiller predominanttır. Pulpaya ilk ulaşan bakterilerde bunlardır.

Ağızda ve diş çürüğünde en sık rastlanılan laktobasil olan *L.casei*, 0,7–1,1x2,0–4,0 µm büyüklüğünde çomaklardır. Sütü peynirleştirdiği için “casei” ismi verilmiştir (caseification=peynirleştirme). Niacin, folik asit, calcium-pantothenate gereksinir. Süt, süt ürünleri, barsak, ağız ve vajina florasında bulunur. Endokardit nedeni olabilir(62). Genç diş biyofilminde çok sayıdadır, fakat biyofilm yaşlandıkça sayısı azalır. Asıl kolonizasyonu mine yüzeyindeki fissürler ve erken çürük lezyonlarının tabanıdır. Bu sebeple tükürük içerisinde serbest olarak bolca bulunmayabilirler, diş fırçalamayı takiben tükürükteki serbest laktobasil sayısında artış olur. Bunlar mine yüzeyinden ayrılan laktobasillerdir. Salya içindeki “laktobasidin” isimli özgün bir protein laktobasiller üzerine inhibitör etki gösterir^{52,57}.

Ağızda ve enfekte kök kanalında rastlanabilecek diğer laktobasiller şunlardır: *L.salivarius*, *L.acidophilus*, *L.amylophilus*, *L.brevis*, *L.cateniforme*, *L.coryniformis*, *L.curvatus*, *L.delbrueckii*, *L.fermentum*, *L.gasseri*, *L.halotolerans*, *L.helveticus*, *L.jensenii*, *L.plantarum*, *L. Minitus*, *L.viridescens*, *L. Yamashiensis* ve diğerleri^{51,52,57}.

Laktobasiller neonatal menenjit, korioamnioit, amnioit, plöropulmoner iltihaplar, endokardit ve bakteriyemi olgularından izole edilebilirler. Besin zehirlenmesinden de sorumlu tutulur. En sık sebep olduğu hastalık diş çürüğüdür. Ayrıca kök kanalı enfeksiyonlarına da neden olur^{43,52,57}.

2.5.Maddelerin Genotoksik Özelliklerini Belirleyen Yöntemler

2.5.1.Tek Hücre Jel Elektropherez “COMET” Yöntemi

Comet Yöntemi, diğer adıyla tek hücre jel elektropherez yöntemi ve mikrojel elektrophorezi, ilk kez 1984 yılında Ostling ve arkadaşları⁶⁰ tarafından, tek hücrede DNA hasarını görüntülemek

amacıyla geliştirilmiştir. Bu tekniğe olan ilgi 1995 yılından bu yana giderek artmaktadır⁶¹.

Tekniğin esası; mikroskop lamı üzerindeki ince bir agar jeline süspande edilmiş az sayıda hücrenin parçalandıktan sonra elektroforeze tabii tutulmasıdır. Elektrik akımı kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının çekirdekten daha hızlı şekilde göçünü sağlar. Daha sonra DNA bağlayıcı floresans bir boya ile boyanır, görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldıza benzediklerinden “COMET” diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilir.

Tek hücre jel elektroforez yöntemi DNA hasar ve onarımını ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceler. Bu yöntemde, tek bir hücrede DNA hasarını doğrudan tayininin yanısıra bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da tespitine olanak sağlar. Tedavi esnasında hücrelerin gösterdiği heterojen yanıtı, özel tedavi protokollerinde tümör cevabının tahmin edilmesine yardımcı olabilir. Çünkü bu şekilde çok az miktardaki dirençli hücreler tespit edilebilir^{60,61,62,63}.

Tek hücre jel elektroforezi “Comet Testi” son yıllarda farklı laboratuvarlarda çeşitli modifikasyonlarla uygulanmaktadır. Comet testi hem tek hem de çift zincir kırıklarının tayinini kolaylaştırır. Çift zincir kırıklarının tayini için nötral lizis ve tek zincir kırıkları için alkali lizis uygulanmaktadır. Deney için herhangi bir ökaryotik hücre kullanılır ve incelenecek hücre süspansiyonunun hazırlanması gerekir. Hayvan ve insanlardan alınan dokularda ve örneklerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için örneklerin izole süspansiyonu ek bir hasara veya onarıma yol açmayacak şekilde hazırlanmalıdır. En fazla kullanılan insan hücresi lenfosit popülasyonudur, ancak pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği; vericinin yaşı, fiziksel aktivitesi, sigara içip içmediği gibi olası faktörlerin hücre cevabında farklılık yaratabildiği ve bireyler arası farklılıkların olabileceği unutulmamalıdır. İn vivo hayvan çalışmalarında karaciğer ve nazal mukoza hücreleri kullanılabilir. İn vitro toksikokinetik çalışmalarında nazal mukoza hücreleri, lenfositler ve lenfoblastoit hücreler, akciğer hücreleri, gastrointestinal kanal hücreleri (özafagus, duodenum, kolon mukozası) incelenebilir. Özellikle izleme çalışmalarında çevresel veya işyeri kaynaklı çeşitli etkenlere mesleki veya kazara maruz kalan kişilerde DNA hasarının incelenmesinde kullanılır bir yöntemdir.

Comet tekniği hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. “Comet” oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayinini yapmak için pek çok farklı çalışma

yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti hasar boyutuna bağlı bir şekilde Comet'leri deneye dayalı olarak kaydetmektedir. Gözlemler için 515–600 nm'lik eksitasyon filtreli epi-floresan mikroskop kullanılır. “Comet'ler en basit şekliyle hasarlı, hasarsız şeklinde görünüşlerine göre değerlendirilebilir. DNA göçü “Comet uzunluğu (mm)” “Comet baş çapı”, “Comet alanı” olarak da değerlendirilir. Comet metodunda, hücredeki DNA kırılması, genetik maddenin anot yönünde göç uzunluğu (kuyruk uzunluğu) ile tahmin edilebilir ⁶². Ayrıca, kuyruktaki DNA yüzde oranının (kuyruk yoğunluğu), DNA bağlarındaki kırık sıklığı ile orantılı olduğu gösterilmiştir ⁶⁴. Kuyruk momenti ise bilgisayarda görüntü analiz sistemi ile hesaplanan, kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunu dikkate alan bir tanımlayıcıdır ⁶⁵. Görüntü analizi daha detaylı ve geniş incelemeye otomatik olarak sağlamaktadır.

Tek hücrede DNA hasarını ölçen Comet tekniği, ilgilenilen bileşiklerin genotoksitesini hızlı bir şekilde değerlendirmede, ayrıca DNA onarımına etkileri hakkında bilgi sağlamada yararlı bir yöntemdir ^{60,62,63,66}.

Günümüzde Comet tekniği, radyasyon biyolojisi, oksidatif hasar tespiti, genetik toksikoloji, apoptosis tespiti, DNA çapraz halka tespitinde kullanılmaktadır ⁶¹.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda yeni geliştirilmiş, antimikrobiyal özellikteki dentin bağlayıcı sistem ile farklı özelliklerdeki dentin bağlayıcı sistemlerin, çürüğün başlaması ve ilerlemesinden sorumlu farklı mikroorganizma türleri üzerine olan antimikrobiyal etkileri ile insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri in vitro şartlarda karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.1.Kullanılan Dentin Bağlayıcı Sistemler (DBS)

1) Clearfil SE Bond

Beşinci kuşak, kendinden asitli primer ve bağlayıcı etken içeren bir sistemdir. Primeri; HEMA, hidrofilik dimetakrilat, N,N-diethanol-p-toluidine, D,L-camphor-quinone ve su içerir, bağlayıcı kısmında ise kollidal silika, HEMA, Bis-fenol A ve su bulunur.

Uygulanışı; Clearfil SE Bond, su esaslı primeri hazırlanmış mine ve dentin yüzeyinde tek aşamada, yıkamadan uygulanır, 20 saniye bekletilip hafif hava ile kurutulur. Bağlayıcı etken uygulanıp hava ile her tarafa yayılması sağlanır ve 10 saniye ışıkla polimerize edilir. Daha sonra dolgu yapılır. Bu sistemler kompozit, kompomer ve ormoserlerle kullanılabilir. Ayrıca, porselen ve kompozitin tamiri için de kullanılmaktadır.

2) SL Bond

5.kuşak, tek şişe dentin bağlayıcı sistem SL Bond, aseton esaslı olup nemden fazla etkilenmez. İçeriğinde Bis-GMA, BPDM, HEMA ve su bulunur.

Uygulanışı; 15 ile 20 sn süre ile ayrı bir asitleme işleminin ardından, tek şişede birleştirilmiş olan primer ve bağlayıcı etken (one bottle, tek şişe) uygulanıp 40 sn ışık uygulamasından sonra dolgu maddesi yerleştirilir.

3) i- Bond (The All- in -One Solution)

i- Bond bağlayıcı sistemi, tüm işlemlerin bir arada olduğu; asitleme, primer, bağlayıcının tek bir şişede birleştiği, 7.kuşak sistemdir. i-Bond sistemin kimyasal patentli aseton/su çözücüsü içinde UDMA ve 4-META içeriğine dayanır.

Uygulanışı; i-Bond kaviteye 3 kat sürülüp, 30 sn bekletildikten sonra, hafif hava ile kurutulur ve 20 sn süreyle polimerize edilir. i-Bond'un teknik duyarlılık gerektirmediği, hekimin ıslak, nemli ya da kuru bağlanmayla ilgili endişe duymasına gerek kalmadığı ileri sürülmektedir.

4) Clearfil Protect Bond

İlk antimikrobiyal içeriği olan bağlayıcı sistemdir. Clearfil Protect Bond primeri içine katılan yeni geliştirilmiş fonksiyonel, antimikrobiyal özellikteki MDPB monomerin, bakterileri elimine ettiği öne sürülmektedir. Primeri; MDP, % 5 MDPB, HEMA, hidrofobik monomer, dimetakrilat, su, polimerizasyon başlatıcıları içerir. Bağlayıcı kısmı; MDP, Bis-GMA, HEMA, di-Kamforokrom, NaF, silanlanmış koloidal silika içerir.

Uygulanışı; Kendinden asitli, su esaslı primer sistemi kaviteye uygulanıp, 20 sn beklenir, yıkanmadan hafif hava ile kurutulur. Bağlayıcı etken uygulanır 10 sn ışık uygulamasından sonra dolgu maddesi yerleştirilir.

3.2.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1.Agar Disk Difüzyon Testi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz çalışmada, farklı özelliklerde dentin bağlayıcı sistemlerin (Clearfil Protect Bond (Kuraray), Clearfil SE Bond (Kuraray), i-Bond (Heraeus Kulzer), SL Bond (Swiss-Tec)) diş çürüklerinde rolü olduğu bilinen *Lactobacillus casei* (ATCC 4646), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Streptococcus mutans*'a (NCTC10449) karşı antimikrobiyal özellikleri değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmalar deney gününe kadar -30°C'de saklanmıştır. Deney gününden önce mikroorganizmalar derin dondurucudan çıkartılarak Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI, BBL-Becton Dickinson, USA), sıvı besiyerine pasaj yapılarak canlandırılmıştır. *L.casei* ve *S.mutans* %7 CO₂ içeren, *C.albicans* normal etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde üreyen mikroorganizmalar BHI agara pasajlanmış ve deneylerde bu agardan toplanan mikroorganizmalar kullanılmıştır.

Disklerin hazırlanması

Disk difüzyon testinde kullanılmak üzere 1,5 mm kalınlığındaki kâğıt tabakalardan (3M) 6 mm çapında diskler kesilmiştir. Hazırlanan diskler 121° C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Test edilecek maddelerin her birinden 20 µl alınarak deneyden hemen önce birer diske emdirilmiştir.

Deneylerde % 2'lik klorheksidin pozitif kontrol, steril serum fizyolojik negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan 0.5 McFarland (Bio Me'rivex, Fransa) eşeline göre BHI sıvı besiyerinde süspansiyon

hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan steril pamuk uçlu eküvyon ile 350 µl alınarak, BHI agar yüzeyine yayılmıştır. Deneyden hemen önce hazırlanmış olan, test edilecek madde emdirilmiş diskler agar yüzeyine yerleştirilmiştir. *S.mutans* ve *L.Casei*'ye ait plaklar %7 CO₂ içeren etüvde (SHEL LAB, Kanada), *C.albicans*'a ait plaklar normal etüvde (Dedeoğlu, Türkiye) 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.

3.2.2.Bakterisid Aktivite Testi

Mikrodilüsyon testi

Mikroorganizmaların minimal inhibitör konsantrasyonlarının, (MİK) (minimum inhibitory concentration, MIC) ve minimal bakterisid konsantrasyonlarının (MBK) (minimum bactericidal concentration, MBC) hesaplanması için mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada 96 kuyucuklu alt kısmı U şeklinde olan mikro plaklar kullanılmıştır.

Mikro plaklardaki her bir kuyucuğa 50 µl BHI sıvı besiyeri dağıtılmıştır. Test edilecek maddelerden alınarak 50 µl ilk kuyucuğa eklenmiştir ve daha sonra, kuyucuklardaki maddelerin konsantrasyonunu ikiye kat azaltacak şekilde, seri dilüsyon yapılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan 0,5 McFarland eşeline göre BHI sıvı besiyerinde süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar 50 kat seyreltilerek son konsantrasyonu 2x10⁶ CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Final süspansiyondan mikropipetle (Labmate HT, 10–100 µl'lik) 50µl alınarak tüm kuyucuklara eklenmiştir. Deneylerde %2'lik klorheksidin pozitif kontrol, steril serum fizyolojik negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *S.mutans* ve *L.casei*'ye ait mikro plaklar %7 CO₂ içeren, *C.albicans*'a ait mikro plaklar normal etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük konsantrasyon maddelere ait MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Üremenin görülmediği kuyucuklardan 10 µl alınarak BHI agara ekim yapılmış ve plaklar disk difüzyon testinde anlatılan koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaklarda üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, MBK değeri olarak kabul edilmiştir. Deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

3.3.Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Genotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.1.Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz çalışmanın ikinci deney aşamasında, incelediğimiz farklı dentin bağlayıcı sistemlerin olası

genotoksiteleri in vitro olarak, tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet Yöntemi) ile insan lenfositlerinde, kültürde kullanılan elüsyon madde miktarıyla ilişkilendirilerek incelenmiştir.

3.3.2.Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Fosfatla tamponlanmış salin solüsyonu (PBS): PBS tableti gerekli hacimde distile suda çözülür. 4°C'de saklanır.

Stok lize edici solüsyon: 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris tartılır, 500 ml su eklenir. 10 g NaOH eklenerek pH 10'a ayarlanır. 10 g Na-Laurilsarkosinat eklenir. Çözününceye kadar karıştırılır. 890 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Lize edici solüsyon: Taze hazırlanır.

	<u>Siyah kutu</u>	<u>Küçük kutu</u>
267 ml =	178 ml lysing stok solution + 2 ml triton-x 20 ml DMSO	89 ml 1ml 10 ml

(% 75) LMPA(Low Melting Point Agar: Düşük Erime Noktalı Agar) Çözeltisi: 187,5 mg LMPA tartılır. 25 ml PBS içinde çözülür. Kaynar su banyosu ya da ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılır. Agar kaynamamalıdır. Buzdolabında saklanır.

NMPA (Normal Melting Point Agar: Normal Erime Noktalı Agar) Çözeltisi: 1g NMPA 100 ml PBS içinde çözülür (% 1'lik normal melting point agaroz). Temiz, alkole ve alkol-eter karışımına daldırılıp kurulanmış lamalar % 1 NMPA olan behere daldırılır arka yüzleri silinip oda ısısında kurutulur ve saklanır.

Elektroforez Tamponu: Taze hazırlanır.

	<u>Büyük elektroforez tankı</u>	<u>Küçük elektroforez tankı</u>
<u>Soğuk distile su</u>	1705 ml	579 ml
10 N NaOH	52,8 ml	18 ml
200 mM EDTA	8,8 ml	3 ml
<u>10 N NaOH:</u>	200 g NaOH	500 ml distile suda çözülür, oda sıcaklığında saklanır.

200 mM EDTA: 14,89 g EDTA 200 ml distile suda çözülür, pH 10'a ayarlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Nötralizasyon Tamponu (0,4 M TRİS): 48,5 g Tris tartılır. 750 ml distile su eklenir. pH 7,5'a ayarlanır. 250 ml distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

Ethidium Bromide (Stok): 5 gr Ethidium Bromide 25 ml distile suda çözülür. 1 ml alınıp distile su ile 10 ml ye tamamlanır. Oda ısısında ve karanlıkta saklanır.

H₂O₂ Çözeltisi: M= 34,01 g/mol 1L=1,13 kg
Elimizde %35 H₂O₂ çözeltisi bulunmaktadır. Merck'de w cinsinden verilmektedir.
Elimizdeki stoğa göre 200 ml'de 35 g (1.03 mol) H₂O₂ içermektedir. Yani bu, 10,3 M H₂O₂ çözeltisi demektir.

0.1M H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: $10,3 \times V = 0,1 \text{ M} \times 1 \text{ ml}$, $V=9,7 \mu\text{l}$ Ana stoktan 9,7 μl alınır, eppendorfa konur üzerine 991,3 μl distile su (4°C) ilave edilir. (1 haftalık çalışma stoğudur).

1mM H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: $100 \text{ mM} \times V = 1 \text{ MM} \times 1 \text{ ml}$ $V= 10 \mu\text{l}$ (0,1 M H₂O₂ çözeltisinden 10 μl alınır, eppendorfa konur üzerine 990 μl PBS (4°C) ilave edilir. Tek kullanımlıktır.)

100 μM H₂O₂ çözeltisinin hazırlanması: 1mM H₂O₂ çözeltisinden 50 μl , santrifüj uygulanmış (5dk, 2500 rpm) ve süpernatant kısmı atılmış ve üzerine 950 μl soğuk PBS ilave edilmiş hücrelere ilave edilir. 5 dk buz banyosunda bekletilir, tekrar aynı koşullarda santrifüjlenir ve pellet 1 ml PBS ile yıkanır. Tekrar santrifüjlenir.

Tripan mavisi (%0,5): 100 mg Tripan mavisi 20 ml PBS içinde karıştırılır.

Seyreltilmiş tripan mavisi: % 0,5'lik tripan mavisi çözeltisinden 1 ml alınır üzerine 9 ml distile su eklenir. Oda sıcaklığında saklanır.

❖ 15 μl lenfosit (inkübasyon vs. bittikten sonra) 15 μl tripan mavisi ile karıştırılır. 100 hücre sayılır, boyayı alan yaşayan hücre demektir.

Bağlayıcı sistemlerin her biri 100 mg tartılıp 2 ml PBS içinde çözülür (100 mg/2ml). Cam vialler kullanılır. 24 saat 37°C de inkübe edildikten sonra deneyler gerçekleştirilir. İnkübasyondan sonra deney anına kadar -25°C'de saklanabilir.

3.3.3.Lenfositlerde DNA Hasarının Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği ile in vitro Tayini

1. İçinde 0.1 ml heparin bulunan steril enjektörle sağlıklı vericiden 10 ml kan alındı.
2. Alınan kan örneği bir tüpe aktararak PBS ile 1:1 oranında seyreltildi.
3. 2.0 ml Ficoll üzerinde PBS ile seyreltilmiş kan, pastör pipetiyle yavaşça yayıldı.
4. 22 °C'de 2300 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda Ficoll üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde bulunan lenfositler pastör pipetiyle dikkatle alındı.
6. Alınan lenfositler cam bir tübe konularak üzerine PBS eklendi. +4 °C'de 2300 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
7. Süpernatant atılarak dipteki hücrelere 1,5 ml PBS eklenip pastör pipetiyle karıştırılarak homojen bir çözelti olması sağlandı.
8. 90'ar µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. 100 mg / 2 ml PBS içinde 24 saat inkübe edilmiş dolgu maddelerinden 25 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl tüplere eklenip 1 ml'ye PBS ile tamamladı. Negatif kontrol olarak madde içermeyen çözücü PBS, pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ kullanıldı.
9. İncelenen bileşikler içeren hücre süspansiyonları 37°C'de 1 saat bekletilerek inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası hücreler 4°C'de 3000 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
11. 1 ml PBS eklenerek 4°C'de 3000 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
12. 15 µl hücre + 15 µl tripan mavisi ile karıştırılıp 100 hücre sayılıp hücre canlılığı değerlendirildi.
13. Önceden NMPA ile kaplanmış lamlara hücre süspansiyonu taşıyan 75 µl düşük erime noktalı agar ikinci tabaka olarak lamlara yayıldı üzerine lamel kapatılarak buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Agarı zedelemekten lamel alındı.
14. Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lize edici çözeltiye daldırılarak en az 1 saat buzdolabında bekletildi. Pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂'li lamalar ayrı bir kapta lize edildi.
15. Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
16. Lamalar, agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi ve akım uygulanmadan 20 dakika bekletildi.
17. 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.
18. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamalar distile suya daldırılıp çıkartıldı.
19. 3'er kez 5'er dakika (15 dakika) nötralizasyon çözeltisi içinde bekletildi.
20. 5 dakika distile su,
21. 5 dakika % 50 etanol,

22. 5 dakika % 75 etanol,
23. 5 dakika % 99 etanol içinde bekletildikten sonra
24. 1 gece oda ısısında kurumaya bırakıldı.
25. Ertesi gün kurumuş lamalar kutulara yerleştirildi.
26. Mikroskop değerlendirilmesinden önce 35 µl Ethidium Bromür damlatılıp lamelle kapatıldı.

DNA hasarının görülebilmesi için, lamalar 1000x büyütme, 40x objektifli bir Leica floresan mikroskopunda (Wetzlar, Almanya) incelendi. Ölçümler, bilgisayarda görüntü analiz sistemi olan "Comet Assay III" (Suffolk, İngiltere) ile yapıldı. DNA molekülü içindeki kırıklar karmaşık sarmal yapısını bozarak, DNA'nın anod yönünde göç etmesine neden olmaktadır. Boyama işlemi DNA'yı kuyruklu yıldız "comet" şeklinde göstermektedir. Her üç tekrar için, rastgele seçilen 100 adet lenfosit hücresi analiz edilip, ekran üzerinde kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti ölçüldü. Comet metodunda, hücredeki DNA kırılması, genetik maddenin anod yönünde göç uzunluğu (kuyruk uzunluğu) ile tahmin edilebilir. Ayrıca, kuyruktaki DNA yüzde oranının (kuyruk yoğunluğu), DNA bağlarındaki kırık sıklığı ile orantılı olduğu gösterilmiştir. Kuyruk momenti ise bilgisayarda görüntü analiz sistemi ile hesaplanan, kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunu dikkate alan bir tanımlayıcıdır. Çalışmamızda kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentinin ortalamaları hesaplanıp, DNA hasarı tespitinde kullanıldı.

27. Mikroskop değerlendirmesinden sonra lamalar kapaklı bir atık kutusunda toplanmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Agar disk difüzyon testinde bütün deneyler 3 kez tekrarlanmış ve ortalama inhibisyon zon çapları standart sapma ile birlikte hesaplanmıştır. Her bir test maddesinin antimikrobiyal etkisi istatistiksel olarak ANOVA ve Fisher's PLSD testlerine göre $p < 0,05$ güvenlik seviyesinde belirlenmiştir. Maddeler arası ikili karşılaştırma Scheffe's F-Testi ile yapılmıştır. İstatistiksel olarak farklılık $p < 0,05$ güvenlik seviyesinde tespit edilmiştir.

Comet metodunun sonuçlarının değerlendirilmesinde, Windows 10.0 bilgisayar programı için SPSS (SPSS, Software, Chicago, IL, USA) istatistiksel analizi kullanılmıştır. Bağlayıcı sistemlerin, negatif ve

pozitif grubun sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ANOVA testi (one way analysis of variance), gruplar arasındaki farklılıklar LSD (the least significant difference) testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Agar Disk Difüzyon Testi Bulguları

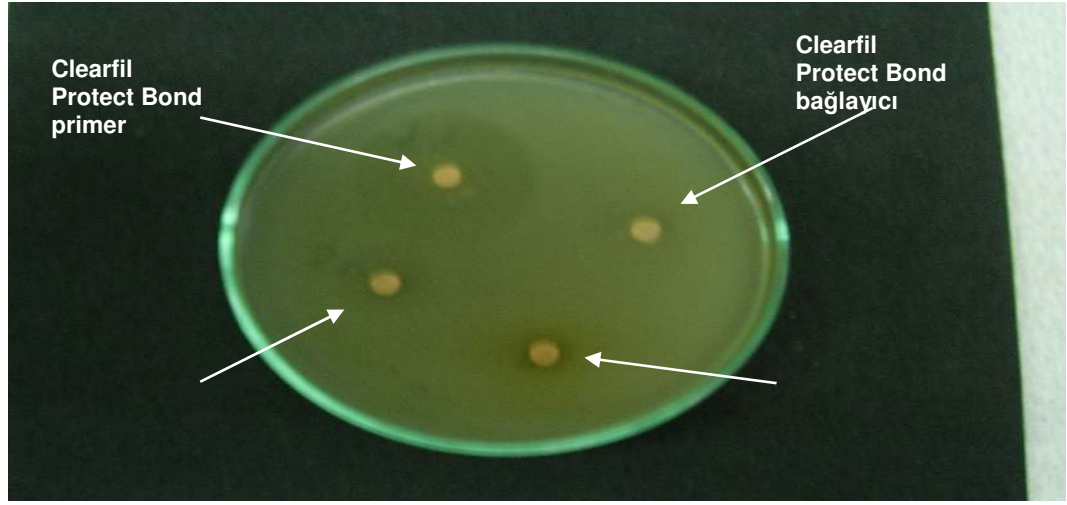
Agar-disk difüzyon deneyinde test edilen dentin bağlayıcı sistemlerin bakteriler üzerinde oluşturdukları inhibisyon zon çapı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Test maddeleri ile pozitif ve negatif kontrolün, *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları (mm olarak) ortalama değer $\pm$ standart sapmaları ile Tablo 2'de gösterilmiştir.

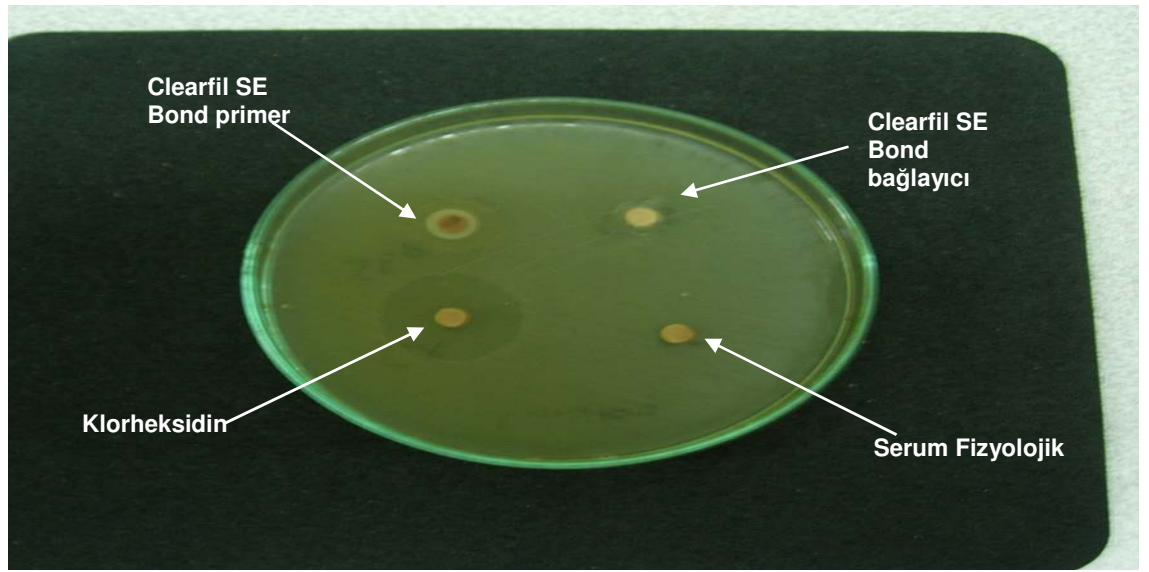
Tablo 2: *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı dentin bağlayıcı sistemler ile negatif kontrol (SF) ve pozitif kontrolün (klorheksidin) oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapları (mm $\pm$ standart sapma).

Maddeler	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>
Serum fizyolojik	0	0	0
Klorheksidin	25,6 $\pm$ 0,57	15 $\pm$ 1,0	25,3 $\pm$ 1,15
Clearfil SE Bond primer	0	0	19 $\pm$ 1,0
Clearfil SE Bond bağlayıcı	0	0	9,3 $\pm$ 1,15
SL Bond	50 $\pm$ 1,15	15,3 $\pm$ 1,15	20 $\pm$ 0,20
i-Bond	10,6 $\pm$ 1,15	9,33 $\pm$ 1,15	10,6 $\pm$ 1,15
Clearfil Protect Bond primer	28,6 $\pm$ 1,15	29 $\pm$ 2,30	37,6 $\pm$ 0,57
Clearfil Protect Bond bağlayıcı	0	0	0

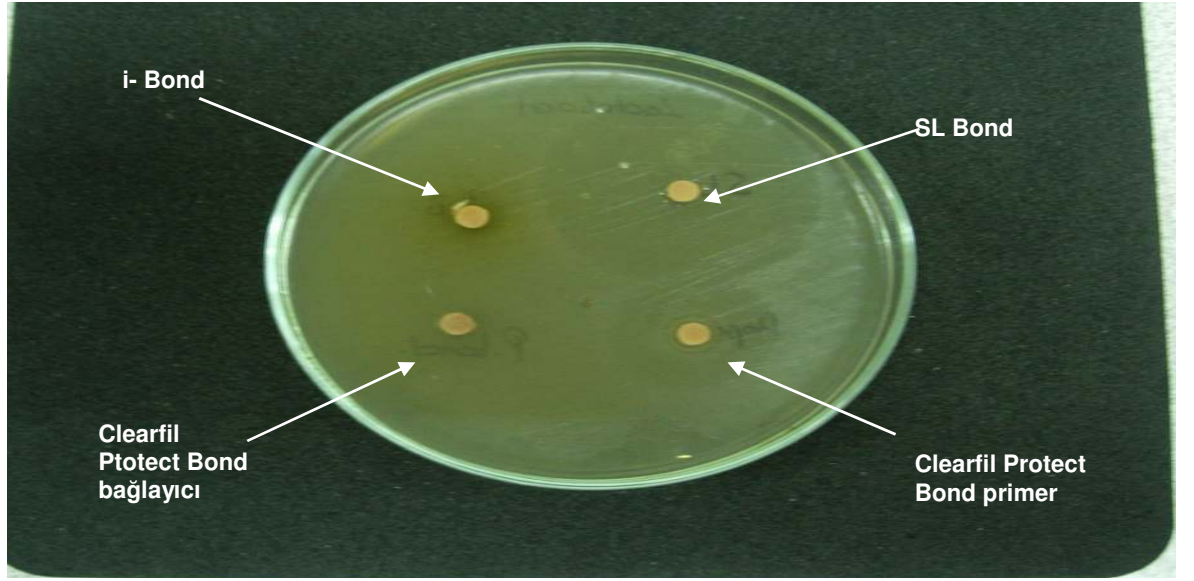
Dentin bağlayıcı sistemler ile pozitif ve negatif kontrollerin mikroorganizmalara karşı agar plakta oluşturdukları inhibisyon zonları resim 1-6'da gösterilmiştir.



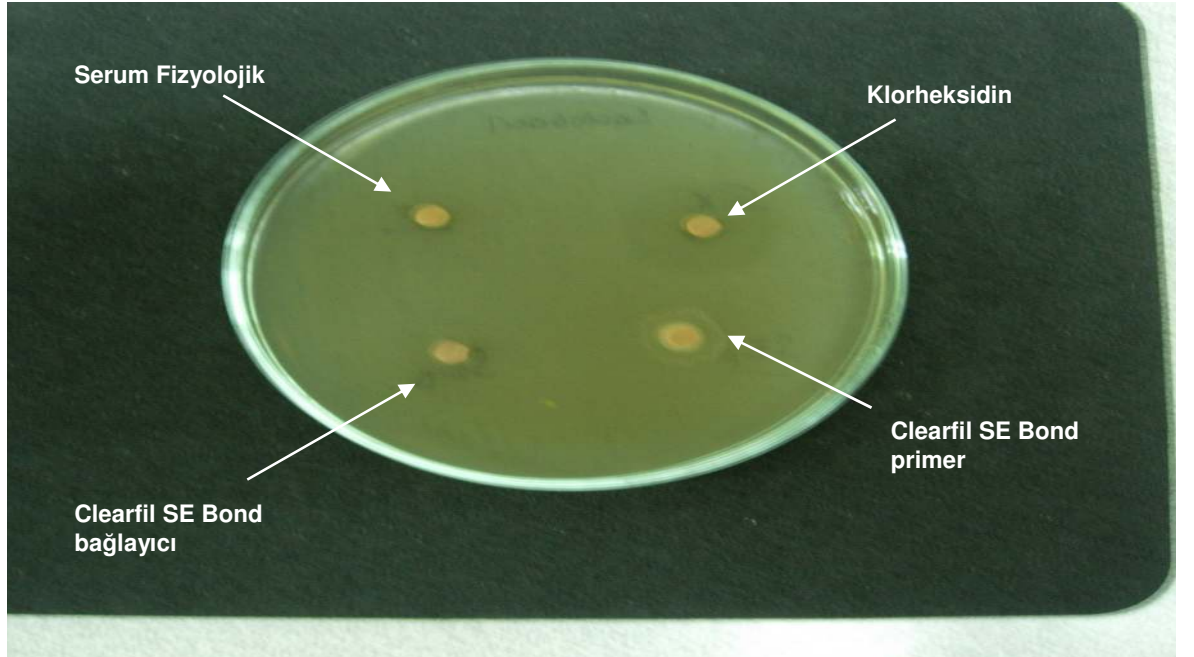
Resim 1. Clearfil Protect Bond primer, Clearfil Protect Bond bağlayıcı, SL bond ve i-Bond'un agar plak üzerinde *S.mutans*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.



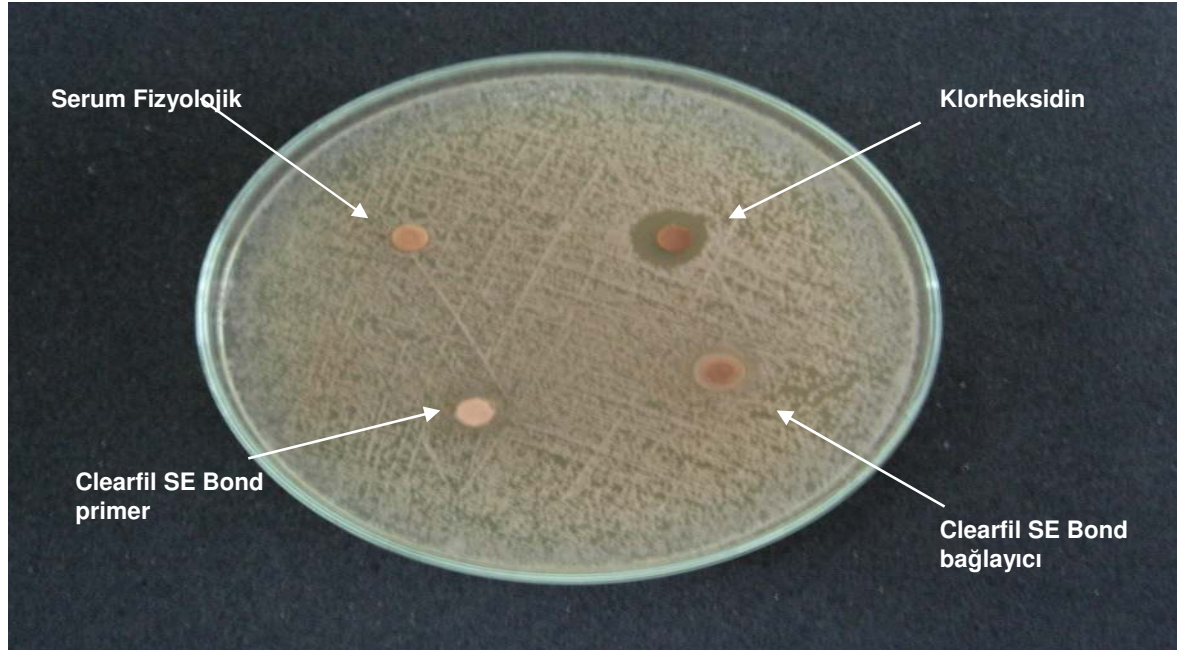
Resim 2. Clearfil SE Bond primer, Clearfil SE Bond bağlayıcı, klorheksidin ve serum fizyolojik solüsyonun agar plak üzerinde *S.mutans*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.



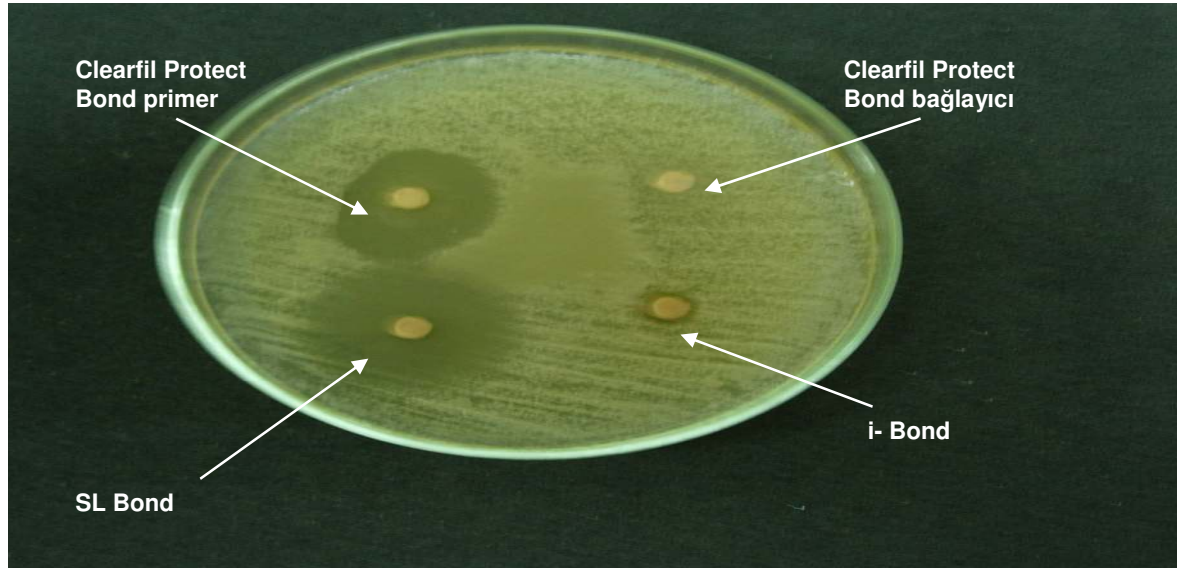
Resim 3. i-Bond, SL bond, Clearfil Protect Bond bağlayıcı ve Clearfil Protect Bond primerin agar plak üzerinde *L.casei*'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.



Resim 4. Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil SE Bond primer, serum fizyolojik ve klorheksidin'in agar plak üzerinde *L.casei*'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.

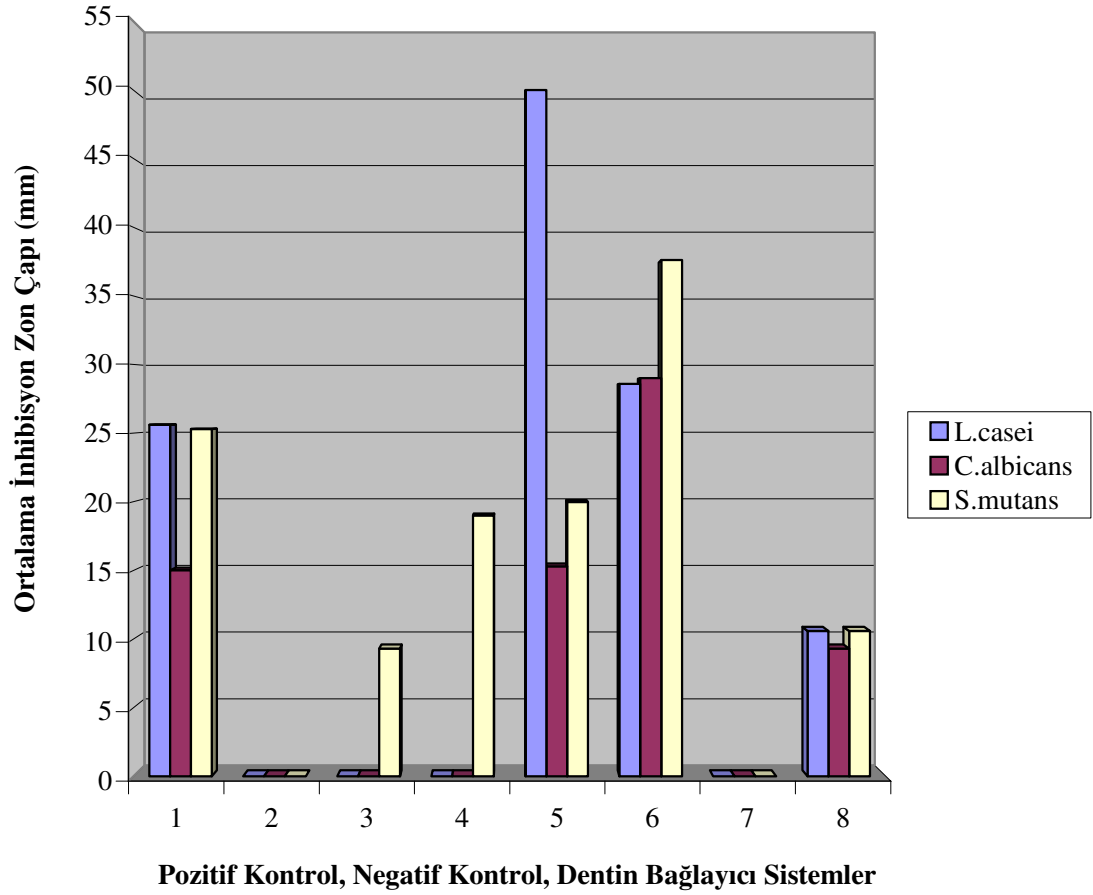


Resim 5. Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil SE Bond primer, serum fizyolojik ve klorheksidinin agar plak üzerinde *C.albicans*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.



Resim 6. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, Clearfil Protect Bond primer, i-Bond ve SL Bond'un agar plak üzerinde *C.albicans*'a karşı oluşturdukları inhibisyon zonu.

Çalışmada kullanılan pozitif kontrol (klorheksidin), negatif kontrol (serum fizyolojik), Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil SE Bond primer, SL Bond, Clearfil Protect Bond primer, Clearfil Protect Bond bağlayıcı ve i-Bond'un, her üç bakteri türüne karşı oluşturduğu ortalama inhibisyon zonlarının ölçüleri (mm) Grafik 1'de gösterilmiştir.



Grafik 1. 1:Klorheksidin (pozitif kontrol), 2:serum fizyolojik (negatif kontrol), 3:Clearfil SE Bond bağlayıcı, 4:Clearfil SE Bond primer, 5:SL Bond, 6:Clearfil Protect Bond primer, 7:Clearfil Protect Bond bağlayıcı, 8:i-Bond'un *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı oluşturduğu ortalama inhibisyon zonlarının ölçüleri (mm)

Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan serum fizyolojik (SF) test edilen tüm bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivite açısından etkisizdir. İnhibisyon zon çapı değeri "0" olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber SF ile zayıf bir inhibisyon oluşturan Clearfil Protect Bond bağlayıcı arasında antimikrobiyal etki açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$).

Pozitif kontrol olarak kullanılan klorheksidin *L.casei* (ortalama inhibisyon zon çapı= $25,6 \pm 0,57$ mm), *C.albicans* (ortalama inhibisyon zon çapı= $15 \pm 1,0$ mm) ve *S.mutans* (ortalama inhibisyon zon çapı= $25,3 \pm 1,15$ mm) bakteri türlerine karşı belirgin bir inhibisyon göstermiştir. Bu etkisi diğer test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklıdır ($p < 0,05$).

Clearfil SE Bond primer ve bağlayıcı, *L.casei* ve *C.albicans* türlerine karşı etkisiz kalmış herhangi bir inhibitör etki gösterememiştir. Oluşan inhibisyon zon çapı değeri "0" olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte *S.mutans*'a karşı oluşturduğu inhibisyon ise zayıf bir inhibisyondur (ortalama inhibisyon zon çapı= $19 \pm 1,0$ mm). Primer sistemin *S.mutans*'a karşı oluşturduğu inhibisyon zonu, bağlayıcı ile oluşan inhibisyon zon çapından (ortalama inhibisyon zon çapı= $9,3 \pm 1,15$ mm) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,05$). Bununla beraber Clearfil SE Bond primer ve bağlayıcı, *S.mutans*'a karşı diğer test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemlere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($p < 0,05$) daha az antimikrobiyal etki göstermiştir.

SL Bond, tek şişe bağlayıcı sistem her üç bakteri türüne karşı antimikrobiyal etki göstermekle birlikte, *L.casei*'ye karşı diğer bakterilerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla inhibisyon (ortalama inhibisyon zon çapı= $50 \pm 1,15$ mm) göstermiştir ($p < 0,05$).

Test edilen bağlayıcı etkenlerin, her üç bakteri üzerine antimikrobiyal etkilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise SL Bond, Clearfil Protect Bond primer'den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az inhibitör etki gösterirken ($p < 0,05$), diğer bağlayıcı sistemlerden ise istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla inhibisyon göstermiştir ($p < 0,05$).

i-Bond'un test edilen bakterilere olan inhibitör etkisi çok zayıf olup istatistiksel olarak da anlamlı değildir ($p > 0,05$). i-Bond test edilen üç bakteri türüne karşı, diğer dentin bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük değerlerde ($p < 0,05$) inhibisyon etkisi göstermiştir (*L.casei* ve *S.mutans* için ortalama inhibisyon zon çapı= $10,6 \pm 1,15$ mm, *C.albicans* için ortalama inhibisyon zon çapı= $9,33 \pm 1,15$ mm).

Clearfil Protect Bond sistemde antimikrobiyal monomer MDPB katılmış olan primeri, her üç mikroorganizma türüne karşı güçlü inhibitör etki göstermiştir. Clearfil Protect Bond primer tarafından oluşturulan inhibisyon zon çapı *S.mutans* (ortalama inhibisyon zon çapı=28,6±1,15 mm) ve *C.albicans* (ortalama inhibisyon zon çapı=29±2,30 mm) için diğer test edilen tüm bağlayıcı sistemlerden, istatistiksel olarak belirgin bir şekilde daha fazladır ($p<0,05$). Clearfil Protect Bond primer *L.casei* üzerinde inhibitör etki göstermekle birlikte (ortalama inhibisyon zon çapı=28,6±1,15 mm), bu etkisi SL Bond sistemden (ortalama inhibisyon zon çapı=50±1,15 mm) istatistiksel olarak belirgin derecede azdır.

Clearfil Protect Bond bağlayıcı ise, her üç mikroorganizma türüne karşı inhibisyon etkisi göstermemiştir. Negatif kontrol grubu olarak kullanılan SF ile istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$), her ikisinde de test bakterilerine karşı oluşan inhibisyon zon çapı değeri "0" olarak bulgulanmıştır.

Bu çalışma sonucuna göre test edilen dentin bağlayıcı sistemler arasında her üç mikroorganizma türüne karşı en fazla inhibisyon zon çapı % 95 güvenlik seviyesine göre, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ortalama 31,889±0,314 mm'lik çap değeri ile Clearfil Protect Bond primer tarafından oluşturulmuştur.

Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak kullanılan klorheksidinin her üç mikroorganizma türüne karşı oluşturduğu, % 95 güvenlik seviyesinde, istatistiksel olarak ortalama inhibisyon zon çapı değeri ise 22,0±0,314 mm olarak tespit edilmiştir. Bu ortalama değer Clearfil Protect Bond primer'den (ortalama inhibisyon zon çapı =31,889±0,314 mm) daha düşüktür.

Çalışmada test edilen maddeler mikroorganizmalara karşı oluşturdukları ortalama inhibisyon zon çaplarına göre büyükten küçüğe şu şekilde sıralanabilir; Clearfil Protect Bond primer (31,889±0,314 mm) > SL Bond (28,44±0,314 mm) > i-Bond (10,22±0,314 mm) > Clearfil SE Bond primer (6,33±0,314 mm) > Clearfil SE Bond bağlayıcı (3,11±0,314 mm) > Clearfil Protect Bond bağlayıcı (0 mm).

Bağlayıcı sistemlerin en fazla inhibitör etki gösterdiği bakteri ise *S.mutans*, *S.mutans*'a karşı test edilen tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapı= 15,25±0,192 mm olarak tespit edilmiştir. *L.casei*'ye karşı tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturdukları ortalama inhibisyon zon çapı ise 14,375±0,192 mm'dir. Bağlayıcıların en az inhibisyon oluşturdukları mikroorganizma ise *C.albicans*'tır, *C.albicans*'a karşı test edilen tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapı=8,625±0,192 mm'dir.

4.2.MİK ve MBK Ölçüm Bulguları

Çalışmada test edilen bağlayıcı sistemlerin *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı minimal inhibitör değerleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Bu değerler orijinal solüsyona (BHI) yüzde oranı olarak ($\mu\text{g/mL}$) hesaplanmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre minimal inhibitör konsantrasyon değerleri ile minimal bakterisid konsantrasyon değerleri birbirine eşittir. (MİK=MBK)

Tablo 3: Bağlayıcı sistemlerin, *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans* için MBK değerleri ($\mu\text{g/mL}$).

Maddeler	<i>L.casei</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S. mutans</i>
Clearfil SE Bond primer	0,5	0,0625	0,125
Clearfil SE Bond bağlayıcı	0,0625	0,5	0,5
SL Bond	0,25	0,0313	0,25
i- Bond	0,125	0,0625	0,0625
Clearfil Protect Bond primer	0,0156	0,0078	0,0078
Clearfil Protect Bond bağlayıcı	0,5	0,5	0,5

Negatif kontrol grubu olarak kullanılan SF'in tüm konsantrasyonlarında bakterilerde üreme görülmüştür. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan %2'lik klorheksidin solüsyonu çok düşük konsantrasyonda ($0,0625 \mu\text{g/mL}$) bakterisid etki göstermiştir.

Clearfil SE Bond primer, *C.albicans* için düşük MBK değeri ($0,0625 \mu\text{g/mL}$) gösterirken, Clearfil SE Bond bağlayıcı ise *L.casei* için en düşük MBK değerine ($0,0625 \mu\text{g/mL}$) sahiptir.

SL Bond, *L.casei* ve *S.mutans* için aynı MBK değerine ($0,25 \mu\text{g/mL}$) sahipken, *C.albicans* için çok daha düşük MBK değerine sahiptir ($0,0313 \mu\text{g/mL}$).

i-Bond, *C.albicans* ve *S.mutans* için düşük (0,0625 µg/mL) MBK değerine sahipken, *L.casei* için bu değer daha yüksektir (0,125 µg/mL).

Clearfil Protect Bond primer, *L.casei* (0,0625 µg/mL), *C.albicans* (0,0078 µg/mL) ve *S.mutans* (0,0078 µg/mL) için diğer bağlayıcı sistemlere göre en düşük MBK değerine sahiptir. Ayrıca Clearfil Protect Bond primer'in, *C.albicans* ve *S.mutans* için MBK değeri pozitif kontrol grubu olarak kullanılan klorheksidinden (0,0625 µg/mL) de düşüktür.

Clearfil Protect Bond bağlayıcı, her üç mikroorganizma için de yüksek (0,5 µg/mL) MBK değerine sahiptir.

Çalışmada kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin; *L.casei* için MBK değerleri 0,0156–0,5 µg/mL, *C.albicans* için 0,0625–0,5 µg/mL, *S.mutans* için 0,0625–0,5 µg/mL arasında değişmektedir.

L.casei için test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemler arasından Clearfil Protect Bond primer en düşük MBK değerine (0,0156 µg/mL) sahiptir. Diğer bir ifade ile Clearfil Protect Bond primer, *L.casei* için en fazla bakterisid etkili bağlayıcıdır.

C.albicans ve *S.mutans* için test edilen tüm bağlayıcı etkenler arasından en fazla fungusid/bakterisid etkili olan bağlayıcı sistem en düşük MBK değeri (0,0078 µg/mL) ile Clearfil Protect Bond primer olarak tespit edilmiştir.

Çalışma sonucuna göre *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans* için en düşük konsantrasyonda inhibitör etki gösteren bağlayıcı sistem Clearfil Protect Bond primer'dir.

4.3.Genotoksisite Testi Bulguları

Test edilen dentin bağlayıcı sistemlerin her bir grubunda, tripan mavisi ile boyamada hücre canlılığı % 90'ın üzerinde bulunmuştur. Çalışmamızda, tek hücre jel elektroforez yönteminde genotoksik hasarı belirten 3 farklı parametre; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti bulgularını dikkate aldık.

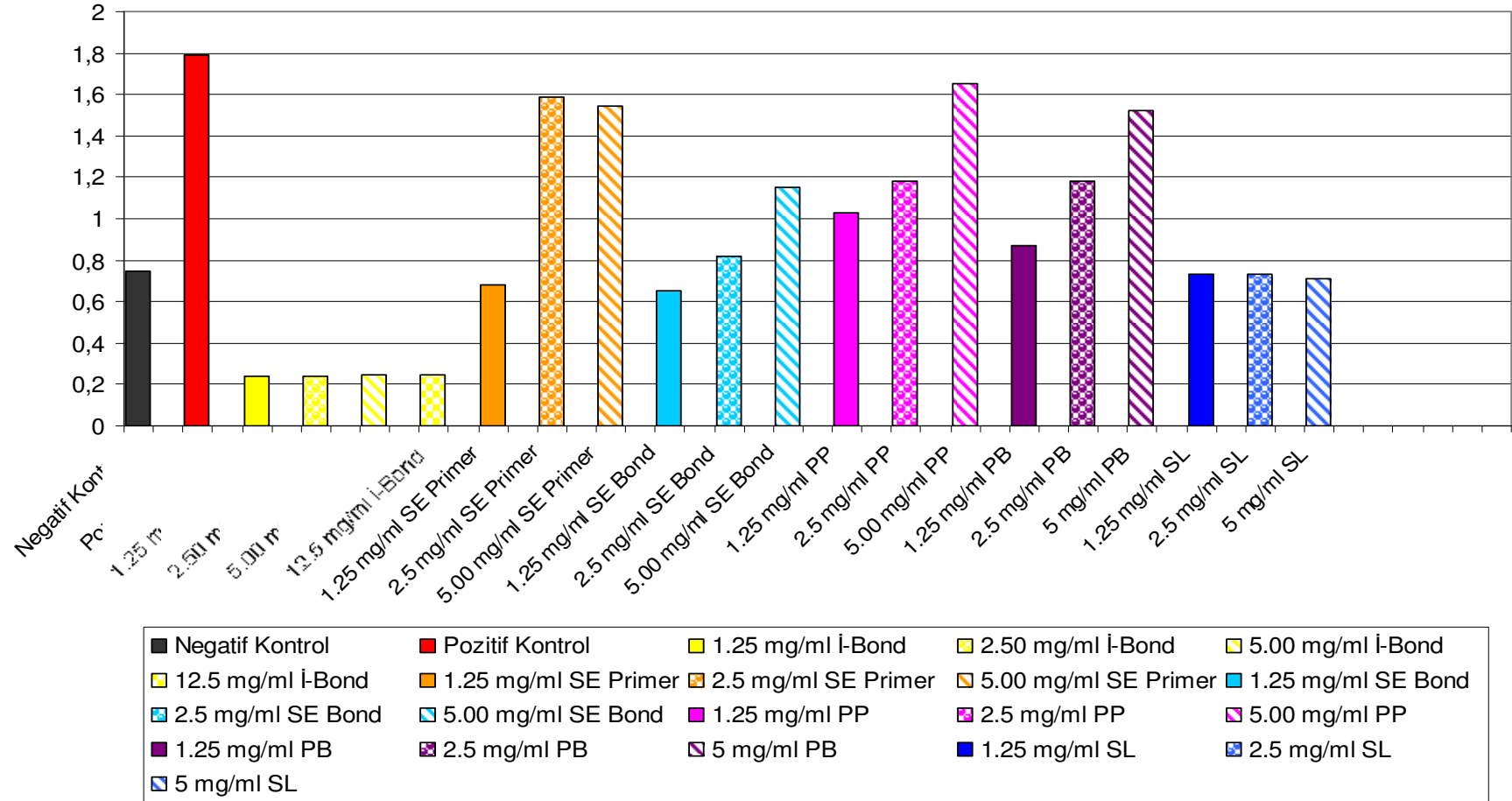
Çalışma sonuçlarına göre, in vitro şartlarda test maddeleri ve kontrol grupları ile 1 saatlik maruziyetten sonra insan periferik lenfositlerindeki, 300 skor/konsantrasyonu (100 skor/deney, 3 deney) ifade eden, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk moment değerlerinin ortalaması ($\pm$ standart hata, SDE) Tablo 4 ve Grafik 2- 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki DNA hasarı (kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ortalama ($\pm$ SDE) değerleri).

TEDAVİ GRUBU		COMET YÖNTEMİ PARAMETRELERİ		
Madde	Konsantrasyon	Kuyruk uzunluğu	Kuyruk yoğunluğu	Kuyruk momenti
Negatif Kontrol	PBS	0,75 $\pm$ 0,006	3,28 $\pm$ 0,25	0,02 $\pm$ 0,001
Pozitif Kontrol	50 μ M H ₂ O ₂	1,79 $\pm$ 0,03 ***	37,81 $\pm$ 1,44 ***	0,47 $\pm$ 0,02 ***
i-Bond	25 μ l	0,24 $\pm$ 0,003 **	5,34 $\pm$ 0,45	0,01 $\pm$ 0,001
i-Bond	50 μ l	0,24 $\pm$ 0,002 **	5,10 $\pm$ 0,41	0,008 $\pm$ 0,0007
i-Bond	100 μ l	0,25 $\pm$ 0,002 **	6,95 $\pm$ 0,51	0,01 $\pm$ 0,001
i-Bond	250 μ l	0,25 $\pm$ 0,003 **	4,45 $\pm$ 0,67	0,01 $\pm$ 0,001
Clearfil SE Bond primer	25 μ l	0,68 $\pm$ 0,006	2,98 $\pm$ 0,28	0,01 $\pm$ 0,001
Clearfil SE Bond primer	50 μ l	1,59 $\pm$ 0,03 ***	31,1 $\pm$ 1,59 ***	0,34 $\pm$ 0,02 ***
Clearfil SE Bond primer	100 μ l	1,54 $\pm$ 0,04 ***	38,92 $\pm$ 1,58 ***	0,37 $\pm$ 0,01 ***
Clearfil SE Bond bağlayıcı	25 μ l	0,65 $\pm$ 0,006	3,2 $\pm$ 0,29	0,01 $\pm$ 0,001
Clearfil SE Bond bağlayıcı	50 μ l	0,82 $\pm$ 0,02	8,84 $\pm$ 0,86	0,06 $\pm$ 0,008
Clearfil SE Bond bağlayıcı	100 μ l	1,15 $\pm$ 0,03 *	15,91 $\pm$ 1,11 *	0,14 $\pm$ 0,01
Clearfil Protect Bond primer	25 μ l	1,03 $\pm$ 0,02	12,25 $\pm$ 0,99	0,1 $\pm$ 0,009
Clearfil Protect Bond primer	50 μ l	1,18 $\pm$ 0,03 **	15,0 $\pm$ 1,12	0,13 $\pm$ 0,01
Clearfil Protect Bond primer	100 μ l	1,65 $\pm$ 0,02 ***	43,76 $\pm$ 2,17 ***	0,46 $\pm$ 0,02 ***
Clearfil Protect Bond bağlayıcı	25 μ l	0,87 $\pm$ 0,02	8,5 $\pm$ 0,96	0,06 $\pm$ 0,009
Clearfil Protect Bond bağlayıcı	50 μ l	1,18 $\pm$ 0,54	15,0 $\pm$ 19,49	0,13 $\pm$ 0,21
Clearfil Protect Bond bağlayıcı	100 μ l	1,52 $\pm$ 0,03 ***	29,33 $\pm$ 1,62 ***	0,32 $\pm$ 0,02 ***
SL Bond	25 μ l	0,73 $\pm$ 0,01	5,07 $\pm$ 0,83	0,03 $\pm$ 0,006
SL Bond	50 μ l	0,73 $\pm$ 0,01	3,12 $\pm$ 0,45	0,01 $\pm$ 0,004
SL Bond	100 μ l	0,71 $\pm$ 0,01	4,12 $\pm$ 0,54	0,02 $\pm$ 0,004

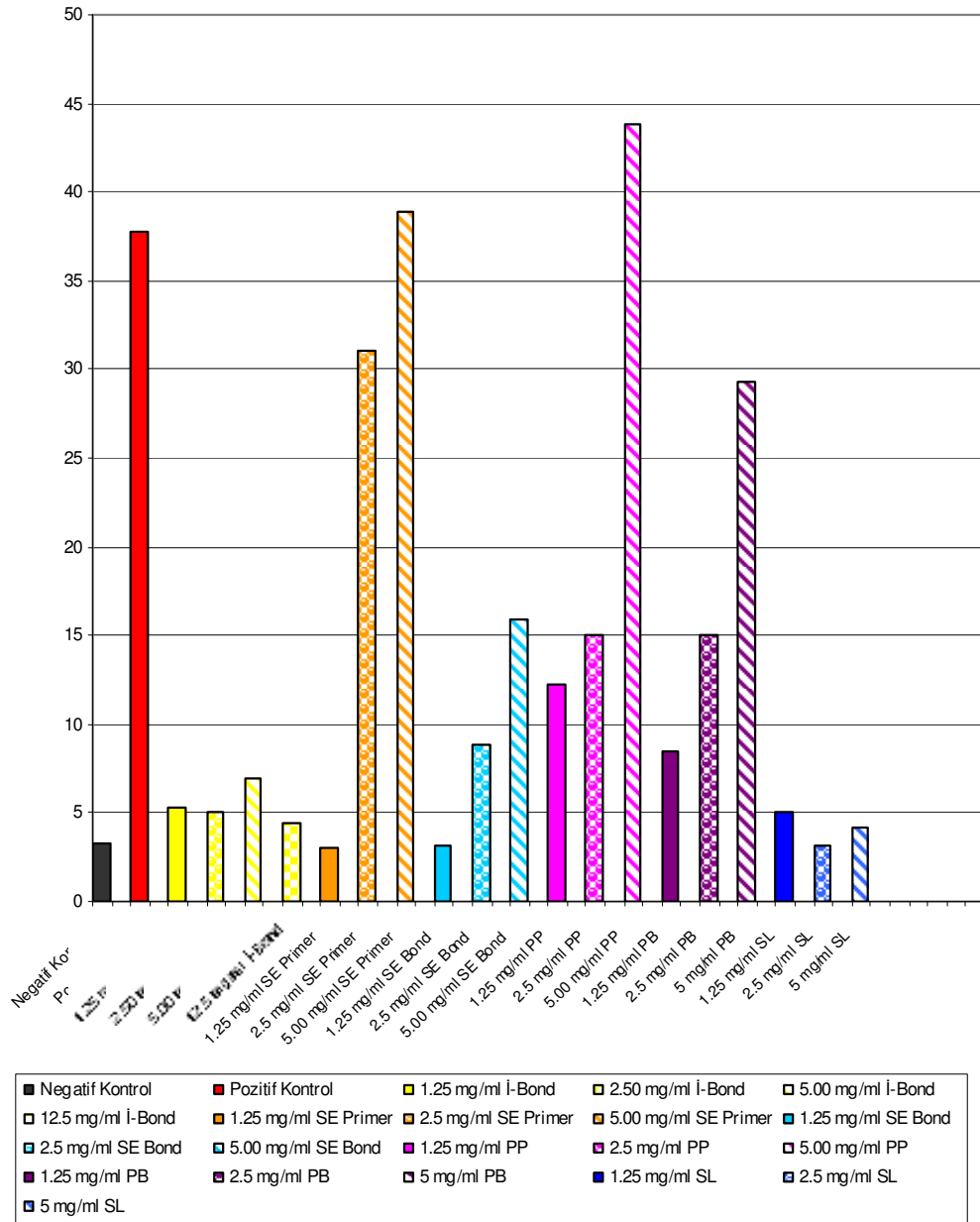
* p< 0,05; ** p< 0,01; *** p<0,001; dentin bağlayıcı sistemler ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki DNA hasarının, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemini göstermektedir.

Kuyruk Uzunluğu



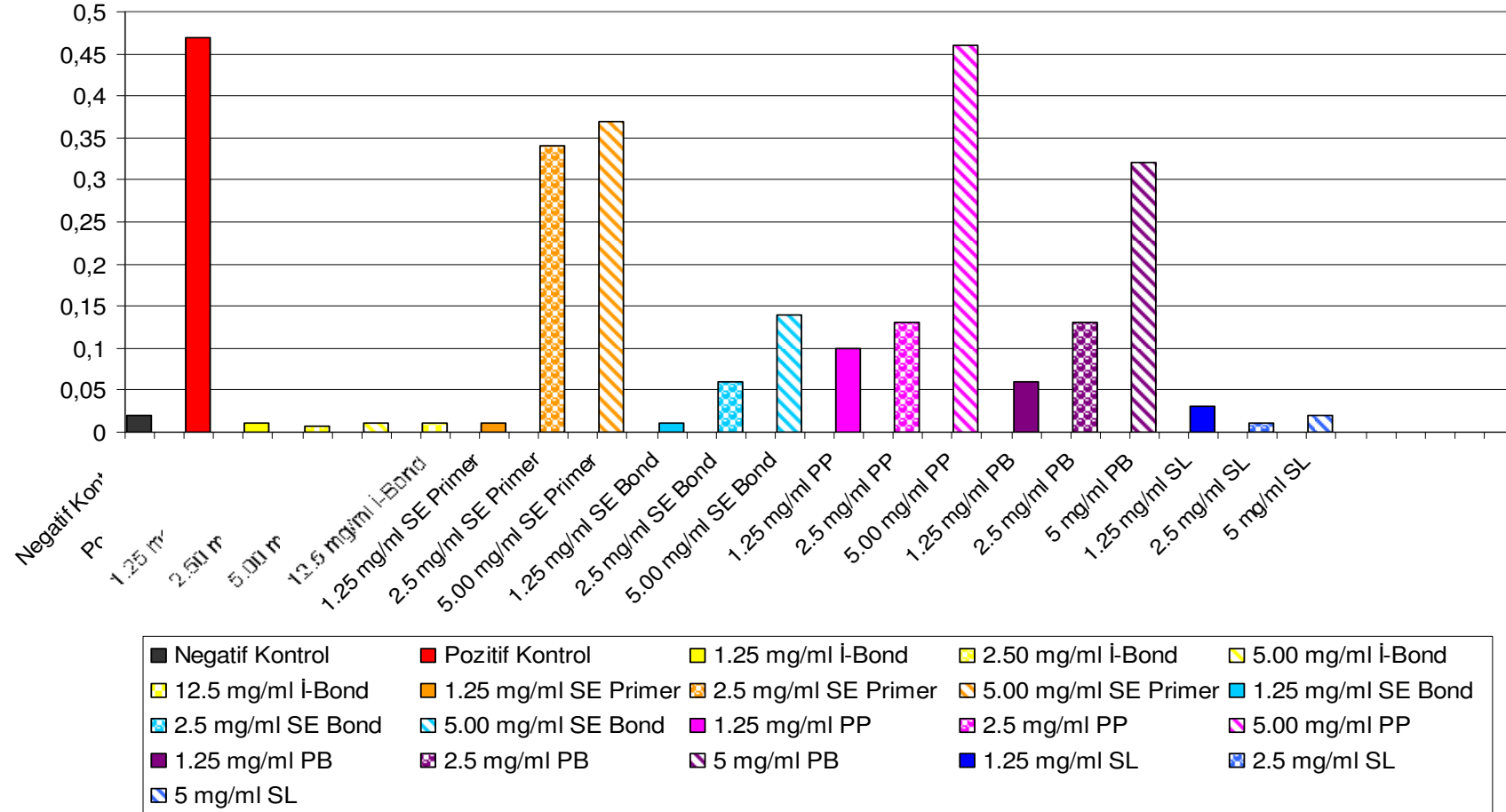
Grafik 2. Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk uzunluğu değerleri.

Kuyruk Yoğunluğu



Grafik 3. Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri.

Kuyruk Momenti



Grafik 4. Bağlayıcı sistemler, negatif kontrol ve pozitif kontrolle tedavi edilen lenfositlerdeki ortalama kuyruk momenti değerleri

Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan hidrojen peroksit lenfositlerde belirgin DNA hasarı oluştururken, negatif kontrol grubu olarak kullanılan PBS ise hücresel üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir.

Çalışma sonuçlarına göre genotoksik hasarı tespit etmek için önemli ölçütler olan kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti değerleri açısından, bağlayıcı sistemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Çalışmada dentin bağlayıcı sistemlerin uygulama dozları olan 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 5 mg/ml'den elde edilen 3 farklı elüsyon konsantrasyonu; 25µl, 50µl ve 100µl test edilmiştir. Maddelerin konsantrasyonları ile kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti arasında farklılıklar bulgulanmıştır. Kuyruk yoğunluğu, uzunluğu ve momenti bakımından Clearfil Protect Bond ve Clearfil SE Bond'un oluşturdukları DNA hasarı doz ile ilişkili, fakat SL Bond ve i-Bond için görülen genotoksik etki dozdan bağımsız olarak gelişmiştir.

Kendinden asitli sistem Clearfil SE Bond primer, her üç kriter açısından, düşük bir konsantrasyonda, 50µl'de belirgin bir DNA hasarı oluşturmuştur ($p < 0,05$). Clearfil SE Bond bağlayıcı ise yüksek konsantrasyonda, 100µl'de genotoksik etki göstermiştir.

SL bond, her dozu için istatistiksel olarak anlamlı bir DNA hasarı oluşturmamış kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentinde belirgin bir artış göstermemiştir ($p > 0,05$).

i-Bond bağlayıcı sistem, her dozunda kuyruk uzunluğunda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde negatif kontrol grubundan düşük değerler göstermiştir ($p < 0,05$). Kuyruk momenti ve yoğunluğu tüm dozlarında belirgin bir artış göstermemiştir ($p > 0,05$).

Clearfil Protect Bond primer, 25µl'lik en düşük konsantrasyonda, kuyruk uzunluğunda belirgin bir DNA hasarı oluşturmazken, 50µl ve 100µl'de istatistiksel olarak anlamlı derecede DNA hasarı oluşturmuştur ($p < 0,05$). 100µl'lik konsantrasyonda yaptığı hasar 50µl'de oluşan hasardan anlamlı derecede fazladır ($p < 0,05$). Kuyruk momenti ve yoğunluğu ise sadece 100µl'lik yüksek konsantrasyonda artış göstermiştir.

Clearfil Protect Bond bağlayıcı, kuyruk moment, uzunluk ve yoğunluğu, sadece yüksek konsantrasyonda (100µl) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p < 0,05$).

Çalışmada test edilen dentin bağlayıcı sistemlerden, kuyruk uzunluğunda, 25µl'lik uygulama dozunda, en düşük artışı i-Bond ile SL Bond yapmış, bu ikisi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulgulanmamıştır ($p > 0,05$). Diğer dentin bağlayıcı sistemler ise i-Bond'dan belirgin olarak fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$). Aynı dozda, diğer maddeler arasında ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p > 0,05$). 50µl'de ise, diğer bağlayıcı sistemler arasında en fazla etkiyi Clearfil SE Bond primer göstermiştir. 100µl'de, Clearfil Protect Bond primerin gösterdiği artış ile Clearfil SE Bond primer arasında belirgin bir fark yokken ($p > 0,05$), Clearfil Protect Bond primerin yaptığı artış diğer bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ($p < 0,05$).

Kuyruk yoğunluğu artışı bakımından, 25µl'de, bağlayıcı sistemler arasında anlamlı bir fark bulgulanmamıştır ($p > 0,05$). 50µl'de, Clearfil SE Bond primer, diğer bağlayıcı etkenlerden anlamlı bir şekilde belirgin kuyruk yoğunluğu artışına neden olmuştur ($p < 0,05$). 100µl'de, Clearfil Protect Bond primer ile Clearfil SE Bond primer arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Clearfil Protect Bond primer diğer bağlayıcı sistemlerden ise anlamlı derecede fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

Dentin bağlayıcı sistemlerin kuyruk momentine etkileri, 25µl'de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermezken ($p > 0,05$), 50µl'de ise en fazla etkiyi Clearfil SE Bond primer göstermiştir ($p < 0,05$). 100µl'de, Clearfil Protect Bond primer; Clearfil SE Bond primer ve Clearfil Protect Bond bağlayıcıdan farklı bir etki yaratmazken ($p > 0,05$), diğer sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla kuyruk momenti artışına neden olmuştur ($p < 0,05$).

Clearfil SE Bond primer, 25µl'de, sadece i-Bond'dan belirgin derecede fazla kuyruk uzunluğuna neden olmuş ($p < 0,05$), diğer sistemlerle arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p > 0,05$). Kuyruk yoğunluğu ve momenti ise aynı dozda diğer bağlayıcı sistemlerle anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0,05$).

Clearfil SE Bond primer, 50µl'de, i-Bond, Clearfil SE Bond bağlayıcı, Clearfil Protect Bond bağlayıcı ve SL Bond'dan anlamlı derecede daha fazla kuyruk uzunluğuna ve moment artışına neden olmuştur ($p < 0,05$). Kuyruk yoğunluğu ise 50µl'de, diğer bağlayıcı etkenlerden anlamlı derecede daha fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$).

Clearfil SE Bond primer, 100µl'de, kuyruk uzunluğu i-Bond ve SL Bond'dan daha fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$). Kuyruk yoğunluğu, i-Bond, SL Bond ve Clearfil SE Bond bağlayıcıdan belirgin derecede daha fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$). 100µl'de, i-Bond, Clearfil SE Bond ve SL Bond'dan daha fazla kuyruk momentinde artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

Clearfil SE Bond bağlayıcı, 25µl'de, kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentinde diğer dentin bağlayıcı sistemlerle istatistiksel olarak farklı bir etkiye neden olmamıştır ($p > 0,05$).

Clearfil SE Bond bağlayıcı, 50µl'de ise, kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti açısından sadece Clearfil SE Bond primer ile anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p < 0,05$). Clearfil SE Bond primer her üç ölçüt için daha fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

Clearfil SE Bond bağlayıcı, 100µl'de, SL Bond hariç, diğer bağlayıcı etkenlerden anlamlı derecede daha az kuyruk uzunluğunda artışa neden olmuştur ($p < 0,05$). Kuyruk yoğunluğu ve momentini ise Clearfil Protect Bond primer ve Clearfil SE Bond primerden anlamlı derecede daha az artırmıştır ($p < 0,05$).

SL Bond, 25µl'de, i-Bond'dan daha fazla kuyruk uzunluğunda artışa neden olurken ($p < 0,05$), kuyruk yoğunluğu ve momenti açısından diğer sistemlerle arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). 50µl'de, i-Bond'dan daha fazla kuyruk uzunluğunu artırırken, Clearfil SE Bond primer ve Clearfil Protect Bond primer ise aynı dozda SL Bond'dan daha fazla etkilidir ($p < 0,05$). 50µl'de kuyruk yoğunluğu ve moment artışı ise Clearfil SE Bond primer de SL Bond'dan belirgin olarak daha fazladır ($p < 0,05$). 100µl'de, i-Bond hariç diğer tüm bağlayıcı sistemler kuyruk uzunluğunu, yoğunluğunu ve momentini SL Bond'dan daha fazla artırmışlardır ($p < 0,05$).

i-Bond'un her üç dozunda kuyruk uzunluğunda yaptığı artış SL Bond haricinde diğer dentin bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük değerlerdedir ($p < 0,05$). Kuyruk yoğunluğunda ve momentinde yaptığı artış 25µl'de, diğer gruplarla anlamlı bir farklılık göstermezken ($p > 0,05$), 50µl'de, sadece Clearfil SE Bond primer ile anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0,05$). 100µl'de, ise, Clearfil SE Bond primer, Clearfil Protect Bond primer ve Clearfil Protect Bond bağlayıcı, anlamlı derecede i-Bond'dan daha fazla kuyruk yoğunluğunda ve momentinde artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

Clearfil Protect Bond primer, 25µl'de, sadece i-Bond'dan anlamlı derecede daha fazla kuyruk uzunluğuna neden olmuş, kuyruk yoğunluğu ve momenti ise aynı dozda diğer dentin bağlayıcı sistemlerle anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0,05$).

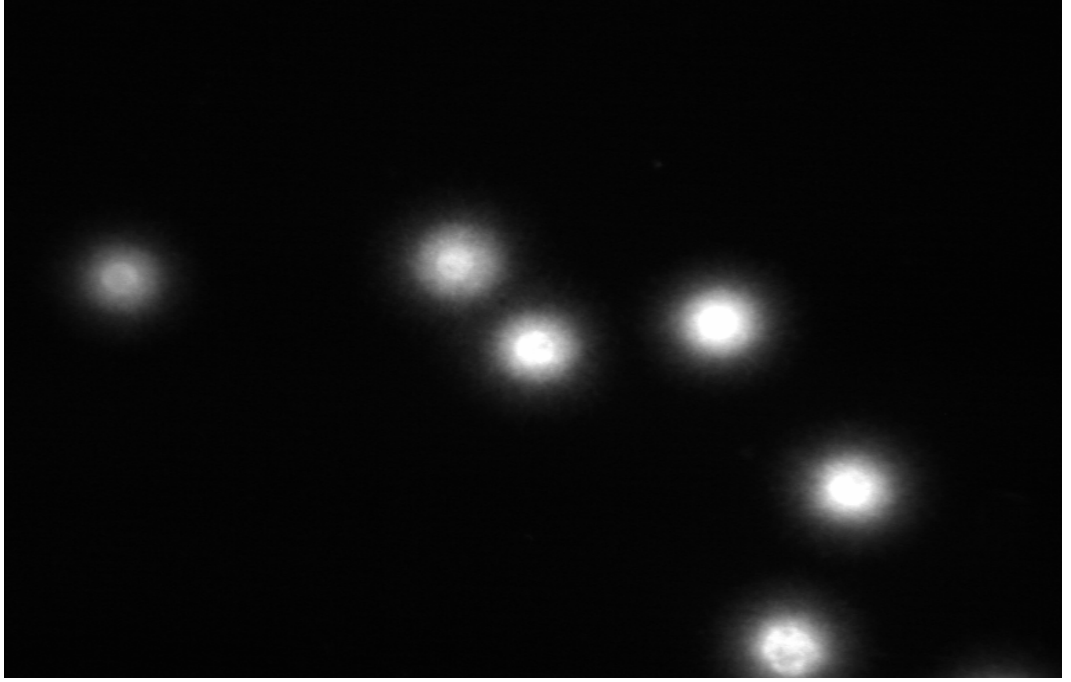
Clearfil Protect Bond primer, 50µl'de, i-Bond ve SL Bond'dan daha fazla kuyruk uzunluğunda artışa neden olmuş ($p < 0,05$), Clearfil SE Bond primer'den ise aynı dozda daha az etki göstermiştir ($p < 0,05$). 50µl'de, kuyruk yoğunluğu ve moment artışı ise Clearfil SE Bond

primerden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

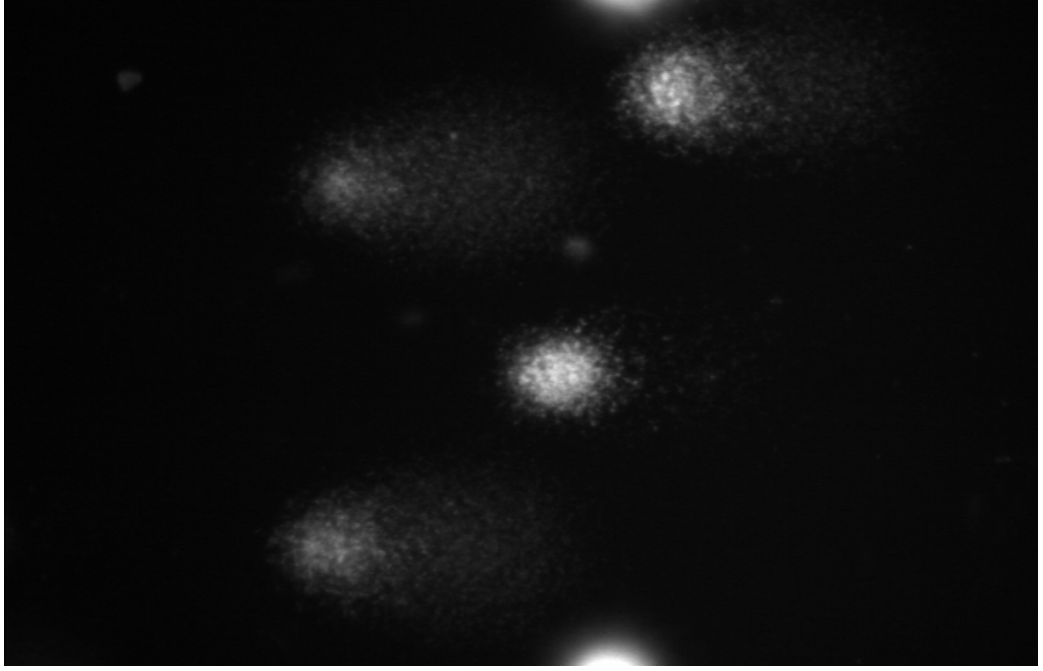
Clearfil Protect Bond primer, 100 μ l'de, i-Bond, Clearfil SE Bond bağlayıcı ve SL Bond'dan daha fazla kuyruk uzunluğuna neden olmuş, kuyruk yoğunluğu ise Clearfil SE Bond primer ile belirgin bir fark göstermezken ($p > 0,05$), diğer bağlayıcı sistemlerden anlamlı derecede fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$). Kuyruk momenti ise Clearfil SE Bond primer ile Clearfil Protect Bond bağlayıcı sistem haricinde, diğer sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

Clearfil Protect Bond bağlayıcı, 25 μ l'de, kuyruk yoğunluğu ve momentinde diğer dentin bağlayıcı sistemlerden farklı bir etkiye neden olmazken ($p > 0,05$), kuyruk uzunluğunda ise sadece i-Bond'dan anlamlı derecede fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$). 50 μ l'de, sadece Clearfil SE Bond primerden anlamlı derecede daha az kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentinde artışa neden olmuştur ($p < 0,05$). 100 μ l'de, i-Bond, Clearfil SE Bond bağlayıcı ve SL Bond'dan daha fazla kuyruk uzunluğuna neden olurken, Clearfil Protect Bond primerden ise anlamlı derecede daha az etki göstermiştir ($p < 0,05$). Kuyruk yoğunluğu i-Bond ve SL Bond'dan fazla iken, Clearfil Protect Bond primerden belirgin olarak azdır ($p < 0,05$). Kuyruk momentindeki artış ise i-Bond ve SL Bond'dan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ($p < 0,05$).

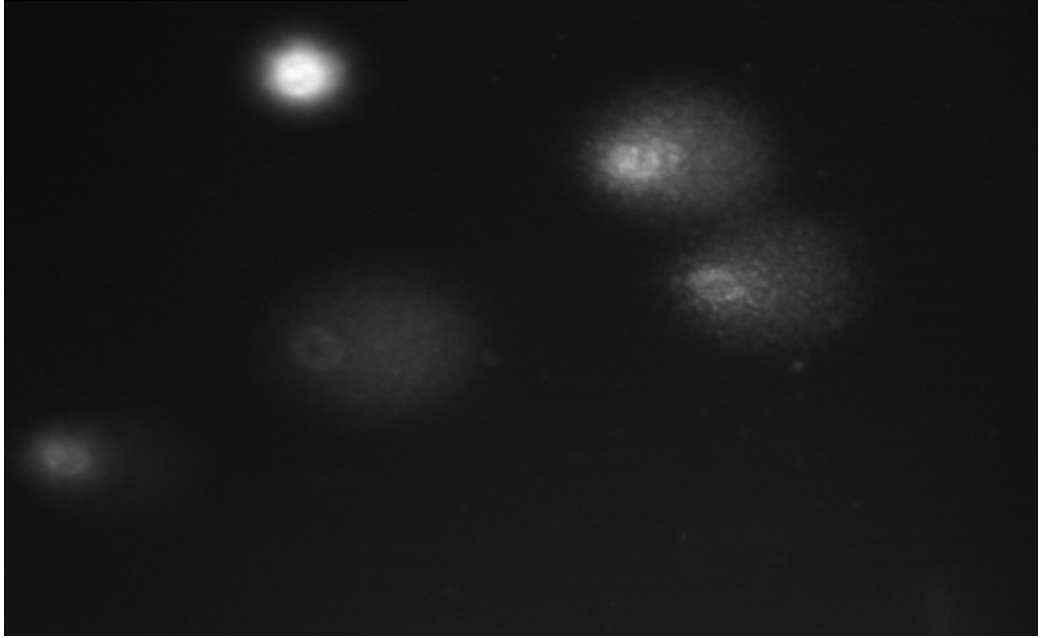
Çalışmada, comet deneyinde elde edilen hücre görüntüleri hasarsız, orta hasarlı ve çok hasarlı olacak şekilde Şekil 1-3'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Hasar Oluşmamış Hücre Görüntüsü (negatif kontrol grubu, PBS)



Şekil 2. Orta Hasarlı Hücre Görüntüsü (Clearfil SE Bond primer, 50µl'lik konsantrasyonda)



Şekil 3. Çok Hasarlı Hücre Görüntüsü (Clearfil Protect Bond bağlayıcı, 100µl'lik konsantrasyonda)

5. TARTIŞMA

Çürük ile periodontal hastalığın esas nedeni olan, diş ile onarım maddesi yüzeyi üzerine yapışan, polisakkarit matriks, ağız bakterileri ve onların metabolik ürünlerinden oluşan diş biyofilm tabakası ve bunun yanı sıra onarım maddesi altında bırakılan ya da dolgu maddesi ile diş aralığındaki mikro boşluklardan sızan bakteriler, sekonder çürük oluşumuna yol açtığı gibi pulpaya da zarar verebilir. Başarılı bir tedavi ve ağız sağlığı için kavitede kalan ve invaziv bakterilerin zararlı etkilerinden korunmak önemlidir. Bu yüzden diş onarım maddelerinin antimikrobiyal etkinliğinin olması onlardan beklenen önemli bir özelliktir ^{15,67}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kompozit reçinelerde diğer dolgu maddelerine oranla daha fazla biyofilm birikimi ya da bakteri bağlanması olduğunu göstermiştir ⁶⁸.

Svanberg ve arkadaşları ⁶⁹, II.sınıf amalgam, kompozit ve cam iyonmer siman onarımların kenarlarındaki biyofilm içindeki mutans streptokoklarının seviyelerini, en yüksek olarak sırasıyla kompozit (ortalama 13.7), sonra amalgam (ortalama 4.3) ve cam iyonmer simanda (ortalama 1.1) tespit etmişlerdir.

Kompozitlerin temel bileşenleri olan Bis-GMA, TEGDMA ya da sıklıkla kullanılan UDMA'nın ağız bakterilerine karşı çok az bakteriyostatik/bakterisid etki gösterdiği ya da hiç etki göstermediği bildirilmiştir ⁷⁰.

Kawai ve arkadaşları ⁷¹, kompozit reçine elüsyon ürünlerinin ve bazı reçine monomerlerinin *Streptococcus sobrinus*'un büyümesini hızlandırdığını ayrıca, dimetakrilat monomerlerden Bis-GMA, TEGDMA ve UDMA'nın streptokok türlerinin büyümesini stimüle ettiğini bildirmiştir.

Kompozit ve içeriklerinin antimikrobiyal etkileriyle ilgili 1977'den beri, pek çok çalışma yapılmaktadır ⁷². Son yıllarda reçine komponentleri geliştirmek için yapılan önemli bir girişim de, reçine matriks içine antimikrobiyal komponentin sabitlenmesidir. Bu amaçla salım yapmayan, antimikrobiyal özellikte yeni bir monomer olan 12-methacryloyloxydodecyl-pyridinium bromide (MDPB), dörtlü amonyum ve methacryloyl grubun birleştirilmesi ile elde edilip kompozit reçine içine katılmıştır ^{73,74}. Kompozite ışık uygulanmasıyla, MDPB diğer monomerlerle birlikte kopolimerize olmakta ve antimikrobiyal etken polimer bağa kovalent olarak bağlanmaktadır.

MDPB içeren kompozitlerin etkisi antimikrobiyal etken salımı yapan maddeler kadar yoğun değildir ⁷⁰. Ebi ve arkadaşları ⁷⁵ hızlı renk

değişiminin MDPB içerikli kompozitlerde değerlendirilmesi gereken önemli bir olumsuzluk olduğunu bildirmişlerdir.

Kompozitlerde antimikrobiyal etki sağlamada karşılaşılan bu tür problemler ile minimal invaziv diş hekimliğinde diş dokusunun az miktarda uzaklaştırılmasıyla kavite içinde bakteri kalma ihtimali olması ve preperasyon sonrası kavite içindeki bakterilerin tam olarak belirlenmesi zor olduğundan ideal bir tedavi elde etmek zorlaşmaktadır ⁵.

Tobias ve arkadaşları ⁷⁶, in vivo olarak kavitelerde görülen pulpa yangısının tam olarak kaide ve dolgu maddesinin kimyasal irritasyon etkisinden değil, kavite duvarı ile dolgu maddesi arasındaki mikrosızıntının bir sonucu olarak oluştuğu ve dolgu maddesinin antimikrobiyal özelliğinin mikrobiyal sızıntı derecesini de etkilediğini vurgulamışlardır.

Bu problemler, dolgunun yerleştirilmesi esnasında kavitede kalan bakterileri etkisiz hale getirebilecek, antimikrobiyal özellikte dentin bağlayıcı sistemler üzerine çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu yüzden bu çalışmada antimikrobiyal etkisi olduğu ileri sürülen kendinden asitli bağlayıcı sistem (Clearfil Protect Bond) ile farklı özelliklerdeki sistemlerin (Clearfil SE Bond, SL Bond, i-Bond), çürük ile yakın ilişkili olan ağız bakterilerine (*L.casei*, *C.albicans*, *S.mutans*) karşı antimikrobiyal etkisi agar disk difüzyon testi ve seri mikrodilüsyon testi olmak üzere iki farklı deney üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Sundqvist ve arkadaşları ⁷⁷, ağız boşluğu içinde 500'den fazla sayıda bakteri grubu yer aldığını fakat bu türlerin çok azının çürük ya da pulpa iltihabıyla ilişkili olduğunu bildirmiştir. *S.mutans* ve laktobasiller en temel diş patojeni olarak kabul edilmesine rağmen daha pek çok bakteri türü de çürük lezyonlarıyla ilişkilendirilmiştir ^{46,78}.

C.albicans ile kuron ve kök çürüğü arasındaki ilişki pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir ^{54,58,59,79,80,81,82,83}.

Pienihakkinen ve arkadaşları ⁸⁰ çürük artışı ve kandida ilişkisini, Russell ve arkadaşları ⁵⁸ yetişkinlerde çürük artışı ile kandida, laktobasil ve *S.mutans* ilişkisini, Coulter ve arkadaşları ⁵⁹ çocuklardaki çürük ile kandida ve laktobasil ilişkisini yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir.

Nikawa ve arkadaşları ⁸⁴, *C.albicans*'ın hidroksiapatit yapıya elektrostatik etkileşimle yapıştığı, çok düşük bir sayıda ($1,0/7,4 \times 10^5$), *C.albicans*'ın hidroksiapatit yapıyı *S.mutans*'a oranla çok daha fazla (yaklaşık 20 kat) çözebildiğini tespit etmişlerdir.

Morinushi ve arkadaşları ⁴⁷, dolgu ile tedaviyi takiben 6 ay süreyle, yeme alışkanlıkları ve diş fırçalama alışkanlıkları dikkatlice düzenlendiğinde, tükürükte bulunan laktobasil ve streptokokların etkisini değerlendirmişlerdir. Tedaviden sadece 1 hafta sonra mutans streptokoklar, laktobasil ve asiditede azalma görülmüştür. Laktobasil tedaviye en fazla direnen bakteri olarak tespit edilmiştir.

Cabezas ve arkadaşları ⁴⁸, *S.mutans*, *L.casei* ve *A.naeslundii* genotip2'nin amalgam onarım altında oluşan sekonder çürüklerde fazla oranda bulunduğunu ve bu çürüklerin oluşmasında önemli bir role sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, diş çürüğüyle yakın ilişkisi olan ve yukarıda konusu geçen araştırmalarda yeralan mikroorganizmalardan; *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal özellikleri agar disk difüzyon testi ve seri mikrodilüsyon testi ile değerlendirilmiştir.

Tobias ¹⁶, agar disk difüzyon testinin diş dolgu maddelerinin antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmede en sık kullanılan yöntem olduğunu, agar disk difüzyon testini etkileyen değişkenler dikkatli bir şekilde kontrol edildiğinde tutarlı ve tekrar edilebilir sonuçlar elde etmenin mümkün olduğunu belirtmiştir.

Fraga ve arkadaşları ⁸⁵, agar disk difüzyon testinin farklı ekim büyüklüklerini ve besiyeri manipülasyonundaki farklılıkları elimine etmesi ve maddeler arasında etkili bir karşılaştırma yapmaya olanak sağlaması gibi önemli avantajları olduğunu belirtmiştir.

Agar disk difüzyon testinin bu çalışmada uygulanma nedeni, Başeren ve arkadaşlarının ⁸⁶ da belirttiği gibi, bu yöntemin dentin bağlayıcılar gibi çözünebilir maddelerin testine imkan tanıyan bir yöntem olmasıdır.

Palenik ve arkadaşları ⁸⁷, agar disk difüzyon testinin diğer yöntemlere göre daha ucuz ve fazla sayıda örnekle tekrarlanabilir olmasına rağmen iki belirgin dezavantajı olduğunu öne sürmüşlerdir.

1) İnhibitör zonun büyüklüğü; mikroorganizma duyarlılığı, etkenin çözünebilirliği ve etken maddenin yerleştirmeyi takiben ilk birkaç saat içindeki salınan madde miktarıyla ilişkilidir. Florid, klorheksidin, gluteralehit ve hatta asit gibi diş dolgu maddelerinin içinde yer alan antimikrobiyal etkenler agar içinde sınırlı bir çözünürlüğe sahiptir ve yalnızca bakteriyostatik etkili olacak oranlarda salınabilmektedir.

2) İn vitro ve in vivo antimikrobiyal etkinlik arasında kesin bir ilişki kurulamamaktadır. Agar disk difüzyon testinin en yaygın kullanımının, yeni maddeleri incelemek ya da çok farklı maddelerle karşılaştırabilmek olduğu belirtilmiştir.

Bu dezavantajlar göz önüne alınarak, bu çalışmada, her bir bağlayıcı sistemin MİK ve MBK değerleri yapılan seri mikrodilüsyon testleri ile de tespit edilmiştir.

Imazato ve arkadaşları⁸⁸ yaptıkları çalışmada, maddelerin agar disk difüzyon testi sonucu ile elde edilen etkinliklerini, MİK/MBK ölçümü ile elde edilenlerden biraz farklı bulmuştur. Benzer sonuç çalışmamız için de geçerlidir. SL Bond, *L.casei* için agar disk difüzyon testinde en geniş inhibisyon zon çapını oluştururken, MİK/MBK ölçümü *L.casei* için *C.albicans*'la karşılaştırıldığında daha yüksek değerde bulunmuştur. Aynı şekilde Clearfil Protect Bond primer, *C.albicans* ve *S.mutans* için aynı değerde düşük MBK değerine sahipken, agar disk difüzyon testinde *S.mutans* için daha geniş inhibisyon zonu oluşturmuştur. Clearfil SE Bond bağlayıcı, *L.casei* için agar disk difüzyon testinde etkisiz bulunurken, MİK/MBK ölçümünde düşük değerde etki göstermiştir.

Test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemler agar disk difüzyon testinde *C.albicans* için zayıf inhibisyon oluştururken, MİK/MBK ölçümlerinde ise Clearfil Protect Bond Primer, SL Bond, i-Bond ve Clearfil SE Bond primerin güçlü bakterisid/fungusid etki gösterebildiği bulgulanmıştır. Bu farklılığın nedeninin, dentin bağlayıcı sistemlerin, agar içindeki difüzyon kapasitelerini etkileyen farklı molekül büyüklükleri ve elektrik yükleri olduğu düşünülmektedir.

Bununla beraber çalışmada, bazı maddeler için agar disk difüzyon testi ile MİK/MBK ölçümleri paralel sonuçlar göstermiştir. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, agar disk difüzyon testinde her 3 bakteri için etkisiz bulunurken, MİK/MBK değerlerinde de maddeler içinde en yüksek değere sahip olan bağlayıcıdır. Clearfil SE Bond bağlayıcı, agar disk difüzyon testinde yalnızca *S.mutans* için çok zayıf bir inhibisyon oluşturmuş, MİK/MBK ölçümlerinde de *C.albicans* ve *S.mutans* için çok yüksek değerler göstermiştir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen seri mikrodilüsyon testine göre, antimikrobiyal monomer MDPB içeren Clearfil Protect Bond primer, *L.casei* için diğer bağlayıcılardan çok daha düşük MİK/MBK değeri (15,6 µg/mL) göstermiştir. Çalışmamız bulgularına benzer şekilde, Imazato ve arkadaşları⁸⁹, %5 MDPB katılmış deneysel bir primer ile 3 farklı primerin (LB Primer, Scotchbond Multi Purpose primer, Bondwell LC primer), laktobasillerin fakültatif anaerob türlerine karşı antibakteriyel etkilerini ve MİK/MBK değerlerini belirledikleri çalışmalarında; MDPB içerikli primerin

en etkili bakterisid olduğunu ve 40 kez dilüe ettiklerinde bile etkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca MİK ve MBK ölçümlerine göre, MDPB'nin tüm laktobasil türlerini 7,8–15,6 µg/mL'lik konsantrasyonda öldürdüğünü bildirmişlerdir. Bu değer çalışmamızda *L.casei* için bulunan MİK/MBK değeri ile aynıdır.

Imazato ve arkadaşları⁹⁰, MDPB'nin ağız streptokokları üzerine olan minimal bakterisid konsantrasyonu (MBK) ile zamana bağlı öldürme kinetiği üzerine yaptıkları araştırmada, polimerize edilmemiş MDPB'nin yedi farklı Streptokok türüne karşı MBK değerini 31,3–62,5 µg/mL olarak tespit etmiş ve bakterisid etkili olduğunu bildirmişlerdir. Zaman-ölüm oranı çalışmaları, MDPB'nin hızlı bakterisid etkisini göstermiştir. Bu araştırmada ise zamana bağlı öldürme kinetiği değerlendirmesi yapılmamakla birlikte, seri mikrodilüsyon testinde MDPB içeren Clearfil Protect Bond primerin, bağlayıcı sistemler içinde ve pozitif kontrol olan klorheksidine oranla çok daha düşük MBK değeri ile güçlü bakterisid etkide olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada *S.mutans* için primerin MBK değeri 7,8 µg/mL olarak tespit edilirken, Imazato ve arkadaşları 31,3–62,5 µg/mL olarak tespit etmiştir. Bu değer çalışmamızdaki pozitif kontrol klorheksidin ile benzer MBK değeridir. Bu farklılık, diğer streptokok türlerinin, Clearfil Protect Bond primere olan duyarlılıklarının değişkenlik göstermesinden kaynaklanabilir.

Imazato ve arkadaşları⁸⁸, agar disk difüzyon testi ve MİK/MBK ölçümleri ile beş farklı kendinden asitli, tek basamaklı sistem (Prime&Bond NT, Syntac SC, Hytac OSB, Xeno Bond, One-up Bond F), 3 farklı priming/bonding sistem (Single Bond, One Step, Optibond Solo), 2 adet iki aşamalı kendinden asitli sistemin (SE Bond primer, Unifil Bond Primer) *S.mutans*, *L.casei* ve *A.viscosus*'a karşı antibakteriyel etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucuna göre kendinden asitli sistemlerden Clearfil SE Bond primer, *S.mutans* ve *A.viscosus*'a karşı zayıf inhibisyon göstermiş, *L.casei*'ye karşı etkisiz bulunmuştur. Çalışmamızda da benzer şekilde, Clearfil SE Bond primer, *S.mutans*'a karşı zayıf inhibisyon gösterirken, *L.casei*'ye karşı etkisiz bulunmuştur.

Çalışmada, Imazato ve arkadaşlarının⁹¹ da belirttiği gibi antimikrobiyal bir monomer olan MDPB'nin primer içine yerleştirilmesinin etkili bir antimikrobiyal primer elde etmek için geçerli bir yöntem olduğu, MDPB içerikli primerin, hem agar disk difüzyon testi ve hem de MİK/MBK ölçüm sonuçlarına göre güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulgulanmıştır. Yeni geliştirilen bu bağlayıcı sistemin antimikrobiyal mekanizması; MDPB monomer içinde yer alan pozitif yüklü, pyridinium grubunun, negatif yüklü, bakteri membranları ile buluşma noktası oluşturup, bu alanda elektrik dengelerini kaybedip, hücre zarının parçalanmasıyla bakterilerin öldüğü (bakteriyolizis) şeklinde açıklanmaktadır^{5,70,89,90,98,102}.

Kendinden asitli primerlerin bu çalışmadaki MİK/MBK ölçümlerine göre, aside dirençli bakteri türü olan *L.casei* için, Clearfil SE Bond primer yüksek konsantrasyonda (0,5 µg/mL) etkili iken, antimikrobiyal monomer içeren Clearfil Protect Bond primer ise çok düşük konsantrasyonda (0,0156 µg/mL) etkili bulunmuştur. Bu farklılığın primerlerin asiditelerinden kaynaklanmayıp antimikrobiyal monomer ilavesinden ileri geldiği kanısındayız. Bu bulgular, Imazato ve arkadaşları⁸⁹ tarafından, mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan MİK/MBK ölçümleri sonucu, DBS'lerin antimikrobiyal etkinliklerinin, içerdikleri komponentlerin asiditeleri ile ilişkili olmadığını gösteren sonuçlarıyla paraleldir.

Kendinden asitli primerlerin asiditesi dentinle temasa geçtiğinde tamponlanıp, dentin sıvısı ile dilüe olmasının da antibakteriyel etkisini azalttığı bildirilmiştir^{5,88}.

Itou ve arkadaşları⁹², primerin pH'sının dentin yüzeyiyle temasa geçtiğinde arttığını, primer solüsyonun lezyonun derin bölgelerine ulaştıkça dilüe olduklarını ve antibakteriyel etkisinin zayıfladığını böylece uygulanan primerin planktonik hücrelere olan etkisinin beklenenden çok daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden, başarılı bir onarım için, içinde antibakteriyel özellik barındıran kendinden asitli primer kullanmanın faydalı olacağı öne sürülmüştür.

Marsh ve arkadaşları⁴³ yaptıkları çalışmada, bağlayıcı sistemlerden; Fluoro Bond, Liner Bond 2 ve Takuso Mac Bond'un kendinden asitli primerlerinin, *S.mutans* ve *L.casei*'ye karşı antimikrobiyal etkisini agar disk difüzyon testi ile değerlendirmişler ve antibakteriyel etkinin sadece *S.mutans* için geçerli olduğunu, *L.casei*'nin ise aside dirençli bir bakteri olduğundan, maddelerin *L.casei*'ye karşı etkisiz kaldıklarını göstermişlerdir.

Emilson⁹³, Imazato⁹⁴, Meiers⁹⁵ ve arkadaşları, DBS'lerin düşük pH'da antibakteriyel etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Primer ve bağlayıcıların içerdiği monomerler, molekülün bir ucunda hidrofilik bir grup içerirler ve genelde hidrojen fosfat ya da karboksilat gibi asit yapıdadırlar. Bu yüzden, adezyonu kolaylaştıran bu monomerleri içeren DBS'lerin içerikleri daha fazla ya da daha az asidik özelliktedir.

Bu çalışma sonuçlarına göre, antimikrobiyal monomer içermeyen, kendinden asitli sistem olan Clearfil SE Bond primer ve bağlayıcı kısmı, agar disk difüzyon testinde *S.mutans*'a karşı zayıf bir inhibisyon oluştururken, *L.casei* ve *C.albicans*'a karşı ise etkisiz bulunmuştur. Benzer olarak Imazato ve arkadaşları⁹¹ yaptıkları çalışmalarda, bazı kendinden asitli primerlerin, kavite test modeli ya da süspansiyon içinde incelediğinde, *S.mutans*ları öldürebildiğini bulmuşlardır. Bu etki, kendinden asitli primerlerin pH'sı 3'ün altında olan,

asidik monomerleri fazla oranda içermeleriyle ilişkilendirilmiştir. Ancak düşük pH'a sahip bu bağlayıcıların bakterisid aktiviteleri, laktobasil gibi aside toleranslı bakteriler karşısında etkisiz kalmaktadır.

Imazato ve arkadaşları⁹¹, in vitro bakterisid etkisi olduğu bildirilen MDPB içerikli primerin hayvan testleriyle in vivo antimikrobiyal etkisini araştırdıkları çalışmada, enfekte dentin kavitesini simüle eden bir model kullanarak, primerin etkinliğini bakteri canlılığı testi ve histopatolojik inceleme ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, bakteri canlılığı testinde, kavite içine % 5 MDPB içeren primer uygulamasının, klorheksidin içeren dezenfektan solüsyonlara benzer olarak bakterileri öldürmede etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte kontrol olarak kullanılan kendinden asitli primer olan LB primerin (Kuraray) hafif fakat belirgin olmayan bir oranda bakteri sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, kendinden asitli primer olan Clearfil SE Bond primer, *S.mutans* üzerinde hafif bir inhibisyon oluştururken, diğer bakteriler üzerinde etkisiz bulunmuştur. Imazato ve arkadaşları⁹¹, LB primer de dâhil, 1,3 oranda pH'a sahip kendinden asitli primerlerin asiditelerine bağlı olarak antimikrobiyal etki gösterdiklerini, fakat bu etkilerinin dentin kavitesi içindeki bakterileri etkisiz hale getirmek için yeterli şiddette olmadığını bildirmişlerdir.

Bu araştırmada test edilen bağlayıcı sistemlerin, *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans* türleri üzerinde, agar disk difüzyon testinde oluşturdukları inhibisyon zon çapı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Emilson ve arkadaşlarının⁹³ yaptıkları çalışmada da paralel sonuçlar görülmektedir. Araştırmacılar 7 farklı dentin bağlayıcı sistemin; Denthesive (Heraeus, Kulzer), Gluma bağlayıcı sistem (Bayer Dental), Prisma Universal Bond (LD Caulk, Dentsply), Scotchbond 2 (3M Dental), Superlux Universal (DMG), Tripton (ICI Dental), XR-Bağlayıcı sistem (Kerr, Sybron) ve pozitif kontrol olarak % 0,2 klorheksidininin, farklı mikroorganizma türlerine; *S.mutans* (IB1600), *S.sobrinus* (B13), *L.casei* (AB1), *S.sanguis* (ATCC10556), *Actinomyces viscosus*'a (LY7) olan antibakteriyel etkinliklerini in vitro olarak agar disk difüzyon metodu ile değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında kullanılan bağlayıcı sistemlerden sadece Gluma, Denthesive ve Scotchbond 2, *S.mutans*, *S.sanguis* ve *A.viscosus*'a karşı zayıf inhibisyon oluştururken, *L.casei* en dirençli bakteri olarak tespit edilmiştir. Elde edilen zayıf antibakteriyel etkinin, asidik özellikteki Scotchbond 2 primerin % 2,5 maleik asit içeriği, Denthesive ve Gluma sisteminin de EDTA içeriğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda da Clearfil SE Bond primer, *S.mutans* üzerinde hafif düzeyde etkili olmuştur. *L.casei*'ye karşı etkisiz olmasının nedeninin, bu bakterinin asidojenik ve asitürik özelliğinden kaynaklandığı kanısındayız.

Çehreli ve arkadaşları ⁷⁸ da, kendinden asitli, iki aşamalı sistemlerin bağlayıcılarının, *S.mutans* için farklı derecelerde, zayıf antimikrobiyal etki gösterdiğini fakat aside dirençli laktobasil türüne karşı etkisiz olduklarını bildirmiştir. Bu bulgular, çalışmamızda Clearfil SE Bond için elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Başeren ve arkadaşları ⁸⁶, yaptıkları çalışmada farklı özelliklerdeki dentin bağlayıcı sistemlerin; Optibond FL Primer, Single Bond, Clearfil SE Bond ve Prompt-L Pop ile % 1'lik klorheksidin cıvanın, *S.mutans*, *S.salivarius*, *L.casei* ve *L.acidophilus*'a karşı antimikrobiyal etkilerini agar disk difüzyon testi ile tespit etmişlerdir. Kendinden asitli sistem Clearfil SE Bond primer, tüm bakteri türleri için inhibitör etki göstermekle beraber *S.salivarius* ve *L.acidophilus* için diğer bağlayıcılara göre en geniş inhibisyon zonunu oluşturmuştur. Çalışmamızda ise aynı primer sadece *S.mutans* için antimikrobiyal etki göstermiş ve *L.casei* için etkisiz bulunmuştur. Araştırmacılar *L.casei* için elde edilen bu etkinin maddenin düşük pH'sı ve içerdiği 10-MDP'den kaynaklandığını öne sürmektedir. Oysa 10-MDP'nin antimikrobiyal etki mekanizması açık değildir. *L.casei* aside dirençli bir mikroorganizmadır. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın, agar jelin viskozitesine bağlı olarak test maddesinin difüzyon kapasitesi, ekilme yoğunluğundan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca test mikroorganizmalarının hızlı ya da yavaş üremelerine imkan tanıyan besiyeri, agar plakta oluşan inhibisyon zon büyüklüğünü de etkilemektedir.

Imazato ve arkadaşları ⁹⁴ yaptıkları çalışmada, 3 farklı kendinden asitli primerin; FB Primer (Fluoro Bond), LB Primer (Liner Bond 2) ve MB dentin hazırlayıcının (Tokuso Mac Bond), *S.mutans*, *L.casei* ve *A.viscosus*'a karşı antibakteriyel etkilerini agar disk difüzyon testi ile incelemiştir. Steril kağıt disklerle emdirilen 20 mikrolitre primerlerin 48 saat sonra oluşturduğu inhibisyon zon çapları tespit edilmiştir. Sonuçlarda; her 3 primer de 1×10^4 CFU içeren *S.mutans*'ı 30 saniyelik temas içinde tamamen öldürmüştür. *L.casei*'ye karşı ise hiçbir primerde inhibisyon zonu görülmemiştir. Bu çalışmada da kendinden asitli sistem,(Clearfil SE Bond), *L.casei*'ye karşı etkisiz bulunmuştur, ancak MDPB içeren, kendinden asitli primer sistem (Clearfil Protect Bond) *L.casei*'yi inhibe edebilmiştir.

Herrera ve arkadaşları ⁹⁶, dentin bağlayıcı sistemler; Gluma 2000, Syntac, Prisma Universal Bond 3, Scotchbond Multi Purpose ve Prime&Bond 2.0 ile klorheksidinin, çürük dentinden izole edilen bakteri türlerine karşı antibakteriyel etkilerini agar disk difüzyon testi ile incelemiştir. Klorheksidin tüm gruplar arasında belirgin bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bağlayıcılar arasında en fazla, kendinden asitli sistem olan Scotchbond Multi Purpose primer antimikrobiyal etki göstermiştir. Bağlayıcı ise daha düşük etkili bulunmuştur. Bu çalışmada da benzer olarak kendinden asitli primer sistem (Clearfil SE Bond primer),

S.mutans'a karşı etkili bulunurken bağlayıcının (Clearfil SE Bond bağlayıcı) etkisi çok düşük değerdedir.

Schmalz ve arkadaşları ⁹⁷, *S.mutans*, *S.sobrinus* ve *L.acidophilus*'a karşı, Prime&Bond NT, florid içermeyen Prime&Bond NT, Gluma Comfort Bond, ABF ve Xeno CF II ile %2'lik klorheksidinin antibakteriyel etkilerini agar disk difüzyon testi ile incelemişlerdir. Sonuçta sadece asidik özellikteki ABF Primer her üç bakterinin büyümesini inhibe etmiştir. ABF primer 1,5'in altında pH'a sahip asidik bir sistem iken, tüm bakteri türlerine karşı görülen antimikrobiyal etkisinin içine katılan antimikrobiyal özellikte bir monomer olan MDPB'den kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada da aynı özellikteki Clearfil Protect Bond primer benzer olarak *S.mutans* ve *L.casei* için güçlü bakterisid etkili bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda, antimikrobiyal monomer, MDPB ilavesinin ışık uygulama öncesi ve sonrası antimikrobiyal aktivite gösterebilen bir dentin primer elde etmek için etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir ^{15,67,73,90,93,98,99}. MDPB içeren reçine esaslı maddenin ışık uygulandıktan sonra yüzeyindeki bakteri büyümesini inhibe edebilecek özellikte olduğu bildirilmekle beraber bu etkinin bakteriyostatik olduğu öne sürülmüştür ^{15,73,99}. Yüksek bakterisid etkiye sahip maddelerin sitotoksiteleri de güçlü olduğundan, MDPB'nin polimerize edilmeden önceki sitotoksik ve genotoksik etkisinin değerlendirilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır ^{15,93,73,90,99}. Bu nedenle, yapılan bu çalışmada bakterisid etkili olduğu öne sürülen dentin bağlayıcı sistem ile diğer dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal özellikleri ve genotoksik potansiyelleri polimerize edilmeden değerlendirilmiştir.

Imazato ve arkadaşları ⁶⁷, %1, 2 ve 5 oranında MDPB kattıkları deneysel primer ile LB primer (Kuraray), Scotchbond Multi Purpose primer ve Trypton dentin primerin polimerize edilmeden önce, *S.mutans*, *L.casei* ve *A.viscosus*'a karşı antibakteriyel etkilerini, agar disk difüzyon testi ile değerlendirdikleri çalışmada, MDPB içeren deneysel primerin her üç bakteri türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi diğerlerinden yüksek bulunmuştur. Antibakteriyel aktivitenin, katılan MDPB miktarı arttıkça fazlalaştığı bildirilmiştir. Bu araştırmada *A.viscosus* yer almamakla beraber, araştırmacıların diğer iki bakteri, *S.mutans* ve *L.casei*, için bulguları çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

% 1–2 klorheksidin solüsyonları kavite dezenfeksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da antimikrobiyal etkisi bilinen, %2 klorheksidin solüsyonu pozitif kontrol grubu olarak kullanılmış, agar disk difüzyon testi sonuçları ve MİK/MBK ölçümlerine göre test edilen üç bakteri türüne karşı güçlü bakterisid etkili bulunmuştur.

Imazato ve arkadaşları⁸⁸, % 1 klorheksidin içeren deneysel bir primer ile piyasada mevcut olan bağlayıcı sistemleri antimikrobiyal etkinlik açısından karşılaştırmışlardır. Hem agar disk difüzyon testi hem de MİK/MBK ölçümlerinde hiçbir bağlayıcı sistem deneysel primerle karşılaştırılabilecek bir antimikrobiyal özellikte bulunmamıştır. Bu yüzden, kavite dezenfektanlarının kullanımının, kavite içinde kalan bakterilerin olası zararlı etkilerini elimine etmede faydalı olabileceği düşünülmüş, fakat yapılan çalışmalar kavite dezenfektanlarının bağlayıcı sistemlerin bağlanma yeteneğini azalttığını göstermiştir^{100,101}.

Imazato ve arkadaşları¹⁰², %5 oranında MDPB ve asidik adezyon artırıcı monomer olan MDP içeren Clearfil Protect Bond ve % 1 cetylpyridinium chloride içeren primerin, *S.mutans*, *L.casei* ve *A.naeslundii*'ye karşı antimikrobiyal etkilerini agar disk difüzyon testi ile tespit etmişlerdir. Her bir primerin bu 3 adet bakteri türü için, minimal inhibitör/bakterisid konsantrasyonları seri mikrodilüsyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Her 3 bakteri türü için, Clearfil Protect Bond primer ile tespit edilen inhibisyon zon çapları diğer primerlerden belirgin olarak büyük bulunmuştur ($p < 0,05$). Clearfil Protect Bond primerin MİK/MBK değerleri, cetylpyridinium chloride içeren primerle karşılaştırılabilecek değerlerde bulunurken çalışmamızda da her üç bakteri türü için maddeler arasında en düşük MİK/MBK değerini Clearfil Protect Bond primer göstermiş, ayrıca *C.albicans* ve *S.mutans* için klorheksidinden daha fazla fungusid/bakterisid etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonuçlarına göre, tek şişe sistem, SL Bond her üç mikroorganizma türü için inhibisyon oluştururken en fazla antimikrobiyal etkiyi *L.casei* için göstermiştir. Schmalz ve arkadaşlarının⁹⁷, yaptıkları bir çalışmada tek şişe sistem, Prime&Bond NT (florid içeren) *S.sobrinus*'a karşı kontrole oranla % 40 oranında antimikrobiyal etki gösterirken, florid içermeyen aynı madde herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. Bu farklılığın tek şişe sistemlerin içerdiği farklı komponentlerden ve bakterilerin bu komponentlerin antimikrobiyal etkilerine karşı gösterdikleri duyarlılığın değişken olmasından kaynaklandığı kanısındayız.

Imazato ve arkadaşları⁸⁸, tek şişe sistemlerden Single Bond'un, (SI Bond), *S.mutans* ve *L.casei*'ye karşı inhibisyon oluşturduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da tek şişe sistem SL Bond *S.mutans* ve *L.casei*'ye karşı antimikrobiyal etki göstermiş, özellikle *L.casei* için çok geniş inhibisyon zonu oluşturmuştur. SL Bond, asitli sistemlerin tersine asit solüsyonla dağlama ve su ile yıkama sonrası kaviteye uygulanan bir tek şişe sistemdir. Asidik özellikte olmayan bu sistemlerin geniş inhibisyon zonu oluşturmaları, antimikrobiyal etkide asiditenin rol oynamadığını göstermektedir. SI ve SL Bond'un *L.casei*'ye karşı oluşturduğu inhibisyondan sorumlu içeriği tam olarak netleştirmek zor olmakla beraber, monomer ya da katalizörlerin bakteriyostatik ya da

bakterisid olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmadaki tek şişe sistem, SL Bond'un *L.casei* için daha fazla inhibisyon göstermesinin, bağlayıcı sistemin daha yüksek oranda diffüz olabilen antimikrobiyal komponent içermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Başeren ve arkadaşları⁸⁶, yaptıkları çalışmada, tek şişe sistem olan Single Bond'u, *S.mutans* ve *L.casei*'ye karşı etkisiz bulmuştur. Bunun nedeninin bağlayıcı sistemin içeriğinden ya da düşük asidik özellikte olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Fakat bu çalışmada düşük asidik özellikteki, tek şişe sistem, SL Bond, *S.mutans* ve *L.casei* üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın bağlayıcı sistemlerin içeriğindeki farklı maddelerin gösterdiği antimikrobiyal aktivitelerinden kaynaklanabileceği, asiditenin etkili olmadığı kanısındayız.

Bu çalışmada test edilen 7.kuşak, tek şişe dentin bağlayıcı sistem olan i-Bond, agar disk difüzyon testine göre her üç mikroorganizma üzerine çok zayıf bir inhibisyon oluşturmuştur. Çalışmada mikrodilüsyon testinde ise *S.mutans* için bakterisid ve *C.albicans* için fungusid etkili (MİK/MBK=0,0625 µg/mL) iken *L.casei* için yüksek MİK/MBK değeri ile etkili değildir (MİK/MBK= 0,125 µg/mL). Benzer sonuçlar Schmalz ve arkadaşlarının⁹⁷ Xeno CF II ile yaptıkları çalışmada da elde edilmiş, bizim çalışmamızda olduğu gibi streptokok türü için antimikrobiyal etki gösterirken, aside dirençli laktobasil türüne karşı etkisiz bulunmuştur. Bunun nedeninin sistemin, orta derecede asidik özellikte, kendinden asitli bir sistem oluşu ve içerdiği farklı komponentlerin gösterebileceği antimikrobiyal etkilerden kaynaklandığı kanısındayız. Total asitleme ve total bağlanma tekniklerinin tersine dentin tübüllerini tam olarak açmayan bu sistemde smear tabakası eritilip, i-Bond'un hidrofilik özelliklerine dayanarak tübüllerin ve peritübüler dentinin içine penetrasyon ve reçine uzantısı oluşumu sağlandığı bildirilmiştir. i-Bond'un mine olgularında arttırdığı yüzey alanıyla gelişmiş mine bağlantısı sağlandığı bildirilmekle beraber, antimikrobiyal özellik beklentisi yüksek olan klinik olgularda, bu sistemin zayıf antimikrobiyal etkinliğinin göz ardı edilmemesi gerektiğini vurgulamak isteriz.

Bu çalışmada dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal etkinlikleri in vitro şartlarda değerlendirilmiştir. Diş hekimliğinde kullanılan maddelerin, hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilen in vivo testleri biyolojik risklerinin değerlendirilmesinde önemli rol oynamakla beraber, yeni geliştirilen maddelerin farklı biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde, gerekmedikçe in vivo deneylerden kaçınarak, hızlı sonuçlar verebilen, maliyeti düşük, planlı in vitro test yöntemlerinin seçilmesi gerektiği bildirilmiştir¹. Ayrıca maddenin ilk olarak laboratuvar test edilmeden in vivo koşullarda denenmesi hem zaman alıcıdır hem de etik değildir¹⁷. Diş onarım maddelerinin basitten karmaşığa, in vitrodan

hayvan deneylerine, preklinikten insanlardaki klinik çalışmalara doğru test edilmesi gerektiği ileri sürülmektedir³⁴.

Çalışmada yapılan birinci deneyin sonucunda elde edilen agar disk difüzyon testi verileri ve MİK/MBK değerlerine göre test edilen *L.casei* ve *S.mutans*'a karşı en güçlü bakteriyostatik/bakterisid etkiyi ve *C.albicans* için fungusid etkiyi, antimikrobiyal monomer MDPB ilave edilmiş Clearfil Protect Bond bağlayıcı sistemin primer kısmı göstermiştir. Başarılı bir tedavi elde etmek için doğru dolgu maddesi seçimi büyük öneme sahiptir. Bu yüzden, bu çalışma ile de güçlü antimikrobiyal etkisi kanıtlanan, kavite içinde kalan ve invaziv bakterilere karşı güçlü inhibitör etki gösterebilecek bir bağlayıcı sistemin kullanımının faydalı olabileceği görüşündeyiz.

Pulpanın çürükle ekspoz olmalarıyla enfekte olduğu düşüncesi artık değişmiştir. Zöllner ve arkadaşları¹⁰³, tedaviyi takiben vital dişlerin endodontik tedavi gerektiren belirtiler gösterdiğini bildirmiştir. Pulpa yanıtları sıklıkla onarım maddesinin sitotoksik aktivitesi ya da mikrosızıntıyla ilişkilendirilmiştir.

Spagnuolo ve arkadaşları¹⁰⁴, bağlayıcı sistemlerin halojen ya da LED ile ışık uygulandığında, hücre içinde reaktif oksijen molekülleri (ROS) yapımının uyarılarak, sitotoksik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. ROS'ların yalnızca sitotoksik etkileri değil ayrıca DNA'yı hasara uğratan genotoksik etkisinin olduğu da kanıtlanmıştır¹⁰⁵. Ayrıca dentin bağlayıcı sistemlerin en fazla sitotoksik etkiyi yerleştirildikten sonra ilk 24 saat içinde gösterdiği ve ışık uygulanmamış bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerinin polimerize edilenlerden daha fazla olduğu bildirildiğinden¹⁰⁶ ve dentin bağlayıcı sistemlerin uygulama dönemindeki genotoksik etkilerine yönelik çalışmaların çok az olması nedeniyle, bu çalışmada bağlayıcı sistemler polimerize edilmeden genotoksiteleri değerlendirilmiştir.

Araştırmada dentin bağlayıcı sistemlerin genotoksik özelliklerini değerlendirmek için seçilen "Comet Yöntemi" memeli hücrelerinde DNA kırıklarını inceleyen ve ölçen basit, hızlı ve duyarlı bir tekniktir. Comet Yöntemi tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryotik hücrede DNA hasar ve onarımını tesbit edebilir^{60,62,63,66}. Bu test yönteminin, insan ve hayvan hücrelerinde, kimyasalların yapabileceği genotoksik ve olası karsinojenik aktivitelerini tahmin etmek için kullanıldığı bildirilmiştir¹⁰⁷.

Ostling ve arkadaşları⁶⁰ tarafından bulunan ve daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilen Comet testi çok yönlü uygulanabilirliği nedeniyle sürekli gelişim göstermekte, toksikoloji, tıp, biyoloji gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Tek hücre düzeyinde DNA

zincir kırıklarının duyarlı teşhisini sağladığından tekniğe ilgi artmaktadır. Öncelikle radyasyon biyolojisinde kullanılmaya başlanmasına rağmen hem in vivo hem de in vitro genotoksisite incelemelerinde gelecekte daha da fazla kullanım göreceği öne sürülmektedir.

Hartmann ve arkadaşları ¹⁰⁸, Comet Yönteminin düşük doz etkisinde DNA hasarını tespit edebilme özelliğinden dolayı in vitro ve in vivo genotoksisite testlerinde geniş uygulama alanı bulduğunu bildirmiştir.

Tek hücre jel elektroforez yöntemi çok az sayıda hücre gerektirdiğinden, küçük hacimde insan biyopsi örneklerinde, deney hayvanlarının her hangi bir dokusunda, DNA kırılmalarının boyutlarını saptamak olasıdır. Ayrıca işlem çabuktur, birkaç saat içinde gerçekleşir ve duyarlılığı yüksektir. Oysa DNA kırılmalarını tespit eden standart alkali elüsyon tekniği gibi yöntemlerde fazla hücreye gerek vardır ve işlem uzundur ^{60,62,63,66}.

Comet Yönteminin tüm bu avantajlarını göz önüne alarak, bu çalışmada antimikrobiyal özellikleri değerlendirilen farklı dentin bağlayıcı sistemlerin genotoksisiteleri, in vitro olarak, tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet Yöntemi) ile insan lenfositlerinde, kültürde kullanılan elüsyon madde miktarıyla ilişkilendirilerek incelenmiştir.

Comet Yönteminin insan lenfositleri üzerinde yapılan testlerinde, pozitif kontrol olarak 10 ile 280 µM konsantrasyonları arasında kullanılacak olan hidrojen peroksit, DNA hasarı yapma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada da 50 µM konsantrasyonda H₂O₂ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ¹⁰⁹.

Kleinsasser ve arkadaşları ¹¹⁰, diş onarım maddelerinden tükürük içine salınan reçine monomerlerin diş pulpası, diş eti, mukoza ve tükürük bezlerine difüzyonu göz önüne alındığında bunun tümör oluşumuna potansiyel bir katkı sağlayabileceği düşüncesi ile reçine monomerlerden TEGDMA, UDMA ve HEMA'nın insan tükürük bezi dokusu lenfositlerindeki genotoksik etkisini Comet Yöntemi ile göstermişlerdir. Bu çalışmada da benzer monomerleri içeren bağlayıcıların, genotoksik potansiyelleri insan lenfositleri üzerinde değerlendirilmiştir.

Genotoksik etkinin değerlendirildiği bu çalışmada tripan mavisi ile boyama testi uygulanmıştır. Kleinsasser ve arkadaşları ¹¹¹, HEMA ve Bis-GMA'nın, insan lenfositlerinde DNA göçünde artışa neden olduklarını Comet Yöntemi ile göstermiş ve ayrıca yapılan bu çalışmada sitotoksik etkilerin kontrolü için tripan mavisi ile boyama testi yapılmıştır.

Bu test hücrenin fonksiyonuyla ilgili olarak, hücre zarı stabilitesi haricinde detaylı bir bilgi vermemesine karşın, Comet Yöntemindeki DNA migrasyonunu etkileyen olası diğer faktörleri gösteren, kabul edilir ve standart hale getirilmiş bir test olarak kabul edilmiştir.

Çalışmada, dentin bağlayıcı sistemler farklı elüsyon konsantrasyonları kullanılarak incelenmiş, aynı konsantrasyondaki bağlayıcı sistemlerin farklı genotoksik etkileri tespit edilmiştir. Prica ve arkadaşları ¹¹², beş farklı dentin bağlayıcı sistemin; Adper Single Bond, Adper Single Bond 2, Excite, Optibond Solo Plus, Prompt L-pop olası genotoksitelerini in vitro olarak insan lenfositlerinde elüsyon periyodu ve kültürde kullanılan elüsyon madde miktarıyla ilişkilendirerek incelemiştir. Tüm bağlayıcılarda genotoksik etki 24 saatlik elüsyon periyodu sonrası, en düşük dilüsyonda, $1:10^5$, iken tespit edilmiştir. Fakat sadece Adper Single Bond 2, Excite ve Optibond Solo Plus aynı dönem sonrasında $1:10^6$ dilüsyonda da genotoksik etkiyi arttırabilmiştir. Bu bağlayıcı sistemler için elde edilen genotoksik etkinin dozdan bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre de SL Bond ve i-Bond'un farklı elüsyon konsantrasyonlarında genotoksik etkisi dozdan bağımsız bulunmuştur. Bununla birlikte Clearfil Protect Bond ve Clearfil SE Bond'un oluşturdukları DNA hasarı doz ile ilişkili olarak bulunmuştur. Bu sistemlerde uygulama dozları arttıkça oluşan DNA hasarı da artış göstermiştir. Bu farklılığın bağlayıcıların içeriğindeki değişiklikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dentin Bağlayıcı sistemlerin genotoksik potansiyelleri üzerine yapılmış çok az sayıdaki çalışmada genotoksik etkinin glutraldehit içeren dentin bağlayıcı sistemlerde görüldüğü bildirilmiştir ^{4,113}. Ancak son yıllarda geliştirilen dentin bağlayıcı sistemler glutraldehit içermediğinden bu sonuçları çalışmamızla karşılaştırma olanağı bulunmamaktadır.

Huang ve arkadaşları ¹¹⁴, HEMA ve Bis-GMA içerikli dentin bağlayıcı sistemlerin insan gingival fibroblastlarında genotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmadaki dentin bağlayıcı sistemler de benzer içeriklere sahiptir ve genotoksik etkinin bu iki maddeden kaynaklabileceği ileri sürülebilir.

Prica ve arkadaşları ¹¹², HEMA'nın hücre nekrozu, Spagnuolo ve arkadaşları ¹¹⁵ da apoptosis yapabilme kabiliyetinde olduğunu bildirmişlerdir. Paranjpe ve arkadaşları ¹¹⁶, HEMA'nın insan lenfositlerinde apoptosisi indüklediğini fakat bu etkisinin moleküler mekanizmasının bilinmediğini bildirmiştir.

Bis-GMA'nın 10^{-7} M konsantrasyonda, fare embriyonik kök hücrelerine teratojenik etkili olduğu kanıtlanmıştır ¹¹⁷.

Dentin bağlayıcı sistemlerin diğer bir içeriği olan TEGDMA ve UDMA gibi dimetakrilatlar da genotoksik etkinin oluşmasından sorumlu tutulabilmektedir. Bunların insan lenfositlerinde, L5178Y fare lenfoma hücrelerinde, hamster akciğer fibroblastlarında (V79) ve CHO hücrelerindeki genotoksik etkileri çalışmalarla gösterilmiştir ^{118,119}. Dimetakrilatların polimerize edilmiş dentin bağlayıcı sistemlerden salımının, ilk 24 saat içinde gerçekleştiği bildirilmiştir ¹²⁰. Her iki maddenin de insan lenfositlerinde DNA migrasyonunda artışa neden oldukları Comet Yöntemi ile gösterilmiştir ¹¹¹. Fakat üreticiler bağlayıcı sistemlerin içerdiği dimetakrilatların özellikleriyle ilgili ayrıntılı bilgi vermemektedirler.

Scheweikl ve arkadaşları ¹¹⁸, TEGDMA'nın Vc-189 hücrelerinde mikroçekirdek indüksiyonuna neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca V79 hücre genomunda geniş lezyonlar yapabildiği bildirilmiştir ¹²¹.

Bağlayıcıların içerdiği silika bileşiklerinin de genotoksik potansiyellerini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Zhong ve arkadaşları ¹²², bazı silika bileşiklerinin DNA hasarı yapabildiklerini göstermiştir. Comet tekniği ile kristal silikaya maruz kalan, V79 yüksek oranda DNA lezyonları görülmüştür.

Bu araştırmayı destekleyen çalışmaların sonuçları doğrultusunda dentin bağlayıcı sistemlerin farklı genotoksik etkilerinin, bağlayıcıların içerdiği, dış ortama salınabilen, HEMA, Bis-GMA, TEGDMA, UDMA ve silika bileşikleri gibi kimyasal içeriklerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Günümüzde yeni geliştirilen biyoaktif fonksiyonlu maddelerin kullanımı, biyolojik güvenilirliklerinin de sorgulanmasına neden olmaktadır. Dentin bağlayıcı etkenler canlı diş dokularıyla uzun bir süre, yakın temasta kalmaktadır. Bu maddelerin yan etkilerinden kaçınmak için canlı hücre üzerinde minimal derecede zararlı etki gösterenlerin tercih edilmesi klinik başarının sağlanmasında önemli rol oynayacaktır.

Bu çalışmada tasarlanan 2 yöntemin sonuçlarına göre, antimikrobiyal aktiviteleri ve genotoksisiteleri değerlendirilen dentin bağlayıcı sistemlerden, antimikrobiyal monomer içeren Clearfil Protect Bond primerin güçlü antimikrobik etkisi ve düşük genotoksik potansiyeli nedeniyle, bağlayıcı diş hekimliğinde kullanılmasını önerebiliriz. Ancak tek bir test yöntemi ile herhangi bir maddenin biyolojik karakteri belirlenemeyeceğinden, diğer biyouyumluluk testleri ile de değerlendirilmesi gerekmektedir. Buna ilave olarak, onarım maddelerinin klinik uygulamalarında bir diğer önemli faktör olan fiziksel özellikleri de gözardı edilmemelidir.

6. SONUÇ

6.1. Antimikrobiyal Aktivite Testi Sonuçları

Yeni geliştirilmiş, antimikrobiyal özellikteki dentin bağlayıcı sistem ile farklı özelliklerdeki dentin bağlayıcı sistemlerin, çürüğün başlaması ve ilerlemesinden sorumlu farklı mikroorganizma türleri üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin değerlendirildiği çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

6.1.1. Agar Disk Difüzyon Testi Sonuçları

1. Dentin bağlayıcı sistemlerin agar disk difüzyon testinde, *L.casei*, *C.albicans* *S.mutans* türlerine karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

2. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan serum fizyolojik (SF) test edilen tüm mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal aktivite açısından etkisizdir. İnhibisyon zon çapı "0" olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber, SF ile zayıf bir inhibisyon oluşturan Clearfil Protect Bond bağlayıcı arasında antimikrobiyal etki açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$).

3. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan %2'lik klorheksidin, *L.casei*, *C.albicans* ve *S.mutans*'a karşı belirgin bir inhibisyon göstermiştir (ortalama inhibisyon zon çapı değeri $22,0 \pm 0,314$ mm). Bu etki, Clearfil Protect Bond primer haricinde, diğer test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazladır ($p < 0,05$).

4. Kendinden asitli sistem olan, Clearfil SE Bond primer, *L.casei* ve *C.albicans* türlerine karşı herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir. Oluşan inhibisyon zon çapı değeri "0" olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte *S.mutans*'a karşı oluşturduğu inhibisyon ise zayıf bir inhibisyonudur (ortalama inhibisyon zon çapı $19 \pm 1,0$ mm). Primer sistemin oluşturduğu inhibisyon zonu, bağlayıcı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ($p < 0,05$). Ancak Clearfil SE Bond primer *S.mutans*'a karşı, diğer test edilen tüm bağlayıcılara göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha az antimikrobiyal etki göstermiştir ($p < 0,05$).

5. Clearfil SE Bond bağlayıcı *L.casei* ve *C.albicans* türlerine karşı etkisiz kalmış herhangi bir inhibitör etki gösterememiştir. Oluşan inhibisyon zon çapı değeri "0" olarak tespit edilmiştir. *S.mutans*'a karşı oluşturduğu inhibisyon ise çok zayıf bir inhibisyonudur (ortalama inhibisyon

zon $\text{çapı}=9,3\pm1,15$ mm). *S.mutans*'a karşı test edilen diğer bağlayıcılara göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha az antibakteriyel etki göstermiştir ($p< 0,05$).

6. Tek şişe bağlayıcı sistem SL Bond, her üç mikroorganizma türüne karşı antimikrobiyal etki göstermekle birlikte, *L.casei*'ye karşı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla inhibitör etki göstermiştir ($p< 0,05$). Bağlayıcı sistemlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ise SL bond, Clearfil Protect Bond primer'den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az antimikrobiyal etki gösterirken ($p< 0,05$), diğer bağlayıcı sistemlerden ise anlamlı derecede daha fazla etki göstermiştir ($p< 0,05$).

7. Yedinci kuşak dentin bağlayıcı sistem olan i-bond, test edilen üç mikroorganizma türüne karşı, diğer bağlayıcılardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük inhibitör etki göstermiştir ($p< 0,05$).

8. Clearfil Protect Bond bağlayıcı sistemde, antimikrobiyal monomer (MDPB) katılmış olan, Clearfil Protect Bond primerin, *C.albicans* ve *S.mutans* bakteri türleri için inhibisyon zon çapı diğer test edilen tüm bağlayıcı sistemlerden, istatistiksel olarak belirgin bir şekilde daha fazladır ($p< 0,05$). Clearfil Protect Bond primer, *L.casei*'ye karşı ise SL Bond sistemden belirgin olarak daha az inhibitör etki göstermiştir ($p< 0,05$).

9. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, her üç mikroorganizma türüne karşı belirgin oranda az inhibisyon göstermiştir ($p< 0,05$). Sadece negatif kontrol grubu olarak kullanılan SF ile istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır, her ikisi de test bakterilerine karşı etkisiz bulunmuştur ($p> 0,05$).

10. Çalışmamızda test edilen dentin bağlayıcı sistemler arasında her üç mikroorganizma türüne karşı en fazla inhibisyon zon çapı % 95 güvenlik seviyesine göre, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, ortalama $31,889\pm0,314$ mm'lik çap değeri ile Clearfil Protect Bond primer tarafından oluşturulmuştur.

11. Çalışmada test edilen maddeler mikroorganizmalara karşı oluşturdukları ortalama inhibisyon zon çaplarına göre büyükten küçüğe şu şekilde sıralanabilir; Clearfil Protect Bond primer ($31,889\pm0,314$ mm) > SL Bond ($28,44\pm0,314$ mm) > i-Bond ($10,22\pm0,314$ mm) > Clearfil SE Bond primer ($6,33\pm0,314$ mm) > Clearfil SE Bond bağlayıcı ($3,11\pm0,314$ mm) > Clearfil Protect Bond bağlayıcı (0 mm).

12. Bağlayıcı sistemlerin en fazla inhibitör etki gösterdiği bakteri *S.mutans*'tır, *S.mutans*'a karşı test edilen tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapı ; $15,25\pm0,192$ mm olarak tespit

edilmiştir. *L.case*'ye karşı tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturdukları ortalama inhibisyon zon çapı ise; $14,375 \pm 0,192$ mm'dir. Bağlayıcıların en az inhibisyon oluşturdukları bakteri ise *C.albicans*'tır, *C.albicans*'a karşı test edilen tüm bağlayıcı sistemlerin oluşturduğu ortalama inhibisyon zon çapı; $8,625 \pm 0,192$ mm'dir.

6.1.2.MİK/MBK Ölçüm Sonuçları

1.Çalışma sonuçlarına göre test edilen bağlayıcı sistemlerin, minimal inhibitör konsantrasyon değerleri ile minimal bakterisid konsantrasyon değerleri birbirine eşittir (MİK=MBK).

2. Negatif kontrol grubu olarak kullanılan SF'in tüm konsantrasyonlarında mikroorganizmalarda üreme görülmüştür.

3. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan %2'lik klorheksidinin her üç mikroorganizma için MBK değeri 0,0625 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

4. Clearfil SE Bond bağlayıcı, en düşük MBK değerini *L.casei* için (0,0625 µg/mL) gösterirken, Clearfil SE Bond primer ise *C.albicans* için en düşük MBK değerine(0,0625 µg/mL) sahiptir.

5. SL Bond, *L.casei* ve *S.mutans* için MBK değeri 0,25 µg/mL iken *C.albicans* için çok daha düşük, 0,0313 µg/mL, MBK değerine sahiptir.

6. i-Bond, *C.albicans* ve *S.mutans* için düşük (0,0625 µg/mL) MBK değerine sahipken, *L.casei* için bu değer daha yüksektir (0,125 µg/mL).

7. Bağlayıcı sistemler arasında, Clearfil Protect Bond primer *L.casei* (0,0156 µg/mL), *C.albicans* (0,0078 µg/mL), ve *S.mutans* (0,0078 µg/mL) için en düşük MBK değerini göstermiştir. Clearfil Protect Bond primer'in, *C.albicans* ve *S.mutans* için MBK değeri pozitif kontrol grubu olarak kullanılan klorheksidinden (0,0625 µg/mL) de düşük değerdedir.

8. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, her üç mikroorganizma için de yüksek MBK (0,5 µg/mL) değerine sahiptir. Bu sonuç agar disk difüzyon testinin sonucunu da desteklemektedir.

9. *L.casei* için tüm bağlayıcı sistemlerin MBK değerleri 0,0156 µg/mL ile 0,5 µg/mL, *C.albicans* için 0,0625 µg/mL ile 0,5 µg/mL, *S.mutans* için 0,0625 µg/mL ile 0,5 µg/mL arasında değişmektedir.

6.2. Genotoksisite Testi Sonuçları

Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemler ile negatif ve pozitif kontrolün insan periferik lenfositlerinde 1 saatlik maruziyetten sonra, DNA hasarı tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet Yöntemi) ile 300 skor/konsantrasyonu ifade eden kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti ortalama($\pm$ standart hata) değerleri ile tespit edilmiştir.

1. Her bir grupta, tripan mavisi ile boyamada hücre canlılığı % 90'ın üzerinde bulunmuştur.

2. Negatif kontrol grubu olarak test edilen PBS hücreler üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir. Ortalama comet skorları, kuyruk uzunluğu için $0,75 \pm 0,006$, kuyruk yoğunluğu için $3,28 \pm 0,25$ ve kuyruk momenti için $0,02 \pm 0,001$ olarak tespit edilmiştir.

3. Pozitif kontrol grubu olarak test edilen $50\mu\text{M}$ H_2O_2 hücreler üzerinde belirgin hasar oluşturmuştur. Ortalama comet skorları kuyruk uzunluğu için $1,79 \pm 0,03$, kuyruk yoğunluğu için $37,81 \pm 1,44$ ve kuyruk momenti için $0,47 \pm 0,02$ olarak tespit edilmiştir.

4. Çalışma sonuçlarına göre gruplar arasında genotoksik hasar oluşturma açısından, kuyruk yoğunluğu, uzunluğu ve momenti ölçütlerine göre, bağlayıcı sistemler arasında istatistiksel olarak belirgin fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

5. Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin, uygulama dozları ile oluşan DNA hasarı arasındaki ilişki incelendiğinde, kuyruk yoğunluğu, uzunluğu ve momenti bakımından Clearfil Protect Bond ve Clearfil SE Bond'un oluşturdukları DNA hasarı doz ile ilişkili, fakat SL Bond ve i-Bond için görülen genotoksik etki dozdan bağımsız olarak tespit edilmiştir.

6. Kendinden asitli sistem Clearfil SE Bond primer, $50\mu\text{l}$ 'de belirgin bir DNA hasarı oluşturmuştur ($p < 0,001$). Clearfil SE Bond bağlayıcı ise yüksek konsantrasyonda, $100\mu\text{l}$ 'de genotoksik etki göstermiştir. ($p < 0,05$). Bu sonuçlara göre; Clearfil SE Bond primerin hücreler üzerinde çok kuvvetli bir genotoksik potansiyeli görülürken bağlayıcıda ise DNA hasarı oluşturma potansiyelinin düşük olduğunu söyleyebiliriz.

7. SL bond, her dozu için istatistiksel olarak anlamlı bir DNA hasarı oluşturmamıştır ($p > 0,05$).

8. i-Bond, kuyruk yoğunluğu ve momentinde herhangi belirgin bir artışa neden olmazken ($p > 0,05$), kuyruk uzunluğu ise

uygulanan her dozu için, negatif kontrolden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük değerler göstermiştir ($p < 0,01$). Bu sonuçlara göre 7. kuşak dentin bağlayıcı sistem olan i-Bond'un düşük genotoksik potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz.

9. Clearfil Protect Bond primer, 25µl'lik en düşük konsantrasyonda, kuyruk uzunluğunda belirgin bir DNA hasarı oluşturmazken, 50µl'de ($p < 0,01$) ve 100µl'de ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede DNA hasarı oluşturmuştur. 100µl'lik konsantrasyonda yaptığı hasar, 50µl'de oluşan hasardan anlamlı derecede fazladır ($p < 0,05$). Kuyruk moment ve yoğunluğu ise sadece 100µl'lik yüksek konsantrasyonda artış göstermiştir ($p < 0,001$).

10. Clearfil Protect Bond bağlayıcı, kuyruk moment, uzunluk ve yoğunluğunu 100µl'lik yüksek konsantrasyonda belirgin olarak artırmıştır ($p < 0,001$).

11. Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemler, 25µl'lik konsantrasyonda uygulandığında, kuyruk yoğunluğu ve momentine en düşük etkiyi i-Bond göstermiş ($p < 0,05$), diğer bağlayıcı sistemler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Kuyruk uzunluğunda en düşük artışı i-Bond ile SL Bond göstermiş, diğer sistemler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulgulanmamıştır ($p > 0,05$).

12. Bağlayıcı sistemler, 50µl'de uygulandığında, Clearfil SE Bond primer kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momentinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla artış göstermiştir ($p < 0,05$).

13. Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemler 100µl'lik konsantrasyonda uygulandığında, kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunda Clearfil Protect Bond primer ile Clearfil SE Bond primer arasında belirgin bir fark yokken ($p > 0,05$), Clearfil Protect Bond primer ise diğer bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$). Kuyruk momentinde ise Clearfil Protect Bond primer, Clearfil Protect Bond bağlayıcı ve Clearfil SE Bond primer arasında belirgin bir fark tespit edilmezken ($p > 0,05$), Clearfil Protect Bond primer ise diğer bağlayıcı sistemlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla artışa neden olmuştur ($p < 0,05$).

7. ÖZET

Farklı Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin ve Genotoksik Potansiyellerinin in vitro Değerlendirilmesi

Dentin bağlayıcı sistemlerin dentin ve çevre dokularla olan sürekli ve yakın teması ile oluşan biyolojik etkilerinden dolayı günümüzde bağlayıcı sistemlere olan ilgiyi artırmıştır. Bu çalışmanın amacı, farklı dentin bağlayıcı sistemlerin antimikrobiyal özelliklerini ve mutajenik potansiyellerini değerlendirmektir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen birinci deneyde, Clearfil SE Bond, SL Bond, i-Bond, Clearfil Protect Bond, %2 klorheksidin (pozitif kontrol) ve serum fizyolojinin (negatif kontrol), *L.casei* (ATCC4646) *C.albicans* (ATCC10231) ve *S.mutans*'a (NCTC10449) karşı antimikrobiyal etkileri agar disk difüzyon testi ve seri mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir.

İkinci deneyde, dentin bağlayıcı sistemlerin genotoksik aktiviteleri, farklı elüsyon konsantrasyonunda, insan lenfositlerinde alkalın tek hücre jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir.

Agar disk difüzyon deneyi ve MİK/MBK ölçümü sonucuna göre, Clearfil Protect Bond primer, test edilen her üç bakteriye karşı diğer bağlayıcı sistemlerden anlamlı derecede, fazla inhibisyon göstermiştir

Çalışmada test edilen diğer sistemlerden, Clearfil SE Bond sadece *S.mutans*'a karşı zayıf bir inhibisyon gösterirken, SL Bond tüm mikroorganizmalarda inhibisyon oluşturmuştur. i-Bond ise test edilen her üç mikroorganizma türüne karşı çok düşük inhibisyon etkisi göstermiştir.

Genotoksisite çalışma sonuçlarına göre, Clearfil Protect Bond primer, kuyruk uzunluğunu 50 µl ve 100 µl'de anlamlı derecede arttırmış, kuyruk momenti ve yoğunluğu ise sadece 100 µl'lik en yüksek konsantrasyonda artış göstermiştir.

Kuyruk uzunluğu, yoğunluğu ve momenti Clearfil Protect Bond bağlayıcıda 100 µl'lik konsantrasyonda belirgin olarak arttırmıştır. Clearfil SE Bond primer 50 µl'de, Clearfil SE bond bağlayıcı ise 100 µl'de DNA hasarını artırmışlardır. Fakat SL bond ve i-Bond belirgin bir DNA hasarı oluşturmamıştır.

Bu çalışmada tasarlanan 2 deneyin sonuçları, test edilen dentin bağlayıcı sistemlerden, antimikrobiyal monomer içeren Clearfil Protect Bond primerin, klinikteki etkili uygulama dozlarında, güçlü

bakterisid/fungusid etki ve düşük genotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler; dentin bağlayıcı sistemler, MDPB, antimikrobiyal aktivite, genotoksisite.

8.SUMMARY

The in vitro Evaluation of Antimicrobial Properties and Genotoxic Potential of Different Dentin Bonding Agents

The interest to bonding agents has been increased recently because of probable biological effects caused by the close and continual contact of dentin bonding agents with tooth and surrounding tissues. The aim of the present study was to evaluate the different dentin bonding agents by assessing antimicrobial property and mutagenic potential.

In the first experiment, performed in this study, the antibacterial activity of Clearfil SE Bond, SL Bond, i-Bond, Clearfil Protect Bond, %2 chlorhexidine (positive control) and SF (negative control) against *L.casei* (ATCC4646), *C.albicans* (ATCC10231) and *S.mutans* (NCTC10449) was determined by agar disc diffusion test and serial microdilution assay.

In the second experiment, the genotoxic activity of dentin bonding agents, was investigated at different elution concentrations in human lymphocytes using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique.

According to the results of agar disc diffusion experiment and serial microdilution assay, Clearfil Protect Bond primer, showed clear inhibition against all three bacteria among the other adhesive systems.

The other systems tested in this study, Clearfil SE Bond produced a little antimicrobial effect on *S.mutans* and SL Bond showed inhibition against the three microorganism. i-Bond, produced significantly less antimicrobial effect against three microorganism.

According to the results of genotoxicity assay, Clearfil Protect Bond primer, at 50 µl and 100 µl concentration increased the tail length significantly. Moreover, tail moment and tail intensity were significantly increased at 100 µl concentration

A significant increase in tail moment, intensity and length was observed at 100 µl concentration for Clearfil Protect Bond adhesive system. Clearfil SE Bond primer at 50 µl and Clearfil SE Bond adhesive at 100 µl resulted in the increase of DNA damage. However SL Bond and i-Bond did not produce significantly DNA damage.

The results of two experiments designed for this study, indicated that, among the adhesives tested, Clearfil Protect Bond, that

contains antimicrobial monomer (MDPB), at clinically effective dose, have strong bactericidal/fungucidal effects and low genotoxic potential.

Key words; dentin bonding systems, MDPB, antimicrobial activity, genotoxicity.

9.KAYNAKLAR

1.Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. Clin Oral Invest 1997; 1: 154–162.

2.Perdigao J. Dentin bonding as a function of dentin structure. Dental Clinics of North America 2002; 46: 277–301.

3.Önal B. Restoratif Dişhekimliğinde Maddeler ve Uygulamaları. I.Baskı. İZMİR: Ege Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Yayınları; 2004. s.153–172.

4.Schweikl H, Schmalz G, Göttke C. Mutagenic activity of various dentine bonding agents. Biomaterials 1996; 17: 1451–1456.

5.Tagami J, Toledano M, Prati C. Advanced Adhesive Dentistry. 3rd International Kuraray Symposium; 1999 Dec 3–4; Granada, Italy. Crimido: Grafiche Erredue; 2000.

6.Spanberg Lsw. Experimental Endodontics. 1st ed. Florida: crcPress; 1990. p. 173–210.

7.Bruzell RE, Dahl JE, Runnängen G, Morisbak E. In vitro cell death induced by irradiation and chemicals relevant for dental applications, dose-response and potentiation effects. Eur J Oral Sci 2004; 112: 273–279.

8.Atesagaoglu A, Omurlu H, Ozcagli E, Sardas S, Ertas N. Mercury Exposure İn Dental Practice. Operative Dentistry 2006; 31(6): 666–669.

9.Christensen GJ. Alternatives for The Restoration of Posterior Teeth. Int Dent J 1989; 39: 155–161.

10.Çolak Ş. Amalgam: Dünü ve Bugünü. A.Ü. Diş Hek. Fak. Dergisi 1989; 16: 533–38.

11.Dunne SM, Gainsford ID, Wilson NH. Current Materials and Techniques for Direct Restorations in Posterior Teeth. Part 1: Silver Amalgam. Int Dent J 1997; 47: 123–36.

12.Rahravi H. Mesleki olarak civaya maruz kalan dişhekimlerinde idrar civa düzeylerinin soğuk buhar-atomik absorpsiyon spektrometresi ile araştırılması. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2002.

- 13.Cook TA, Yates PO. Fatal Mercury Intoxication in a Dental Surgery Assistant. Br Dent J 1969; 127: 553.
- 14.Eley BM. The future of dental amalgam: a review of the literature Part 2: Mercury exposure in dental practice. Br Dent J 1997; 182(8): 293–7.
- 15.Türkün ŞL. Clinical evaluation of a self-etching and a one-bottle adhesive system at two years. Journal of Dentistry 2003; 31: 527–534.
- 16.Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. Int Endod J 1988; 21: 155–160.
- 17.Hanks CT, Wataha JC, Zhilin S. In vitro models of biocompatibility. A review. Dent Mater 1996; 12: 186–193.
- 18.Roberson T. Studevant's Art and Science of Operative Dentistry 3rd ed. London: Mosby; 2001. p.237–268.
- 19.Dayangaç B. Kompozit Rezin Restorasyonlar. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2000. s.21–38.
- 20.Kenneth J.A. Philips' Science of Dental Materials, 11th ed. Florida: Saunders; 2003. p.381–396.
- 21.Noort R. Introduction to Dental Materials, 2nd ed. London: Mosby; 2002. p.149–168.
- 22.Schmidseder J. Color Atlas of Dental Medicine, Aesthetic Dentistry. 1st ed. Stuttgart-New York: Thime; 2000. p.103–124.
- 23.Sano Y, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow MF, Takatsu T, Clucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. Oper Dent 1995; 20(4): 160–7.
- 24.Fusayama T. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative system. J Dent Res 1979; 58: 1364–66.
- 25.Nakabayashi N. Resin reinforced dentin due to infiltration of monomers into the dentin at the adhesive interface. J Jpn Dent Mat Devices 1982; 1: 78–81.
26. Kanca J. Resin bonding to wet substrate. Bonding to dentin. Quintessence Int 1992; 23: 39–41.

27.Fusayama T. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative system. J Dent Res 1979; 58: 1364–70.

28.Miller MB. Self-etching adhesives: solving the sensitivity conundrum. Pract Proced Aesthet Dent 2002; 14: 406–411.

29.Van Meerbeek B, Inoue S, Perdigao J. Fundamentals of Operative Dentistry. 2nd ed. Carol Stream: Quintessence Publishing Co, Inc; 2001. p.194–214.

30. Perdigao J, Geraldeli S. Bonding characteristics of self-etching adhesives to intact versus prepared enamel. J Esthet Restor Dent 2003; 15(1): 32–41.

31.Van Meerbeek B, Satoshi I, Vargas M, Yoshida Y, Armstrong S, Lambrechts P, Vanherle G. Microtensile bond strengths of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. Am J Dent 2003; 16(6): 414–20.

32.Langeland K, Langeland LK. Pulp reactions to crown preparations, impression, temporary crown fixation and permanent cementation. J Prosthet Dent 1965; 15: 129–138.

33. Aulton J. The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. Int Dent J 1970; 20: 481–490.

34.International Organization For Standardization FDI/ISO/TR 7405: Recommended Standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1980; 30: 67.

35. Shmalz G, Hiller KA, Aslan-Dörter F. New developments in the filter test system for cytotoxicity testing. Mater Med 1994; 5: 43–51.

36. Jolanki R, Kanerva L, Estlander T. Occupational allergic contact dermatitis caused by epoxy diacrylate in ultraviolet light-cured paint, and bisphenol A in dental composite resin. Contact Dermatitis 1995; 33: 94–9.

37.Munksgaard EC, Hansen EK, Engen T, Holm U. Self-reported occupational dermatological reactions among Danish dentists. Eur J Oral Sci 1996; 104: 396–402.

38.Schweikl H, Schmalz G. Gluteraldehyde-containing bonding agents are mutagens in mammalian cells in vitro. J Biomed Mater Res 1997; 36: 284–88.

39.Schweikl H, Schmalz G, Bey B. Mutagenicity of dentin bonding agents. J Biomed Mater Res 1994; 28: 1061–67.

40.Türk Standardı, TS EN ISO 10993–12: Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi-Bölüm 12: Numune hazırlanması ve referans malzemeler, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 2005.

41.Cengiz A.T. Bakterilerde Antibiyotiklere Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri. içinde: CENGİZ, A.T. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004. s.281–301.

42.Tanner J. Adhesion of oral microbes to dental fiber reinforced composites. With emphasis on Streptococcus mutans and Candida albicans. Doktora Tezi, Turku: Institute of Dentistry, University of Turku, Department of Prosthetic Dentistry; 2003.

43.Marsh P, Martin M. Oral Microbiology. 3rd edition, London: Chapman&Hall; 1992.

44.Cengiz AT. Streptococcus. içinde: CENGİZ AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.s.362–372.

45.Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, Senpuku H. Assessment of Genes Associated with Streptococcus mutans Biofilm Morphology. Applied and Environmental Microbiology 2006; 72(9): 6277–6287.

46.Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. Dental Clinics of North America 1999, 43(4): 599–614.

47.Morinushi T, Murayama M, Kinjo S. Mutans streptococci, lactobacilli in saliva and acidity from organisms in dental plaque: changes after restorative treatment. J Clin Pediatr Dent 2004; 28(4): 327–332.

48.Cabezas GC, Gregory RL, Stookey G.K. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. Caries Res 1999; 33: 357–365.

49.Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. Pediatr Dent 2006; 28: 106–109.

50.Svensater G, Borgstrom M, Bowden GHW, Edwardsson S. The Acid-Tolerant Microbiota Associated with Plaque from Initial Caries and Heathy Tooth Surfaces. Caries Res 2003; 37: 395–403.

51. Alaçam T. ENDODONTİ. II. Baskı. Ankara: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2000. s.327.

52.Aydın M. Candida cinsi mantarlar. içinde: CENGİZ AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.s.1110–1116.

53.Tübay E. Kandidalar. içinde: USTAÇELEBİ Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. s.1083–1093.

54.Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J of Dent, 1998; 26(4): 299–304.

55.Carvalho F, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and Candida spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Archives of Oral Biology 2006;51: 1024–1028.

56.Kuştimur S. Mantarlar ve Sınıflandırılması. içinde: Cengiz AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.s.1082–1087.

57.Öztürk C. Lactobacillus. içinde: CENGİZ A.T. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. I.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004. s. 599–604.

58.Russell JJ, Macfarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. Community Dent Oral Epidemiol 1991;19(2): 74–7.

59.Colter WA, Murray SD. The use of a concentrated oral rinse culture technique to sample oral candida and lactobacilli in children, and the relationship between candida and lactobacilli levels and dental caries experience: a pilot study. Int J Pediatr Dent 1993;3(1): 17–21.

60.Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 1984; 123: 291–298.

61.Fairbairn DW, Olive PL, Q'neill KL. The comet assay: a comprehensive review. Mut Res 1995; 339(1): 37–59.

62.Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–91.

63.Collins AR, Dobson VL, Dusinka M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997; 375: 183–93.

64.Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet assay'. *Radiat Res* 1990; 122: 86–94.

65.Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini, G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S, Rodriguez AV. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (comet assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* 1998; 130: 129–39.

66.Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 1990; 53: 291–301.

67.Imazato S, Kinomoto H, Tarumi H, Russell RRB, McCabe JF. Incorporation of Antibacterial Monomer MDPB into Dentin Primer. *J Dent Res* 1997; 76(3): 768–772.

68.Forss H, Jokinen J, Spets-Happonen S, Seppa S, Luoma H. Fluoride and mutans Streptococci in plaque grown on glass ionomer and composite. *Caries Res* 1991; 25: 454–8.

69.Svanberg M, Mjör IA, Qrstavik D. Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glass-ionomer Restorations. *J Dent Res* 1990; 69(3): 861–64.

70.Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dental Materials* 2003; 19: 449–457.

71.Kawai K, Tsuchitani Y. Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 123–27.

72.Kawai K, Tsuchitani Y. Effects of composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. *J Biomed Mater Res* 2000; 51: 123–7.

- 73.Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB. Incorporation of Bacterial Inhibitor into Resin Composite. *J Dent Res* 1994; 73(8): 1437–43.
- 74.Imazato S, Tarumi H, Kato S, Ebisu S. Water sorption and colour stability of composites containing the antibacterial monomer MDPB. *Journal of Dentistry* 1999; 27: 279–83.
- 75.Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S. Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dental Materials* 2001; 17: 485–91.
- 76.Tobias RS, Rippin JW, Browne RM, Wilson C. A further study of the antibacterial properties of dental restorative materials. *Int Endod J* 1988; 21: 381–92.
- 77.Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* 1992; 7(5): 257–62.
- 78.Çehreli ZC, Atac AS, Sener B. Antimicrobial Properties of Self-Etching Primer-Bonding Systems. *Operative Dentistry* 2003; 28(2): 143–48.
- 79.Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel W-E, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiology* 2003; 18: 302–8.
- 80.Pienihakkinen K. Caries prediction through combined use of incipient caries lesions, salivary buffering capacity, lactobacilli and yeasts in Hungary Community. *Dent Oral Epidemiol* 1987; 15(6): 325–8.
- 81.Scheinin A, Pienihakkinen K, Tiekso J, Holmberg S. Multifactorial modeling for root caries prediction. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20(1): 35–7.
- 82.Ainamo J, Etemadzadeh H, Kallio P. Comparability and discriminating power of 4 plaque quantifications. *J Clin Periodontol* 1993; 20(4): 244–9.
- 83.Beighton P, Lynch E. Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentine associated with primary root caries lesions. *Caries Res* 1995; 29(2): 154–8.

84. Nikawa H, Yamashiro H, Makihiro S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46: 471–78.
85. Fraga RC, Siqueira JS, Uzeda M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. *J Prosthet Dent* 1996; 76: 483–6.
86. Başeren M, Yazıcı R, Özalp M, Dayangaç B. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. *Quintessence International* 2005; 36: 339–44.
87. Palenik CJ, Setcos JC. Antimicrobial abilities of various dentine bonding agents and restorative materials. *J Dent* 1996; 24(4): 289–95.
88. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RRB. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent* 2002; 5: 356–360.
89. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Reh* 2001; 28: 314–19.
90. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 1999; 20: 899–903.
91. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y, Ebisu S. In Vivo Antibacterial Effects of Dentin Primer Incorporating MDPB. *Operative Dentistry* 2004; 29(4): 369–375.
92. Itou K, Torii Y, Suzuki K, Nakai H, Inoue K. Adhesion of restorative resin to tooth-adhesion promoted by Liner Bond II. *Adhesive Dentistry* 1994; 12: 174–81.
93. Emilson CG, Bergenholtz G. Antibacterial activity of dentinal bonding agents. *Quintessence Int* 1993; 24: 511–15.
94. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *Am J Dent* 1998; 11(3): 160–8.
95. Meiers JC, Miller GA. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers and polyacid-modified composite resins. *Oper Dent* 1996; 21: 257–64.

- 96.Herrera M, Castillo A, Bravo M, Liebana J, Carrion P. Antibacterial Activity of Resin Adhesives, Glass Ionomer and Resin-Modified Glass Ionomer Cements and a Compomer in Contact with Dentin Caries Samples. *Operative Dentistry* 2000; 25: 265–69.
- 97.Schmalz G, Ergücü Z, Hiller KA. Effect of Dentin on the Antibacterial Activity of Dentin Bonding Agents. *Journal of Endodontics* 2004; 30(5): 352–58.
- 98.Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent* 1998; 26: 267–71.
- 99.Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay RF. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dental Materials* 2003; 19: 313–19.
- 100.Meiers JC, Shook LW. Effect of disinfectants on the bond strength of composite to dentin. *Am J Dent* 1996; 9: 11–14.
- 101.Gurgan S, Bolay S, Kiremitci A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Reh* 1999; 26: 836–40.
- 102.Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dental Materials* 2006; 22: 527–32.
- 103.Zollner A, Gaengler P. Pulp reactions to different preparation techniques on teeth exhibiting periodontal disease. *J Oral Rehabil* 2000; 27(2): 93–102.
- 104.Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. Cytotoxicity and oxidative stres caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Invest* 2004; 8: 81–5.
- 105.Pratti IS, Barron T. Regulatory recognition of indirect genotoxicity mechanisms in the European Union. *Toxicol Lett* 2005; 140–141: 53–62.
- 106.Bouillaguet S, Virgillito, M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentin bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil* 1998; 25: 45–51.

107. Ündeğer Ü, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch Toxicol* 2005; 79: 169–76.
108. Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grunert-Fuchs M, Speit G. Does physical activity induce DNA damage?. *Mutagenesis* 1994; 9: 269–72.
109. Holz O, Jorres R, Kastner A, Magnussen H. Differences in basal and induced DNA single-strand breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 1995; 322: 55–62.
110. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus U, Staundenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl F. 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(8): 1762–70.
111. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl F. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 2004; 32(3): 229–34.
112. Prica D, Galic N, Zeljezic D, Prica A. Genotoxicity evaluation of five different dentin bonding agents by chromosomal aberration analysis. *J Oral Reh* 2006; 33(6): 462–8.
113. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of Modern Dentin Adhesives- in vitro Testing on Gingival Fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 53–60.
114. Huang FM, Chou MY, Chang YC. Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2003; 24: 157–163.
115. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S. NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 2004; 83: 837–42.
116. Paranjpe A, Bordador LCF, Wang M, Hume WR, Jewett A. Resin Monomer HEMA is a Potent Inducer of Apoptotic Cell Death in Human and Mouse Cells. *J Dent Res* 2005; 84(2): 172–7.
117. Schengberg S, Bohlen H, Kleinsasser K, Kehe K, Seiss M, Walther UI, Hickel R, Reichl FX. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J Dent* 2005; 33: 49–55.

- 118.Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The Induction of Micronuclei in vitro by Unpolymerized Resin Monomers. *J Dent Res* 2001; 80(7): 1615–20.
- 119.Muller BP, Eisentrager A, Jahnen-Dechent W, Dott W, Hollender J. Effect of sample preparation on the in vitro genotoxicity of light curable glass-ionomer cement. *Biomaterials* 2003; 24: 611–17.
- 120.Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 333–35.
- 121.Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrilate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res* 1999; 438: 71–8.
- 122.Zhong BZ, Whong WZ, Ong TM. Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay. *Mutat Res* 1997; 393: 181–87.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı : Alev

Soyadı : Ateşagaolu KAYA

Doğum Yeri ve Tarihi : 23 Mart 1977, ORDU

Eğitimi :

1995–2000; İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi

1995-1988; Ordu Anadolu Lisesi

1988-1983; İnönü İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce