



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ORTODONTİ ANABİLİM DALI
ORTODONTİ DOKTORA PROGRAMI

ORTODONTİDE AKTİF TEDAVİ VE RETANSİYON TEDAVİSİ
BOYUNCA KULLANILAN FARKLI ŞEFFAF PLAK
MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE
BİSFENOL SALINIMLARININ İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

ESRA ÇİFÇİ ÖZKAN

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Gülay Dumanlı Gök

İSTANBUL 2021



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORTODONTİ ANABİLİM DALI

ORTODONTİ DOKTORA PROGRAMI

**ORTODONTİDE AKTİF TEDAVİ VE RETANSİYON TEDAVİSİ
BOYUNCA KULLANILAN FARKLI ŞEFFAF PLAK
MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE
BİSFENOL SALINIMLARININ İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ESRA ÇİFÇİ ÖZKAN

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Gülay Dumanlı Gök

İSTANBUL 2021

Beyan

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Esra ÇİFÇİ ÖZKAN



TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgisi ve ilgisiyle bana her zaman destek olan değerli danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi. Gülay DUMANLI GÖK'e,

Bilimsel ve manevi desteğini öğrenim hayatım boyunca benden esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Muzaffer GÜLYURT 'a,

Laboratuvar çalışmalarında bilgi paylaşımları ve desteklerinden dolayı sayın Doç. Dr. Nazlı Ece ORDUERİ, Dr. Öğr. Üyesi. Sibel DEMİRCİ DELİPINAR ve Tuğba ELGÜN'e,

Örneklerin deneylere hazırlanmasında bana destek olan Pelin KILIÇASLAN'a,

Çalışmamın analiz aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan SEM A.Ş. Ar-Ge Laboratuvar Yöneticisi Gökhan GÜNAY'a,

Her zaman gösterdikleri sabır ve destekleri için sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Esra ÇİFÇİ ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İç Kapak	-
Onay sayfası.....	-
Beyan	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TÜRKÇE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER	xiii
İNGİLİZCE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Şeffaf plaklar	4
2.2. Biyouyumluluk	7
2.3. Plastiklerin Genel, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	12
2.3.1. <i>Isılsertleşir Plastikler (Termosetler)</i>	13
2.3.1.1. <i>Poliester</i>	13
2.3.1.2. <i>Poliüretan (PU)</i>	13
2.3.1.3. <i>Epoksi reçinesi</i>	14
2.3.2. <i>Isılıyumuşar Plastikler (Termoplastikler)</i>	14
2.3.2.1. <i>Polietilen (PE)</i>	14
2.3.2.2. <i>Polietilen Tereftalat (PET)</i>	15
2.3.2.3. <i>Polivinil Klorür (PVC)</i>	15
2.3.2.4. <i>Polipropilen (PP)</i>	16
2.3.2.5. <i>Polistiren (PS)</i>	16
2.3.2.6. <i>Polimetil Metakrilat (PMMA)</i>	16
2.3.2.7. <i>Poliamit (PA)</i>	17
2.3.2.8. <i>Polikarbonat (PC)</i>	17
2.4. Bisfenollerin Genel, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	17

2.5. BPA'nın Sistemik Etkileri	23
<i>2.5.1. BPA'nın Endokrin Sistem Üzerine Etkisi</i>	<i>23</i>
<i>2.5.2. BPA'nın Troid Hormon Üzerine Etkisi</i>	<i>25</i>
<i>2.5.3. BPA'nın Beyin Gelişimi Üzerine Etkisi</i>	<i>25</i>
<i>2.5.4. BPA'nın Obezite ve Diabetes Mellitus ile İlişkisi</i>	<i>26</i>
<i>2.5.5. BPA'nın Meme Dokusu ve Meme Kanseri Üzerindeki Etkisi.....</i>	<i>27</i>
<i>2.5.6. BPA'nın Pubertal Gelişim Üzerine Etkileri</i>	<i>27</i>
<i>2.5.7. BPA'nın Kardiovasküler Etkileri</i>	<i>28</i>
<i>2.5.8. BPA'nın İmmünotoksik Etkileri</i>	<i>28</i>
<i>2.5.9. BPA'nın Hepatotoksik Etkileri</i>	<i>29</i>
<i>2.5.10. BPA'nın Nörotoksik Etkileri</i>	<i>29</i>
2.6. BPF ve BPS'nin Kullanımı	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Gereç	34
<i>3.1.1. Deneysel Çalışmalar İçin Örneklerin Seçilmesi</i>	<i>34</i>
<i>3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler</i>	<i>35</i>
<i>3.1.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	<i>36</i>
3.2. Yöntem	37
<i>3.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Yaşlandırılması</i>	<i>37</i>
<i>3.2.2. Şeffaf Plakların Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi</i>	<i>37</i>
<i>3.2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması</i>	<i>37</i>
<i>3.2.2.2. Primer Gingival Fibroblast Hücrelerinin Morfolojilerinin Değerlendirilmesi.....</i>	<i>38</i>
<i>3.2.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi</i>	<i>39</i>
<i>3.2.3. Şeffaf Plakların BPA, BPF, BPS Salınımlarının Değerlendirilmesi</i>	<i>41</i>
<i>3.2.3.1. BPA, BPF, BPS Analizi İçin Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması</i>	<i>41</i>
<i>3.2.3.2. BPA, BPF, BPS Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması</i>	<i>41</i>
<i>3.2.3.3. BPA, BPF, BPS Analizi İçin LC/MS-MS Cihazı Çalışma</i>	

<i>Koşulları.....</i>	42
<i>3.2.3.4. Geliştirilen LC/MS-MS Yönteminin Validasyonu</i>	42
<i>3.2.4. İstatiksel Analiz.....</i>	43
4. BULGULAR	45
4.1. Sitotoksosite Bulguları.....	45
<i>4.1.1. MTT Analizi Bulguları</i>	45
<i>4.1.2. X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi</i>	
<i>Bulguları</i>	48
4.2. Bisfenol Salınımı Bulguları	49
<i>4.2.1. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, BPF, BPS Analizi</i>	
<i>Yöntem Validasyonu</i>	49
<i>4.2.1.1. LC/MS-MS Cihazının Kalibrasyonu</i>	49
<i>4.2.1.2. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, BPF ve BPS Analizine İlişkin</i>	
<i>Kromatogramlar</i>	51
<i>4.2.1.3. LC/MS-MS Cihazında BPA, BPF ve BPS Analizi Yöntem</i>	
<i>Parametreleri</i>	52
<i>4.2.2. Farklı Şeffaf Plak Materyallerinin BPA. BPF. BPS Analizi</i>	
<i>Sonuçları</i>	53
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	57
5.1. Tartışma	57
5.2. Sonuç	65
5.3. Öneriler	66
6. KAYNAKÇA	67
ÖZGEÇMİŞ	81
İNTİHAL RAPORU	82

SİMGE/ SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

atm	Atmosfer
BPA	Bisfenol A
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
CAS	Chemical Abstract Service
CE	Collision Energy
CI	Cell Index (Hücre İndeksi)
CO ₂	Carbon di Oksit
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
EDC	Endokrin Bozucu Kimyasallar (Endocrine Disrupting Chemicals)
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (European Food Safety Authority)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Er α	Östrojen reseptörü α
Er β	Östrojen reseptörü β
ERR- γ	Östrojen reseptörü- γ
ESI	Elektron Sprey İyonizasyon
FBS	Fetal Bone Serum
FV	Fragmentor Voltage
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC/MS-MS	Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi

LDH	Laktat dehidrojenaz
LOAEL	Lowest Observed Effect Level
LOD	Tesbit edilebilen miktar limiti (Limit Of Dedection)
LOQ	Miktarlandırılabilen derişim limiti (Limit Of Quantitation)
MCF-7	İzole edilmiş insan göğüs kanseri hücre serisi
Mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
Mm	Mili Molar
MS	Kütle Spektrometrisi
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide
Ng	Nanogram
ng/mL	Nanogram/ mililitre
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NTP	National Toxicology Program
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Polietilen
PET	Polietilen Terefalat
PETG	Polietilen terefalat glikol
pH	Power of Hydrogen
PP	Polipropilen
ppb	Part Per Billion
psi	Pounds Per Square Inch
PU	Poliüretan
PVC	Polivinil chloride

rpm	Revolutions Per Minute
RTCA-DP	Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TSH	Tiroit uyarıcı hormon
U/mL	Ünite/ mililitre
ug/L	mikrogram/ Litre
V	Volt
µg/ L	Mikrogram/ Litre

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Tablo Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1	Plastik endüstrisinde kullanılan başlıca bisfenollerin listesi	18
Tablo 2.2	BPA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	20
Tablo 3.1	Çalışmada kullanılacak olan şeffaf plak markaları ve içerikleri...	34
Tablo 3.2	LC-MS/MS metot koşulları	42
Tablo 3.3	LC-MS/MS cihazı ile BPA, BPF, BPS analizi için belirlenen LOD ve LOQ değerleri	43
Tablo.4.1	Şeffaf plakların MTT yöntemi ile elde edilen hücre poliferasyon %’si bakımından karşılaştırılması	46
Tablo 4.2	Şeffaf plakların X-Celligence yöntemi kullanılarak elde edilen değerler bakımından karşılaştırılması	49
Tablo 4.3	BPA, BPF ve BPS miktarlarının belirlenmesi için kullanılan MS/MS geçişleri ve LC/MS/MS parametreleri	52
Tablo 4.4	BPA, BPF ve BPS miktarlarını LC/MS/MS cihazı ile belirlemek üzere geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri	53
Tablo 4.5	Numunelerin BPA değerleri bakımından karşılaştırılması	54
Tablo 4.6	Numunelerin BPF değerleri bakımından karşılaştırılması	55
Tablo 4.7	Numunelerin BPS değerleri bakımından karşılaştırılması	56

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Şekil İsmi</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1	Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirme prosedürü	9
Şekil 2.2	BPA'nın fenol ve asetonadan sentezi	20
Şekil 2.3	BPA, BPF ve BPS'nin kimyasal yapısı	30
Şekil 4.1	Şeffaf plak gruplarında MTT yöntemi ile elde edilen primer gingival fibroblastların hücre proliferasyon % dağılımları	47
Şekil 4.2	Primer gingival fibroblast hücre hattı ile X Celligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi analizi sonuçları	48
Şekil 4.3	1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPA kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	50
Şekil 4.4	1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPF kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	50
Şekil 4.5	1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPS kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	50
Şekil 4.6	20ng/ml BPA, F, S ve 7.0 ug/ml internal std karışımına ait kromatogram	51
Şekil 4.7	20ng/ml BPA'ya ait kromatogram ve kütle spektrumu	51
Şekil 4.8	20ng/ml BPF'e ait kromatogram ve kütle spektrumu	51
Şekil 4.9	20ng/ml BPS'e ait kromatogram ve kütle spektrumu	52
Şekil 4.10	7,0 ug/ml BPA internal std'a ait kromatogram ve kütle spektrumu	52
Şekil 4.11	Numunelerde BPA değerlerinin dağılımı	54
Şekil 4.12	Numunelerde BPF değerlerinin dağılımı	55
Şekil 4.13	Numunelerde BPS değerlerinin dağılımı	56

TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER

Çifçi Özkan, E. (2021). Ortodontide Aktif Tedavi ve Retansiyon Tedavisi Boyunca Kullanılan Farklı Şeffaf Plak Materyallerinin Sitotoksik Etkilerinin ve Bisfenol Salınımlarının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Aktif ortodontik tedavi ve retansiyon döneminde kullanılan şeffaf plaklar, polietilen (PE), polietilen terefat (PET), polietilen terefat glikol (PETG), poliüretan (PU) ve polipropilen (PP) gibi polimerlerden üretilmektedir. Bu materyallerin tedavi süresince dişler, dişeti ve intraoral sıvılar ile etkileşim halinde olmaları sitotoksik etkileri ve zararlı etkileri araştırmalarla tespit edilmiş olan Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF) ve Bisfenol S (BPS) salınımları bakımından değerlendirmesini önemli kılmaktadır. Çalışmamızda 6 farklı şeffaf plak markasının [Duran (ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya), Zendura Flx (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Taglus (Laxmi Dental Export Pvt. Ltd, Mumbai, India) ve Smart Track (Align Technology, San Jose, CA, ABD), Zendura (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Essix C+ (Dentsply, FL, ABD)] sitotoksitesi, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT) yöntemi ve X Celligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile insan gingival fibroblast hücre hattı kullanılarak belirlenmiştir. Bisfenol salınımlarının değerlendirilmesinde, sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (LC/MS-MS) cihazı kullanılmıştır. MTT yöntemi ile elde edilen hücre proliferasyon yüzdeleri incelendiğinde Smart Track ve Zendura gruplarının proliferasyon yüzdeleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p = .028$, $p = .028$). X-Celligence yöntemi verileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = .063$). BPA salınımları karşılaştırıldığında Smart Track değerleri Zendura ve Zendura Flx gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p = .02$, $p = .03$) BPF değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamışken ($p = .108$); BPS değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış ($p = .002$) ve Smart Track grubunun BPS değerlerinin Zendura grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p = .001$, $p = .001$).

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Sitotoksiste, Şeffaf plak

İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER

Çifçi Özkan, E. (2021). In Vitro Evaluation of Cytotoxic Effects and Bisphenol Releases of Different Clear Aligner Materials Used During Active Treatment and Retention Treatment in Orthodontics. Doctoral Thesis, Biruni University Graduate Education Institute, İstanbul.

Clear aligners used in active orthodontic treatment and retention period are produced from polymers such as polyethylene (PE), polyethylene terephthalate (PET), polyethylene terephthalate glycol (PETG), polyurethane (PU) and polypropylene (PP). The interaction of these materials with teeth, gingiva and intraoral fluids during the treatment makes it important to evaluate their cytotoxic effects and their harmful effects in terms of Bisphenol A (BPA), Bisphenol F (BPF) and Bisphenol S (BPS) releases. In our study, 6 different clear aligner brands [Duran (ScheuDental GmbH, Iserlohn, Germany), Zendura Flx (Bay Materials LLC, Fremont, CA, USA), Taglus (Laxmi Dental Export Pvt. Ltd, Mumbai, India) and Smart Track (Align Technology San Jose, CA, USA), Zendura (Bay Materials LLC, Fremont, CA, USA), Essix C+ (Dentsply, FL, USA)] determined using the human gingival fibroblast cell line using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method and the X CELLigence real-time cell analysis system. Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS-MS) device was used in the evaluation of bisphenol releases. When the cell proliferation percentages obtained by MTT method were examined, the proliferation percentages of the Smart Track and Zendura groups were found to be significantly lower ($p = .028$, $p = .028$). When the X-Celligence method data were compared, no statistically significant difference was found ($p = .063$). When BPA releases were compared, Smart Track values were found to be statistically significantly higher than the Zendura and Zendura Flx groups ($p = .02$, $p = .03$, respectively). While there was no statistically significant difference between the groups in terms of BPF values ($p = .108$), a statistically significant difference was found between the groups in BPS values ($p = .002$) and it was observed that the BPS values of the Smart Track group were significantly higher than the Zendura group ($p = .001$, $p = .001$).

Keywords: Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol S, Clear Aligner, Cytotoxicity.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüz ortodonti pratiğinde şeffaf plaklar bir tedavi aracı olarak yer almaktadır. Şeffaf plak ile ortodontik tedavi, braketlere ihtiyaç duyulmadan dişleri kademeli olarak ideal pozisyonlarına yönlendirmek için, bilgisayar teknolojisi ile oluşturulmuş bir dizi şeffaf, plastik, hareketli plağın kullanıldığı ortodontik tedavi yöntemlerinin ortak adıdır (Joffe, 2003).

Estetik özelliğiyle öne çıkan şeffaf plaklar, dişlerin bütün yüzeylerini kaplayarak dişeti başlangıcına kadar uzanan ve böylece diş yüzeylerini kavrayarak dişleri istenen yönde harekete zorlamak suretiyle dişsel iyileşme sağlayan hareketli apearelerdir (Kravitz, Kusnoto, BeGole, Obrez, Agran, 2009). Diş hareketi elde etmek için kullanılan bu plaklar, ortodontik tedavinin bitiminde elde edilmiş olan ideal durumun korunmasında, nüksünün engellenmesinde kullanılan ‘retainer’ adı verilen retansiyon apeareyi olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Mollov, Lindauer, Best, Shroff, Tufekci, 2010).

Ortodontide kullanılan şeffaf plaklar, dişlerde istenilen hareketi oluşturabilmek amacıyla, dişleri ve 1/3 yapışık dişetini kavramaktadır. Hem ortodontik diş hareketi hem de retansiyon amacıyla kullanılan bu plakların gün boyunca en az 20 saat kullanılması gerekir (Joffe, 2003). Kullanımları esnasında ağız içi dokularla uzun süre etkileşim halinde olmaları plak materyallerinin dokularla biyouyumluluk ilişkisini daha önemli hale getirmektedir (Premaraj, Simet, Beatty, Premaraj, 2014).

Biyouyumluluk, materyalin dokularla etkileşimi durumunda zararlı etkiler oluşturmadan uyumlu olabilmesi durumunu ifade etmektedir. Günümüzde bir materyalin klinik başarısında mekanik ve estetik özellikleri kadar dokular için zararlı etki oluşturmuyor olması da oldukça büyük önem taşımaktadır (Hanks, Wataha, Sun, 1996).

Genel olarak kullanılan şeffaf plak materyalleri; polietilen (PE), polietilen terefat (PET), polietilen terefat glikol (PETG), poliüretan (PU) ve polipropilen (PP) gibi polimerlerdir (Ihssen, Willmann, Nimer, 2019). Bu plastik materyaller, ağız içi ortam değişikliklerinden etkilenebilir ve ağız içi hücreler için zararlı bazı moleküllerin salınımına neden olabilir. Bu zararlı moleküllerin başında plastik üretiminde yaygın

bir şekilde kullanılan ve tüm dünyada zehirli çevresel bileşenlerin en belirginlerinden olan Bisfenol A [(2.2-bis (4hidroksifenol) propan); BPA] gelmektedir. BPA başlıca plastikler ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılmakla beraber, poliester reçineleri, polisülfon reçineleri, poliakrilat reçineleri, fenolik reçineler, polioller, modifiye poliamid, polisülfonlar, polieterimid polivinil klorür (PVC) plastikler ve diğer tip plastiklerde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. BPA'nın oldukça fazla kullanım alanının olması, günlük hayatta bireylerin bu madde ile etkileşimde olma ihtimalini artırmaktadır (Tsai, 2006; Nam, Seo, Kim 2010).

BPA'nın insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. BPA, endokrin bozucu olarak bilinmektedir ve endokrin bozucu özelliği laboratuvar çalışmalarında gösterilmiştir (Manfo, Jubendradass, Nantia, Moundipa, F., Mathur 2014). Endokrin bozucu etkilerinin dışında infertilite, metabolik hastalıklar, kanser (nöroblastoma, meme kanseri) ve astım ile ilişkilendirilmiştir (Midoro-Horiuti, Tiwari, Watson, Goldblum 2010; Soto and Sonnenschein 2010; Rochester, 2013). BPA'nın aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve anormal karaciğer fonksiyonları gibi etkilere de neden olabileceği bildirilmiştir (Ji, Hong, Kho, Choi, 2013; Feng, Jiao, Shi, Li, Guo, et al, 2016).

2011 yılında Avrupa Komisyonunda, bu alandaki bilimsel çalışmaların sonuçları esas alınarak BPA'nın biberonlarda kullanımına kısıtlama getirilmesinin ardından, ülkemizde de 2011 yılında yayınlanan "Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2011/29)" ile BPA'nın bebekler için kullanılan polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılması yasaklanmıştır (Türk Gıda Kodeksi, 2011). BPA'nın dünya genelinde birçok ülkede kullanımının yasaklanması veya kullanımının kısıtlanması ve özellikle bebek ürünlerinde ve su damacalarında BPA'sız (BPA-free) plastik ve polikarbonat kullanımına geçilmesi ile BPA'ya alternatif olarak, birer bisfenol türevi olan Bisfenol S [bis (4-hidroksifenil) sülfon; BPS] ve Bisfenol F [bis (4-hidroksifenil) metan; BPF] kullanılmaya başlanmıştır (Gramec Skledar, Troberg, Lavdas, Peterlin Mašič, Finel, 2015). BPS ve BPF'in kullanımının artması, toksik etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmaların da artmasına neden olmuştur (Liao, Liu, Guo, Moon, Nakata, et al., 2012b; Viñas and Watson, 2013; Héliers-Toussaint, Peyre, Costanzo, Chagnon, Rahmani, 2014). Bu

Çalışmalarda, yaygın tüketim ve ticari kullanım nedeni ile gıda, kişisel bakım ürünleri ve kağıt ürünleri gibi pek çok günlük yaşamda kullanılan ürünlerde tespit edilen BPS ve BPF'in, BPA'ya eşdeğer konsantrasyonlarda havada, toprakta, yerüstü sularında ve kanalizasyon sularında bulunduğu saptanmış ve ayrıca çevresel bulaş ve insan sağlığı üzerine negatif etkileri bakımından BPA ile aynı etkide oldukları gösterilmiştir (Song, Song, Zeng, Wang, Liu et al., 2014; Yang, Lu, Zhang, Yang, Wu et al., 2014).

Literatürde, ağız içine uygulanan çeşitli dental materyallerin biyouyumluluğuyla ilgili olarak yapılmış çeşitli çalışmalar olmakla beraber, ortodontik tedavide kullanılan şeffaf plakların sitotoksik etkileri ve bisfenol salınımları ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma göze çarpmaktadır. Martina ve arkadaşları çalışmalarında, 4 farklı şeffaf plak materyalinin sitotoksik etkilerini değerlendirirken, bisfenol salınımları hakkında bir inceleme yapmamışlardır (Martina, Rongo, Bucci, Viviano, 2019). Elliades ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise tek bir marka şeffaf plak materyalinin sitotoksitite ve BPA salınımını değerlendirmiş, BPS ve BPF salınımları ise değerlendirilmemiştir (Eliades, Pratsinis, Athanasiou, Eliades, Kletsas, 2009).

Ortodontik tedavi boyunca uzun süre ağız içinde kalan plak materyali, ağız içi sıvılar ile reaksiyondadır. Bunun sonucunda plak materyalinin yapacağı kimyasal salınımın hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin saptanması ve ayrıca plak materyalini oluşturan polimerlerin, olası BPA, BPF, BPS salınımlarının araştırılması, bu bisfenol türevlerinin insan sağlığı üzerine tespit edilmiş olumsuz etkileri nedeniyle oldukça önemlidir.

Çalışmamızda, ağız içinde dişleri hizalamada kullanılan 4 farklı marka şeffaf plak materyali ile ortodontik tedavi bittikten sonra elde edilen mevcut durumun korunması amacıyla kullanılan ve 'retainer' adı verilen şeffaf plaklardan en sık kullanılan 2 farklı markanın sitotoksik etkileri incelenmiş, ayrıca çok düşük miktarlarda maddelerin çeşitli biyolojik örneklerde analizini duyarlı ve güvenilir ölçümünü mümkün kılan, sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (LC/MS-MS) cihazı kullanılarak, BPA BPF ve BPS'nin salınımları değerlendirilmiştir. Bu alışma, birden fazla şeffaf plak materyalinin sitotoksik etkilerini inceleyen aynı zamanda BPA, BPF ve BPS salınımları açısından değerlendirme yapan ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Şeffaf Plaklar

Diş hekimliğinde ortodontik tedavinin amacı, hastadaki mevcut anomaliyi tedavi ederek, tedavi sonunda, doğru bir çiğneme, konuşma, solunum fonksiyonu, estetik bir diş, çene ve yüz görünümü sağlamak ve ortodontik tedavi sonunda edinilen halin devamlılığını sağlayarak anomalinin tekrarını önlemektir (Ülgen, 2005). Bu amaca ulaşabilmek için sabit veya hareketli olmak üzere çeşitli apareylerden yararlanılır. Sabit apareyler kullanılarak yapılan tedavilerde, dişlerin üzerine yapıştırılarak sabit hale getirilen braketler ve çeşitli metal alaşımlarından elde edilmiş ark tellerinden faydalanılır. Braket ve ark tellerinin dişler üzerindeki görünürlüğü, gitgide artan estetik kaygılar nedeniyle bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle, ortodontik şeffaf plaklar şeklinde hazırlanan hareketli apareylerin kullanımı hızla artmaktadır. Dünyada ‘Clear aligner’lar olarak adlandırılan şeffaf plaklar, braketlere ihtiyaç duyulmadan dişleri kademeli olarak ideal pozisyonlarına yönlendirmek için, bilgisayar teknolojisi ile oluşturulmuş bir dizi şeffaf, plastik, hareketli plağın kullanıldığı ortodontik tedavi yöntemlerinin ortak adıdır (Joffe, 2003).

Bantlar, braketler ve teller kullanılmadan, esnek bir diş konumlandırma apareyi kullanılarak diş hareketi elde edilmesi fikri ilk olarak 1945 tarihinde Dr. H.D. Kesling tarafından ortaya konmuştur (Kesling,1945). Birkaç yıl sonra, Nahoum ve arkadaşları, termoform plastik aparey kullanarak diş pozisyonunu değiştirmeyi amaçlayan bir yöntem tarif etmişlerdir (Nahoum,1964). 1971 yılında Pontiz balmumu ile yeniden konumlandırılan bir ana model üzerinde yapılan, ‘görünmez retainer’ adı verilen termoform plastikten yapılmış bir aparey tanıtmış ve bu apareyin sınırlı diş hareketi oluşturabileceğini iddia etmiştir (Pontiz,1971). Daha sonra Sheridan ve arkadaşları, uzun dönem retansiyon için Essix apareylerini geliştirmiş ve bu apareyi kullanarak, interproksimal diş redüksiyonunu ve progresif hizalamayı içeren bir teknik oluşturmuşlardır. Bu teknik, Hillaed ve Sheridan tarafından spesifik diş hareketleri oluşturmak için tasarlanmış bir dizi özel termoform pens ile daha da geliştirilmiştir (Sheridan, LeDoux, McMinn, 1993; Hilliard and Sheridan, 2000). Kesling’in hareketli apareyleri kullanma önerisine dayanan bu teknikler geçmişte bir dereceye kadar kullanılmasına rağmen, laboratuvar işlemleri oldukça zor olması bu tekniklerin yaygın

olarak kullanımını sınırlamıştır. Sonraları 1998 yılında şeffaf plakların öncüsü olan Invisalign markası kurulmuş ve o zamandan günümüze sayısız şeffaf plak şirketi sektörde yerini almıştır.

Günümüzde, tedaviyi hasta için daha konforlu ve estetik hale getirmek amacıyla çeşitli yeni teknikler geliştirilmiştir. Bu sayede hastaların; maliyet, tedavi süresi, estetik ve konfor gibi farklı faktörlere bağlı olarak seçim yapabileceği çok sayıda alternatif oluşmuştur. Şeffaf plak tedavisi, ortodontide sabit tedaviye yeni bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Şeffaf plaklarla yapılan tedavinin hastaların özgürce istediklerini yiyip içebilmelerine imkân vermesi, sosyal ve mesleki hayattaki gereklilikte plakları çıkarabilmeleri, plakların temizliğinin daha kolay olması dolayısıyla daha az çürük riski oluşturmaları, hastanın dişleri ile ilgili diğer konservatif tedavi işlemlerinin kolayca yapılabilir olması, kopan braket ve yaralanma risklerinin olmaması, daha az randevu gerektirmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte şeffaf plakların temel avantajı; tel ve braket görüntüsünün olmayışı, yani estetik avantajdır (Weir, 2017).

2012 yılında aktif ortodontik tedavinin %11'inin şeffaf plaklarla sağlandığı tahmin edilmektedir. Bu oranın her yıl istikrarlı bir şekilde arttığı görülmektedir. 2015 yılında, piyasada 27 farklı şeffaf plak sistemi olduğu ve bu sayının hızla arttığı belirtilmektedir (Weir, 2017).

Dişsel düzeltmelerde kullanılan ve estetik özellikleriyle öne çıkan şeffaf plaklar, dişeti başlangıç bölgesine kadar bütün diş alanlarını kaplamaktadır. Şeffaf plakların hazırlanırken, hastadan alınan ağız içi ölçüler bilgisayar ortamına aktarılmaktadır. Hastanın bilgisayar ortamına aktarılan ağız içi ölçülerinden, bir yazılım programı kullanılmak suretiyle planlanan tedavi hedefine ulaşmak üzere seri plaklar üretilmektedir. Üretilen her bir şeffaf plak, dişleri hedeflenen yönde hareket ettirerek tedavi sonunda istenilen konuma ulaştırmakta, birbiri ardına takılarak kullanılan bu plakları, hasta ihtiyaç duyduğunda takip çıkarabilmektedir (Kravitz et al., 2009).

Aktif ortodontik tedavi ile elde edilen son durumun, tedavi öncesi haline dönmesini engellemek üzere, diş çevresindeki dokuların yeniden organizasyonu tamamlanana ve elde edilmiş yeni morfolojik duruma fonksiyonel adaptasyon sağlanana kadar, dişlerin tamamen pasif, kuvvet uygulamayan aygıtlarla tutulmasına,

tedavinin retansiyon (pekiştirme) fazı ve bu amaçla kullanılan apareylere de retainer (pekiştirme apereyi) adı verilmektedir (Ülgen, 2005). Şeffaf plaklar, aktif ortodontik tedavide gitgide artan bir sıklıkla kullanılmalarının yanı sıra, pekiştirme apereyi olarak pekiştirme tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu pekiştirme apareyleri şeffaf ve ince olduğundan, bu şekilde hazırlanan pekiştirme apareyleri çoğu hasta tarafından tercih edilmektedir. Şeffaf plaklar şeklinde hazırlanan pekiştirme apareyleri özellikle maksiller ark için en yaygın olarak kullanılan apareyler olup bunları kullanan hastalar, tedavilerinden, diğer tip retainerları kullanan hastalara göre daha fazla memnuniyet bildirmektedir (Mollov et al., 2010).

Şeffaf plaklar ile yapılacak ortodontik tedavi planı için; hastadan alınan ekstraoral ve intraoral fotoğraflar, radyografiler, alveoler çıkıntılar ve diş arklarının vinil polisiloksan ölçüleri ve tam bir kapanış kaydını içeren kayıtlar gerekmektedir. Şeffaf plakların hazırlanmasında kullanılacak dijital modeller, ya hastadan alınan ölçülerden elde edilen modellerin 3 boyutlu tarayıcılar ile taranması ya da direk ağız içi 3 boyutlu tarama yapılarak elde edilmektedir. Daha sonra elde edilen 3 boyutlu dijital modeller bir yazılım programına aktarılmakta, bu yazılım programı ile, dişlerin tedavi sonunda olması istenen dizilime getirilmesi sağlanmaktadır. Tedavi hedefi belirlendikten sonra, sanal model, stereolitografik bir yöntemle, reçine bir modele dönüştürülmekte ve ilgili reçine modeller üzerinde şeffaf plaklar üretilmektedir (Weir 2017). Şeffaf plak üretimi için yaygın olarak kullanılan şeffaf plak malzemeleri; polietilen (PE), polietilen terefat (PET), polietilen terefat glikol (PETG), poliüretan (PU) ve polipropilendir (PP) (İhssen et al., 2019). Bazı şeffaf plaklar vakumlu, bazıları ise basınçlı yöntemlerle oluşturulmaktadır. Her iki yöntem de apareyleri oluşturmak için hava basıncı kullanılmakta, bununla birlikte vakum oluşturma işlemi 3-14 psi basınç gerektirirken, basınç oluşturma işlemi ise 100 psi'ye kadar basınç gerektirmektedir. Plakların iç yüzeyinin ayrıntısı plağın bir diş veya ataçman yüzeyini kavraması ve kuvvet üretme kabiliyeti hava basıncına bağlıdır. Bu nedenle; daha yüksek basınç, geliştirilmiş kuvvet üretimi sayesinde daha yüksek hassasiyet ile plak üretimi sağlamaktadır (Nahoum, 2014).

Şeffaf plaklar hastaya teslim edilmeden önce, plakların ağız içindeki uyumu kontrol edilmektedir. Tüm dişler plak tarafından tamamen kavranıyorsa, tüm kenar boşlukları düzgün ve alveole yakın ise ve takıldığında dişetinde baskı oluşturmuyorsa

plak uyumlu olarak kabul edilmektedir (Miethke and Vogt, 2005). Ortodontist, hastaya, plağın nasıl takılıp çıkarılacağını, nasıl temizleneceğini ve plağı hangi sıklıkla takması gerektiğini anlatır. Şeffaf plakların aktif ortodontik tedavide takılma süresi, gün içinde, yemek içmek ve diş fırçalamak dışındaki süreci kapsamakta olup, hekim tarafından gerekli bilgilendirme yapılarak plaklar hastaya teslim edilmektedir (Weir 2017).

2.2. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk; bir maddenin, canlı dokuyla temas halindeyken, biyolojik olarak beklenmedik riskler oluşturmamasını ifade etmektedir. Diğer bir deyişle; materyalin güvenilirliği onun biyouyumluğunu ifade eder. Biyouyumlu materyaller, dokuda herhangi istenmeyen reaksiyonlar meydana getirmezler. Bir malzemenin biyouyumluluğu, o malzemeden serbestleşen bileşenler ve bu bileşenlerin hücresel seviyede meydana getirdiği etkilere bağlıdır (Tokur ve Aksoy, 2017). Canlıda kullanılan materyaller sistemik toksisite, lokal toksisite ve alerjik reaksiyonlara neden olabileceği için, bu materyallerin öngörülemeyen zararlı reaksiyonlar oluşturma ihtimalinin olmaması ve doku ile etkileşiminde tahmin edilebilir reaksiyonlar oluşturmaması önemlidir. Bir materyalin doku uyumluluğu süreye ve koşullara göre değişkenlik gösterebilir, yani önceleri biyouyumlu olan bir materyal zaman geçtikçe bu özelliğini kaybedebilir (Williams, 2008; Mallineni, Nuvvula, Matinlinna., Yiu, King, 2013).

Bir materyalin biyouyumlu olarak kabul edilebilmesi için aşağıdaki testlerin uygulanması gerekmektedir (Schmalz, 1994; Schmalz, 1998).

1. Sistemik Toksisite Testleri: Sistemik toksisitenin temel özelliği zararlı etkinin materyalin uygulandığı bölgeden uzakta ortaya çıkmasıdır. Bu durumun nedeni materyalden salınan bileşenlerin dolaşım sistemi ile taşınarak farklı bölgelere dağılmasıdır.

2. Sitotoksisite Testleri: Sitotoksisitenin tespiti için hücre kültürü kullanılır. Hücre kültürleri, dental malzemelerin dokular üzerindeki etkilerinin ve olası hasarın incelenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir.

3. Mutojenite, Genotoksisite, Kanserojenite Testleri: Kimyasalların genler üzerinde oluşturdıkları doğrudan etkiye genotoksisite denilmektedir. Değişime uğrayan genlerin gelecek kuşaklara aktarılması ise mutojenite olarak isimlendirilmektedir.

4. Östrojenite Testi: Östrojenite testinde maddenin toksik konsantrasyon altında östrojen reseptörlerine bağlanma kapasitesine bakılmaktadır. Östrojenik etkisi olduğu ileri sürülen bileşenlerden biri BPA'dır.

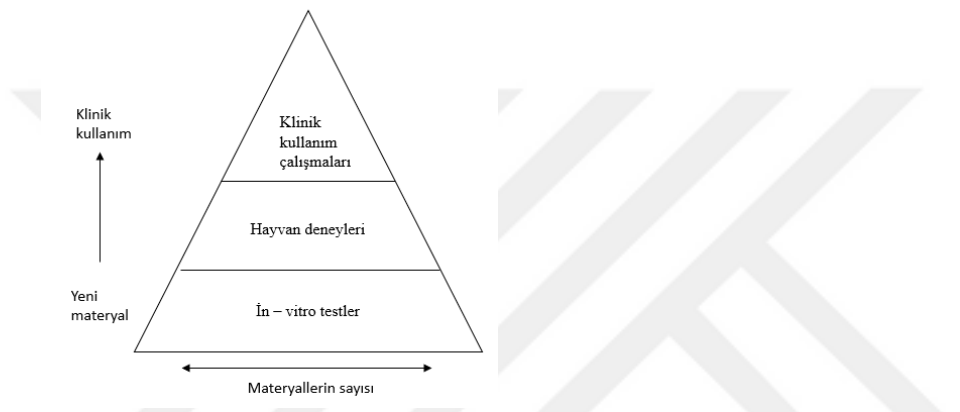
5. İmplantasyon Çalışmaları: Bu çalışmalarda dental materyaller, lokal toksisitesinin araştırılması amacıyla deney hayvanlarının dokularına yerleştirilmektedir.

6. Lokal Reaksiyonların İncelenmesi: Restoratif materyallerin tasarlanması esnasında araştırmacılar materyallerin insan organizmasındaki biyoyumluluğuyla ilgili olarak potansiyel doku reaksiyonu, bakteri sızıntısı, materyalin kütle değişimi ve ortaya çıkan gerilimler gibi çeşitli önemli konuları da incelemektedir.

Diş hekimliği uygulamalarında tüm teşhis ve tedavi işlemleri boyunca hangi malzemelerin kullanılacağına karar verilirken; malzemenin mekanik, estetik, ekonomik özelliklerine ek olarak biyolojik özellikleri de dikkate alınmalıdır. Diş hekimliğinde kullanılan dental materyaller ağız içinde; dil, dudak, yanak, dişeti, mine, dentin, pulpa ve periodonsiyum gibi çeşitli dokularla direkt temas halindedirler. Dental materyaller, kullanıldıkları bölgede bölgesel zararlı etkiler oluşturabilirken, tükürük veya inhalasyon yolu ile de dolaşıma karışarak uzak dokularda da zararlı etkilere sebep olabilmektedir. Dental materyaller, bünyelerinden salınan zararlı bileşenler nedeniyle alerjik, toksik, mutajenik, karsinojenik veya iltihabi reaksiyonlara sebep olabileceği için kullanımlarından önce biyoyumluluk değerlendirilmesi yapılmalıdır. Biyoyumluluk değerlendirilmesi için kullanılan test yöntemi, materyalin dokular üzerinde oluşturabileceği olası tüm reaksiyonları gösterebilmelidir. Biyoyumluluk testleri; temel olarak materyalin, dokunun yapısında herhangi bir değişiklik meydana getirip getirmediğinin ve getiriyorsa bu değişikliğin geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan testlerdir (Yıldırım, Bakır, Bakır, Aydın, 2017). Bu testlerin standartları ulusal (Türk Standartları Enstitüsü, 2019) ve uluslararası

(International Organization for Standardization, 2009) kuruluşlar tarafından belirlenmiştir.

Son yıllarda, biyouyumluluk alanındaki uluslararası organizasyonlar ve farklı standardizasyon kuruluşları tarafından, kullanılacak materyalin biyolojik performansını belirleyebilmek amacıyla, in vitro testler, hayvanlar üzerinde uygulanan deneyler ve klinik kullanım çalışmaları kademelerinden oluşan bir değerlendirme prosedürü tarif edilmiştir (Şekil 2.1) (Wataha, 2011). Bu prosedürün ana prensibi; kullanımı ile zararlı etkiler ortaya çıkması muhtemel olan materyallerin belirlenmesi ve bu materyallerin kullanımının durdurulmasıdır.



Şekil 2.1. Yeni materyallerin biyouyumluluk değerlendirme prosedürü (Wataha, 2011).

Materyalin biyouyumluluk değerlendirilmesinin deney ortamında değerlendirilmesi söz konusu olduğunda, kullanılan test modelinin klinik koşulları yansıtır olması doğru bir risk değerlendirilmesi açısından önemlidir (Kusdemir, Gunal, Ozer., Imazato, Izutani et al., 2011). Teste tabi tutulan materyal hücre kültüründe zararlı etkiler gösterirken canlı dokuda aynı zararlı etkiler söz konusu olmayabilir. Öte yandan bu toksik etki canlı dokuda hiç görülmeyebilir veya zamanla yok olabilir. Bu nedenle biyouyumluluğunun değerlendirildiği testlerde hücre kültürü deneyi uygulanmasını takiben klinik koşulları yansıtan başka bir in vitro test yöntemi, takibinde hayvan deneyleri ve nihai olarak in vivo deneylerin yapılması materyalin kullanıma sokulması için önemlidir (Wataha, 2001).

Materyallerin dokulara karşı olası zararlarını engelleyebilmek için öncelikle sitotoksikite mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir. Hücresel düzeydeki toksik etki, test edilen materyalin uygulanma miktarına ve uygulanma süresine göre farklı

düzeylerde gerçekleşebilen bir etkidir. Bir materyalin sitotoksik olması, hücre ölümüne sebep olması anlamına gelmektedir. Toksik maddeyle etkileşim içine giren hücreler canlılıklarını ya da çoğalma yeteneklerini kaybedebilmektedir (Galluzzi, Aaronson, Abrams, Alnemri, Andrews, 2009).

Sitotoksisite belirleme çalışmaları, bir materyalin sitotoksik etki oluşturma riskinin tespiti için yapılan çalışmalardır. Sitotoksisite çalışmaları genellikle hücre kültürü yöntemleri ile yapılmaktadır. Hücre kültürü kullanılarak yapılan sitotoksisite çalışmaları hızlı sonuç vermesi, maliyetinin az olması, kolay uygulanması, çok sayıda örneğin test edilebilmesi ve in vivo deney koşullarında yapılan deneylerden alınan sonuçlar ile paralel sonuçlar vermesi sebebiyle oldukça sık olarak kullanılmaktadır (Riss and Moravec, 2004).

Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yöntemler, temel olarak üç ana grup altında toplanmaktadır. Bu yöntemler; Kolorimetrik, lüminometrik ve enzimatik yöntemlerdir (Crouch, Kozlowski, Slater, Fletcher, 1993; Fan and Wood, 2007).

Kolorimetrik yöntemler kullanıldığında; 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları veya çeşitli boya maddelerinin uygulanması ile canlı hücrelerin renk değiştirmesi temeline dayalı olarak hücre canlılığı tespit edilmektedir. Kolorimetrik deneylerde kullanılan reaktifler, canlı hücrelerde renk geliştirerek, spektrofotometre ile hücre canlılığının ölçümünü sağlamaktadırlar (Borenfreund and Puerner, 1985; Feoktistova, Geserick, Leverkus, 2018; Riss and Moravec, 2004). Hücre canlılığını tespit etmek amacıyla kullanılan MTT analizinde; uygulanan sarı renkli tetrazolyum MTT tuzu mitokondride bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi ile reaksiyona girerek formazona dönüşmekte ve mor renk almaktadır. MTT tuzunun formazon haline dönüşmesi yalnızca canlı hücrelerde meydana geldiğinden, böylece hücre canlılığı tespit edilmiş olmaktadır (Kumar, Nagarajan, Uchil, 2018).

Luminometrik yöntemler; florometrik ve biyolüminometrik olmak üzere iki grup halinde değerlendirilir. Florometrik yöntemlerde hücre canlılığını belirlemek amacıyla, UV ışığı görünür ışık şeklinde yayan floresans maddeler kullanılmakta,

biyoluminometrik yöntemlerde ise hücre canlılığını belirlemek amacıyla lusiferaz adı verilen enzimler ve bunların bileşenleri kullanılmaktadır (Duellman, Zhou, Meisenheimer, Vidugiris, Cali et al., 2015).

Enzimatik yöntemlerde; hücrelerin zarar görmesi veya canlılıklarını kaybetmesi sonucu ortaya çıkan enzimler hücre canlılığını tespit etme ve yaşayan hücre sayısını belirlemede kullanılmaktadır. Bu enzimler içerisinde en sık kullanılan enzim, tüm hücrelerin sitoplazmasında mevcut bulunan laktat dehidrojenaz (LDH) enzimidir. Toksik etkilerle karşılaşan hücrelerde, zaman içinde hücre zarında bozulmalar meydana gelmekte ve LDH enzimi hücre zarından sızmaktadır. Bu esasa dayanarak, toksik maddeye maruz kalmayı takiben oluşan LDH enzim seviyesine bağlı olarak hücre hasar tespit edilebilmektedir (Korzeniewski and Callewaert, 1983; Riss and Moravec, 2004).

Hücre canlılığının tespitinde kullanılan Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) teknolojisinde, hücrelerin özel tasarlanmış plakalar üzerine basılmış yüksek yoğunluklu altın elektrot dizilerine net yapışmasını ölçen gerçek zamanlı bir hücre biyosensör sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde, üzerine hedef hücrelerin yapıştığı ve büyüdüğü yüksek yoğunluklu altın elektrot dizisine sahip özel olarak tasarlanmış plakalar kullanılmaktadır. Hücreler plaka yüzeyine yapışmakta ve elektriksel empedansı etkilemektedir. Bu etki, bilgisayar yazılımı tarafından ölçülerek kaydedilmektedir. Empedans değerleri, yazılım tarafından Hücre İndeksine (CI)'ne dönüştürülmekte ve bu değer yapışma ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin yokluğunda, CI sıfır olarak ölçülmekte ve hücreler yapıştıkça CI değeri artmaktadır. CI değerinin artması, yapışma seviyesinin yükseldiğini ve azalması ise hücre yapışmasının azaldığını göstermektedir. Bu nedenle, hücrede morfoloji (boyut, hacim, şekil veya yayılma), sayısı (çoğalma veya ölüm) veya hareketinde (göç veya fazlalık) değişikliklere neden olan herhangi bir yanıt 'Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi' teknolojisi kullanılarak incelenebilmektedir (Kho, MacDonald, Johnson, Unsworth, O'Carroll et al., 2015).

Kullanılacak materyalin biyoyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla kullanılacak yöntemin, test edilen materyalden serbestleşen bileşenlerin tüm biyolojik etkilerini ortaya koyması oldukça önemlidir. Şeffaf plaklar ile yapılan aktif ortodontik tedavi veya retansiyon tedavisi boyunca plakların uzun süre boyunca ağız içinde

tutuluyor olmaları, bu polimer yapılı materyallerin uzun süre boyunca dişler, dişeti ve intraoral sıvılar ile doğrudan ve/veya dolaylı olarak etkileşim halinde oldukları anlamına gelmekte ve bu durum şeffaf plak materyallerinin biyouyumluluklarının önemini arttırmaktadır (Martina et al., 2019).

2.3. Plastiklerin Genel, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Plastik, yunanca "plastikos" kelimesinden türetilmiş olup 'istenilen şekle girebilen' anlamına gelmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Plastikler; karbonun (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve diğer elementler ile meydana getirdikleri basit yapılı monomerlerdeki bağın kırılarak, polimer denilen uzun ve zincirli bir yapı haline getirilmesiyle elde edilmektedirler (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Plastikler doğada kendiliğinden var olmazlar. Monomerlerin katalizör yardımıyla, belli bir ısı ve basınç altında reaksiyona sokularak polimerlere dönüştürülmesi ile oluşturulmaktadır. Hemen hemen tüm plastikler, temelinde doğal gaz, petrol ve kömürden meydana gelmektedir. Plastik yapımında ilk olarak; bu maddeler monomerlere çevrilmekte, ikinci olarak ise; monomerler zincir oluşturacak şekilde, ısı, basınç ve birçok kimyasalın etkisiyle polimer oluşumunu sağlayacak biçimde birbirine bağlanmaktadır. Bu işleme 'polimerizasyon' denilmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Polimerizasyon ürünleri doğrudan kullanılabilmeyle beraber, yapılarına performansı, stabiliteyi veya elastikiyeti artıran, spesifik özellikler sağlayan çok çeşitli katkı maddeleri ilave edilerek kullanılmaları da mümkün olabilmektedir (Hahladakis, Velis, Weber, Lacovidou, Purnell, 2018).

Plastikler temel olarak ısılsertleşir plastikler (termosetler) ve ısılyumuşar plastikler (termoplastikler) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Lithner, Larsson, Dave, 2011). Bazı termoset ürünler termoplast özellik de gösterebilmektedir (Yaşar, 2001).

2.3.1. Isılsertleşir Plastikler (Termosetler):

Isılsertleşir plastikler oda sıcaklığında sıvı halde bulunmaktadır. Bu plastikler ısıtılmaları durumunda sadece bir defaya mahsus olmak üzere şekillendirilebilirken, bu işlem sırasında yapıları bozulduğu için tekrar ısıtılarak yeniden şekil vermek mümkün değildir. Isılsertleşir plastiklere örnek olarak; poliesterler, poliüretanlar ve epoksi reçineler verilmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

2.3.1.1. Poliester:

Endüstrinin farklı alanlarında farklı amaçlarla yaygın olarak kullanılan poliesterler, esterlerin polimerize olması ile elde edilen plastiklerdir. Bunların, katı, sıvı, termoset, termoplastik ve doymamış gibi çeşitleri mevcuttur. Katı poliesterlerin başlıca yaygın türleri polietilen terefalat (PET) ve polibutilen terefalat (PBT)'tir. Hava koşullarına ve farklı kimyasallara dayanıklılık, katılık, sertlik gibi iyi özelliklere sahip oldukları için kullanımları oldukça yaygın olan poliesterler gün ışığı ve hava koşullarından etkilenmemektedir (Yaşar, 2001).

2.3.1.2. Poliüretan (PU):

Poliüretan (PU), ısılsertleşir plastikler sınıfında yer alan plastiktir. Poliüretan polimerler sıvı, katı veya köpük gibi farklı yapılarda üretilmektedir. Poliüretanlarda hidrojen bağı vardır ve kristal yapıdadır. Poliüretanlar, yumuşak ve sert bölümlerden meydana gelmektedir. Yumuşak ve sert bölümlerin bütün malzeme içerisindeki dağılımına bağlı olarak PU'nın yapısal özellikleri değişiklik göstermektedir. Yumuşak yapıdaki kısımlar poliüretana elastikiyet özelliği sağlarken, sert yapıdaki kısımlar çapraz bağlanma meydana gelmesinde etki göstermektedir. Poliüretanlar termoset yapıda polimerler oldukları için aşınmaya karşı dirençlidir ve mekanik olarak oldukça iyi özellikleri ile öne çıkmaktadır (Yücedağ, 2006).

2.3.1.3. Epoksi Reçinesi:

Epoksi reçineler genellikle BPA ile epiklorhidridin'in karıştırılmasıyla ortaya çıkan tepkime ile oluşmaktadır. Epoksi reçinesinin ana yapısı birbiriyle bağ yapmış iki adet karbon atomuna bağlı oksijen atomudur. Endüstriyel alanlarda farklı epoksi reçineler sıklıkla kullanılmaktadır. Epoksi reçineler neme, termal değişikliklere ve kimyasal maddelere karşı yüksek dirence sahiptirler ve uzun ömürlüdür. Yapıştırma güçleri oldukça yüksek olan epoksi reçinelerin aşınmaya karşı yüksek direnç göstermeleri en önemli özellikleridir (Yaşar, 2001).

2.3.2. Isıl Yumuşar Plastikler (Termoplastikler):

Isıl yumuşar plastiklerin önemli özelliği, yapısını oluşturan makro moleküller arasında kimyasal bağların olmaması ve böylece defalarca şekillendirilebilmeleridir. Termoplastikler kimyasal çözücülerde çözülebilmektedir. Termoplastiklere ısı uygulayarak eritilip daha sonra şekil verildikten sonra yeniden ısı verilip eritilip yeni bir şekil daha verilebilmektedir. Bu termoplastiklerin geri dönüşüm prosedürlerine tabii tutulabileceği anlamına gelmektedir. Fakat tekrarlanan şekil verme işlemleri yapılarında bozulmalara neden olabilmektedir. Endüstriyel alanlarda sıkça kullanılan termoplastikler; polietilen, polietilen terefat, polivinil klorür, polipropilen, polistiren, polimetil metakrilat, poliamit ve polikarbonattır (Ekşi, 2007).

2.3.2.1. Polietilen (PE):

Polietilen polimeri, etilen monomerinin polimerize olması neticesinde oluşmaktadır. Yapısında uzun zincirli tekrar eden büyük moleküller içermektedir. Oda sıcaklığında stabil olan polietilen 93°C'nin üzerinde bazı organik çözücülerde çözünebilmektedir. Sert, sağlam, dayanıklı ve kararlılığı olan bir termoplastik olması nedeniyle endüstriyel alanlarda oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Üretilme oranı %40 olan polietilen, en fazla üretimi yapılan plastik grubudur. Polietilenlerin, düşük yoğunluklu polietilen, yüksek yoğunluklu polietilen gibi türleri bulunmaktadır (Güler ve Çobanoğlu, 1997; Ekşi, 2007).

Yüksek yoğunluklu polietilen grubunda, yan zincirlerin sayı ve uzunluklarının az olması nedeniyle ana zincirler arası mesafe kısadır. "Doğrusal" (lineer) polietilen" de denilen YYPE, %90 oranında kristal halde bulunmaktadır. Yoğunluğunun fazla olması YYPE'nin dayanıklılığının fazla olmasını sağlamaktadır. Sıcaklık dayanımı 100°C'nin üzerinde olan YYPE; esnek, dayanıklı ve saydam renkli bir plastiktir (Yaşar, 2001).

Düşük yoğunluklu polietilen (DYPE), yapısında uzun ve dallanmış yan zincirlerin bağlı olduğu bir ana zincir içermektedir. YYPE'nin aksine yapı olarak daha az oranda katı kristal yapı ihtiva etmekte ve bunun sonucu olarak sertliği daha az olmaktadır. Beyaz renkli, opak, dokunulduğunda mum hissi ve kokusu veren yapıdaki DYPE, 80-85°C'nin üzerindeki ısılarda yumuşayarak parçalanmaktadır. Neme karşı dayanıklı olan DYPE, kimyasallara karşı dayanıklı değildir (Yaşar, 2001).

2.3.2.2. Polietilen Tereftalat (PET):

Etilen glikol ile tereftalik asitin polimerizasyonu ile üretilen polietilen tereftalat, polyester ailesine ait bir termoplastiktir. Diğer termoplastik polimerlere göre daha sağlam ve dayanıklıdır. Oldukça sert yapısı darbelere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Geçirgenliği düşük, çözücülere karşı direnci yüksektir. Sahip olduğu avantajlar nedeniyle kullanım alanı oldukça geniştir. Yiyecek içecek kaplarında da kullanılan PET ambalaj sektöründe en yaygın kullanılan termoplastik grubudur (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

2.3.2.3. Polivinil Klorür (PVC):

Polivinil klorür, beyaz renkli toz veya renksiz granül halinde bulunmaktadır. Polivinil klorür kimyasallara karşı oldukça dayanıklı bir termoplastik malzemedir. Kimyasal ve fiziksel dayanıklılığı ve yalıtım özellikleri yüksek olan PVC, düşük maliyeti ile özellikle boru hatları için en çok tercih edilen termoplastik grubudur (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

2.3.2.4. Polipropilen (PP):

Polipropilen; yüksek sertliğe, iyi gerilme dayanıklılığına sahip, asit, baz ve kimyasal çözücülere, çevresel şartlara, darbelere dayanıklı, uzun ömürlü, yarı kristal yapıda bir plastiktir. Isı ve ışığın etkisiyle kolayca bozulabilmektedir. Su emiciliği ve su geçirgenliği düşüktür. Dünyada 150’den fazla üretilmiş polipropilen türü bulunması nedeniyle kullanım alanları da oldukça geniştir. Termoplastik bir plastik olan polipropilen, birçok plastik işleme yöntemi kullanılarak şekillendirilebilmektedir (Ekşi, 2007).

2.3.2.5. Polistiren (PS):

Polistiren, oda ısısında katı halde ve renksizdir. Isıtıldığında ise yumuşayarak işlenebilir hale gelebilmektedir. Amorf bir kimyasal yapıya sahip olduğu için, diğer termoplastiklere göre daha avantajlıdır. Kristal yapıya sahip olmadığı için ısıtılarak yumuşatılma işleminde harcanan enerjinin az olması, polistirenin hızlı kalıplanmasını mümkün kılmakta ve kolay işlenebilmesini sağlamaktadır (Ekşi, 2007). Akışkanlığı oldukça iyi olan ve ısısal kararlılığa sahip polistiren, endüstriyel alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yaşar, 2001).

2.3.2.6. Polimetil Metakrilat (PMMA):

Polimetil metakrilat, ısılyumuşar plastikler sınıfında yer almaktadır. ‘Akrilik cam’, ‘pleksiglas’ veya ‘fleksiglas’ olarak da adlandırılabilen bu plastik saydam renklidir. Işık geçirgenliği %90’nın üzerindeki oranlarda olan PMMA’nın optik olarak çok başarılı yapıya sahip olması kullanım alanlarını belirlemektedir. Başarılı optik özellikleri ve ısıyı daha az iletiyor olmaları, cam yerine kullanılmalarını sağlamaktadır (Yaşar, 2001).

2.3.2.7. Poliamit (PA):

Poliamitin molekül ağırlığının fazla olması ve yapısındaki çapraz kimyasal bağlar bu plastiğin dayanıklı, sert yapıda bir plastik çeşidi olmasını sağlamaktadır. Yüklere karşı dayanıklı olması çalışma süresinin de uzun olmasını sağlamaktadır. Isıyumuşar bir polimer olan poliamitler; işlenmesi kolay, dayanıklılığı yüksek, ışık geçirgenliği ve elektrik iletkenliği yüksek plastiklerdir. Poliamitler bu özelliklerine bağlı olarak, darbe ve yüklere maruz kalan makina kısımlarında, elektriksel ürünlerde, kimya sanayisinde, silah sanayisinde ve tekstilde sıkça kullanılmaktadır (Yaşar, 2001).

2.3.2.8. Polikarbonat (PC):

Polikarbonatlar, ısıyumuşar plastiklerin en önemli grubudur. Şekil verilebilmesi oldukça kolay, mekanik ve elektriksel özellikleri yüksek, saydam, açık hava ve ışıktan etkilenmeyen, su emilimi son derece az olan bir plastik grubudur. Işık geçirgenliği oldukça iyi ve hafif olup dizaynı kolaydır. Ayrıca, darbe direncinin yüksek olması ve oldukça esnek olması diğer önemli özellikleridir. Polikarbonatın yük ve darbelere karşı dayanıklı olması ve renksiz saydam yapısı yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır. En fazla olarak üretilen polikarbonat türleri BPA ve karbonil klorür (COCl_2) kombinasyonu ile üretilmektedir (Yaşar, 2001).

2.4. Bisfenollerin Genel, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

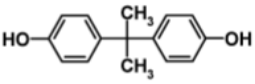
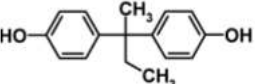
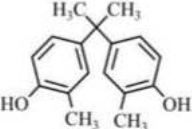
Modern plastik malzemeler, performansı, stabiliteyi, elastikiyeti artıran ve spesifik özellikler sağlayan çok çeşitli katkı maddeleri içerebilmektedir (Meeker, Sathyanarayana, Swan, 2009; Lithner et al., 2011; Hahladakis et al., 2018). En yaygın olarak kullanılan katkı maddeleri arasında plastikleştiriciler, alev geciktiriciler, antioksidanlar, asit temizleyiciler, yağlayıcılar, ışık ve ısı stabilizatörleri, pigmentler, boyalar, antistatik ve antienflamatuar ajanlar ve termal stabilizatörler gibi kimyasallar bulunmaktadır (Hahladakis et al., 2018). Bisfenoller ve BPA, kullanılan bu kimyasalların en büyük grubunu oluşturmakta ve dünya çapında en çok üretilen

endüstriyel kimyasal maddelerin içinde yer almaktadır (Vandenberg, Hauser, Marcus, Olea, Welshons, 2007; Jalal, Surendranath, Pathak, Yu, Chung, 2018).

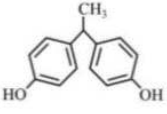
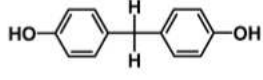
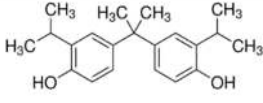
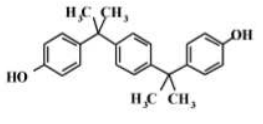
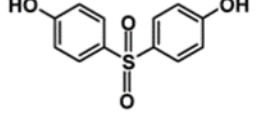
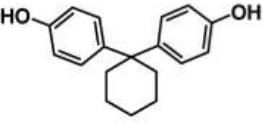
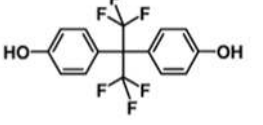
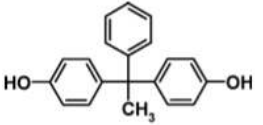
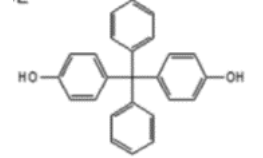
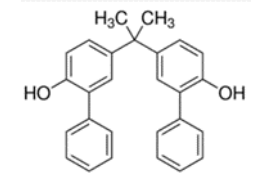
Bisfenoller genellikle plastiğin sertleştirilmesi ve dayanıklılığının artırılması için kullanılmaktadır. Bu bileşikler yaygın olarak plastik kaplar, epoksi reçineleri, yiyecek ve içecek kutuları, su boruları, elektronik ekipmanlar, mutfak eşyaları, oyuncaklar ve sıvı metalik maddelerin üretiminde kullanılmaktadır. Bisfenoller genellikle yiyecek ve içeceklerde kolayca çözülmemektedir. Bu nedenle genel popülasyon hem doğrudan hem de dolaylı olarak bisfenollere maruz kalmaktadır. Geniş kullanım alanları ve plastik ürünlerden uzun süreli salınımları nedeniyle, insanlar kasıtlı olarak maruz kalmaları da vücut sıvılarında her zaman bir bisfenol konsantrasyonu bulunmaktadır (Kim, Kumar, Kumar, Lee, Kim et al., 2019).

Bisfenoller iki adet hidroksifenil işlevsel grubu içeren kimyasal bileşikler olup, karbon ve diğer kimyasal yapıların oluşturduğu bir köprü ile birbirine bağlanmış iki fenolik halka içermektedir. Bisfenollerin birçok farklı türevi (analoğu) bulunmaktadır (Tablo 2.1). Bisfenol çeşidini belirleyen temel faktör içindeki reaktan bileşenin farklılığıdır. Bisfenol ifadesinin arkasına gelen büyük harf, içindeki reaktan bileşeni ifade etmek için kullanılmaktadır (Chen, Ike, Fujita, 2002). Örneğin, BPA'da reaktan grup aseton iken, BPF'de formaldehit, BPS'de kükürt trioksittir (Das, Lee, Cheng, 2004).

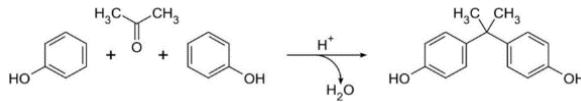
Tablo 2.1. Plastik endüstrisinde kullanılan başlıca bisfenollerin listesi (Liao et al., 2012b; Chen, Kannan, Tan, Zheng, Feng et al., 2016).

Bisfenol	Kimyasal formül	Kimyasal ad	Kimyasal yapı
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	4,4'-(Propane-2,2- diyl) diphenol	
Bisfenol B	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	2,2-Bis (4 hydroxyphenyl) butane	
Bisfenol C	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ O ₂	4-(2,2-dichloro-1-(4 hydroxyphenyl) ethenyl) phenol	

Tablo 2.1. Plastik endüstrisinde kullanılan başlıca bisfenollerin listesi (devam).

Bisfenol	Kimyasal formül	Kimyasal ad	Kimyasal yapı
Bisfenol E	$C_{14}H_{14}O_2$	1,1-Bis (4 hydroxyphenyl) ethane	
Bisfenol F	$C_{13}H_{12}O_2$	4,4'-dihydroxydiphenylmethane	
Bisfenol G	$C_{21}H_{28}O_2$	2,2-bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl) propane;	
Bisfenol P	$C_{24}H_{26}O_2$	4,4'-(1,4-phenylenediisopropylidene) bisphenol	
Bisfenol S	$C_{12}H_{10}O_4S$	4,4'-sulfonyldiphenol	
Bisfenol Z	$C_{18}H_{20}O_2$	4,4'-cyclohexylidenebisphenol	
Bisfenol AF	$C_{15}H_{10}F_6O_2$	4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenol	
Bisfenol AP	$C_{20}H_{18}O_2$	4,4'-(1-Phenylethylidene) bisphenol	
Bisfenol BP	$C_{25}H_{20}O_2$	bis(4-hydroxyphenyl) diphenylmethane	
Bisfenol PH	$C_{27}H_{24}O_2$	2,2-bis(2-hydroxy-5-biphenyl) propane	

Bisfenollerin en yaygın bilinen türevi BPA'dır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC) sistemine göre kimyasal olarak, 4,4'-dihidroksi-2,2'difenilpropan $[(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2]$ şeklinde adlandırılan BPA, asetonun iki fenol grubu ile reaksiyona sokulması ile ortaya çıkan bir kimyasal bileşiktir (Şekil 2.2) (Das et al., 2004). BPA'nın fiziksel ve kimyasal yapısına ait özellikleri Tablo 2.2'de verilmektedir.



Şekil 2.2. BPA'nın fenol ve asetondan sentezi (Das et al., 2004).

Tablo 2.2. BPA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Staples, Dom, Klecka, O'Block, Harris, 1998).

Moleküler formülü:	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molekül ağırlığı:	228.29 g/mol
Fiziksel hali ve rengi:	Beyaz, partikül veya toz
Erime noktası:	153 °C
Kaynama noktası:	220 °C
Yoğunluğu:	1.1- 1.2 kg/m ³
Suda çözünürlüğü:	120 mg/l (25°C'de)

Endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılan BPA, esas olarak polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır. Polikarbonat plastikler bazı yiyecek ve içecek kaplarında kullanılırken, epoksi reçineler ise gıda kutuları, şişe üstleri ve su tedarik boruları gibi metal ürünleri paslanma ve korozyona karşı korumak amacıyla kaplamak için lak olarak kullanılmaktadır. BPA; polyester reçineleri, polisülfon reçineleri, poliakrilat reçineleri, fenolik reçineler, polioller, modifiye poliamid, polisülfonlar, polieterimid, polivinil klorürün üretiminde de stabilite edici ve antioksidan olarak kullanılmaktadır. BPA, diş hekimliğinde Bis-GMA ve bisfenol A dimetakrilat (Bis-DMA) gibi monomerlerden elde edilen rezin içerikli dişhekimliği

materyallerinde, mühendislikte ise mühendislik plastiklerinde düşük nem emiciliği, tokluğu ve termal kararlılığı nedenleriyle sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer tip plastikler de katkı maddesi olarak BPA içerebilmektedirler (Tsai, 2006; Nam et al., 2010).

Paketleme uygulamalarında kullanılan plastik malzemeler yedi gruba ayrılmaktadır: Grup 1; polietilen tereftalat (PET), Grup 2; yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE), Grup 3; polivinil klorür (PVC), Grup 4; düşük yoğunluklu polietilen (LDPE), Grup 5; polipropilen (PP), Grup 6; polistiren (PS) ve Grup 7; akrilik, naylon, polikarbonat dahil diğer plastiklerden oluşmaktadır (Durmaz ve Giray, 2013). Kullanım alanı oldukça geniş olan BPA, Grup 3 plastiklere sertleştirici, Grup 7 plastiklere antioksidan olarak eklenmektedir (Battal, 2012). BPA yapısına katıldığı plastiğin kullanım alanına bağlı olarak, biberonlar, yeniden kullanılabilir su şişeleri, tekrar kullanılabilir gıda kapları, kağıtlar, kartonlar, elektronik ekipmanlar, otomobiller, klimalar, inşaat camları, spor koruma ekipmanları, deterjanlar, sabunlar, losyonlar, şampuanlar, bazı diş macunları dahil olmak üzere çok sayıda tüketici ürününde bulunmaktadır. Metalik yiyecek ve içecek kutularını paslanma ve korozyona karşı korumak için iç kısımları epoksi reçineleri ile kaplanmakta ve eğer eksik polimerizasyon meydana gelirse, artık BPA epoksi reçinesinden sızmaktadır. Yüksek sıcaklıklar ve asidik veya bazik çözeltilere maruz kalınması, tam polimerizasyon gerçekleşse bile BPA'nın kaplamalardan ve plastiklerden sızmasını artırabilmektedir (Vandenberg, Chahoud, Heindel, Padmanabhan, Paumgartten et al., 2012).

BPA içeren plastikler 1957'den beri satılmaktadır. Dünya genelinde yılda 3,5 milyon tondan fazla BPA üretilmektedir ve bu miktarın 100 tondan fazlası havaya salınmaktadır (Vandenberg et al., 2012). Salınan BPA kalıntıları havada, toprakta, sularda, yiyecek maddelerinde ve diğer birçok alanda olmak üzere tüm çevrede yaygın olarak bulunmaktadır (Knez, 2013).

BPA'nın çevrede oldukça yaygın olarak bulunması BPA'ya değişik şekillerde maruz kalınabilmesini mümkün kılmaktadır. BPA'ya maruz kalma en çok oral yolla gerçekleşmektedir (Vandenberg, Maffini, Sonnenschein, Rubin, Soto, 2009). İnsanlarda oral alınan BPA, gastrointestinal sistemden emilmekte ve ardından karaciğerde metabolize edilmektedir. BPA karaciğerden geçerken glukuronik asit ve sülfat ile bağlanarak ana metaboliti olan BPA glukuronit (BPAG) ve minor metaboliti olan BPA sülfata dönüşmektedir. Vücuttaki yarılanma süresi yaklaşık 6 saattir ve 24

saatte hemen hemen tümüyle idrarla atılmaktadır (Völkel, Colnot, Csanady, Filser, Dekant, 2002). Hızlı metabolize edilmesine rağmen, BPA uzun süreler boyunca dokularda birikebilmektedir (Ginsberg and Rice, 2009). BPA'ya dermal yoldan maruz kalındığında %10 kadar emilim olabileceği gösterilmiştir (US Department of Health and Human Services, 2008) BPA'nın yılda yaklaşık 100 tonunun atmosfere salındığı bildirilmektedir ve buna bağlı olarak inhalasyon yoluyla da temas söz konusu olabilmektedir (Vandenberg et al., 2012).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority; EFSA) raporunda, BPA'nın hiçbir yan etki göstermeyen dozu (NOAEL; No Observable Adverse Effect Level; ters etki gözlenmeyen düzey, alt limit) 5 mg/kg/gün ve bu NOAEL değerine temel alınarak kabul edilen günlük alım miktarı 0,05 mg/kg/gün olarak belirtilmiştir (European Food Safety Authority, 2006). BPA güvenilir doz düzeyi 50µg/kg/gün olarak belirtilmiş olmasına rağmen, araştırmalar çok daha az miktarların dahi sağlık üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir (Newbold, Jefferson, Padilla-Banks, 2009).

Bisfenollerin günlük olarak kullanılan birçok üründe yer alması sebebiyle, insanlar ve hayvanlar, doğrudan veya dolaylı yollarla, yaşamlarının prenatal döneminden son anına kadar bisfenollere maruz kalmaktadırlar. BPA, yüksek hacimlerde üretilmesi ve yaygın kullanımı nedeniyle, canlılar üzerindeki etkileri en çok araştırılan bisfenol türevi olmuş ve yapılan birçok araştırmada BPA'nın birçok canlıda sağlık üzerindeki zararlı etkileri gösterilmiştir (Crain, Eriksen, Iguchi, Jobling, Laufer et al., 2007; Vom Saal, Akingbemi, Belcher, Birnbaum, Crain et al., 2007). Çeşitli çalışmalarla kanıtlanan olumsuz etkilerine dayanarak, dünyada BPA'nın toksik bir bileşen olduğunu ilk deklare eden ülke Eylül 2010'da Kanada olmuştur (Durmaz ve Giray, 2013). Bunu takiben 2011 yılında Avrupa Birliği Ülkeleri ve Türkiye, 2012 yılında da Amerika Birleşik Devletleri, BPA'nın bebek biberonlarında kullanımı tamamen yasaklamışlardır. Ülkemizde BPA ile ilgili yapılan düzenlemeler Avrupa Birliği kriterlerine uyumlu olarak Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 17.01.2011 tarih 1919 sayılı yazısında, AB Komisyon kararı dikkate alınarak, "Bisfenol A maddesi kullanılarak üretilen bebek biberonlarının ithalatı ve üretiminin 1 Mart 2011 tarihinden itibaren yasaklanması, bu tarihten önce ithal edilmiş veya üretilmiş biberonların 1 Haziran 2011 tarihinden itibaren piyasaya

sunumuna izin verilmemesi" hususunun Bakanlıklarınca uygun görüldüğü bildirilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2019).

2.5. BPA'nın Sistemik Etkileri

Dünyanın en çok üretilen ve tüketilen kimyasallarından biri olması, yiyecek ve içme sularının sürekli olarak bu kimyasala maruz kalması ve bu maruz kalmanın potansiyel riskleri, BPA'nın insan sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılmasını gerekli kılmıştır (Zhao, Sheng, Zhu, Wei, Cai et al., 2010).

BPA'ya maruz kalma sonuçlarını değerlendiren çalışmalarda, BPA'ya maruz kalmanın kronik hastalıklarla ve özellikle gelişimin önemli evrelerinde davranışsal ve gelişimsel anormalliklerle ilişkilendirilebileceği gösterilmiştir (Brody, Moysich, Humblet, Attfield, Beehler et al., 2007; Braun, Kalkbrenner, Calafat., Yolton, Ye et al., 2011; Meeker, Yang, Ye, Calafat, Hauser, 2011). Çeşitli araştırmalar ile endokrin sistem üzerinde olumsuz etkileri gösterilen BPA, ayrıca infertilite, metabolik hastalıklar, kanser (nöroblastoma, meme kanseri) ve astım ile ilişkilendirilmiştir (Midoro-Horiuti et al., 2010; Soto and Sonnenschein, 2010; Rochester, 2013). Bunun dışında, kardiovasküler hastalıklar, diyabet ve anormal karaciğer fonksiyonları gibi etkilere de neden olabileceği belirtilmiştir (Ji et al., 2013; Feng et al., 2016). BPA'nın az miktarlarda bile alınmasının çeşitli dokularda farklı biyolojik etkiler oluşturabildiği ve lipofilik yapıda olması nedeniyle insanda yağlı bölgelerde birikebildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Wetherill, Akingbemi, Kanno, McLachlan, Nadal et al., 2007; Ben-Jonathan, Hugo, Brandebourg, 2009).

2.5.1. BPA'nın Endokrin Sistem Üzerine Etkisi

Canlılarda hormonların üretildiği salgı bezleri ve bu hormonların algılandığı reseptörlerin hepsine birlikte "Endokrin Sistem" ve bu sistemin işlev bozukluklarına neden olan kimyasallara "Endokrin Bozucu Kimyasallar (Endocrine Disrupting Chemicals; EDC)" adı verilmektedir (Biggsby, Chapin, Daston, Davis, Gorski et al., 1999). Endokrin bozucular, doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerdir. Bunlar, insan

ve hayvan metabolizmasında hormonları taklit ederek, hormon sentezini ve hormon reseptörlerini bozmakta ve böylece hormonların üretimi, salınımı, taşınması, etkinliği, yıkımı ve vücuttan atılımlarını etkilemektedir (Bigsby et al., 1999; Şişe, 2011). Araştırmacılar ve araştırma kuruluşları son yıllarda çeşitli test yöntemleri kullanarak birçok kimyasal madde değerlendirmişler ve böylece insanlar ve ekosistem üzerindeki ciddi etkileri olan EDC'leri tanımlamışlardır. Bu çalışmalar sonucunda BPA, insan sağlığı için olumsuz sonuçlarla bağlantılı olan bir endokrin bozucu kimyasal (EDC) olarak tanımlanmıştır (Vom Saal, Cooke, Buchanan, Palanza, Thayer et al., 1998; Vom Saal, Richter, Ruhlen, Nagel, Timms et al., 2005). Canlı vücudunda östrojeni taklit eden ve farklı etki mekanizmaları ile endokrin bozucu etki gösteren çevresel kimyasallar “ksenoöstrojen (sentetik östrojen)” olarak adlandırılmaktadır. Ksenoöstrojenlerin bazıları hormon reseptör bölgelerine bağlanarak hormon gibi davranırlarken, bazıları ise doğal hormonun reseptör bölgesine bağlanmasına engel olmak suretiyle anti-hormonal etki göstermektedir. Literatürde yer alan birçok çalışma sonucuna göre BPA, insanlar ve hayvanlar için endokrin bozucu etkisi (ksenoöstrojenik etkisi) olan bir kimyasal maddedir (Bondesson, Jönsson, Pongratz, Oleab, Cravedi et al., 2009). BPA, hormonları taklit ederek endokrin bozucu etki göstermektedir. Doğal östrojen olan 17- β östradiolün etkisini taklit ederek, hem östrojen reseptörü a (ER α), hem de östrojen reseptörü b (ER β) 'ya bağlanabilir. Bu nedenle ksenoöstrojenik madde olarak tanımlanmaktadır. BPA, ER β 'ya ER α 'ya göre 10 kat daha fazla afinite göstermekte, fakat bu reseptörlere östrojene göre ~10.000 kat daha az afinite göstermektedir (Gould, Leonard, Maness, Wagner, Conner, et al., 1998; Kuiper, Lemmen, Carlsson, Corton, Safe et al., 1998). Esas östrojenik etkinin reseptör gama (ERR- γ) ile olduğu tahmin edilmektedir (Matsushima, Kakuta, Teramoto, Teramoto, Koshiha et al., 2007). BPA, doğal östrojen gibi davranarak ilgili reseptörlere bağlanmakta ve böylece hücre fonksiyonlarını bozmaktadır. Üreme ve gelişim sistemlerinin olumsuz etkilenmesine neden olarak ciddi sağlık sorunları meydana getirebilmektedir (Huang, Wong, Zheng, Bouwman, Barra et al., 2012). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ng/l düzeyindeki eser miktarda BPA'nın bile östrojenik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Watabe, Hosoya, Tanaka, Kondo., Morita et al., 2005). Östrojenitisine ek olarak, BPA östrojenlerin, androjenlerin veya tiroid hormonlarının etkilerini antagonize edebilmekte ve enzim aktivitesini veya reseptör ekspresyonunu etkileyebilmektedir (Wetherill et al., 2007). BPA'nın, östrojenik hormon sistemi dışında, androjenik hormon sistemi üzerine etkilerini değerlendirmek

üzere çoğunlukla deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, BPA'nın üreme, testis patolojisi ve özellikle spermatogenez üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir (Lakind and Naiman, 2008).

2.5.2. BPA'nın Tiroid Hormon Üzerine Etkisi

BPA'nın, tiroit hormon reseptörlerine bağlanarak tiroid hormonların işlevlerinde bozukluklar meydana getirdiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Kitamura, Kato, Iida, Jinno, Suzuki et al., 2005). İnsanlarda BPA'nın tiroit hormonları üzerine etkisi ile ilgili yapılmış çalışma sayısı azdır. Yapılan bir çalışmada 167 erkek hastanın idrar BPA düzeyleri arttıkça serum tiroit uyarıcı hormon (TSH) düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Meeker, Calafat, Hauser, 2010). Ayrıca 1346 erişkin ve 329 ergen birey üzerinde yürütülen bir başka araştırmada, bireylerin idrar BPA seviyeleri arttıkça serum TSH ve total T4 seviyelerinin azaldığını gösterilmiştir (Meeker and Ferguson, 2011).

2.5.3. BPA'nın Beyin Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Çocuklar bisfenollere maruz kalmaya daha yatkındır ve bisfenoller düşük konsantrasyonlarda (≤ 100 μg) bile hem doğum öncesi hem de çocukluk döneminde beyin gelişimi için toksik etki göstermektedir (Eilam-Stock, Serrano, Frankfurt, Luine, 2012; Harley, Gunier, Kogut, Johnson, Bradman et al., 2013; Kardas, Bayram, Demirci, Akin, Ozmen et al., 2015; Ejaredar, Lee, Roberts, Sauve, Dewey 2016; Cho, Kim, Lee, Lee, Lee et al., 2018).

Beyin gelişimi esnasında östrojen ve progesteron önemli rol oynamaktadır. BPA'nın, östrojen hormonuna benzer şekilde etkide bulunarak, beyin gelişimi esnasında cinsel farklılaşma ile ilgili alanlarda değişiklikler meydana getirdiği çeşitli hayvan deneyleri ile ortaya konmuştur (US Department of Health and Human Services, 2008). BPA'nın öğrenme zorluğu ve hafıza bozukluğu meydana getirebileceği de gösterilmiştir (MacLusky, Hajszan, Leranth, 2005).

Yetişkin fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, BPA'ya maruz kalan gruptaki yetişkin farelerin beyinlerinde, anormal neokortikal yapı ve anormal kortikotalamik projeksiyonlar tespit edilmiş ve beyin gelişiminde bazı olumsuz etkileri tetikleyebildiği bildirilmiştir (Fejerskov, Larsen, Josephsen, Thylstrup, 1979).

2.5.4. BPA'nın Obezite ve Diyabetes Mellitus ile İlişkisi

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, bisfenol toksisitesi ile obezite ve bozulmuş glikoz homeostazı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Andujar, Galvez-Ontiveros, Zafra-Gomez, Rodrigo, Alvarez-Cubero et al., 2019; Wang, Zhou, Tang, Wu, Chen et al., 2012; Trasande, Attina, Blustein, 2012). BPA'ya maruz kalan insanlarda, glikozla uyarılan insülin / C-peptit yanıtının değiştiği (Stahlhut, Myers, Taylor, Nadal, Dyer et al., 2018) gösterilmiştir. Oral veya intravenöz olarak BPA'ya maruz kalan ratlarda ise insülin seviyesinin arttığı ve insülin direnci geliştiği gösterilmiştir (Alonso-Magdalena, Vieira, Soriano, Menes, Burks et al., 2010). BPA'nın yağ dokusu hücreleri ve pankreas beta hücrelerinde bulunan östrojen reseptörlerine bağlandığı ve böylece pankreatik hücrelerde insülin salınımı için gerekli olan sinyal iletimini artırarak insülin direnci yaratabileceği gösterilmiş, BPA maruziyetinin insülin direnciyle ilişkili olduğunu belirtilmiştir (Batista, Alonso-Magdalena, Vieira, Amaral, Cederroth et al., 2012; Alonso-Magdalena, Morimoto, Ripoll, Fuentes, Nadal, 2006). Moon ve ark. ise sadece prenatal değil, aynı zamanda postnatal olarak BPA'ya maruz kalmanın insülin direncinin yanı sıra Tip 2 diyabeti de indükleyebileceğini belirtmişlerdir (Moon, Jeong, Oh, Ahn, Kim et al., 2015). Yapılan bir meta-analiz çalışmasında hem idrar hem de serum BPA düzeylerinin Tip 2 diyabeti riski ile pozitif ilişki gösterdiği bu nedenle BPA toksisitesinin artmış Tip 2 diyabeti riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hwang, Lim, Choi, Jee, 2018).

BPA'nın, ayrıca açlık ve tokluğun hormonal kontrolüne müdahale ettiği gösterilmiştir (Rönn, Lind, Orberg, Kullberg, Soderberg et al., 2014). Orta yaşlı ve yaşlı Çin nüfusu üzerine yapılan kesitsel bir çalışmada, genelleştirilmiş obezite, abdominal obezite ve insülin direnci arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (Wang, Li, Chen, Xu, Xu et al., 2012). Kim ve ark. yaptıkları meta-analiz çalışmasında,

çocuklarda BPA maruziyetinin obezite riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Kim, Lee, Kim, 2019).

2.5.5. BPA'nın Meme Dokusu ve Meme Kanseri Üzerindeki Etkisi

BPA meme dokusunda, östrojen reseptör β (ER β) ve östrojen reseptör α 'ya (ER α) bağlanır. Östrojenik etkilenim, meme kanseri gelişimi için risk oluşturan en önemli faktörlerden biridir (Takeuchi, Tsutsumi, Ikezuki, Takai, Taketani, 2004). BPA meme bezinde; biyokimyasal, hücresele ve doku seviyelerindeki gelişimi değiştirerek, özellikle karsinomların kaynaklandığı bölgeler olduğu düşünülen terminal sonlanma sayısında artış, duktal yoğunluk ve estradiole duyarlılıktaki artış ile meme kanserine karşı duyarlılığı arttırmaktadır (Muñoz-de-Toro, Markey, Wadia, Luque, Rubin et al., 2005; Durando, Kass, Piva, Sonnenschein, Soto et al., 2007). Yapılan hayvan deneylerinde, BPA'nın, meme ve prostat hücrelerini kansere yatkın hale getirmeye zorladığı gösterilmiştir (Murray, Maffini, Ucci, Sonnenschein, Soto, 2007; Ho, Tang, Belmonte deFrausto, Prins, 2006). BPA'nın östrojene bağımlı meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etkili olarak kanser riskini artırma potansiyeli olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Soto and Sonnenschein, 2010).

2.5.6. BPA'nın Pubertal Gelişim Üzerine Etkileri

Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, doğumu takiben on gün süreyle düşük ve yüksek doz BPA'ya maruz bırakılan farelerde hormonal yanıtlarda farklılıklar ortaya çıktığı ve kontrol grubuna kıyasla puberteye daha erken girdikleri tespit edilmiştir (Fernández, Bianchi, Lux-Lantos, Libertun, 2009).

İnsanlarda üzerinde yapılan, ortalama dokuz yaşında olan 192 kız çocuğunun idrar BPA seviyeleri ve pubertal gelişimleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı kesitsel bir araştırmada belirgin bir ilişki tespit edilememiştir (Wolff, Britton, Boguski, Hochman, Maloney et al., 2008). ABD'de 2010 yılında yayınlanan, 6-8 yaş aralığındaki 1151 kız çocuğu dahil edilen prospektif bir çalışmada, bireylerin pubertal

gelişimleri ve BPA düzeyleri arasında belirgin bir ilişki saptanamamıştır (Wolff, Teitelbaum, Pinney, Windham, Liao et al.,2010).

2.5.7. BPA'nın Kardiovasküler Etkileri

BPA'nın kardiovasküler fonksiyon üzerindeki etkileri toksikolojik verilerle ortaya konmamış olsa da (European Food Safety Authority,2015), yapılan bazı çalışmalarda, miyokardiyal enfarktüs, kardiyomiyopati ve hipertansif kalp rahatsızlığı gibi kardiyovasküler hastalıklarda bisfenolün rolü gösterilmiştir (Shankar and Teppala, 2012; Gao and Wang, 2014; Posnack, Brooks, Chandra, Jaimes, Sarvazyan et al., 2015). Shankar ve ark., Amerika Birleşik Devletlerinde yaşayan yetişkinlerde, sigara ve alkol kullanımı, vücut kitle indeksi, hipertansiyon, kolesterol seviyesi ve diyabet gibi durumlardan bağımsız olarak, artmış üriner BPA konsantrasyonu ile hipertansiyonun ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Shankar and Teppala, 2012). Farelerde yapılan bir çalışmada ise, BPA'nın aort düz kaslarında L tipi kalsiyum kanallarını inhibe ettiği ve BPA konsantrasyonuna bağlı olarak vasküler düz kasların gevşemesine yol açtığı gözlemlenmiştir (Feiteiro, Mariana, Gloria, Cairrao 2018).

2.5.8. BPA'nın İmmünotoksik Etkileri

Bisfenoller, çeşitli sinyal yollarını etkileyerek inflamasyonu ve immün cevabı etkiler ve bağışıklık hücrelerinin aktivitelerini hem başlatabilir hem de inhibe edebilir. Bisfenollere maruz kalma; alerji, astım, multipl skleroz gibi bağışıklık ile ilişkili hastalıkların şiddetini veya sonuçlarını değiştiren sitokinlerin ve kemokinlerin işlevini değiştirebilir (Riu, Grimaldi, le Maire, Bey, Phillips et al., 2011; Rogers, Metz, Yong, 2013; Xu, Huang, Guo, 2016). BPA'nın bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini ortaya koyabilmek için, BPA'nın potansiyel immünotoksitesini belirlendiği yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle kesin olmamakla beraber BPA'nın, insanlarda cilt hassasiyeti ortaya çıkarabileceği, doğum öncesi ve/veya doğum sonrası BPA'ya maruz kalmanın alerjik yanıtlar oluşturabileceği belirtilmiştir (EFSA, 2015).

2.5.9. BPA'nın Hepatotoksik Etkileri

BPA maruziyeti; oksidatif stres, mitokondriyal bozukluk ve inflamasyon oluşturmak suretiyle hepatotoksisiteye yol açabilir (Thoene, Rytel, Dzika, Wlodarczyk, Kruminis-Kaszkiet et al., 2017; Peerapanyasut, Kobroob, Palee, Chattipakorn, Wongmekiat, 2019; Dallio, Diano, Masarone, Gravina, Patanè, et al., 2019). Nicolucci ve ark., karaciğer hastalığı olan grubun, sağlıklı karaciğere sahip olan gruba kıyasla daha yüksek BPA seviyelerine sahip olduğunu, bunun da karaciğer sağlığı durumu ile BPA maruziyeti arasında bir ilişkiye işaret edebileceğini belirtmişlerdir (Nicolucci, Errico, Federico, Dallio, Loguercio, et al., 2017). Meng ve ark., prenatal BPA maruziyetinin karaciğerde, oksidatif stresi indüklediğini ve normal metabolik profili bozduğunu bulmuşlardır (Meng, Tian, Yan, Jia, Yan et al., 2019). Moon ve ark., BPA'nın lipid peroksidasyonunu indüklediğini ve glutatyon peroksidaz aktivitesini ve tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (Moon, Kim, Jung, Koo, Ann et al., 2012). BPA'ya maruz kalan insan HepG2 hepatom hücrelerinde, lipid peroksidasyonunun, mitokondriyal transmembran hiperpolarizasyonunun ve interlökin-8 ve tümör nekroz faktörü- α sekresyonunun indüklenmesi sonucunda mitokondriyal disfonksiyon meydana geldiği gösterilmiştir (Huc, Lemarie, Gueraud, Helies-Toussaint, 2012).

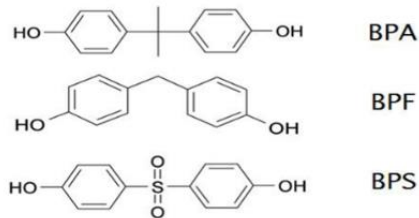
2.5.10. BPA'nın Nörotoksik Etkileri

Bisfenollere maruz kalmanın, saldırganlık, hiperaktivite, anksiyete, depresyon, otizm ve nöroinflamasyon da dahil olmak üzere hafıza ve bilişsel bozukluklardan oluşan çeşitli nörolojik işlev bozuklukları ile ilişkisini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Braun ve ark., 249 anne ve yeni doğan bebeği, gebelik, doğum ve iki yaş döneminde prospektif olarak izleyerek çocukluk davranışlarını değerlendirdiklerinde; gebelik idrar BPA seviyeleri ile bebeklerin hiperaktivite davranışları arasında, kız çocuklarda daha fazla olmak üzere, anlamlı ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (Braun, Yolton, Dietrich, Hornung, Ye et al., 2009). Harley ve ark da., yaptıkları çalışmada, çocuklarda prenatal ve erken çocukluk döneminde BPA maruz kalmanın anksiyete, depresyon ve hiperaktivite gibi davranış sorunlarına yol açtığını göstermişlerdir (Harley et al., 2013). Evans ve ark., prenatal BPA maruziyetinin, okul çağındaki

erkeklerde artan davranış sorunları ile ilişkili olabileceğini, ancak kızlarda bu ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir (Evans, Kobrosly, Barrett, Thurston, Calafat et al., 2014). Ayrıca, Otizm Spektrum Bozukluğu (ASD) olan çocuklarda artmış serum ve idrar BPA düzeyleri saptanmıştır (Stein, Schluter, Steer, Guo, Ming, 2015; Kardas et al., 2016).

2.6. BPF ve BPS'nin Kullanımı

BPA'nın, yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan toksik ve endokrin bozucu etkileri nedeniyle başta çocuk ürünleri olmak üzere, birçok üründe BPA'nın kullanımı yasaklanmış veya kısıtlanmıştır (Ji et al., 2013; Feng et al., 2016). Bu yasaklamaların sonucu olarak, endüstride yapısal olarak benzerlik gösteren diğer bisfenol türevleri, özellikle de en yaygın olarak, Bisfenol F [bis (4-hidroksifenil)metan; BPF] ve Bisfenol S [bis (4-hidroksifenil) sülfon; BPS] kullanımı tercih edilmektedir (Şekil 2.10) (Gramec Skledar et al., 2015). Özellikle “BPA içermeyen ve/veya BPA'sız” etiketi ile satılan birçok üründe BPS ve BPF kullanıldığı bilinmektedir (Rochester and Bolden, 2015).



Şekil 2.3. BPA, BPF ve BPS'nin kimyasal yapısı (Gramec Skledar et al., 2015).

BPA'nın yapısal türevi olan BPF, BPA içermeyen ürünlerde BPA'ya alternatif olarak, epoksi reçinelerinde, yüksek dayanıklılık gerektiren yapı sistemlerinde, zemin kaplamalarında, yapıştırıcılarda, inşaatlarda kullanılan sıva ve kaplamalarda ve elektrik yalıtımında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca şampuan, duş jeli, makyaj malzemeleri, diş macunları, ojeler gibi kişisel bakım ürünleri, plastik ev gereçleri, diş dolgu malzemeleri ve gıda paketlerinde de kullanılmaktadır (Rochester and Bolden, 2015). BPF'nin ev içi tozlarında, yerüstü sularda, su dibi çökeltilerde ve

kanalizasyonlarda bulunduğu da rapor edilmiştir (Fromme, K  chler, Otto, Pilz, Müller et al., 2002).

Son yıllarda sıklıkla kullanılan bir diğ  r bisfenol de BPS'dir. BPS, yüksek ısılara dayanıklılığı ve güneş ışığına dirençli yapısı nedeniyle epoksi reçineleri, konserve kutuları, kutu içecekler, termal fatura kağıtları, hazır yemek kutuları, el ilanları ve gazete materyali olarak çeşitli endüstriyel ürünlerde BPA'ya alternatif olarak kullanılmaktadır (Molina-Molina, Amaya, Grimaldi, S  enz, Real et al., 2013; Liao, Liu, Alomirah, Loi, Mohd et al., 2012a; Liao, Liu, Alomirah, Loi, Mohd., 2012c). BPS i  mekan tozlarında, yerüstü sularında, su dibi    keltirlerde ve kanalizasyon atık suları gibi çeşitli çevresel ortamlarda tespit edilmiştir (Song et al., 2014; Yang et al., 2014). BPS, BPA ile karşılaştırıldığında çevresel çözünebilme açısından daha dirençli olmasına rağmen, plastik materyal teması ile doğrudan maruziyete yol a  abilmekte ve potansiyel risk oluşturabilmektedir (Vi  as and Watson, 2013). Gerek çevrede bulunma miktarının artışı gerekse insan temasındaki belirgin artışı, BPS'nin akut ve kronik toksik etkileri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmasına neden olmuş ve bu   alışmalar, BPS'nin akut toksisite, genotoksisite ve östrojenik aktivite açısından BPA'ya benzer etkilere sahip olduğunu destekler sonuçlar ortaya koymuştur (Chen et al., 2002; Eladak, Grisin, Moison, Guerquin, N'Tumba-Byn, et al., 2015).

BPF ve BPS'nin yaygın tüketimi ve ticari kullanımı ile birlikte, yerüstü sularında ve kanalizasyon sularında BPA'ya eşdeğer konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmış ve çevresel bulaş açısından BPA ile aynı etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Song et al., 2014; Yang et al., 2014). Japonya'dan yapılan bir çalışmada, bir dizi bisfenol  n biyolojik olarak bozulmaları karşılaştırılmış ve BPF ve BPS'nin bozulmaya BPA'dan daha dirençli olduğunu gösterilmiştir (Ike, Chen, Danzl, Sei, Fujita, 2006).

BPS ve BPF'nin biyolojik ve farmakokinetik mekanizmalar açısından BPA ile benzer özelliklere sahip olmaları ve moleküler yapısındaki benzerlik göz önüne alındığında; bu bileşiklerin, BPA'ya benzer çevresel davranış, toksisite ve maruz kalma yollarına sahip olmaları beklenmektedir (Chen et al., 2002; Liao et al., 2012b; Eladak et al., 2015). Bu sebeple, BPS ve BPF'nin akut ve kronik toksik etkilerini konu alan in vitro ve in vivo çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir.

BPF, BPS ve BPA'nın potansiyel ve etki mekanizmalarının doğrudan karşılaştırılmasını sağlamak amacıyla yapılmış olan çok sayıda çalışmada, BPF ve / veya BPS'nin oluşturduğu etkilerle BPA'nın oluşturduğu hormonal etkiler karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar, BPS ve BPF östrojenik etkilerinin BPA'nın östrojenik etkisi ile aynı büyüklükte olduğunu göstermiştir (Rochester and Bolden, 2015). BPS ve BPF'nin hormonal etkilerini inceleyen çalışmalarda, BPS ve BPF'nin hormonal olarak BPA kadar aktif olduğu gösterilmiş, BPF ve BPS, BPA'nın yapısal analogları olması nedeniyle etki mekanizmalarının benzer olmasının şaşırtıcı olmadığı sonucuna varılmıştır (Liao et al., 2012b).

BPS ve BPF'in zararlı etkileri az olsa bile, bu bileşiklerin daha güvenli olup olmadığı belirsizdir; çünkü birçok bilim insanı endokrin bozulmasına “eşiksiz” bir yaklaşımı savunmuştur, çünkü eşikler gelişim sırasında değişebilir veya değerlendirilmesi çok zor olabilmektedir (Munn and Goumenou, 2013).

BPS ve BPF'in in vivo etkileri ile ilgili az sayıda çalışma olmakla beraber, bu kimyasalların endokrin bozucu ve üreme sistemi üzerine toksik etkileri gösterilmiştir. BPS'nin, kemirgenlerde uterus büyümesini ve balıklarda üremeyi bozduğu (Yamasaki, Noda, Imatanaka, Yakabe, 2004; Ji et al., 2013; Naderi, Wong, Gholami, 2014) ve BPF'nin dişi kemirgenlerde östrojenik etkileri ve erkek kemirgenlerde androjenik etkileri olduğu belirtilmiştir (Stroheker, Chagnon, Pinnert, Berges, Canivenc-Lavier, 2003; Stroheker, Picard, Lhuguenot, Canivenc-Lavier, Chagnon, 2004; Yamasaki et al., 2004; Higashihara, Shiraishi, Miyata, Oshima, Minobe et al., 2007). İn vitro verilerin çoğu BPS ve BPF'nin östrojenik ve bir dereceye kadar antiandrojenik etkilerini desteklemekle beraber, bir in vitro çalışma BPS'nin BPA'ya benzer androjenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Molina-Molina et al., 2013).

BPF maruziyetinin tiroid ağırlığını ve tiroid hormonu konsantrasyonlarını değiştirdiğini, hematolojik parametrelerde ve enzim ekspresyonunda değişikliklere neden olduğunu gösteren (Higashihara et al., 2007) ve ayrıca sitotoksisite, hücresel işlev bozukluğu, DNA hasarı ve kromozomal anormallikler gibi in vitro etkileri olduğuna işaret eden çalışmalar (Nakagawa and Tayama, 2000; Cabaton, Dumont, Severin, Perdu, Zalko et al., 2009; Audebert, Dolo, Perdu, Cravedi, Zalko, 2011; Pisapia, Del Pozzo, Barba, Caputo, Mita et al., 2012; Lee, Liu, Takeda, Choi, 2013) literatürde yer almaktadır.

BPS maruziyetiyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda, BPS'nin serum albüminlerine bağlandığı gösterilmiştir (Mathew, Sreedhanya, Manoj, Aravindakumar, Aravind, 2014; Peyre, Rouimi, de Sousa, Héliès-Toussaint, Carré et al., 2014). Yapılan çalışmalarda BPS'e maruz kalmanın DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Hashimoto and Nakamura, 2000; Fic, Žegura, Sollner Dolenc, Filipic, Peterlin Masic, 2013; Lee et al., 2013).

İdeal olarak; bir kimyasal maddenin yerini almak üzere kullanılacak olan herhangi bir kimyasal maddenin inert veya orijinal kimyasaldan en azından çok daha az toksik olması beklenmektedir. Bu nedenle, bu kimyasal analoglar toksik kimyasalların yerine kullanılmadan önce değerlendirilmelidir (Rochester and Bolden, 2015). Her ne kadar BPA analogları olarak kullanılan BPF ve BPS gibi diğer bisfenol analoglarının çok daha az toksik oldukları düşünülse de bisfenol analoglarının moleküler yapısındaki benzerlik göz önüne alındığında, BPA'nın çevresel davranışına benzer şekilde çevresel davranış, toksisite ve maruz kalma yollarına sahip olmaları muhtemeldir. Yapılan çeşitli çalışmalarda BPA'nın analogu olan BPF ve BPS'nin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri gösterildiğinden, bu iki kimyasalın BPA'nın yerine sıkça kullanımı insan sağlığı açısından endişe verici olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (Liao et al., 2012b).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deneyisel Çalışmalar İçin Örneklerin Seçilmesi

Bu çalışmada, aktif ortodontik tedavide kullanılan 4 farklı şeffaf plak markası [Duran (ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya), Zendura Flx (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Taglus (Laxmi Dental Export Pvt. Ltd, Mumbai, India), Smart Track (Align Technology, San Jose, CA, ABD)] ve retansiyon apereyi olarak kullanılan 2 farklı şeffaf plak markası [Zendura (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Essix C+ (Essix® (Raintree Essix, Inc., 4001 Division St, Metairie, LA-USA)] olmak üzere altı farklı şeffaf plak markası kullanılmıştır. Şeffaf plaklar Biruni Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim dalından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan şeffaf plak marka ve içerikleri Tablo 3.1’de verilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılacak olan şeffaf plak markaları ve içerikleri.

Marka	Materyal içeriği	Tedarikçi
Duran	Polietilen terefatat glikol (PETG)	Scheu-Dental GmbH
Essix C+	Polipropilen/etilen kopolimer (>95%), stabilizatörler (<5%)	Raintree Essix, Inc.
Smart Track	Poliüretan, metilen difenil diisosianat ve 1,6-hexanedial, katkı maddeleri	Align Technology, Inc.
Zendura	Poliüretan resin	Bay Materials LLC
Taglus	Polietilen terefatat glikol (PETG)	Laxmi Dental Export
Zendura Flx	Poliüretan resin ve kopoliester	Bay Materials LLC

3.1.2. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler

Analitik Kolon (Jasem BPA HPLC Analitik Kolonu)

Autosampler System,1290

Balonjoje (Isolab, Almanya)

Binary Pump System,1290

Cam Pasteur pipeti (HBG HHH, İtalya)

CO2 İnkübatör (Binder, Almanya)

Derin dondurucu (-20°C) (Beko, No Frost, Türkiye)

Distile su cihazı (Elga Labwater Veolia, Fransa)

Elektronik hassas terazi (Mettler Toledo, ABD)

ELİSA Okuyucu (SPECTROstar® Nano, Almanya)

Etüv (NuAire, Inc. Plymouth, ABD)

Falkon tüp (Corning, ABD)

İnverted ışık mikroskobu (Nikon ECLIPSE TS 100, Japonya)

JuLI™ FL, Fluorescence Cell History Recorder (NanoEnTek Inc., G. Kore)

LC/MS/MS kolonu (Agilent SB-C18, 3X50 mm, ABD)

LC/MS/MS kolonu (Agilent PFP, 100X30 mm, ABD)

Manyetik karıştırıcı (Wisd Wisestir MSH 320, Almanya)

Santrifüj (Hettich Zentrifugen, Rotofix 32A, Almanya)

Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC/MS/MS) Cihazı (Agilent 6470 Triple Quad, Amerika)

Steril Kabin (Microtest, Class II-A2, Türkiye)

Su banyosu (Microtest, MCS 30, Almanya)

Pipet ucu (Agilent, Amerika)

Repeater pipet (Eppendorf, Almanya)

T25 Flask (Corning, ABD)

Viial (Agilent, Amerika)

Viial kapağı (Agilent, ABD)

Vorteks (Heidolph, Almanya)

X CELLigence® RTCA DP (Double Plate) İstasyonu (ACEA Biosciences Inc., Amerika)

10-100-1000ul micropipette (Axypet, Isolab) (Eppendorf, Almanya)

96 kuyucuklu kültür kapları (Nunc, Roskilde, Danimarka)

3.1.3. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antibiotic (Sigma, Cat no: A5955)

Bisphenol A (239658, Sigma Aldrich ABD)

Bisphenol F (51453, Sigma Aldrich, ABD)

Bisphenol S (103039, Sigma Aldrich, ABD)

Bisphenol A-D16 (451835, Sigma Aldrich, ABD)

Dulbecco'nun Minimal Essential Medium (DMEM) (Biochrom KG, Berlin, Almanya)

Fetal Bone Serum (FBS) (Biochrom AG, Almanya)

Fosfat tampon solüsyonu (PBS) tablet (İnvitrogen, California, ABD)

Jasem Bisfenol A analiz kiti (Sigma Aldrich, ABD)

Mobil Fazlar (Jasem BPA Mobil Faz A, Jasem BPA Mobil Faz B, Sigma Aldrich, ABD)

Normal saline (%0,9'luk İzotonik NaCl) (Osel İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye)

Trypsin-EDTA Solution (0.25 % Thermo, ABD)

3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT) (Sigma Chemical Co., Milan, İtalya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması ve Yaşlandırılması

Çalışmamızda, Duran (ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya), Zendura Flx (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Zendura (Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD), Essix (Essix® (Raintree Essix, Inc., 4001 Division St, Metairie, LA-USA) Dentsply, FL, ABD), Taglus (Laxmi Dental Export Pvt. Ltd, Mumbai, India) ve Smart Track (Align Technology, San Jose, CA, ABD) olmak üzere 6 farklı markaya ait şeffaf plak kullanılmıştır. Kullanılan plaklar ve içerikleri Tablo 3.1 'de verilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan şeffaf plaklar Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) 10993-5 normu tarafından tanımlanan şekilde üretici firma tarafından önerilen yöntemler kullanılarak sterilize edilmiştir (ISO, 2009). Numunelerin ağırlığı ile seyreltilerin hacmi arasındaki oran ISO parametreleri tarafından önerildiği gibi 0.1 g/ml olacak şekilde hazırlanmak üzere, her 0,1 gramlık plak parçası için 1ml salin (% 0.9 NaCl izotonik) kullanılarak deney solüsyonları hazırlanmıştır. Çalışmamızda 8 haftalık yaşlandırma periyodu kullanılmıştır. Hazırlanan numuneler sabit koşullar altında, her biri ayrı hava geçirmez cam deney kaplarında, 37 °C'de, 8 hafta boyunca normal salin içerisinde bekletilmiştir. Herhangi bir şeffaf plak içermeyen normal salin negatif kontrol olarak kullanılabilme amacıyla, aynı koşullar altında inkübe edilmiştir. Numuneler, analizleri yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Şeffaf Plakların Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

3.2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Şeffaf plakların sitotoksitesini değerlendirmek üzere insan gingival fibroblast hücre hattı (PCS-201-018, ATTC; Manassas, Virginia, ABD) kullanılmıştır.

Kullandığımız hücreler Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından temin edilmiştir.

Fibroblast hücreleri, 37 °C'de, %5 karbondioksit içinde, %10 fetal sığır serumu (FBS) Biochrom AG, Almanya) ile desteklenen, 2 mM glutamin, 100 U/mL penisillin, 100 µg/mL streptomisin takviye edilmiş Dulbecco'nun Minimal Essential Medium (DMEM) (Biochrom KG, Berlin, Almanya) besi ortamını ihtiva eden T25 cm² hücre kültürü üretme kabına (flask) yerleştirilerek kültüre edilmiştir. Medyumlar 2 günde bir tazelenerek kontrolleri düzenli olarak yapılmıştır. Yedinci günün sonunda hücrelerin üremeleri ve flask tabanında dağılımları, inverted ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Birincil kültürler uygun hale geldiklerinde kültür kabındaki besiyeri (medyum) aspire edilmiştir. Hücresel atıklar ve serum artıklarını uzaklaştırmak üzere hücrelerin yüzeyi fosfat tampon solüsyonu (PBS) (İnvitrogen, California, ABD) (pH=7,0) ile yıkanmıştır. Flaska, tripsin/ etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (%0.05 tripsin + %0.02 EDTA, Thermo, Almanya) solüsyonundan 1ml ilave edilerek çalkalanmak suretiyle her hücreye ulaşması sağlanmış, daha sonra 37⁰ C de etüvde (NuAire, Inc. Plymouth, ABD) 5-10 dk inkübe edilmiştir. Hücreler flask tabanından ayrılınca flask içine %10 serum içeren yeni medyum ilave edilmiştir. Pipet ile karıştırıldıktan sonra 15.000 rpm de 3 dakika süreyle santrifüj (Hettich Zentrifugen, Rotofix 32A, Almanya) edilmiştir. Süpernatant kısım alındıktan sonra pelet içerisindeki hücreler 37⁰ C' de %10 serum ve antibiyotikli DMEM medyum ile homojenize edilmiş ve fibroblastlar 96 kuyucuklu plaklara ekilerek pasajlama işlemi tamamlanmıştır. Kültür kapları hergün düzenli olarak kontrol edilerek medyumlar 2 günde bir yenilenmiş ve düzenli olarak pasajlama işlemi tekrarlanarak %80 yoğunluğa ulaşana kadar tek bir tabaka halinde çoğaltılmıştır. Bütün işlemler kontaminasyon riskine karşı steril kabinde (Microtest, Class II-A2, Türkiye) yapılmıştır.

3.2.2.2. Primer Gingival Hücrelerinin Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

Hücreler, yeni bir T25 flaskına ekildikten sonra JuLI™ FL altına yerleştirilmiş ve parlak ışık altında 48 saat süreyle monitorize edilerek morfolojileri incelenmiştir.

3.2.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Flask tabanının yüzeyini %90-95 oranında kaplayan hücreler pasajlanarak flask tabanından ayrılmış ve taze medyum kullanılarak hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Doksan altı kuyucuklu kültür kaplarına (Nunc, Roskilde, Danimarka) 100 µl/8.000 hücre yoğunluğunda olacak şekilde hücre süspansiyonu eklenmiştir. Yirmi dört saat sonra DMEM medyum uzaklaştırılmış ve yerine yeni medyum eklenerek yeniden 37°C 'de %5 CO₂'li inkübatörde (Binder, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol kuyucuklarına ise sadece hücre içeren 100' µl lik DMEM medyumunu konulmuş ve 24 saatlik inkübasyon süresi sona erdiğinde hücrelerin tüm kuyucukların tabanını tamamen doldurup doldurmadığı inverted ışık mikroskobu (Nikon ECLIPSE TS 100, Japonya) ile kontrol edilmiştir.

Hücrelere salin içerisinde hazırlanan şeffaf plak eluatu 1:1 oranında seyreltilerek ilave edilmiş ve 37 °C'de, %5 karbondioksitli ortamda 48 saat inkübe edilmiştir. Kontrol hücreleri de plak eluatu içermeyen salin çözeltisi ile hazırlanmış, salinin toksik olup olmadığının belirteci olarak ayrıca plak eluatu içermeyen DMEM de kontrol olarak hazırlanmıştır. Yetmiş iki saatlik inkübasyon süresi sonunda MTT analizi uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edilmiş ve 4 saat 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazon kristallerinin çözünebilmesi için her bir kuyucuğa 100 µl sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu eklenmiş ve 16-18 saat CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında (SPECTROstar® Nano, Almanya) 540 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Herhangi bir şeffaf plak içermeyen DMEM ortamında kültürlenmiş hücrelerin optik yoğunluğu, %100 hücre canlılığı için bir negatif kontrol ve deneydeki sitotoksite seviyesinin belirlenmesi için bir referans olarak kullanılmıştır. Bu test istatistik hesaplamaları için 6 kez tekrar edilmiştir.

Her bir test materyalinin hücre proliferasyon yüzdeleri, optik okuyucudan elde edilen değerler Vande Vannet ve ark.'nın ortaya koymuş olduğu aşağıdaki formüle konularak hesaplanmıştır (Vande Vannet, Mohebbian, Wehrbein, 2006):

Hücre canlılığı (%) = (Test grubunun optik yoğunluğu /Hücresel kontrol grubunun optik yoğunluğu) ×100

Hücre canlılığı Ahrari ve ark.'nın sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir (Ahrari, Tavakkol Afshari, Poosti, Brook, 2010). Buna göre;

%90'dan fazla hücre canlılığı: sitotoksosite yok

%60-%90 hücre canlılığı: hafif sitotoksosite

%30-%59 hücre canlılığı: orta sitotoksosite

%30'dan az hücre canlılığı: şiddetli sitotoksosite şeklinde değerlendirilmiştir.

MTT analizi ile değerlendirilen hücre canlılığı, X CELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) kullanılarak ayrıca değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Gerçek-zamanlı hücre analiz sisteminin “E-plate”lerine 200 µl/40.000 yoğunluğunda HGF hücresi ekilmiştir. Hücrelerin plakaya tutunmaları için 24 saat beklenildikten sonra ağırlığı ile seyreltilerin hacmi arasındaki oran, ISO parametreleri tarafından önerildiği gibi 0.1 g / ml olacak şekilde normal salin içinde hazırlanmış ve sabit koşullar altında, her biri ayrı hava geçirmez cam deney kaplarında, 37 °C'de muhafaza edilmiş ve şeffaf plak eluatları hücrelerin üzerine eklenmiştir. Eklenen eluatların varlığında hücrelerin proliferasyonu takip edilmiştir. Hücre sayısının proliferasyonla artmasıyla birlikte “E-plate”e yapışan hücre miktarı artmış ve empedansda değişiklik oluşmuş olup, ortaya çıkan bu değişiklikler 96 saat boyunca tespit edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak hücre artışı sayısı tespit edilmiş ve farklı zamanlardaki proliferasyonları hesaplanmıştır. Bu şekilde eluatların hücre proliferasyonuna bağlı olarak sitotoksosite değerlendirilmesi sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca, herhangi bir şeffaf plak eluatına maruz bırakılmayan HGF hücreleri, kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler 4 kez tekrarlanmıştır.

3.2.3. Şeffaf Plakların BPA, BPF, BPS Salınımının Değerlendirilmesi

Deney grubundaki şeffaf plaklardan elde edilen eluatlardaki BPA, BPF, BPS miktarını belirlemek amacıyla sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi kullanılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan cihazlar; Agilent 6470 Triple Quad LC-MS/MS System, 1290 Binary Pump System, 1290 Autosampler System'dir.

3.2.3.1. BPA, BPF, BPS Analizi İçin Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Kimyasal olarak BPA (239658, Sigma Aldrich), BPF (51453, Sigma Aldrich), BPS (103039, Sigma Aldrich), Bisphenol A-D16 (451835, Sigma Aldrich), Jasem Bisfenol A analiz kiti kullanılmıştır.

Kalibratör standart olarak kullanılmak üzere BPA, BPF, BPS analitlerinin her birinden 1000mg/L (ppm) metanol içerisinde tekli ana stok çözeltilerinden hazırlanmıştır. Daha sonra tekli ana stok çözeltileri kullanılarak 1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) methanol içerisinde 6 farklı konsantrasyonda karışımlar hazırlanmış ve bu karışımlar kalibratör olarak kullanılmıştır.

3.2.3.2. BPA, BPF, BPS Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması

Analiz için oda sıcaklığına getirilen şeffaf plak eluatlarından, otomatik pipet yardımı ile HPLC viali içerisine 250 µL numune alınmış, üzerine 25 µL internal standart ve 225 µL Jasem reaktif-1 eklenip 10 sn santrifüj edilmiştir. Daha sonra LC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir.

3.2.3.3. BPA, BPF, BPS Analizi İçin LC/MS-MS Cihazı Çalışma Koşulları

Çalışmamızda BPA, BPF, BPS analizi sonuçlarını elde etmek üzere ‘Agilent 6470 Triple Quad LC-MS/MS System’ cihaz kullanılarak, Jasem BPA HPLC Analitik Kolonu ile çalışma sonuçları elde edilmiştir.

Çalışmamızda MS/MS, elektrosprey (ESI) negatif iyon çoğaltıcı reaksiyon görüntüleme modunda (multiple reaction monitoring, MRM) çalıştırılmıştır. Optimize edilen elektron spre y iyonizasyon (ESI) koşulları ise şöyledir: Sheath gaz ve auxiliary gaz (Azot, 99.995%) akış hızı 10 L/dk; sheath gaz ve auxiliary gaz sıcaklıkları sırasıyla 400°C and 350°C; kapiler voltaj 2500 V (negatif); nozzle voltaj 500 V (negatif). Kolon sıcaklığı 20°C’ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL, analiz süresi 9.0 dakikadır. LC-MS/MS metot koşulları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. LC-MS/MS metot koşulları.

Agilent 6470 LC-MS/MS	
İyon Kaynağı	ESI (Agilent Jet Stream)
Polarite	Negatif
Gaz Isısı	350 °C
Gaz Akışı	10 L/min
Nebulizer Basıncı	40 psi
Sheath Gaz Isısı	400 °C
Sheat Gaz Akışı	10 L/min
Kapiller Voltaj	2500 V (Negatif)
Nozzle Voltaj	500 V
Çözünürlük MS1 ve MS2	Unit çözünürlük

3.2.3.4. Geliştirilen LC-MS-MS Yönteminin Validasyonu

LC-MS/MS cihazı ile deney örneklerinde BPA, BPF, BPS analizi için geliştirilen yönteme ilişkin validasyon parametreleri olarak, cihaz ile ölçülebilen en düşük miktar (Limit of detection; LOD) ve miktarlandırılabilen en düşük değer (Limit of quantification; LOQ) aşağıdaki formüller kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 3.3).

LOD= Cihaza verilen en düşük konsantrasyon değeri x 3 / (cihazdan elde edilen sinyal/gürültü oranı)

LOQ= Cihaza verilen en düşük konsantrasyon değeri x 10 / (cihazdan elde edilen sinyal/gürültü oranı)

Tablo 3.3. LC-MS/MS cihazı ile BPA, BPF, BPS analizi için belirlenen, LOD ve LOQ değerleri.

Analit	LOD (ug/L)	LOQ (ug/L)
BPA	0.086	0.34
BPF	0.052	0.21
BPS	0.013	0.05

3.2.4. İstatiksel Analiz

Çalışmamız için gerekli örneklem büyüklüğü, 6 farklı marka şeffaf plak arasında sitotoksosite ve bisfenol (A/F/S) salınımı bakımından farklılığın araştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi kullanılması temel alınarak hesaplanmıştır. Standardize etki büyüklüğü $f=1.14$ için, Tip-I hata $\alpha=0.05$ ve istatistiksel güç .95 olarak alındığında her bir grup için 4 tekrar gereklidir. Örneklem büyüklüğü G*Power v. 3.1.9.4 programında hesaplanmıştır.

Her grup içindeki ölçümler ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) değerleri ile özetlenmiştir. Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis testi ile incelenmiştir. Kruskal Wallis testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu, bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu saptamak üzere, ikili grup karşılaştırmaları için post-hoc Dunn-Bonferroni testi kullanılmıştır. Plak gruplarındaki hücre proliferasyon % medyan değerlerinin %100'den farklılığını test

etmek üzere tek örneklem Wilcoxon Signed Rank testi kullanılmış, $p < .05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizler IBM SPSS Statistics for Windows, Versiyon 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Sitotoksikite Bulguları

Çalışmamızda plakları beklettiğimiz normal salinin hücre kültüre ettiğimiz DMEM ile arasında toksik fark olmadığını belirteci olarak sadece hücre içeren DMEM solüsyonu kontrol DMEM grubu olarak kullanılmıştır. Şeffaf plak içermeyen boş salin ile hücreli DMEM'in birleştirilmesi ile elde edilen kontrol salin grubu ise deneye tabi tutulan gruplar arasındaki farkların tespit edilmesinde kullanılmıştır.

4.1.1. MTT Analizi Bulguları

Bu çalışmada kullanılan farklı şeffaf plak materyalleri normal salin içinde 8 hafta boyunca 37 °C hava geçirmez cam tüplerde beklemeye bırakılmıştır. Böylece elde edilen deney eluatlarının MTT yöntemi kullanılarak sitotoksik analizi yapılmış ve yaşayabilen hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

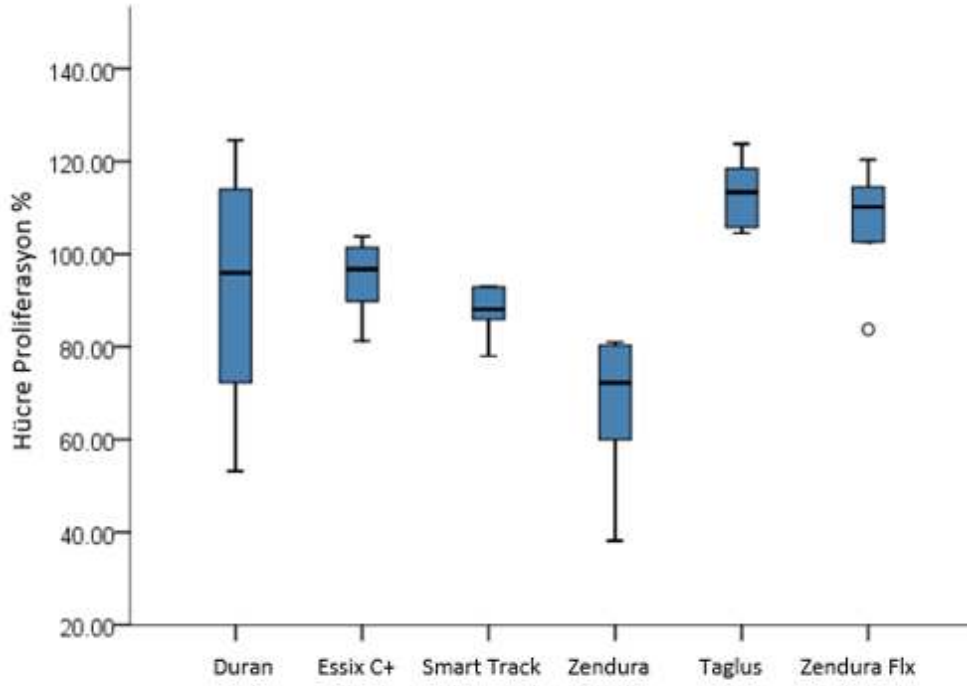
Her bir şeffaf plak gruplarında MTT yöntemi ile elde edilen Hücre Proliferasyon % medyan değerlerinin %100'den olan farkı incelendiğinde, Smart Track ve Zendura grupları %100'den anlamlı olarak düşük; Taglus grubu ise %100'den anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p = .028$, $p = .028$, $p = .028$).

Hücre proliferasyon %'si bakımından şeffaf plak grupları birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p = .001$). İkili grup karşılaştırmalarına bakıldığında; Zendura, Taglus ve Zendura Flx plaklarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (sırasıyla $p = .001$, $p = .011$) (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Şeffaf plakların MTT yöntemi ile elde edilen hücre proliferasyon %'si bakımından karşılaştırılması.

Şeffaf Plak	N	Ortalama± SS. Medyan (Min.-Maks.)	Tek örneklem testi *	Kruskal Wallis Test İstatistiği	p ^a	p ^b	p ^c	p ^d	p ^e
Duran	6	92.625±26.345 95.91(53.15-124.59)	z= 0.734; p=0.463	H(5)=21.075 ; p= .001					
Essix C+	6	94.947±8.543 96.72(81.29-103.82)	z=-0.943; p= .345		1.00				
Smart Track	6	87.662±5.535 88.05(78.01-93.03)	z=-2.201; p= .028		1.00	1.00			
Zendura	6	67.31±16.209 72.21(38.13-81.01)	z=-2.201; p= .028		.397	.456	1.00		
Taglus	6	113.183±7.459 113.32(104.51-123.77)	z=2.201; p= .028		.937	.827	.085	.001	
Zendura Flx	6	106.922±12.765 110.18(83.75-120.35)	z=1.153; p= .249		1.00	1.00	.598	.011	1.00

* %100'den farklar tek örneklem Wilcoxon signed rank testi. Kruskal Wallis testi, p<.05. Kruskal Wallis testi sonrasında istatistiksel anlamlılık bulunduğunda Dunn-Bonferroni testine göre post-hoc ikili grup karşılaştırmaarı a: Duran ile farklar, b: Essix C+ ile farklar, c: Smart Track ile farklar, d: Zendura ile farklar, e: Taglus ile farklar.

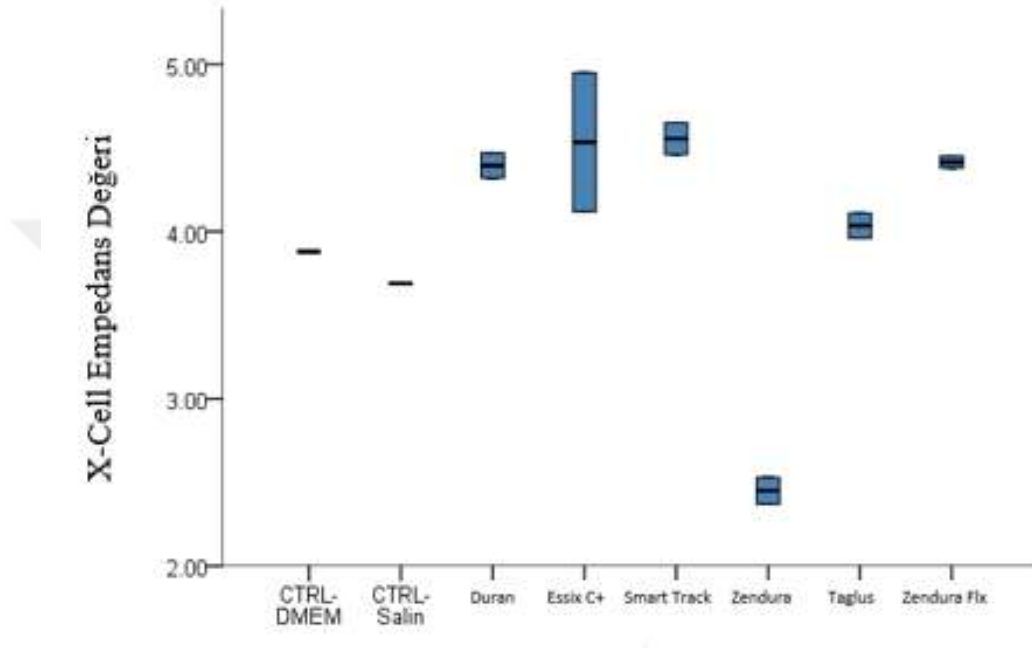


Şekil 4.1. Şeffaf plak gruplarında MTT yöntemi ile elde edilen primer gingival fibroblastların Hücre proliferasyon % dağılımları.

Ahrari ve ark.'nın sınıflandırmasına göre puanlanan (Ahrari et al., 2010) hücre canlılığı sonuçlarına göre; Zendura % 67.31 ± 16.209 hücre canlılığı ile hafif sitotoksikite gösterirken, Zendura'yı % 87.662 ± 5.535 hücre canlılığı ile Smart Track ve % 92.625 ± 26.345 hücre canlılığı ile Duran takip etmiştir. Essix C+'de % 94.947 ± 8.543 hücre canlılığı ve Zendura Flx'de % 106.922 ± 12.765 hücre canlılığı mevcut iken, Taglus % 113.183 ± 7.459 hücre canlılığı gösteren plak olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

4.1.2. X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; Rtca-Dp) Bulguları

MTT analizi ile değerlendirilen hücre canlılığı ayrıca X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) kullanılarak ikinci bir değerlendirmeye tabi tutulmuştur.



Şekil 4.2. Primer gingival fibroblast hücre hattı ile X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi analizi sonuçları.

X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) bulguları dikkate alındığında; plaklar sitotoksik etkileri bakımından Zendura (2.45 ± 0.113) > Taglus (4.035 ± 0.106) > Duran (4.395 ± 0.106) > Zendura Flx (4.415 ± 0.05) > Essix C+ (4.535 ± 0.587) > Smart Track (4.555 ± 0.134) olarak sıralanmışlardır.

Şeffaf plaklar, X-Celligence yöntemi kullanılarak elde edilen değerler bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = .063$, Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Şeffaf plakların X-Celligence yöntemi kullanılarak elde edilen değerler bakımından karşılaştırılması.

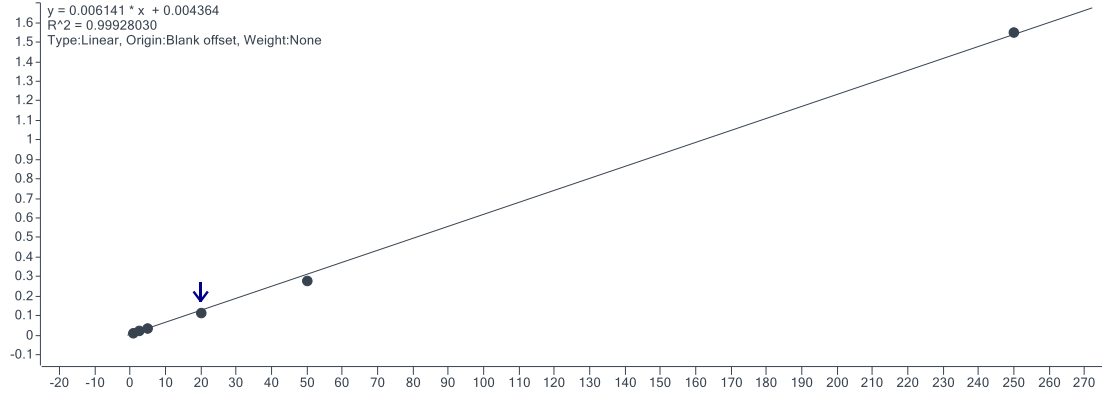
Şeffaf Plak	N	Ortalama± SS. Medyan (Min.-Maks.)	Kruskal Wallis Test İstatistiği
CTRL-DMEM	4	3.88±0 3.88(3.88-3.88)	H(7)= 13.407; p= .063
CTRL-Salin	4	3.69±0 3.69(3.69-3.69)	
Duran	4	4.395±0.106 4.4(4.32-4.47)	
Essix C+	4	4.535±0.587 4.54(4.12-4.95)	
Smart Track	4	4.555±0.134 4.56(4.46-4.65)	
Zendura	4	2.45±0.113 2.45(2.37-2.53)	
Taglus	4	4.035±0.106 4.04(3.96-4.11)	
Zendura Flx	4	4.415±0.05 4.42(4.38-4.45)	

4.2. Bisfenol Salınımı Bulguları

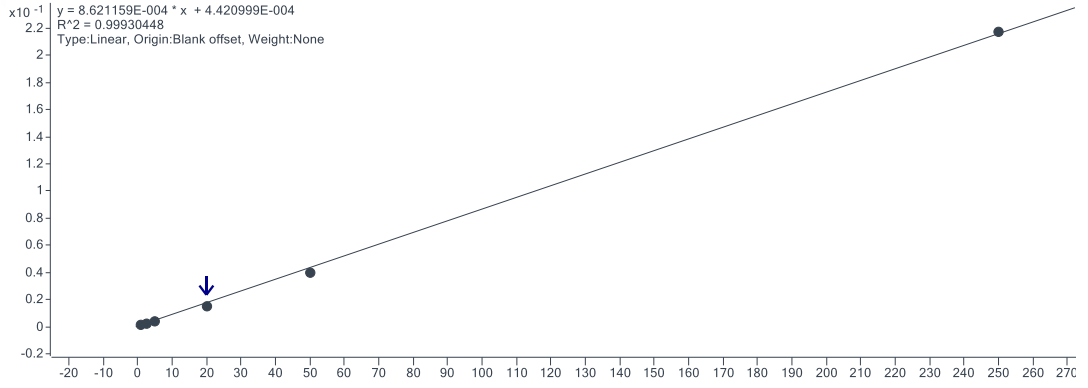
4.2.1. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, BPF, BPS Analizi Yöntem Validasyonu

4.2.1.1. LC/MS-MS Cihazının Kalibrasyonu

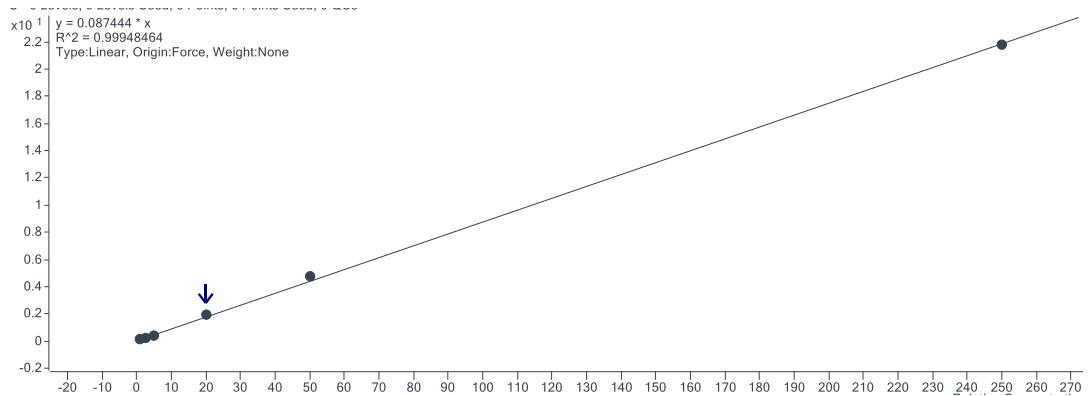
Şeffaf plak eluatlarında BPA, BPF ve BPS analizleri için geliştirilen yöntem kullanılarak yapılan cihaz kalibrasyonuna ilişkin grafikler Şekil 4.3, Şekil 4.4. ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Kalibrasyon grafiklerine ilişkin doğrusallık (R^2) değerleri BPA için 0.9992, BPF için 0.9993 ve BPS için 0.9994 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. 1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPA kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.



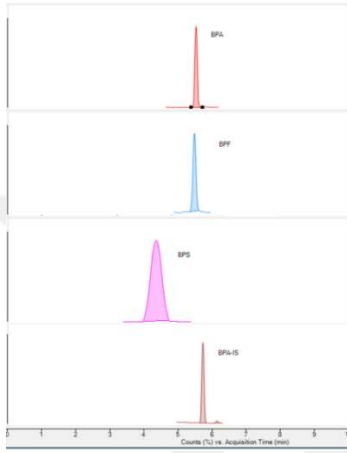
Şekil 4.4. 1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPF kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.



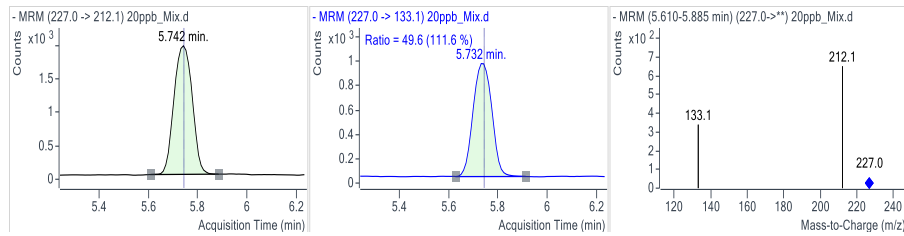
Şekil 4.5. 1.0, 2.5, 5.0, 20, 50 ve 250 ng/mL (ppb) BPS kalibratörleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

4.2.1.2. LC/MS-MS Cihazı ile BPA, BPF ve BPS Analizine İlişkin Kromatogramlar

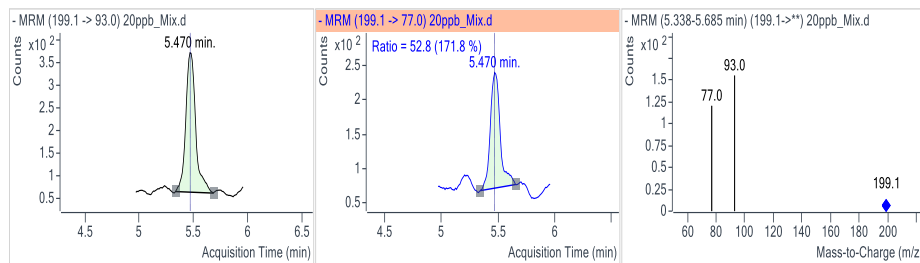
LC/MS-MS cihazı ile BPA, BPF ve BPS analizine ilişkin kromatogram Şekil 6.6’te gösterilmiştir. LC/MS-MS cihazında BPA, BPF, BPS’e ilişkin kromatogram ve kütle spektrumu Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’de gösterilmiştir.



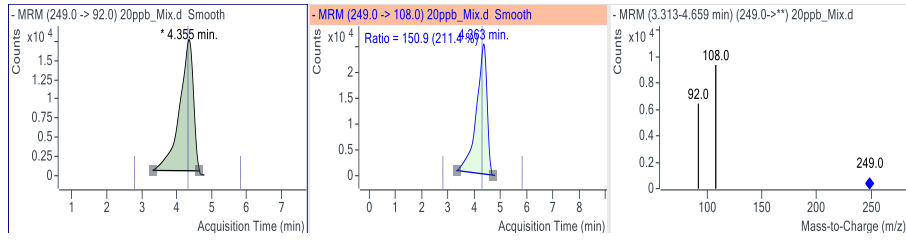
Şekil 4.6 .20ng/ml BPA, F, S ve 7.0 ug/ml internal std karışımına ait kromatogram.



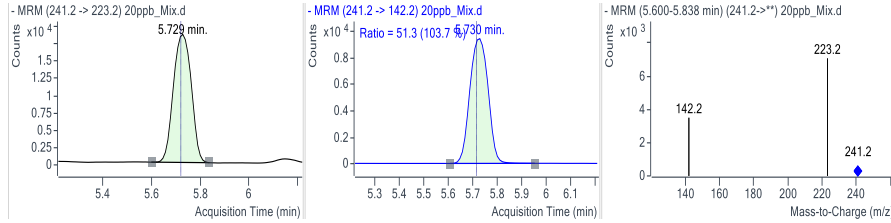
Şekil 4.7. 20ng/ml BPA’ya ait kromatogram ve kütle spektrumu.



Şekil 4.8. 20ng/ml BPF’e ait kromatogram ve kütle spektrumu.



Şekil 4.9. 20ng/ml BPS'e ait kromatogram ve kütle spektrumu.



Şekil 4.10. 7,0 ug/ml BPA internal Std'a ait kromatogram ve kütle spektrumu.

4.2.1.3. LC/MS-MS Cihazında BPA, BPF ve BPS Analizi Yöntem Parametreleri

LC/MS-MS cihazı kullanılarak, BPA, BPF ve BPS miktarlarının belirlenmesi için belirlenen yöntem ve yöntem validasyon parametreleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. BPA, BPF ve BPS miktarlarının belirlenmesi için kullanılan MS/MS geçişleri ve LC/MS/MS parametreleri.

Analit	Tarama Tipi	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Dwell (ms)	Fragmentor voltaj (FV)	Collision enerji (CE)	Polarite
BPA	MRM	227,0	212,1	150	120	14	Negatif
BPA Confirm	MRM	227,0	133,1	150	100	28	Negatif
BPA-IS	MRM	241,2	223,2	150	120	14	Negatif
BPF	MRM	199,1	93,0		120	22	Negatif
BPF Confirm	MRM	199,1	77,0		120	28	Negatif
BPS	MRM	249,0	108,0		120	30	Negatif
BPS Confirm	MRM	249,0	92,0		120	40	Negatif

Tablo 4.4. BPA, BPF ve BPS miktarlarını LC/MS/MS cihazı ile belirlemek üzere geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri.

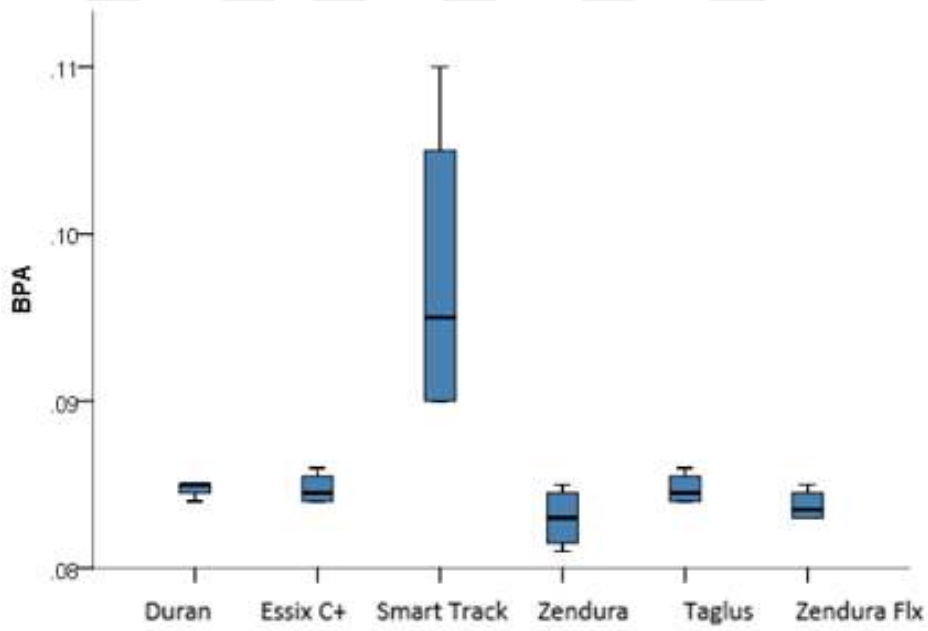
Analit	LOD ug/L	LOQ ug/L	Doğrusallık R2	Ölçülen değerlerin ortalaması (n= 10)	Geri kazanım (% Rec) (20ug/L)	Tekrarlanabilirlik (% RSD) (20ug/L)
BPA	0,086	0,34	0,9992	17,77 ± 0,37	89,20	2,11
BPF	0,052	0,21	0,9993	16,807 ± 0,88	83,96	5,22
BPS	0,013	0,05	0,9994	21,706 ± 1,01	110,35	4,66

4.2.2. Farklı Şeffaf Plak Materyallerinin BPA, BPF, BPS Analizi Sonuçları

Numune gruplarının BPA değerleri bakımından karşılaştırılmasında, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiştir ($p = .018$). Smart Track'te BPA değerleri Zendura ve Zendura Flx gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (sırasıyla $p = .02$, $p = .03$) (Tablo 4.5, Şekil 4.11).

Tablo 4.5. Numunelerin BPA değerleri bakımından karşılaştırılması.

şeffaf Plak	N	Ortalama± SS. µg/L Medyan (Min.-Maks.)	Kruskal Wallis Test İstatistiği†	p ^a	p ^b	p ^c	p ^d	p ^e
Duran	4	0.085±0.001 0.09(0.08-0.09)	H(5)=13.608; p= .018					
Essix C+	4	0.085±0.001 0.08(0.08-0.09)		1				
Smart Track	4	0.098±0.01 0.1(0.09-0.11)		.87	.64			
Zendura	4	0.083±0.002 0.08(0.08-0.09)		1	1	.02		
Taglus	4	0.085±0.001 0.08(0.08-0.09)		1	1	0.64	1	
Zendura Flx	4	0.084±0.001 0.08(0.08-0.09)		1	1	.03	1	1



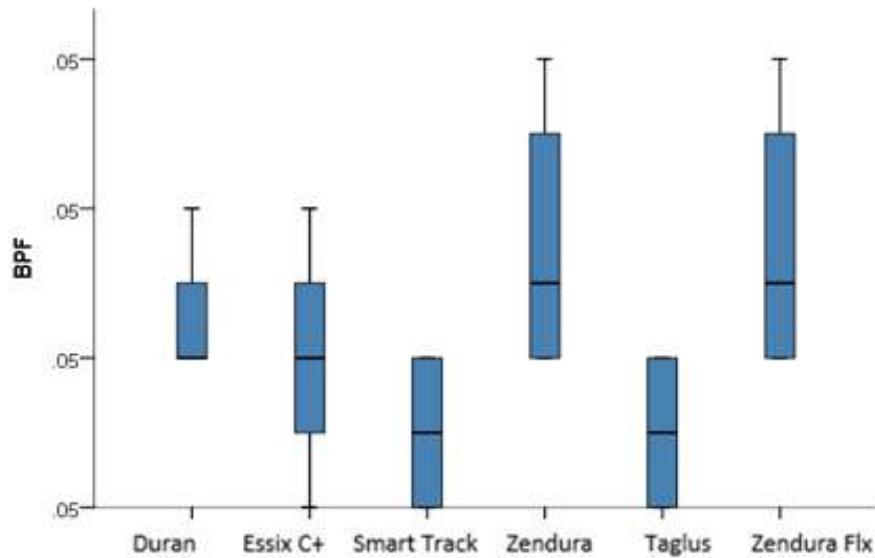
şekil 4.11. Numunelerde BPA değerlerinin dağılımı.

† Kruskal Wallis testi sonrasında istatistiksel anlamlılık bulunduğunda Dunn-Bonferroni testine göre post-hoc ikili grup karşılaştırmaarı a: Duran ile farklar, b: Essix C+ ile farklar, c: Smart Track ile farklar, d: Zendura ile farklar, e: Taglus ile farklar.

BPF değerleri bakımından numune grupları karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = .108$) (Tablo 4.6, şekil 4.12).

Tablo 4.6. Numunelerin BPF değerleri bakımından karşılaştırılması.

şeffaf Plak	N	Ortalama $\pm$ SS. μ g/L Medyan (Min.-Maks.)	Kruskal Wallis Test İstatistiği
Duran	4	0.051 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	H (5) =9.034; $p = .108$
Essix C+	4	0.051 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	
Smart Track	4	0.051 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	
Zendura	4	0.052 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	
Taglus	4	0.051 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	
Zendura Flx	4	0.052 $\pm$ 0.001 0.05(0.05-0.05)	

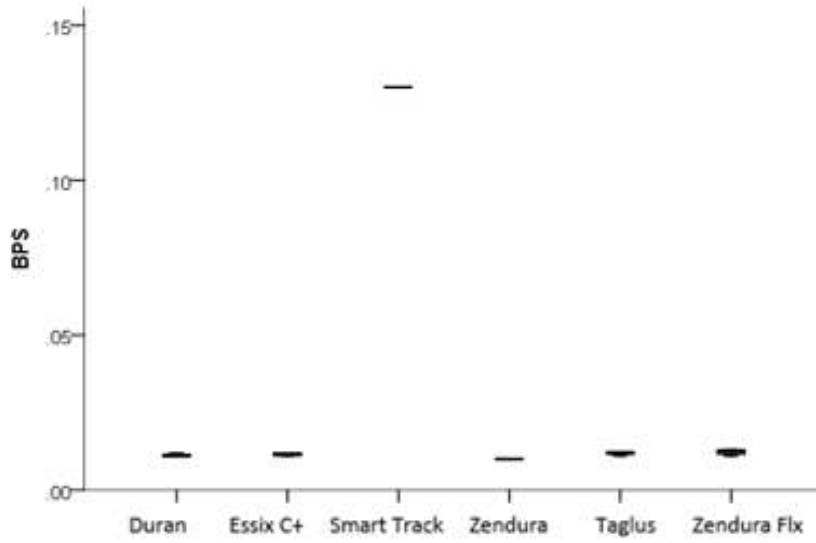


şekil 4.12. Numunelerde BPF değerlerinin dağılımı.

Numune grupları BPS değerleri bakımından karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p = .002$). İekli grup karşılaştırmaları incelendiğinde Smart Track numune grubunda BPS değerlerinin Zendura grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p = .001$) (Tablo 4.7, şekil 4.13).

Tablo 4.7. Numunelerin BPS değerleri bakımından karşılaştırılması.

şeffaf Plak	N	Ortalama± SS μg/L. Medyan (Min.- Maks.)	Kruskal Wallis Test İstatistiği†	p ^a	p ^b	p ^c	p ^d	p ^e
Duran	4	0.011±0.001 0.01(0.01-0.01)	H(5)=18/521; p= .002					
Essix C+	4	0.012±0.001 0.01(0.01-0.01)		1				
Smart Track	4	0.13±0 0.13(0.13-0.13)		.129	.351			
Zendura	4	0.01±0 0.01(0.01-0.01)		1	.955	.001		
Taglus	4	0.012±0.001 0.01(0.01-0.01)		1	1	.85	.401	
Zendura Flx	4	0.012±0.001 0.01(0.01-0.01)		1	1	1	.111	1



şekil 4.13. Numunelerde BPS değerlerinin dağılımı.

† Kruskal Wallis testi sonrasında istatistiksel anlamlılık bulunduğunda Dunn-Bonferroni testine göre post-hoc ikili grup karşılaştırmaarı a: Duran ile farklar, b: Essix C+ ile farklar, c: Smart Track ile farklar, d: Zendura ile farklar, e: Taglus ile farklar.

5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Şeffaf plaklar, braketlere ihtiyaç duyulmadan dişleri kademeli olarak ideal pozisyonlarına yönlendirmek için, bilgisayar teknolojisi ile oluşturulmuş bir dizi şeffaf, plastik, hareketli plaktan oluşan apareylerdir (Joffe, 2003). Ortodontik tedavi boyunca hastaların yiyecek kısıtlamalarının olmaması, sosyal ve mesleki hayattaki gereklilikte plakları çıkararak tedaviye ara verebiliyor olmaları, plak bakımı ve ağız hijyeninin daha kolay sağlanabilmesi nedeniyle daha az çürük riski oluşturmaları, hastanın dişleri ile ilgili diğer konservatif tedavi işlemlerini kolayca yaptırabilmesi, kopan braket ve ağız içi yaralanma risklerinin olmaması, daha az randevu gerektirmesi gibi avantajları olan şeffaf plakların temel avantajı estetik kaygıyı ortadan kaldırmalarıdır (Weir, 2017). Bu avantajlara bağlı olarak plakların ortodontik tedavi amaçlı olarak kullanım oranları istikrarlı bir şekilde artmaktadır. 2015 yılında, piyasada 27 farklı şeffaf plak sistemi olduğu ve bu sayının hızla arttığı belirtilmektedir (Weir, 2017). Şeffaf plaklar, aktif ortodontik tedavide gitgide artan bir sıklıkla kullanılmalarının yanı sıra, pekiştirme apareyi olarak pekiştirme tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadırlar (Mollov et al., 2010).

Şeffaf plaklar dişlerin tüm yüzeylerini örterek, dişeti sınırına kadar uzanmaktadır ve ağız içi dokular ve ağız sıvıları ile etkileşim halindedir. Genel olarak kullanılan şeffaf plak materyalleri; polietilen (PE), polietilen terefat (PET), polietilen terefat glikol (PETG), poliüretan (PU) ve polipropilen (PP) gibi polimerlerdir (İhsen et al., 2019). Bu plastik materyaller, ağız içi ortam değişikliklerinden etkilenebileceği ve ağız içi hücreler için zararlı bazı moleküllerin salınımına neden olabileceği için materyallerin doku uyumluluklarının bilinmesi önemlidir. Bu zararlı moleküllerden başında plastik üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan ve tüm dünyada zehirli çevresel bileşiklerin en bilinenlerinden olan Bisfenol A [(2.2-bis (4hidroksifenol) propan); BPA] gelmektedir. Bisfenol A'nın insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Brody et al., 2007; Braun et al., 2011; Meeker et al., 2011). Bisfenol A'nın dünya genelinde birçok ülkede kullanımının yasaklanması veya kısıtlanması ve özellikle bebek ürünleri ve su damacalarında BPA'sız (BPA-free) plastik ve polikarbonat kullanımına geçilmesi ile BPA'ya alternatif olarak, birer

bisfenol türevi olan BPS ve BPF kullanılmaya başlanmıştır (Gramec Skledar et al., 2015). BPS ve BPF'in kullanımının artması, toksik etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmaların da artmasına neden olmuştur (Liao et al., 2012b; Viñas and Watson, 2013; Héliès-toussaint et al., 2014). Bu çalışmalarda, yaygın tüketim ve ticari kullanım nedeni ile gıda ve kişisel bakım ürünleri gibi pek çok gündelik üründe tespit edilen BPS ve BPF'in, BPA'ya eşdeğer konsantrasyonlarda yerüstü sularında ve kanalizasyon sularında bulunduğu saptanmış ve ayrıca çevresel bulaş ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri bakımından BPA ile benzer etkide oldukları gösterilmiştir (Song et al., 2014; Yang et al., 2014).

Çalışmamızda, şeffaf plak olarak altı farklı marka plağın insan gingival fibroblast (HGF) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve bisfenol salınımları in vitro olarak değerlendirilmiştir. Plak eluatlarını içeren ortamın hücre kültürleri üzerindeki sitotoksitesini değerlendirmek için HGF'lerin seçilmesinin nedeni epitelyal keratinositler ile beraber oral dokulardaki temel hücre dizisi olmaları ve şeffaf plaklar kullanılırken diş eti ile temas ettikleri için klinik olarak plak materyallerin potansiyel toksik etkilerine maruz kalmalarıdır. İnsan gingival fibroblast hücre hattı (HGF'ler), dental materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için en çok kullanılan hücreler arasında olup, malzemelerin in vitro değerlendirmesi için tavsiye edilmektedir (ISO, 2009).

In vitro testlerde laboratuvarında in vivo şartları yansıtmak amacıyla, özel kültür ortamları kullanılmaktadır. In vitro testlerin in vivo test yöntemlerine göre daha hesaplı, daha kolay uygulanabilir, deneysel olarak kontrolü mümkün ve tekrarlanabilir olmaları en önemli avantajlarıdır. İn vitro testlerde mümkün olduğunca klinik koşulları taklit eden deney sistemleri hazırlanması materyalin biyolojik etkilerinin doğru değerlendirilebilmesi açısından oldukça önemlidir (Schmalz, 1994). In vitro sitotoksite testlerinde; organ kültürleri, kültür içindeki hücreler veya hücre organelleri kullanılabilir. Dental materyallerin in vitro toksite testleri için en yaygın kullanılan biyolojik sistemler kültürize edilmiş hücre hatlarıdır. İki tür hücre hattı kullanılabilir. Bunlar; tip-kültür koleksiyonlarından veya ticari kaynaklardan türetilen devamlı hücre hatları veya bir donörden türetilen ve bireysel olarak laboratuvarında çoğaltılan primer hücre hatlarıdır (Schmalz, 1998). Devamlı hücre hatlarının elde edilmeleri primer hücre kültürüne göre daha kolay olup, bunlar

hızlı üremektedirler ve uygun pasajlama ile çok uzun süreyle yaşatılmaları mümkün olmaktadır. Schmalz, her iki kültür tipinin benzer bulgular verdiğini, primer hücre kültürlerinin biraz daha hassas olmasına bağlı olarak, primer hücrelerin spesifik bilimsel testlerde, devamlı hücre kültürlerinin de dental malzemelerin toksisite testlerinde kullanılmalarının uygun olduğunu belirtmiştir (Schmalz, 1994). Bu nedenle çalışmamızda devamlı hücre hatları kullanılmıştır.

Hücre canlılığının tespiti amacıyla kullanılan MTT analizi; temelde mitokondride bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi ile sarı tetrazolyum, MTT tuzunun reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucunda koyu mor renkli formazon oluşması esasına dayanmaktadır. MTT'nin formazon haline indirgenmesi sadece yaşayan hücrelerde gerçekleşmekte ve böylece hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılmaktadır. MTT analizi; sonuçların hızlı elde edilmesi, son derece hassas olması ve çok düşük seviyedeki toksisite tespitini bile mümkün kılması sebebiyle en güvenilir biyouyumluluk analizlerinden biri olarak sıkça kullanılmaktadır (Kumar et al, 2018). Bu nedenle çalışmamızda şeffaf plakların sitotoksitesinin tespitinde MTT analizi kullanılmıştır. MTT analizi ile değerlendirilen hücre canlılığı ayrıca X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) kullanılarak ikinci bir değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA), biyolojik süreçlerin elektronik olarak tespit edilmesine dayanan bir sistemdir. Sistemin bir versiyonu olan RTCA- DP (çift amaçlı) analizatör, elektriksel olarak entegre Boyden odası (CIM-Plate16) ile hücre invazyonu ve göçünün kinetiğini ölçmek için kullanılmaktadır (Kho et al.,2015). Sitotoksisite çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan, tetrazolyum tuzlarının kullanıldığı yöntemlerden biri olan MTT deneylerinden farklı olarak deney sırasında farklı zaman noktaları arasında herhangi bir hücresel değişikliği tespit etme olanağı sunmaktadır. Empedans tabanlı teknoloji, birçok zaman noktasında tüm bir deneyin ölçülmesini sağlamakta ve bir bileşik eklemenden önce ve sonra, hücresel çoğalmayı, büyümeyi ve morfolojik değişiklikleri yansıtan eğriler oluşturmaktadır (Stefanowicz-Hajduk and Ochocka 2020). Tetrazolyum tuzu kullanılan tahlillerinin önemli bir dezavantajı, tahlil sırasında kültür ortamında bulunan veya üretilen kimyasalların tetrazolyum reaktifini azaltarak yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmesidir. Ayrıca MTT tuzlarının indirgendiği formazon ürünü ve incelenen bileşik arasındaki etkileşimler de yanlış pozitif sonuçlar üretilmektedir. X CELLigence sistemi bu dezavantajlara sahip

değildir. Teknoloji, hücre işlevini değiştirebilecek herhangi bir uyarının eklenmesi veya deney sırasında ortama müdahale edilmesine gerek kalmadan, hücre davranışının doğru olarak gerçek zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Empedans teknolojisinin yüksek hassasiyeti ve RTCA plakalarında mikro elektrotların bulunması, test edilen malzemenin toksisite etkilerinin tetrazolyum tuzları testlerine kıyasla daha yüksek hassasiyetle tespit edilmesini sağlayabilmektedir. Netice olarak, her iki yöntem de güvenilir, sitotoksosite araştırmaları için uygun ve çoğunlukla karşılaştırılabilir sonuçlar üreten yöntemlerdir (Stefanowicz-Hajduk and Ochocka 2020).

Literatürde, ortodontik tedavide kullanılan şeffaf plakların sitotoksik etkileri ve bisfenol salınımları ile oldukça sınırlı sayıda çalışma göze çarpmaktadır. Martina ve ark., 4 farklı şeffaf plak materyalinin sitotoksik etkilerini MTT analizi ile değerlendirirken, bisfenol salınımları hakkında bir değerlendirme yapmamışlardır. Sitotoksik etki tespiti için primer insan gingival fibroblast hücre hattı kullanılan bu çalışmada değerlendirilen dört farklı şeffaf plak materyalinden her birinin 14 gün sonra hafif bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada insan gingival fibroblastlar üzerindeki sitotoksosite seviyeleri yüksekten düşüğe doğru Biolon (%64,6 $\pm$ 3,3 hücre canlılığı), Zendura (% 74.46 $\pm$ 2.3 hücre canlılığı), SmartTrack (% 78.8 $\pm$ 6.3 hücre canlılığı) ve Duran (% 84.6 $\pm$ 4 hücre canlılığı) şeklinde tespit edilmiştir (Martina et al., 2019).

Elliades ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Invisalign (Align Technology, Santa Clara, Calif) marka şeffaf plak materyalinin sitotoksitite ve BPA salınımını değerlendirmiş, BPS ve BPF salınımları ise değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada MTT analizi kullanılmış ve insan gingival fibroblastları üzerinde sitotoksik etkiye dair bir bulgu tespit edilmemiştir. Östrojene duyarlı (MCF-7) ve östrojene duyarsız (MDA MB-231) insan göğüs adenokarsinomu hücreleri kullanılarak değerlendirilen şeffaf plak östrojenisitesinde MCF-7 hücre hattının proliferasyonunun stimülasyonu tespit edilmemiş, bu da plak eluatlarının östrojenisitesine işaret etmemiştir (Eliades et al., 2009).

Premaraj ve arkadaşları, 2014 yılında yaptıkları çalışmada Invisalign marka plakların (Align Technology, Santa Clara, Calif) insan keratinosit hücre hattı (N-TERT-1) üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT analizi ile değerlendirmişler ve salin solüsyonu eluatına maruz kalan hücrelerde metabolik inaktivite ve hücre ölümlerinin

önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, tükürük eluatlarına maruz kalan hücre canlılığında önemli değişikliklere neden olmadığı için tükürüğün koruma sağlayabileceğini de göstermişlerdir. (Premaraj et al., 2014).

Çalışmamızda değerlendirilen şeffaf plak örneklerinin insan gingival fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile değerlendirildiğinde; Zendura % 67.31 ± 16.209 hücre canlılığı ile hafif sitotoksikite gösterirken, Zendura'yı % 87.662 ± 5.535 hücre canlılığı ile hafif sitotoksik etki gösteren Smart Track ve % 92.625 ± 26.345 hücre canlılığı ile Duran takip etmiştir. Essix C+'de % 94.947 ± 8.543 hücre canlılığı ve Zendura Flx'de % 106.922 ± 12.765 hücre canlılığı mevcutken Taglus % 113.183 ± 7.459 hücre canlılığı gösteren plak olarak belirlenmiştir. Sitotoksik etkileri rakamsal olarak Zendura > Smart Track > Duran > Essix C+ > Zendura Flx > Taglus olarak sıralanmakla beraber, bunlardan sadece Zendura ve Smart Track hafif sitotoksik etki gösterirken diğer materyaller sitotoksik etki göstermedikleri söylenebilir. Zendura % 67.31 ± 16.209 hücre canlılığı ile hafif sitotoksikite gösterirken Zendura Flx'de % 106.922 ± 12.765 hücre canlılığı göstermiştir. Aynı firmanın (Bay Materials LLC) ürettiği bu 2 plak aynı içeriğe sahiptir. Zendura Flx'in yapısında Zendura'dan farklı olarak bulunan kopoliester, sitotoksik özelliklerini olumlu olarak değiştirmiştir. Çalışmamızda Zendura Flx (106.922 ± 12.765) ve Taglus (113.183 ± 7.459) materyallerinin hücre proliferasyonu %100 ün üstünde olarak görülmesi kontrol gurubunda hücre proliferasyonunun olmadığına (medyumun her gün tazelenmesi bu olasılığı mümkün kılmamaktadır) ya da hücre proloiferasyonunu stimule edici substratların salınmış olabileceğine işaret edebilir. Mockers ve arkadaşları ortodontik bant, braket ve ark tellerinin sitotoksitesini MTT analizi kullanarak değerlendirdikleri çalışmada; bazı metal, seramik ve polikarbonat materyallerde %100'ün üzerinde hücre proliferasyonu belirlemeleri ve bu durumun ya kontrol besiyerindeki hücre proliferasyonun durmasından ya da bu materyallerden hücre proliferasyonunu uyaran maddelerin salınmış olmasından kaynaklanabileceğini bildirmiş olmaları bulgularımızı destekler niteliktedir (Mockers, Deroze, Camps, 2002). Çeşitli alaşım ve metaller için yapılan in vitro sitotoksikite testlerinde hücre modifikasyonları, hücre çoğalmaları bildirilmiştir (Wataha, 2011).

Martina ve arkadaşlarının MTT analizi kullanarak yaptıkları çalışmada (Martina et al., 2019) kullandıkları plak materyallerinden Zendura, Smart Track ve

Duran'nın sitotoksik etki sıralaması Zendura> Smart Track> Duran şeklindedir ve bu sonuç çalışmamızda ortaya koyduğumuz sonuçlar ile uyumludur.

X CELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) bulgularımız dikkate alındığında; şeffaf plaklar sitotoksik etkileri bakımından Zendura (2.45 ± 0.113)> Taglus (4.035 ± 0.106)> Duran (4.395 ± 0.106)> Zendura Flx (4.415 ± 0.05)> Essix C+ (4.535 ± 0.587)> Smart Track (4.555 ± 0.134) şeklinde sıralanmışlardır. Şeffaf plaklar, X-Celligence yöntemi kullanılarak elde edilen değerler bakımından karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla birlikte ($p = .063$) sadece Zendura hafif sitotoksik etki gösterirken diğer materyaller sitotoksik etki göstermemiştir. Kullandığımız her iki yöntemde de sitotoksik etki bakımından Zendura en sitotoksik etki gösteren plak olmuştur.

Polietilen tereftalat glikol (PETG)' den üretilen Taglus ve Duran marka şeffaf plakların MTT analiz bulgularına göre; Taglus 113.183 ± 7.459 ve Duran 92.625 ± 26.345 hücre canlılığı göstermiştir. Her iki plak aynı polimerden üretilmiş olmasına rağmen, hücre proliferasyon yüzdeleri arasındaki bu farklılık; yapılarına katılmış olan stabilize edici, plastikleştirici, kararlılık sağlayıcı gibi farklı kimyasal katkı maddelerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Bu iki materyalin X CELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi bulguları Taglus, 4.035 ± 0.106 ve Duran, 4.395 ± 0.106 olmak üzere birbirine oldukça yakın sonuçlar vermiştir. Ahrari ve ark.'nın sınıflandırması dikkate alındığında her iki materyalin de sitotoksik etki göstermediği söylenebilir (Ahrari et al., 2010).

Poliüretandan üretilen Zendura, Smart Track ve Zendura Flx plaklarının MTT analizinde; Zendura 67.31 ± 16.209 hücre canlılığı ile Smart Track 87.662 ± 5.535 hücre canlılığı ile hafif sitotoksik etki göstermişlerdir. Zendura Flx'de 106.922 ± 12.765 hücre canlılığı göstermiştir. Zendura ve Zendura Flx arasındaki bu proliferasyon farkı, Zendura Flx'in yapısındaki kopoliester varlığı ile ilişkilendirilebilir. X CELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi bulgularında, Zendura 2.45 ± 0.113 değeri ile Zendura Flx (4.415 ± 0.05) ve Smart Track (4.555 ± 0.134) plaklarına göre daha fazla toksik etki göstermiştir. Aynı polimerden üretilmiş olmalarına rağmen, bilinen polimer içerikleri dışında yapılarına katılan diğer kimyasalların varlığı plakların sitotoksik etki değerlerini farklılaştırmış olabilir.

Literatürde şeffaf plakların bisfenol salınımları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Eliades ve arkadaşları Invisalign materyali (Align Technology, Santa Clara, Calif.) üzerinde yaptıkları çalışmada östrojene duyarlı (MCF-7) ve östrojene duyarsız (MDA MB-231) insan göğüs adenokarsinomu hücreleri kullanarak, BPA'nın östrojenisite etkisini kullanarak dolaylı yoldan BPA salınımını değerlendirmeye çalışmışlardır. Östrojene duyarlı hücrelerin proliferasyonlarına bağlı olarak değerlendirilen BPA salınımı bu çalışmada tespit edilememiştir (Eliades et al., 2009).

Çalışmamızda BPA, BPF, BPS salınımlarının belirlenmesi için LC/MS-MS (Sıvı kromatografi- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yöntemi kullanılmıştır. LC-MS/MS; sıvı kromatografisinin (HPLC) ve kütle spektrometrisinin (MS) kütle analizi becerilerini ve bileşikleri ayırma becerilerini bir araya getiren kimyasal bir yöntemidir. Sıvı kromatografisi, bileşikleri bileşenlerine ayırırken, kütle spektrometresi, yüksek bileşenlerin yapısal özelliklerini analiz eder. LC-MS/MS, analitlerin nitelik ve nicelik olarak analiz edilmesini mümkün kılar. LC-MS/MS, bileşen içindeki maddelerin tayinine ilave olarak eser miktardaki bileşiklerin dahi tespitini sağlayabilen en hassas yöntemlerden biridir (Zhang, Shou, Ogura, Li, Weller, 2019).

Cihaz ile ölçülebilen en düşük miktar (Limit of detection) 'LOD' ve miktarlandırılabilen en düşük değer (Limit of quantification) 'LOQ' olarak ifade edilmektedir. LOD değeri; cihaza verilen en düşük konsantrasyon değeri $\times 3 /$ (cihazdan elde edilen sinyal/gürültü oranı) denklemi ile LOQ değeri; cihaza verilen en düşük konsantrasyon değeri $\times 10 /$ (cihazdan elde edilen sinyal/gürültü oranı) denklemi ile hesaplanmıştır. Çalışmamızda LOD değerleri, BPA için 0,086 ug/L, BPF için 0,052 ug/L, BPS için 0,013 ug/L olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.3).

Çalışmamızda kullanılan şeffaf plaklarda tespit edilen en yüksek BPA düzeyi 0.098 ± 0.01 µg/L değeri ile (Tablo 4.5) ve en yüksek BPS düzeyi 0.13 ± 0 µg/L değeri ile Smart Track'te tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Poliüretan metilen difenil diizosiyanat ve 1,6-hekzanediol ve katkı maddelerinden üretilen Smart Track dışındaki tüm numunelerde BPA, belirlenen LOD değerinin altında, Smart Track'de ise 0.098 ± 0.01 µg/L ile LOD değerinin üstünde tespit edilmiştir. Numune gruplarının BPA değerleri bakımından karşılaştırıldığında,

gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiştir ($p = .018$). Smart Track'te BPA değerleri Zendura ve Zendura Flx gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir (sırasıyla $p = .02$, $p = .03$).

Tüm numunelerde BPF salınımı belirlenen LOD değeri olan $0,052 \text{ ug/L}$ 'den düşük olarak tespit edilmiştir. BPF değerleri bakımından numune grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = .108$).

Smart Track dışındaki tüm numunelerde BPS değeri, belirlenen LOD değeri olan $0,013 \text{ ug/L}$ 'nin altında tespit edilmiştir. Smart Track'te BPS salınımı $0.13 \pm 0 \text{ ug/L}$ olarak tespit edilmiştir. Numune gruplarının BPS değerleri bakımından karşılaştırılmasında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p = .002$). İkili grup karşılaştırmaları incelendiğinde Smart Track numune grubunda BPS değerlerinin Zendura grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p = .001$).

BPA, BPF, BPS salınımı için belirlenen sırayla $0,086 \text{ ug/L}$, $0,052 \text{ ug/L}$, $0,013 \text{ ug/L}$ 'lik LOD değerleri dikkate alındığında sadece Smart Track'te BPA ($0.098 \pm 0.01 \text{ ug/L}$) ve BPS ($0.13 \pm 0 \text{ ug/L}$) seviyeleri, bu LOD değerlerinin daha üzerinde bulunmuştur.

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority; EFSA) raporunda, BPA'nın hiçbir yan etki göstermeyen dozu (NOAEL; No Observable Adverse Effect Level; ters etki gözlenmeyen düzey, alt limit) 5 mg/kg/gün ve bu NOAEL değeri esas alınarak kabul edilebilen günlük alım miktarı $0,05 \text{ mg/kg/gün}$ olarak bildirilmiştir (EFSA, 2006). Çalışmamızda numune plaklarımızın 8 hafta boyunca normal salin içinde bekletilmesi sonucu elde edilen bisfenol salınımlarında; Smart Track'te elde edilen Bisfenol A seviyesi ($0.098 \pm 0.01 \text{ ug/L}$) ters etki göstermeyen dozun çok altında bir miktar olmasına rağmen, belirlenen LOD değerinin üzerinde bir değerdir.

5.2. Sonuç

Günümüzde bilim ve teknolojinin hızla ilerlemesine bağlı olarak diş hekimliği alanında da tedaviye yönelik birçok yeni materyal ve yöntem geliştirilmekte ve hekimlerin kullanımına sunulmaktadır. Estetik, konfor, kısa tedavi süresi gibi avantajlar vadeden yöntemlerden en dikkat çeken şeffaf plaklar kullanılarak yapılan tedavilerdir ve kullanımı her geçen gün hızla artmaktadır. Hasta memnuniyeti ve klinik başarı, kullanılan materyalin olası biyolojik etkileri ile de yakından ilgilidir. Kullanılan şeffaf plak materyalinin ağız içindeki sitotoksik etkilerinin tespiti ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri birçok çalışma ile tespit edilmiş olan BPA, BPF, BPS salınımlarının tespiti oldukça önemlidir.

Çalışmamızda kullanılan şeffaf plak örneklerinin insan gingival fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile değerlendirilmesi sonucunda, sadece Zendura ve Smart Track plaklarında hafif sitotoksik etki belirlenmiş, diğer materyaller sitotoksik etki göstermemiştir.

X Celligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analysis System-Dual Purpose; RTCA-DP) bulgularına bakıldığında; şeffaf plak grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p = .063$).

Çalışmamızda plak materyallerin bisfenol salınımları değerlendirildiğinde; Smart Track dışındaki tüm numunelerde BPA ve BPS düzeyleri belirlenen LOD değerinden düşük olarak tespit edilmiştir. BPF salınımı ise tüm numunelerde belirlenen LOD değerinden düşük olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre; MTT analizinde sadece Zendura ve Smart Track plakları hafif sitotoksikite göstermiş ve sadece Smart Track materyalinde LOD değeri üstünde BPA ve BPS salınımı tespit edilmiştir. Ancak, bu miktar ters etki gözlenmeyen düzeyin çok altında olduğundan çalışmamızda kullanılan tüm plak materyallerinin sitotoksikite ve bisfenol salınımı açısından güvenli bir şekilde kullanılabileceği söylenebilir. Bununla birlikte, söz konusu yorumu yaparken deneysel ortamda elde edilen bu bulguların, canlı üzerinde elde edilecek bulgularla ne derecede uyumlu olacağı hatırd tutulmalıdır.

5.3. Öneriler

Şeffaf plaklar ile tedavi sırasında hastanın malzemeye sürekli maruz kalması söz konusu olduğundan, in vitro koşullar altında elde edilen sonuçların in vivo ortamda elde edilecek bulgularla ne düzeyde uyumlu olacağı tartışmalıdır. Bu nedenle, şeffaf plak kullanımının sitotoksik etkisi olup olmadığı sonucuna varmak ve olası bisfenol salınım düzeylerini belirlemek, bu düzeyleri kabul edilen uluslararası standartlara göre ters etki gözlenmeyen seviyeler ve günlük alım miktarları açısından değerlendirmek ve varsa insanlar üzerindeki muhtemel zararlı lokal ve sistemik etkilerini belirlemek için daha geniş örnek grupları üzerinde ve daha uzun süreli çalışmalar yapılması gerekmektedir.



6. KAYNAKÇA

- Ahrari, F., Tavakkol Afshari, J., Poosti, M., Brook, A. (2010), Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod*, 32, 688–692.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A. (2006), The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114 (1), 106-12.
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., Nadal, A. (2010), Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect*, 118, 1243-1250.
- Andujar, N., Galvez-Ontiveros, Y., Zafra-Gomez, A., Rodrigo, L., Alvarez-Cubero, M.J., Aguilera, M., Monteagudo, C., ...Rivas, A.A. (2019), Bisphenol A Analogues in Food and Their Hormonal and Obesogenic Effects. A Review. *Nutrients*, 11, 21-36.
- Audebert, M., Dolo, L., Perdu, E., Cravedi, J.P., Zalko, D. (2011), Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol*, 85, 1463–1473.
- Batista, T.M., Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Amaral, M.E.C., Cederroth, C.R., Nef, S., Quesada, I., ...Nadal, A. (2012), Short term treatment with Bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice. *PLoS ONE*, 7(3), 1-10.
- Battal, D. (2012), Mersin İlinde Yaşayan Bireylerdeki Bisfenol A Düzeyinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, T.C.Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Mersin, (Danışman: Prof. Dr. Bahar Tunçtan, Prof. Dr. İsmet Çok)
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R., Brandebourg, T.D. (2009), Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 304, 49–54.
- Bigsby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis, B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., ...Vom Saal, F.S. (1999), Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 107(4), 613-18.
- Bondesson, M., Jönsson, J., Pongratz, I., Oleab, N., Cravedi, J.P., Zalkoc, D., Håkansson, H., ...Gustafsson, J.A. (2009), A Cascade of Effects of Bisphenol-A. *Reproductive Toxicology*, 28, 563–567.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. (1985), Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3), 119-124.

Braun, J.M., Kalkbrenner, A.E., Calafat, A.M., Yoltan, K., Ye, X., Dietrich, K.N., Lanphear, B.P. (2011), Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics*, 128, 873-882.

Braun, J.M., Yoltan, K., Dietrich, K.N., Hornung, R., Ye, X., Calafat, A.M., Lanphear, B.P. (2009), Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*, 117, 1945-1952.

Brody, J.G., Moysich, K.B., Humblet, O., Attfield, K.R., Beehler, G.P., Rudel, R.A. (2007), Environmental pollutants and breast cancer. *Epidemiologic Studies*, 109, 2667-2711.

Cabaton, N., Dumont, C., Severin, I., Perdu, E., Zalko, D., Cherkaoui-Malki, M., Chagnon, M.C. (2009), Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology*, 255, 15-24.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y.L., Wu, Y. (2016), Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity A review. *Environ. Sci. Technol*, 50(11), 5438-5453.

Chen, M. Y., Ike, M., and Fujita, M. (2002), Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, 17(1), 80-86.

Cho, J.H., Kim, A.H., Lee, S., Lee, Y., Lee, W.J., Chang, S.C., Lee, J. (2018), Sensitive neurotoxicity assessment of bisphenol A using double immunocytochemistry of DCX and MAP2. *Arch. Pharmacol. Res*, 41, 1098-1107.

Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guilette Jr, L. J. (2007), An ecological assessment of Bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol (Elmsford, N.Y.)*, 24(2), 225-239.

Crouch, S.P.M., Kozlowski, R., Slater, K.J., and Fletcher, J. (1993), The Use of ATP Bioluminescence as a Measure of Cell Proliferation and Cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160, 81-88.

Dallio, M., Diano, N., Masarone, M., Gravina, A.G., Patanè, V., Romeo, M., DiSarno, R., ...Federico, A. (2019), Chemical Effect of Bisphenol A on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16, 31-34.

Das, D., Lee, J.F., Cheng, S. (2004), Selective synthesis of Bisphenol-A over mesoporous MCM silica catalysts functionalized with sulfonic acid groups. *Journal of Catalysis*, 223, 152-160.

Duellman, S. J., Zhou, W., Meisenheimer, P., Vidugiris, G., Cali J. J., Gautam, P., Wennerberg, K., ...Vidugiriene, J. (2015), Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Techn*, 13(8), 456-465.

Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M. (2007), Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*, 115, 80-86.

Durmaz, E., ve Giray, B. (2013), Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56, 192-199.

European Food Safety Authority (EFSA), (2006), Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the comission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (Bisphenol A). *The EFSA journal*, 428, 2006, Question number EFSA-Q-2005-100, 1-75. Adopted on 29 November 2006.

European Food Safety Authority (EFSA), (2015), Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *The EFSA journal*, 13(1), 3978, Question number EFSA-Q-2012-00423, Adopted on 11 December 2014.

Eilam-Stock, T., Serrano, P., Frankfurt, M., Luine, V. (2012), Bisphenol-A impairs Memory and Reduces Dendritic Spine Density in Adult Male Rats. *Behav. Neurosci.*, 126, 175–185.

Ejaredar, M., Lee, Y., Roberts, D.J., Sauve, R., Dewey, D. (2017), Bisphenol A exposure and children's behavior: A systematic review. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 27, 175–183.

Ekşi, O. (2007), Plastik Esaslı Malzemelerin Isıl Şekil Verme Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Makine Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Edirne, (Danışman: Yrd.Doç. Dr. Selçuk ERDOĞAN)

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M.J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Habert, R. (2015), A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, 103(1),11-21.

Eliades, T., Pratsinis, H., Athanasiou, A. E., Eliades, G., Kletsas D. (2009), Cytotoxicity and estrogenicity of Invisalign appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 136, 100–103.

Evans, S.F., Kobrosly, R.W., Barrett, E.S., Thurston, S.W., Calafat, A.M., Weiss, B., Stahlhut, R., ...Swan, S.H. 2014), Prenatal bisphenol A exposure and maternally reported behavior in boys and girls. *Neurotoxicology*, 45, 91–99.

Fan, F. and Wood, K.V. (2007), Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5(1): 127-136.

Feiteiro, J., Mariana, M., Gloria, S., Cairrao, E. (2018), Inhibition of L-type calcium channels by Bisphenol A in rat aorta smooth muscle. *J. Toxicol. Sci.*, 43, 579–586.

Fejerskov, O., Larsen, M.J., Josephsen, K., Thylstrup, A. (1979), Effect of lng-term administration of fluoride on plasma fluoride and calcium in relation to forming enamel and dentin in rats. *Scand J Dent Res*, 87(2), 98-104.

Feng, Y., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Guo, Q., Shao, B. (2016), Effects of bisphenol analogues on steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells. *Chemosphere*, 147, 9-19.

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M. (2018), Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocol*, DOI:10.1101/pdb. Prot 087379.

Fernández, M., Bianchi, M., Lux-Lantos, V., Libertun, C. (2009), Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats. *Environ Health Perspect.*, 117, 757–762

Fic, A., Žegura, B., Sollner Dolenc, M., Filipic, M., Peterlin Masic, L. (2013), Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Arh Hig Rada Toksikol*, 64, 189-200.

Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A. (2002), Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36(6), 1429-1438.

Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri E. S., Andrews, D. W. (2009), Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16, 1093-1107.

Gao, X., and Wang, H.S. (2014), Impact of bisphenol a on the cardiovascular system -epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 8399–8413.

Ginsberg, G. and Rice, D.C. (2009), Does rapid metabolism ensure negligible risk from Bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 117(11), 1639-1643.

Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., ...Gaido, K.W. (1998), Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 142, 203-14.

Gramec Skledar, D., Troberg, J., Lavdas, J., Peterlin Mašič, L., Finel, M. (2015), Differences in the glucuronidation of bisphenols F and S between two homologous human UGT enzymes, 1A9 and 1A10. *Xenobiotica*, 45(6), 511-519.

Güler, Ç., ve Çobanoğlu Z. (1997), Plastikler. 1.Baskı, Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü. (Sayfa 9,15,19,20,21,22,23)

Hahladakis, J.N., Velis, C.A., Weber, R., Lacovidou, E., Purnell, P. (2018), An overview of chemical additives presents in plastics: migration, release, fate and environmental, disposal and recycling. *J.Hazard. Mater*, 344, 179–199.

Hanks, C. T., Wataha, J.C., Sun, Z. (1996), In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater*, 12, 186-193.

Harley, K.G., Gunier, R.B., Kogut, K., Johnson, C., Bradman, A., Calafat, A.M., Eskenazi, B. (2013), Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. *Environ. Res.*, 126, 43–50.

Hashimoto, Y., and Nakamura M. (2000), Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related chemicals in vitro. *Dental Materials Journal*, 19 (3), 245-262.

Héliès-Toussaint, C., Peyre, L., Costanzo, C., Chagnon, M.-C., Rahmani, R. (2014), Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(2), 224-235.

Higashihara, N., Shiraishi, K., Miyata, K., Oshima, Y., Minobe, Y., Yamasaki, K. (2007), Subacute oral toxicity study of bisphenol F based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline no. 407.” *Arch Toxicol*, 81, 825–832.

Hilliard, K., Sheridan, J. J., (2000), Adjusting Essix appliance at chairside—these simple adjustments can be made in the operatory. *J Clin Orthod*, 34(4), 236–238.

Ho, S.M., Tang, W.Y., Belmonte deFrausto, J., Prins, G.S. (2006), Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4[J]. *Cancer Res*, 66(11), 5624–5632.

Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin L., ... Wong, M.H. (2012), Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42, 91–99.

Huc, L., Lemarie, A., Gueraud, F., Helies-Toussaint, C. (2012), Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro*, 26, 709–717.

Hwang, S., Lim, J.E., Choi, Y., Jee, S.H. (2018), Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk: A meta-analysis. *BMC Endocr. Disord*, 18, 81.

Ihsen, B. A., Willmann, J. H. and Nimer, A. (2019), Effect of in Vitro Aging by Water Immersion and Thermocycling on the Mechanical Properties of PETG Aligner Material. *J Orofac Orthop*, <https://doi.org/10.1007/s00056-019-00192-8> , Son Erişim Tarihi: 18/12/2020

Ike, M., Chen, M. Y., Danzl, E., Sei, K., Fujita, M. (2006), Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Sci. Technol*, 53 (6), 153–159.

International Organization for Standardization (ISO) 10993-5: (2009), Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Test For in Vitro Cytotoxicity. 3.baskı, 2009-06-01.

Jalal, N., Surendranath, A.R., Pathak, J.L., Yu, S., Chung, C.Y. (2018), Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol.Rep*, 5, 76–84.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., and Choi, K. (2013), Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8793-8800.

Joffe, L. (2003), Current Products and Practice Invisalign ®: Early Experiences. *Journal of Orthodontics*, 30, 348–52.

Kardas, F., Bayram, A.K., Demirci, E., Akin, L., Ozmen, S., Kendirci, M., Canpolat, M., ...Per, H. (2016), Increased Serum Phthalates (MEHP, DEHP) and Bisphenol A Concentrations in Children with Autism Spectrum Disorder: The Role of Endocrine Disruptors in Autism Etiopathogenesis. *J. Child Neurol.*, 31, 629–635.

Kesling, H. D. (1945), The philosophy of tooth positioning appliance. *Am J Ortho Oral Surg*, 31, 297–304.

Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., Mez, E., Angel, C. A., ...Graham, E.S. (2015), Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*, 5, 199-222.

Kim, J., Kumar, S., Kumar, V., Lee, Y., Kim, Y., Kumar V. (2019), Bisphenols as a Legacy Pollutant and Their Effects on Organ Vulnerability. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 112; doi:10.3390/ijerph17010112

Kim, K.Y., Lee, E., Kim, Y. (2019), The Association between Bisphenol A Exposure and Obesity in Children-A Systematic Review with Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16, 25-21.

Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., ...Kashiwagi, A. (2005), Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci*, 76, 1589-601.

Knez, J. (2013), Endocrine-Disrupting Chemicals and Male Reproductive Health. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(5), 440–48.

Korzeniewski, C., Callewaert, D.M. (1983), An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64, 313-320.

Kravitz, N. D., Kusnoto, B., BeGole, E., Obrez, A., Agran, B. (2009), How well does Invisalign work? A prospective clinical study evaluating the efficacy of tooth movement with Invisalign. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 135(1), 27–35.

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., Van der Burg, B., ...Gustafsson, J.A. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 10-16.

Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 1, 2018(6). doi: 10. 1101/pdb.prot095505.

Kusdemir, M., Gunal, S., Ozer., Imazato, S., Izutani, N., Ebisu, S., Blatz, M.B. (2011), Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect tests. *Dent Mater J*, 30(6), 799-805.

Lakind, J.S., and Naiman, D.Q. (2008), Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: Estimates from the 2003–2004 NHANES urinary BPA data. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 18, 608-15.

- Lee, S., Liu, X., Takeda, S., Choi, K. (2013), Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, 93, 434–440.
- Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V.D., Mohd., MA., Moon, H.B., Nakata, H., ...Kannan, K. (2012a), Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol*, 46, 6860–6866.
- Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H. B., Nakata, H., Wu, Q., Kannan, K. (2012b), Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 46(16), 9138–9145
- Liao, C., Liu, F. and Kannan, K. (2012c), Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental Science & Technology*, 46(12), 6515-6522.
- Lithner, D., Larsson, A., Dave, G. (2011), Science of the Total Environment Environmental and Health Hazard Ranking and Assessment of Plastic Polymers Based on Chemical Composition. *Science of the Total Environment*, 409(18), 3309–24.
- MacLusky, N.J., Hajszan, T., Lерanth, C. (2005), The environmental estrogen bisphenol-A inhibits estrogen-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect*, 113, 675-679.
- Mallineni, S. K., Nuvvula, S., Matinlinna, J. P., Yiu, C. K., King, N. M. (2013), Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4, 9-19.
- Manfo, F.P., Jubendradass, R., Nantia, E. A., Moundipa, P. F., Mathur, P. P. (2014), Adverse effects of Bisphenol A on male reproductive function. *Toxicol*, 228, 57-82.
- Martina, S., Rongo, R., Bucci, R., Viviano, A. (2019), In Vitro Cytotoxicity of Different Thermoplastic Materials for Clear Aligners. *TheAngle Orthodontist*, Vol 89, 6, 1-3.
- Mathew, M., Sreedhanya, S., Manoj, P., Aravindakumar, C.T., Aravind, U.K. (2014), Exploring the interaction of bisphenol-S with serum albumins: a better or worse alternative for bisphenol A. *J Phys Chem B*, 118, 3832–3843.
- Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Teramoto, T., Koshiba, T., Liu, X., Okada, H., ...Shimohigashi, Y. (2007), Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J Biochem*, 142, 517-524.
- Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R. (2010), Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol*, 44, 1458-63.
- Meeker, J.D. and Ferguson, K.K. (2011), Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environ Health Perspect*, 119, 1396-402.

Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H. (2009), Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. R.Soc. Lond., B, Biol.Sci*, 364, 2097–2113.

Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M., Hauser, R. (2011), Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect*, 119, 252-257.

Meng, Z., Tian, S., Yan, J., Jia, M., Yan, S., Li, R., Zhang, R., ...Zhou, Z. (2019), Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environ. Pollut*, 247, 935–943

Midoro-Horiuti, T., Tiwari, R., Watson, C. S., Goldblum, R. M. (2010), Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 273-78.

Miethke, R.R, and Vogt, S. (2005), A Comparison of the Periodontal Health of Patients during Treatment with the Invisalign® System and with Fixed Orthodontic Appliances. *J Orofac Orthop*, 66, 219–229.

Mockers, O., Deroze, D., Camps, J. (2002), Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dental Materials*, 18, 311-317.

Molina-Molina, J.M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., ...Olea, N. (2013), In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272, 127–136.

Mollov, N.D., Lindauer, S.J., Best, A.M., Shroff, B., Tufekci, E. (2010), Patient attitudes toward retention and perceptions of treatment success. *The Angle Orthodontist*, 80(4), 656-661. doi: 10.2319/102109-594. 1

Moon, M.K., Jeong, I.K., Oh, T.J., Ahn, H.Y., Kim, H.H., Park, Y.J., Park, K.S. (2015), Long-term oral exposure to Bisphenol-A induces glucose intolerance and insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, 226(1), 35-42.

Moon, M.K., Kim, M.J., Jung, I.K., Koo, Y.D., Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S.H., ...Park, Y.J. (2012), Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J. Korean Med. Sci*, 27, 644–652.

Munn, S. and Goumenou, M. (2013), Thresholds for Endocrine Disrupters and Related Uncertainties, *Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group. Luxembourg: Publications Office of the European Union*. doi: 10.2788/82126

Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2005), Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, 146, 4138-4147.

Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Soto, A.M. (2007), Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*, 23(3), 383– 390.

- Naderi, M., Wong, M.Y., Gholami, F. (2014), Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat Toxicol*, 148, 195–203.
- Nahoum, H. (1964), The vacuum-formed dental contour appliance. *N Y State Dent J*, 30, 385–390.
- Nahoum, H. (2014), Forces and moments generated by removable thermoplastic aligners. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 146, 545–6.
- Nakagawa, Y., and Tayama, S. (2000), Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74, 99–105.
- Nam, S.H., Seo Y.M. and Kim M.G. (2010), Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 79, 949–952.
- Newbold, R.R., Jefferson, W.N., PadillaBanks, E. (2009), Prenatal exposure to Bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect*, 117(6), 879–885.
- Nicolucci, C., Errico, S., Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C., Diano, N. (2017), Human exposure to Bisphenol A and liver health status: Quantification of urinary and circulating levels by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 140, 105–112.
- Peerapanyasut, W., Kobroob, A., Palee, S., Chattipakorn, N., Wongmekiat, O. (2019), Activation of Sirtuin 3 and Maintenance of Mitochondrial Integrity by N-Acetylcysteine Protects Against Bisphenol A-Induced Kidney and Liver Toxicity in Rats. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 267. doi:10.3390/ijms20020267
- Peyre, L., Rouimi, P., de Sousa, G., Héliers-Toussaint, C., Carré, B., Barcellini, S., Chagnon, M.C., ...Rahmani, R. (2014), Comparative study of bisphenol A and its analogue bisphenol S on human hepatic cells: a focus on their potential involvement in nonalcoholic fatty liver disease. *Food Chem Toxicol*, 70, 9–18.
- Pisapia, L., Del Pozzo, G., Barba, P., Caputo, L., Mita, L., Viggiano, E., Russo, G.L., ...Diano, N. (2012), Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 178, 54–63.
- Ponitz, R. J. (1971), Invisible retainers. *Am J Orthod*, 59(3), 266–272.
- Posnack, N.G., Brooks, D., Chandra, A., Jaimes, R., Sarvazyan, N., Kay, M. (2015), Physiological response of cardiac tissue to bisphenol A: Alterations in ventricular pressure and contractility. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 309, 267–275.
- Premaraj, T., Simet, S., Beatty, M., Premaraj, S. (2014), Oral Epithelial Cell Reaction After Exposure to Invisalign Plastic Material. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 145(1), 64–71.
- Riss, T.L., and Moravec, R.A. (2004), Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62.

- Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., Perdu, E., ...Balaguer, P. (2011), Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ. Health Perspect*, 119, 1227-33.
- Rochester, J. R. (2013), Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
- Rochester, J. R., and Bolden, A. L. (2015), Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental Health Perspectives*, 123(7), 643-650.
- Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W. (2013), Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol*, 53, 421-430.
- Rönn, M., Lind, L., Orberg, J., Kullberg, J., Soderberg, S., Larsson, A., Johansson, L., ...Lind, P.M. (2014), Bisphenol A is related to circulating levels of adiponectin, leptin and ghrelin, but not to fat mass or fat distribution in humans. *Chemosphere*, 112, 42-48.
- Schmalz, G. (1994), The use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent*, 22, 6-11.
- Schmalz, G. (1998), The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 106, 696-706.
- Shankar, A. and Teppala, S. (2012), Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *J. Environ. Public Health*, 48, 16-41.
- Sheridan, J.J., LeDoux, W., McMinn, R., (1993), Essix retainers: fabrication and supervision for permanent retention. *J Clin Orthod*, 27(1), 37-45.
- Song, S., Song, M., Zeng, L., Wang, T., Liu, R., Ruan, T., and Jiang, G. (2014), Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China. *Environmental Pollution*, 186, 14-19.
- Soto, A. M., and Sonnenschein, C. (2010), Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7), 363-370.
- Stahlhut, R.W., Myers, J.P., Taylor, J.A., Nadal, A., Dyer, J.A., Vom Saal, F.S. (2018), Experimental BPA Exposure and Glucose-Stimulated Insulin Response in Adult Men and Women. *J. Endocr. Soc*, 2, 1173-1187.
- Staples, C.A., Dom, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Harris, L.R., (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36 (10), 2149- 2173.
- Stefanowicz-Hajduk, J., and Ochocka, J.R. (2020). Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicology Reports*, 7, 335-344.

Stein, T.P., Schluter, M.D., Steer, R.A., Guo, L., Ming, X., (2015), Bisphenol A Exposure in Children with Autism Spectrum Disorders. *Autism. Res.* 8, 272–283.

Stroheker, T., Chagnon, M.C., Pinnert, M.F., Berges, R., Canivenc-Lavier, M.C. (2003), Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol*, 17, 421–432.

Stroheker, T., Picard, K., Lhuguenot, J.C., Canivenc-Lavier, M.C., Chagnon, M.C. (2004), Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*, 42, 887–897.

Şişe, Ş. (2011), Anne Sütünde Nonilfenol ve Bisfenol A Düzeylerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, (Danışman: Prof. Dr. Cevdet UĞUZ)

Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., Taketani, Y. (2004), Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, 51, 165-169.

Thoene, M., Rytel, L., Dzika, E., Wlodarczyk, A., Kruminis-Kaszkiel, E., Konrad, P., Wojtkiewicz, J. (2017), Bisphenol A Causes Liver Damage and Selectively Alters the Neurochemical Coding of Intrahepatic Parasympathetic Nerves in Juvenile Porcine Models under Physiological Conditions. *Int. J. Mol. Sci*, 18, 2726.

Türk Gıda Kodeksi (TGK). (2011), Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2011/29). İnternet Adresi: <http://www.resmigazete.gov.tr/> Son Erişim Tarihi:10/10/2020

Türk Gıda Kodeksi (TGK). (2019), Türk Gıda Kodeksi.Gıda maddeleri ile temasta bulunan plastik madde ve malzemeler tebliği (Tebliğ No: 2019/44.). İnternet Adresi: <http://www.resmigazete.gov.tr/> Son Erişim Tarihi:10/10/2020

Tokur, O., ve Aksoy, A. (2017), In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.

Trasande, L., Attina, T.M., Blustein, J. (2012), Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*, 308, 1113–1121.

Tsai, W.T. (2006), Human health risk on environmental exposure to bisphenol-a: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 24, 225–55.

Türk Standardları Enstitüsü (TSE). (2019), TS EN ISO 7405. Dış Hekimliğinde kullanılan tıbbi cihazların biyouyumluluğunun değerlendirilmesi (ISO 7405:2019). 1.baskı, ICS Kodu: 11.060.10; 11.100.99

U.S. Department of Health and Human Services (2008), NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. September 2008 NIH Publication No. 08-5994.

Ülgen, M. (2005), Ortodontik Tedavi Prensipleri. 7.baskı, Ankara: *Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları*. (Syf 40,41,42,43,44,512,513)

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J., Schoenfelder, G. (2012), Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to Bisphenol A. *Cien Saude Colet*, 17(2), 407-434.

Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V. (2007), Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol*, 24 (2), 139–177.

Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, BS., Soto, A.M. (2009), Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev*, 30, 75-95

Vande Vannet, B., Mohebbian, N., Wehrbein, H., (2006). Toxicity of used orthodontic archwires assessed by three-dimensional cell culture. *Eur J Orthod*, 28, 426–432.

Viñas, R., and Watson, C.S. (2013), Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental Health Perspectives*, 121(3), 352-358.

Vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabolli, F., ... Iguchi, T. (2007), Chapel Hill bisphenol a expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 24(2), 131-138.

Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., ...Welshons, W.V. (1998), A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health*, 14, 239–260.

Vom Saal, F.S., Richter, C.A., Ruhlen, R.R., Nagel, S.C., Timms, B.G., Welshons, W.V. (2005), The importance of appropriate controls, animal feed, and animal models in interpreting results from low-dose studies of bisphenol A. *Birth Defects. Res (Part A)*, 73, 140–145.

Völkel, W., Colnot, T., Csanady, G.A., Filser, J.G., Dekant, W. (2002), Metabolism and kinetics of Bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*, 15(10), 1281-1287.

Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Lu, J., ...Ning, G. (2012), Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 97, 223–227.

Wang, H.X., Zhou, Y., Tang, C.X., Wu, J.G., Chen, Y., Jiang, Q.W. (2012). Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: A cross-sectional study. *Environ. Health*, 11(79), 1-9.

Watabe, Y., Hosoya, K., Tanaka, N., Kondo., T., Morita M., Kubo, T. (2005), LC/MS determination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularlyimprinted polymer as an on-line pretreatment device. *Anal Bioanal Chem*, 381, 1193–1198.

Wataha, J. C. (2001), Principles of Biocompatibility for Dental Practitioners. *The Journal Of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203–9.

Wataha, J. C. (2011), Predicting Clinical Biological Responses to Dental Materials. *Dental Materials*, 28(1), 23–40.

Weir, T. (2017), Clear Aligners in Orthodontic Treatment. *Australian Dental Journal*, 62, 58–62.

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., Mclachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., ...Belcher, S.M. (2007), In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, 24, 178–198.

Williams, D.F. (2008), On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941–53.

Wolff, M.S, Britton, J.A., Boguski, L., Hochman, S., Maloney, N., Serra, N., Liu, Z., ...Forman, J. (2008), Environmental exposures and puberty in inner-city girls. *Environ Res*, 107, 393–400.

Wolff, M.S., Teitelbaum, S.L., Pinney, S.M., Windham, G., Liao, L., Biro, F., Kushi, L.H., ...Calafat, A.M. (2010), Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect*, 118, 1039-1046.

Xu, J., Huang, G., Guo, T.L. (2016), Developmental Bisphenol A Exposure Modulates Immune-Related Diseases. *Toxics*, 4, 23.

Yamasaki, K., Noda, S., Imatanaka, N., Yakabe, Y. (2004), Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicol Lett*, 146, 111–120.

Yang, Y., Lu, L., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Y., Shao, B. (2014), Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1328, 26-34.

Yaşar H. (2001), Plastikler Dünyası. 2. Baskı, Ankara: *MMO Yayınları* (Sayfa: 99,107,112,115,116,118,119,121,123,125,127,139).

Yıldırım, Z.S., Bakır, E.P., Bakır Ş., Aydın, M.S., (2017), Diş Hekimliğinde Biyouyumluluk ve Değerlendirme Yöntemleri. *Selcuk Dent J*, 4, 162-169.

Yücedağ, F. (2006), Anti-Bakteriyel Poliüretan Film Üretimi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. Fatma Seniha GÜNER)

Zhang, J., Shou, W., Ogura, T., Li, S., Weller, H. (2019), Optimization of microflow LC–MS/MS and its utility in quantitative discovery bioanalysis. *Bioanalysis*, 11(11), 1117–1127.

Zhao, W., Sheng, N., Zhu, R., Wei, F., Cai, Z., Zhai, M., Du, S., ...Hu, Q. (2010), Preparation Of Dummy Template Imprinted Polymers At Surface Of Silica Microparticles For The Selective Extraction Of Trace Bisphenol A From Water Samples. *Journal of Hazardous Materials*,179, 223–229.



ORTODONTİDE AKTİF TEDAVİ VE RETANSİYON TEDAVİSİ BOYUNCA KULLANILAN FARKLI ŞEFFAF PLAK MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN VE BİSFENOL SALINIMLARININ İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

aubibam.anadolu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%1

2

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

%1

3

Submitted to Selçuk Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

4

www.adiyamansmmmo.org.tr

İnternet Kaynağı

<%1

5

DEMİRCİ, Tefik, GÜRBÜZ, Taşkın and
ŞENGÜL, Fatih. "DENTAL REZİN
KOMPOZİTLERİN SİTOTOKSİSİTESİ: BİR İN
VİTRO ÇALIŞMA", Atatürk Üniversitesi, 2014.

Yayın

<%1

6

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

7

doaj.org

İnternet Kaynağı

<%1