



T.C.
ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ortodonti Anabilim Dalı

**ORTODONTİK TEDAVİDE KULLANILAN
GÜNCEL ŞEFFAF PLAK MATERYALLERİNİN
BİYUYUMLULUKLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökhan ATAY

Doktora Tezi

Danışman

Doç. Dr. Seden AKAN BAYHAN

İstanbul, 2022

**ORTODONTİK TEDAVİDE KULLANILAN GÜNCEL ŞEFFAF PLAK
MATERYALLERİNİN BİYOUYUMLULUKLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökhan ATAY

Ortodonti Anabilim Dalı

Doktora Tezi

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ

2022

“Gökhan ATAY” tarafından hazırlanmış ve 14.12.2022 tarihinde sunulmuş “ORTODONTİK TEDAVİDE KULLANILAN GÜNCEL ŞEFFAF PLAK MATERYALLERİNİN BİYOUYUMLULUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tez Ortodonti Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Seden AKAN BAYHAN
Danışman

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Seden AKAN BAYHAN Ortodonti Anabilim Dalı
Yeditepe Üniversitesi

Prof. Dr. Korkmaz SAYINSU Ortodonti Anabilim Dalı
Altınbaş Üniversitesi

Prof. Dr. Sabri İlhan RAMOĞLU Ortodonti Anabilim Dalı
Altınbaş Üniversitesi

Prof. Dr. Buğra ÖZEN Pedodonti Anabilim Dalı
İstanbul Sağlık ve
Teknoloji Üniversitesi

Prof. Dr. Samim Çetin SEVÜK Protetik Diş Tedavisi
Anabilim Dalı
Altınbaş Üniversitesi

Bu tezin Doktora tezi olarak bütün şartları sağladığımı beyan ederim.

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü kabul tarihi:

____/____/____

Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışlara uygun olarak edinildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde, bu çalışmada, orijinal olmayan tüm materyalleri ve sonuçları tamamen alıntı yaptığımı ve referans gösterdiğimi de beyan ederim.

Gökhan ATAY

İmzası

XXXXXX

İTHAF

Canım oğlum Toprak Atay'a ithaf ediyorum.



ÖNSÖZ

Bu tez, Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Dairesi Başkanlığı tarafından PB2019-DIS-4 numaralı proje ile desteklenmiştir.



TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığı ve doktora eğitimi süresince bilgi ve birikimlerinden beni mahrum bırakmayan, yıllar geçse de iletişim ve etkileşimde olacağımızı düşündüğüm sayın hocam Doç. Dr. Seden Akan Bayhan'a

Ortodonti doktora eğitimim süresinde bana rehber olan hocalarım Prof. Dr. Korkmaz Sayınsu, Prof. Dr. Sabri İlhan Ramoğlu, Prof. Dr. Toros Alcan, Dr. Öğr. Üyesi Pelin Acar Ulutaş'a,

Deneyleri gece gündüz demeden titizlik ve özveri ile sonuçlandıran, bizi yönlendiren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Vildan Bozok Çetinkaya'ya ve doktora öğrencisi Zafer Yıldırım'a

Lisans dönemimde hekimlik vasıflarını ve becerilerini bana aşıl原因, hayatıma dokunan Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nin değerli hocalarına,

Aynı bölümde birlikte çalıştığımız, dost olduğumuz, güzel ve zor anlarımızı paylaştığımız, anı biriktirdiğimiz Burak Çağrı Çini ve Cem Ünsal' a,

Bu süreçte tüm zorlukların üstesinden gelen ve bir an olsun elimi bırakmayan, en büyük desteğim, sevgili eşim Doç. Dr. Ayşe Atay'a

Bugünlere gelmemde bileğinin gücü ve gözünün nuru olan annem ve babama çok teşekkür ederim.

ÖZET

ORTODONTİK TEDAVİDE KULLANILAN GÜNCEL ŞEFFAF PLAK MATERYALLERİNİN BİYOUYUMLULUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ATAY, Gökhan

Doktora Programı, Ortodonti Anabilim Dalı, Altınbaş Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Seden AKAN BAYHAN

Tarih: Aralık/2022

Sayfa: 89

AMAC: Şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin biyoyuumluluğunu, *in-vitro* sitotoksosite testleri (XTT proliferasyon kiti ve Anneksin V/PI boyama yöntemleri) ile L929 fare fibroblastları üzerinde değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada test edilen şeffaf plak materyalleri: SmartTrack® (Align Technology, ABD), Zendura® A ve Zendura FLX (Bay Materials LLC, ABD), CA® Pro ve CA® Pro+, Duran ve Duran+ (ScheuDental GmbH, Almanya), Provecta (DingZing Advanced Materials, Tayvan)'dır. Materyaller, üretici firmaların talimatlarına ve ISO parametrelerine göre hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, sitotoksosite testi öncesinde 40 dakika süreyle ultraviyole ışık altında laminar akışlı steril kabinde (Esco Airstream Class II BSC, İngiltere) sterilize edilmiştir. Besiyeri ekstraktları, her grup için 1., 3., 7. ve 14. günlerde toplanarak, L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde test edilmiş ve hücrelerin canlılığı 48 saat sonra ölçülmüştür. Sitotoksosite XTT testi, apoptoz ise Anneksin V/PI boyama yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler, $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde iki yönlü varyans analizi (ANOVA), tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri ile istatistiksel olarak analiz edildi.

BULGULAR: Şeffaf plak materyalleri arasında 1.ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılığı sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p<0,05$). Test edilen materyallerde tüm zaman periyotlarında hücre canlılığı açısından önemli farklılıklar bulunmuştur ($p<0,05$). 14. gün ekstratlarının bulgularına göre, CA® Pro materyali; CA®

Pro+, SmartTrack®, Duran, Duran+ ve Provecta materyallerinden daha yüksek hücre canlılık değerleri göstermiştir ($p<0,05$). Tüm zaman periyotlarında şeffaf plak materyallerinin apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur($p<0,05$).

SONUÇ: Çalışmada test edilen termoplastik şeffaf plak materyalleri hafif ila orta derecede sitotoksosite sergilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Şeffaf Plaklar, Termoplastik Materyaller, Sitotoksosite, Apoptoz, XTT Testi



ABSTRACT

EVALUATION OF THE BIOCOMPATIBILITY OF CURRENT CLEAR ALIGNER MATERIALS USED IN ORTHODONTIC TREATMENT

ATAY, Gökhan

PhD, Department of Orthodontics, Altınbas University

Supervisor: Doç. Dr. Seden AKAN BAYHAN

Date: December/2022

Pages: 89

AIM: The purpose of this in vitro study was to evaluate the biocompatibility of eight different thermoplastic materials for clear aligners on L929 mouse fibroblasts with in-vitro cytotoxicity (XTT assay and Annexin V/PI staining) tests.

MATERIALS AND METHOD: The clear aligner materials tested in the study were: SmartTrack® (Align Technology, USA); Zendura® A and Zendura FLX (Bay Materials LLC, USA); CA® Pro and CA® Pro+, Duran and Duran+ (ScheuDental GmbH, Germany), Provecta (DingZing Advanced Materials, Taiwan). Materials were prepared according to the manufacturer's instructions and ISO parameters. The prepared specimens were sterilized under ultraviolet light in a laminar flow sterile cabin (Esco Airstream Class II BSC, UK) for 40 minutes before the cytotoxicity tests. Mediums were collected and filtered from each of four samples in 1st, 3rd, 7th and 14th days for each material and tested using the L929 cells. Viability of cells was measured after 48 hours. Cytotoxicity was evaluated using XTT assay and apoptosis was determined by Annexin V/PI. All data were statistically analyzed with Two-way ANOVA, One-way ANOVA and Tukey's multiple range tests at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS: The cell viability results of the 1st and 14th day extracts among the clear aligner materials showed statistically significant differences ($p < 0.05$). There were significant differences in all tested materials regarding time periods ($p < 0.05$). At the end of the

observation period on the 14th day, CA[®] Pro material showed higher cell viability values than CA[®] Pro+, SmartTrack[®], Duran, Duran+ and Provecta materials ($p<0.05$). There were significant differences within the clear aligner materials in different time periods regarding apoptosis rate ($p<0.05$).

CONCLUSION: The thermoplastic clear aligner materials tested in the study presented slight to moderate cytotoxicity.

Keywords: Clear Aligners, Thermoplastic Materials, Cytotoxicity, Apoptosis, XTT Assay



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
TABLO LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİL LİSTESİ	xv
KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 ŞEFFAF PLAKLARIN TARİHÇESİ	3
2.2 ŞEFFAF PLAKLARDA TEDAVİ SİSTEMLERİ.....	4
2.2.1 Essix Sistem.....	4
2.2.2 CAD/CAM Sistem.....	5
2.2.2.1 Tek aşamalı plak sistemleri	5
2.2.2.2 Üç aşamalı şeffaf plak sistemleri	6
2.3 ŞEFFAF PLAKLARLA TEDAVİNİN AVANTAJLARI, DEZAVANTAJLARI VE LİMİTASYONLARI	6
2.3.1 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Avantajları	6
2.3.2 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Dezavantajları	7
2.3.3 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Limitasyonları.....	7
2.4 BİYOUYUMLULUK	7
2.4.1 Toksisite.....	9
2.4.2 Sitotoksisite.....	9
2.4.3 Biyouyumluluk Test Standartları	9
2.4.4 Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Biyolojik Sistemler	10
2.4.5 Sitotoksisite Değerlendirme Yöntemleri: in-vitro	11

2.4.5.1 XTT testi.....	11
2.4.5.2 Apoptoz (Anneksin V- FITC) testi	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1 ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI	15
3.2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI.....	17
3.3 MATERYAL EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI	18
3.4 XTT DENEYİNİN UYGULANMASI	18
3.5 APOPTOZ (Anneksin V- FITC) TESTİ	19
3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	20
4. BULGULAR	21
4.1 EKSTRATLARIN 24 SAAT UYGULANMASI SONRASI XTT ÖLÇÜMLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRE CANLILIK DEĞERLERİ	21
4.1.1 1. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	23
4.1.2 3. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	23
4.1.3 7. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	23
4.1.4 14. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri	25
4.2 EKSTRATLARIN 48 SAAT UYGULANMASI SONRASI XTT ÖLÇÜMLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRE CANLILIK DEĞERLERİ	31
4.2.1 1. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	33
4.2.2 3. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	33
4.2.3 7. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri.....	34
4.2.4 14. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri	35
4.3 APOPTOZ BULGULARI	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
REFERANSLAR	70

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Biyouyumluluk tanımına göre dental materyallerin sınıflandırılması	8
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firmalar	14
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri	22
Tablo 4.2: Materyal ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerlerinin 2 yönlü ANOVA analizi ile incelenmesi	22
Tablo 4.3: Çalışmada kullanılan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri	32
Tablo 4.4: Materyal ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerlerinin 2 yönlü ANOVA analizi ile incelenmesi	32

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: XTT'nin formozana dönüşümü.....	12
Şekil 3.1: a.Typodont master model, b.Typodont master modeli 3D print baskısı, c. SmartTrack materyali, d. Zendura®A materyali, e. Zendura FLX materyali, f. CA® Pro materyali	15
Şekil 3.2: a. CA® Pro+ materyali, b. Duran materyali, c. Duran+ materyali, d. Provecta materyali	16
Şekil 3.3: Materyallere ait örneklerin sterilize edildiği laminar akışlı steril kabin ve UV altındaki örnekleri.....	17
Şekil 3.4: a. Fetal Sığır Serumı, b. MEM- Eagle Besiyeri, c. Olympus CH30	17
Şekil 3.5: a. 24. saat sitotoksosite ölçümleri için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka, b. 48. saat sitotoksosite ölçümleri için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka	18
Şekil 3.6: a. XTT Hücre Proliferasyon Kiti, b. Apoptoz Belirleme Kiti	19
Şekil 3.7: Akım sitometri cihazı (BD Accuri C6)	19
Şekil 4.1: Şeffaf plak materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık yüzdeleri	21
Şekil 4.2: Materyallerin 1. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık yüzdeleri.....	23
Şekil 4.3: Materyallerin 3. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri	24
Şekil 4.4: Materyallerin 7. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri.	24
Şekil 4.5: Materyallerin 14. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri.	25
Şekil 4.6: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14.gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri	26
Şekil 4.7: CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14.gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri	26
Şekil 4.8: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri.....	27
Şekil 4.9: Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri.....	27
Şekil 4.10: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri.....	28
Şekil 4.11: Zendura® A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri.....	29

Şekil 4.12: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri.....	29
Şekil 4.13: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri.....	30
Şekil 4.14: Şeffaf plak materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri	31
Şekil 4.15: Materyallerin 1. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri.....	33
Şekil 4.16: Materyallerin 3. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri.....	34
Şekil 4.17: Materyallerin 7. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri.....	34
Şekil 4.18: Materyallerin 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri.....	35
Şekil 4.19: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	36
Şekil 4.20: CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	36
Şekil 4.21: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	37
Şekil 4.22: Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	38
Şekil 4.23: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	38
Şekil 4.24: Zendura® A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	39
Şekil 4.25: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	40
Şekil 4.26: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri	40
Şekil 4.27: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları.....	41
Şekil 4.28: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları.....	42
Şekil 4.29: CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları.....	43

Şekil 4.30: CA [®] Pro ⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları.....	44
Şekil 4.31: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları	45
Şekil 4.32: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları.....	46
Şekil 4.33: Duran ⁺ materyalinin Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü test sonuçlarının akış sitometri cihazı ile analizi	47
Şekil 4.34: Duran ⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları.....	48
Şekil 4.35: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları	49
Şekil 4.36: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları.....	50
Şekil 4.37: Zendura [®] A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları	51
Şekil 4.38: Zendura [®] A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları	52
Şekil 4.39: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları	53
Şekil 4.40: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları	54
Şekil 4.41: SmartTrack [®] materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları	55
Şekil 4.42: SmartTrack [®] materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları	56

KISALTMALAR

%	: Yüzde
°	: Derece
<	: ‘den küçüktür
>	: ‘den büyüktür
µl	: mikrolitre
ark.	: Arkadaşları
ARS	: Air Rotor Stripping
3B	: 3 boyutlu
CAD/CAM	: Bilgisayar Destekli Tasarım/Bilgisayar Destekli Üretim
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Örgütü
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	: Metiltiazol difenil tetrazolyum (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
SLA	: Stereolitografi
WST-1	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H- tetrazolyum
XTT	: 2,3-Bis(2-metoksi4-nitro- 5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yetişkin hastalarda ortodontik tedaviye artan taleple birlikte, geleneksel sabit braketlerden hem daha estetik hem de daha konforlu tedavi yöntemlerine olan ilgi giderek artmıştır (Rossini ve diğerleri, 2015). Geleneksel sabit tedavide kullanılan metal braketlere alternatif olarak birçok farklı estetik tedavi seçenekleri geliştirilmiştir. Bu amaçla lingual ortodonti, seramik braketler ve şeffaf plaklar hastaya sunulabilecek alternatif tedavi yöntemleridir (Rosvall ve diğerleri, 2009).

Braketlerin, dişlerin lingual yüzeylerine yerleştirilmesi esasına dayanan lingual ortodonti geleneksel yöntemlere kıyasla estetik olarak nitelendirilmektedir (McCrostie, 2006). Lingual tekniğin geleneksel ortodontik tedavi yöntemine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Labial bölgedeki dişeti enflamasyonunun ve bukkal bölgedeki mine demineralizasyonunun önlenmesi bu yöntemin avantajları arasındandır. Konumsal sapmaları engellemek için braketlerin yerleştirilmesi sırasında indirekt bonding yöntemlerinin kullanılması tedavi maliyetinin artmasına sebep olur. Bunun yanı sıra, braketlerin dil tarafında olması, konuşma güçlüğüne ve lingual dokularda travmaya sebep olur (Slater, 2013; van der Veen ve diğerleri, 2010).

Plastik ve seramik braketler, estetik braketler olarak tanımlanmaktadır. Güçlendirilmiş polikarbonattan üretilen plastik braketlerin zaman içerisinde renklenmeleri, tel ve braket arasında fazla sürtünme oluşması, tork verilmiş tellerin slot içerisinde aktif iken deformasyon yaratması gibi problemleri çözmek amacıyla yapılarına seramik dolgular eklenmiş ya da metal slotlar kullanılmıştır (Alkire ve diğerleri, 1997; Harzer ve diğerleri, 2004). Ancak seramik braketlerin de bazı dezavantajları mevcuttur. Bunlar; seramik ve mine arasındaki sertlik farkı nedeniyle karşıt dişlerde aşınmaların görülmesi, yapılarının kırılgan olması ve braket sökümü sonrasında mikroskobik mine çatlaklarının meydana gelmesidir (Zinelis ve diğerleri, 2005).

Görünmez tedavi olarak tanımlanan şeffaf plak sistemleri, sabit apareylerde olduğu gibi farklı hareket modlarına sahip cihazlara, yapım yöntemlerine ve çeşitli maloklüzyon tedavilerinde uygulanabilen geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Keim, 2017). Son yıllarda

şeffaf plaklar ile yapılan ortodontik tedavi, hastaların estetik kaygıları nedeniyle 'görünmez' ortodontiye karşı ilginin artması ve üretici firmaların yaygın tanıtım politikalarıyla ilgi odağı olmuştur. Şeffaf plakların ortodontik tedavinin bitim safhasında diş hareketi ya da geniş kapsamlı ortodontik tedavilerde kullanılmasındaki artışın önemli boyutlara ulaşması dikkat çekicidir (Hennessy ve Al-Awadhi, 2016).

Polimerize edilmemiş monomerlerin polimerik materyallerden salınım yapabileceği ve biyolojik sistemler üzerinde toksik etkilere neden olabileceği kabul edilmektedir. Potansiyel sitotoksik etki aralıkları, materyale maruz kalmaya karşı bir bağışıklık reaksiyonunu, hücre döngüsü bozukluğunu, hücre apoptozunu ve mutajenez veya karsinojenez uyarılmayı içermektedir. Bu etkiler her zaman kısa sürede görülmemektedir. Ortodontik tedavi amaçlı kullanılan şeffaf plaklar, dişleri marjinal sınırında sarar veya dişetin yaklaşık üçte birine temas eder. Tedavi tamamlanana kadar hastalar haftada ya da en fazla iki haftada bir yeni plaklarını kullanırlar. Hastaların bu plakları günde en az 20-21 saat kullanmaları gerekmektedir. Toplam tedavi süreleri, maloklüzyonun ciddiyetine bağlı olarak 6 ay ile 24 ay arasında değişebilmektedir. Artan tedavi süreleri ile biyouyumluluk endişeleri de artmaktadır (Premaraj ve diğerleri, 2014). Ağız içerisinde uzun süre dokularla temasta olan bu materyallerin biyouyumlu olmaları ve herhangi bir sitotoksik etkiye yol açmamaları klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır.

Günümüzde dental sektördeki teknolojik gelişmelere paralel olarak farklı içeriğe sahip şeffaf plak materyalleri kullanıma sunulmuştur. Isı ile şekillendirilebilen ve ağız içerisinde uzun süre dokularla temasta kalan bu materyallerin biyouyumluluğunu inceleyen literatür sayısı oldukça azdır (Ahamed, S.F.; Kumar, S.M.; Vijaya kumar, R.K.; Kanna, 2020; Alhendi ve diğerleri, 2022.; Eliades ve diğerleri, 2009; Martina ve diğerleri, 2019; Nemec ve diğerleri, 2020; Premaraj ve diğerleri, 2014) . Materyallerin farklı özelliklerinin hekimler tarafından bilinmesi uygulama pratiğinde başarıyı ciddi oranda arttıracak, üretici firmaları da farklı arayışlara yönlendirecektir. Bu anlayışla başlatılan araştırmanın amacı şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin biyouyumluluğunu, *in-vitro* sitotoksisite testleri (XTT proliferasyon kiti ve Annexin V-PI boyama yöntemleri) ile L929 fare fibroblastları üzerinde değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ŞEFFAF PLAKLARIN TARİHÇESİ

Yunanca ‘Termoplastik’ kelimesi ‘thermos’ (sıcak) ve ‘plasso’ (oluşturmak) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmaktadır. ‘Isıtıldıklarında yumuşayan, soğuduğunda tekrar sertleşen plastik grubu’ anlamına gelmektedir. Kesling’in 1944 yılında ortodontik tedavinin sonunda yanlış hizalanmış dişleri hareket ettirmek için şeffaf apareyleri kullanma fikri, son 15 yılda gelişen yazılım ve üretim teknolojilerinin ortodonti pratiğine girişi ile günümüze kadar gelmiştir (Hennessy ve Al-Awadhi, 2016). Alçı set-up tekniği ve kauçuk materyaller kullanılarak üretilen esnek ‘positioner’ın diş hareketini sağlaması ile şeffaf plastik apareyler keşfedilmiştir (Kesling, 1945). 1959’da Marshall ve Horvay tarafından ‘Vacuum Former’ (basınçlı kalıplama) cihazı üretilmiştir. 1960’da Nahoum bu cihazı kullanılarak ilk ‘aligner’ı yapmış ve hasta ağzında uygulamıştır (H. Nahoum, 1964). İlk zamanlarda sadece diş konumlarını korumak veya düzenlemek için tasarlandığından dental kontur cihazı olarak tanımlanmıştır. Yapımı sırasında dişler kıl testere ile kesilip mum üzerine yerleştirilerek yeni bir model oluşturulmuştur. Bu model üzerine basılan termoplastik materyalin uyguladığı basınç sonucu diş hareketi elde edilmiştir. Nahoum, apareyin ortodontide minimal rotasyonların düzeltilmesi ve boşlukların kapatılması gibi diş hareketlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla uygulanabileceğini ileri sürmüştür. Ancak sonrasında tüm diş hareketlerinin tek seferde yapılamayacağını fark ederek, Kesling’in planlanan fazla diş hareketlerini sıralı şekilde aparey kullanarak gerçekleştirme fikrini temel almıştır (H. I. Nahoum, 2014). Nahoum, uygulamaları sonrasında apareyin sadece diş hareketi amacıyla değil diş hekimliğinde pekiştirme apareyi, alışkanlık kırıcı ve geçici kuron gibi farklı amaçlar için de uygulanabileceğini belirtmiştir (Fiasconaro ve Sherman, 1968). Ponitz 1971 yılında, ‘invisible retainer’ diye adlandırdığı aparey ile sınırlı diş hareketi sağladığını bildirmiştir (Ponitz, 1971). Sheridan ve ark. şeffaf plakların air-rotor stripping (ARS) ile dişlerde düzeltme sağladıklarını göstermişlerdir (Sheridan JJ, LeDoux W, 1993).

Tüm bu sistemler Kesling’in diş hareketi tekniğini temel alır. Her defasında hastadan alınan yeni ölçü ve set-up tekniği ile bir diş hareketin sağlanması vakit alıcı işlemlerdir. Termoplastik materyalin katılık özelliği bir şeffaf plak ile belirli bir miktarda diş hareketine olanak sağlar. Tek plakla daha fazla diş hareketi yapmak için hizalayıcı tekrar

şekillendirilmelidir. Bazı özel pensler belirli bir sıcaklığa kadar ısıtılarak plağın şeklini değiştirmede kullanılabilmekte ve daha çok diş hareketi sağlayabilmektedir. Bu işlem yeni bir plak yapımına göre daha az maliyetlidir. Fakat pensler ile yapılan tekrar şekillendirme işlemi esnasında plaklar 3 mm'ye kadar gerilime uğratılabilir. Fazlası plağın kuvvet uygulamayacağı kadar incelteceğinden şeffaf plaklar, kontrolsüz ve daha az miktarda diş hareketi sağlamaktadır. Bu teknik karmaşık ortodontik sorunlara çözüm oluşturamadığından çok daha fazla diş hareketi planlanan vakalarda kullanılması için dişlere kademeli olarak hareket veren plak serilerinden oluşan teknikler geliştirilmiştir (Proffit ve diğerleri, 2006).

Align Teknoloji firması tarafından 1997'de tanıtılan daha pratik bir yöntem olan Invisalign şeffaf plak sistemi, ortodontistler tarafından 1999 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Şeffaf plaklar bilgisayar destekli tasarım/bilgisayar destekli üretim (CAD/CAM) sistemlerinin kullanıldığı ilk ortodontik tedavi yöntemidir. Bu teknoloji, her diş hareketi için yeni bir model elde etmek yerine, tek bir ölçü ile çok sayıda diş hareketinin oluşturulmasına izin vermektedir (Miller ve diğerleri, 2003).

2.2 ŞEFFAF PLAKLARLA TEDAVİ SİSTEMLERİ

2.2.1 Essix Sistem

1993'te Sheridan adındaki araştırmacı tarafından tanıtılmış olan Essix sistem, estetik, maliyeti düşük ve kullanımı kolaydır. Raintree Essix firması tarafından bu sistem geliştirilmiştir. Bu sistemde kullanılan plaklar, ısıtılarak basınç veya vakum ile alçı model üzerinde şekillendirilmektedir. Plakların kullanılması ile diş hareketi sağlamak için yeterli kuvvet, kuvvetin etki edebileceği yeterli süre ve yeterli boşluk olması gerekmektedir (Sheridan JJ, Hilliard K, 2003). Bu plaklar ile gerçekleştirilebilecek hareketler: ekstrüzyon, intrüzyon, tipping, rotasyon ve tork hareketleridir (Sheridan JJ, LeDoux W, 1994). Plaklar beslenme ve diş fırçalama haricinde bütün gün boyunca kullanılmalıdır (Sheridan JJ, Hilliard K, 2003). Essix plak sistemi, düşük üretim maliyetine sahiptir. Bu sistemde aylık hedeflenen diş hareketi miktarı 1 mm'dir. Yeni hareket istenildiğinde yeni bir ölçü alınıp, elde edilen alçı model üzerine plak basılması gerekmektedir (Sheridan JJ, LeDoux W, 1993).

2.2.2 CAD/CAM Sistem

Kesling'in set-up tekniğine dayanan şeffaf plakların yapımı, her seansta ölçü alınması gerekliliğinden dolayı hasta ve hekim için konforlu değildir. Günümüzde CAD/CAM sistemlerinin geliştirilmesi ile digital ağız içi ya da model taramadan sonra 3 boyutlu (3B) yazılım programında tedavi planı oluşturulmakta, sonrasında hekim kontrolü ve onayından sonra plak üretimine geçilmektedir (Joffe, 2003b; Wong ve diğerleri, 2002). Günümüzde bu sistemle kullanılan plaklar, tek aşamalı (tek sertlik ve kalınlık; örnek olarak Invisalign, ClearCorrect) veya üç aşamalı (kalınlığı ve sertliği giderek artan; örnek olarak Clear Aligner (CA), ECliqner, Clearfix) olabilmektedir (Özsaygılı M., 2019).

2.2.2.1 Tek aşamalı plak sistemleri

Tek aşamalı plak sistemlerinden olan Invisalign sistemi ilk olarak 1997 yılında Stanford Üniversitesi'nin bilgisayar mühendisliği bölüm öğrencileri Zia Chisti ve Kelsey Wirth'in girişimleri sayesinde planlanmıştır. İki ortodontist ile kurdukları Align Technology (Kaliforniya, ABD) 1998 yılında Invisalign sistemini tanıtmıştır ve 1999 yılında hasta tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Wong ve diğerleri, 2002).

Bu sistemde, bilgisayar ortamında hazırlanan set-up, gerçekleşmesi istenen tedavi planının 3B simülasyonunun sunulduğu bir bilgisayar programı olan 'ClinCheck' üzerinden hekime gönderilmektedir. Bu program, hekime istediği diş hareketlerini elde edene kadar planladığı tedaviyi düzenleyebilmesine olanak sağlamaktadır. Hekim planlanan tedaviyi onayladıktan sonra, dijital modellerden stereolitografik (SLA) modeller üretilmekte ve bu modeller üzerine etilen difenil diizosiyanat ve 1,6 heksanediol ilave edilmiş poliüretan yapıda ve 0,76 mm kalınlığında olan plaklar hazırlanıp hekime gönderilmektedir (Mantovani ve diğerleri, 2019; Wong ve diğerleri, 2002). Her plak tek diş veya bir grup diş 0,25-0,33 mm hareket sağlamaktadır. Plaklar, dişlerin klinik kronlarını ve marjinal dişetinin bir kısmını sarmaktadır. Plaklar diş hareketlerinin etkili bir şekilde sağlanması için günde en az 22 saat takılmalı ve her bir plak 1 ya da 2 hafta süreyle değiştirilmelidir (Kravitz ve diğerleri, 2009). Tipik bir Invisalign tedavisi vakanın durumuna göre 10 ile 50 plak arasında değişebilmektedir (Joffe, 2003a).

2.2.2.2 Üç aşamalı şeffaf plak sistemleri

Üç aşamalı plak sistemlerinden biri olan Clear Aligner sistemi, 1998’de Kim tarafından öne sürülmüştür. Bu yöntemde Invisalign sisteminden farklı olarak 3 haftada bir hastadan yeni ölçü alınmakta ve elde edilen modellerin üzerlerinde set-up işlemi uygulanmaktadır. Elde edilen modeller üzerinde yumuşak (0,5 mm), orta (0,625 mm) ve sert (0,75) olmak üzere farklı kalınlıklarda plaklar (Duran, Scheu-dental, Almanya) vakum (Essix, Dentsply, Reintree Essix, LA, ABD) veya basınç (Biostar, Scheu-dental, Germany) cihazları kullanılarak hazırlanmaktadır (Kim TW, 2008). Clear Aligner tedavisinde kontrollü diş hareketi hedeflendiği için hastalara farklı kalınlıklardaki plaklar sırasıyla kullanılmaktadır. Bu sistemin Invisalign sisteminden farkı, hastalar plakların her birini birer hafta kullanırlar. Bir diğer farkı da bu sistemde plaklar dişetin 2 mm’lik kısmını kapsamaktadırlar (Kim ve Echarri, 2007).

Üç aşamalı plak sistemlerinden bir diğeri ise ECligner (eClear International, Seul, Kore) sistemidir. Bu sistemin Clear Aligner’dan (Scheu Dental GmbH, Iserlorhn, Almanya) farkı, modeller 3 boyutlu taranır ve dijital set-up uygulanır. Hekim tedavi planında düzenleme ve değişiklik yapabilir. Tedaviye başlanmadan önce tedavinin fiyatı, süresi, öngörülen plak sayısı ve kontaklardaki aşındırma miktarı bilinmektedir. Sanal planlama hekim tarafından onaylandıktan sonra SLA yöntemi ile plaklar üretilerek hekime gönderilmektedir. Bu yöntemde kullanılan plaklar ve kullanım süreleri, Clear Aligner sisteminde kullanılan plaklarla benzer yapıda, aynı kalınlıkta ve aynı sertliktedir.

2.3 ŞEFFAF PLAKLARLA TEDAVİNİN AVANTAJLARI, DEZAVANTAJLARI VE LİMİTASYONLARI

2.3.1 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Avantajları

Şeffaf plaklar geleneksel sabit apareylerden daha estetik, konforlu ve kullanımı kolaydır (Joffe, 2003a). Geleneksel braketlerin neden olduğu mukoza irritasyonu ve enflamasyonu minimal düzeyde oluşmaktadır. Hastalar oral hijyeni daha kolay sağlayabilirler. Tedavi süresinde periodontal problem oluşma riski daha azdır. Tedavi sonunda yeni oluşan diş çürüğü oranı da daha azdır (Miethke ve Vogt, 2005). Tedavi simülasyonu ile nihai sonucu başlangıç aşamasında hastaya sunulabilmektedir. Hastaların koltukta geçirdiği süre daha

kısadır. Parafonksiyonel bozukluğu olan hastalarda plak kullanımıyla myofasial ağrılar azalmaktadır (Nedwed ve Miethke, 2005).

2.3.2 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Dezavantajları

Şeffaf apareyler hasta tarafından takıp çıkarılabilir olduğundan istenen tedavi sonucuna ulaşmak için hasta kooperasyonunun yüksek düzeyde olması gerekmektedir. Dişlerde görülen hareket daha çok tipping şeklindedir. Ekstrüzyon, dikleştirme, paralel hareket ve rotasyon düzeltimi gibi hareketlerin gerçekleştirilmesi kısıtlıdır. Bu hareketlerin oluşturulması için ek olarak ataşmanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Plakların kalınlığı ile orantılı bir şekilde tedavi bitiminde posterior bölgede intrüzyon gerçekleşebilir. Tedavi boyunca kullanılacak tüm plaklar başlangıç tedavi planı üzerinden yapıldığından, ara dönemlerde eklenecek veya değiştirilecek durumlar tekrar ölçü alınıp yeniden plak üretimi yapılmasına neden olur. Bu durum hasta ve hekim için zaman kaybı ve ek maliyete neden olur (Joffe, 2003b; Phan ve Ling, 2007; Pavoni ve diğerleri, 2011).

2.3.3 Şeffaf Plaklarla Tedavinin Limitasyonları

Ek tedavi prosedürleri olmadan sadece şeffaf plaklar kullanılarak yapılan tedaviler; 5 mm'yi aşan çapraşıklık veya diastema vakaları, 45°'den fazla rotasyonu olan dişler, klinik kron boyu kısa olan dişler, oligodonti vakaları, dişlerde ekstrüzyon hareketi istenen vakalarda yetersiz olacaktır (Phan ve Ling, 2007; Weir, 2017; Wong ve diğerleri, 2002).

2.4 BİYOUYUMLULUK

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin estetik, fonksiyon ve dayanıklılık gibi özelliklerinin yanı sıra biyouyumluluk özellikleri de oldukça önemlidir. Literatürde biyouyumluluk için bazı farklı tanımlamalar bulunmaktadır. Genel olarak, bir materyalin amaçlandığı gibi uygulandığında uygun bir konak cevabını sağlama kapasitesini ifade eder (Schmalz G, 2009). Diğer görüşlere göre biyouyumluluk, bir materyalin toksik, zararlı, fizyolojik olarak reaktif olmaması veya immünolojik red içermemesi nedeniyle canlı bir doku/sistem ile uyumluluğu olarak tanımlanabilir (Black ve Black, 2005). Ek olarak, biyouyumluluğa (dokunun kullanılan biyomateryale reaksiyonuna) bağlı olarak, diş

hekimliğinde kullanılan biyomateryaller biyotolerant, biyoinert ve biyoaktif olarak sınıflandırılabilir (Albrektsson ve diğerleri, 1983) (Tablo 2.1).

Bir materyalin biyoyumluluğu, korozyon ya da çözünürlük yoluyla materyalden salınan komponentler ile değerlendirilir. Bu maddeler hücrelere zarar verebilir veya belirli proteinlerin (örneğin, interlökin-1 ve interlökin-6 gibi pro-inflamatuar mediyatörler) hücresel sentezini uyararak enflamasyonu indükleyebilir (Schmalz G, 2009). Diş hekimliği uygulamalarında yeni materyallerin gelişme hızının artması, bu materyallerin biyolojik riskleri ve kısıtlamaları konusunda bilincin artmasına neden olmuştur ve bu da materyal bilimciler ve üretici firmalar için oldukça önem taşımaktadır (Shahi ve diğerleri, 2019).

Tablo 2.1: Dental materyallerin biyoyumluluk tanımına göre sınıflandırılması (Albrektsson ve diğerleri, 1983)

Biyoyumluluk sınıfı	Diş hekimliğindeki tanımı	Diş hekimliğinde kullanılan materyallere örnekler	Kemik ile ilgili temel özellik
Biyotolerant	Kemik dokusundan bir fibröz doku tabakası ile ayrılan	Polimetil metakrilat, paslanmaz çelik, kobalt alaşımları	Uzak osteogenezis
Biyoinert	Kemik dokusu ile kimyasal bağ kurma özelliğine sahip (osseointegrasyon).	Titanyum, zirkonyum, alüminyum, karbon	Kemik dokuya direkt temas
Biyoaktif	İmplant ve doku arasında kimyasal reaksiyonlar olmaksızın komşu kemik dokusu ile direkt temasta olan	Hidroksiapatit, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, cam seramikler	Kemik dokuya yapışma

2.4.1 Toksisite

Bir materyalin toksisitesi, biyolojik bir sisteme kimyasal yollarla zarar verme yeteneğini tanımlar. Daha yüksek organizmalarda (hayvanlar, insanlar) lokal toksisite (yani uygulama bölgesinde ortaya çıkan advers reaksiyonlar), advers reaksiyonun uygulama yerinden uzak bir alanda ortaya çıktığı sistemik toksisiteden farklıdır. Diş hekimliğinde lokal reaksiyonlar öncelikle pulpa, periodonsiyum ve diş eti/ağız mukozasında meydana gelir (Schmalz G, 2009).

2.4.2 Sitotoksisite

Biyouyumluluğun bariz bir belirleyicisi, bir materyalin hücre canlılığı üzerindeki etkisidir. Sitotoksisite terimi, makromoleküler senteze müdahale eden, kesin hücresel, fonksiyonel ve yapısal zarara neden olan birçok moleküler olaylar dizisini tanımlamak üzere kullanılır (Aldridge WN., 1993). Sitotoksisite, hücresel bozulmayı tetiklemenin neredeyse sonsuz sayıda yolu olduğu için karakterize edilmesi zor bir süreçtir. Diş tedavisinin bir parçası olarak, maksimum doku canlılığı korunmalı ve sitotoksik reaksiyonlar önlenmelidir. Bu nedenle tüm dental bileşiklerin klinik olarak kullanılmadan önce değerlendirilmesi gerekmektedir (Murray ve diğerleri, 2007).

2.4.3. Biyouyumluluk Test Standartları

Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), ISO 7405 (ISO 7405, 1996) ve ISO 10993 (ISO 10993, 1992) kılavuzları ile diş hekimliğinde kullanılan materyal ve tıbbi cihazların biyouyumluluklarının değerlendirilmesindeki standartları ve testleri belirtmişlerdir. Bunlar;

a) Materyalin kullanım amacına ve materyalin veya bileşenlerinin bilinen ve varsayılan toksisite profiline dayalı olarak uygun testleri seçmek dental materyal üreticisinin sorumluluğundadır.

b) Üretici; maliyet, deneyim veya diğer nedenlerle, sitotoksisite testlerinden birini diğerine tercih edebilir.

c) Genel olarak testlerin, dört test seviyesi vardır. Yeni materyaller, öncelikle başlangıç sitotoksisite testi, sonrasında doku reaksiyon testlerine tabi tutulmalıdır. Ardından hayvan deneyleri uygulanmalı ve klinik testler kullanılarak değerlendirilmelidir.

d) Test sonucu her zaman üreticinin materyal için belirttiği kullanım dikkate alınarak değerlendirilmeli ve yorumlanmalıdır (Murray ve diğerleri, 2007).

Dental materyallerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde farklı testler kullanılmaktadır ancak ilk adım *in-vitro* sitotoksite testleridir. *In-vitro* testler dental materyallerin olası toksisitesini tahmin etmek için kullanılır (Murray ve diğerleri, 2007).

In-vitro sitotoksite testleri:

- a) Direkt ve indirekt hücre kültürü testi ve ekstrat testi
- b) Agar difüzyon testi
- c) Dentin bariyer testi
- d) Filtre difüzyon testleridir (ISO 7405, 1996).

2.4.4 Sitotoksite Testlerinde Kullanılan Biyolojik Sistemler

Sitotoksite testleri, organ kültürleri ve kültür edilmiş hücreler kullanılan biyolojik sistemlerdir. En çok tercih edilen hücre kültürleridir. Hücre kültürü, canlı dokulardan elde edilen hücrelerin, *in-vitro* koşullarda vücudun fizyolojisini taklit eden sıvılar içerisinde canlı tutulup üremeleri olarak ifade edilmektedir. Çalışmalarda primer hücre kültürü ya da devamlı hücre hatları tercih edilmektedir.

Primer hücre kültürleri, orijinal dokudan alınan ve kültür şartlarında tutulan hücreleri içerir. Hücrelerin canlılığı sağlandıktan sonra hücre pasajlaması yapıp, hücreler bir kültür ortamından diğerine taşınarak alt kültürler elde edilir. Primer hücre kültürleri dokunun fizyolojik durumunu en iyi şekilde yansıtır. Ancak kültür edilme aşamaları zordur ve hassasiyet gerektirir.

Devamlı hücre hatları, kolaylıkla çoğaltılabilir ve davranışları iyi bilinir, nispeten tutarlı ve sabittir. Devamlı hücre hatları olarak sıklıkla fare fibroblastları (L929, 3T3) veya insan epitel hücreleri (HeLa) kullanılır (Schmalz, 1994).

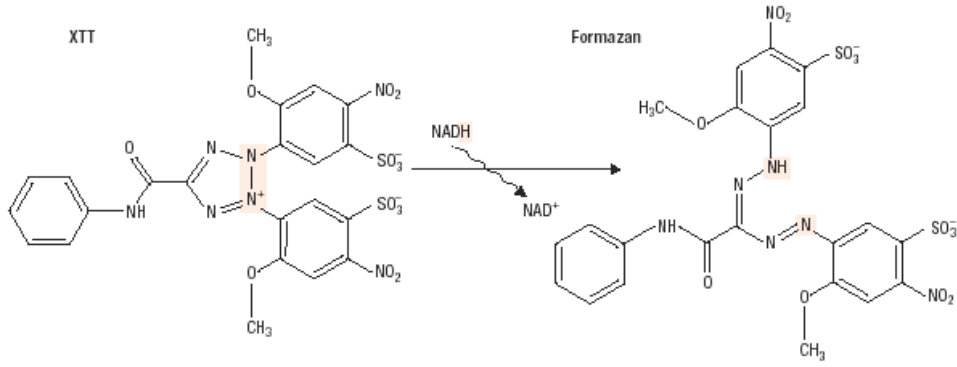
2.4.5 Sitotoksosite Değerlendirme Yöntemleri: *in-vitro*

Değerlendirme dört yöntemle yapılmaktadır. Bunlar:

- a) Canlılığı değerlendiren testler: Test edilen materyalin toksik etkisine bağlı olarak kültürde kalan canlı hücre oranının belirlenmesi esasına dayanır. Bu yöntemde değerlendirme membran bütünlüğü bozulmamış ve bozulmuş hücrelerin boyanması ile yapılmaktadır.
- b) Yaşamı değerlendiren testler: Yaşam değerlendirme testleri, hücreler üzerine uygulanmış materyalin uzun dönemde toksik etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile kullanılmaktadır.
- c) Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler: Bu test yönteminde, test edilen materyalin bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisi incelenir (RI., 1999).
- d) Hücre metabolizmasını değerlendiren testler: Metabolizma testleri, hücrelerde uzun dönem sitotoksik etkileri belirlemek için hücrelerin metabolik veya proliferatif aktivitelerini ölçerler. Metabolizma testleri arasında; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1), 2,3-Bis(2-metoksi4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) testleri yer almaktadır (Scudiero, D. A. ve diğerleri, 1988) .

2.4.5.1 XTT testi

XTT sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur ve hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlendiği bir test yöntemidir. Bu test yöntemi P.A. Scudiero tarafından 1988 yılında tanımlanmıştır (Scudiero, D. A. ve diğerleri, 1988). Bu yöntem basit, hızlı, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip, hassasiyeti yüksek ve güvenilirdir. Metabolik olarak canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi aracılığıyla XTT, turuncu renkli suda çözünebilen formazan bileşenlerine indirgenir (Şekil 2.1). Test yönteminde ELISA okuyucunun ve çok kuyucuklu platelerin kullanımı, kolay ve hızlı sonuç alınmasını sağlar (Roehm ve diğerleri, 1991).



Şekil 2.1: XTT'nin formozana dönüşümü

2.4.5.2 Apoptoz (Anneksin V- FITC) testi

Kerr ve ark. ölen tümör hücrelerinin benzersiz morfolojisini tanımlamak için Yunanca sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan 'apoptoz' terimini kullanmışlardır (Kerr ve diğerleri, 1972.). İlk olarak 1842'de Carl Vogt tarafından tanımlanan apoptotik hücre ölümünün anatomisi, hücre zarı özelliklerinin kaybını, hücre ankrajını, nükleer parçalanma ile kromatin yoğunlaşmasını ve hücre büzülmesiyle birlikte sitoplazmik yoğunlaşmayı içerir (Levy ve Nelson, 2000).

Apoptozis, diğer adı ile programlanmış hücre ölümü, normal olarak büyüme, yaşlanma sürecinde ve dokulardaki hücre sayılarını korumak için bir homeostatik mekanizma olarak bilinir. Apoptoz, hücreler hastalık ve zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde savunma mekanizması olarak da görev yapar (Norbury ve Hickson, 2001). Apoptoz ölçümü, hastalığı evreleme olasılıklarını büyük ölçüde artırılmasına yardımcı olacak ve aynı derecede önemli olarak, terapötik müdahalelerin etkisi için erken bir belirteç olarak kullanılır (Bursch ve diğerleri, 1992).

Apoptoz, membran asimetrisi ve bağlanma kaybı, sitoplazma ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi çeşitli morfolojik özelliklerle karakterize edilir. Apoptoz sürecinin tamamı birbirini izleyen üç aşamadan oluşur. Bir ölüm reseptörünün aktivasyonundan sonra (başlangıç aşaması), karmaşık süreç bir dizi enzim tarafından tetiklenir (karar aşaması). Daha sonra uygulama (idam aşaması) sırasında, hücreler önce mitokondri düzeyinde değişir, ardından dış zar ve diğer yapılar değişir. Bu aşamanın önemli olaylarından biri, hücre membranında iç kısımda yer alan fosfatidilserinin

membranın dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir (Engeland ve diğerleri, 1998). Sonrasında hücre tomurcuklar halinde kopar ve apoptotik cisimciklere ayrılır. Makrofajlar tarafından apoptotik cisimcikler tanınır ve fagosit edilir (Bellamy ve diğerleri, 1995).

Apoptoz süreci, manyetik rezonans görüntüleme, optik görüntüleme, ultrason ve radyonüklid görüntüleme gibi çeşitli yöntemler kullanılarak görüntülenebilir. Her görüntüleme yönteminin belirli avantajları ve sınırlamaları olduğu ve bir görüntüleme yöntemi veya yöntemlerinin seçiminin, sorulan spesifik biyolojik sorular tarafından belirlendiği bildirilmiştir (Tait, 2008).

Apoptozisi belirlemede kullanılan yöntemlerden bir tanesi, hücre zarının dış yüzeyine çıkan fosfatidilserin varlığının saptanmasını sağlayan floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V boyası uygulamasıdır (Van Heerde ve diğerleri, 2000). Anneksin V, fosfatidilserin kalıntıları ile güçlü bir şekilde etkileşime giren ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir. Bu yöntem, kalsiyum varlığında protein Anneksin V'nin fosfatidilserine bağlanma yeteneğine dayalıdır. Anneksin V boyalı hücrelere propidyum iyodürün ilavesi; canlı hücreler ile erken, geç apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayırma izin verir (Leite ve diğerleri, 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada günümüzde şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkileri *in-vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan şeffaf plak materyallerinin isimleri, içerikleri ve üretici firmaları Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

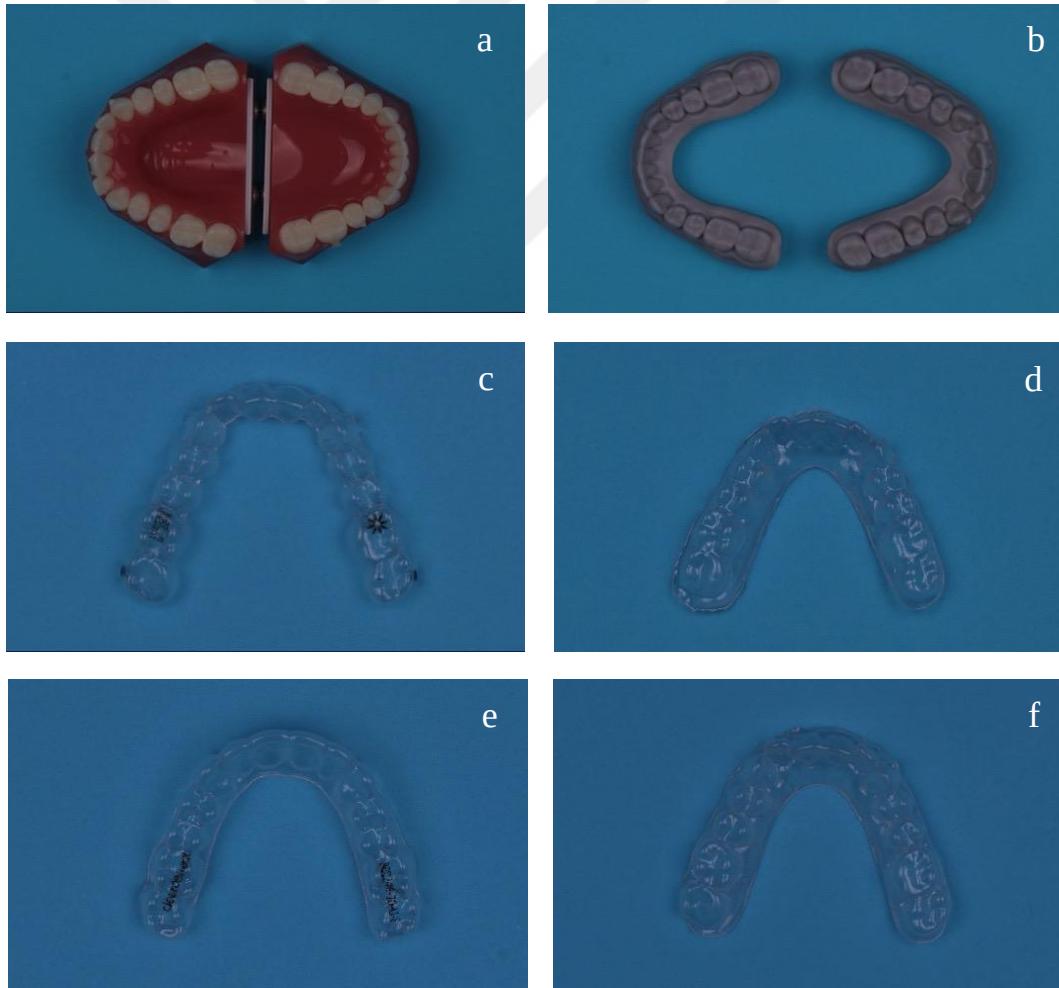
Çalışma kapsamında yürütülen sitotoksikite testleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no: PB2019-DIS-4).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firmalar

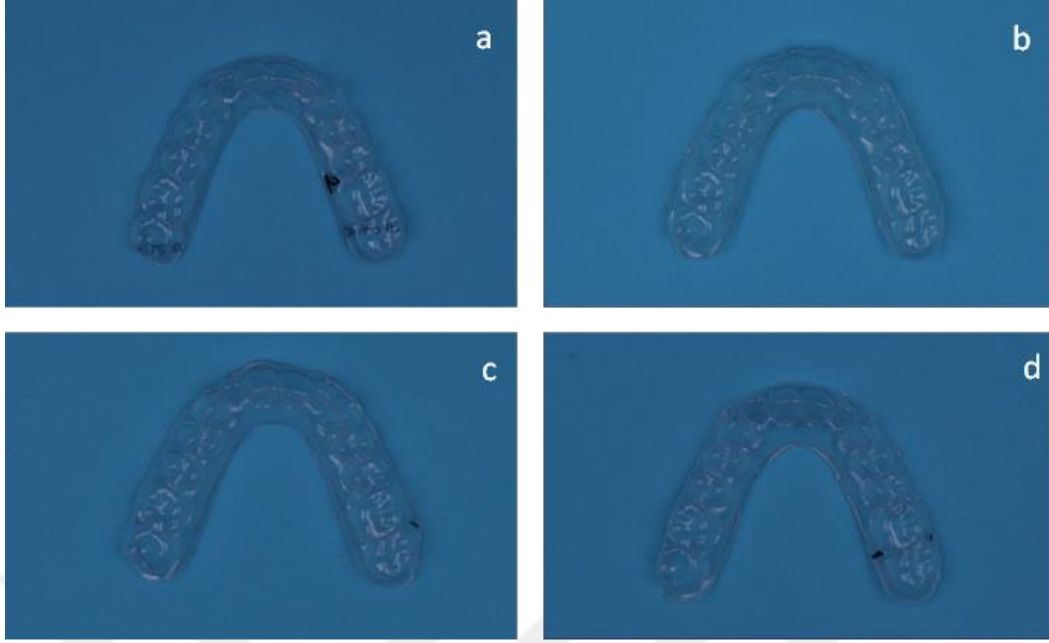
Materyal	İçeriği	Firma
SmartTrack®	Çok katmanlı aromatik termoplastik poliüretan/kopolyester	Align Technology, San Jose, CA, ABD
Zendura® A	Poliüretan rezin	Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD
Zendura FLX	Kopolyester/poliüretan rezin	Bay Materials LLC, Fremont, CA, ABD
CA® Pro	Kopolyester ve termoplastik elastomer	ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya
CA® Pro ⁺	Kopolyester ve termoplastik elastomer ve Polietilen kaplama	ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya
Duran	Polietilentereftalat-glikol kopolyester (PETG)	Scheu-Dental GmbH, Iserlohn, Almanya
Duran ⁺	Polietilentereftalat-glikol kopolyester (PETG) ve Polietilen kaplama	ScheuDental GmbH, Iserlohn, Almanya
Provecta	Termoplastik poliüretan	DingZing Advanced Materials Inc., Kaohsiung, Tayvan

3.1 ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Standardizasyonu sağlamak amacıyla Align Teknoloji (Align Technology, ABD) firmasının sınıf II Typodont modeli (Şekil 3.1, a) Ağız içi tarayıcı (3Shape Trios, 3Shape, Kopenhag, Danimarka) ile taranarak ilave üretim tekniği ile 3B baskı (Straumann P series rapidshape, Straumann, Basel, İsviçre) kullanılarak üretildi (Şekil 3.1, b). Çalışmada kullanılan 8 farklı şeffaf plak materyalinden 2'şer adet olmak üzere (n=2/grup) olmak üzere toplam 16 adet (N=16) plak üretildi (Şekil 3.1, c-f ve Şekil 3.2, a-d). SmartTrack materyaline ait plaklar, üretici firmanın sınıf II Typodont master model için ürettiği plaklardır (Align Technology, ABD) (Şekil 3.1, c). Zendura FLX materyali, (firmanın ürettiği doktor test plakları) 3B baskı ile üretilen master model üzerinde üretici firma tarafından hazırlandı (Şekil 3.1, e). Diğer tüm materyaller MINISTAR S® (Scheu-Dental GmbH) vakum cihazı ile üretildi.



Şekil 3.1: a.Typodont master model, b.Typodont master modeli 3D print baskısı, c. SmartTrack materyali, d. Zendura® A materyali, e. Zendura FLX materyali, f. CA® Pro materyali



Şekil 3.2: a. CA[®] Pro+ materyali, b. Duran materyali, c. Duran+ materyali, d. Provecta materyali

Sitotoksisite analizi için ISO 10993-12:2012 (ISO 10993, 2012) no'lu “Örnek hazırlama ve referans materyaller” önerileri esas alındı. Kullanılan materyaller solid materyaller olduğu için örneklerin ağırlığı ile seyreltinin hacmi arasındaki oran, ISO parametreleri doğrultusunda 0,2g/ml olarak ayarlandı. Elde edilen tüm örnekler ultrasonik banyoda distile su ile 5'er dakika temizlendi ve havayla kurutuldu. Sonrasında örnekler laminar akışlı steril kabinde ultraviyole ışık altında (Esco Airstream Class II BSC, Esco Gb Ltd., İngiltere) alt ve üst yüzeyleri 40'er dakika sterilize edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Materyallere ait örneklerin sterilize edildiği laminar akışlı steril kabin ve UV altındaki örnekler

3.2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI

Çalışmada fare fibroblast hücre hattı (L929 -American Type Culture Collection, Manassas, VA, ABD) kullanıldı. L929 hücreleri 75 cm² kültür kaplarında, %10 fetal sıgır serumu (FBS, Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) (Şekil 3.4, a) ve %1 penisilin-streptomisin içeren (EMEM, Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) (Şekil 3.4, b) besiyerinde, 37°C’de %5’lik CO₂ içeren nemli ortamda kültüre edildi. Hücre kültürleri inverted mikroskopta (Olympus CH30, Japonya) (Şekil 3.4, c) her 3 günde bir takip edilerek, kültür kabı yüzeyini %80 oranında kapladıklarında tripsinizasyon ile kaldırılarak pasajları yapıldı.



a



b



c

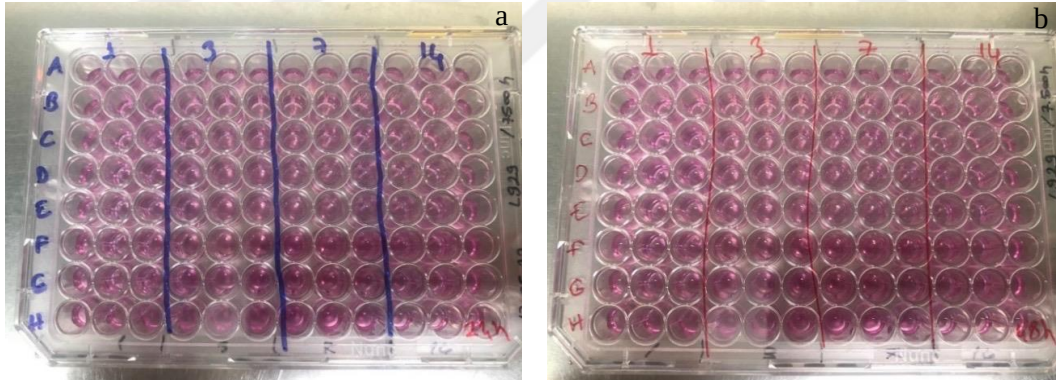
Şekil 3.4: a. Fetal Sığır Serumu, b. MEM- Eagle Besiyeri, c. Olympus CH30

3.3 MATERYAL EKSTRAKTLARININ HAZIRLANMASI

Hazırlanan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarını elde etmek için her materyal 4'er gruba ayrılarak falkon tüplerin içerisine alındı ve üzerlerine ağırlıklarına göre besiyeri eklendi (0.2g/ml). Besiyerleri 1., 3., 7. ve 14. günlerde toplandı, 0,2 µ filtreden geçirildikten sonra sitotoksosite deneylerine kadar -20°C'de saklandı.

3.4 XTT DENEYİNİN UYGULANMASI

L929 hücreleri tripsinizasyon yapılarak kaldırıldıktan sonra trypan mavisı boyası kullanılarak sayıldı. 96 kuyucuklu kültür kabına, her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yapışması için 96 kuyucuklu kültür kabı 24 saat etüvde bekletildi. Ertesi gün her kuyucuktaki besiyeri toplanarak yerine 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarından 100 µl pipetlendi. Her materyalin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratları 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Ayrıca 24 saatlik (Şekil 3.5, a) ve 48 saatlik (Şekil 3.5, b) ölçümler için iki ayrı 96'lık plaka hazırlandı.



Şekil 3.5: a. 24. saat sitotoksosite ölçümleri için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka, b. 48. saat sitotoksosite ölçümleri için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka

İnkübasyon süresi dolduğunda kuyucuklardaki tüm ortam çekilerek, kuyucuk başına 100 µl fenol red içermeyen besi ortamı pipetlendi. Her kuyucuk başına 50 µl XTT solüsyonu ve 1 µl aktivatör karışımı olacak şekilde XTT karışımı hazırlandıktan sonra hücrelerin üzerine pipetlendi (XTT Cell Proliferation Kit XTT, Biological Industries, İsrail) (Şekil 3.6, a). 37°C'deki inkübatörde dört saat inkübe edildikten sonra ELISA okuyucuda 450 nm ve 620 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü (Thermo, Finlandiya). Elde edilen

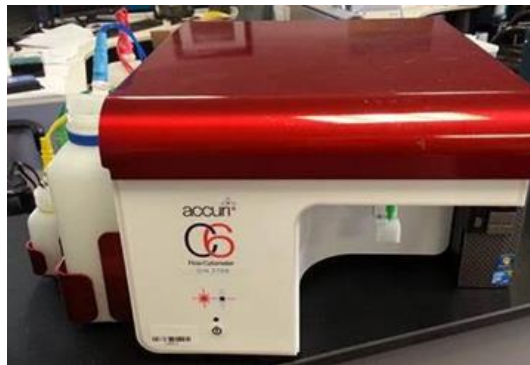
absorbans değerlerinin ortalamaları, her örneğin aynı gün için elde edilen kontrol absorbansı ortalamalarına oranlanarak her materyal için % canlılık değeri hesaplandı.



Şekil 3.6: a. XTT Hücre Proliferasyon Kiti, b. Apoptoz Belirleme Kiti

3.5 APOPTOZ (Anneksin V- FITC) TESTİ

Test materyallerinden elde edilen ortam ekstraktlarının apoptotik etkilerinin belirlenmesi için BD Pharmingen FITC Anneksin V Apoptoz belirleme kiti kullanıldı (Şekil 3.6, b). L929 hücreleri, 12 kuyucuklu plakaya 75×10^3 hücre/kuyu içerecek şekilde ekildi. Etüvde 24 saat inkübe edilerek hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra, besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı ve kuyucuklara test materyallerinin ortam ekstraktlarından 1000 µl pipetlendi. Etüvde 48 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki hücreler toplandı, fosfat tamponlu salin ile 2 kez yıkandı.



Şekil 3.7: Akım Sitometri Cihazı (BD Accuri C6)

Kontrol grubu olarak ayrılan hücreler bağlama tamponu ile resüspande edildikten sonra dört tüpe bölündü; hiç boya içermeyen, propidium iodide (PI) ile boyanan, Anneksin V ile boyanan ve PI+Anneksin V ile boyanan gruplar oluşturuldu. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra hücreler akım sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 3.7) (BD Accuri C6 Flow Cytometer, BD Biosciences, ABD). Deney gruplarındaki hücreler 100 µl bağlama tamponu ile resuspande edildikten sonra 1 µl PI ve 1 µl Anneksin V ile boyandı. İnkübasyonun ardından hücreler akım sitometri cihazında analiz edildi.

Akım sitometri cihazının analiz programından elde edilen FSC-A/SSC-A grafiğinde P1 alanında 20×10^3 hücre sayıldı. P1 alanındaki hücrelerin FL1-A ve FL2-A filtrelerinde analizi yapılarak canlı hücre ile erken, geç apoptoz ve nekroz alanları belirlendi.

3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

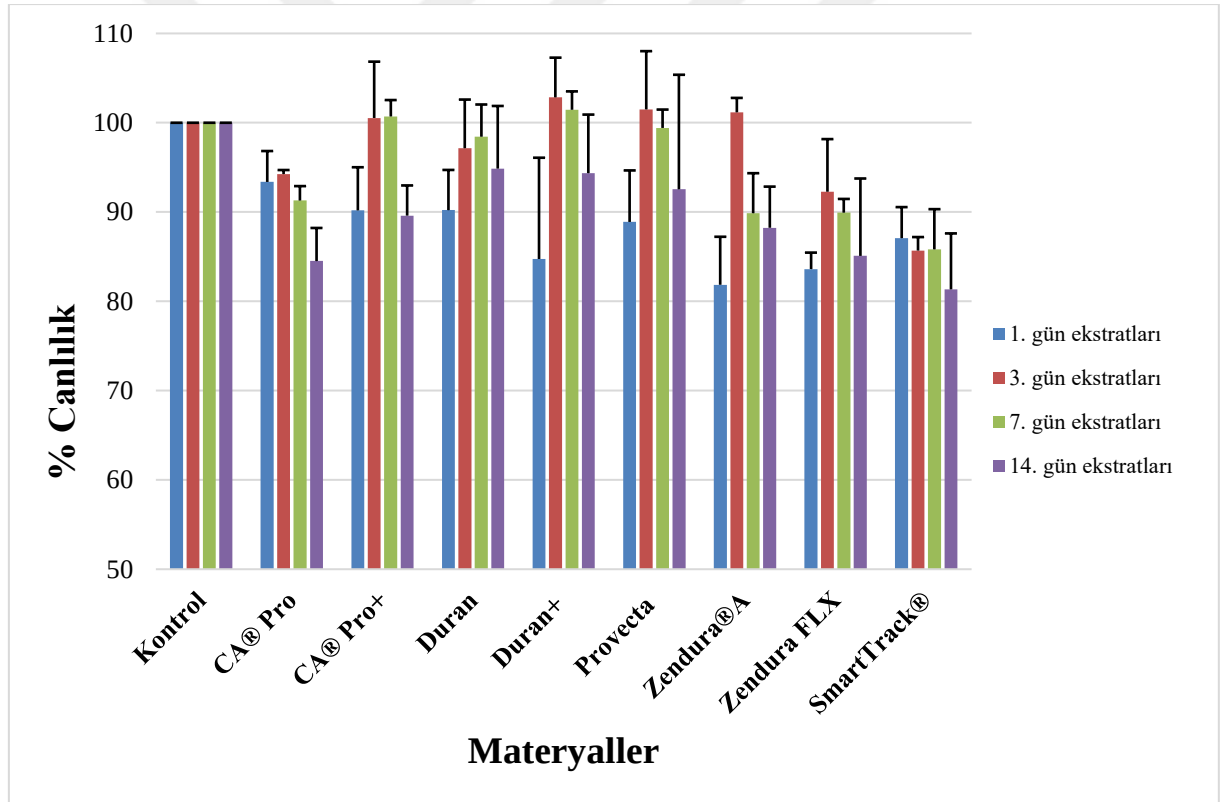
İstatistiksel analizler SPSS V.23 (SPSS INC, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. “Kolmogorov-Smirnov” testi ile değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu ölçüldü ve normal dağılımda oldukları tespit edildi. Sonra da iki yönlü varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunan gruplarda Tukey HSD Post hoc testi kullanıldı. İstatistiksel analizlerin sonuçlarında, p değerleri 0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 EKSTRATLARIN 24 SAAT UYGULANMASI SONRASI XTT ÖLÇÜMLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRE CANLILIK DEĞERLERİ

Çalışmada şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelерinin ortalamaları, standart sapmaları Şekil 4.1’te verilmiştir.

Şekil 4.1’de gösterilen hücre canlılık yüzdeleri, kontrol grubunun değeri %100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeri ve canlı hücre oranını simgelemektedir.



Şekil 4.1: Şeffaf plak materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri

* işareti satırlardaki, sütunlardaki istatistiksel farklılıkları gösterir ($p < 0,05$).

	1. gün ekstratları	3. gün ekstratları	7. gün ekstratları	14. gün ekstratları	p
CA® Pro	93,37 ±3,46	94,25±0,45	91,29±1,61	84,51±3,70	0,008*
CA® Pro+	90,19±4,83	100,53±6,31	100,70±1,84	89,60±3,38	0,059
Duran	90,22±4,50	97,15±5,45	98,44±3,61	94,87±7,01	0,312
Duran+	84,74±11,34	102,84±4,45	101,45±2,06	94,36±6,56	0,046
Provecta	88,89±5,77	101,50±6,52	99,42±2,06	92,55±12,82	0,245
Zendura®A	81,85±5,37	101,17±1,61	89,87±4,48	88,24±4,61	0,004*
Zendura FLX	83,61±1,84	92,28±5,89	89,93±1,54	85,09±8,67	0,242
SmartTrack®	87,08±3,48	85,68±1,51	85,82±4,50	81,35±6,26	0,433
p	0,278	0,004*	<0,001*	0,271	

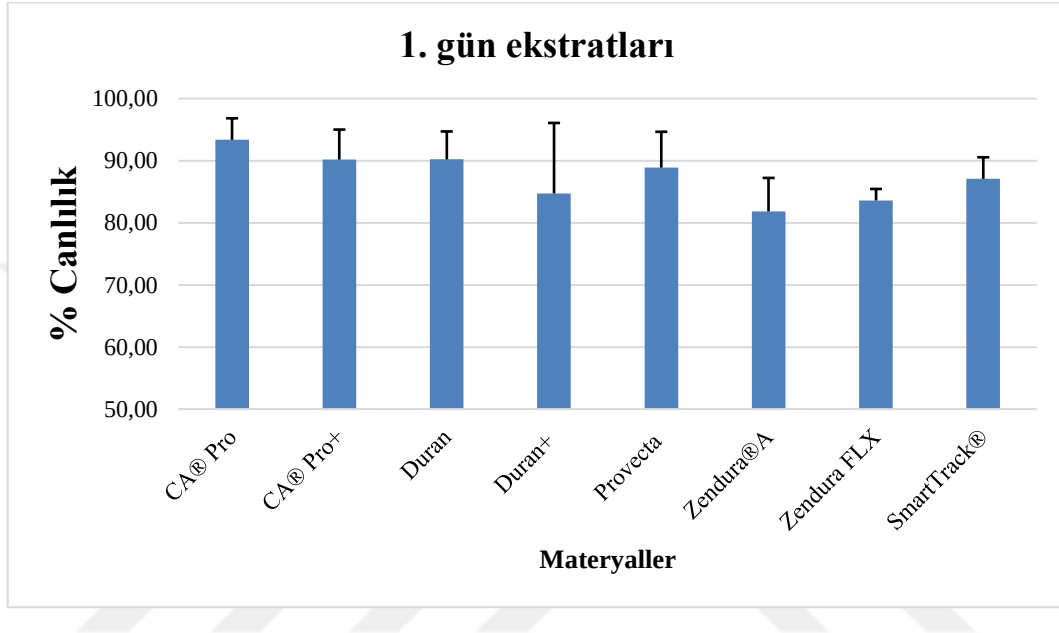
Yapılan iki yönlü varyans analizi (ANOVA) analizine göre çalışmada kullanılan test materyallerinin zamana bağlı hücre canlılık değerleri, materyalin tipinden ($p < 0,05$) ve zamandan etkilenmektedir ($p < 0,05$). Çalışmada kullanılan test materyalleri ve zamanlar arasında etkileşim yoktur ($p > 0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Materyal ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerlerinin 2 yönlü ANOVA analizi ile incelenmesi

	Kareler Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F	Sig.	Parsiyel Eta-Kare
Materyal	1440,95	7	205,85	7,15	0,00	0,44
Zaman	1476,44	3	492,15	17,11	0,00	0,45
Materyal*Zaman	876,80	21	41,75	1,45	0,13	0,32

4.1.1 1. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

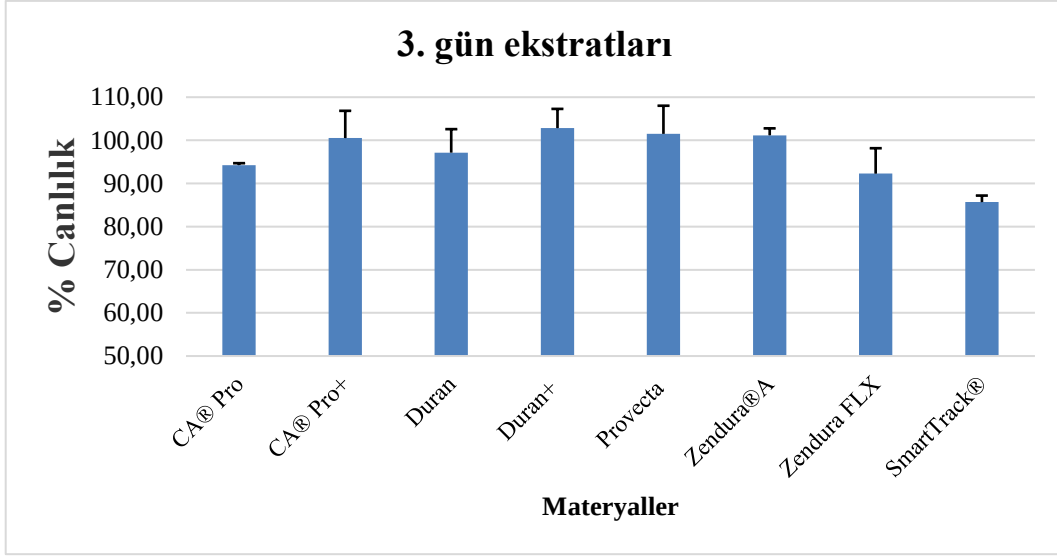
1. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p= 0,278$, Tablo 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Materyallerin 1. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

4.1.2 3. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

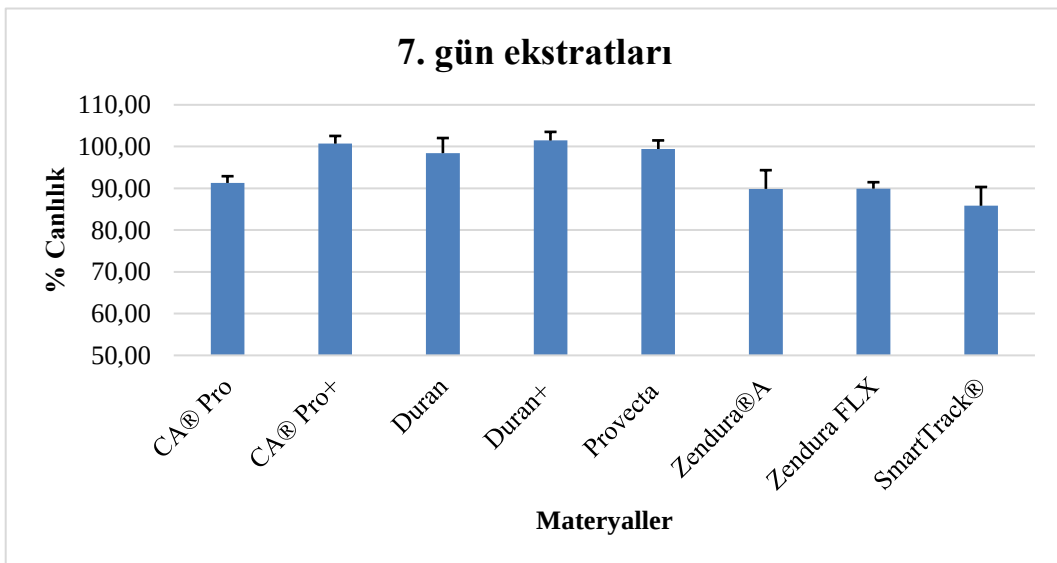
Materyallerin 3. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,004$, Tablo 4.1). SmartTrack® materyalinin hücre canlılık değeri ($85,68\pm1,51$); CA® Pro+ ($100,53\pm6,31$), Duran+ ($102,84\pm4,45$), Provecta ($101,50\pm6,52$) ve Zendura®A ($101,17\pm1,61$) materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.1). Karşılaştırılan diğer materyaller arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Tablo 4.1, Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Materyallerin 3. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri

4.1.3 7. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

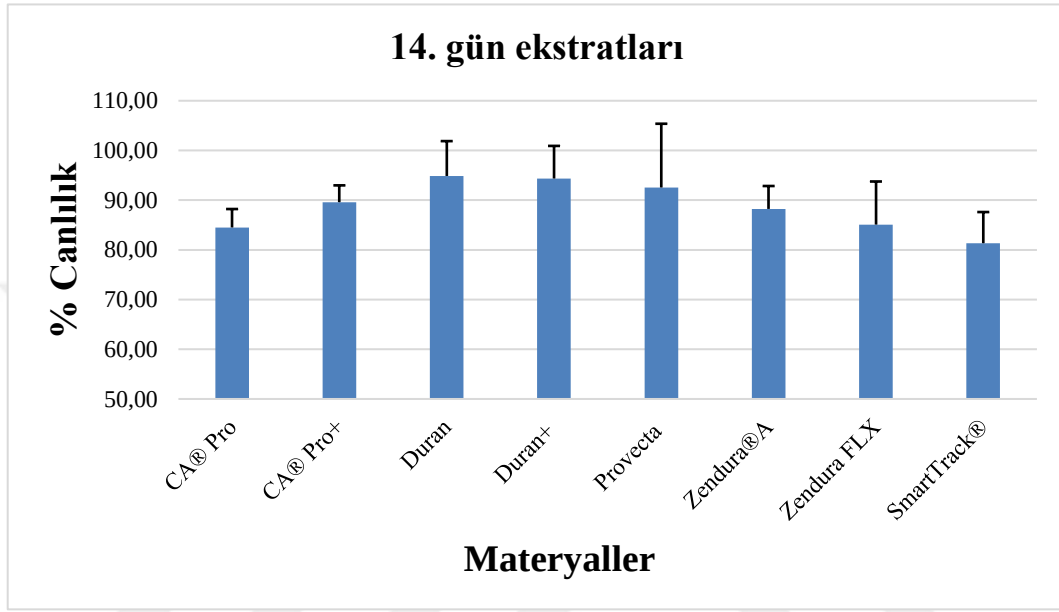
7. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre; çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,001$, Tablo 4.1). CA® Pro+ ($100,70 \pm 1,84$), Duran ($98,44 \pm 3,61$), Duran+ ($101,45 \pm 2,06$), Provecta ($99,42 \pm 2,06$) materyallerinin hücre canlılık değerleri; Zendura®A ($89,87 \pm 4,48$), Zendura FLX ($89,93 \pm 1,54$) ve SmartTrack® ($85,82 \pm 4,50$) materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$, Tablo 4.1, Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Materyallerin 7. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri

4.1.4 14. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

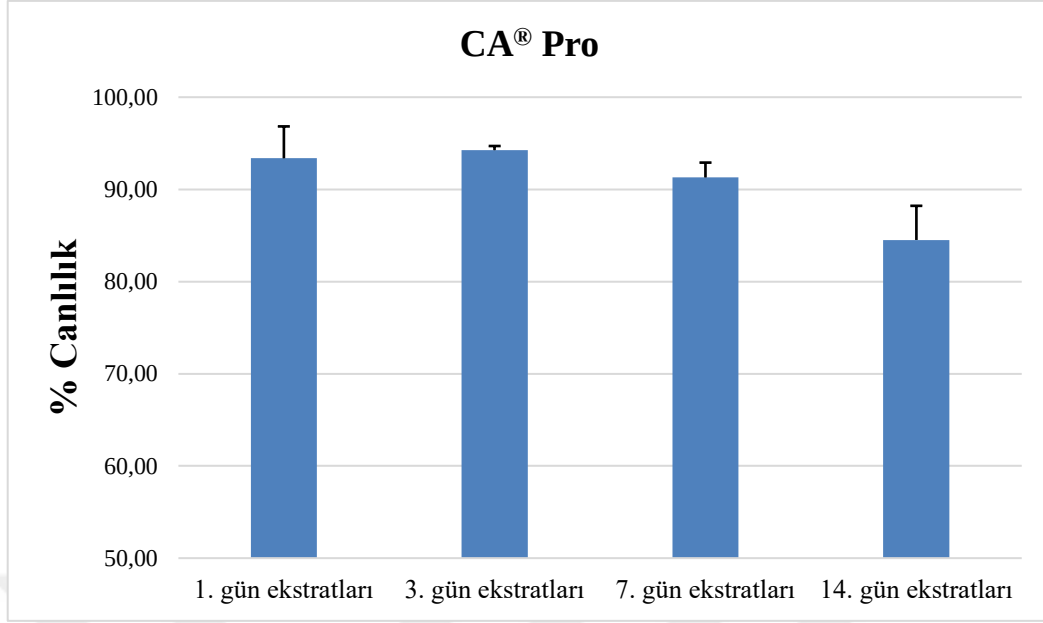
14. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,271$, Tablo 4.1, Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Materyallerin 14. gün ekstratlarının hücre canlılık yüzdeleri

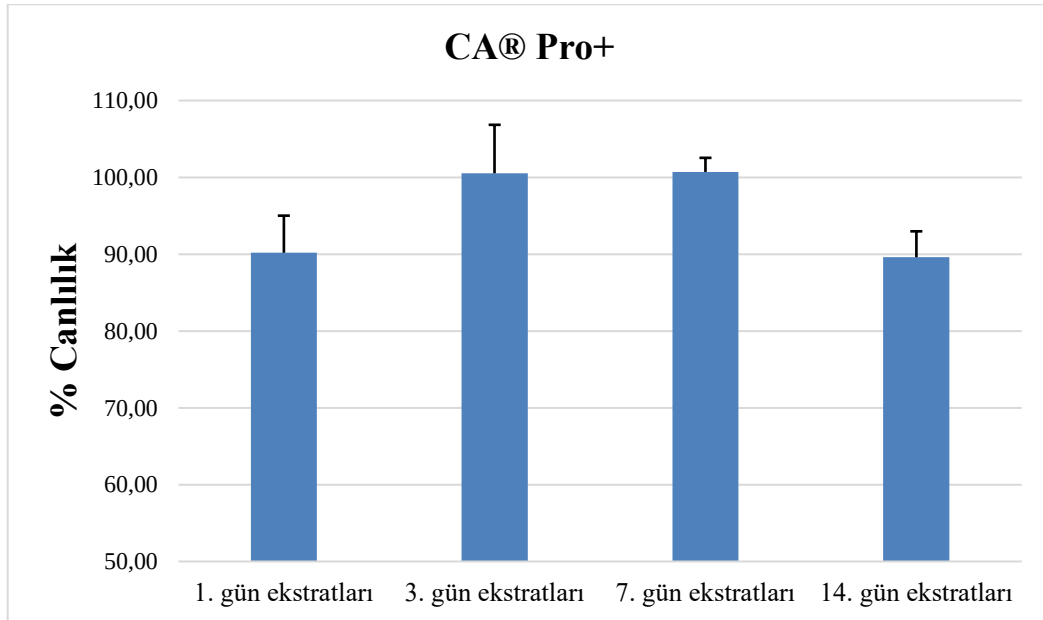
Çalışmada kullanılan her bir materyalin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında;

CA® Pro materyalinin 1., 3, 7. ve 14. ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p= 0,008$, Tablo 4.1). CA® Pro materyalinin 14. gün ekstratının hücre canlılık değeri ($84,51\pm3,70$); 1. gün ($93,37\pm3,46$) ve 3. gün ($94,25\pm0,45$) ekstratlarının hücre canlılık değerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.1). 1., 3. ve 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$, Tablo 4.1, Şekil 4.6).



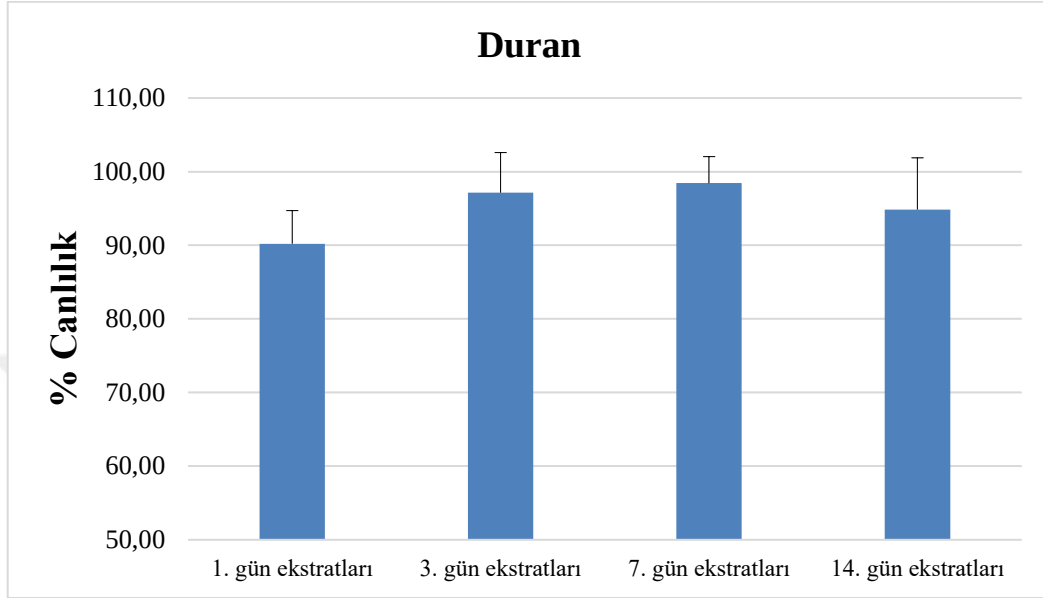
Şekil 4.6: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14.gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri

CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,059$, Tablo 4.1, Şekil 4.7).



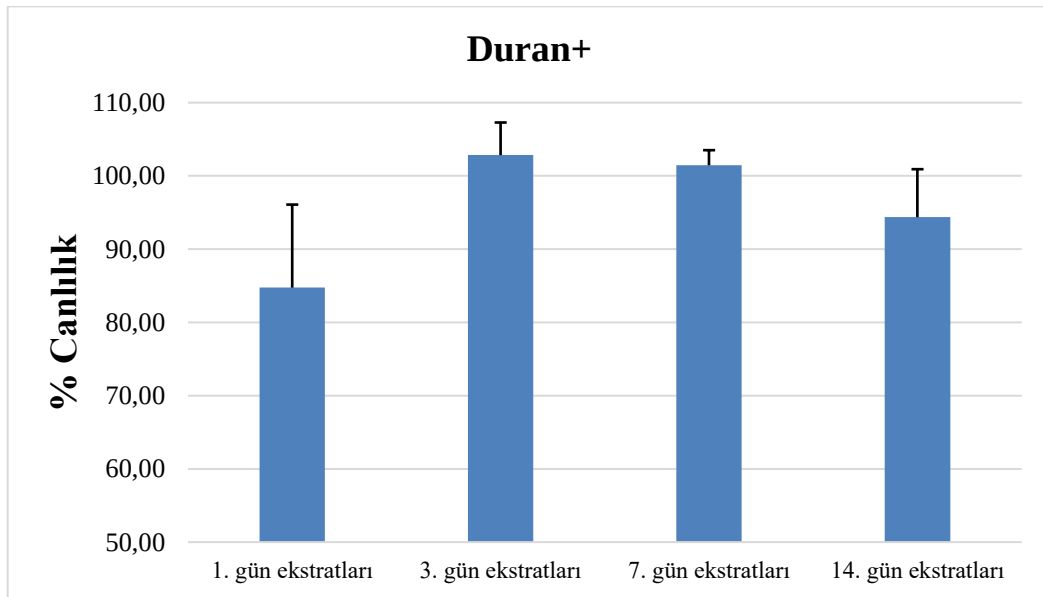
Şekil 4.7: CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14.gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri

Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,312$, Tablo 4.1, Şekil 4.8).



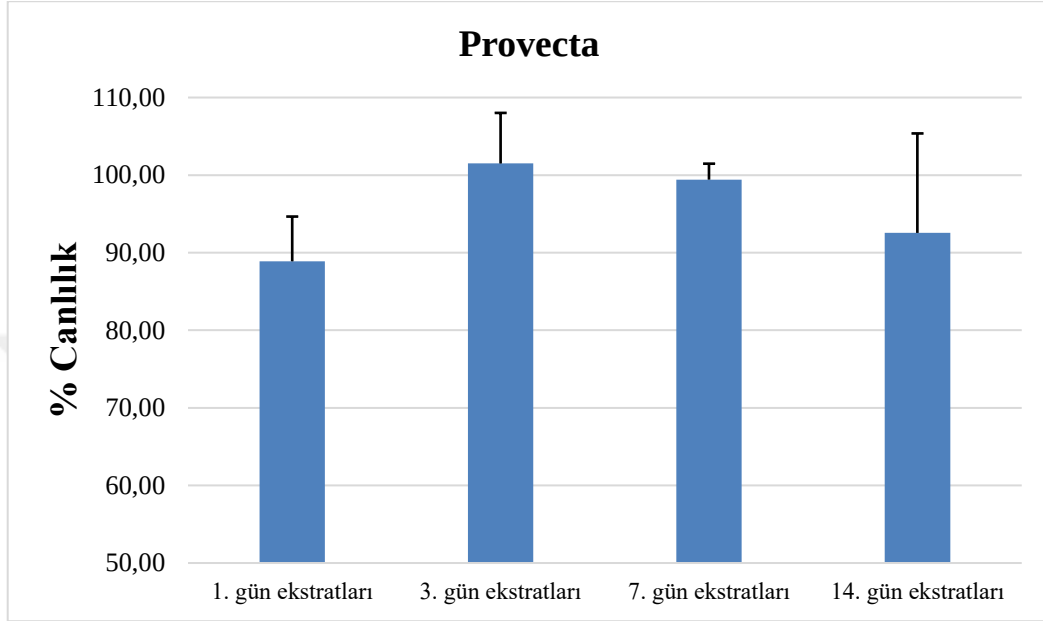
Şekil 4.8: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 24 saatlik hücre canlılık değerleri

Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,046$, Tablo 4.1, Şekil 4.9).



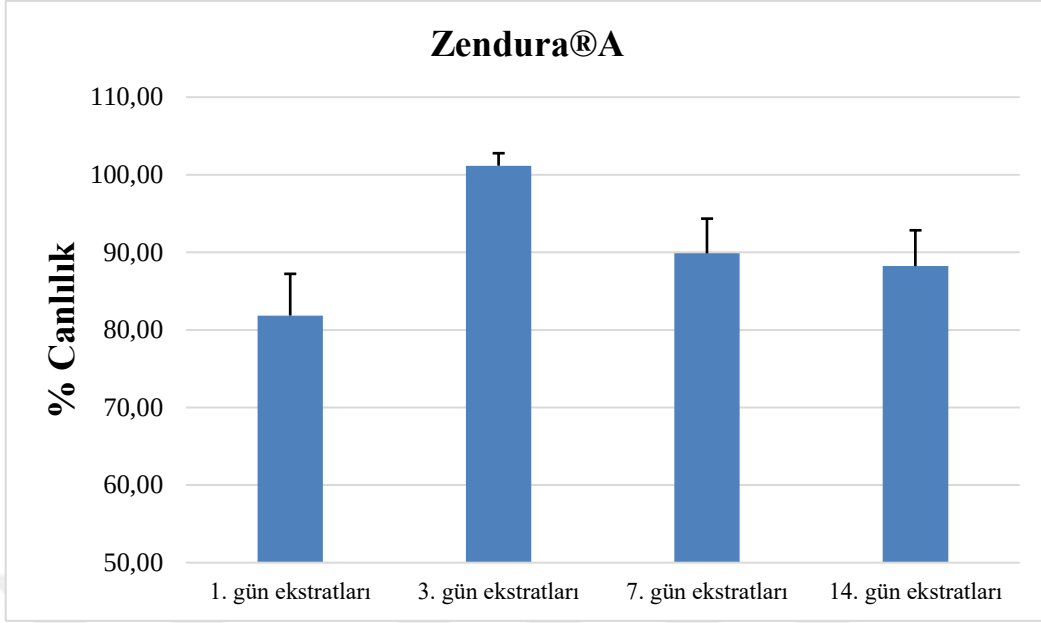
Şekil 4.9: Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri

Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,245$, Tablo 4.1, Şekil 4.10).



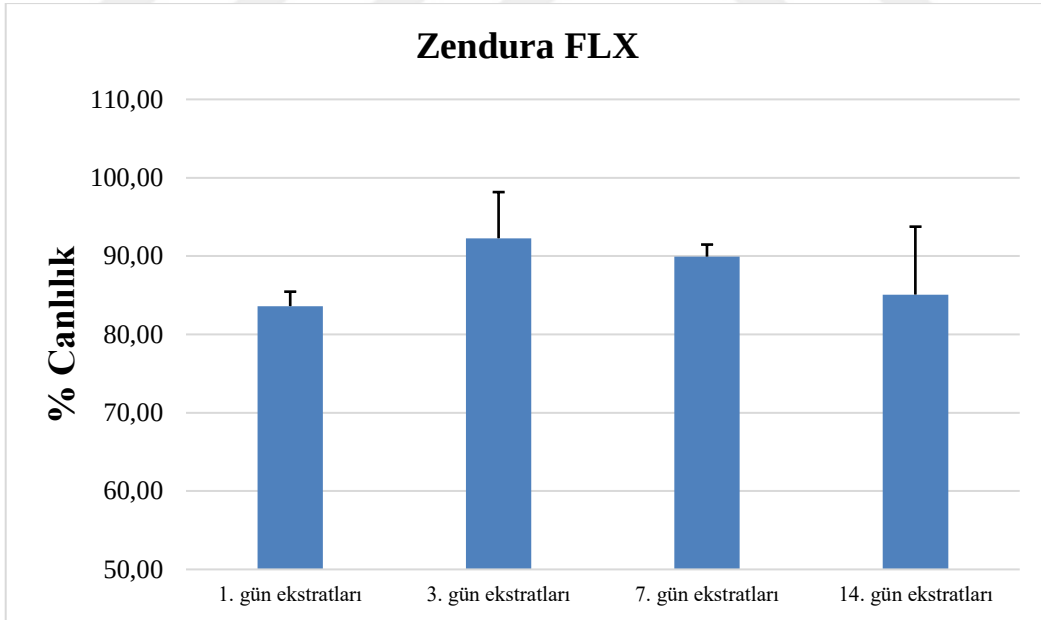
Şekil 4.10: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri

Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,004$, Tablo 4.1). En yüksek hücre canlılığı 3. gün ekstratında gözlenirken ($101,17 \pm 1,61$) ($p < 0,05$), diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$, Tablo 4.1, Şekil 4.11).



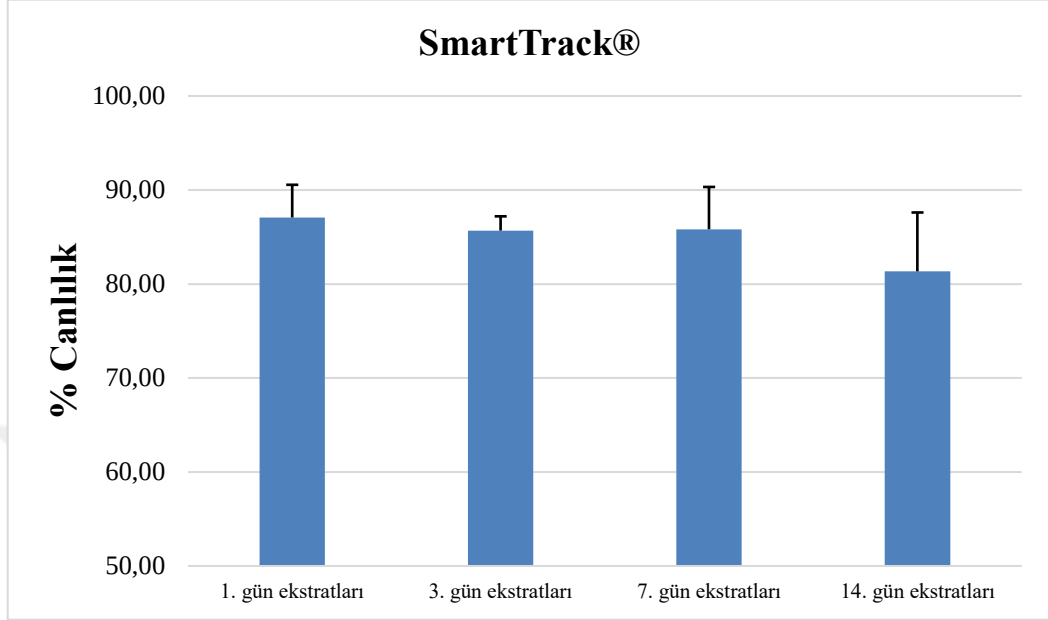
Şekil 4.11: Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri

Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,242$, Tablo 4.1, Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri

SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,433$, Tablo 4.1, Şekil 4.13).

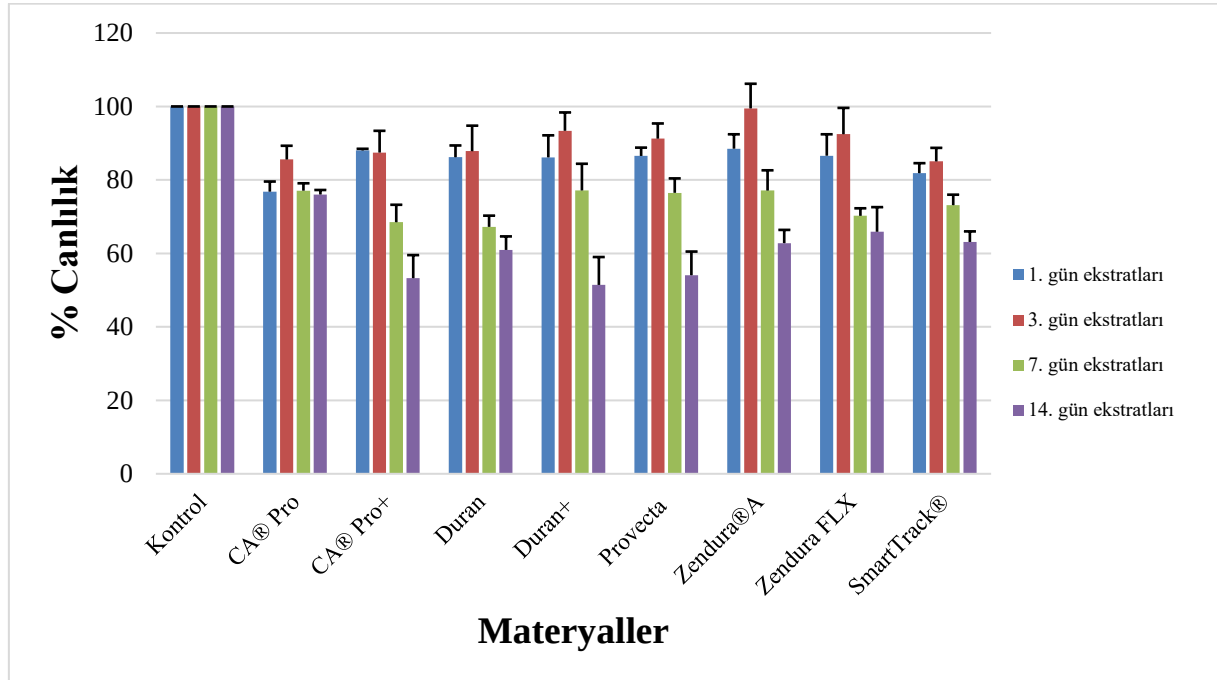


Şekil 4.13: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri

4.2 EKSTRATLARIN 48 SAAT UYGULANMASI SONRASI XTT ÖLÇÜMLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRE CANLILIK DEĞERLERİ

Çalışmada şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelерinin ortalamaları, standart sapmaları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Şekil 4.14'te gösterilen hücre canlılık yüzdeleri, kontrol grubunun değeri %100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeri'dir ve canlı hücre oranını simgelemektedir.



Şekil 4.14: Şeffaf plak materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

Tablo 4.3: Çalışmada kullanılan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri

* işareti satırlardaki, sütunlardaki istatistiksel farklılıkları gösterir ($p < 0,05$).

	1. gün ekstratları	3. gün ekstratları	7. gün ekstratları	14. gün ekstratları	p
CA® Pro	76,81±2,76	85,57±3,74	77,08±2,01	76,05±1,22	0,006*
CA® Pro+	88,05±0,43	87,45±5,92	68,50±4,75	53,27±6,27	<0,001*
Duran	86,19±3,19	87,83±6,94	67,23±3,05	60,94±3,68	<0,001*
Duran+	86,15±6,00	93,38±5,00	77,14±7,27	51,42±7,60	<0,001*
Provecta	86,53±2,26	91,24±4,13	76,49±3,92	54,07±6,43	<0,001*
Zendura®A	88,51±3,92	99,48±6,70	77,11±5,51	62,80±3,60	<0,001*
Zendura FLX	86,60±5,83	92,46±7,15	70,22±2,06	65,89±6,70	0,001*
SmartTrack®	81,85±2,71	85,04±3,69	73,14±2,85	63,12±2,87	<0,001*
p	0,027*	0,085	0,048	0,001*	

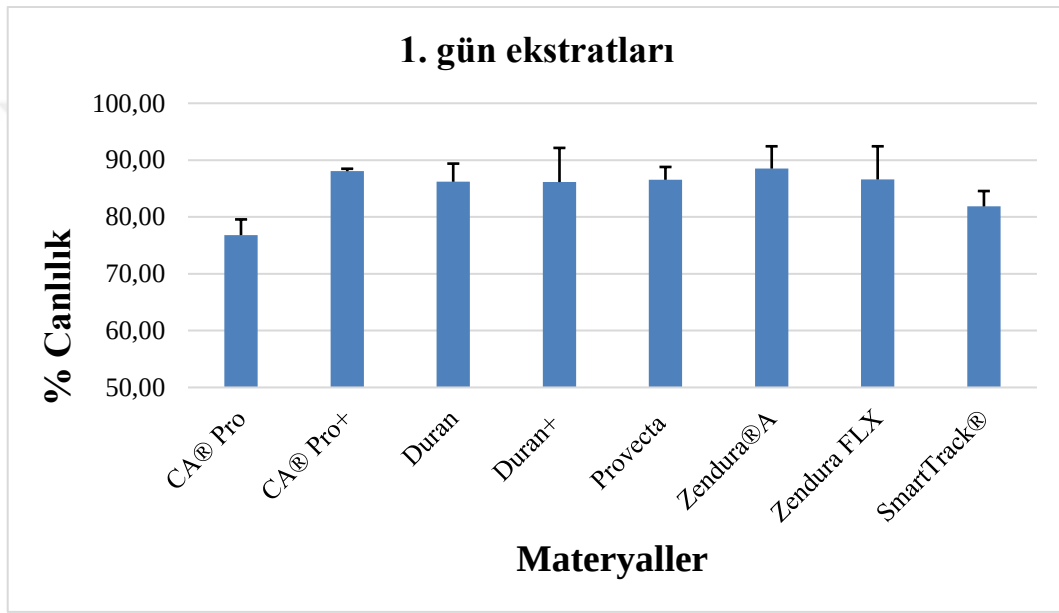
Yapılan iki yönlü varyans analizine (ANOVA) göre çalışmada kullanılan test materyallerinin zamana bağlı hücre canlılık değerleri, materyalin tipinden ($p < 0,05$) ve zamandan etkilenmektedir ($p < 0,05$). Çalışmada kullanılan test materyalleri ve zamanlar arasında etkileşim mevcuttur ($p < 0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Materyal ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerlerinin 2 yönlü ANOVA analizi ile incelenmesi

	Kareler Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F	Sig.	Parsiyel Eta-Kare
Materyal	490,17	7	70,02	3,06	0,01	0,25
Zaman	12307,02	3	4102,34	179,49	0,00	0,89
Materyal*Zaman	2062,57	21	98,22	4,30	0,00	0,59

4.2.1 1. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

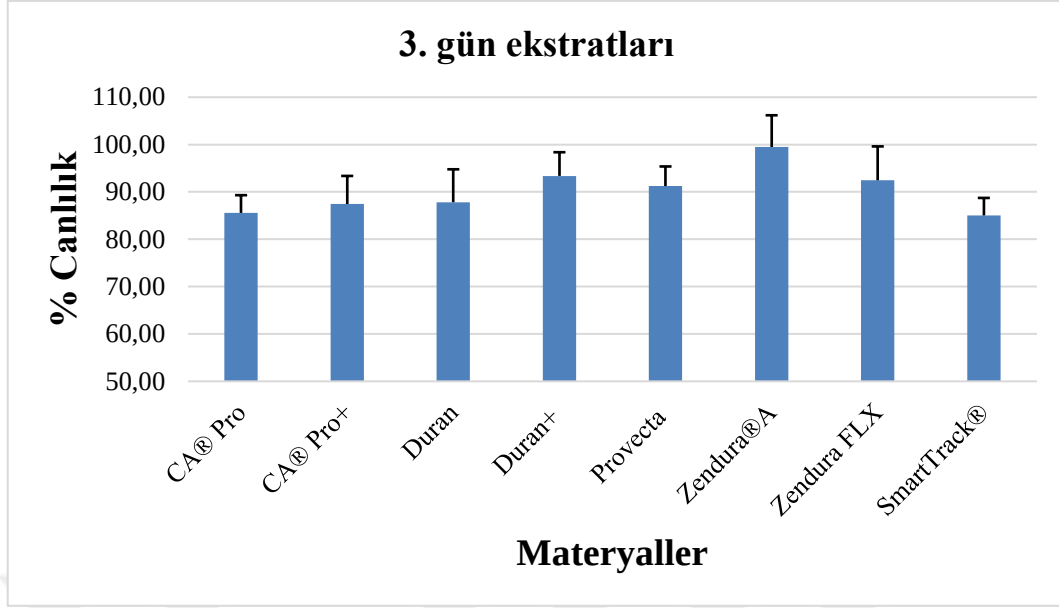
1. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,027$, Tablo 4.3). CA® Pro materyalinin hücre canlılık değeri ($76,81\pm2,76$); CA® Pro+ ($88,05\pm0,43$) ve Zendura®A ($88,51\pm3,92$) materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.1). Karşılaştırılan diğer materyaller arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Materyallerin 1. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

4.2.2 3. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

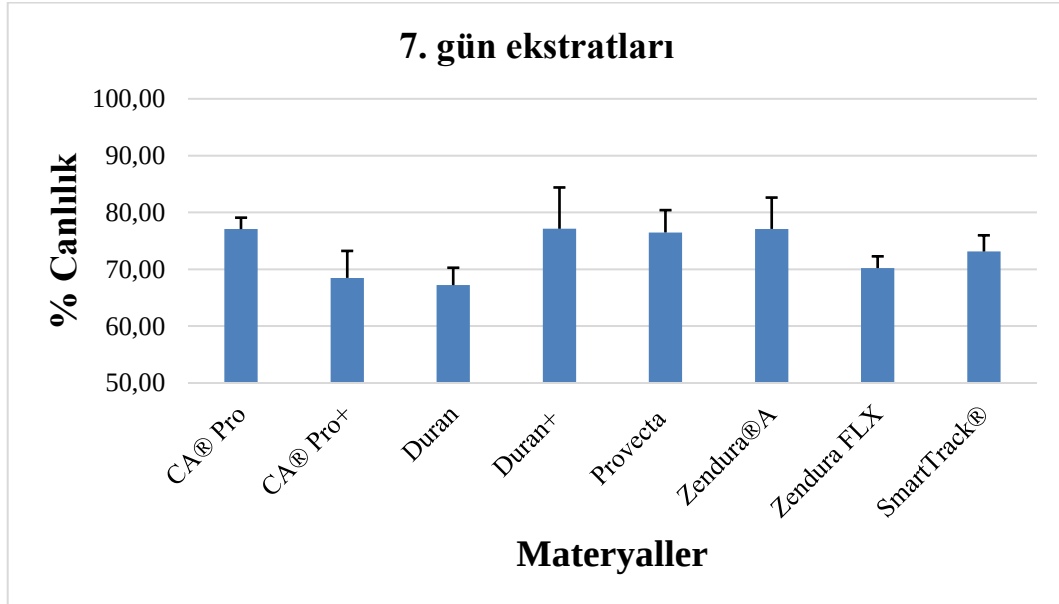
3. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,085$, Tablo 4.3, Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Materyallerin 3. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

4.2.3 7. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

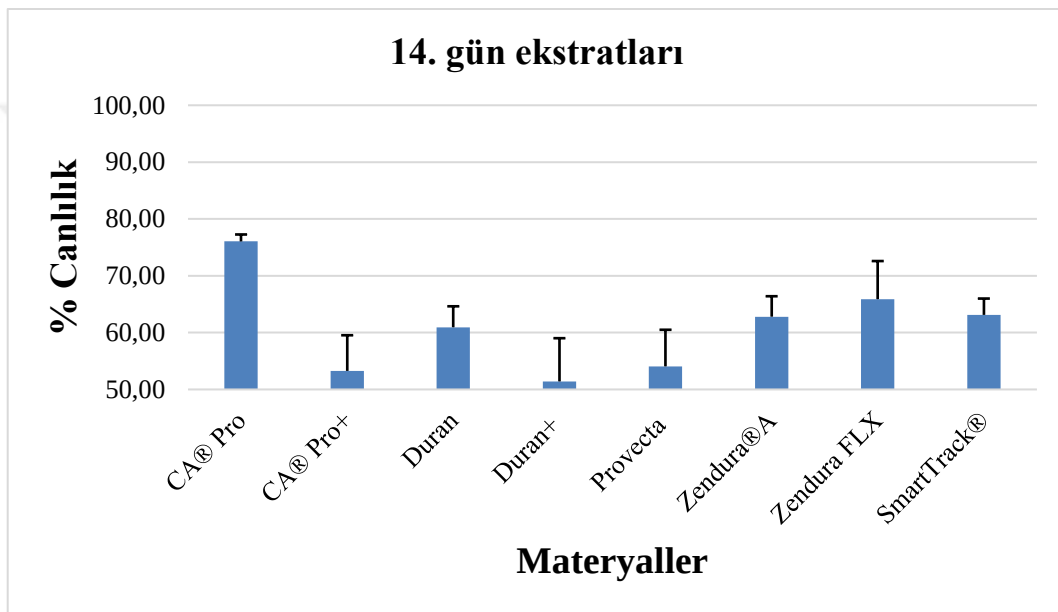
7. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,048$, Tablo 4.3, Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Materyallerin 7. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

4.2.4 14. Gün Ekstratlarının XTT Testi ile Elde Edilen Canlılık Değerleri

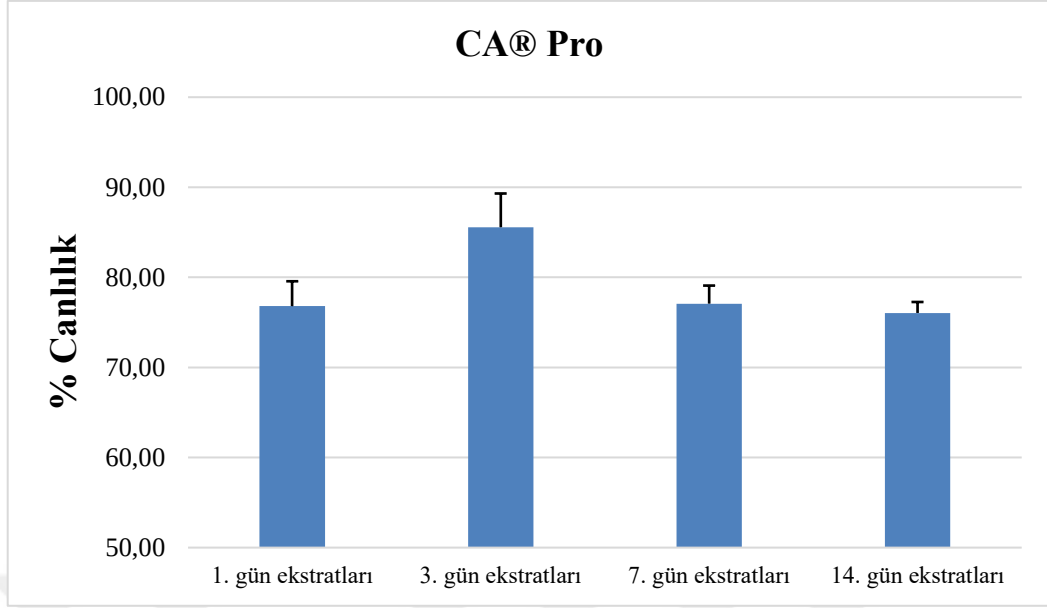
14. gün ekstratlarının sitotoksosite bulgularına göre, çalışmada kullanılan sekiz materyalin hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,001$, Tablo 4.3). CA® Pro materyalinin hücre canlılık değeri ($76,05\pm1,22$); CA® Pro+ ($53,27\pm6,27$), Duran ($60,94\pm3,68$), Duran+ ($51,42\pm7,60$), Provecta ($54,07\pm6,43$) materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.3). Karşılaştırılan diğer materyaller arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Materyallerin 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri

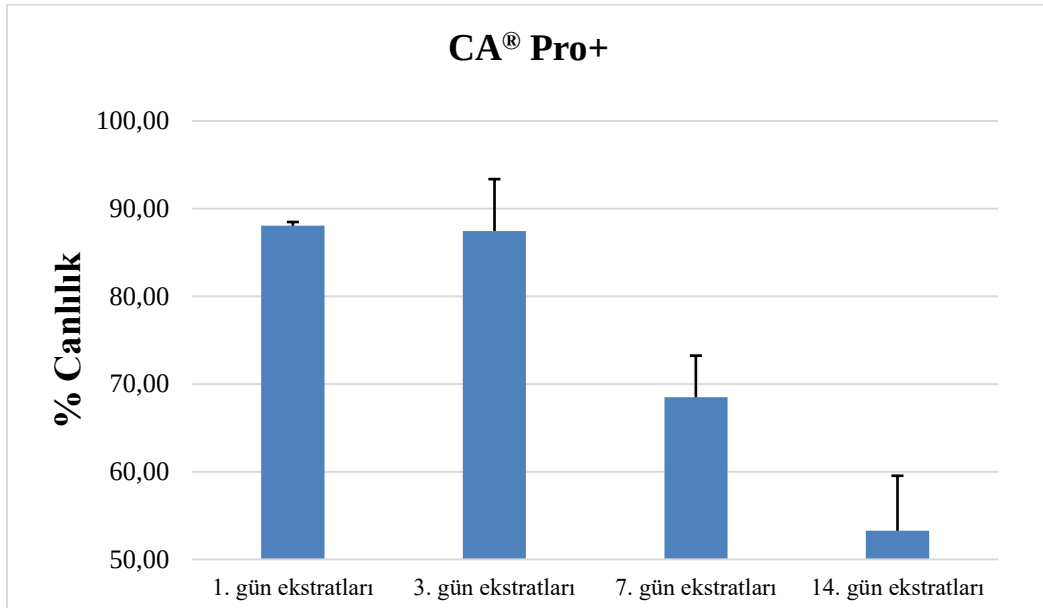
Çalışmada kullanılan her bir materyalin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık yüzdeleri değerlendirildiğinde;

CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p= 0,006$, Tablo 4.3). CA® Pro materyalinin 3. gün ekstratının hücre canlılık değeri ($85,57\pm3,74$); 1. gün ($76,81\pm2,76$), 7. Gün ($77,08\pm2,01$) ve 14. gün ($76,05\pm1,22$) ekstratlarının hücre canlılık değerlerinden yüksek bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.19).



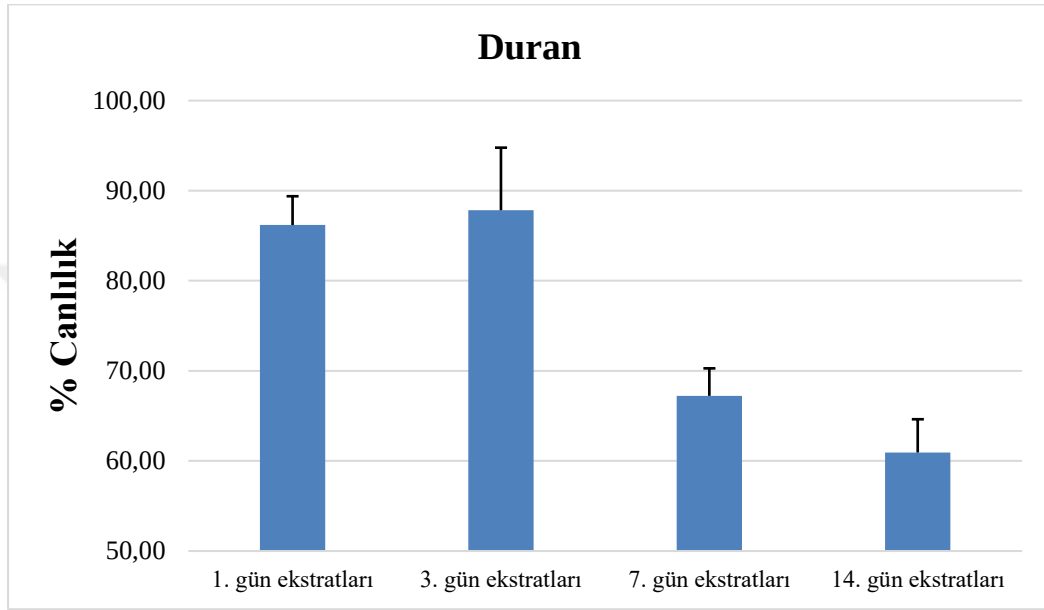
Şekil 4.19: CA® Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,001$, Tablo 4.3). 1. gün ($88,05 \pm 0,43$) ve 3. gün ($87,45 \pm 5,92$) ekstratları ile karşılaştırıldığında 7. gün ($68,50 \pm 4,75$) ve 14. gün ($53,27 \pm 6,27$) ekstratlarının hücre canlılık değerleri anlamlı olarak düşmüştür ($p < 0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.20).



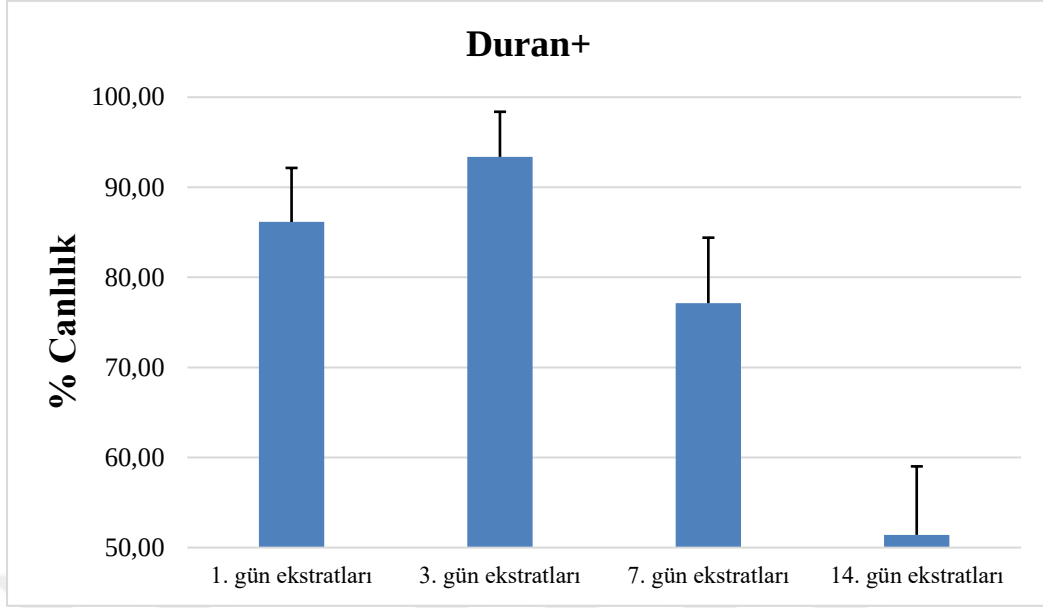
Şekil 4.20: CA® Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,001$, Tablo 4.3). 1.gün ($86,19\pm3,19$) ve 3. gün ekstratlarının hücre canlılığı değerleri ($87,83\pm6,94$) arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), 7. gün ($67,23\pm3,05$) ve 14. gün ($60,94\pm3,68$) ekstratlarının hücre canlılık değeri oldukça düşük bulunmuştur ($p<0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.21).



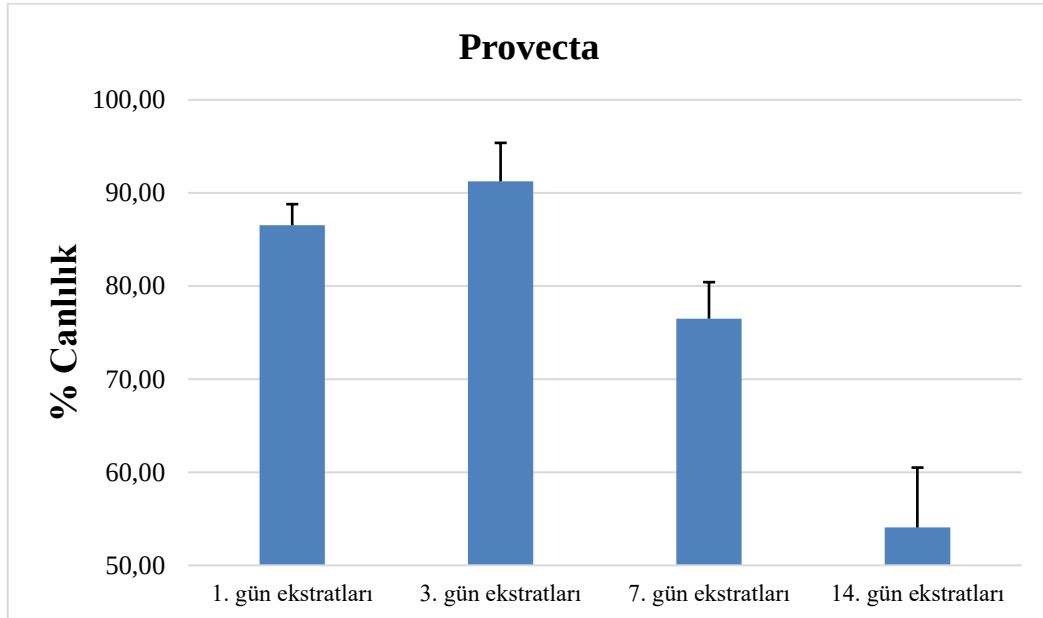
Şekil 4.21: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,001$, Tablo 4.3). 1.gün ($86,15\pm6,00$), 3. gün ($93,38\pm5,00$) ve 7. gün ($77,14\pm7,27$) ekstratlarının hücre canlılığı değerleri arasında anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), 14. gün ekstratının hücre canlılık değeri ($51,42\pm7,60$) anlamlı olarak düşmüştür ($p<0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.22).



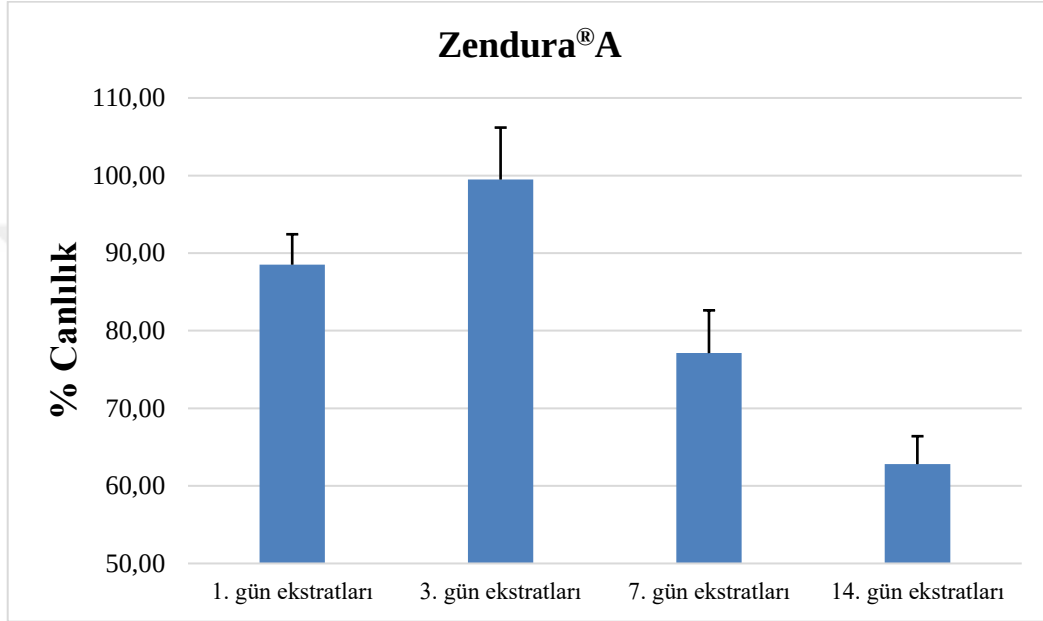
Şekil 4.22: Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,001$, Tablo 4.3). En yüksek hücre canlılığı 3. gün ekstratında gözlenirken ($91,24 \pm 4,13$), en düşük hücre canlılığı da 14. gün ekstratında gözlenmiştir ($54,07 \pm 6,43$) ($p < 0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.23).



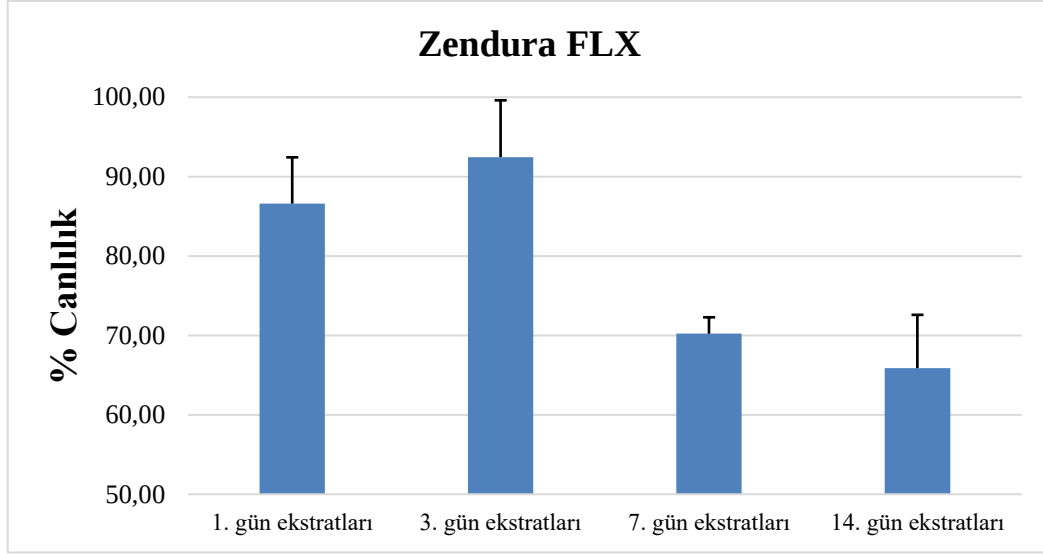
Şekil 4.23: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,001$, Tablo 4.3). En yüksek hücre canlılığı 3. gün ekstratında gözlenirken ($99,48\pm6,70$), en düşük hücre canlılığı da 14. gün ekstratında gözlenmiştir ($62,80\pm3,60$) ($p<0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.24).



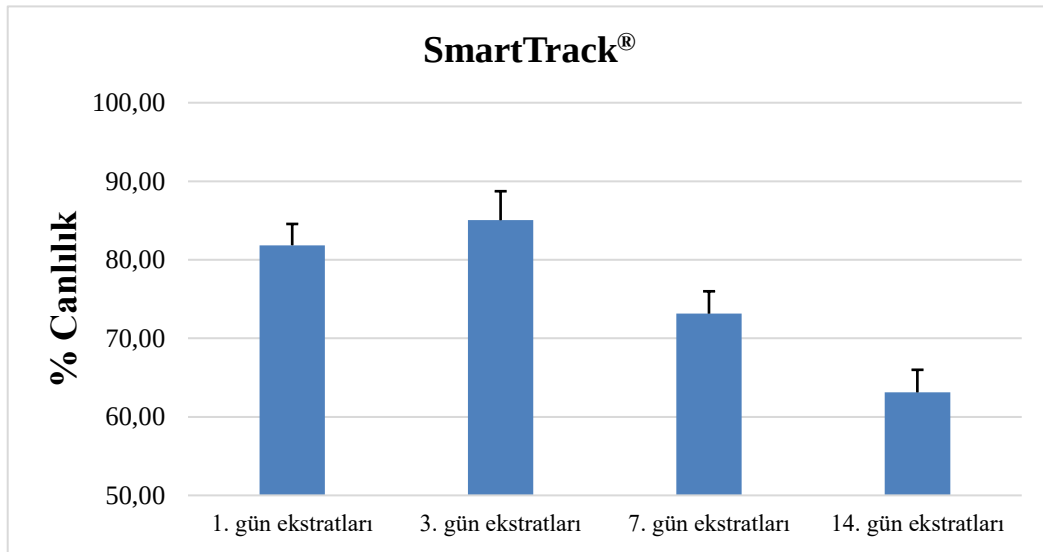
Şekil 4.24: Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,001$, Tablo 4.3). 1.gün ($86,60\pm5,83$), 3. Gün ($92,46\pm7,15$) ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$) 7. ($70,22\pm2,06$) ve 14. ($65,89\pm6,70$) gün ekstratlarının hücre canlılığı anlamlı derecede düşmüştür ($p<0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.25).



Şekil 4.25: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

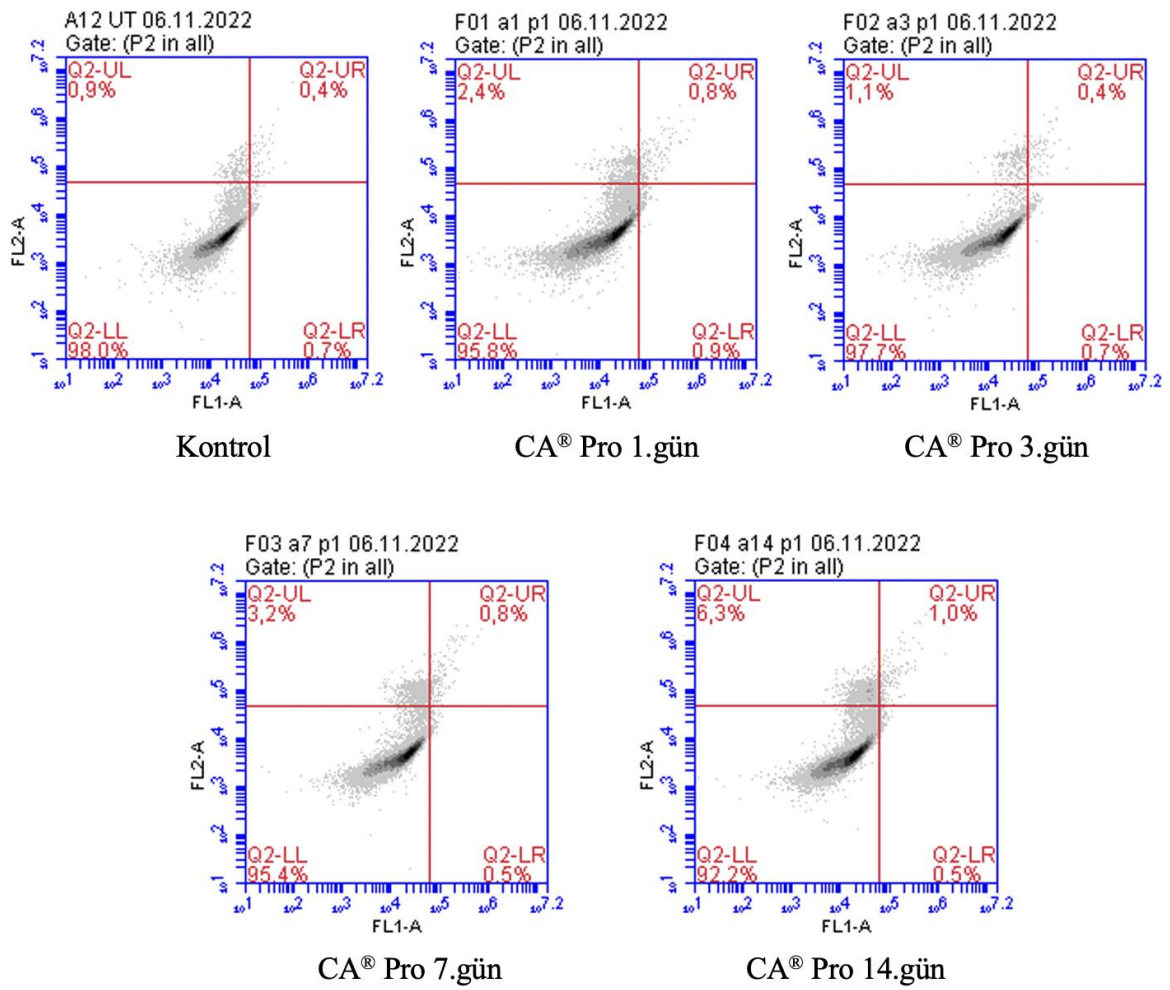
SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,001$, Tablo 4.3). 1.gün ($81,85 \pm 2,71$), 3. Gün ($85,04 \pm 3,69$) ekstratlarının hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). 7. ($73,14 \pm 2,85$) ve 14. ($63,12 \pm 2,87$) gün ekstratlarının hücre canlılığı anlamlı derecede düşmüştür ($p < 0,05$, Tablo 5). En düşük hücre canlılığı 14. gün ekstratında ($63,12 \pm 2,87$) gözlenmiştir ($p < 0,05$, Tablo 4.3, Şekil 4.26).



Şekil 4.26: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri

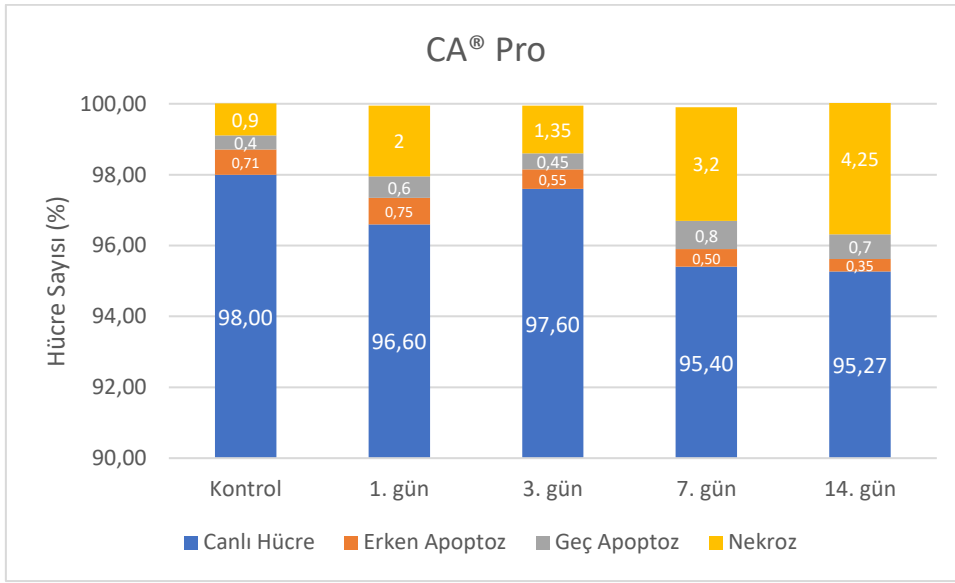
4.3 APOPTOZ BULGULARI

CA[®] Pro materyalinin Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.27 ve 4.28’de gösterilmektedir. Grafikte sol altta canlı hücreler (LL), sağ altta erken apoptoz (LR), sağ üstte geç apoptoz (UR) ve sol üstte nekrotik hücreler (UL) görülmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, CA[®] Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %95,80; %97,70; %95,40 ve %92,20 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27).



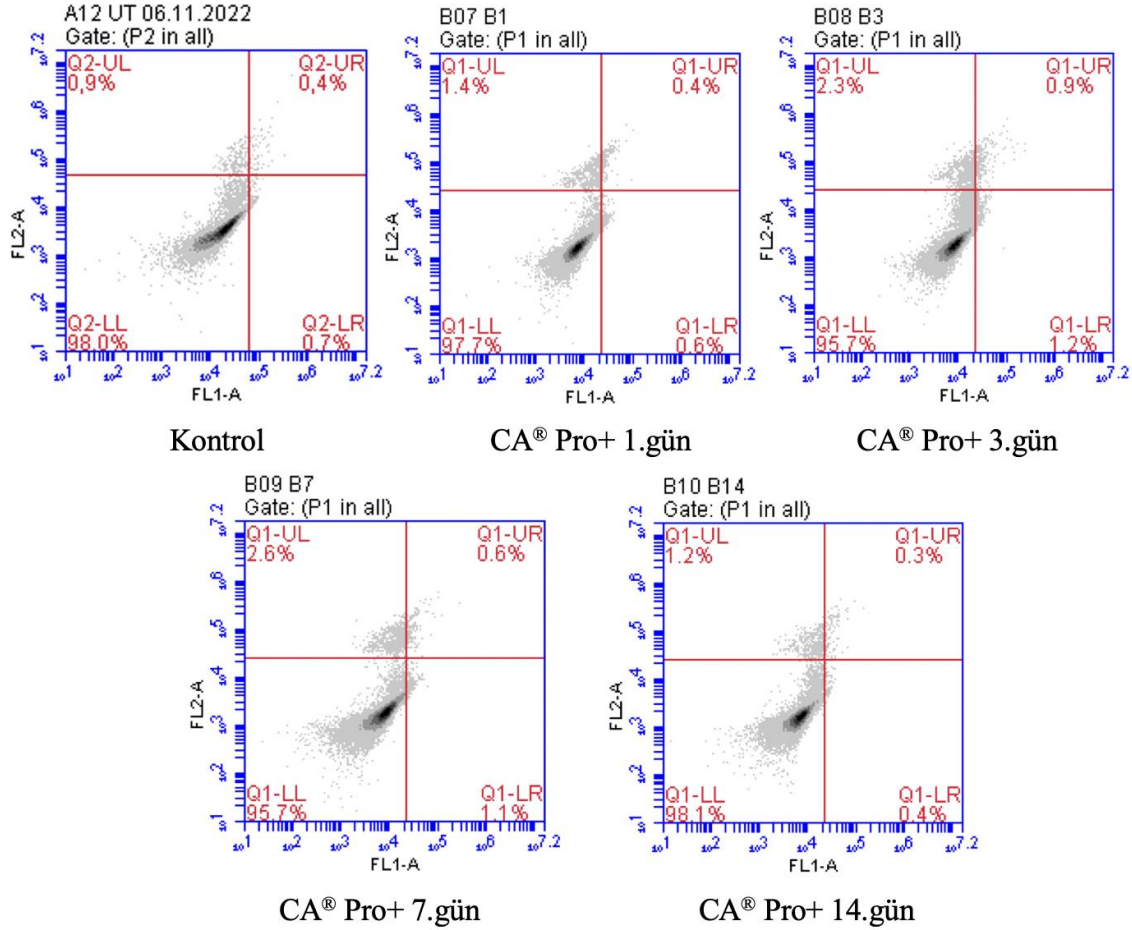
Şekil 4.27: CA[®] Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları.

CA[®] Pro materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %96,60±0,80; erken apoptoz %0,75±0,15; geç apoptoz %0,60±0,20 ve nekroz oranı %2±0,40 olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %97,60±0,10; erken apoptoz %0,55±0,15; geç apoptoz %0,45±0,05 ve nekroz oranı %1,35±0,25'dür. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %95,40±1,30; erken apoptoz %0,50±0,06 ; geç apoptoz %0,80±0,05 ve nekroz oranı %3,20±0,60 olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %95,27±2,69; erken apoptoz %0,35±0,15; geç apoptoz %0,70±0,30 ve nekroz oranı %4,25±2,05 olarak izlenmektedir. CA[®] Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05) (Şekil 4.28).



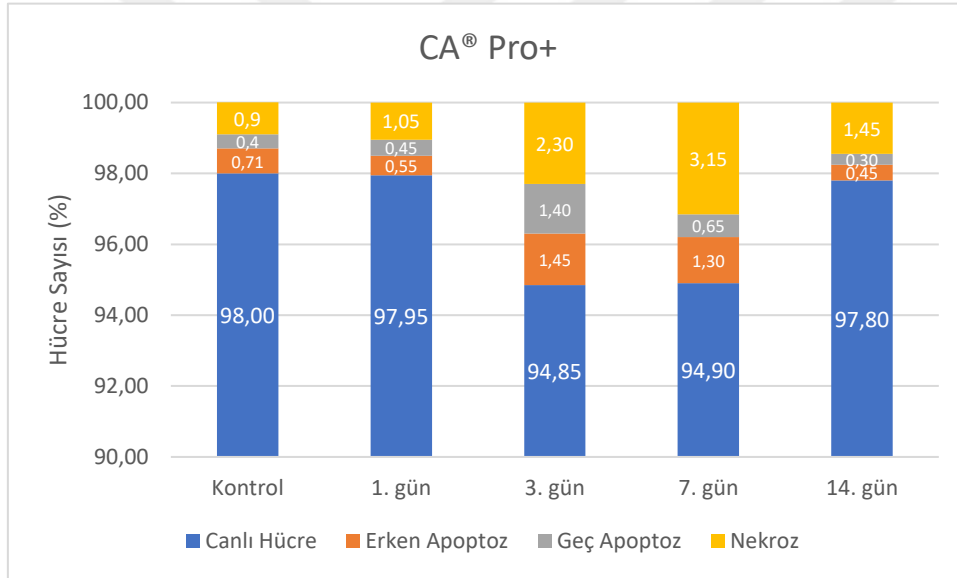
Şekil 4.28: CA[®] Pro materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

CA[®] Pro+ materyalinin Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.29 ve 4.30'da gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, CA[®] Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %97,70; %95,70; %95,70 ve %98,10 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29).



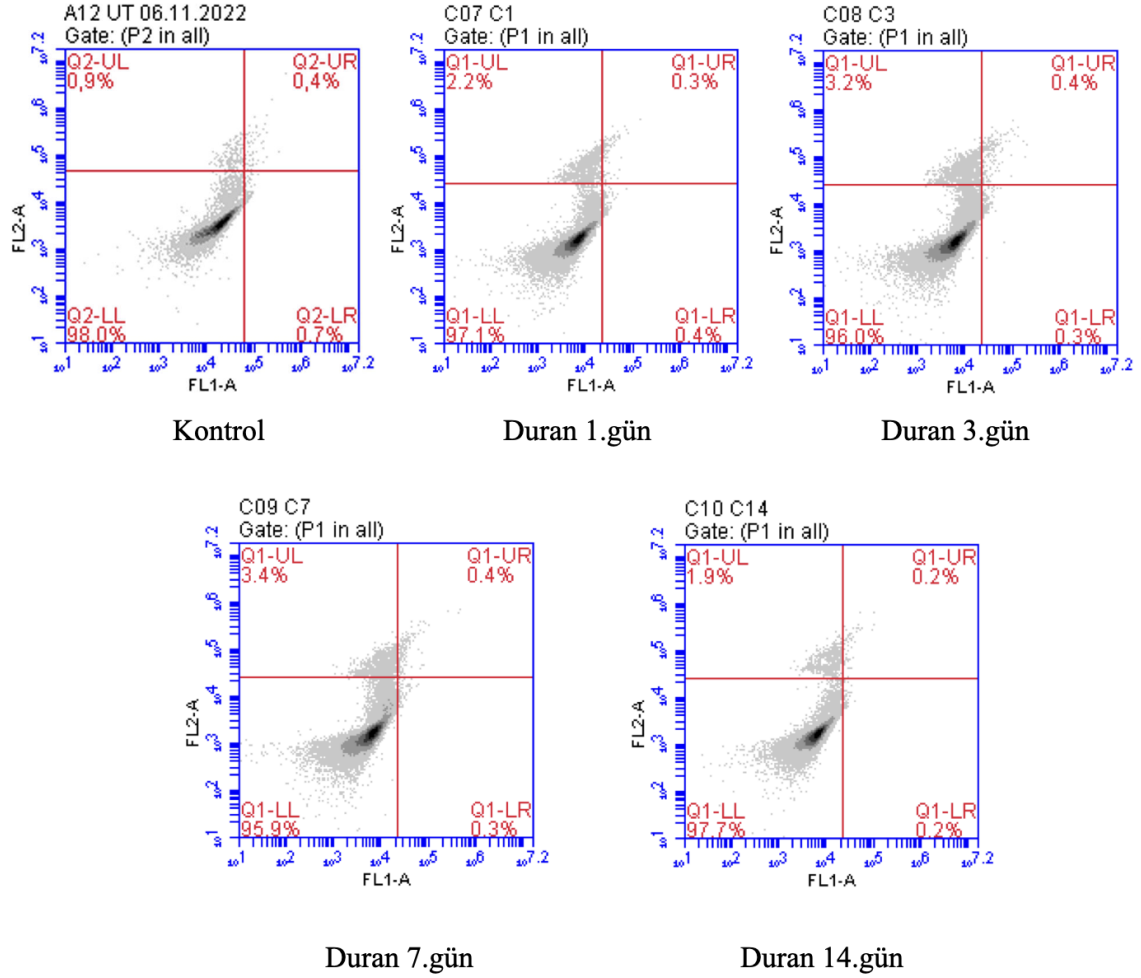
Şekil 4.29: CA[®] Pro+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları.

CA[®] Pro⁺ materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %97,95±0,25; erken apoptoz %0,55±0,05; geç apoptoz %0,45±0,15 ve nekroz oranı %1,05±0,35 olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %94,85±0,85; erken apoptoz %1,45±0,25; geç apoptoz %1,40±0,50 ve nekroz oranı %2,30±0,10'dur. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %94,90±0,80; erken apoptoz %1,30±0,20; geç apoptoz %0,65±0,05 ve nekroz oranı %3,15±0,55 olarak izlenmektedir. 14. ekstratlarının gün hücre canlılık değeri %97,80±0,30; erken apoptoz %0,45±0,05; geç apoptoz %0,30 ve nekroz oranı %1,45±0,25 olarak izlenmektedir. CA[®] Pro⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p<0,05). En yüksek hücre canlılığı 1. gün (97,95±0,25) ve 14. gün (97,80±0,30) ekstratlarında görülmektedir (p<0,05) (Şekil 4.30).



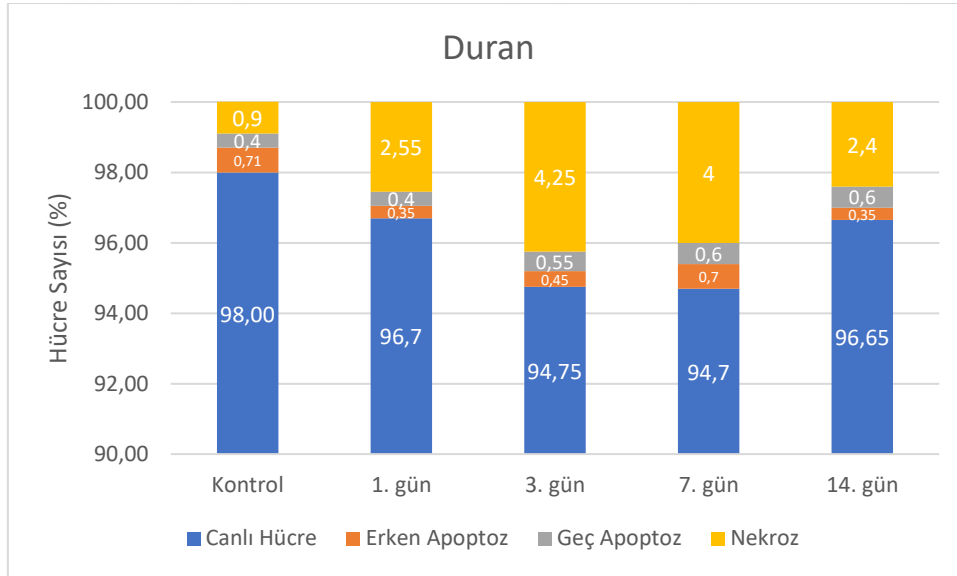
Şekil 4.30: CA[®] Pro⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

Duran materyalinin AnnexinV/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.31 ve 4.32’de gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %97,10; %96,0; %95,90 ve %97,70 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31).



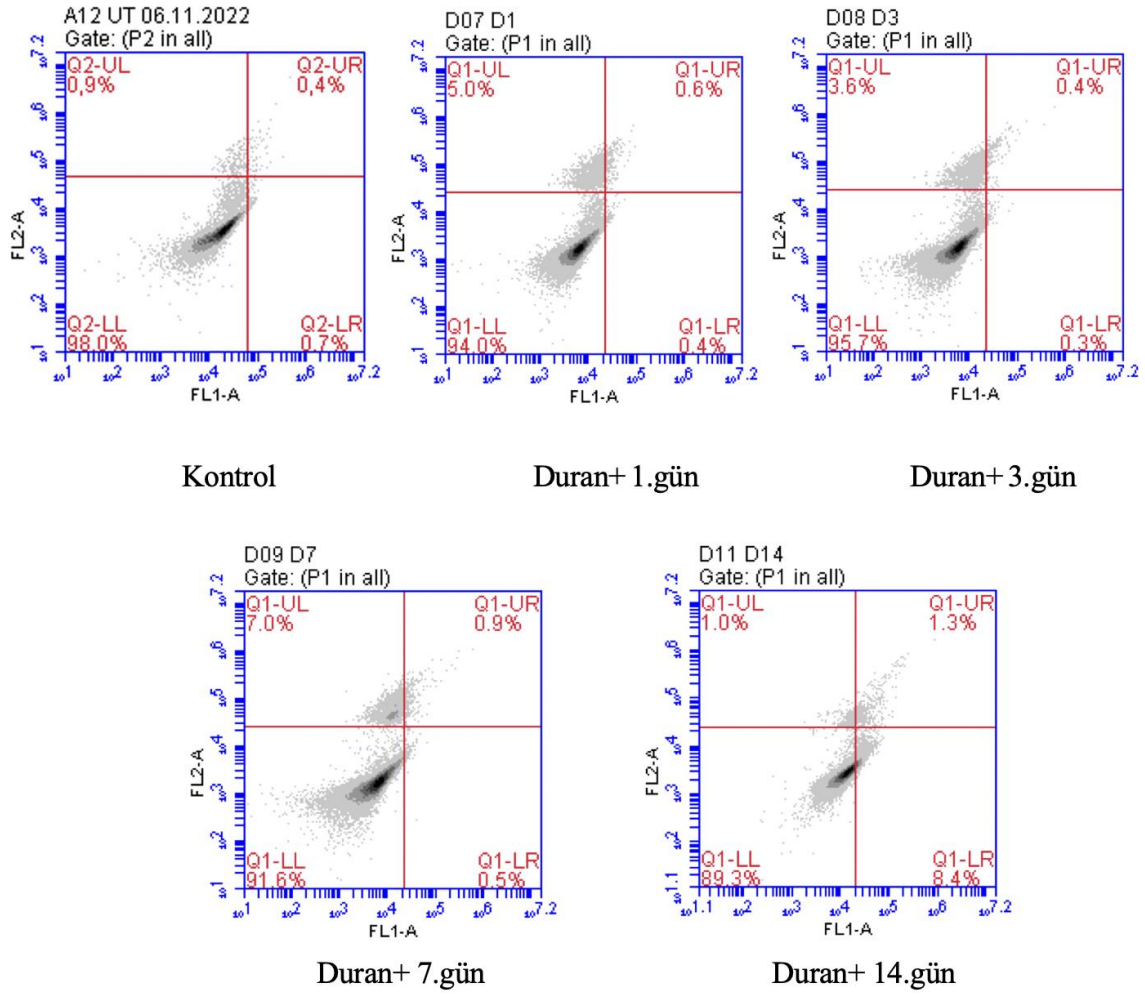
Şekil 4.31: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

Duran materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $96,70 \pm 0,40$; erken apoptoz $0,35 \pm 0,05$; geç apoptoz $0,40 \pm 0,10$ ve nekroz oranı $2,55 \pm 0,35$ olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $94,75 \pm 1,25$; erken apoptoz $0,45 \pm 0,15$; geç apoptoz $0,55 \pm 0,15$ ve nekroz oranı $4,25 \pm 0,10$ 'dur. 7. ekstratlarının gün hücre canlılık değeri $94,70 \pm 1,20$; erken apoptoz $0,70 \pm 0,40$; geç apoptoz $0,60 \pm 0,20$ ve nekroz oranı $4 \pm 0,55$ olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $96,65 \pm 1,05$; erken apoptoz $0,35 \pm 0,15$; geç apoptoz $0,60 \pm 0,40$ ve nekroz oranı $2,40 \pm 0,25$ olarak izlenmektedir. Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Duran materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

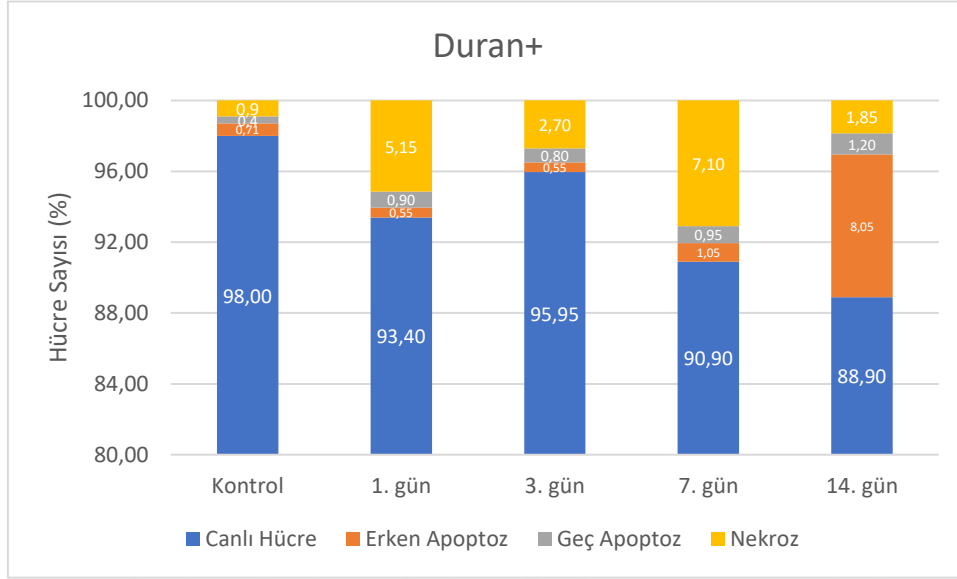
Duran+ materyalinin AnnexinV/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.33 ve 4.34'te gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %94,00; %95,70; %91,60 ve %89,3 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Duran+ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

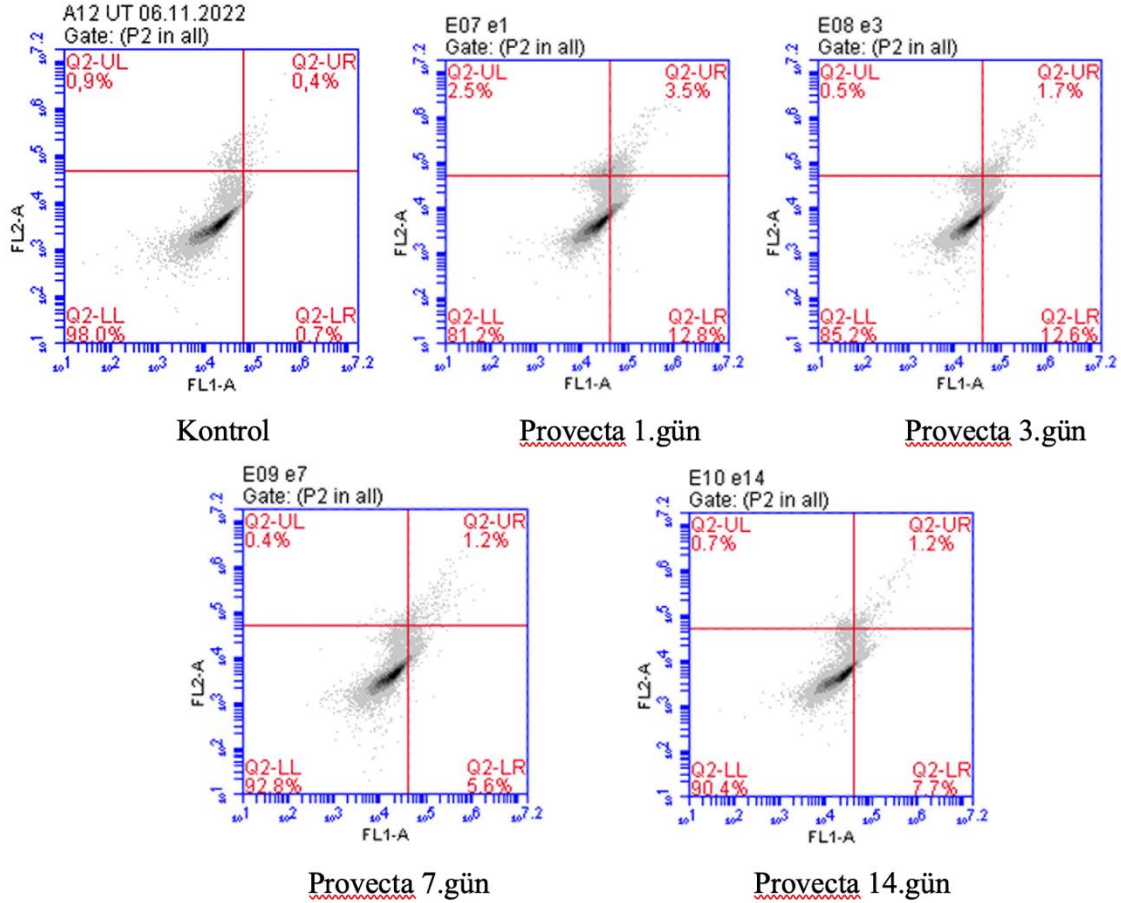
Duran+ materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $93,40 \pm 0,60$; erken apoptoz $0,55 \pm 0,15$; geç apoptoz $0,90 \pm 0,30$ ve nekroz oranı $5,15 \pm 0,15$ olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $95,95 \pm 0,25$; erken apoptoz $0,55 \pm 0,25$; geç apoptoz $0,80 \pm 0,40$ ve nekroz oranı $2,70 \pm 0,90$ 'dır. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $90,90 \pm 0,70$; erken apoptoz $1,05 \pm 0,55$; geç apoptoz $0,95 \pm 0,05$ ve

nekroz oranı $7,10 \pm 0,10$ olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $88,90 \pm 0,40$; erken apoptoz $8,05 \pm 0,35$; geç apoptoz $1,20 \pm 0,10$ ve nekroz oranı $1,85 \pm 0,85$ olarak izlenmektedir. Duran⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). En yüksek canlılık değeri 3. gün ($95,95 \pm 0,25$), en düşük hücre canlılığı ise 14. gün ($88,90 \pm 0,40$) ekstratlarında görülmektedir ($p < 0,05$) (Şekil 4.34).



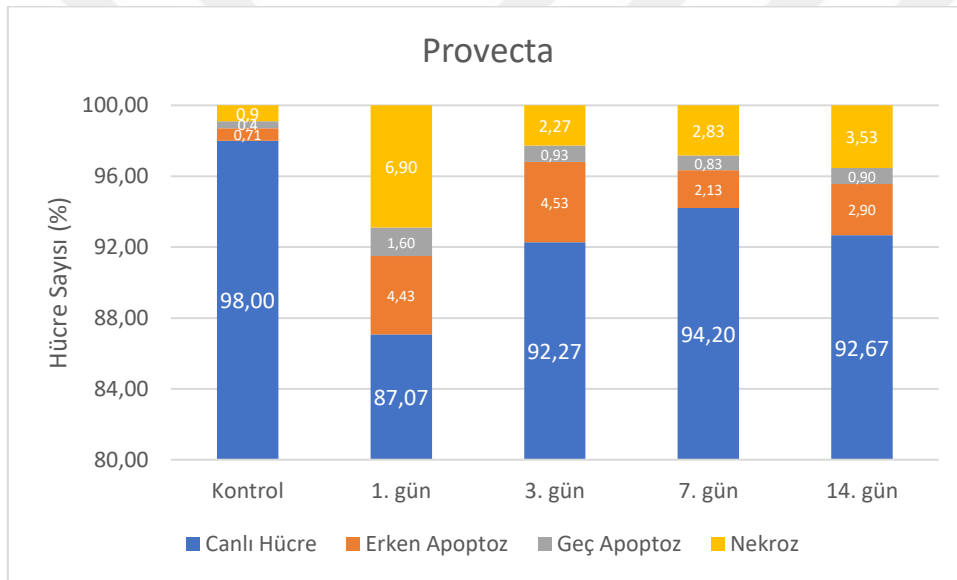
Şekil 4.34: Duran⁺ materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

Provecta materyalinin Annexin/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.35 ve 4.36’da gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %81,20; %85,20; %92,80 ve %90,40 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35).



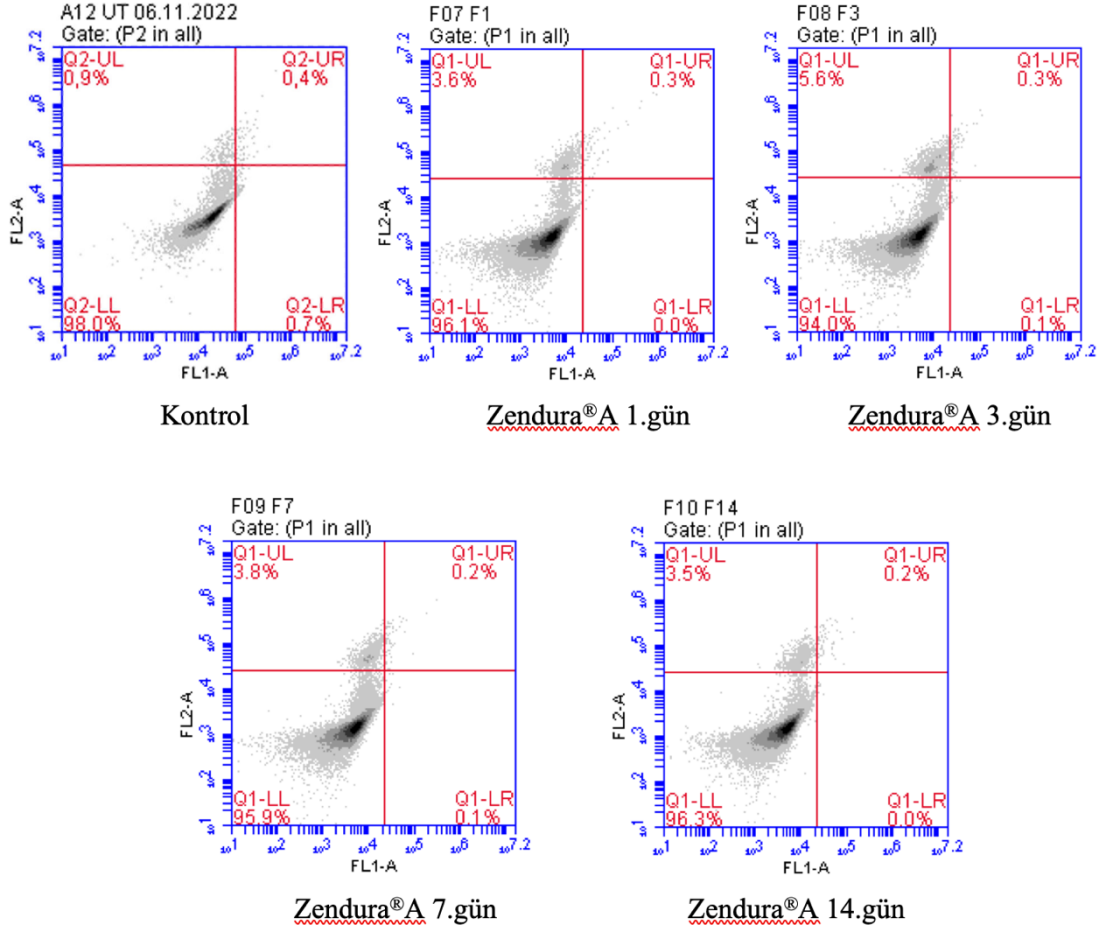
Şekil 4.35: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

Provecta materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $87,07 \pm 5,09$; erken apoptoz $4,43 \pm 3,25$; geç apoptoz $1,60 \pm 0,66$ ve nekroz oranı $6,90 \pm 1,30$ olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $92,27 \pm 6,19$; erken apoptoz $4,53 \pm 2,10$; geç apoptoz $0,93 \pm 0,35$ ve nekroz oranı $2,27 \pm 1,20$ 'dir. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $94,20 \pm 1,51$; erken apoptoz $2,13 \pm 1,02$; geç apoptoz $0,83 \pm 0,40$ ve nekroz oranı $2,83 \pm 0,35$ olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $92,67 \pm 2,08$; erken apoptoz $2,90 \pm 1,17$; geç apoptoz $0,90 \pm 0,30$ ve nekroz oranı $3,53 \pm 0,65$ olarak izlenmektedir. Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.36).



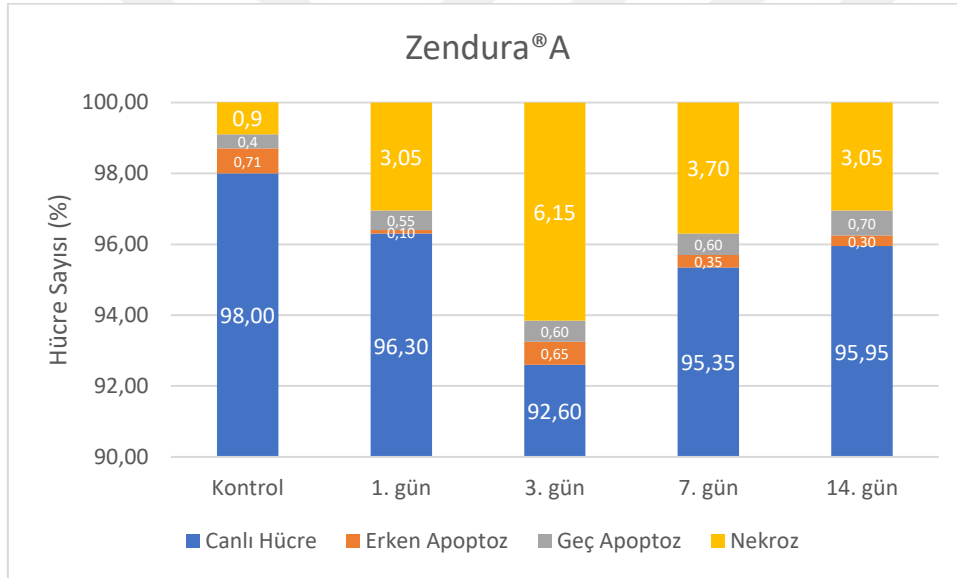
Şekil 4.36: Provecta materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

Zendura®A materyalinin AnnexinV/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.37 ve 4.38’de gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %96,10; %94,00; %95,90 ve %96,30 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.37).



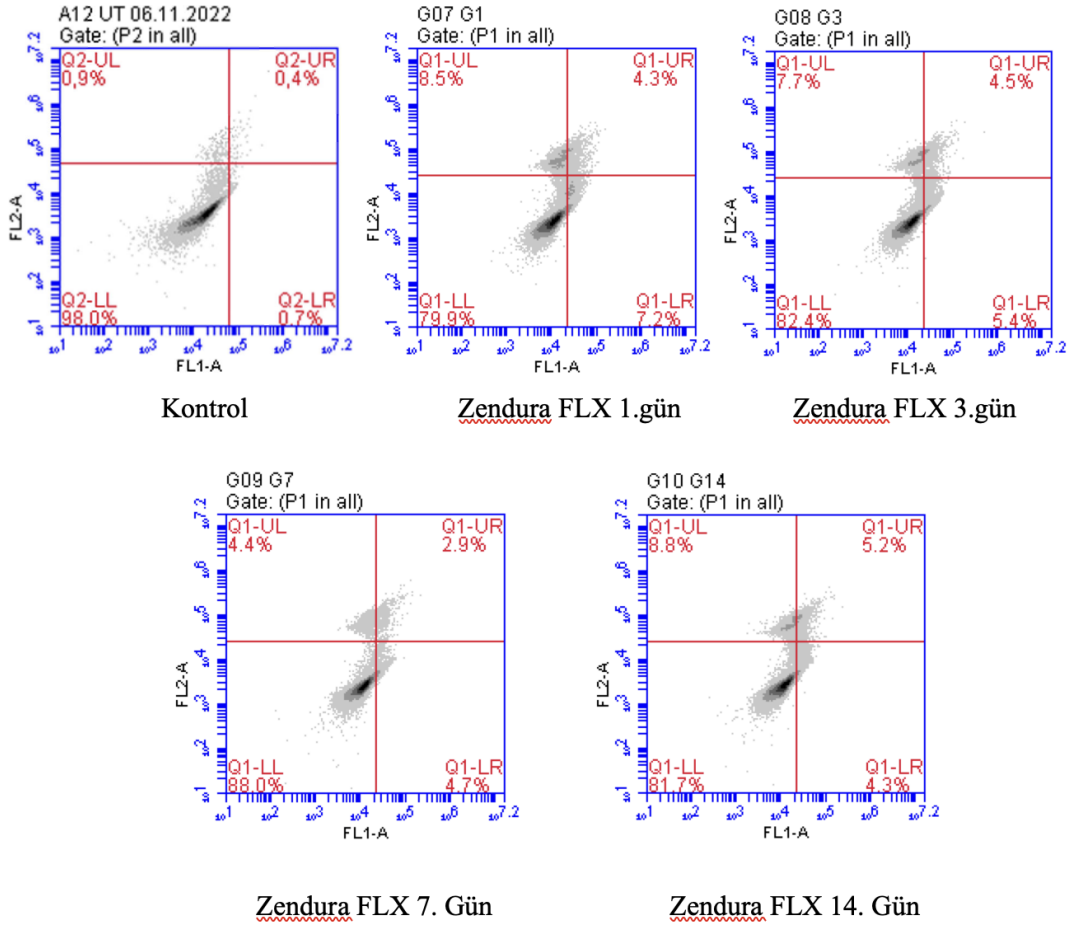
Şekil 4.37: Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

Zendura®A materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $96,30 \pm 0,20$; erken apoptoz $0,10 \pm 0,05$; geç apoptoz $0,55 \pm 0,25$ ve nekroz oranı $3,05 \pm 0,55$ olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $92,60 \pm 1,40$; erken apoptoz $0,65 \pm 0,25$; geç apoptoz $0,60 \pm 0,30$ ve nekroz oranı $6,15 \pm 0,55$ 'tir. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık seviyesi $95,35 \pm 0,55$; erken apoptoz $0,35 \pm 0,15$; geç apoptoz $0,60 \pm 0,30$ ve nekroz oranı $3,70 \pm 0,10$ olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $95,95 \pm 0,35$; erken apoptoz $0,30 \pm 0,10$; geç apoptoz $0,70 \pm 0,20$ ve nekroz oranı $3,05 \pm 0,45$ olarak izlenmektedir. Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). En düşük hücre canlılığı 3. gün ekstratında ($92,60 \pm 1,40$) görülmektedir ($p < 0,05$) (Şekil 4.38).



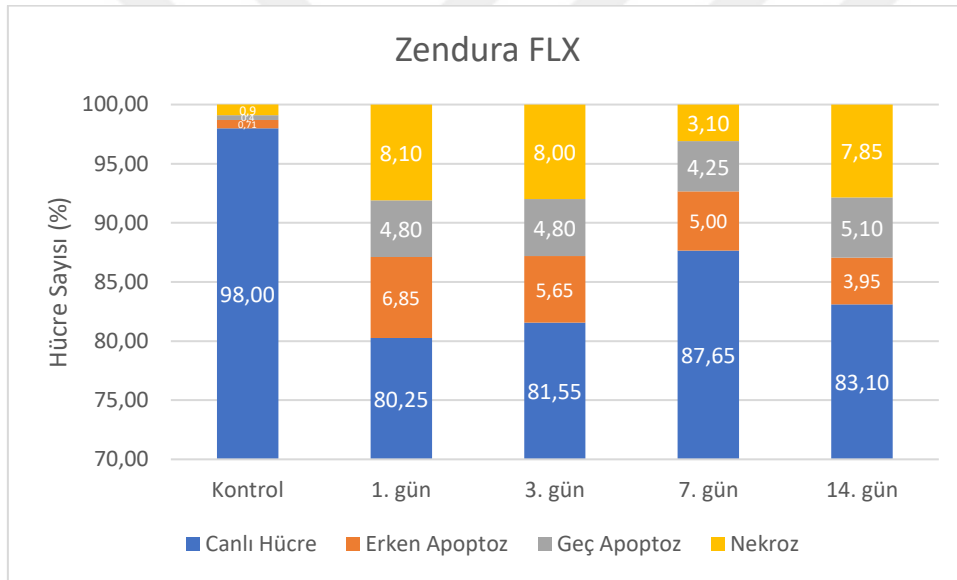
Şekil 4.38: Zendura®A materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

Zendura FLX materyalinin AnnexinV/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.39 ve 4.40'ta gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %79,90; %82,40; %88,00 ve %81,70 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39).



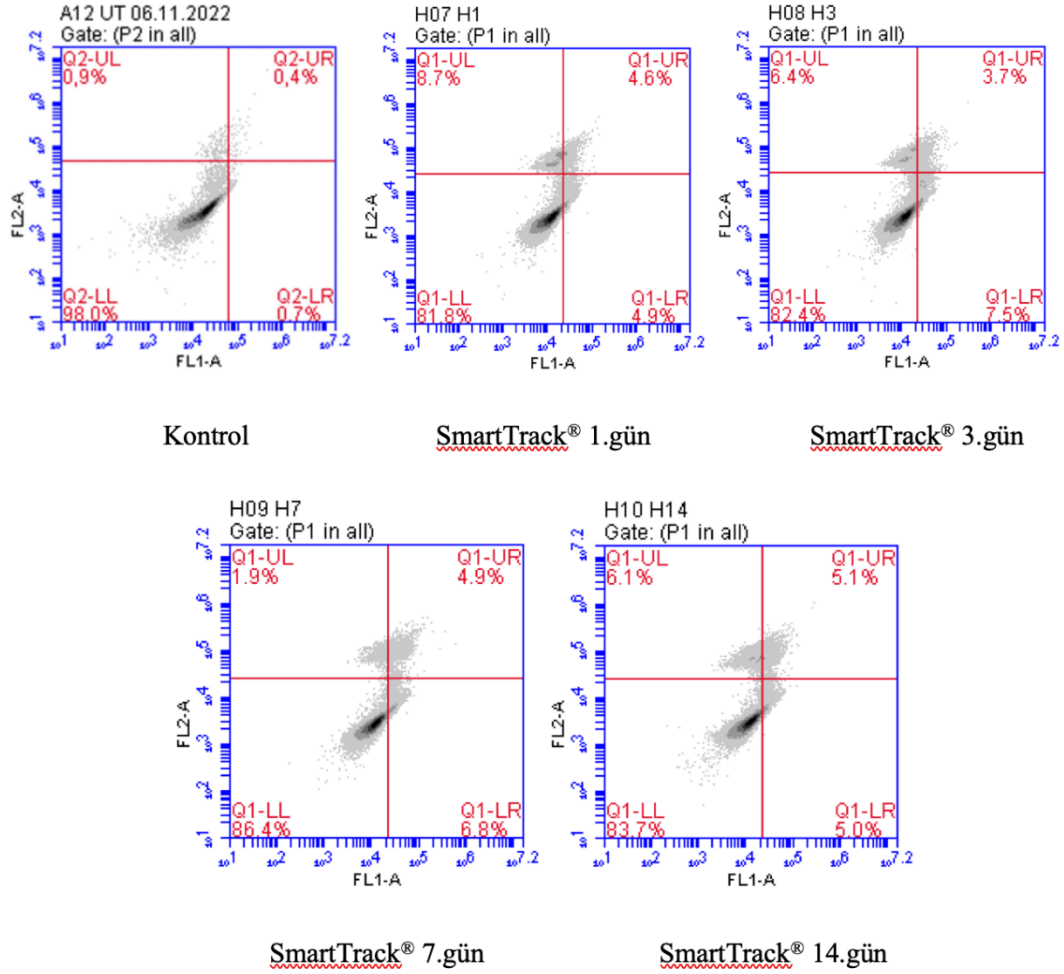
Şekil 4.39: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

Zendura FLX materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $80,25 \pm 0,35$; erken apoptoz $6,85 \pm 0,35$; geç apoptoz $4,80 \pm 0,40$ ve nekroz oranı $8,10 \pm 0,40$ olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $81,55 \pm 0,85$; erken apoptoz $5,65 \pm 0,25$; geç apoptoz $4,80 \pm 0,30$ ve nekroz oranı $8 \pm 0,30$ 'dur. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $87,65 \pm 0,35$; erken apoptoz $5 \pm 0,30$; geç apoptoz $4,25 \pm 1,35$ ve nekroz oranı $3,10 \pm 1,30$ olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri $83,10 \pm 1,40$; erken apoptoz $3,95 \pm 0,35$; geç apoptoz $5,10 \pm 0,10$ ve nekroz oranı $7,85 \pm 0,95$ olarak izlenmektedir. Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). En yüksek canlılık değeri 7. gün ekstratında ($87,65 \pm 0,35$) görülmektedir ($p < 0,05$) (Şekil 4.40).



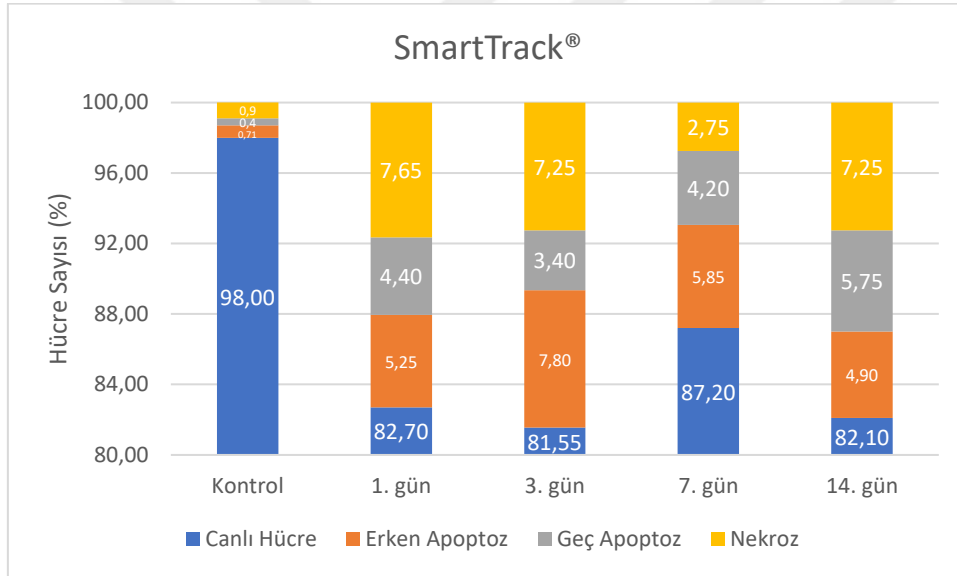
Şekil 4.40: Zendura FLX materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

SmartTrack® materyalinin AnnexinV/PI ile boyanarak apoptotik etkisinin ölçüldüğü akış sitometri sonuçları Şekil 4.41 ve 4.42’de gösterilmektedir. Kontrol grubunda canlı hücre oranı %98,00 iken, SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. Gün ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın sırasıyla %81,80; %82,40; %86,40 ve %83,70 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının akış sitometri grafiklerinde canlı (LL), erken apoptoz (LR), geç apoptoz (UR) ve nekroz (UL) oranları

SmartTrack® materyal grubunun 1. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %82,70±0,90; erken apoptoz %5,25±0,35; geç apoptoz %4,40±0,20 ve nekroz oranı %7,65±1,05 olarak ölçülmüştür. 3. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %81,55±0,85; erken apoptoz %7,80±0,30; geç apoptoz %3,40±0,30 ve nekroz oranı %7,25±0,85'tir. 7. gün ekstratlarının hücre canlılık değeri %87,20±0,80; erken apoptoz %5,85±0,95; geç apoptoz %4,20±0,70 ve nekroz oranı %2,75±0,85 olarak izlenmektedir. 14. gün ekstratlarının hücre canlılık seviyesi %82,10±1,60; erken apoptoz %4,90±0,10; geç apoptoz %5,75±0,55 ve nekroz oranı %7,25±1,15 olarak izlenmektedir. SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. ekstratlarının 48 saatlik hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). En yüksek canlılık değeri 7. gün ekstratında (87,20±0,80) görülmektedir ($p<0,05$) (Şekil 4.42).



Şekil 4.42: SmartTrack® materyalinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz bulgularına göre canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre oranları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli maloklüzyonlar gülüş estetiğini olumsuz yönde etkilediği gibi ağız hijyeni etkinliğini ve periodontal sağlığı da tehlikeye atar. Hastaların ortodontik tedavi isteğinin dişsel nedenler, estetik iyileştirme beklentisi bununla birlikte öz saygı, güveninin artırılması gibi birçok nedeni vardır (Bollen, 2008; Kaur ve diğerleri, 2018). Günümüzde estetik, ortodontik tedavi gören hastaların temel kaygısı haline gelmiştir. Yetişkinler ve profesyoneller, geleneksel sabit tedavi yerine estetik bir alternatifi tercih etmektedir. Estetik beklentinin artması ve yeni teknolojilerin kullanılmaya başlanması, maloklüzyon tedavisine çeşitli estetik alternatiflerin sunulmasına yol açmıştır (Kumar, 2019).

İlk şeffaf plaklar, ortodontik tedavinin son aşamaları için bir araç olarak veya sadece diş pozisyonundaki küçük düzensizlikleri tedavi etmek için geliştirilmiştir (Kesling, 1945). Şeffaf plak tedavisi alanındaki gelişmeler, sonunda bu plakların orta ile şiddetli maloklüzyonların tedavisinde kullanılmasını sağlamıştır (Tartaglia ve diğerleri, 2021)

Hastaların geleneksel ortodontik tedavilere alternatif olarak “görünmez” tedavilere yönelik artan istekleri, seri olarak kullanılan şeffaf plakların popülarlığının artmasına katkıda bulunmuştur (Rossini ve diğerleri, 2015). Plakların şeffaf olması, yüksek konfor ve kullanım kolaylığı ile yemek yerken ve fırçalama esnasında çıkarabilmeleri birincil tercih edilme sebeplerindendir (Shalish ve diğerleri, 2012). Şeffaf plaklarla tedavi, geleneksel sabit braketler ve ark tellerine kıyasla süre olarak daha kısadır ve hasta başında geçen süre daha azdır. Bunun yanı sıra dişlerde var olan restorasyonlara zarar vermemeleri, dekalsifikasyonlara sebep olmamaları, relaps meydana geldiğinde kolay çözüm imkânı sunmaları da avantajları arasındadır (Zheng ve diğerleri, 2017).

Şeffaf plakların üretiminde üstün özelliklerinden dolayı çeşitli termoplastik materyaller ve/veya kombinasyonları kullanılmaktadır. Bunlar; polivinil klorür, poliüretan, polietilen tereftalat ve polietilen tereftalat glikoldür (Ercoli ve diğerleri, 2014; Pithon, 2012). Şeffaf plak üretimi için iş akışı, ilk olarak alçı model elde edilmesi (3B olarak taranır) veya doğrudan dişlerin 3B ağız içi tarayıcılarla taranması ile elde edilen verilerin sanal planlama yazılımlarına aktarılmasıyla başlar. Her bir plak üretimi için bir 3B modele ihtiyaç vardır. Bu modeller 3B baskı, STL veya materyal püskürtme yöntemi kullanılarak yapılır. Hastanın

dişlerini ve çevre dokularını taklit eden 3B modelin üzerine ısıyla ve vakumla şekillendirilen plaklar basılır ve son olarak trimlenir. Bu süreç uzundur, maliyetlidir ve yoğun emek harcanır (Martorelli ve diğerleri, 2013; Weir, 2017).

Şeffaf plaklar, tüm tedavi süresi boyunca her biri 7-14 gün olmak üzere günde yaklaşık 22 saat takılması gereken plastik materyalden üretilmiş çıkarılabilir plaklardır. Böylece dişler, diş eti ve ağız içi sıvıları ile uzun süre yakın temas halindedirler (Kravitz ve diğerleri, 2009). Hasta tarafından gün boyunca sürekli olarak takıp çıkarılabilen bu plaklar dişleri sarar ve diş etinin yaklaşık üçte birine temas eder. Tedavi tamamlanana kadar haftada bir yeni plaklar verilir. Toplam tedavi süreleri maloklüzyonun ciddiyetine bağlı olarak 6 ay ile 2 yıl arasında değişmektedir. Çoğu maloklüzyon tipinin düzeltilmesinde plaklar giderek daha fazla kullanıldığından, karmaşık vakalarda tedavi süresi uzayabilir. Bu polimerik için biyouyumluluk endişeleri uzayan tedavi süreleri ile birlikte daha da artmaktadır (Premaraj ve diğerleri, 2014). Plastik materyaller ağız ortamından kaynaklanan değişikliklerden etkilenebilir ve daha sonra oral hücreler için tehlikeli olabilecek molekülleri serbest bırakabilir; bu nedenlerle şeffaf plak materyallerinin sitotoksitesisi araştırılmalıdır (Eliades ve Bourauel, 2005). Polimerize edilmemiş monomerlerin polimerik materyallerden sızabileceği ve muhtemelen biyolojik sistemler üzerinde toksik etkilere neden olabileceği kabul edilmektedir. Potansiyel sitotoksik etki aralıkları, materyale maruz kalmaya karşı bir bağışıklık reaksiyonunu, hücre döngüsü bozukluğunu, hücre apoptozunu ve mutajenez veya karsinojenez indüksiyonunu içerir. Bu etkiler her zaman kısa sürede görülmemektedir (Premaraj ve diğerleri, 2014).

Bu materyallerin estetik özelliklerinin yanı sıra ağız ortamında uzun süreli kullanılabilmeleri için biyolojik olarak uyumlu olmaları, diğer bir deyişle çevre dokularda zararlı etki yaratmadan uzun süre ağızda kalabilmeleri gerekmektedir. Bir dental materyalin klinik kullanıma sunulmadan önce hem fiziksel özellikleri hem de biyouyumluluğu açısından doğru ve detaylı değerlendirmelerden geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle, yeni geliştirilen ve klinik kullanıma sunulan dental materyaller, içerdikleri bazı elementlerin dışarıya sızarak doku üzerinde olumsuz etkileşim yaratarak alerjik reaksiyon ve enflamasyon oluşturmaları açısından, canlı dokularla karşılaşmadan önce detaylı olarak incelenmelidir (Browne, 1988).

Literatürde şeffaf plakların biyouyumluluklarının incelendiği az sayıda çalışma mevcuttur (Ahamed, S.F.ve diğerleri 2020; Alhendi ve diğerleri, 2022; Eliades ve diğerleri, 2009; Martina ve diğerleri, 2019; Nemec ve diğerleri, 2020; Pratsinis ve diğerleri, 2022; Premaraj ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, ortodontik amaçla kullanılan şeffaf plakların sitotoksitesisi, bilimsel literatür eksikliği ve mevcut birkaç çalışmada çelişkili sonuçlar nedeniyle hala tartışma konusudur. Son on yılda, farklı markalar tarafından farklı materyallerden oluşan birkaç yeni şeffaf plak piyasaya sunulmuştur (Gierie, 2018). Bu materyallerin sitotoksitesilerinin değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Bu anlayışla başlatılan araştırmada; şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin biyouyumluluğu, *in-vitro* sitotoksitesite testleri ile L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde değerlendirilmiştir.

Biyouyumluluk, canlı dokularla temasta olan materyalin, lokal ve/veya sistemik toksisite, mutajenik, karsinojenik ve alerjik etkilere sebep olmaması, inert özelliklere sahip olması şeklinde tanımlanmaktadır (Schmalz G, 2009). Bir materyalin biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi üç aşamalı olarak yapılmaktadır. Birinci, hücre kültürleri kullanılarak materyallerin biyouyumluluklarının belirlendiği *in-vitro* test yöntemleridir. Bunun sonrasında ikinci olarak olumlu sonuçlar veren materyallere *in-vivo* hayvan testleri uygulanır. Bu testlerden sonra insanlarda daha kapsamlı klinik testler yapılmaktadır (Schmalz G, 1994). Sıklıkla kullanılan yöntemler: hücre kültürü testleri ve hayvan deneyleridir. Hayvan deneylerinin maliyetlerinin yüksek olması, gerçekleştirilmesinin uzun zaman alması, tekrarlanmasının zor olması, kontrolünün kolay olmaması ve etik açıdan tartışılan bir konu olması dezavantajlarındandır. Ayrıca deneyde kullanılan canlının sahip olduğu metabolik özellikler test edilen materyalin asıl etkisinin izlenmesini engelleyebilmektedir (Hanks ve diğerleri, 1996). *In-vitro* sitotoksitesite testleri ile bu deneysel faktörleri kontrol etme güçlüğüne önüne geçilmiştir. Bu testler dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde en uygun olan ve en yaygın kullanılan testlerdir (Hanks ve diğerleri, 1996; Schmalz, 1994).

Klinik kullanıma girmeden önce dental materyallerin, öncelikli olarak *in-vitro* testlerle ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkileri değerlendirilmelidir. Çalışmamızda şeffaf plak yapımında kullanılan sekiz farklı materyalin sitotoksitesitesinin incelenmesi *in-vitro* test yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

In-vitro sitotoksisite testlerinde hücre kültürleri en yaygın kullanılan sistemlerdir. Hücre kültürü testlerinde primer hücreler olan insan ağız içi dokulardan kaynak alan hücreler veya devamlı hücre dizileri kullanılmaktadır (Schmalz, 1994). Dental materyallerle temasta olan dokulardan primer hücrelerin izole edilmesinin *in-vivo* koşulların taklit edilmesi açısından daha güvenilir olacağı belirtilmektedir (Murray ve diğerleri, 2007). Primer hücreler, her kültüre edildiklerinde yaşlanırlar bundan dolayı ömürleri sınırlı olup, izole edilmeleri güç ve zaman alıcıdır ancak *in-vivo* özellikleri daha iyi yansıtırlar (Schmalz, 1994). Primer hücrelerin aksine devamlı hücre dizilerinin hızlı bir şekilde üremeleri, uzun süre kültüre edilebilmeleri, homojen morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip olmaları avantajlarıdır (Browne, 1988; Wataha, 2001). Bazı araştırmacılar, çalışmalarında 3T3 fare fibroblastı (Ahamed, S.F.ve diğerleri, 2020), gingival fibroblast hücre hattı (Alhendi ve diğerleri, 2022), insan keratonist N/TERT-1 hücre hattını (Premaraj ve diğerleri, 2014), oral epitelyal hücrelerini (Ca9-22 hücre serisi) (Nemec ve diğerleri, 2020), bazıları araştırmacılar da primer gingival fibroblast hücrelerini kullanmışlardır (Eliades ve Bourauel, 2005; Martina ve diğerleri, 2019). ISO 10993-5 sitotoksisite testleri, *in-vitro* yöntemler standartlarına göre; *in-vitro* çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında standart olarak L929 ya da Balbc 3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılmasını önermektedir (ISO 10993, 1992). Yaptığımız bu *in-vitro* çalışmada L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda şeffaf plak materyallerinin biyoyumluluklarının değerlendirilmesinde; ISO 10993-5-İn-vitro Sitotoksisite Testleri Yöntemleri bölümü rehber alınmıştır (International Organization for Standardization, 2009).

Hücre canlılığı ve proliferasyon değerlendirmede metabolik testler yaygın olarak kullanılır ve genellikle bu testler mitokondriyal aktiviteye odaklanır; bunlar, kantitatif kolorimetrik testler olan MTT ve XTT testini içerir (Berridge, M.V. ve diğerleri, 1996). 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilen ve hücre canlılığı testlerinin “altın standardı” olarak adlandırılan MTT test yönteminde (Mosmann, 1983) sarı tetrazolyum tuzu olan MTT, mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından çözünmeyen mor formazan çökeltisi verecek şekilde indirgenir. Absorbansı ölçmeden önce formazanın çözdürülmesi gerekir. Çözdürme, dimetil sülfoksit veya izopropanol kullanılarak gerçekleştirilebilir. Çözücü olarak genellikle tercih edilen dimetil sülfoksitin hücreler üzerinde toksik etkisi bulunmaktadır ve çözdürmek için yapılan pipetleme esnasında formazan kristallerinin zarar görmesi MTT testinin

güvenirliliğini ve hassasiyetini düşüren etkenlerdir. XTT test yönteminde; suda eriyebilir bir bileşik olan XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro5sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) canlı hücrelerce turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenir (Scudiero, D. A. ve diğerleri, 1988). XTT test yönteminde, farklı zamanlarda absorbansın kaydedilmesi mümkün olmakla birlikte, oluşan formazanlar suda çözünür olduğu için ekstra bir çözündürme basamağını gerektirmez. MTT test yöntemine kıyasla, XTT testi daha detaylı ve daha hassas bilgi sunar (Parboosing ve diğerleri, 2017; Scudiero, D. A. ve diğerleri, 1988). Literatür incelemesinde ise şeffaf plakların sitotoksitelerinin incelendiği in-vitro çalışmalarda MTT testinin kullanıldığı görülmektedir (Ahamed, S.F. ve diğerleri, 2020; Alhendi ve diğerleri, 2022.; Eliades ve Bourauel, 2005; Martina ve diğerleri, 2019; Premaraj ve diğerleri, 2014) Çalışmamızda şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin L929 fare fibroblastları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde ise XTT test yöntemi kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada kullanılan materyallerin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen deney sonuçlarına göre çalışmada kullanılan materyaller ve zamanlar arasında etkileşim bulunmazken, materyallerin zamana bağlı hücre canlılık değerleri, materyalin tipinden ve zamandan etkilenmiştir. 1. gün ($p=0,278$) ve 14. gün ($p=0,271$) ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken 3. Gün ($p=0,004$) ve 7. Gün ($p<0,001$) ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ekstratlara 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT deney sonuçlarına göre test materyallerinin zamana bağlı hücre canlılık değerlerinin, materyalin tipinden ve zamandan etkilenmediği, fakat test materyalleri ve zamanlar arasında etkileşim olduğu bulunmuştur. Materyallerin 3. gün ($p=0,085$) ve 7. gün ($p=0,048$) ekstratlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılık değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken 1. gün ($p=0,027$) ve 14. gün ($p<0,001$) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CA® Pro materyali dışında tüm materyallerin hücre canlılığı zaman içerisinde azalmıştır.

Çalışmamızda sitotoksite analizi için ISO 10993-12:2012 no'lu "Örnek hazırlama ve referans materyaller" önerileri esas alındı. Kullanılan materyaller solid materyaller olduğu için örneklerin ağırlığı ile seyreltinin hacmi arasındaki oran, ISO parametreleri doğrultusunda 0.2g/ml olarak ayarlandı (ISO 10993-12: *Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials*, 2012). Martina ve ark. dört

farklı termoplastik materyalin sitotoksitelerini inceledikleri çalışmalarında ISO parametrelerini esas alarak örneklerin ağırlığı ile seyreltinin hacmi arasındaki oranı 1g/ml olarak ayarlamışlardır (Martina ve diğerleri, 2019). Fayyaz Ahamed ve ark.nın yaptığı çalışmada ise şeffaf plakların yüzey alanını bir grafik kağıdı kullanılarak hesaplamışlar ve bu yüzey alanına göre ekstraksiyon ortamının miktarı hesaplanmışlardır (Ahamed, S.F. ve diğerleri , 2020).

In-vitro sitotoksite testlerinde, test edilecek materyalin biyouyumluluğu değerlendirilirken hücrenin materyal ile olan teması direkt, indirekt veya ekstrakt vasıtasıyla olabilmektedir. İndirekt temas testinde, hücreler ve materyaller arasında dentin bariyer, agar overlay veya milipor filtre gibi bariyer kullanılması önerilmektedir (Murray ve diğerleri, 2007). İndirekt temas testinde kalitatif değerlendirme yapılırken, direkt temas ve ekstrakt testinde kalitatif ve kantitatif değerlendirme yapılabilmektedir (ISO, 2009). Direkt temas test yönteminde, hücre doğrudan materyale maruz kalacak, ekstrakt yolu ile temas testinde ise materyal belirli koşullar altında (örn. standartlarla tanımlanmış) belirli bir süre (örn. 24 saat) belirli bir sıcaklıkta (örn. örneğin 37°C) bir sıvı içinde bekletilecektir (ISO 10993, 1992). Daha sonra, ekstrakt veya elüat olarak bilinen bu "yükü" sıvı, daha ileri testler için kullanılacaktır. Bu ekstraktların kimyasal analizi, materyalin “sızdırma davranışı” ile ilgili değerli bilgiler sağlayabilmektedir. Ekstraksiyonlar için hidrofilik sıvılar (ör., tuzlu su çözeltisi), lipofilik sıvılar (ör., dimetil sülfoksit) veya karışımlar (etanol/su) da kullanılır (Ferrancane, 1994; Geurtsen, 1998; Schmalz G, 2009). Bu tez çalışmasında, şeffaf plak materyallerinin pratikte kullanımının taklit edilmesi amacıyla ekstraksiyon test metodu kullanılmıştır.

Sitotoksik etkileri incelenen bir materyalin, hücre ölüm tipinin (nekroz ve apoptoz) ayrımının yapılması önem taşımaktadır. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz süreci genellikle enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ve farklı morfolojik özellikler ile karakterizedir. Apoptoz, normal hücre döngüsü, hormonal atrofi, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Uygunsuz apoptoz (çok az veya çok fazla) iskemik hasar, nörodejeneratif hastalıklar, birçok kanser türünde ve otoimmün bozukluklarda faktördür. Hücrenin ölümünü veya yaşamını modüle etme yeteneği, muazzam terapötik potansiyeli ile tanınır. Bu nedenle araştırmalar, hücre döngüsü mekanizmasının aydınlatılmasına ve analizine, hücre döngüsü durmasına ve apoptozu kontrol eden sinyal

yollarına odaklanmaya devam etmektedir. Anahtar apoptotik proteinlerin birçoğu tanımlanmış olmasına rağmen, bu proteinlerin moleküler etki veya eylemsizlik mekanizmalarını açığa kavuşturmak için çalışmalar devam etmektedir (Elmore, 2007).

Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden bir tanesi Anneksin-V/propidyum iyodür boyama yöntemidir. Anneksin V, fosfatidilserin kalıntıları ile güçlü ve spesifik olarak etkileşen ve apoptozun belirlenmesi için kullanılan bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir (Leite ve diğerleri, 1999). Anneksin V, apoptotik hücreleri görünür hale getirmek için floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenir ve sonrasında hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanır. Anneksin V bağlanması nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de gözlemlendiği için propidium iyodür ikinci boya olarak eklenmektedir (Krysko ve diğerleri, 2008; Taatjes ve diğerleri, 2008). PI nükleik asitleri boyayan, zar geçirimsiz floresan bir boyadır. Zar bütünlüğüne dayalı olarak sağlıklı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayırt edilmesinde kullanılır. Sağlıklı hücre zarı seçici geçirgendir ve PI hücre zarını geçemez. Ancak apoptozun geç evresinde veya nekrotik hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğu için nükleik asit içeren organelleri boyar. Apoptoz testi bu ilkeye dayanarak apoptotik, nekrotik ve canlı hücre ayırımını yapar (Boersma HH, ve diğerleri, 2005). Literatürde, şeffaf plakların sitotoksistelerinin değerlendirilmesinde kolorimetrik test yöntemleri ile hücre canlılığının değerlendirilmesi sıklıkla kullanılmıştır (Ahamed, S.F. ve diğerleri, 2020; Alhendi ve diğerleri, 2022.; Eliades ve Bourauel, 2005; Martina ve diğerleri, 2019; Nemec ve diğerleri, 2020; Pratsinis ve diğerleri, 2022; Premaraj ve diğerleri, 2014) ancak meydana gelen hücre ölümünün nekroz veya apoptoz yoluyla olup olmadığının inceleyen bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında apoptoz da incelenmiştir ve apoptozu belirlemek için Anneksin V/PI boyama yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre Zendura FLX ve SmartTrack® materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının hücre canlılık değerleri diğer materyallerden düşük, apoptoz değerleri de yüksek bulunmuştur.

İlk şeffaf plaklar, tek katmanlı sert poliüretan plaklardan yapılmıştır (Lombardo ve diğerleri, 2015). Yeni nesil Invisalign şeffaf plak materyali, entegre elastomerli termoplastik bir poliüretan olan SmartTrack'tir. SmartTrack materyali, 4, 4-metilen difenil diizosiyanat ve 1,6-heksandiol öncülerinin bir ürünü olan poliüretandır (Ryokawa ve diğerleri, 2006). Polivinil klorür, poliüretan, polietilen tereftalat ve polietilen tereftalat glikol gibi farklı

termoplastik materyaller şeffaf plaklar için kullanılır (Ercoli ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte, her bir plağın ısıyla şekillendirilmesi ve son olarak kesilmesi için bir model (3B baskı, STL veya materyal püskürtme ile üretilmiş) gereklidir (Weir, 2017). Isıyla şekillendirme işlemi, termoplastik materyallerin hızlı soğuması nedeniyle moleküler oryantasyonu, ortalama moleküler ağırlığı ve artık gerilmeleri etkileyebilir (Eliades, T., ve Brantley, 2016). Ayrıca, ısıyla şekillendirme işlemi nedeniyle materyal özelliklerinde önemli değişiklikler rapor edilmiştir. Ryu et al. (Ryu ve diğerleri, 2018), dört farklı termoplastik materyalin ısıyla şekillendirildikten sonra materyallerde meydana gelen değişiklikleri incelediği çalışmalarında, ısıyla şekillendirmenin daha kalın materyallerin şeffaflığını azalttığını ve test edilen materyallerin su emilimini, suda çözünürlüğünü arttırdığını ve ayrıca bazı plastiklerin yüzey sertliğini değiştirebileceğini bildirmişlerdir.

Isıyla şekillendirilen şeffaf plakların 0,5 ile 1,5 mm arasında değişen farklı kalınlıklara sahip olabileceği ve bu kalınlıkların dış yüzeyine basınç uygulayarak dış hareketini indüklerken klinik performanslarını ve özelliklerini kesinlikle etkileyebileceği gözlemlenmiştir. Kalınlığın artması uygulanan kuvveti artırır ve eğilme modülünü azaltırken, ısıyla şekillendirme işlemi her iki özelliği de azaltır. Şeffaf plağın normal kalınlığı, iletilen kuvvetlerin büyüklüğünde önemli bir rol oynar: kalınlıktaki düzensizlikler, şeffaf plağın oturma doğruluğunu etkiler (Weir, 2017). Şeffaf plakların üretiminde kullanılan termoplastik materyallerin mekanik davranışı, plak kalınlığı düzenliliği ve geometri tasarımı gibi özelliklerin yanı sıra zor ortodontik hareketlerde istenen klinik sonuçların elde edilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Tamburrino ve diğerleri, 2020). Ayrıca, diğer çalışmalar, termoplastik materyalden üretilmiş şeffaf plakların kullanımları sırasında ağız içi ortama duyarlı olduğunu göstermiştir. Vücut sıcaklığı, ağız içi nemi ve tükürük enzimleri, şeffaf plağın orijinal boyutunu ve mekanik özelliklerini değiştirerek plağı içsel olarak etkiler (Gerard Bradley ve diğerleri, 2016; Ryokawa ve diğerleri, 2006).

Genel olarak, şeffaf plak materyalleri inert değildir ve ağız ortamında sıcaklık, nem, çiğneme kuvvetleri ve tükürük enzimleriyle uzun süreli temasta değişikliklere maruz kalırlar. Yaşlanmanın termoplastik materyallerin mekanik ve kimyasal özelliklerindeki etkisi az çok aydınlatılabilirken bu değişikliklerin plakların klinik performansı üzerindeki gerçek etkisini değerlendirmek zordur (Eliades, T., ve Brantley, 2016; Gerard Bradley ve diğerleri, 2016).

In-vitro olarak yaşılandırılmış apareylerin, etanol-su solventinde (Eliades ve diğerleri, 2009) veya yapay tükürük (Gracco ve diğerleri, 2009) içinde kısa süreli bekletildikten sonra izlenebilir monomerler veya yan ürünlerin salınmadığı bulunmuştur. Bu termoplastik plakların difenil yapısı, yan ürünler içermeyen bir polimer oluşturmak için stabilite ve yeterli reaktivite sağlar (Schuster ve diğerleri, 2004). Başka bir çalışmada plaklar 2 ay boyunca normal tuzlu su çözeltisinde bekletilmiş ve plakların sitotoksik ve östrojenik etkileri indüklediği belirtilmiştir (Eliades ve diğerleri, 2009). Aynı zamanda Bradley ve ark. da yaptıkları çalışmada ağız içi yaşılandırmanın SmartTrack plaklarının moleküler bileşimini değiştirmediğini bildirmişlerdir (Gerard Bradley ve diğerleri, 2016).

Polimerik şeffaf plaklar, her ne kadar yöntemin etkinliği ve sınırlamaları konusunda bazı tartışmalar olsa da günlük ortodontik pratiğinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Invisalign şeffaf plak için temel bileşen polimerik materyal poliüretandır. Poliüretan inaktif bir materyal değildir. Eliades ve ark. Invisalign plaklarının sitotoksikite ve östrojenitesini değerlendirmişlerdir ve yaptıkları çalışmanın sonucunda, plakların ölçülebilir biyolojik etkiler göstermediğini bildirmişlerdir (Eliades ve diğerleri, 2009).

Çalışmamızda sekiz farklı termoplastik şeffaf plak materyali kullanılmıştır. Bu materyallerin içerikleri şu şekildedir: CA[®] Pro: kopoliester ve termoplastik elastomer; CA[®] Pro⁺: kopoliester, termoplastik elastomer ve polietilen kaplama; Duran: Polietilentereftalat-glikol kopoliester (PETG); Duran⁺: PETG ve polietilen kaplama; Provecta: termoplastik poliüretan; Zendura[®] A: poliüretan, Zendura FLX: kopoliester-poliüretan; SmartTrack[®]: çok katmanlı aromatik termoplastik poliüretan/kopolyesterdir.

Çalışmamızda kullanılan materyallerden biri olan SmartTrack materyali, 4, 4-metilen difenil diizosiyanat ve 1,6-heksandiol öncülerinin bir ürünü olan poliüretandır (Ryokawa ve diğerleri, 2006). İzosiyanatlar dokularla temas ettiğinde proteinlere ve diğer biyomakromoleküllere hızlıca bağlanırlar (Brown ve diğerleri, 1987; Mraz ve Bouskova, 1999; Sabbioni ve diğerleri, 2000). İnsanlarda reaksiyona yol açabilen immünojenik haptenler oluştururlar. İzosiyanat maruziyetine karşı kontakt alerjik reaksiyonlar bildirilmiş olmasına rağmen, nispeten az sayıda çalışma, izosiyanatların ciltten emilimi ve bunun sonucunda toksisite gösterdiğini bildirmiştir (Frick ve diğerleri, 2003; Hamada ve diğerleri, 2012; Hoffmann ve diğerleri, 2010; Yeh HJ ve diğerleri, 2007).

Epitel hücre ölümü, epitel tabakasında hasar veya bütünlük kaybı, insan bağışıklık sisteminde heksametilen diizosiyanat konjuge protein ortaya çıkmasına yol açabilir (24). Sonuç olarak, immünolojik reaksiyonlar oluşabilir. Termoplastik materyallerin sitotoksik özellikleri, polimer bileşimi ve yapısından; ayrıca sıcaklık, nem, basınç ve termal geçmiş gibi üretim ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Premaraj ve diğerleri, 2014). Jorge ve ark. (Jorge ve diğerleri, 2003) yaptıkları literatür derlemesinde, polimerik materyallerin sitotoksik etkilerinde, materyallerin kimyasal bileşimi ve kullanılan polimerizasyon yöntemleri dahil olmak üzere çeşitli faktörlere göre farklılıklar bildirmiştir. Dental termoplastik materyallerin fiziksel özelliklerini, simüle edilmiş bir ağız içi ortamda inceleyen Ryokawa ve ark. (Ryokawa ve diğerleri, 2006), Invisalign materyalinin test edilen materyaller arasında 24 ve 336 saat sonra en yüksek miktarda suyu emdiğini ve ölçüm periyotları sırasında tam doygunluğa ulaşmadığını, bu da reaksiyona girmemiş bileşenlerin Invisalign materyalinden sızmasının muhtemel olduğunu bildirmişlerdir. Premaraj ve ark. (Premaraj ve diğerleri, 2014) Invisalign materyalinin oral keratinositler üzerindeki etkisini bildiren çalışmalarında Invisalign materyalinin, salin çözeltisi ortamında canlılık, membran geçirgenliği ve epitel hücrelerinin adezyonunda değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Sekonder mikrosızıntı ve haptin oluşumunun, sistemik veya dişetine lokalize olabilen izosiyanat alerjisine yol açabileceğini bildirmişler. Bununla birlikte, tükürüğün koruma sağlayabileceğini de bildirmişlerdir.

İnsan gingival fibroblast ve meme adenokarsinom hücre dizilerinde Invisalign materyalinden salınan Bisfenol A'nın in-vitro sitotoksik etkilerini ve östrojenik etkilerini araştırıldığı çalışmada, Invisalign'ın test edilen hücreler üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (Eliades ve diğerleri, 2009). Invisalign plastiğinin kimyasal bileşimi, Bisfenol A'yı serbest bırakmak için gerekli bileşenlere sahip değildir. Invisalign plağında, Bisfenol A değil izosiyanat, sağlık sorunları oluşturabilecek bileşendir. İzosiyanat genellikle mukoza zarı tahrişine neden olur; maruz kalma süresine bağlı olarak astım veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilir (Liljelind ve diğerleri, 2010). Epitelyal hücre ölümü, epitel tabakasında hasar veya bütünlük kaybı, heksametilen diizosiyanat konjuge proteininin insan bağışıklık sistemine maruz kalmasına neden olabilir (Wisnewski ve diğerleri, 2000). Sonuç olarak, immünolojik reaksiyonlar oluşturabilir.

Martina ve ark. (Martina ve diğerleri, 2019) insan primer dişeti fibroblastları üzerinde 4 farklı termoplastik şeffaf plak (Duran (Scheu-Dental GmbH, Almanya), Biolon (Dreve Dentamid GmbH, Almanya), Zendura (Bay Materials LLC, Fremont, ABD), and SmartTrack (Align Technology, ABD) materyallerinin sitotoksitesini araştırdıkları çalışmalarında, 14. gün sonunda tüm materyallerin hafif sitotoksiste gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara benzer şekilde 14. Gün sonunda Duran, Zendura A ve SmartTrack materyalleri hafif derecede sitotoksiste göstermişlerdir. Martina ve ark. yaptıkları çalışmada materyaller arasında en yüksek sitotoksitenin Biolon (hücre canlılığı $64,6 \pm 3,3$), ardından Zendura (hücre canlılığı $74,4 \pm 2,3$), SmartTrack (hücre canlılığı $78,8 \pm 6,3$) ve son olarak en az sitotoksitenin Duran (hücre canlılığı $84,6 \pm 6,4$) materyaline ait olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 14. gün sonunda Duran (hücre canlılığı $60,94 \pm 3,68$) materyali, Zendura®A ($62,80 \pm 3,60$) ve SmartTrack (hücre canlılığı $63,12 \pm 2,87$) materyalinin hücre canlılıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Martina ve ark.'nın (Martina ve diğerleri, 2019) çalışmalarında kullandıkları dört materyalden üçü (Duran, Biolon, Zendura) ısıyla şekillendirilmiş ve ısıyla şekillendirilmemiş olarak değerlendirilirken, SmartTrack yalnızca ısıyla şekillendirilmiş olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonuçlarına göre ısıyla şekillendirme işleminden sonra polietilen tereftalat glikol içerikli Duran ve Biolan materyallerinin sitotoksitesinin arttığı gözlenmiştir. Polietilen tereftalatın sıcaklık arttıkça daha fazla ilave materyal saldıgı göz önüne alındığında (Bach ve diğerleri, 2013), Martina ve ark. (Martina ve diğerleri, 2019) bunun nedeni olarak ısıyla şekillendirmenin monomer salınımını ve dolayısıyla sitotoksiteyi arttırdığını ileri sürmüşlerdir.

Alhendi ve ark. (Alhendi ve diğerleri, 2022.), dört farklı şeffaf plak sistemi (Invisalign, Eon, Clarity ve SureSmile) tarafından kullanılan termoplastik materyallerin sitotoksitesini in-vitro olarak inceledikleri çalışmalarında, dört sistem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmediğini ve materyallerin hafif ile orta derecede sitotoksiste gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada şeffaf plaklar 1 ay boyunca 37°C'de salin içinde bekletilmiş ve her bir plaktan elde edilen çözeltiler daha sonra üç farklı konsantrasyona (%5, %10 ve %20) seyreltilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, Invisalign sisteminin kullandığı SmartTrack materyalinin %5'lik (hücre canlılığı: $82,6 \pm 13,6$) ve %10'luk (hücre canlılığı: $60,3 \pm 8,8$) konsantrasyonunun hafif derecede sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Invisalign materyalinin sitotoksitesi 1., 3., 7. ve 14. günlerde araştırılmıştır. Bu

çalışmayla paralel olarak çalışmamızda SmartTrack materyalinde 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının bulgularına göre hafif derecede sitotoksiste gözlenmiştir.

Ahamed ve ark. (Ahamed, S.F. ve diğerleri, 2020) 3B yazıcılarla (Dental LT® clear resin (Form Labs, Somerville, MA, USA); E-Guard clear (EnvisionTEC, Rockhill, South Carolina) ve ısıyla şekillendirilerek üretilmiş Invisalign® (Align Technology, San Jose, CA, USA) plaklarının sitotoksitesini 3T3 fare fibroblastları üzerinde incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda tüm materyallerin 1., 3., 5. ve 7. günlerde hafif derecede sitotoksiste sergilediklerini bildirmişlerdir. Gruplar arasında, en yüksek sitotoksiste E-Guard clear ve Dental LT materyallerinde gözlenirken en düşük sitotoksiste SmartTrack materyalinde gözlenmiştir. SmartTrack materyalinin hücre canlılığı 1. günden 7. güne kadar giderek artmıştır. Bu çalışmanın aksine çalışmamızda SmartTrack materyalinin hücre canlılığı 7. ve 14. günde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür. Ahamed ve ark. (Ahamed, S.F.; Kumar, S.M.; Vijaya kumar, R.K.; Kanna, 2020) aynı zamanda sitotoksitenin 1. gün en fazla olduğunu ve giderek azaldığını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda ise bu sonucun aksine CA Pro materyali dışında tüm materyallerde hücre canlılığı giderek azalmıştır.

Yapılan bir tez çalışmasında 3B yazıcı ile üretilen 2 farklı şeffaf plak materyalinin (Accura 60® SLA, 3D Systems, Güney Karolina), Dental LT® clear resin (Form Labs, Somerville, MA, ABD) ve ısıyla şekillendirilen şeffaf plak materyalinin (Invisalign®, Align Tech, San Jose, CA, ABD) sitotoksitesini 3T3 embriyonik fare fibroblast hücreleri üzerinde 1, 3, 5 ve 7 günlük periyotta in-vitro olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre Invisalign® (poliüretan) ve Dental LT® (metakrilat oligomer–glikol metakrilat) materyalleri ağız içi kullanım için biyouyumlu ve güvenli bulunmuştur. Polikarbonat içerikli Accura 60® materyali diğer materyallere göre önemli derecede daha toksik bulunmuştur. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre Invisalign materyali 1., 3., 5. ve 7. günlerde sitotoksitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış ve materyal tüm zaman periyotlarında hafif derecede sitotoksiste sergilemiştir (Kumar, 2019). Bizim çalışmamızda ise SmartTrack materyalinin hücre canlılığı 1. ve 3. Günlerde, 7. ve 14. günlere kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek gözlenmiştir. En düşük hücre canlılığı da 14. günde gözlenmiştir.

Bu çalışmanın kısıtlayıcı yönü laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen in-vitro bir çalışma olması ve sonuçların klinik uygulama için doğrudan geçerli olamamasıdır. Ancak sonuçlar, materyal seçimi sırasında klinisyenler için ek bilgi sağlayabilir. Bu çalışmada devamlı hücre serilerinden L929 fare fibroblastları kullanıldı, ancak gelecekteki çalışmalarda oral ortamı daha iyi taklit etme yetenekleri nedeniyle primer hücreler (örneğin dişeti fibroblastları) tercih edilebilir. Gelecekteki araştırmalar, bu çalışmada orta ve hafif derecede sitotoksik etkileri belirlenen şeffaf plak materyallerinden ortama salınan monomerleri ve miktarlarını incelemek üzerine olmalıdır.

Şeffaf plak olarak kullanılan sekiz farklı termoplastik materyalin sitotoksitesinin L929 fare fibroblastları üzerinde değerlendirildiği bu in-vitro çalışmanın sınırlamaları dahilinde, aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- i. Çalışmada kullanılan şeffaf plak materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre, CA® Pro materyali dışında tüm materyallerin hücre canlılığı zaman içerisinde azalmıştır.
- ii. 14. gün ekstratlarına 48 saat maruz bırakılan hücrelerin XTT testi sonuçlarına göre en yüksek hücre canlılığı CA® Pro materyalinde, en düşük hücre canlılık oranları ise CA® Pro+, Duran+ ve Provecta materyallerinde gözlenmiştir.
- iii. Apoptoz testi sonuçları incelendiğinde Zendura FLX ve SmartTrack® materyallerinin 1., 3., 7. ve 14. gün ekstratlarının apoptoz oranları diğer materyallerden yüksek bulunmuştur.
- iv. Çalışmamızda kullanılan tüm şeffaf plak materyalleri, hafif ile orta derecede sitotoksosite sergiledikleri için klinik kullanımda güvenle tercih edilebilirler. Materyallerin zamanla sitotoksitesileri arttığı göz önüne alındığında bir haftada gerçekleşmesi istenilen hareketlerin tek plak ile değil iki aynı plak ile yapılması planlanabilir.

REFERANSLAR

- Ahamed, S.F.; Kumar, S.M.; Vijaya kumar, R.K.; Kanna, S. A. (2020). Cytotoxic evaluation of directly 3D printed aligners and Invisalign. *Eur. J. Mol*, 1129–1140.
- Albrektsson, T., Brånemark, P. I., Hansson, H. A., Kasemo, B., Larsson, K., Lundström, I., McQueen, D. H., ve Skalak, R. (1983). The interface zone of inorganic implantsIn vivo: Titanium implants in bone. *Annals of Biomedical Engineering* 1983 11:1, 11(1), 1–27. doi.org/10.1007/BF02363944
- Alhendi, A., Khounganian, R., ve Almudhi, A. (2022.). *Cytotoxicity assessment of different clear aligner systems: An in vitro study*.
- Alkire, R. G., Bagby, M. D., Gladwin, M. A., ve Kim, H. (1997). Torsional creep of polycarbonate orthodontic brackets. *Dental Materials*, 13(1), 2–6.
- Bach, C., Dauchy, X., Severin, I., Munoz, J. F., Etienne, S., ve Chagnon, M. C. (2013). Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity. *Food Chemistry*, 139(1–4), 672–680.
- Bellamy, C. O. C., Malcomson, R. D. G., Harrison, D. J., ve Wyllie, A. H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in cancer biology*, 6(1), 3–16.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D. and Wang, R. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, 14-19.
- Black, J., ve Black, J. (2005). Biological Performance of Materials : Fundamentals of Biocompatibility, Fourth Edition. *Biological Performance of Materials*.
- Bollen, A.-M. (2008). Effects of Malocclusions and Orthodontics on Periodontal Health: Evidence from a Systematic Review. *Journal of Dental Education*, 72(8), 912–918.
- Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*. 2005 Dec;46(12):2035-50.
- Brown, W. E., Green, A. H., Cedel, T. E., ve Cairns, J. (1987). Biochemistry of protein-isocyanate interactions: a comparison of the effects of aryl vs. alkyl isocyanates.

Environmental Health Perspectives, 72, 5–11.

- Browne, R. M. (1988). The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials—does it have a role? *International Endodontic Journal*, 21(2), 50–58.
- Bursch, W., Oberhammer, F., ve Schulte-Hermann, R. (1992). Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends in pharmacological sciences*, 13(6), 245–251.
- Eliades, T., ve Brantley, W. A. (Eds.). (2016). *Orthodontic applications of biomaterials: A clinical guide*. (W. B. Theodore Eliades (ed.); 1. baskı).
- Eliades, T., ve Bourauel, C. (2005). Intraoral aging of orthodontic materials: The picture we miss and its clinical relevance. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 127(4), 403–412.
- Eliades, T., Pratsinis, H., Athanasiou, A. E., Eliades, G., ve Kletsas, D. (2009). Cytotoxicity and estrogenicity of Invisalign appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 136(1), 100–103.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Engeland, M. Van, Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., ve Reutelingsperger, C. P. M. (1998). *Cytometry - 1998 - van Engeland - Annexin V-Affinity assay A review on an apoptosis detection system based on*. 9, 1–9.
- Ercoli, F., Tepedino, M., Parziale, V., ve Luzi, C. (2014). A comparative study of two different clear aligner systems. *Progress in Orthodontics*, 15(1), 1–5.
- FERRACANE, J. L. (1994). Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*, 21(4), 441–452.
- Fiasconaro, J. E., ve Sherman, H. (1968). Vacuum-formed prostheses. I. A temporary fixed bridge or splint. *Journal of the American Dental Association* (1939), 76(1), 74–78.
- Frick, M., Isaksson, M., Björkner, B., Hindsén, M., Pontén, A., ve Bruze, M. (2003). Occupational allergic contact dermatitis in a company manufacturing boards coated with isocyanate lacquer. *Contact Dermatitis*, 48(5), 255–260.
- Gerard Bradley, T., Teske, L., Eliades, G., Zinelis, S., ve Eliades, T. (2016). Do the mechanical and chemical properties of Invisalign™ appliances change after use? A retrieval analysis. *European Journal of Orthodontics*, 38(1), 27–31.
- Geurtsen, W. (1998). *Geurtsen1998*. 4, 687–695.
- Gierie, W. V. (2018). Clear aligner therapy: An overview. *Journal of clinical orthodontics* :

- JCO, 52(12), 665–674.
- Gracco, A., Mazzoli, A., Favoni, O., Conti, C., Ferraris, P., Tosi, G., ve Guarneri, M. P. (2009). Short-term chemical and physical changes in invisalign appliances. *Australian orthodontic journal*, 25(1), 34–40.
- Hamada, H., Isaksson, M., Bruze, M., Engfeldt, M., Liljelind, I., Axelsson, S., Jönsson, B., Tinnerberg, H., ve Zimerson, E. (2012). Dermal uptake study with 4,4'-diphenylmethane diisocyanate led to active sensitization. *Contact Dermatitis*, 66(2), 101–105.
- Hanks, C. T., Wataha, J. C., ve Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 12(3), 186–193.
- Harzer, W., Bourauel, C., ve Gmyrek, H. (2004). *Harzer2004*. 26(4), 435–441.
- Hennessy, J., ve Al-Awadhi, E. A. (2016). Clear Aligners Generations and Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Orthodontics*, 43(1), 68–76.
- Hoffmann, H. D., Leibold, E., Ehnes, C., Fabian, E., Landsiedel, R., Gamer, A., ve Poole, A. (2010). Dermal uptake and excretion of ¹⁴C-toluene diisocyanate (TDI) and ¹⁴C-methylene diphenyl diisocyanate (MDI) in male rats. Clinical signs and histopathology following dermal exposure of male rats to TDI. *Toxicology Letters*, 199(3), 364–371.
- ISO 10993. (1992). *Biological evaluation of dental devices*. International Standards Organization.
- ISO 7405. (1996). *Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials*.
- International Organization for Standardization. (2009). *Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*.
- ISO 10993-12: *Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials*. (2012).
- Joffe, L. (2003a). Features section: Current products and practice invisalign: Early experiences. *Journal of Orthodontics*, 30(4), 348–352.
- Joffe, L. (2003b). Features section: Current products and practice invisalign®: Early experiences. *Journal of Orthodontics*, 30(4), 348–352.
- Jorge, J. H., Giampaolo, E. T., Machado, A. L., ve Vergani, C. E. (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), 190–193.

- Kaur, S., Singh, R., Soni, S., Garg, V., ve Kaur, M. (2018). Esthetic orthodontic appliances - A review. *Annals of Geriatric Education and Medical Sciences*, 5(1), 11–14.
- Keim, R. G. (2017). The Evolution of Invisalign. *Journal of clinical orthodontics : JCO*, 51(2), 69–70.
- Kerr, J., Wyllie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics.
- Kesling, H. D. (1945). The philosophy of the tooth positioning appliance. *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery*, 31(6), 297–304.
- Kim, T. W., ve Echarri, P. (2007). Clear aligner: an efficient, esthetic, and comfortable option for an adult patient. *World journal of orthodontics*, 8(1), 13–18.
- Kim TW, P. J. (2008). An aesthetic orthodontic treatment option: Fabrication and applications. *Dentistry Todayent Today*, 27, 132–135.
- Kravitz, N. D., Kusnoto, B., BeGole, E., Obrez, A., ve 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.
- Krisko, D. V., Vanden Berghe, T., D’Herde, K., ve Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221.
- Kumar, M. (2019). Cytotoxicity of 3D Printed Materials an In-Vitro Study Dissertation submitted to The Tamilnadu Dr . M . G . R . Medical University In partial fulfillment for the degree of Master of Dental Surgery. *Master’s Thesis*.
- Leite, M., Quinta-Costa, M., Leite, P. S., ve Guimarães, J. E. (1999). Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*, 19(3–4), 139–151.
- Levy, R., ve Nelson, D. M. (2000). CURRENT TOPIC: To Be, or Not to Be, That is the Question. Apoptosis in Human Trophoblast. *Placenta*, 21(1), 1–13.
- Liljelind, I., Norberg, C., Egelrud, L., Westberg, H., Eriksson, K., ve Nylander-French, L. A. (2010). Dermal and inhalation exposure to methylene bisphenyl isocyanate (MDI) in iron foundry workers. *Annals of Occupational Hygiene*, 54(1), 31–40.
- Lombardo, L., Arreghini, A., Maccarrone, R., Bianchi, A., Scalia, S., ve Siciliani, G. (2015). Optical properties of orthodontic aligners—spectrophotometry analysis of three types

- before and after aging. *Progress in Orthodontics*, 16(1), 1–8.
- Mantovani, E., Castroflorio, E., Rossini, G., Garino, F., Cugliari, G., Deregibus, A., ve Castroflorio, T. (2019). Scanning electron microscopy analysis of aligner fitting on anchorage attachments. *Journal of Orofacial Orthopedics*, 80(2), 79–87.
- Martina, S., Rongo, R., Bucci, R., Razionale, A. V., Valletta, R., ve D'Antò, V. (2019). In vitro cytotoxicity of different thermoplastic materials for clear aligners. *Angle Orthodontist*, 89(6), 942–945.
- Martorelli, M., Gerbino, S., Giudice, M., ve Ausiello, P. (2013). A comparison between customized clear and removable orthodontic appliances manufactured using RP and CNC techniques. *Dental Materials*, 29(2), e1–e10.
- McCrostie, H. S. (2006). Lingual Orthodontics: The Future. *Seminars in Orthodontics*, 12(3), 211–214.
- Miethke, R. R., ve Vogt, S. (2005). Vergleich der Parodontalbefunde zwischen Invisalign®- und Multibracketpatienten. *Journal of Orofacial Orthopedics*, 66(3), 219–229.
- Miller, R. J., Kuo, E., ve Choi, W. (2003). Validation of align technology's treat III™ digital model superimposition tool and its case application. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 6, 143–149.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1), 55–63.
- Mraz, J., ve Bouskova, S. (1999). 2,4-Toluene diisocyanate and hexamethylene-diisocyanate adducts with blood proteins: assessment of reactivity of amino acid residues in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 117(2), 173–186.
- Murray, P. E., García Godoy, C., ve García Godoy, F. (2007). How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 12(3).
- Nahoum, H. (1964). The vacuum formed dental contour appliance. *N Y State Dent J*, 9, 385–390.
- Nahoum, H. I. (2014). Forces and moments generated by removable thermoplastic aligners. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 146(5), 545–546.
- Nedwed, V., ve Miethke, R.-R. (2005). Motivation, Acceptance and Problems of Invisalign® Patients Motivation, Akzeptanz und Probleme von Invisalign®-Patienten. *J Orofac Orthop*, 66(2), 162–173.

- Nemec, M., Bartholomaeus, H. M., Bertl, M. H., Behm, C., Shokoohi-Tabrizi, H. A., Jonke, E., Andrukhov, O., ve Rausch-Fan, X. (2020). Behaviour of Human Oral Epithelial Cells Grown on Invisalign[®] SmartTrack[®] Material. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(23), 1–16.
- Norbury, C. J., ve Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, 367–401.
- Özsaygılı M. (2019). *Tek Aşamalı ve Üç Aşamalı Uygulanan Farklı Ortodontik Şeffaf Plak Tekniklerinin Hasta Konforu, Memnuniyeti, Tedavi Etkileri ve Süresi Açısından Değerlendirilmesi*. Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi.
- Parboosing, R., Mzobe, G., Chonco, L., ve Moodley, I. (2017). Cell-based Assays for Assessing Toxicity: A Basic Guide. *Medicinal Chemistry*, 13(1), 13–21.
- Pavoni, C., Lione, R., Laganà, G., ve Cozza, P. (2011). Self-ligating versus Invisalign: analysis of dento-alveolar effects.
- Phan, X., ve Ling, P. H. (2007). Clinical limitations of invisalign. *Journal of the Canadian Dental Association*, 73(3), 263–266.
- Pithon, M. M. (2012). A modified Thermoplastic Retainer. *Progress in Orthodontics*, 13(2), 195–199.
- Ponitz, R. J. (1971). Invisible retainers. *American Journal of Orthodontics*, 59, 266–271.
- Pratsinis, H., Papageorgiou, S. N., Panayi, N., Iliadi, A., Eliades, T., ve Kletsas, D. (2022). Cytotoxicity and estrogenicity of a novel 3-dimensional printed orthodontic aligner. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 162(3), e116–e122.
- Premaraj, T., Simet, S., Beatty, M., ve Premaraj, S. (2014). Oral epithelial cell reaction after exposure to Invisalign plastic material. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 145(1), 64–71.
- Proffit, W., Jr, H. F., ve Sarver, D. (2006). *Contemporary orthodontics*.
- RI., F. (1999). *Freshney's culture of animal cells: a multimedia guide*. Wiley-Liss.
- Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., ve Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2), 257–265.
- Rossini, G., Parrini, S., Castroflorio, T., Deregibus, A., ve Debernardi, C. L. (2015). Efficacy of clear aligners in controlling orthodontic tooth movement: A systematic review. *Angle Orthodontist* (C. 85, Sayı 5, ss. 881–889).

- Rosvall, M. D., Fields, H. W., Ziuchkovski, J., Rosenstiel, S. F., ve Johnston, W. M. (2009). Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 135(3), 276–277.
- Ryokawa, H., Miyazaki, Y., Fujishima, A., Miyazaki, T., ve Maki, K. (2006). The mechanical properties of dental thermoplastic materials in a simulated intraoral environment. *Orthodontic Waves*, 65, 64–72.
- Ryu, J. H., Kwon, J. S., Jiang, H. B., Cha, J. Y., ve Kim, K. M. (2018). Effects of thermoforming on the physical and mechanical properties of thermoplastic materials for transparent orthodontic aligners. *Korean Journal of Orthodontics*, 48(5), 316–325.
- Sabbioni, G., Hartley, R., Henschler, D., Höllrigl-Rosta, A., Koeber, R., ve Schneider, S. (2000). Isocyanate-specific hemoglobin adduct in rats exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Chemical Research in Toxicology*, 13(2), 82–89.
- Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22(SUPPL. 2), S6.
- Schmalz G, A.-B. D. (2009). *Biocompatibility of dental materials*. (1st ed.).
- Schuster, S., Eliades, G., Zinelis, S., Eliades, T., ve Bradley, T. G. (2004). Structural conformation and leaching from in vitro aged and retrieved Invisalign appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 226(6), 725–728.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., ve Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, 48(17), 4827–4833.
- Shahi, S., Özcan, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., Al-Haj Husain, N., Eftekhari, A., ve Ahmadian, E. (2019). A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicology mechanisms and methods*, 29(5), 368–377.
- Shalish, M., Cooper-Kazaz, R., Ivgi, I., Canetti, L., Tsur, B., Bachar, E., ve Chaushu, S. (2012). Adult patients' adjustability to orthodontic appliances. Part I: A comparison between Labial, Lingual, and Invisalign™. *European Journal of Orthodontics*, 34(6), 724–730.
- Sheridan JJ, Hilliard K, A. P. (2003). Essix Appliance Technology: Applications, Fabrication and Rationale. *GAC International*, 45–95.
- Sheridan JJ, LeDoux W, M. R. (1993). Essix retainers: fabrication and supervision for

- permanent retention. *J Clin Orthod*, 27(1), 37–45.
- Sheridan JJ, LeDoux W, M. R. (1994). Essix appliances: minor tooth movement with divots and windows. *J Clin Orthod*, 28(28), 659–663.
- Slater, R. D. (2013). Speech and discomfort during lingual orthodontic treatment. *Journal of Orthodontics*, 40(sup1), s34–s37.
- Taatjes, D. J., Sobel, B. E., ve Budd, R. C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(1), 33–43.
- Tait, J. F. (2008). Imaging of apoptosis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(10), 1573–1576.
- Tamburrino, F., D'Antò, V., Bucci, R., Alessandri-Bonetti, G., Barone, S., ve Razionale, A. V. (2020). Mechanical properties of thermoplastic polymers for aligner manufacturing: In vitro study. *Dentistry Journal*, 8(2), 1–10.
- Tartaglia, G. M., Mapelli, A., Maspero, C., Santaniello, T., Serafin, M., Farronato, M., ve Caprioglio, A. (2021). Direct 3D printing of clear orthodontic aligners: Current state and future possibilities. *Materials*, 14(7), 1–11.
- van der Veen, M. H., Attin, R., Schwestka-Polly, R., ve Wiechmann, D. (2010). Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: Do lingual brackets make a difference? *European Journal of Oral Sciences*, 118(3), 298–303.
- Van Heerde, W. L., Robert-Offerman, S., Dumont, E., Hofstra, L., Doevendans, P. A., Smits, J. F. M., Daemen, M. J. A. P., ve Reutelingsperger, C. P. M. (2000). Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovascular research*, 45(3), 549–559.
- Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203–209.
- Weir, T. (2017). Clear aligners in orthodontic treatment. *Australian Dental Journal*, 62, 58–62.
- Wisnewski, A. V., Srivastava, R., Herick, C., Xu, L., Lemus, R., Cain, H., Magoski, N. M., Karol, M. H., Bottomly, K., ve Redlich, C. A. (2000). Identification of human lung and skin proteins conjugated with hexamethylene diisocyanate in vitro and in vivo. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(6), 2330–2336.
- WN., A. (1993). *The biochemical principles of toxicology*. Exp. Toxicol.

- Wong, B. H., Scholz, R. P., ve Turpin, D. L. (2002). Invisalign A to Z. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 121(5), 540–541.
- Yeh HJ, Lin WC, Shih TS, Tsai PJ, Wang ST, C. H. (2007). Urinary excretion of toluene diisocyanates in rats following dermal exposure. *Journal of Applied Toxicology*.
- Zheng, M., Liu, R., Ni, Z., ve Yu, Z. (2017). Efficiency, effectiveness and treatment stability of clear aligners: A systematic review and meta-analysis. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 20(3), 127–133.
- Zinelis, S., Eliades, T., Eliades, G., Makou, M., ve Silikas, N. (2005). Comparative assessment of the roughness, hardness, and wear resistance of aesthetic bracket materials. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 21(9), 890–894.