

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**DENTİN BARIYER TESTİ İLE DİŞ HEKİMLİĞİNDE
KULLANILAN KOMPOZİT REZİN SİMANLARIN
SİTOTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hayriye Esra ÜLKER

DOKTORA TEZİ

DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİMDALI

Danışman

Prof. Dr. Abdülkadir ŞENGÜN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 06102038 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA–2009

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Dişhekimliğinde Kullanılan Simanlar.....	2
1.1.1. Fosfat esaslı simanlar.....	3
1.1.2. Fenolat esaslı simanlar.....	4
1.1.3. Polikarboksilat esaslı simanlar.....	4
1.1.4. Cam iyonomer esaslı simanlar.....	4
1.1.5. Polimer esaslı simanlar.....	5
1.2. Biyouyumluluk	10
1.3. Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi.....	11
1.3.1. In vitro deneyler (birincil ya da eleme testleri).....	11
1.3.2. Hayvan deneyleri (ikincil testler).....	17
1.3.3. İnsanlarda klinik çalışmalar.....	18
1.4. Rezin Esaslı Materyallerin Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi.....	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24-46
2.1. İnsan ve Sığır Pulpalarından Derive Edilmiş Hücre Kültürleri.....	24
2.2. Test Materyalleri, Kristal Viyole ve ROS Deneyleri için Materyal Ekstraktlarının Hazırlanması.....	25
2.3. Kristal Viyole Testi.....	32
2.3.1. Kristal viyole testi için istatistiksel değerlendirme.....	35
2.4. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tespit Edilmesi.....	35
2.4.1. Hücrelerin materyal ekstraktları ile muamele edilmesi.....	35
2.4.2. Sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretiminin belirlenmesi.....	36
2.4.3. ROS testleri için istatistiksel değerlendirme.....	38

2.5. Dentin Bariyer Testi.....	38
2.5.1. Dentin disklerinin hazırlanması.....	38
2.5.2. Hücrelerin idamesi.....	39
2.5.3. Üç boyutlu hücre kültürlerinin hazırlanması.....	40
2.5.4. Yapay pulpa odalarının hazırlanışı.....	41
2.5.5. Metiltetrazolyum testi.....	44
2.5.6. Dentin bariyer testlerinin istatistiksel değerlendirmesi.....	45
3. BULGULAR.....	46-69
3.1. Kompozit Resin Simanların Kristal Viyole Testi ile Elde	
Edilen Bulguları.....	46
3.2. Kompozit Resin Simanlara Karşı Oluşan Reaktif Oksijen	
Ürünü Bulguları.....	54
3.3. Kompozit Resin Simanların Dentin Bariyer Testi ile Elde	
Edilen Sitotoksisite Bulguları.....	63
4. TARTIŞMA	64-77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	77-78
6. ÖZET.....	79-80
8. SUMMARY.....	81-82
9. KAYNAKLAR.....	83
10. ÖZGEÇMİŞ.....	88

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince manevi olarak beni her zaman destekleyen sevgili eşim ve aileme, tezimin hazırlanması sırasında her konuda bana yardımcı olan, yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Abdulkadir Şengün'e; hücre kültürü laboratuvar çalışmalarındaki bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sema S. Hakkı'ya, Almanya Regensburg Üniversitesi hücre kültürü laboratuvarında çalışma olanağını bana sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Füsün Özer ve Prof. Dr. Gottfried Schmalz'a; Almanya'da laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Helmut Schweikl, Sayın Prof. Dr. K. Anton Hiller ve Sayın Claudie Bosl'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

KRS: Kompozit Rezin Siman

ROS: Reaktif Oxygen Species

SV3neoB: Sığır Pulpa Hücreleri

tHPC: Transfected Human Pulp Cell- İnsan Pulpa Hücreleri

CİS: Cam İyonomer Siman

TEG-DMA: Triethyleneglycol dimethacrylate

HEMA: 2-hydroxyethylmethacrylate

Bis-GMA: bisphenol A glycidyl methacrylate

BPA: Bisphenol A

FBS: Fetal Bovine Serumu

MEM α : Minimum Essential Medium Eagle Alpha

CMF-PBS: Kalsiyumsuz, Magnezyumsuz Phosphate Buffered Saline

DNA: Deoksiribonükleik asit

DCFHDA: 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

1. GİRİŞ

Günümüzde estetiğe verilen önemin gittikçe artması nedeniyle hasta ve hekimin beklentilerine yanıt verebilmek için, restoratif dişhekimliğinde her an yeni materyallerin geliştirilmesine devam edilmektedir. Kompozit materyallerin kullanım alanı gün geçtikçe artmaktadır. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalarda kompozit rezin esaslı materyallerden sertleşme sırasında veya daha sonra çeşitli monomerler salındığı gösterilmiştir. Hücre kültürlerindeki sitotoksik etkilerin bu salınan monomerlerden kaynaklandığı iddia edilmektedir.

Kompozit veya seramik restorasyonların yapıştırılmasında, dişin sert dokularına kimyasal ve mikromekanik yollarla bağlanabilen ve kullanımı kolaylaştırılmış kompozit rezin esaslı yapıştırma simanları geliştirilmeye devam edilmektedir. Yeni geliştirilen kompozit rezin simanların asitleme ve bonding aşamalarını ortadan kaldıran self-etch karakterde oldukları ve hem ışıkla hem de kimyasal olarak sertleşme mekanizmalarına sahip oldukları görülmektedir. Kompozit rezin simanlar direkt olarak dentin üzerine uygulanan materyaller oldukları için pulpa ile ve dişeti ile yakın temasta oldukları için periodontal dokular ile biyouyumlu olmaları çok önemlidir.

Bu çalışmanın amacı; dişhekimliğinde yeni geliştirilen bazı self etch kompozit rezin simanların pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin kristal viyole testi ile değerlendirilmesi, oluşturdukları reaktif oksijen ürünlerinin belirlenmesi ve son olarak üç boyutlu hücre kültürü ve simanların *in vivo* kullanımının *in vitro* ortamda taklit eden dentin bariyeri testleri ile değerlendirilmesidir.

Yeni geliştirilen bu materyallerin biyolojik olarak yeterince test edilmeden piyasaya sürüldükleri göz önünde bulundurularak yaygın olarak klinik test veya kullanıma geçmeden önce bu materyallerin çeşitli sitotoksikite testlerini geçmeleri ve kabul edilebilir biyouyumluluğa sahip olanların kullanımına izin verilmesi gereklidir.

Çok farklı sitotoksikite testleri bulunmakta ve bunların sonuçlarının *in vivo* şartlara uygulanıp uygulanamayacağı tartışılmaktadır.

1.1. Dişhekimliğinde Kullanılan Simanlar

Yirmi yılı aşkın süredir adeziv sistemlerin gelişimine bağlı olarak yapıştırma materyalleri üzerine yoğunlaşmıştır. Simanların fiziksel, biyolojik özellikleri ve klinik uygulamalarının farklılık göstermesi sebebiyle, kompozisyonlarına göre (ANSI /ADA(American National Standards Institute/American Dental Association)) ve performans kriterleri üzerine çeşitli yeni uluslararası standartlar (International Standard Organization [ISO]) geliştirmiştir (Rosenstiel ve ark 1998).

Ondokuzuncu yüzyılın başlarından beri dental simanlar diş hekimliğinde farklı amaçlarla kullanılmakta ve halen geliştirilmeye devam etmektedir. İlk olarak Sorel 1856 yılında magnezyum klorid esaslı bir simanı tanıtmıştır (Holleman ve Wiber 2001). 1900'lü yılların başlarında temel olarak üç siman diş hekimliğinde klinik olarak kullanılmaktaydı: çinkofosfat siman, çinkooksit öjenol siman ve silikat siman. Ancak Smith 1968 yılında toz kompozisyonu çinko fosfat siman ile aynı olan ancak likiti farklı olarak aköz poliakrilik asit içeren bir siman geliştirilmiştir. Karboksilat siman adı verilen bu siman ile Smith diş hekimliğinde tamamen yeni bir alan açmıştır.

İlk olarak geliştirilen polikarboksilat simandan daha sonra cam iyonomer simanlar ve son zamanlarda da rezin simanlar ve hibrit iyonomer simanlar geliştirilmiştir. Bu yeni simanlar pulpa üzerine daha az toksik etki, daha yüksek dayanım ve daha az çözünme ve daha iyi adeziv karakterleri açısından çinko fosfat simana alternatif olarak piyasaya sürülmüştür (Macorra ve Pradies 2002).

Akrilik rezinlerin 1950'lerin ortasında geliştirilmesi, polimetilmetakrilatların gelişimine rehberlik etmiştir. Akrilik rezinlerin rutin simantasyonda kullanımlarını sona erdiren düşük adhezyon, yüksek sızıntı ve toksisite gibi bazı sınırlamaları vardı (Jorge ve ark 2003). Son 20 yılda polimerize olabilen Bis-GMA ve diğer dimetakrilat monomer esaslı simanlar, porselen ve döküm restorasyonların, kompozit ve porselen inley ve onleylerin ve ortodontik braketlerin diş sert dokularına bağlanması için çeşitli formlarda kullanılmaktadır (Leinfelder 2006).

İdeal bir dental siman; farklı materyaller arasında dayanıklı bir bağ oluşturmalı, uygun sıkışma ve gerilme kuvvetlerine sahip olması, interfasyal veya

koheşiv başarısızlıklar sonucu ortaya çıkan yer değiştirmeyi önlemek amacıyla yeterli dayanıklılığa sahip olması, restorasyonu ve dişi ıslatabilmesi, yeterli film kalınlığına ve viskoziteye sahip olması ve ağızda çözölmeye karşı dayanıklı olması gereklidir. Yeterli alışma ve sertleşme zamanı gibi iyi manöplasyon özelliği de başarılı bir kullanım için şarttır. Bunlardan daha önemli derecede materyallerin biyolojik olarak kabul edilebilir özellikte olmaları istenir (Macorra ve Pradies 2002).

Simanlar, içerikleri arasında oluşan kimyasal reaksiyonla (sıklıkla asit-baz reaksiyonu) yada monomer bileşiklerinin polimerizasyonuna bağlı olarak sertleşirler (Dayangaç 2000).

Günümüzde en çok kullanılan simanlar tipleri kimyasal kompozisyonlarına göre 5 grupta sınıflandırılabilirler:

1. Fosfat esaslı simanlar
2. Fenolat esaslı simanlar
3. Polikarboksilat esaslı simanlar
4. Cam iyonomer esaslı simanlar
5. Polimer esaslı simanlar (O'Brein 2002).

1.1.1. Fosfat Esaslı Simanlar

Çinko fosfat simanlar; prefabrike veya döküm post, metal inley, onley, sabit kuron köprü restorasyonlar ve alüminöz tam seramik kuronların simantasyonunda kullanılırlar (Diaz-Arnold ve ark 1999). Çinko fosfat siman ilk karıştırıldığında oldukça asidiktir ve pH değeri 1 ila 2 arasındadır. Bir saat sonra pH 4'ün altına düşerken 24 saat sonunda ise pH 6–7 olur. Simantasyon sırasında oluşan hassasiyet, simanın asidik olmasının yanı sıra dentin tübülleri içerisindeki sıvının ozmotik basınç ile hareketinden de kaynaklanmaktadır. Bu simanın sertleşme zamanının uzun olması nedeniyle kalan dentin kalınlığının az olduğu dişlerde pulpanın düşük pH'ya maruz kalmasıyla çeşitli zararlar oluşabilir (O'Brein 2002).

Toz/likit oranı 2/1 olan çinko fosfat simanın dentin bariyeri testinde hücrelere neredeyse hiç sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Aynı materyal 1/1 toz/likit oranında uygulanırsa çok az sitotoksik olduğu görölmüş, bu oranda 24 saat sonunda hücrelerin %81'i yaşamını devam ettirmiştir (Schmalz, 1996).

1.1.2. Fenolat Esaslı Simanlar

Çinko oksit öjenol siman, kronların geçici yapıştırılmasında ve derin kavitelere kaide maddesi olarak kullanılmaktadır (Altıntaş 2007). En önemli avantajı; pulpa hassasiyetini önleyici veya azaltıcı etkisidir. Düşük dayanıklılık ve abrazyon direnci ile ağız sıvılarında kolay çözünme, bozulma ve düşük antikaryojenik özelliği çinkooksit öjenol simanın dezavantajlarıdır (O'Brein 2002).

Çinko oksit öjenol siman ile yapılan bir *in vitro* çalışmada (Schmalz ve ark 1996) yüksek toksik etki göstermesine rağmen daha önce yapılan hayvan (Schmalz ve ark 1986) ve insan çalışmalarında (Stanley ve ark 1975) toksik etki izlenmemiştir. Dentin bariyer testlerinde ise çinko oksit öjenol simanın sitotoksitesinin konsantrasyona ve dentin kalınlığına göre farklılık gösterdiği saptanmıştır (Schmalz, 2001).

1.1.3. Polikarboksilat Esaslı Simanlar

Polikarboksilat siman; çinko oksit ve magnezyum oksit tozunun, yüksek molekül ağırlıklı vizköz bir likit olan poliakrilik asit ile asit-baz reaksiyonu sonucu oluşur. Polikarboksilat simanlar hidrofiliktirler ve dentin yüzeyini ıslatabilirler. Karboksilik asit ve kalsiyum arasında reaksiyon sonucu diş dokusu ile kimyasal bir bağ oluşturabilirler (Şen 2005, Altıntaş 2007). En önemli özellikleri; pulpa ile olan biyouyumluluğudur, bunun da karıştırma sonrası aniden meydana gelen pH yükselmesi ve büyük poliakrilik asit moleküllerinin dentin tübüllerine penetre olmaması sonucu olduğu iddia edilmektedir (Anusavice 1996).

Polikarboksilat simanların plastik deformasyona dirençleri çinko fosfat simanlardan daha azdır. Bu nedenle uzun köprü protezlerinde yüksek çiğneme stresi olan bölgelerde kullanımı çok uygun değildir. Çiğneme kuvvetlerinin fazla yüksek olmadığı bölgelerde ve hassasiyeti olan dişlerde tek üyeli restorasyonların simantasyonunda kullanılmaktadırlar (Diaz-Arnold ve ark 1999).

1.1.4. Cam İyonomer Esaslı Simanlar

Cam İyonomer Simanlar (CİS), silikat ve polikarboksilat simanların bir karışımıdır. Alüminyum florosilikat cam partikülleri ile zayıf polialkenoik,

itakonik, maleik ve trikarboksilik asit içeren likitin asit-baz reaksiyonu sonucu sertleşirler. Asit içindeki karboksil gruplarıyla dentin ve mine apatitindeki kalsiyum ve fosfat iyonları arasında iyonik bağlar oluşur (Şen 2005).

Chang (2001) yaptığı bir çalışmada CİS'den salınan floridin kültüre edilmiş insan pulpa hücreleri üzerinde hücre büyümesini, proliferasyonunu, mitokondrial aktivitesini ve protein sentezini inhibe edici özelliklerinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Schmalz ve ark (1996), klasik CİS olan Ketac fil ve Ketac silver uygulandıktan sonra Ketac fil grubunda % 28 ve Ketac silver grubunda % 24 oranında hücre hasarı olduğunu saptamışlar. Ancak bu simanlarla daha sonra yapılan dentin bariyer testlerinde sitotoksik etki görülmemiş ve bu sonuçlarında daha önce yapılan hayvan deneyleri ve klinik deneyimlerle benzer doğrultuda olduğu görülmüştür (Schmalz 1999).

Schmalz ve ark (1999) yaptığı agar difüzyon ve milipore filtre testleri sonucunda rezin modifiye CİS olan Vitrebond'un yüksek toksisiteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Ratanasathien ve ark (1994), Vitrebond isimli ışıkla sertleşen CİS'in sitotoksitesinin bir komponenti olan 2-hydroxyethyl-methacrylate maddesine bağlı olarak oluştuğunu savunmaktadır.

Ürünler arasındaki farkla ilgili olarak ratların bağ dokusu üzerinde yapılan bir histoloji çalışmasında fissür örtücü olarak kullanılan, daha düşük toz/likit oranına sahip olan Fuji İonomer Tip III diğer CİS'lardan daha ağır bir reaksiyon oluştururken, restoratif siman olan Fuji Cap II orta derecede reaksiyon oluşturduğu görülmüştür. Bu da araştırmacıların daha düşük başlangıç pH'sının ve salgılanan irritan komponentlerin bu reaksiyona sebep olduğu kanısına varmalarına sebep olmuştur (McComb ve Ericson 1987).

1.1.5. Polimer Esaslı Simanlar

Akrilik rezin simanlar

Akrilik rezinler, restorasyonların yüzey kaplamalarının ve geçici kuronların yapıştırılmasında kullanılırlar. Birim molekül metilmetakrilattır. Oda sıcaklığında

kimyasal yolla polimerize olarak polimetilmetakrilat zincirleri oluştururlar. Kompozitlerin geliştirilmesi ile uygulama alanları sınırlanmıştır (Dayangaç 2000).

Adeziv rezin simanlar

Adeziv rezin simanların yapısına 4-metiloksi etil trimelletik anhidrid (4-META) adezyon geliştirici olarak karıştırılır. Bunlara ilaveten, dentine kimyasal olarak yapışmayı sağladığı dışınulen tribütil boron ilave edilir. Bu materyaller özellikle soy metal alaşımdan yapılan sabit protezler ve amalgamın dentine ve kompozit rezine tutunması amacıyla da kullanılmaktadır (O'Brein 2002).

Dimetakrilat simanlar (Kompozit Rezin simanlar)

Rezin simanlar Bis-GMA rezin ve diğer metakrilatları içeren bir siman türüdür. Farklı renk tonlarına, opasiteye sahiptir ve kimyaları dış yapısı ile adhezyonuna izin verir (Diaz-Arnold ve ark 1999).

Rezin simanlar seramik restorasyonların adeziv yapıştırmasında kullanılır. Rezin simanlarda içerik ve karakteristik özellik açısından restoratif kompozit rezinlere benzerler ve organik matriks (örn: Bis-GMA, TEGDMA, UDMA) içerisine gömülmüş inorganik dolduruculardan oluşurlar (Kramer ve ark 2000).

Rezin simanlar doldurucu tiplerine göre mikro dolduruculu ve hibrit dolduruculu sistemler olarak ayrılmaktadırlar. Yapı olarak kompozit rezinler gibi organik polimer faz, inorganik faz ve ara bağlayıcı faz olmak üzere üç ayrı fazdan oluşmaktadırlar (Zaimoğlu ve Can 2004).

Rezinin mineye adezyonu asitlenmiş mine yüzeyinde mikromekanik olarak hidroksiapatit kristalleri ile oluşur. Dentine adezyonu biraz daha komplekstir. Adezyon, asitlenmiş dentinde ortaya çıkan demineralize apatit tabakanın üstünde yer alan kollojen tabakaya hidrofilik monomerlerin penetrasyonu ile oluşur (Diaz-Arnold ve ark 1999).

Son zamanlarda dış sert dokularına bir ara bağlayıcı gerekmeksizin kimyasal ve mikromekanik olarak bağlanabilen kompozit rezin simanlar (KRS) geliştirilmiştir. Polimerizasyon tiplerine göre 3 gruba ayrılabilirler:

Kimyasal polimerize olan rezin simanlar

Kimyasal yolla polimerize olan sistemler amin ve peroksit olmak üzere iki pasta içerirler. Patların karıştırılması ile polimerizasyon reaksiyonu başlar. Reaksiyonu başlatan tersiyer aromatik aminlerin ağız ortamında kimyasal değişikliğe uğraması ile amin renklenmesi görülmektedir. Ayrıca çalışma sürelerinin kısa olması da diğer bir dezavantajdır. Kalın ve metal destekli restorasyonların simantasyonunda kullanılabilirler. Kimyasal olarak polimerize olan rezin simanların çoğunun sadece birkaç renk seçeneği vardır. Bu yüzden diş ve materyal kombinasyonunun siman ile renginin değiştirilmesi düşünüldüğü translusent ve metal altyapısız restorasyonlar için uygun değildir (Öztürk ve Uludağ 2002).

Işık ile polimerize olan rezin simanlar

Işık ile polimerize olan rezin simanlar tek pat olarak üretilmişlerdir. Tek pat halindeki bu simanlarda ışık emici olarak kamforokinon (champhoroquinone) ve hızlandırıcı olarak alifatik amin bulunur. Bunlar tüp içinde birlikte bulunmalarına rağmen ışık uygulanmadıkça polimerizasyonu başlamaz. Polimerizasyonu başlatan görünür mavi ışık ortalama 420-450 nm dalga boyundadır. Bu simanlar, görünür ışığın penetrasyonuna tamamen izin veren, kalınlığı 1.5-2 mm'den az olan ve translusent yapıdaki seramik veya kompozit laminate'lerin yapıştırılmasında kullanılması uygundur (Öztürk ve Uludağ 2002).

Bu simanlar optimal olarak sertleştiğinde, kimyasal ve dual olarak sertleşen bazı simanlar gibi zamanla renk değişimi göstermezler. Çalışma süreleri, restorasyonun yerleştirilmesi ve taşan simanın temizlenmesi için yeterlidir. Farklı opasite ve renk seçeneklerine sahip olmaları estetik yönden başarıyı arttırmıştır (Altıntaş 2007).

Hem ışık hem kimyasal yolla polimerize olan rezin simanlar (dual-polimerize simanlar)

Hem ışık hem kimyasal yolla polimerize olan rezin simanlar iki pat veya toz-likit şeklinde bulunurlar. Bu simanların baz kısmında diketon (kamforokinon) gibi ışığa hassas polimerizasyon sistemleri vardır (O'Brien 2002). Kimyasal ve ışık ile polimerize olan rezin simanlar (dual polimerize simanlar), çevre dokuların veya

alttaki diş dokusunun rengini yansıtacak (bukalemun etkisi) ve restorasyonun rengiyle uyum sağlayacak şekilde genellikle translüsent yapıdadırlar. Bu tip simanlar, restorasyonun bir miktar ışık penetrasyonuna izin verecek kadar translüsent olduğu, ancak sadece ışık ile polimerizasyonun tamamen sağlanamayacağı kalınlıktaki (1.5-2 mm'den fazla olan) restorasyonlarda kullanılmaktadır (Zaimoğlu ve Can 2004). Dual polimerize rezin simanların kimyasal aktivasyonlarının etkinliği yetersiz olduğundan, uygun ışık aktivasyonu materyalin tamamen polimerize olması için çok önemlidir (Rosenstiel ve ark 1998).

Dual polimerize olan simanlar; seramik inley ve onley restorasyonların, tam seramik kuronların yapıştırılmasında kullanılmaktadırlar. Bu simanlar ana madde ve katalizör karıştırılmasıyla kimyasal olarak, ışık uygulandığında ise ışık ile polimerize olmaktadır (Rosenstiel ve ark 1998).

Araştırmalar dual polimerize olan simanlarda ışığın ulaşamadığı bölgelerin, hiçbir zaman kimyasal sertleşen simanlardaki kadar tam sertliğe ulaşamadığını göstermiştir. Bu yüzden tüm siman tabakası boyunca sertleşmenin tamamen sağlanabilmesi için kimyasal olarak polimerize olan simanların kullanılması önerilmiştir (Darr ve Jacobsen 1995, Saskalauskaite ve ark 2007).

Bir inley restorasyonun simantasyonu sırasında; simanın ışık kaynağına yakın olan yüzeyi dual simanın hem ışıkla hem de kimyasal, kavitenin gingival tabanındaki kısımları ise daha çok kimyasal olarak polimerize olmaktadır. Maksimum sertliğe ulaşmada, dual sertleşen simanlar için kimyasal sertleşme tek başına yetersizdir (Zaimoğlu ve Can 2004).

Dual polimerize rezin simanların avantajları:

- Çok çeşitli yüzeylere yapışabilme yetenekleri vardır.
- Yüksek dayanıklılığa sahiptirler.
- Ağız ortamında düşük çözünürlük gösterirler.
- Farklı renk ve opasite seçeneklerine sahiptirler.
- Optimal retansiyon ve direnç formunun sağlanamadığı vakalarda başarıyla kullanılabilirler.

- Bazı rezin simanların “yiterbiyum trifloride” içeriklerine bağlı olarak flor salma özelliği vardır (O’Brien 2002).

Dual polimerize rezin simanların dezavantajları:

- Çok dikkatli ve hassas bir çalışma gerektirirler. İyi bir bağlantı dayanıklılığı elde etmek ve mikrosızıntıyı önlemek için diş yüzeyinin kontaminasyonuna engel olmak gerekmektedir.
- Geleneksel simanlara göre film kalınlığı fazladır.
- Simantasyon sırasında taşan simanın temizlenmesi zordur.
- Mikrosızıntı ve pulpa hassasiyeti oluşturma olasılıkları vardır.
- Polimerizasyonları oksijen ile inhibe olmaktadır (O’Brien 2002).

Mevcut rezin simanlar, oksijen varlığında polimerize olamamaktadırlar. Bu durum özellikle restorasyon kenarlarında çok önemlidir. Polimerize olmayan kısımlar yapışkan, sertleşmemiş bir tabaka olarak göze çarpmaktadır. Bu yüzden restorasyon yerleştirildikten sonra taşan siman temizlenmeli ve hava ile temasını bloke eden ajanlarla (örneğin oxyguard) marjinal bölgeye derhal yerleştirilmelidir (Feilzer ve ark 1993).

Işıkla sertleşen rezin materyallerinde polimere dönüşüm derecesi % 55- 80 arasında iken, bu oran oksijen inhibisyon tabakası varlığında % 35’e düşmekte ve bunun sonucu olarak reaksiyona girmemiş monomer miktarı % 65’e çıkmaktadır. Karbon-karbon çift bağ dönüşüm derecesi; ışık kaynağının tipine, uygulama zamanına, ışığın yoğunluğuna ve rezin materyalinin kalınlığı gibi bazı özelliklere bağlıdır (Kömürcüoğlu ve ark 2005).

Birçok materyale uyumu, yüksek direnci, ağız içinde çözünmemesi ve renk seçimi yapılabilmesi açısından rezin simanlar; kompozit rezin inley ve onleylerde, veneerlerde, kuronlarda, sabit parsiyel protezlerde ve yeni geliştirilen fiberle güçlendirilen kompozit rezinler ile birlikte uygulanmasında iyi bir seçenektir (Diaz-Arnold ve ark 1999).

1.2. Biyouyumluluk

“Biyouyumluluk” ve “Biyomalzeme” terimleri, malzemelerin biyolojik performanslarını belirtmek için kullanılmaktadır. Biyouyumlu olan malzemeler, biyomalzeme olarak adlandırılmış ve biyouyumluluk; bir materyalin kendine özgü uygulamaları sonrası, uygun konak doku cevabı oluşturabilme yeteneği şeklinde tanımlanır (Wataha 2001). Her materyal piyasaya sürölüp, hastalar üzerinde uygulanmadan önce olası biyolojik cevapları araştırılmalıdır. Bu analizler bu materyallerden salınan komponentleri ve çeşitli dokularla lokal ve sistemik ilişkilerini de içermelidir (Schmalz 1994).

Bilimsel anlamda yeni bir alan olmasına karşın, uygulama açısından biyomalzeme kullanımı tarihin çok eski zamanlarına kadar uzanmaktadır. Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler bunun en güzel kanıtlarıdır. Altının diş hekimliğinde kullanımı, 2000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. 19. yüzyıl ortasından itibaren yabancı malzemelerin vücut içerisinde kullanımına yönelik ciddi ilerlemeler kaydedilmiştir. Örneğin 1880’de fildişi protezler vücuda yerleştirilmiştir. İlk metal protez, vitallyum alaşımından 1938’de üretilmiş. 1960’lara kadar kullanılan bu protezler, metal korozyona uğradığında ciddi tehlikeler yaratmıştır. 1972’de alumina ve zirkonya isimli iki seramik yapı herhangi bir biyolojik olumsuzluk yaratmaksızın kullanılmaya başlanmış, ancak inert yapıdaki bu seramikler dokuya bağlanamadıklarından çok çabuk zayıflamışlardır. Aynı yıllarda Hench tarafından geliştirilen biyoaktif seramikler (örneğin; biyocam ve hidroksiapatit) ile bu problem çözüm bulmuştur. İlk başarılı sentetik implantlar, iskeletteki kırıkların tedavisinde kullanılan kemik plakalarıdır. Bunun yanı sıra, ilk olarak 1937’de diş hekimliğinde kullanılmaya başlanan polimetilmetakrilat (diş akriliği olarak da bilinir) ve yüksek molekül ağırlıklı polietilende kalça protezi olarak kullanılmıştır (Gümüşderelioğlu 2002).

Son 50 yılda 40’ı aşkın metal, seramik ve polimer, vücudun 40’dan fazla değişik parçasının onarımı ve yenilenmesi için kullanılmıştır. Ancak, halen biyomalzemedan kaynaklanan aşılammamış sorunlar bulunmaktadır. Bunların çözümünde doku mühendisliği ve gen tedavisi alternatif yaklaşımlar sunmaktadır. Özellikle nanoteknoloji, bilişim teknolojileri ve fabrikasyon yöntemlerindeki

gelişmelere paralel olarak daha uyumlu biyomalzemelerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (Gümüşderelioğlu, 2002).

1.3. Biyouyumluluğun Değerlendirilmesi

Biyouyumluluk testleri materyallerin vücuttaki dokulara temas ettiğinde meydana gelebilecek reaksiyonları önceden belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. Dental materyallerin biyolojik olarak incelenmesinde çok sayıda teknik kullanılmaktadır:

- *In vitro* deneyler (birincil ya da eleme testleri),
- *In vivo* hayvan deneyleri (ikincil testler),
- İnsanlarda klinik çalışmalar olmak üzere üç basamakta yürütülmektedir.

1.3.1. *In vitro* Deneyler (birincil ya da eleme testleri)

Biyouyumluluğun araştırılmasında standart, basit ve kısa sürede sonuç veren bir test yönteminin kullanımı tercih edilmelidir. Materyalin biyolojik aktivite mekanizmasının *in vitro* deneylerle öğrenilmesi özelliklerinin geliştirilmesini sağlar (Wataha 2001).

Çok çeşitli hücre kültürü testleri vardır, fakat genellikle hücreler ve ya bakteriler materyal ile kontağa getirilerek testler yapılır. Bu testlerde amaç çeşitli hücreler ile materyalin temasında ortaya çıkan çeşitli biyolojik cevapların test edilmesidir. Örneğin, bakteriler bu materyallerin mutasyon oluşturup oluşturmadığını anlamada kullanılabilir (Schweikl ve ark 2002) ya da hücreler bir petri kabında üretilerek ve materyalin ekstraktlarına maruz bırakılır (Annunziata 2006, Şengün ve ark 2006, Kuşdemir 2007). Materyale maruz kalan hücrelerin sayısı, gelişim hızı, çeşitli metabolik fonksiyonları veya diğer hücre fonksiyonları değerlendirilerek etki ölçülür. Bu testler, sitotoksosite, hemolizis, ağız veya damar yolu ile kullanım sonucu sistemik toksisite, inhalasyon toksisitesi, teratojenite, karsinojenite tahmin testleri, Ames mutajenite testi, Styles hücre transformasyon testi gibi, bir seri yöntemi kapsamaktadır (Hensten-Pettersen, 1988).

In vitro hücre kültürü testleri kontrol edilebilir, tekrarlanabilir, daha çabuk sonuç alınır, uygulaması kolay ve maliyeti ise daha az olan testlerdir (Schmalz

1994). Hayvan ve insan çalışmalarında karşılaşılan etik problemler *in vitro* deneylerde yoktur. Ancak sonuçlarının *in vivo* koşulların sonuçları ile bağıntısının kurulması güçtür, vücutta materyale karşı çok kompleks biyolojik cevaplar gelişir. *In vitro* testler ile materyale karşı oluşan biyolojik cevapla ilgili yanıltıcı sonuçlar oluşturabilir (Wataha 2001).

Biyolojik dokularda kullanılacak materyalin zararlı etkilerinin araştırılmasında kullanılan yöntemlerin prensibi, materyal ile biyolojik sistemin teması sonucunda canlıdaki fonksiyonel ve yapısal değişimin niteliğini ve niceliğini belirlemektir. Bir başka deyişle bu etkinin, biyolojik sistemin yapısında belirgin bir değişikliğe yol açıp açmadığı ve etkinin geri dönüşümlü olup olmadığını ortaya çıkarmaktır (Schmalz 1994).

Her maddenin biyolojik sistemde etki göstermediği minimum bir konsantrasyon vardır. Yine her maddenin bu miktarın üstünde belli bir etki gösterdiği konsantrasyon vardır. Canlı sistemin maddeye verdiği cevap kantitatif olarak değerlendirilebilir. Biyolojik etkilerin incelenmesinde “aynı fonksiyonu ve aynı biyokimyasal metabolik yolları olan hücreler belirli bir kimyasal maddeye karşı aynı etkiyi gösterir” prensibi büyük önem taşır. Bu prensip farklı türlerde hücreler içinde tersi şeklinde geçerlidir. Materyal biyolojik aktivite açısından incelenirken kullanım amacı da göz önünde bulundurulmalıdır (Wataha 2001).

1950 yılında Kawahara’nın laboratuvarında dental materyallerin sitotoksitesini araştırmak amacıyla hücre kültürü metodları kullanılmaya başlanmıştır. L-929 hücreleri ile monolayer ve hanging drop metodunu kullanarak, saf metallerin, dental simanların, ilaçların ve plastiklerin sitotoksitesini araştırmışlardır (Kawahara ve ark 1968).

Leiskar ve Helgeland (1972) dental materyallerden elde edilen standart boyutlu diskler üzerinde insan epitelyal ve L-929 fare hücrelerinin gelişimiyle ilgili ilk çalışmayı yapmışlar. Araştırdıkları materyaller: gümüş amalgam, yüksek bakırlı amalgam, rezinler, silikat siman ve altın alaşımlarıdır.

Schmalz (1982) dental materyallerin sitotoksitesini test etmek için agar overlay tekniğini ilk kullanan diş hekimliği araştırmacısıdır. Bu teknikte L-929 fare

hücreleri plastik kültür kaplarında üretilip ve hücreler agar üzerine yerleştirilmiştir. Agar üzerine yerleştirilen toksik test materyalleri agar içerisine difüze olarak, hücre membran permeabilitesinde artışa sebep olur ve vital boya (nötral red) hücre dışına salınır. Schmalz bu tekniği kullanarak bir grup diş dolgu malzemeleri üzerinde çalışmış ve daha ucuza ve radyoaktivite olmadan Cr-release tekniğine benzer sonuçlar elde etmiştir (Schmalz 1982, 1988).

Hücre kültürü tanım ve yöntemleri

Hücre kültürleri primer doku eksplantlarından üretilebilir. Primer hücre kültürleri tipik olarak sınırlı bir yaşam süresine sahipken (belli bir bölünme sayısından sonra çoğalma durur), sürekli hücre serileri anormal (kanser hücreleri gibi) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileridir ve daha fazla çoğalma gösterebilirler (Hanks ve ark 1996).

Ancak, spesifik metabolik potansiyele sahip primer hücreler, hedef hücrelere benzerlikleri nedeni ile *in vivo* şartlara daha yakın deneysel koşullar oluşturulmasını sağlarlar (Arenholt-Bindslev ve Blegg 1990).

Tek bir hücre tipi hakkında özel bir bilgi edinmek için o hücrenin dokudaki diğer hücre tiplerinden ayrılması gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (kültür ortamı, besiyeri, *medium*) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir (Freshney 1987).

Dental materyallerin sitotoksikite testlerinde farklı kaynaklardan elde edilen diploid ve anüloid memeli hücreleri kullanılmaktadır. Deneylerde en sık kullanılan L929 fare fibroblastı, BHK-21 (C-13) fibroblastları, fare fibroblastlarının L hücreleri, insan deri epitelyumyal (NCTC 2544) hücreleri (Polyzois 1994) veya insan gingival hücreleridir (Şengün ve ark 2006). Son zamanlarda sığır (SV3neoB) ve insandan (tHPC) derive edilerek immortal hale getirilmiş pulpa hücreleri çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Thonemann ve Schmalz 2000, Galler ve ark 2006).

Diş pulpasından elde edilen primer hücreler *in vitro* olarak odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabilir (Andrews ve ark 1993, MacDougall ve ark 1995). Ancak, odontoblastlara farklılaşmanın özel hücre metabolizmaları ve hücreler arası ilişkiler ile ilgili *in vitro* araştırmalar kısıtlı sayıda hücre ile sınırlıdır. Daha da

önemlisi, primer hücreler orijinal dokunun özel doku metabolizmalarını yansıttığı halde çok çeşitlilik gösterirler, örneğin proliferasyon aktivitesi yaşa bağlıdır, konağın yaşı, kaynağı veya pasaj numarası ile açıklanamaz (Pinzon ve ark 1966, Moule ve ark, 1995). Primer hücreler birkaç kez sub-kültür yapıldıktan sonra yaşlanır (Hayflick ve Moorhead, 1961), bu yüzden hücre kültürü deneylerinde primer hücrelerin kullanımı sınırlıdır.

Primer hücrelerin yaşlanması proliferasyonun azalması, stoplazmanın genişlemesi ve sonuç olarak ölüm ile karakterizedir. Ancak çeşitli protokoller hücre yaşlanmasını geciktirebilir ve hücre daha fazla pasajlanabilir. Genellikle, memeli hücreleri *in vitro* olarak sınırlı sayıda üretilebilirler (Hayflick ve Moorhead 1961). Ancak, kemirgen hücrelerinin, 10^5 - 10^6 kez üreyebildikleri gözlenmiştir (McCormick ve Campisi 1991). Kemirgen hücrelerinin spontan defalarca üretilebildiğinden yola çıkarak Simian Virus 40 large t antijeni, HPV E6/E7 ve adenovirüs E1B gibi farklı ajanlarla memeli hücreleri de immortal hale getirilmiştir (Bryan ve Reddel 1994). Fare odontoblastları ısıya hassas SV40 Large t antijeni kullanılarak immortal hale getirilmiştir (MacDougall ve ark 1995). Thonemann ve Schmalz (2000) sığır pulpa hücrelerini ve Galler ve arkadaşları (2006) insan pulpa hücrelerini SV40 Large t antijeni ile transfekte ederek immortal hale getirerek, *in vitro* çalışmalarda kullanılabilir hale getirmişlerdir.

Sitotoksikite testleri

İnsanlardan ve hayvanlardan derive edilmiş hücre kültürleri maddelerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Direk maddelerin veya maddelerin ekstraktlarının sitotoksik etkilerini araştırmada çeşitli “biyolojik hücre ölümleri/endpoint” kullanılır:

- Çeşitli enzim aktiviteleri değerlendirilmesi (Annunziata 2006),
- Membran geçirgenliğinin ve hücre metabolizmasının incelenmesi (DNA, RNA ve protein sentezi) (Heil ve ark 1996, Schweikl ve ark 2005, Kuşdemir 2007),
- Işık veya elektron mikroskobu ile hücre morfolojisinin incelenmesi (Schweikl ve ark 2005, Saw ve ark 2005, Şen 2005),

- Hücre gelişiminin, sayısının incelenmesi gibi değerlendirmelerle sitotoksosite değerlendirilir (Geurtsen 1988, Geurtsen ve Leyhausen 1997).

Membran geçirgenliği ve değişiklikleri, canlı hücrelerde depolanan ve membran hasar gördüğünde dışarı salınan nötral kırmızı veya ölü hücreleri boyayabilen tripan mavisi gibi boyalarla belirlenmektedir (Schmalz 1981a).

Hücre aktivitesini belirlemeye yönelik test sistemleri, hücrelerin turn-over hızına dayanır. Bir enzim veya bir grup enzimin aktivitesi veya diğer maddelerin ölçülmesi ile değerlendirme yapılmaktadır (Schmalz ve ark 1994). Dental materyallerin sitotoksosite değerlendirmelerinde sıkça kullanılan mitokondri dehidrojenaz aktivitesini ölçmeye yönelik MTT değerlendirmeleri (Keiser ve ark 2000) ve fluoresein diasetat ile non spesifik hidrolazların ölçülmesine yönelik değerlendirmeler hücre aktivitesini belirleyen testlere örnek olarak verilebilir (Schmalz ve Schweikl 1990). Ayrıca hücre canlılığının değerlendirilmesinde fiske edilmiş canlı hücrelerin duvarını boyayan Kristal Viyolet testi kullanılmaktadır (Gilles ve ark 1986). Hücresel hasarın belirlenmesinde kullanılan en eski ve en çok kullanılan metotlardan biri de hücre proliferasyon oranlarının ölçülmesidir, direk hücre sayımı kolaydır ve canlı boyama ile kombine edilebilir (Schmalz 1981b).

Hücre/Materyal kontak testleri

Klinik ortamda, dolgu maddeleri, simanlar ve adezivler gibi dental materyaller dişeti ve dentin yoluyla veya direk pulpa ile kontakta olabilir. Hücre/materyal kontak testlerinde; direkt veya indirekt yolla materyalin kendisi veya materyal yapısından salınan bileşenleri hücre kültürleri ile kontağı sağlanmaktadır. Direkt kontak testlerinde, hücreler materyalin yanında veya üzerinde büyürlerken (Cao ve ark 2005), indirekt kontak testlerinde, materyal ve hücreler arasında bir bariyer bulunmaktadır (Schmalz 1988). Hücre-materyal temasını sağlamanın diğer bir yolu ise, dental materyal örneklerinin kültür ortamında bekletilmesi ve sitotoksosite testlerinde materyalin kendisi yerine bu sıvıların kullanılmasıdır (Annunziata 2006).

Ağız ortamında, materyal ve pulpa dokusu arasında hidrofobik monomerlerin pulpaya geçişini önleyen bir dentin bariyer mevcuttur. İndirekt hücre-materyal kontağı testlerinde ise agar, agaroz (Schmalz; 1988) ve selüloz asetat filtre (Schmalz ve ark, 1994) gibi bariyerler kullanılmıştır. Böylece, hücreler bakteriyel kontaminasyon veya mekanik hasardan korunurken, dolgu maddeleri ile hücreleri birbirinden ayrılabilir (Schmalz, 1994). Ancak, bu tür bariyerlerin tam olarak *in vivo* koşulları taklit edemeyeceğini bildiren görüşler de mevcuttur (Schmalz 1981a, Schmalz ve ark 1994).

In vitro ortamda oluşturulan yapay pulpa odalarında test materyali ile hedef hücreler arasında bir difüzyon veya adsorpsiyon bariyeri olarak dentin kullanılmaktadır. Dentin kesitleri insan üçüncü büyük azı dışından veya preslenmiş dentin tozu talaşlarından elde edilebilir (Tyas 1977, Meryon 1984, Hume 1988, Hanks 1989). Ancak standart insan dişinin yeterli sayıda bulunamadığı ve dişlerden alınan kesitlerde hidrolik geçirgenlik açısından önemli farklar olduğu rapor edilmiştir (Pashley ve ark 1987). Preslenmiş dentin talaşlarının ise doğal dentinin anatomik yapısıyla uyuşmadığı iddia edilmektedir (Schmalz 1994). Bir alternatif olarak, *in vitro* dentin bariyer testlerinde sığır dentin disklerini kullanılmaya başlanmıştır. Hücrelerin bu disklerin üzerinde gelişmesi ve hidrolik geçirgenlik açısından insan dentini ile benzer olması; her zaman istenilen miktarda bulunabilmesi ve insan dentinine göre geçirgenlik özelliklerinin daha az varyasyon göstermesi sığır dentininin avantajları arasında sayılmaktadır (Schmalz ve ark 1994).

Hücre materyal temasının sağlanmasında bir diğer alternatif, materyallerden salınan bileşenlerin kullanımudur. Bu salınan maddeler, sitotoksikite değerlendirme testlerinde materyalin kendisi yerine kullanılabilir (Annunziata 2006). Bu yaklaşımla, materyalin hem direkt temasında, hem de hücrelerden uzakta meydana getireceği etkiler belirlenebilmektedir (Keiser ve ark 2000).

Basit bariyer sistemi olan agar/agaroz ve selüloz asetat filtrelerin dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde birinci adım olduğu, ikinci adımda daha iyi değerlendirme amacı ile yapıdan salınan bileşenlerin kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Schmalz 1988).

Genotoksisite/Mutajenite ve karsinojenitenin değerlendirilmesi

Genotoksisite ve karsinojenite maddelerin sistemik uyumluluğunu değerlendirmede önemli parametrelerdir. Kanserojen (ya da karsinojen) kansere yol açan, mutajen mutasyona yani DNA'da herhangi bir değişikliğe neden olan anlamına gelmektedir. Genler üzerinde toksik etkisi olan kimyasal maddeler ise genotoksik olarak tanımlanmaktadır (Leyhausen ve ark 1995).

Kromozom tekniklerinin gelişmesinden sonra kimyasalların genotoksik etkileri de incelenmeye başlanmıştır. Günümüzde genetik laboratuvarlarında pek çok kimyasalın genotoksik etkileri üzerine araştırmalar yapılmaktadır (Schweikl ve ark 2002).

Kromozom anormalliklerinin oluşumuyla ilgili çeşitli görüşler bulunmaktadır. Temel olarak anormallikler ayrı mekanizmalarla oluşan DNA kırıkları sonucu meydana gelmektedir. Kimyasal maddelerin yapısında bulunan çeşitli gruplar (Örneğin TEGDMA ve HEMA), DNA yapısındaki kısımlara bağlanarak DNA'nın fiziksel ve kimyasal yapısını etkilemektedir (Schweikl ve ark 2001).

Genotoksisiteyi değerlendirmek için kullanılan bakteriyel bir deneye örnek olarak klasik Ames testleri verilebilir (Bloching ve ark 2007). Tercih edilen diğer testler kromozomal anomali testi, the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase Testi (HPRT), kardeş kromatid değişimi ve DNA sentezi inhibisyonu deneyleridir (DNA synthesis inhibition test - DIT) (Geurtsen ve Leyhausen 1997, Schweikl ve Schmalz 1999).

1.3.2. Hayvan Deneyleri (ikincil testler)

Bir memeli organizması kullanılarak, materyal ile biyolojik ortam arasında oluşan kompleks ilişkilerin test edilmesi sağlanır. Denenecek olan materyal fare, rat, köpek, kedi, koyun, tavşan veya maymun gibi deney hayvanları kullanılır. Böylece biyolojik cevap *in vitro* testlere göre daha anlamlı ve kompleks bir şekilde belirlenmiş olur. İkincil testler, bağ dokusu veya kemik dokuya implantasyon, oral mukoz membran irritasyon testleri ve sensitizasyon testlerini içermektedir (Hensten-Pettersen, 1988). Ancak hayvan deneylerinde değişkenleri kontrol etmek zordur, uzun sürer, pahalıdır ve etik açıdan bilim çevrelerinde tartışmalara konu olmaktadır.

Ek olarak, insanlar ile hayvanlar arasındaki biyolojik cevabın benzerliği tartışmalı bir konudur (Schmalz 1999).

1.3.3. İnsanlarda Klinik Çalışmalar

Laboratuar ve hayvan deneylerinde güvenilir bulunan materyalin insanlarda klinik olarak kullanılması hedeflenen alana yerleştirilmesi sonrasında, materyale verilen cevapların gözlenmesi esasına dayanmaktadır (Souza Costa 2006). Materyallerin klinik kullanım ve reaksiyonlar açısından değerlendirilmesine yardımcı olur. Materyal gönüllü bir insana yerleştirilir. En gerçek cevap alınan biyoyumluluk testidir ancak çok pahalı, uzun zaman alan, kontrolü zor, yorumlaması zor ve etik açıdan tartışmalı olan testlerdir.

İnsanlarda pulpa çalışmaları spesifik lokal reaksiyonları değerlendirmek için yapılmaktadır. Bu amaçla genellikle ortodontik amaçla çekilecek dişlerden faydalanılır. Ancak insan deneylerinde özellikle çocukların ve ergenlerin kullanılması etik açıdan doğru bulunmamaktadır. Bu konuda insanları içeren çok az pulpa çalışması bulunmaktadır (Goracci ve ark 1995, Costa 2006, Çobanoğlu 2006). Maddelerin *in vivo* toksisitesini çeşitli faktörler etkiler; kişisel faktörler, dentinin yapısı, çürük lezyonunun durumu, bakteriyel proliferasyon, dolgu ile kavite duvarı arasındaki aralık gibi (Eriksen ve Leidal 1979; Torstenson ve ark 1982). *In vivo* olarak standart bir test gerçekleştirebilmek zordur, sonuçlar çeşitli pulpa çalışmaları ile karşılaştırılmalıdır (Geurtsen 2000).

Maddelerin biyolojik davranışlarını, özellikle uzun dönem biyoyumluluklarını belirlemede, final değerlendirme olan klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu klinik çalışmalar, *in vitro* ve pre-klinik çalışmalarda biyoyumluluğu kanıtlanmış maddelerde yapılmalıdır. Klinik çalışmalarda çeşitli biyolojik parametreler; pulpa reaksiyonları, gingiva ve periodonsiyum ile biyoyumluluk, oral mukozada irritasyon ve plak oluşumu gibi parametreler değerlendirilebilir (Dunkin ve Chambers 1983, Geurtsen ve Schoeler 1997).

1.4. Rezin Esaslı Materyallerin Biyoyumluluğunun Değerlendirilmesi

Klinik olarak uygulanmadan önce her rezin esaslı restoratif materyal biyoyumluluk açısından çeşitli standardize testlerle değerlendirilmelidir (Geurtsen

2000). Günümüzde uluslar arası standart organizasyonu “Medikal Malzemelerin Biyolojik Değerlendirilmesi” için *in vivo* ve *in vitro* çeşitli testler önermiştir (ISO, Geneve, Switzerland, 1992-1997). Standartlar örnekler hazırlanarak sitotoksosite, genotoksosite, karsinojenite ve reproduktif toksisite testleri kadar implantasyon, irritasyon, sensitizasyon ve sistemik toksisite sonrası lokal reaksiyonları da değerlendirir. Ayrıca, prelinik ve klinik değerlendirme kadar risk analizleri ve risk değerlendirmelerini de tanımlarlar (Schmalz, 1997).

Rezin esaslı materyaller diş yapılarına bağlanma özelliği ile dişhekimliği alanında yeni restoratif tekniklerin kullanımına izin verir. Bu materyallerin klinik başarısı, materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve aynı zamanda biyolojik güvenilirliklerine bağlıdır. Kötü biyolojik reaksiyonların büyük bir çoğunluğunun kaynağının dental rezin materyallerin organik matriksi olduğu bildirilmiştir (Schmalz 1998, Geurtsen 2000, Ortengren 2000, Goldberg ve Smith 2004, Bouillaguet 2004). Rezin esaslı maddelerden salınan bileşenler, sıklıkla epoksi rezinler ve akrilik monomerlerdir. Bu maddelere bağlı olarak dişhekimliğinde çalışan personelde işe bağlı yan etkiler mesela, alerjik veya irritant kontak dermatitis sıklıkla bildirilmektedir (Kanerva ve ark 1994, Kanerva 2001, Alanko ve ark 2004). Bu salınan maddeler pulpa, diş eti, ağız mukozası gibi ağız dokularında lokal veya sistemik reaksiyonlar oluşturabilir. Bu reaksiyonlar alerjik veya toksik olarak adlandırılır (Hume ve Gerzina 1996).

Rezin esaslı dental materyallerden komponentlerin salınımı genellikle iki mekanizma ile oluşur. İlki polimerizasyondan sonra kalan sertleşmemiş monomerlerin özellikle ilk 24 saat içinde oral sıvılarda veya alınan diyet ürünlerinde çözünen maddelerdir. İkincisi ise zamanla degradasyon ve erozyon sonucu oluşan salınımlardır (Ferracane 1994,1995, Geurtsen 1998)

Işık, ısı, mekanik veya kimyasal etkiler rezinlerde degradasyon ve erozyona sebep olur. Örneğin tükürük esterazları kompozitlerin yüzeyinde degradasyona sebep olarak, metakrilik ürünlerinin serbest kalmasına sebep olur (Gopferich 1996). Matriks monomerlerin yapısı salınan komponentler sebebiyle önemli derecede etkilenir (Pearson ve Longman 1989)

Çeşitli çalışmalarda kompozitlerden en çok salınan komponentlerin HEMA ve TEGDMA olduğu tespit edilmiştir (Santerre ve ark 2001, Michelsen ve ark 2003). HEMA ve TEGDMA çok yüksek konsantrasyonda olursa dentinden difüze olarak pulpada hücre hasarına yol açabilir (Bouillaguet ve ark 1996, Hume ve Gerzina, 1996). Dentin adezivlerden salınan HEMA pulpa içerisinde 1,5-8 mmol/L kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. Aynı şekilde, derin kavitelere difüzyondan sonra pulpaya ulaşan TEGDMA konsantrasyonu 4 mmol/L'e kadar olabilir (Bouillaguet ve ark 1996, Noda ve ark 2002). Bu konsantrasyonlar, normal enflamatuvar cevabın değişikliği veya pulpal dokuların homeostasis, stabil hücresel redoks dengesinin bozulması ve redoks ile ilişkili yolların bozulması gibi zararlı etkileri oluşturacak kadar yüksek olabilir (Schweikl 2006).

Rezin esaslı dental restoratif materyallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla insan ve hayvanlardan derive edilmiş hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu amaçla primer hücreler ve oral dokulardan derive edilmiş hücreler kullanılmaktadır (Ratanasathien ve ark 1995, Geurtsen ve ark 1998). Bu araştırmalarda hücre membranının hasarı, enzim aktivitelerinin veya protein, RNA ve DNA sentezinin inhibisyonu veya sadece tedaviden sonra yaşayan hücrelerin sayısını hesaplamak gibi temel hücre fonksiyonundaki değişiklikler incelenmektedir (Hanks ve ark 1991, Wataha ve ark 1999, Geurtsen 2000, Schweikl ve ark 2005). Rezin esaslı maddelerin her bir bileşiğinin tanımlanması hücresel yapılar ile ilişkisi önemli bir konudur. Öncelikle, bu kompleks materyallerin sitotoksik komponentleri olan major monomerler ve ko-monomerler tanımlanmalı ve yapı ve biyolojik aktivitelerle ilgili ilişkileri belirlenmelidir (Hanks ve ark 1991, Yoshii 1997). Ancak, rezin monomerlerin genetik ve sellüler toksisitesinin temelinde bulunan moleküler ve sellüler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Son zamanlarda, rezin monomerler, reaktif oksijen ürünlerinin (Reaktive Oxygen Species - ROS) seviyesinin artmasıyla ve ardından apoptosis yoluyla oluşan hücre ölümleri ile sonuçlanan, stabil sellüler redoks dengesini bozan kimyasallar olarak tanımlanmaktadır (Schweikl ve ark 2006). Ayrıca, ROS seviyesinin yükselmesi genotoksik etkilerin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülen mekanizmalardandır. Schweikl ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada TEGDMA ve HEMA'nın genotoksik etkileri gösterilmiştir. Modern ışıkla sertleşen dental rezin sistemlerde en

sık kullanılan reaksiyon başlatıcı kamforokinondur ve bu bileşik reaktif oksijen ürünleri oluşumundan sorumludur (Pagoria ve ark 2005, Winter ve ark 2005).

DNA, endojen ve eksojen ROS, ultra viole (uv) ışınlar, radyasyon ve kemoterapötik maddeler için hedef moleküldür (Schweickl ve ark 2006). Bu genotoksik ajanlar DNA hasarına sebep olan çeşitli lezyonlar oluşturur. Hücre siklusundaki defektler genom bütünlüğü için zararlıdır, çünkü gen mutasyonları veya kromozomal hasarlar gibi irreversible hücre hasarları oluşabilir (Shackelford ve ark 1999).

Dental materyaller ve bileşenlerinin *in vitro* düzeyde dokular ve hücrelerde meydana getirebileceği zararların belirlenmesi klinik açıdan önemlidir (Schmalz 2002, Geurtsen 2003). Rezin monomerlerin hücresel toksikolojisinin analizindeki gelişmeler ağız içi dokuları için risk faktörlerinin açıklanmasında katkı sağlamaktadır. Klinik açıdan dentinden monomerlerin difüzyonu, kalan dentin kalınlığı ve dentin geçirgenliği gibi durumların hücresel toksikoloji sonuçlarından farklı sonuçlar oluşmasına sebep olabileceği gösterilmiştir (Hume ve Gerzina, 1996, Mjör ve Ferrari, 2002).

Mendoça ve ark (2007) iki rezin siman (Rely X Luting ve Rely X Unicem), bir cam iyonomer esaslı siman (Vitrebond) ve kalsiyum hidroksit materyallerini kullanarak MDPC-23 hücrelerinde yaptıkları *in vitro* sitotoksikite çalışmasında 24 saat materyal ekstraktına maruz kalan hücreler üzerinde en sitotoksik olan simanların kalsiyum hidroksit ve vitrebond olduğu ve sırasıyla hücre canlılığını % 91 ve % 81 azalttıkları tespit edilmiştir. Rely X Luting grubunda ise hücre canlılığı % 78 azalmıştır. Test edilen materyaller içerisinde en az toksik olan materyalin Rely X Unicem olduğu, hücre canlılığını sadece % 2,64 azalttığı tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak negatif kontrol grubu (%100 canlılık) ile arasında fark bulunmamıştır. Yedi günlük ekspozda ise self etch rezin siman olan Rely X Unicem hücre canlılığını % 10,51 azalttığı ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farkın önemli olduğu tespit edilmiştir. Diğer grupların ise 7 günlük bulgularının 24 saat ekspoz süresi bulguları ile benzer olduğu kaydedilmiştir.

Costa ve ark (2006) inley restorasyonları yapıştırma da kullanılan rezin simanlara insan pulpa cevabını değerlendiren bir *in vivo* histoloji çalışması

yapmışlar. Bu çalışmada Rely X Unicem ve Variolink rezin simanları kullanarak inley restorasyonlar premolar dişlerde açılan kavitelere simante edilmiş ve dişler 7 veya 60 gün sonra çekilerek histolojik kesitler alınarak bulgular değerlendirilmiş. Yedi gün sonra çekilen dişlerde her iki grupta orta derecede enflamatuvar cevap olduğu, altmış gün sonra ise pulpal cevabın azaldığı, kalan dentin kalınlığının 300 µ'dan az olduğu gruplarda enflamatuvar cevabın daha çok gözlemlendiği belirtilmiştir.

Daha önce yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalar, polimerize olmamış bileşenlerin rezin esaslı materyallerden salınarak hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkiler oluşturdukları (Geurtsen ve ark 1999, Annunziata ve ark 2006, Şengün ve ark 2006, Demirci ve ark 2008), ek olarak insan dişinde gerçekleştirilen pek çok *in vivo* çalışmada rezin monomerlerden salınan bileşenlerin önemli enflamatuvar cevap oluşturduğu gösterilmiştir (Tay ve ark 1994, Hebling ve ark 1999, Costa ve ark 2002, 2003, 2006, Çobanoğlu 2007). Resin esaslı materyallerden HEMA ve TEGDMA gibi bileşenlerin salınması sonucu ROS üretimi ile hücresel stres oluşur. Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda ROS üretimi ile sitotoksik aktivite arasında bir ilişki olabileceği gösterilmiştir (Atsumi ve ark 2001, Spagnuolo ve ark 2004a, 2004b, 2006, Schweikl ve ark 2007). Bu araştırmada, kompozit rezin simanlara karşı çeşitli hücre cevapları analiz edildi. İlk olarak, kompozit rezin simanlardan salınan biyolojik olarak aktif monomerler tek sıralı hücre deneylerinde(direk kontak testlerinde) hücreler için sitotoksik olabilir. İkinci olarak, Reaktif oksijen ürünleri üretimi apoptozis yoluyla hücre ölümüne sebep olabilir, bunlara ek olarak direk dentin üzerine uygulanan kompozit rezin simanların pulpa ile biyouyumlu olması gerekmektedir. Çalışmamızın hipotezi, kompozit rezin simanların dentin bariyeri varlığında pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olmadığıdır.

Test edilen materyaller farklı sitotoksisite testlerinde farklı sonuçlar verebildiği literatürde izlendiği için bu çalışmada üç farklı sitotoksisite testi kullanıldı. Monolayer testlerin uygulanması daha kolay ve nispeten hızlı olduğu için bu çalışmada materyaller hakkında genel bir bilgi edinmek için önce kristal viyole testi kullanıldı. Sitotoksisitenin mekanizmasını açıklayabilmenin bir yolu olan ROS üretiminin oluşan sitotoksisiteler ile ilişkisi değerlendirildi. Son olarak monolayer kültürlerde materyaller sitotoksik bulunsalar da klinik çalışmalarda bu materyallerin

biyoyuyumlu oldukları yani *in vitro* çalışma sonuçlarının klinik duruma bütünüyle aktarılamayacağı iddia edilmektedir.

Bu çalışmada esas olarak monolayer kültürlerde sitotoksik oldukları tespit edilen materyallerin bir dentin bariyeri varlığında ve pulpayı taklit eden üç boyutlu bir hücre kültürü ve kan akımını taklit eden besi ortamı perfüzyonunda halen sitotoksik etki gösterip göstermeyecekleri test edilecektir.

Diş hekimliğinde yaygın kullanım alanı olan ve yeni geliştirilen 5 self etch kompozit rezin simanın sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak kompozit rezin simanların sitotoksik etkileri insan ve sığır pulpa hücrelerinin monolayer kültürlerinde kristal viyole testi ile materyalden salınan maddelerin toksik etkisi incelendi.

İkinci olarak sitotoksitenin önemli bir mekanizması olan Reaktif Oksijen Ürünleri araştırıldı. Bu iki sitotoksiste testinde hem insan hem sığır pulpa hücreleri kullanıldı ve karşılaştırıldı.

Son olarak, kompozit rezin simanların sitotoksitesi *in vivo* durumu günümüzde gerçeğine en yakın şekilde taklit edebildiği literatürde tespit edilen, dentin bariyer düzeneğinde üç boyutlu hücre kültürleri kullanılarak değerlendirildi.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada kompozit rezin simanların sitotoksik etkileri üç aşamada değerlendirildi:

- Kristal Viyole Testi
- Reaktif Oksijen Ürünlerinin Belirlenmesi
- Dentin Bariyer Testi

Çalışmanın Kristal viyole testleri ve Reaktif Oksijen Ürünlerini belirleme testleri Almanya, Regensburg Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu deneylerde Kristal viyole ve ROS üretimi testlerinde insan (Galler ve ark 2006) ve sığır (Thonemann ve Schmalz 2000) diş pulpasından izole edilip, SV 40 large T-antijeni ile transfekte edilmiş pulpa hücreleri, dentin bariyer testlerinde ise sadece sığır pulpa hücreleri kullanıldı. Dentin bariyer testleri ise Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.1. İnsan ve Sığır Pulpalarından Derive Edilmiş Hücre Kültürleri

Sığır pulpa hücreleri % 20'lik fetal bovine serumu* (FBS), 150 IU/ml penisilin/streptomisin** ve 0,1 mg/ml geneticin*** içeren MEM α **** (Minimum Essential Medium Eagle Alpha) içinde %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edildi. Sığır pulpa hücrelerinin subkültürlerinin hazırlanması için 162 cm²'lik hücre kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı aspire edildi. Serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 5 ml kalsiyumsuz, Magnezyumsuz Phosphate Buffered Saline (CMF-PBS) ile yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 3 ml % 0,25 Trypsin/EDTA ilave edilerek 5 dk inkübatörde bekletildi. Tripsin etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra tripsinin etkisini durdurmak amacıyla, ortama 10 ml serum içeren kültür ortamı ilave edildi. Daha sonra hücreler steril bir tüp içerisine toplandı ve santrifüj edildi (Resim 2.1.2).

*Fetal Bovine Serum, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Almanya

**Penicilin/Streptomisin, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Almanya

***Geneticin, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Almanya

****Minimum Essential Medium Eagle Alpha, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Almanya



Resim 2.1.1. Hücrelerin incelenmesinde kullanılan inverted mikroskop*.



Resim 2.1.2. Hücre süspansiyonunun santrifüj edilmesinde kullanılan santrifüj cihazı**.

Daha sonra kültür ortamı ile hücreler süspanse edilip yeni bir hücre kültür kabına alındı (Resim 2.1.3). Hücre kültürlerinin devam edebilmesi için 2 günde bir kültür ortamları değiştirildi. Çalışmada 19-25. pasajdaki hücreler kullanıldı.

*Rotanta 460 R, Hettich, Almanya

**Leica, Wetzlar, Almanya

İnsan pulpa hücreleri de yine % 10'luk fetal bovine serumu, 150 IU/ml penisilin/streptomisin ve 0,1 mg/ml geneticin içeren MEM α içinde %5 CO₂'li ortamda, 37°C'de inkübe edilmiştir. İnsan pulpa hücrelerinin subkültürlerinin hazırlanması için hücre kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı aspire edildi ve serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 3 ml CMF-PBS ile yıkandı ve aspire edildi. Ardından hücrelerin üzerine 2 ml Akütaz* ilave edilerek 5 dk inkubatörde** bekletildi. Akütaz etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra Akütaz'ın etkisini durdurmak amacıyla, ortama 10 ml serum içeren MEM α ilave edildi. Daha sonra hücreler steril bir tüp içerisine toplandı ve santrifüj edilerek enzimler uzaklaştırıldı. Daha sonra kültür ortamı ile hücreler süspanse edilip 75 cm²'lik hücre kültür kabına*** alındı (Resim 2.1.4). Kap üzerine hücre adı, tarih ve pasaj numarası yazılarak inkubatöre kaldırıldı. Hücre kültürlerinin devam edebilmesi için 2 günde bir kültür ortamı değiştirildi. Çalışmada 23-35. pasajdaki hücreler kullanıldı.



Resim 2.1.3. Sığır pulpa hücreleri için kullanılan 162 cm² hücre kültürü kabı.



Resim 2.1.4. İnsan pulpa hücreleri için kullanılan 75 cm² hücre kültürü kabı.

* Accutase, PAA laboratories GmbH, Cölbe, Almanya

**Begasungbruschrack, Heraeus Instruments, Hanau Almanya

*** Corning 162cm² cell culture flask, NY, ABD

2.2. Test Materyalleri, Kristal Viyole ve ROS Deneyleri için Materyal Ekstraktlarının Hazırlanması

Bu çalışmada diş sert dokularına self etch olarak bağlanabilen 5 farklı dual-cure KRS kullanıldı (Çizelge 2.2.1). Araştırmada materyaller üretici firmanın talimatları doğrultusunda steril ortamda (Resim 2.2.1) 5mm çapında, 2,5 mm kalınlığında standart teflon halkalar içinde hazırlandı (Resim 2.2.2). Örneklerin polimerizasyonu için 780mW/cm^2 gücünde halojen polimerizasyon cihazı* kullanıldı (Resim 2.2.3).

*Halogen Light Curing Unit, Dentsply, PA, ABD

Çizelge 2.2.1 Kullanılan kompozit rezin simanların üretim numaraları, üretici firmaları ve içerikleri

Rezin Simanlar	Üretim Numaraları	Üretici	Yapısı	İçeriği
Rely X Unicem Clicker	279830	3M ESPE, Seefeld, Almanya	Base, Katalist	Toz: silanized glass powder, silanized silica, calcium hydroxide, substituted pyrimidine, sodium persulfate Likit: methacrylated phosphoric acid esters, triethylene glycol dimethacrylate, substituted dimethacrylate
Maxcem	2712954	Kerr, Orange, CA, ABD	Pasta / Pasta	Rezin Matriks: Glyceroldimethacrylate dihydrogen phosphate (GPDM) –self-etching/self-adhering acidic monomer, Comonomers including mono-, di-, and tri-functional methacrylate monomers, Proprietary self-cure redox initiator, Photoinitiator, Stabilizer Doldurucular: Barium glass filler, Fluoroaluminosilicate glass filler, Fumed silica
Panavia F 2.0	Pasta A: 00185A Pasta B: 00027A	Kuraray, Okuyama, Japonya	Pasta A, Pasta B	Pasta A: Silica, Dibenzoyl peroxide Pasta B: Silanated Barium Glass, silanated titanium oxide, sodium fluoride, colloidal silica, bisphenol A, polyethoxy dimethacrylate, hydrophilic dimethacrylate, hydrophobic dimethacrylate, N,N'-diethanol-P-toluidine, sodium 2,4,6-triisopropyl benzene sulfonat
BisCem	0700004155	Bisco, Schaumburg, IL, ABD	Base, Katalist	Bis(Hydroxyethyl methacrylate) phosphate (Base), Tetraethylene glycol dimethacrylate, Dental Glass
Bistite II DC	50R-90C	Tokuyama Dental Corporation, Tokyo, Japonya	Pasta A, Pasta B	Doldurucu: Silica Zirconia Matriks: Dimethacrylate, MAC-10 (adhesive promoter), initiator



Resim 2.2.1 Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril ortam.



Resim 2.2.2 Standart materyal örnekleri elde etmek amacı ile hazırlanan teflon halkalar.



Resim 2.2.3 Materyallerin polimerizasyonunda kullanılan ışık cihazı.

Rely X Unicem Clicker, eşit miktarda base ve katalist karıştırma kâğıdı üzerine konuldu. Base ve katalist 20 sn boyunca plastik bir spatula ile karıştırıldı ve bir enjektörün içine taşındı. Bir siman camı üzerine yerleştirilen teflon disk içine enjekte edildi, artık simanlar temizlendi. Her iki taraftan 40 sn ışık ile muamele edildi ve 5 dk polimerizasyonun tamamlanması için beklendi (Resim 2.2.4).



Resim 2.2.4 Rely X Unicem Cilcker.

Maxcem^{**}, otomiks şırıngası kullanılarak pat direkt olarak bir siman camı üzerine yerleştirilen teflon disk içine enjekte edildi, artık simanlar temizlendi. Her iki taraftan 40 sn ışık ile muamele edildi ve 5 dk polimerizasyonun tamamlanması için beklendi (Resim 2.2.5).



Resim 2.2.5 Maxcem.

Panavia F 2.0^{***}, eşit miktarda base ve katalist elde edildi. Base ve katalist 20 sn boyunca plastik bir spatula ile karıştırıldı ve bir enjektörün içine taşındı. Bir siman camı üzerine yerleştirilen teflon disk içine enjekte edildi, artık simanlar temizlendi. Her iki taraftan 40 sn ışık ile muamele edildi ve 5 dk polimerizasyonun tamamlanması için beklendi (Resim 2.2.6).

* *Rely X Unicem Cilcker*, 3M ESPE, Seefeld, Almanya

** *Maxcem*, Kerr, Orange, CA, ABD

*** *Panavia F 2.0*, Kuraray, Okuyama, Japonya



Resim 2.2.6 Panavia F 2.0.

BisCem^{*}, otomiks şırıngası kullanılarak pat direkt olarak bir siman camı üzerine yerleştirilen teflon disk içine enjekte edildi, artık simanlar temizlendi. Her iki taraftan 40 sn ışık ile muamele edildi ve 6 dk polimerizasyonun tamamlanması için beklendi (Resim 2.2.7).



Resim 2.2.7 BisCem.

Bistite II DC^{**}, eşit miktarda pat, şırıngası ile karıştırma kâğıdı üzerine sıkıldı. Base ve katalist 10 sn boyunca plastik bir spatula ile karıştırıldı ve bir enjektörün içine taşındı. Bir siman camı üzerine yerleştirilen teflon disk içine enjekte edildi, artık simanlar temizlendi. Her iki taraftan 40 sn ışık ile muamele edildi ve 3 dk polimerizasyonun tamamlanması beklendi (Resim 2.2.8).



Resim 2.2.8 Bistite II DC.

^{*} BisCem, Bisco, Schaumburg, IL, ABD

^{**} Bistite II DC, Tokuyama Dental Corporation, Tokyo, Japonya

2.3. Kristal Viyole Testi

Hücreler kültür kabında yoğunluğu % 80'e ulaştığında deney için kullanıldı. Daha sonra ml'deki hücre sayısı hesaplandı. Sığır pulpa hücrelerinden her yuvacıkta 200 µl kültür ortamı içinde 5×10^3 hücre, insan pulpa hücrelerinden ise her yuvacıkta 200 µl kültür ortamı içinde 8×10^3 hücre içeren hücre süspansiyonu hazırlanarak 96 yuvacıklı hücre kültürü kabına* aktarıldı, üzerine hücre ve materyal adı yazılarak ve 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi.

Kristal violet testi için her materyalden sığır ve insan pulpa hücreleri için ayrı ayrı olmak üzere her bir test için 7'şer adet örnek hazırlandı. Örnekler altı yuvalı bir hücre kültür kabı içine yerleştirilen filtreler** içerisinde 24 saat, sığır hücreleri için % 20 serum içeren, insan hücreleri için % 10 serum içeren 3ml kültür ortamında saklandı, steril tüpler içine alındı ve bu stok solüsyonundan (1:1) kültür ortamı ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 konsantrasyonunda ekstraktlar hazırlandı (Resim 2.3..1–2–3).



Resim 2.3.1 Materyal örneklerinin kültür ortamı ile muamelesi.



Resim 2.3.2 Materyal ekstraktı içeren besi ortamlarının steril tüpler içine toplanması.

*96 Well Plate Corning, NY, ABD

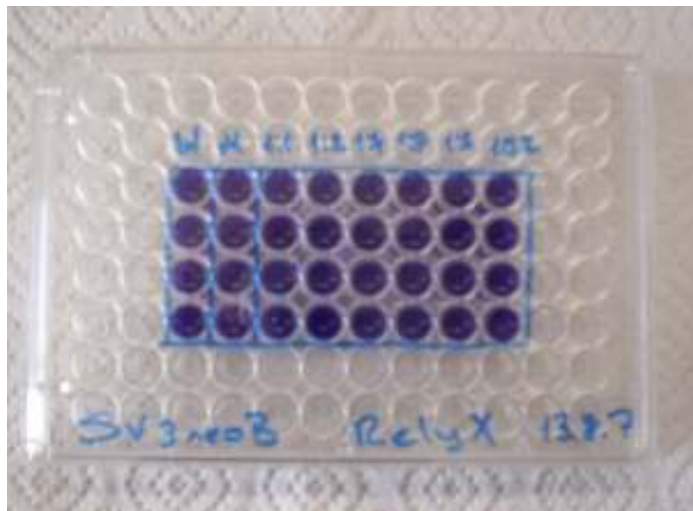
**Cell Culture Insert, Millicell, Millipore, ABD



Resim 2.3.3 Materyal ekstraktı içeren orijinal kültür ortamından konsantrasyonların hazırlanması.

Hücre kültürlerinin kültür ortamı 24 saat sonra uzaklaştırılarak her konsantrasyondan 200 µl materyal ekstraktı içeren kültür ortamı ilave edildi. Negatif kontrol grubu olarak hücrelere sadece serum içeren kültür ortamı ilave edildi.

- Kristal violet testi için 24 saat inkubasyon sonunda hücreler üzerinden materyal ekstraktı içeren besi ortamları uzaklaştırıldı.
- Artık partikülleri uzaklaştırmak amacıyla 200 µl CMF-PBS ile hücreler yıkandı.
- Hücreleri fikse etmek amacıyla her yuvacığa 100 µl %1 gluterdialdehid ilave edildi, 30 dk oda ısısında bekletildi.
- Fiksasyondan sonra 200 µl CMF-PBS ile hücreler iki kez yıkandı.
- Her yuvacığa 150 µl % 0,02 Kristal viyole* ilave edildi ve 15 dk oda ısısında bekletildi (Resim 2.3.4).



Resim 2.3.4 Hücreler üzerine kristal viyole boyası ilave edilmesi.

*Crystal Violet, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya

- Daha sonra kristal viyole boyası musluk suyu ile yıkanarak, 10 dk boyunca kurutuldu.
- Kuruduktan sonra her yuvacığa 180 µl %70'lik ethanol ilave edildi, 100 rpm hızındaki çalkalayıcıda 2 saat bekletildi (Resim 2.3.5). Sonuçlar bir fotometre cihazı* ile 600 nm dalga boyunda değerlendirildi (Resim 2.3.6).



Resim 2.3.5 Deney kapları çalkalayıcıda 2 saat bekletilmesi.



Resim 2.3.6 Tecan-Platereader Infinite F200.

* Tecan-Platereader Infinite F200, Crailsheim, Almanya

Her bir materyalin tüm konsantrasyonları için 1 deneyde 4 yuvacık kullanıldı ve 3 bağımsız deney gerçekleştirildi (n=12).

2.3.1. Kristal Viyole Testi İçin İstatistiksel Değerlendirme

Fotometre cihazından alınan sonuçlar Microsoft Office Excel 2003 programında kaydedildi. Pozitif kontrol grubunun canlılık yüzdesi 100'e eşitlendi, tüm grupların canlılık yüzdesi belirlendi. Deney grupları ile kontrol grubu canlılık yüzdeleri arasındaki farklar Mann-Whitney U-testi ($\alpha=0,05$) ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Değerlendirmede;

- Materyallerin tüm konsantrasyonlarında sığır pulpa hücrelerine sitotoksik etkileri.
- Materyallerin tüm konsantrasyonlarında insan pulpa hücrelerine sitotoksik etkileri.
- Materyallerin 1:1 konsantrasyonlarında sığır ve insan pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri karşılaştırıldı.

2.4. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tespit Edilmesi (ROS-Reactive Oxygen Spieces)

Sığır pulpa hücreleri ve insan pulpa hücreleri her yuvacıkta 3 ml kültür ortamı içinde 2×10^5 hücre içeren hücre süspansiyonu hazırlandı ve 6 yuvacıklı hücre kültürü kabına aktarıldı, üzerine hücre ve materyal adı yazılarak ve 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi.

2.4.1. Hücrelerin Materyal Ekstraktları ile Muamele Edilmesi

Reaktif oksijen ürünlerinin tespit edilmesi için her materyalden 14 adet örnek hazırlandı. Her 7 örnek için bir yuvacık kullanılacak şekilde her yuvacıkta bir filtre bulunan 6 yuvacıklı hücre kabına yerleştirildi. Örnekler 24 saat sığır hücreleri için % 20 serum ve insan hücreleri için % 10 serum içeren 3 ml besi ortamlarında bekletildikten sonra steril tüpler içine alındı ve bu stok solüsyonundan (1:1) kültür ortamı ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 konsantrasyonunda ekstraktlar hazırlandı.

Hücre kültürlerinden kültür ortamı 24 saat sonra uzaklaştırılarak her konsantrasyondan 2 ml materyal ekstraktı içeren kültür ortamı yuvacıklara ilave edildi. Her grup için bir 6 yuvacıklı hücre kabı ve her konsantrasyon için bir yuvacık kullanıldı.

Negatif kontrol grubu olarak;

- Sadece serum içeren kültür ortamı verilen, muamele edilmemiş, DCFHDA* (2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) ile boyanmamış hücreler,
- Sadece serum içeren kültür ortamı verilen, muamele edilmemiş, DCFHDA ile boyanmış hücreler kullanıldı.

Pozitif kontrol grubu olarak ise;

- 1µM Triethylene glycol dimethacrylate** (TEG-DMA) içeren kültür ortamı verilen hücreler
- 3 µM TEG-DMA içeren kültür ortamı verilen hücreler kullanıldı.

Materyal ekstraktı uygulamasından sonra 30 dk inkubatörde bekletildi. Daha sonra hücrelere 2 µl (10 mmol/l) DCFHDA eklenerek 37°C'de 30 dk daha bekletildi. Ekspoz süresi 1 saat sonra sona erdi.

2.4.2. Sığır ve İnsan Pulpa Hücrelerinin ROS Üretiminin Belirlenmesi

Bir saat ekspoz süresi sonunda 6 yuvacıklı hücre kabının yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin materyal ekstraktı içeren kültür ortamı uzaklaştırıldı ve serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 1 ml CMF-PBS ile yıkandı. Ardından sığır pulpa hücreleri üzerine 0,5 ml Tripsin, insan pulpa hücreleri üzerine ise 0,5 ml Akütaz ilave edilerek 5 dk inkubatörde bekletildi. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra ortama 1,5 ml serum içeren kültür ortamı ilave edildi ve her bir yuvacıktaki hücreler 5 ml'lik FAC's*** tüpüne toplandı (2.4.2.1). Daha sonra 5 dk 1000 rpm hızda santrifüj edildi. Hücre peleti 2 kez 1 ml CMF-PBS ile yıkandı ve santrifüj edildi ve son olarak 250µl CMF-PBS ilave edildi.

ROS üretimi oksijene hassas fluorescent probu 2_7_-dichlorodihydrofluorescein diacetate kullanılarak belirlendi. İntrasellüler esteraz aktivitesi sonucu DCFH oluşur. DCFH non-florasans bir bileşiktir. Oksidasyona uğradığında DCF-DA'ya dönüşür ve florasans ışığı yayar (Myhre ve ark 2003).

* 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(H₂DCF-DA) Invitrogen Molecular Probes, Karsruhe, Almanya

**TEG-DMA Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya

***FAC's Tube, Corning, NY, ABD.

Florasans 488 nm uyarma dalga boyu ve 519 nm emisyon dalga boyunda flow sitometri cihazı * ile belirlendi (2.4.2.2).



Resim 2.4.2.1 FAC's tüplerinin taşıyıcıya yerleştirilmesi.



Resim 2.4.2.2 ROS üretimi bir oksijene hassas fluorescent probu 2_7_-dichlorodihydrofluorescein diacetate kullanılarak belirlenmesi.

* BD FACSCanto, CA, ABD

2.4.3. ROS Testleri İçin İstatistiksel Değerlendirme

Ortalama floransans değerleri FACs Canto software histogram istatistikleri kullanılarak belirlendi. Her materyal ve tüm konsantrasyonları ile en az 4 bağımsız deney gerçekleştirildi. Ortalama floransans şiddeti “sadece serum içeren kültür ortamı verilen, muamele edilmemiş, boyanmış hücreler”in sonuçları 1’e eşitlendi ve tüm sonuçlar bu faktör 1’e göre değerlendirildi. Kontrol ile deney druplarının ortalama floransans değerleri arasındaki farklar Mann-Whitney U-testi ($\alpha=0,05$) ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Değerlendirmede;

- Sığır pulpa hücrelerinin her materyal ve tüm konsantrasyonlarında oluşturdıkları reaktif oksijen ürünleri
- İnsan pulpa hücrelerinin her materyal ve tüm konsantrasyonlarında oluşturdıkları reaktif oksijen ürünleri
- SV3neoB ve tHPC hücrelerinin tüm materyallerde 1 saatlik ekspoz süresi sonunda ürettikleri reaktif oksijen ürünlerinin karşılaştırılması yapıldı.

İstatistiki analizler SPSS,13.0 (Version 13.0; SPSS, Chicago, IL, USA) ve MS Excel 2003 programları kullanılarak yapıldı.

2.5. Dentin Bariyer Testi

Dentin bariyer testleri Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.5.1. Dentin Disklerinin Hazırlanması

Dentin örnekleri 2-4 yaş arası sığırların keser dişlerinden elde edildi. Dişlerin etrafındaki yumuşak dokular temizlendi ve distile su içerisinde +4°C’de buzdolabında saklandı. Disklerin hazırlanması için sığır dişleri kesit cihazına bağlamak ve kesilmek üzere akrilik içine gömüldü. Dentin diskleri dişin uzun aksına paralel olarak su soğutması altında düşük hızla dönen elmas separe* ile 500±20 µm kalınlığında hazırlandı (Resim 2.5.1.1) ve kalınlıkları dijital mikrometreyle

* Isomet, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA

doğrulandı (Resim 2.5.1.2). Disklerin pulpaya bakan yüzlerinden smear tabakasını uzaklaştırmak için 30 saniye %50'lik sitrik asitle muamele edildi. Diskler 2 kez serum fizyolojikte yıkandıktan sonra otoklavda steril edildi. Dentin bariyer testinde kullanılıncaya kadar +4°C'de serum fizyolojikte bekletildi.



Resim 2.5.1.1-2 Sığır keser dişinden elde edilmesinde kullanılan cihaz, 500±20 µm kalınlığında dentin örnekleri.

2.5.2 Hücrelerin idamesi

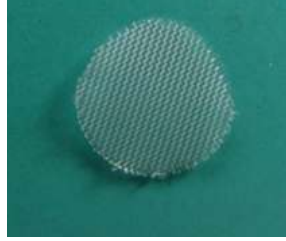
Dentin bariyer testinde kullanılacak olan sığır pulpa hücreleri (Thonemann ve Schmalz 2000) Almanya Regensburg Üniversitesi'nden Prof. Dr. G. Schmalz tarafından gönderildi. Hücreler deneylerde kullanılmak üzere Pasaj 19 ve Pasaj 20'ye kadar % 20'lik FBS, 150 IU/ml penisilin/streptomisin ve 0,1 mg/ml genetikin içeren MEMα ile idame edildi. Hücre kültürlerinin devamlılığını sağlamak amacıyla besi ortamları haftada üç kez değiştirildi (Resim 2.5.2.1).



Resim 2.5.2.1 Hücre kültürü işlemlerinin gerçekleştirildiği steril ortam

2.5.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

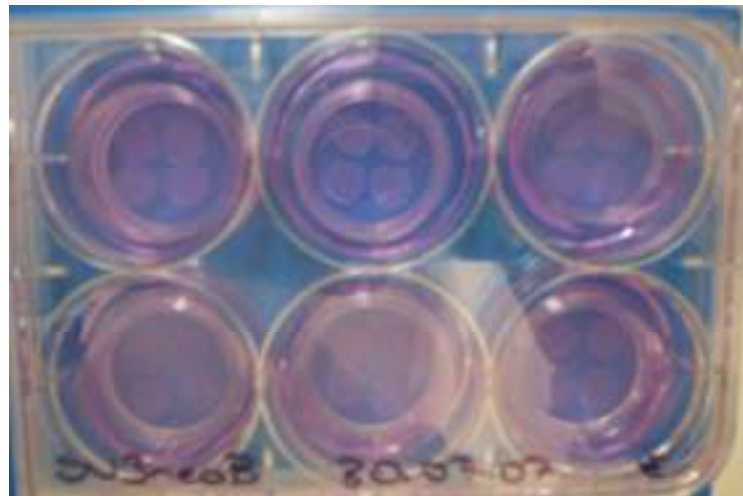
Üç boyutlu hücre kültüründe kullanılacak poliamid meşler* 8 mm çapında kesilerek hazırlandı (Resim 2.5.3.1) ve 0.1 M asetik asit** içinde 30 dakika bekletildikten sonra CMF-PBS ile 3 kez yıkandı ve kağıt peçete üzerinde kurutulduktan sonra otoklav ile steril edildi.



Resim 2.5.3.1 8 mm çapında kesilerek hazırlanmış poliamid meş

Meşler 0.03 mg/ml fibronektin ile kaplandı. Hücre kültürü filtreleri her bir yuva içinde 1.25 ml kültür ortamı (20% FBS içeren MEM α) bulunan altı yuvalı hücre kültürü kabına yerleştirildi. Meşlerin üzerine 25 μ l hücre süspansiyonu (8×10^4 hücre/meş) eklendi (Resim 2.5.3.2). Meşler %5 CO₂'li ortamda ve 37°C de 48 saat inkübasyondan sonra 24 yuvalı hücre kültürü kabına taşındı (Resim 2.5.3.3).

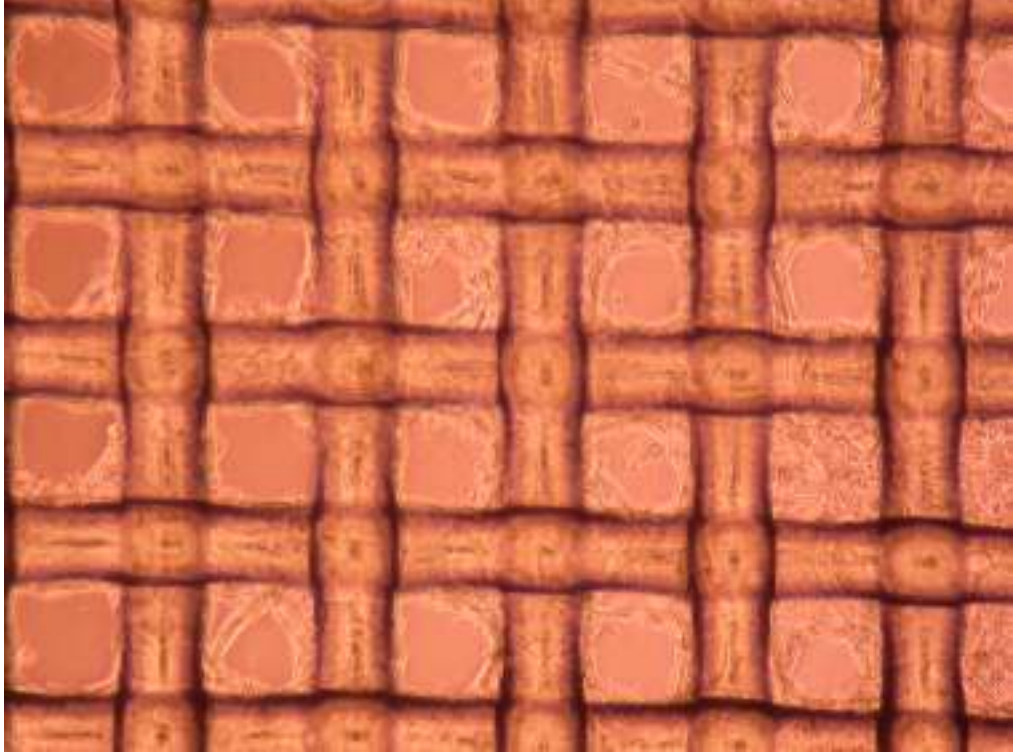
Sitotoksosite testleri için kullanılıncaya kadar hücrelerin meşleri 3 boyutlu olarak sarması için kültür ortamı 50 μ g/ml askorbik asit ilave edilmiş büyüme ortamı haftada üç kez değiştirilerek, 14 gün 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi.



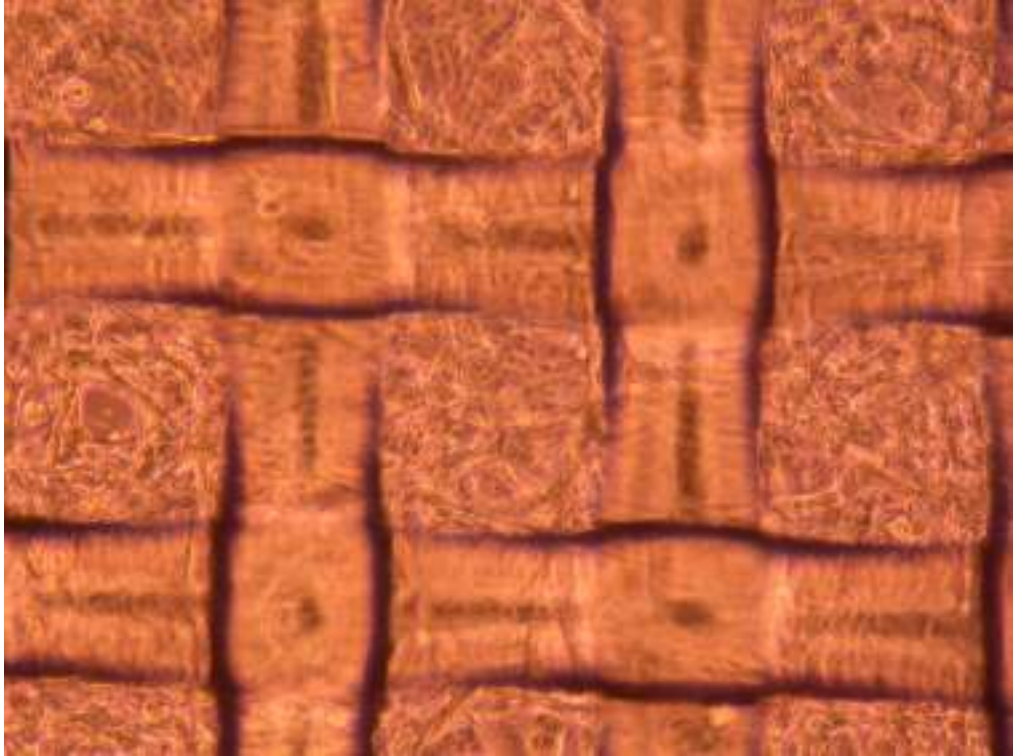
Resim 2.5.3.2 Meşlerin üzerine 25 μ l hücre süspansiyonu eklenerek inkübasyonu

* Polyamid meş, 0.5 cm²; Reichelt Chemietechnik, Almanya.

**Asetic acid, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya



Resim 2.5.3.3 Sığır hücreleri ile tam olarak sarılmamış meşlerin mikroskopik görüntüsü (x10).

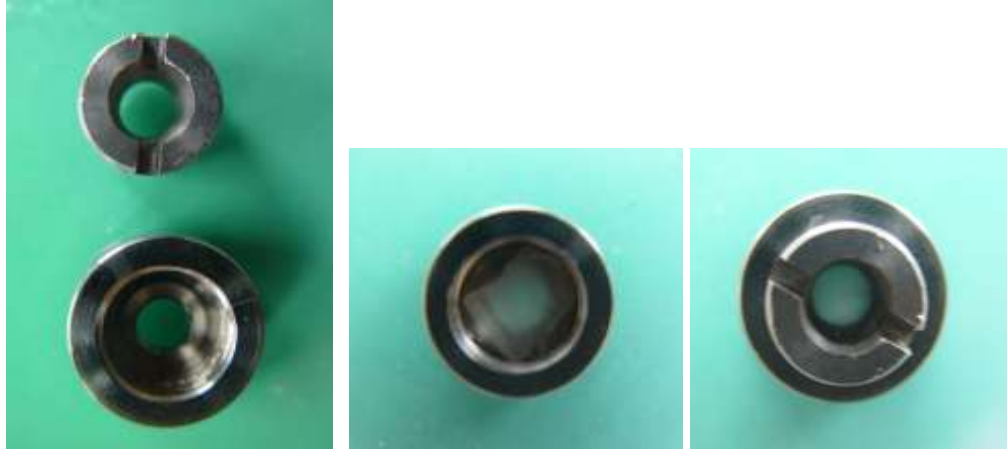


Resim 2.5.3.3 Sığır hücreleri ile 3 boyutlu olarak sarılmış meşlerin mikroskopik görüntüsü (x20).

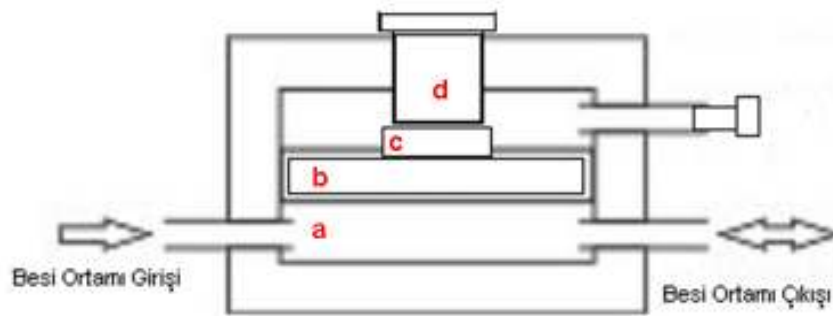
2.5.4. Yapay Pulpa Odalarının Hazırlanışı

Hücre kültürü perfüzyon odaları *in vivo* koşulları taklit edecek şekilde hazırlandı*. Her bir hücre kültürü odası içerisine üç boyutlu hücre kültürü ve meşi yerleştirebilmek için paslanmaz metal insertler kullanıldı (Resim 2.5.4.1). meşler üç boyutlu hücre kültürü kültür ortamı ile temas edecek şekilde insertin tabanına yerleştirildi (Resim 2.5.4.2).

Üç boyutlu hücre kültürü ile dentin disklerinin asitlenmiş yüzeyleri direkt kontakta gelecek şekilde yerleştirildi ve yapay pulpa odalarının 24 saat kültür ortamı (20% FBS ve 5.96 g/L HEPES içeren perfüzyon kültür ortamı) ile 0,3 ml/dk perfüzyonu** sağlandı (Resim 2.5.4.3).



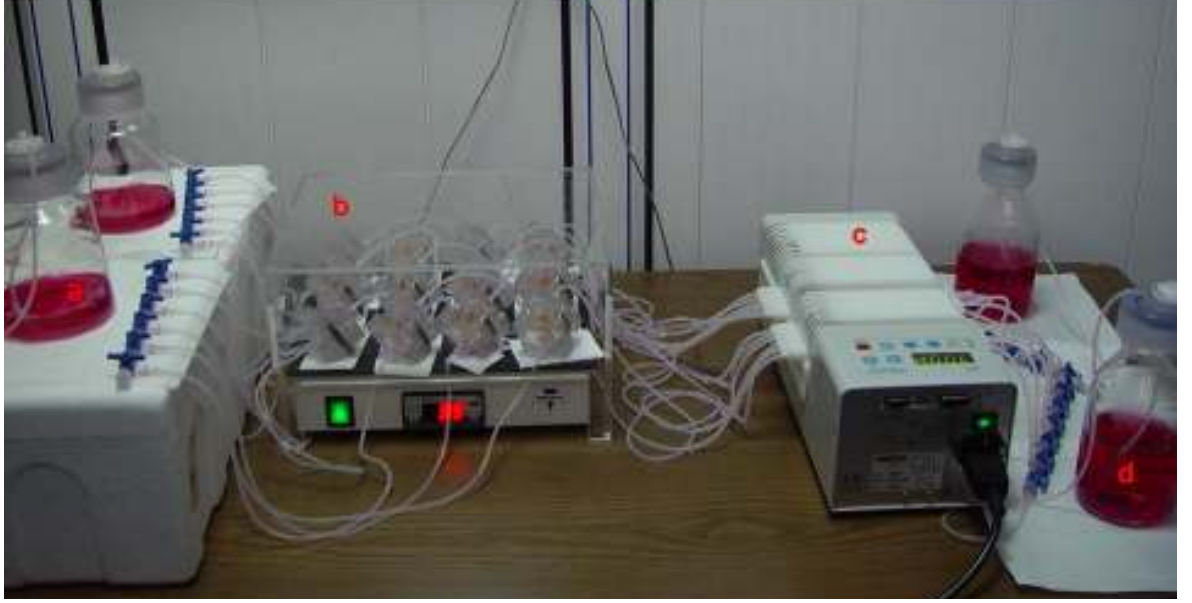
Resim 2.5.4.1 Paslanmaz çelik insertlerden yapay pulpa odalarının hazırlanışı.



Resim 2.5.4.2 Yapay pulpa odası, a: hücrelerin beslenmesini sağlayan besi ortamı girişi, b: hücre ve dentin diskini taşıyan paslanmaz çelik insert, c: kompozit rezin simanların uygulandığı kavite, d: paslanmaz çelik kapak.

*Cell Culture Perfusion Chambers, Minucells & Minutissue® GmbH, Bad Abbach, Almanya

**Ismatec, Peristaltic pump, Wertheim-Mondfeld, Almanya



Resim 2.5.4.3 Dentin bariyer testi düzeneği; a: Perfüzyon kültür ortamı, b: Yapay pulpa odaları, c: perfüzyon cihazı, d: Atık kültür ortamı.

Perfüzyon 24 saat sonra kapatılarak test edilecek rezin simanlar üreticilerinin talimatlarına uygun bir şekilde dentin diskleri üzerine uygulandı (Resim 2.5.4.4). KRS'lerin LED ışık kaynağı* ile polimerizasyonları sağlandı.

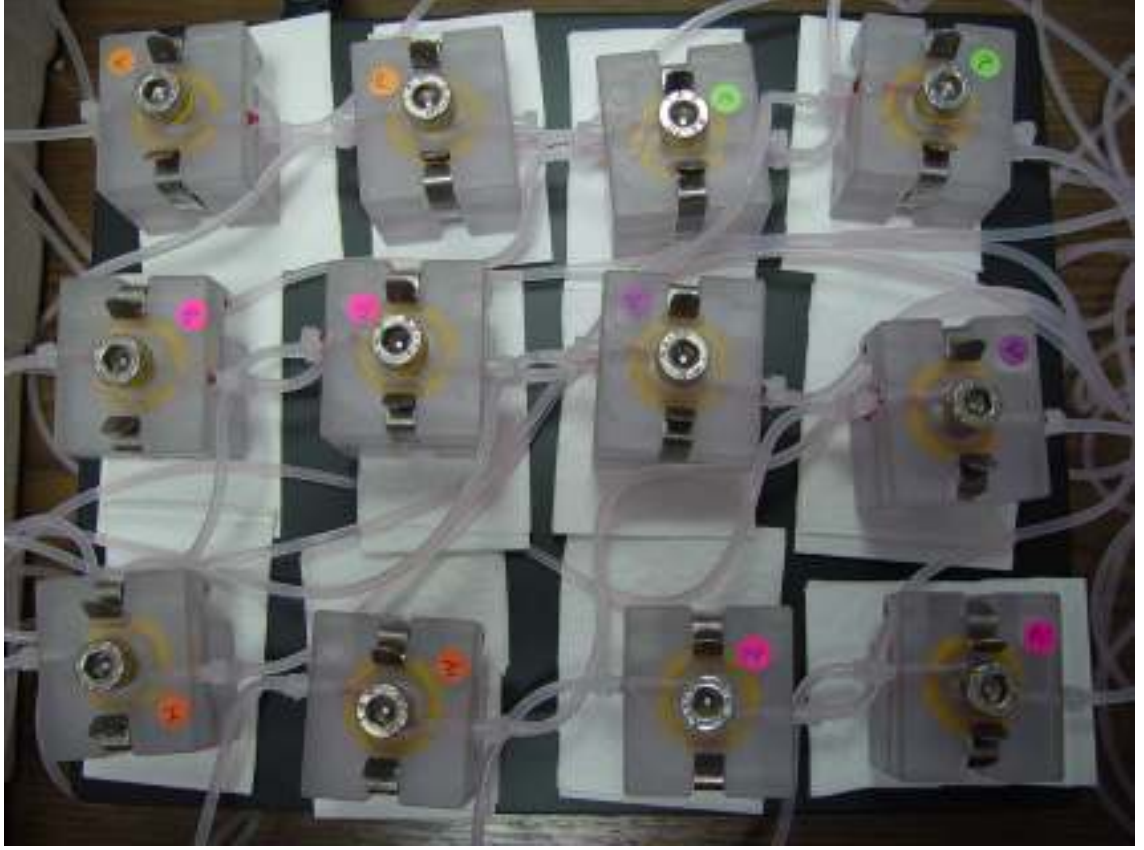


Resim 2.5.4.4 KRS'lerin polimerizasyonunda kullanılan LED ışık kaynağı.

Bir silikon ölçü maddesi** negatif kontrol (%100 hücre canlılığı) materyali olarak kullanıldı. Aynı miktarda base ve katalist 20 sn. karıştırıldı ve bir insülin enjektörü içerisine konularak direkt dentin üzerine 2 mm pat enjekte edildi ve polimerizasyonu için beklendi. Daha sonra, pulpal kısımda kültür ortamı ile perfüzyonları (2ml/dk) sağlandı.

*LED ışık kaynağı, Bluephase, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein, Avusturya

**Silikon ölçü maddesi, President Coltene AG, Altstatten, İsviçre.



Resim 2.5.4.5 Yapay pulpa odalarına materyallerin uygulanıp, etiketlenmesi.

Her materyal 6 kez test edildi, 24 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin canlılığı MTT ile değerlendirildi.

2.5.5. Metiltetrazolyum testi

- Üç boyutlu hücre kültürlerinin canlılığı mitekondrial enzim aktivitelerinin belirlenmesi esasına dayanan MTT* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile değerlendirildi. Yapay pulpa odalarından pulpa hücrelerini taşıyan meşler çıkartıldı. Karanlık ortamda meşler 24 kuyulu hücre kültürü kabına her kuyuya 0,5 mg/ml'lik 500µl MTT solüsyonu eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 2 saat bekletildi.
- MTT uzaklaştırılarak PBS ile 2 kez yıkandı ve 200 µl Dimetil sülfoksit eklenerek karanlık ortamda 30 dk çalkalandı.
- ELISA reader** ile 540 nm dalga boyunda okutuldu.

* MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya

**ELISA Reader, µQuant, Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, ABD

2.5.6. Dentin bariyer testlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Kontrol grubu % 100 canlılık oranı kabul edilerek diğer grupların rölatif canlılıkları hesaplandı. Kontrol ve deney gruplarının canlılık oranları arasındaki farklar Mann-Whitney U-testi ($\alpha=0,05$) ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

İstatistiki analizler SPSS 15.0 ve MS Excel 2003 programları kullanılarak yapılmıştır.

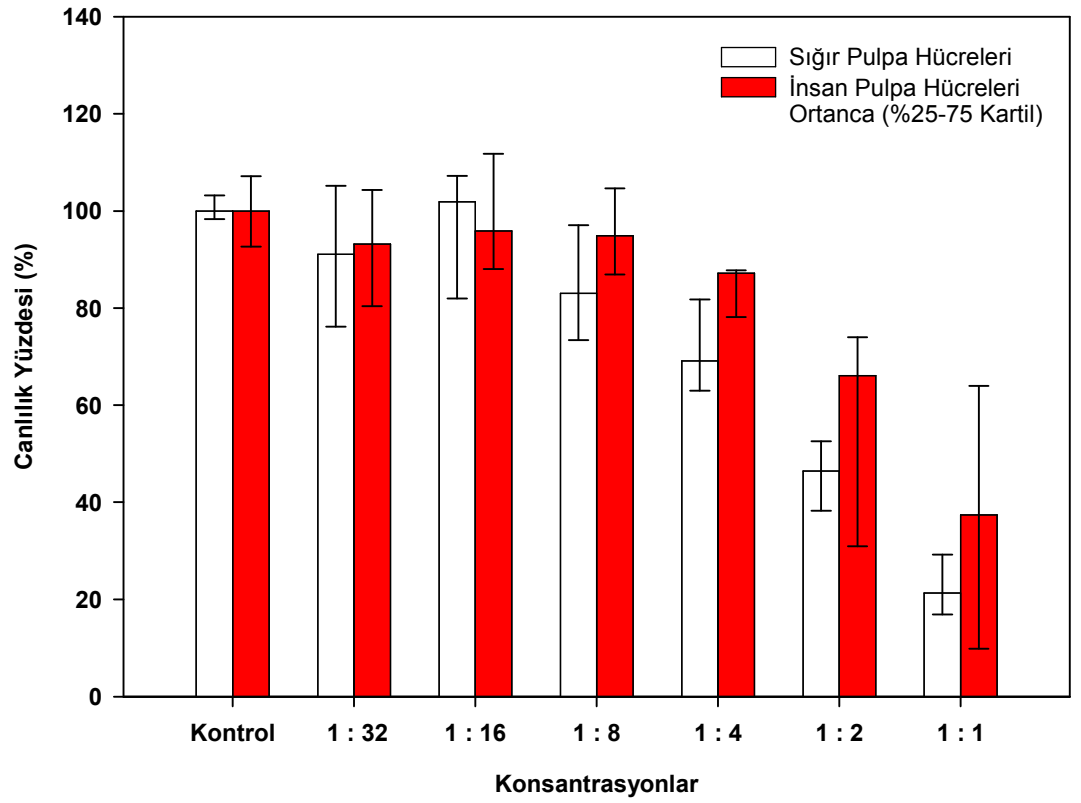
3. BULGULAR

3.1. KRS'lerin Kristal Viyole Testi ile Elde Edilen Bulguları

Bu çalışmada kullanılan KRS'ların çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarının 24 saatlik ekspoz süresi sonunda insan ve sığır hücrelerinin canlılığına etkisinin Kristal viyole yöntemiyle değerlendirilmesinin yüzde olarak sonuçları karşılaştırıldı.

İnsan ve sığırdan derive edilmiş pulpa hücrelerinin kullanıldığı bu çalışmadaki deneylerde farklı derecelerde sitotoksisite bulguları tespit edildi. Deney materyallerinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksisite bulguları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm materyallerin 1:1 konsantrasyonları ve bazı materyallerin 1:2 konsantrasyonlarında sitotoksisite gözlenirken, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 konsantrasyonlarında sitotoksisite bulguları gözlenmedi. Böylece istatistiksel karşılaştırmada materyallerin 1:1 konsantrasyonları değerlendirmeye alındı. Materyal ekstraktlarının her konsantrasyonu için deneyler 4 kez tekrarlandı. Her deneyde bir materyal konsantrasyonu için 4 kuyucuk kullanıldı (n=16).

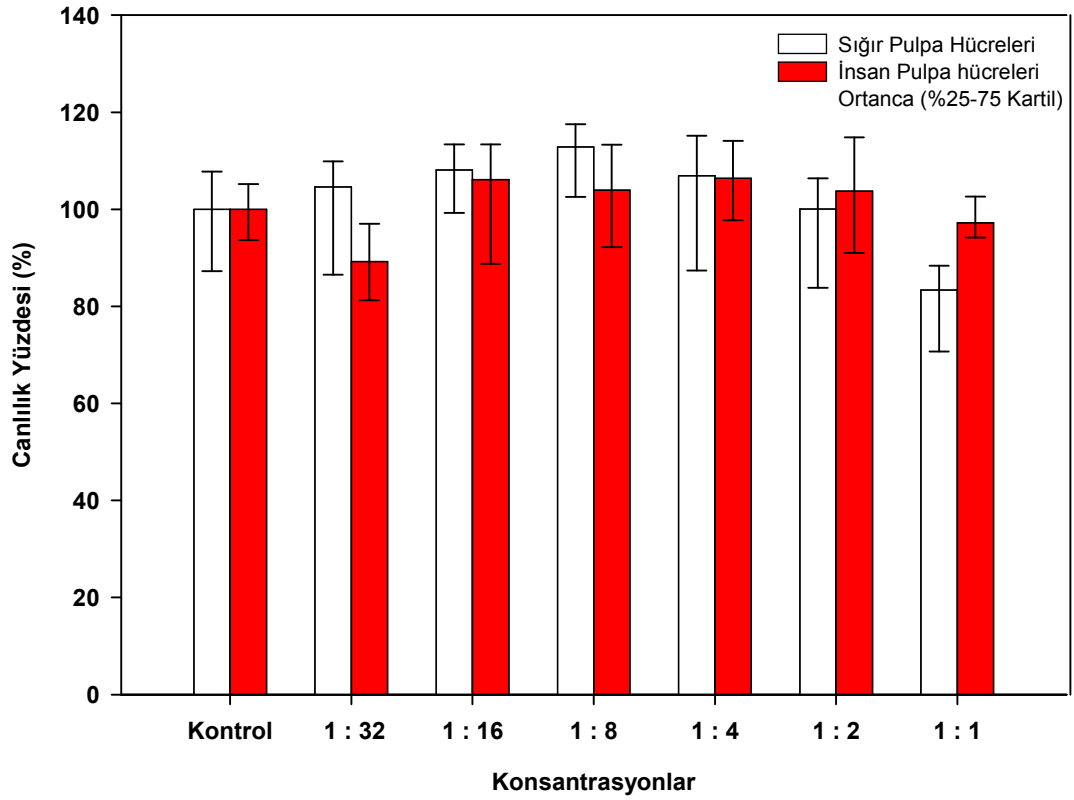
Kristal viyole ile boyanma sonrasında lizise uğramış hücre alanlarının şeffaf görüntü sergilediği, canlı hücre alanlarının mavi-mor renkte görüldüğü izlendi.



Grafik 3.1.1 Çeşitli konsantrasyonlardaki Maxcem KRS'nin insan ve sığır pulpa hücrelerinde canlılık yüzdeleri (Ortanca %25–75 Kartil).

Maxcem KRS orijinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan pulpa hücreleri üzerinde % 63, sığır pulpa hücrelerinde ise % 79 hücre ölümüne sebep oldu. Maxcem KRS'nin orijinal ekstraktı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde negatif kontrol grubu ile arasında hem insan hem de sığır pulpa hücrelerinde önemli bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).

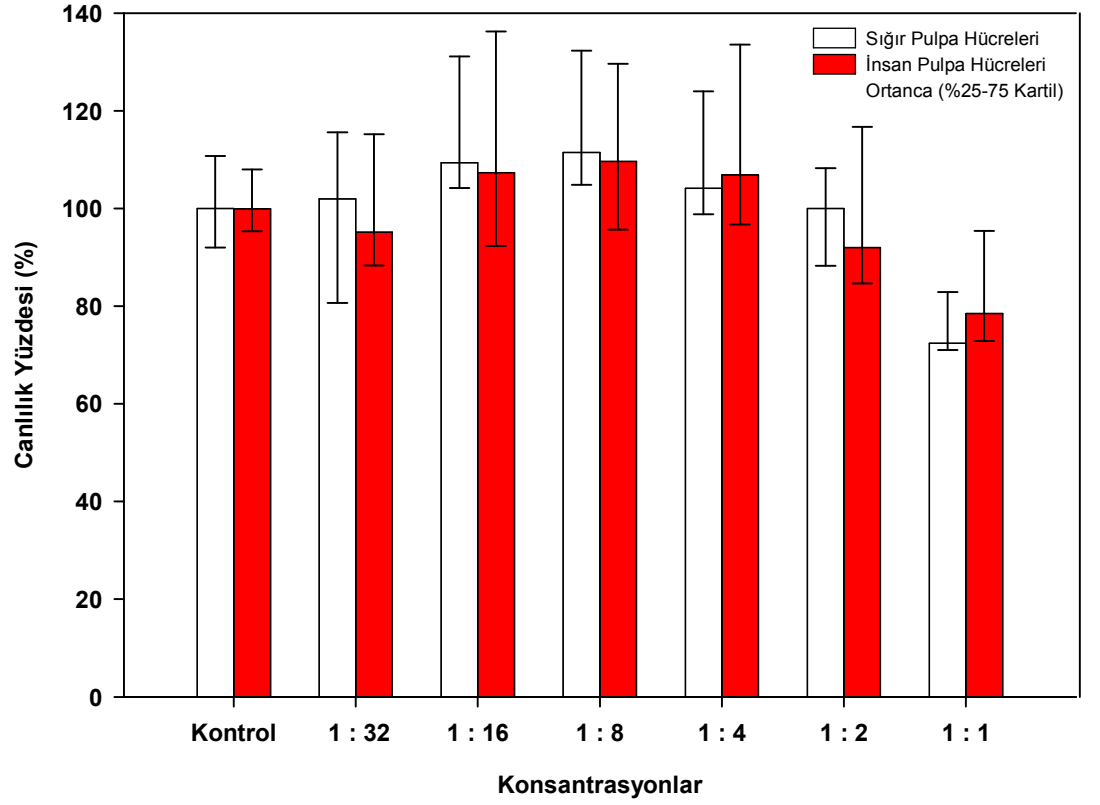
Yüksek konsantrasyonda materyal ekstraktı içeren gruplarda sığır pulpa hücrelerinde daha yüksek oranda hücre ölümleri görülmesine rağmen, Maxcem KRS'nin farklı ekstraktlarına 24 saat maruz kalan insan ve sığır hücrelerinin canlılıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki hücre arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ($p > 0.05$) (Grafik 3.1.1).



Grafik 3.1.2 Çeşitli konsantrasyonlardaki Rely X Unicem Clicker KRS'nın insan ve sığır pulpa hücrelerinde canlılık yüzdeleri (Ortanca %25-75 Kartil).

Rely X Unicem Clicker KRS orijinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan pulpa hücreleri üzerinde % 3, sığır pulpa hücreleri üzerinde % 17 hücre ölümüne sebep oldu, insan pulpa hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0.05$) ancak sığır pulpa hücrelerinde fark anlamlı bulundu ($p<0.05$).

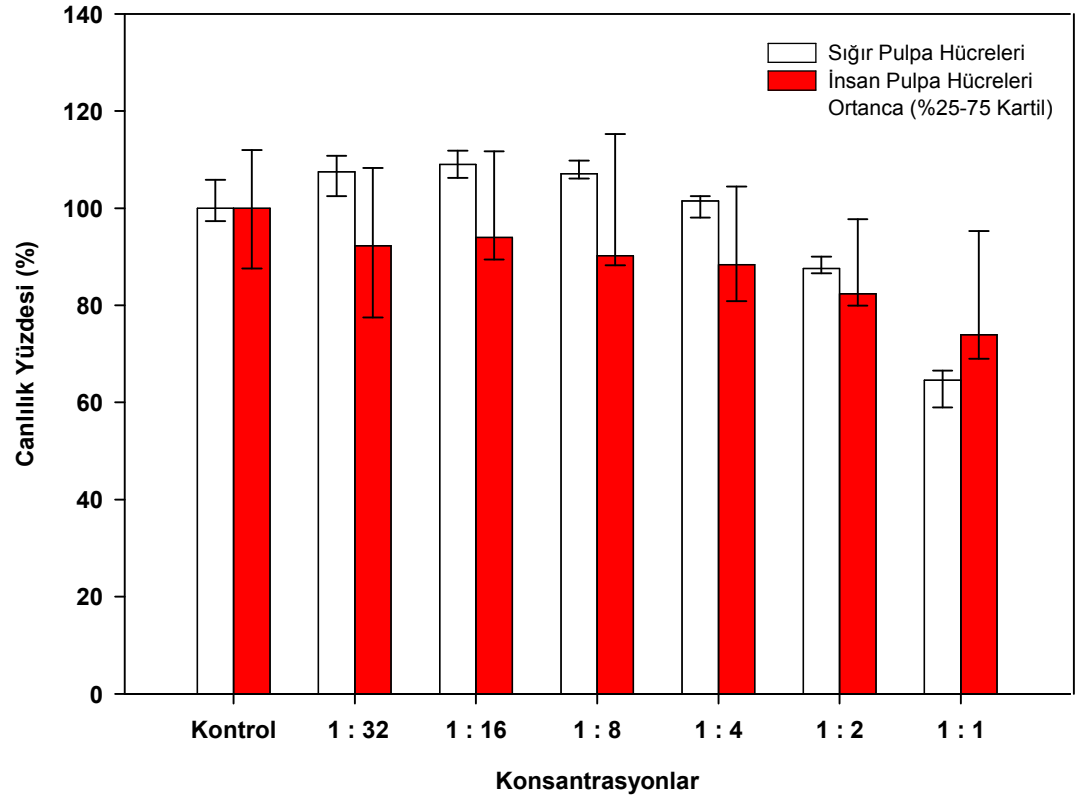
Rely X Unicem Clicker KRS'nin orijinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan ve sığır hücreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki hücre arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ancak daha düşük konsantrasyonlarda materyal ekstraktı içeren gruplarda hücreler arasında fark görülmedi ($p>0.05$) (Grafik 3.1.2).



Grafik 3.1.3 Çeşitli konsantrasyonlardaki Panavia F 2.0 KRS'nın insan ve sığır pulpa hücrelerinde canlılık yüzdeleri (Ortanca %25–75 Kartil).

Panavia F 2.0 KRS orjinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan pulpa hücreleri üzerinde % 22, sığır pulpa hücrelerinde % 28 oranında hücre ölümüne sebep oldu. Her iki hücre tipinde de materyal ekstraktı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

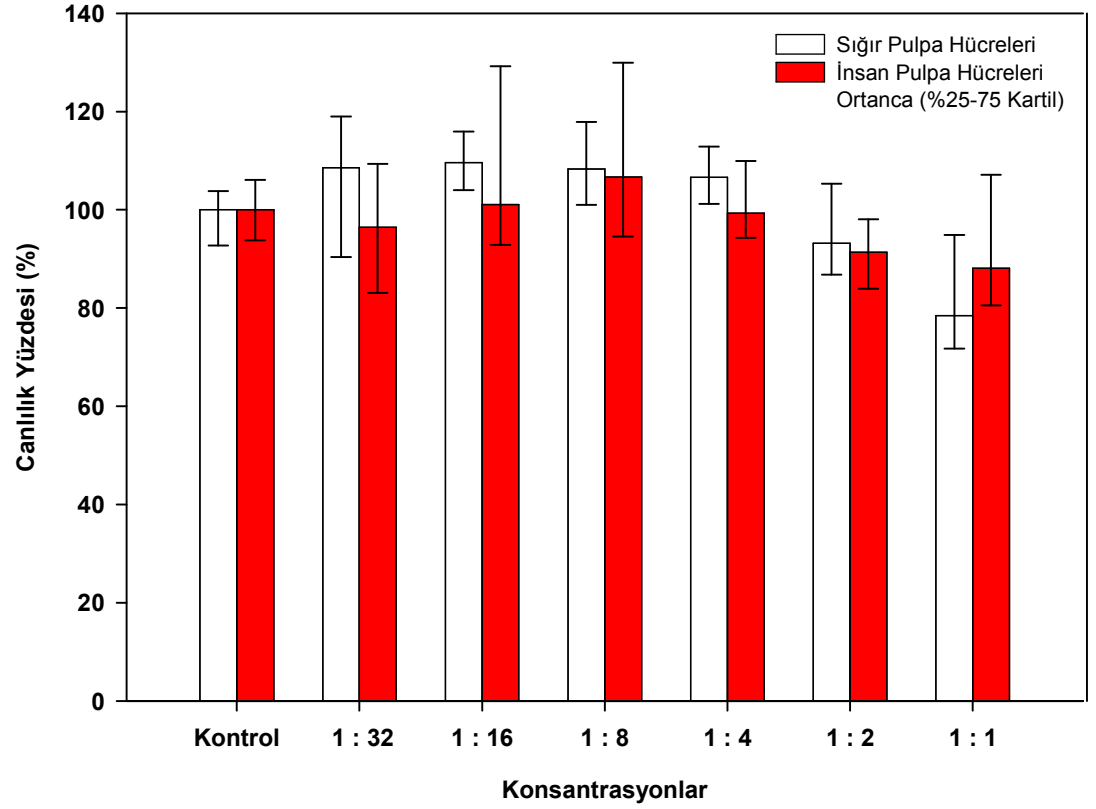
Panavia F 2.0 KRS'in orijinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan ve sığır hücreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki hücre arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Grafik 3.1.3).



Grafik 3.1.4 Çeşitli konsantrasyonlardaki Biscem KRS'nın insan ve sığır pulpa hücrelerinde canlılık yüzdeleri (Ortanca %25-75 Kartil).

Biscem KRS orjinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan pulpa hücreleri üzerinde % 27, sığır pulpa hücrelerinde % 36 hücre ölümüne sebep oldu. Biscem materyalinin orijinal ekstraktı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında insan hücrelerinde istatistiksel olarak fark olmadığı ($p>0.05$), sığır hücrelerinde ise farkın anlamlı olduğu ($p<0.05$) görüldü.

Biscem KRS'nın orijinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan ve sığır hücrelerinin canlılığına etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki hücre arasındaki farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ancak diğer konsantrasyonlarda bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Grafik 3.1.4).



Grafik 3.1.5 Çeşitli konsantrasyonlardaki Bistite II DC KRS'nın insan ve sığır pulpa hücrelerinde canlılık yüzdeleri (Ortanca %25–75 Kartil).

Bistite II DC KRS orjinal ekstraktına 24 saat maruz kalan insan pulpa hücrelerinde % 12, sığır pulpa hücrelerinde ise % 22 oranında hücre ölümüne sebep oldu. Bistite II DC materyalinin orjinal ekstraktı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında insan hücreleri için istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0.05$) fakat sığır pulpa hücrelerinde farkın önemli olduğu ($p<0.05$) tespit edildi.

Bistite II DC KRS'ın ekstraktına 24 saat maruz kalan insan ve sığır hücrelerinin canlılığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak iki hücre arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Grafik 3.1.5).

Çizelge 3.1.1 İnsan ve sığır pulpa hücreleri üzerinde KRS'lerin orijinal ekstraktlarının sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması (FY=Fark Yok).

Materyaller	İnsan Pulpa Hücreleri		Sığır Pulpa Hücreleri		İstatistiksel Fark
	Ortanca	Kartil*	Ortanca	Kartil*	
Maxcem	21	16–29	37	9–63	FY
Rely x Unicem Clicker	97	94–102	83	70–88	0,007
Panavia F 2.0	78	72–95	72	71–82	FY
Biscem	73	68–95	64	58–66	0,029
Bistite II DC	88	80–107	78	71–94	FY

* Kartil % 25-75

Kristal viyole testinde materyaller birbirleri ile karşılaştırıldığında Maxcem KRS'in diğer tüm KRS'lerden hem insan hemde sığır pulpa hücrelerinde diğer simanlara kıyasla en yüksek oranda toksisite gösterdi ($p<0.05$). KRS'ler insan pulpa hücreleri üzerinde değerlendirildiğinde Maxcem'in diğer test edilen KRS'ler içerisinde en yüksek toksisiteye (% 79) sahip olduğu ($p<0.05$) görüldü. Rely X Unicem Clicker ise en az toksisiteye (% 3) sahip olduğu bulundu. Diğer simanların ise insan pulpa hücreleri üzerine % 20-30 dolaylarında toksisite gösterdiği izlendi.

Sığır pulpa hücreleri üzerinde KRS'lerin toksisitesi Kristal viyole testi ile değerlendirildiğinde insan pulpa hücreleri üzerindeki benzer şekilde Maxcem'in en yüksek (% 63) sitotoksositeye yol açtığı ($p<0.05$), Rely X Unicem Clicker'in ise en az (% 17) sitotoksositeye yol açtığı diğer üç simanın ise % 30-35 dolaylarında sitotoksosite ile sonuçlandığı görüldü (Çizelge 3.1.1).

Çizelge 3.1.2 İnsan ve sığır pulpa hücreleri* üzerine materyallerin sitotoksik etkilerinin birbiri ile karşılaştırılması (FY=Fark Yok).

Rezin Simanlar	Maxcem	Rely X	Panavia F	Biscem	Bistite
Maxcem		0,000	0,000	0,001	0,000
Rely X	0,000		FY	0,002	FY
Panavia F 2.0	0,000	0,024		0,008	FY
BisCem	0,020	FY	FY		0,013
Bistite II DC	0,000	FY	FY	FY	

* Beyaz alanlar sığır hücreleri, gri alanlar insan hücreleri.

İnsan ve sığırdan derive edilmiş hücreler üzerinde KRS'lerin orjinal ekstraktlarının hücre canlılığına etkisi karşılaştırıldığında tüm gruplarda insan pulpa hücrelerinin yüzdesi daha yüksek olmasına rağmen istatistiki olarak karşılaştırıldığında sadece Rely X ve Biscem grupları arasında farklılık bulundu ($p<0.05$). Maxcem, Panavia F 2.0 ve Bistite II DC gruplarında hücreler arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0.05$) (Çizelge 3.1.2).

Genel olarak KRS ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarına maruz kalan sığır pulpa hücrelerinin yüzdesinin insan pulpa hücrelerine göre daha az olduğu görüldü. Buna karşılık daha düşük konsantrasyonda sitotoksik etkinin olmadığı veya daha az olduğu gruplarda sığır pulpa hücrelerinin yüzdesinin daha yüksek olduğu da görüldü.

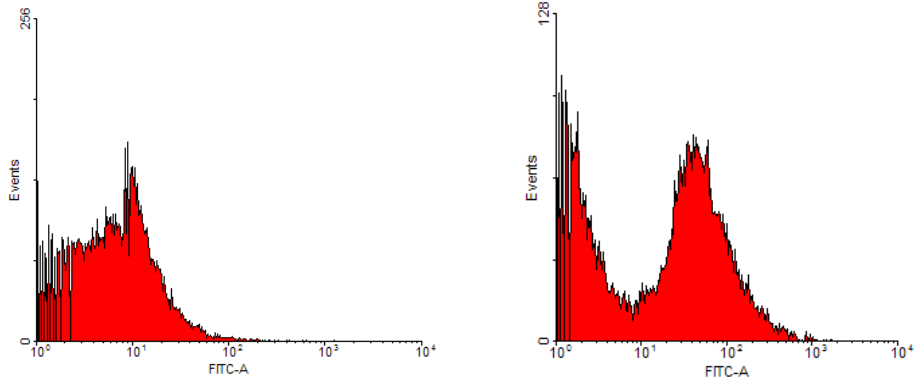
KRS'lerin insan ve sığır pulpa hücreleri üzerine gösterdikleri toksik etkinin moleküler temelini araştırmak için bu çalışmada materyal ekstraktına maruz bırakılan hücreler tarafından üretilen ROS seviyesi de araştırıldı. ROS deneyi sonuçları aşağıda verilmiştir.

3.2. Kompozit Rezin Simanlara Karşı Oluşan Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS-Reaktive Oxygen Spieces) Bulguları

Kristal viyole testleri ile sitotoksisiteleri tespit edilen materyallerin oluşan bu sitotosisitenin bir mekanizmasını açıklayabilmek için ROS üretimleri araştırıldı.

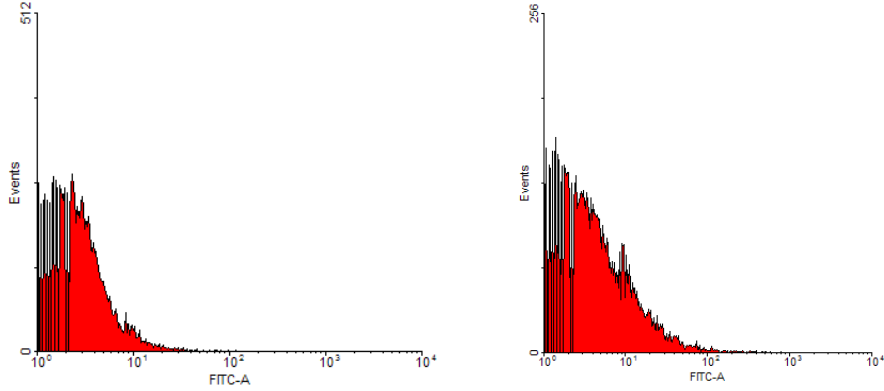
KRS bir saat ekspoz süresi sonunda sığır ve insan hücrelerinin ROS oluşturmalarının göstergesi olan DCF florasans üretimi değerlendirildi. Her deney 4 kez tekrarlandı. İnsan pulpa hücrelerinde sitotoksisite analizlerine benzer şekilde KRS'lerin ROS üretimi yüksek konsantrasyonlara doğru artmıştır. Ancak ilginç olarak sığır pulpa hücrelerinde en yüksek ROS değerleri materyallerin 1:2 ya da 1:4 konsantrasyonlarında kaydedilmiştir. Histogram grafiklerinde de yüksek konsantrasyonlarda ölü hücrelerin sayısının fazla olduğu tespit edildi.

Pozitif kontrol materyali 1mM TEG-DMA'ya 1 saat maruz bırakılan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 2.006, insan pulpa hücrelerinin ise 5.093 olarak tespit edildi.



Grafik 3.2.1 Solda sığır, sağda insan pulpa hücrelerine ait pozitif kontrol grubunun (1 μ M TEG-DMA) histogram grafiği.

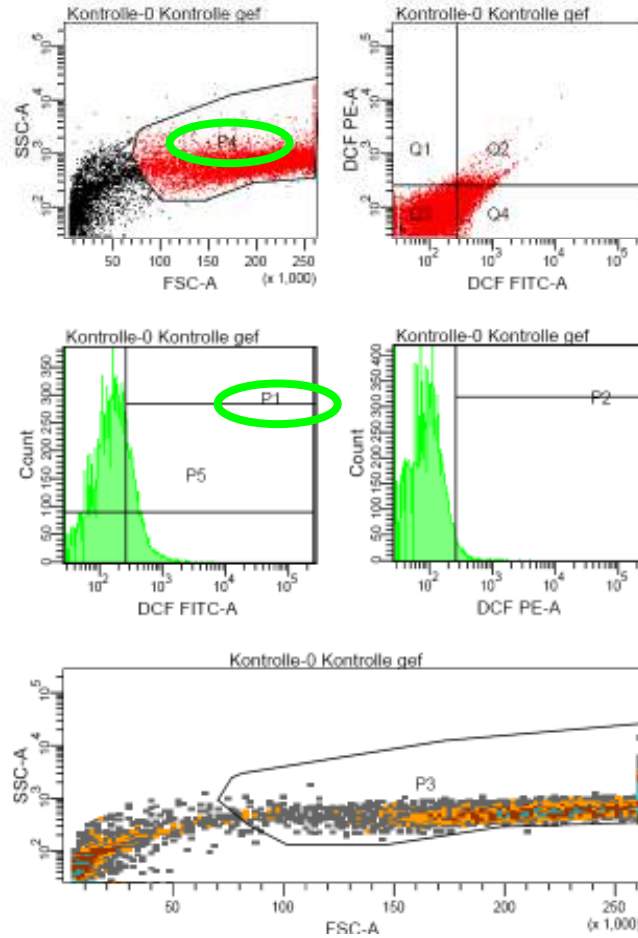
ROS üretimi oksijene hassas fluorescent probu 2_7_-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) kullanılarak belirlendi. İntrasellüler esterase aktivitesi sonucu DCFH oluşur. DCFH bir non-fluoresan bir bileşiktir. Oksidasyona uğradığında DCF-DA'ya dönüşür ve floresans ışığı yayar (Myhre ve ark 2003). Reaktif oksijen üretimi sonucu DCFDA ile boyanan hücrelerin grafiklerde (Grafik 3.2.1) pik yaptığı görülüyor.



Grafik 3.2.2 Solda sığır, sağda insan pulpa hücrelerine ait negatif kontrol gruplarının histogram grafiği.

Grafik 3.2.2'de sığır ve insan hücrelerinin normal hücre fonksiyonları sonucu oluşan doğal oksijen ürünlerinin floresans faktörlerinin histogram grafikleri görülmektedir.

Tube Name: 0 Kontrolle gef						
Record Date: Sep 18, 2007 11:57:12 AM						
SAMPLE ID: P1, P5 und P2 aus P4						
Population	#Events	%Parent	DCF FITC-A Geometric M	DCF FITC-A Mean	DCF PE-A Geometric M	DCF PE-A Mean
All Events	20,000	####	####	146	####	69
P4	14,692	73.5	####	192	####	89
P1	3,113	21.2	534	433	####	162
P5	13,775	93.8	159	204	####	93
P2	300	2.0	647	819	377	431
P3	14,692	73.5	####	192	####	89



Grafik 3.2.3 Negatif kontrol grubuna ait histogram grafikleri, P5 değerinin geometrik ortalaması.

Tüm grupların histogram grafiğindeki P5 değerinin geometrik ortalamaları değerlendirildi. P4 alanındaki hücreler değerlendirmeye alındı. P5 değerinin geometrik ortalaması P4 alanındaki tüm hücrelerin floresans faktör değerlerini gösterir, P1 ise sadece en yüksek floresans değerlerini gösterir (Grafik 3.2.3).

Çizelge 3.2.1 Maxcem KRS’in çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarına maruz kalan sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi.

Maxcem Konsantrasyonları	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri	
	Ortanca	Kartil*	Ortanca	Kartil*
1 : 32	1,79 ⁿ	1,59-2,17	3,61 ⁿ	1,75-6,19
1 : 16	1,58 ⁿ	1,31-2,02	5,80 ⁿ	2,79-11,49
1 : 8	1,63 ⁿ	1,48-1,89	6,07 ⁿ	2,94-9,26
1 : 4	1,95 ⁿ	1,73-2,03	7,33 ⁿ	3,19-15,66
1 : 2	1,78 ⁿ	1,64-2,09	8,83 ⁿ	3,75-20,47
1 : 1	1,43 ⁿ	1,29-2,35	9,21 ⁿ	3,43-30,76
Pozitif Kontrol	2,01	1,54-2,61	5,09	4,61-6,51
Negatif Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00

* Kartil %25-75.

p: Mann Withney U-Testi’ne göre pozitif kontrol grubu ile önemli fark.

n: Mann Whitney U-Testi’ne göre negatif kontrol grubu ile önemli fark.

Maxcem KRS’in orjinal ekstraktına maruz bırakılan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 1,4, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 1,78, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 1.94 ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama ortalama 9,21, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 8,83, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 7,33 olduğu tespit edildi. Hem insan hem de sığır pulpa hücreleri için Maxcem KRS’in farklı ekstraktları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak tüm gruplarda önemli ölçüde ROS üretiminin gerçekleştiği tespit edildi ($p<0.05$). İstatistiksel olarak bütün konsantrasyonlar pozitif kontrol grubu ile benzer ROS üretimine yol açtı ($p>0.05$) (Çizelge 3.2.1).

Çizelge 3.2.2 Rely X Unicem Clicker KRS çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarına maruz bırakılan sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi.

Rely X Unicem Clicker Konsantrasyonları	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri	
	Ortanca	Kartil	Ortanca	Kartil
1 : 32	0,74 ^p	0,64-1,38	0,96 ^p	0,85-1,16
1 : 16	1,25 ^p	0,83-1,79	1,01 ^p	0,91-1,45
1 : 8	1,33	1,06-2,17	1,44 ^{n,p}	1,36-2,37
1 : 4	1,43 ⁿ	1,11-2,33	3,95 ⁿ	2,61-6,23
1 : 2	1,96 ⁿ	1,44-2,79	10,12 ⁿ	5,25-15,58
1 : 1	1,92 ⁿ	1,45- -	16,09 ^{n,p}	7,47-36-86
Pozitif Kontrol	2,01	1,55-2,61	5,09	4,61-6,52
Negatif Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00

* Kartil %25-75.

p: Mann Whitney U-Testi'ne göre pozitif kontrol grubu ile önemli fark.

n: Mann Whitney U-Testi'ne göre negatif kontrol grubu ile önemli fark.

Rely X Unicem Clicker KRS'nın orjinal ekstraktına maruz bırakılan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi florans faktörleri ortalama 1.91, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 1.95, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 1.43 florans faktör ile negatif kontrol grubundan önemli derecede fazla ROS üretimi oluşturdu ($p<0.05$). 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 konsantrasyonları pozitif kontrol grubu ile benzer ROS üretimine yol açtığı izlendi ($p>0.05$).

Rely X Unicem Clicker KRS'nın ekstraktına maruz bırakılan insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi florans faktörleri ortalama 16,08, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 10,11, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 3,95, 1:8 konsantrasyonunda ortalama 1,44 olduğu tespit edildi. Rely X Unicem Clicker KRS'nın 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 konsantrasyonları negatif kontrol grubundan önemli derecede fazla ROS üretimi oluştururken ($p<0.05$), 1:2 ve 1:4 konsantrasyonları pozitif kontrol grubu ile benzer ROS üretimine yol açtı ($p>0.05$) (Çizelge 3.2.2).

Çizelge 3.2.3 Panavia F 2.0 KRS'in çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarına maruz bırakılan sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi.

Panavia F 2.0 Konsantrasyonları	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri	
	Ortanca	Kartil	Ortanca	Kartil
1 : 32	0,91 ^p	0,76-1,07	1,26 ^p	0,96-1,88
1 : 16	1,22 ^{n,p}	1,05-1,30	1,59 ^p	1,22-1,65
1 : 8	1,43 ⁿ	1,31-2,52	1,97 ^p	1,73-2,66
1 : 4	1,51 ⁿ	1,47-3,06	3,60 ⁿ	2,63-4,30
1 : 2	1,65 ⁿ	1,44-1,72	7,00 ⁿ	5,20-9,15
1 : 1	1,59 ⁿ	1,48- -	10,16 ⁿ	6,22-15,35
Pozitif Kontrol	2,01	1,55-2,61	5,09	4,61-6,52
Negatif Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00

* Kartil %25-75.

p: Mann Whitney U-Testi'ne göre pozitif kontrol grubu ile önemli fark.

n: Mann Whitney U-Testi'ne göre negatif kontrol grubu ile önemli fark.

Panavia F 2.0 KRS'in orjinal ekstraktına maruz kalan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 1,59, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 1,65, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 1,51 olduğu tespit edildi. Panavia F 2.0 KRS'in farklı ekstraktları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1:32 konsantrasyonu dışındaki gruplarda önemli derecede ROS üretimi görülürken ($p<0.05$), pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 1:16 ve 1:32 konsantrasyonlarında fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Panavia F 2.0 KRS ekstraktına maruz bırakılan insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 10,16, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 7,00, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 3,60 olduğu tespit edildi. Panavia F 2.0 KRS'in 1:1, 1:2 ve 1:4, konsantrasyonları negatif kontrol grubundan önemli derecede fazla ($p<0.05$); pozitif kontrol grubu ile benzer ROS üretimine yol açtı ($p>0.05$) (Çizelge 3.2.3).

Çizelge 3.2.4 Biscem KRS’in çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarına maruz bırakılan sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi.

Biscem Konsantrasyonları	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri	
	Ortanca	Kartil	Ortanca	Kartil
1 : 32	1,36	0,95-1,57	1,19	0,44-1,24
1 : 16	1,51	1,09-1,98	1,43	0,60-1,75
1 : 8	2,05	1,69-2,51	2,32	0,96-3,55
1 : 4	2,60 ⁿ	2,33-3,29	6,41 ⁿ	2,36-7,72
1 : 2	2,30 ⁿ	2,07-3,37	12,01 ⁿ	5,10-14,62
1 : 1	2,76 ⁿ	1,44-4,11	7,87 ⁿ	4,20-20,34
Pozitif Kontrol	2,01	1,55-2,61	5,09	4,61-6,52
Negatif Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00

* Kartil %25-75.

p: Mann Whitney U-Testi’ne göre pozitif kontrol grubu ile önemli fark.

n: Mann Whitney U-Testi’ne göre negatif kontrol grubu ile önemli fark.

Biscem KRS’in orjinal ekstraktına maruz bırakılan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 2.76, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 2.30, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 2.60 olduğu tespit edildi. Biscem KRS orijinal ekstraktına maruz bırakılan insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi florasans faktörleri ortalama 7,87, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 12,00, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 6,41 olduğu tespit edilmiştir. Hem insan hem de sığır pulpa hücreleri için, Biscem KRS’in farklı ekstraktları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1:1, 1:2 ve 1:4 konsantrasyonlarında istatistiksel olarak aralarındaki farkın önemli olduğu ($p<0.05$) ve tüm konsantrasyonların pozitif kontrol ile benzer olduğu tespit edildi ($p>0.05$) (Çizelge 3.2.4).

Çizelge 3.2.5 Bistite II DC'nin KRS'in çeşitli konsantrasyonlardaki ekstraktlarına maruz bırakılan sığır ve insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi.

Bistite II DC Konsantrasyonları	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri	
	Ortanca	Kartil	Ortanca	Kartil
1 : 32	1,16 ^p	1,04–1,61	1,00 ^p	0,51–1,11
1 : 16	1,57 ^p	1,14–2,32	1,34 ^p	0,79–1,57
1 : 8	2,04 ^p	1,52–2,38	1,61 ^p	1,05–2,05
1 : 4	2,45 ⁿ	2,35–2,98	3,18 ⁿ	1,77–4,10
1 : 2	3,09 ⁿ	2,60–3,41	6,01 ⁿ	3,07–8,27
1 : 1	2,25 ⁿ	1,37–3,58	11,33 ⁿ	4,66–23,99
Pozitif Kontrol	2,01	1,55–2,61	5,09	4,61–6,52
Negatif Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00

* Kartil %25-75.

p: Mann Whitney U-Testi'ne göre pozitif kontrol grubu ile önemli fark.

n: Mann Whitney U-Testi'ne göre negatif kontrol grubu ile önemli fark.

Bistite II DC KRS'in ekstraktlarına maruz bırakılan sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi floresans faktörleri ortalama 2.24, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 3.09, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 2.44 olduğu tespit edildi. Bistite II DC KRS orijinal ekstraktına maruz bırakılan insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi floresans faktörleri ortalama 11,33, 1:2 konsantrasyonunda ortalama 6,01, 1:4 konsantrasyonunda ortalama 3,18 olduğu tespit edildi. Hem insan hem de sığır pulpa hücreleri için Bistite II DC KRS'in 1:1, 1:2 ve 1:4 konsantrasyonları negatif kontrol grubundan önemli derecede fazla ROS üretimi oluştururken ($p < 0.05$), pozitif kontrol grubu ile benzer ROS üretimine yol açtı ($p > 0.05$) (Çizelge 3.2.5).

Çizelge 3.2.6 Sığır ve insan pulpa hücrelerinde materyallerin 1:1 konsantrasyonlarının oluşturdukları reaktif oksijen ürünlerinin floresans faktör değerlerinin karşılaştırılmasının anlamlılık Çizelgesi (FY=Fark Yok).

Rezın simanlar	Sığır Pulpa Hücreleri		İnsan Pulpa Hücreleri		İstatistiksel
	Ortanca	Kartil	Ortanca	Kartil	Fark
TEG-DMA	1,00	1,00	5,09	1,00	0,014
Maxcem	1,43	1,29-2,35	9,21	3,43-30,76	0,000
Rely X	1,92	1,45- -	16,09	7,47-36,86	0,033
Panavia F 2.0	1,59	1,48- -	10,16	6,22-15,35	0,000
BisCem	2,76	1,44-4,11	7,87	4,20-20,34	FY
Bistite II DC	2,25	1,37-3,58	11,33	4,66-23,99	FY

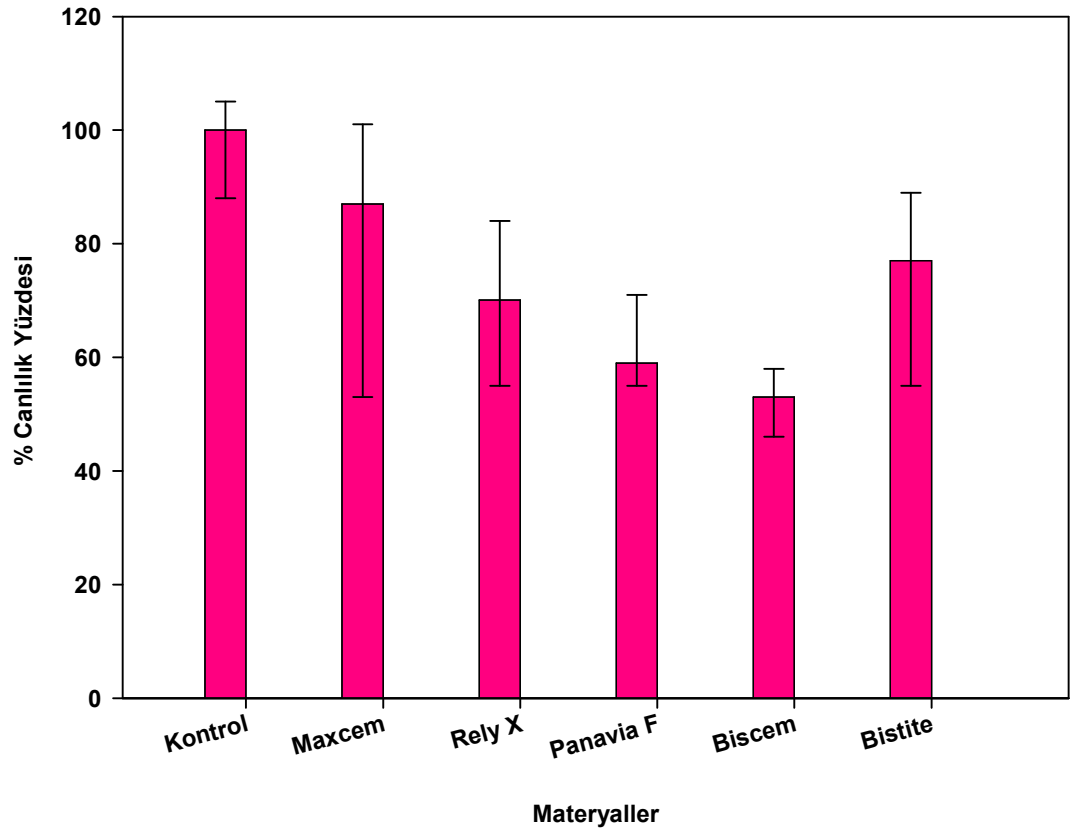
KRS materyallerinin 1:1 konsantrasyonlarının ve pozitif kontrol grubunun oluşturdukları reaktif oksijen ürünlerinin insan ve sığır pulpa hücrelerinde karşılaştırıldığında ROS üretiminin insan pulpa hücrelerinde sığır pulpa hücrelerinden daha yüksek olduğu görüldü. Oluşan fark pozitif kontrol grubu, Maxcem, Rely X Unicem Clicker ve Panavia F 2.0 gruplarında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Biscem ve Bistite II DC gruplarında iki hücre cevabı arasında fark bulunmadı ($p>0.05$) (Çizelge 3.2.6).

Hem insan hem de sığır pulpa hücrelerinde kullanılan KRS'ler pozitif kontrol grubundan önemli derecede fazla ROS üretimine yol açtı ($p<0.05$).

Sığır pulpa hücrelerinde en yüksek ROS üretimi Biscem'de en düşük ise Maxcem ve PanaviaF 2.0 gruplarında görüldü ($p<0.05$). İnsan pulpa hücrelerinde en yüksek ROS üretimi Rely X Unicem Clicker ($p<0.05$), en düşük ise Biscem grubunda elde edildi ($p<0.05$).

3.3.Kompozit Rezin Simanların Dentin Bariyer Testi ile Elde Edilen Sitotoksosite Bulguları

KRS'ların sitotoksitesi sığır pulpa hücrelerinin üç boyutlu kültürleri ile değerlendirildi (Grafik 3.3.1). Bir vinil poli siloksan ölçü materyali (President) negatif kontrol materyali olarak kullanıldı. Dentin bariyer testinde Maxcem % 79, Rely X Unicem clicker % 70, Panavia F 2.0 % 62, Biscem % 52, ve Bistite II DC'de % 73 canlılık oranı tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak Maxcem KRS kontrol grubu ile benzer oranda sonuç verirken ($p>0.05$), diğer grupların kontrol grubundan daha düşük hücre canlılığı gösterdiği saptandı ($p<0.05$). Bütün gruplar içerisinde Biscem KRS en düşük hücre canlılığına yol açtı.



Grafik 3.3.1 Dentin bariyer test aygıtında KRS'lara maruz kalan üç boyutlu hücre kültürlerinin canlılık yüzdeleri (Ortanca %25–75 Kartil).

4. TARTIŞMA

Rezin esaslı materyallerden sertleşme sırasında veya daha sonra farklı monomerlerin salınabildiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Ruyter 1995, Gerzina ve ark 1996, Geurtsen ve ark 1999, Altıntaş 2007). Rezin esaslı materyallerin biyouyumluluğunu özellikle materyalden salınan çeşitli monomerler ve uygulanan yüzeyin özellikleri gibi faktörler etkiler (Geurtsen 2000). Pulpa, diş eti, ağız mukozası gibi yumuşak dokularda lokal etkiler oluşabildiği gibi sistemik reaksiyonlarda ortaya çıkabilir (Hume ve Gerzina 1996). Dentin gibi nemli bir yüzeye uygulanan polimerize olmamış serbest monomerler rezin esaslı materyallerden salınarak dentin tübüllerinden pulpaya ulaşabilir (Sauza Costa ve ark 2000). Birçok araştırma salınan monomerlerin hücre kültürlerinde biyolojik etkilere yol açtığını ispatlamıştır (Stanilawski ve ark 2003, Lafeuvre ve ark 2005). Bu çalışmada, diş hekimliğinde yaygın kullanım alanı olan ve yeni geliştirilen beş self etch KRS pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Kompozit rezin simanların sitotoksik özelliklerini belirlemeye yönelik araştırmalar literatürde çok fazla bulunmamaktadır. Bir araştırmada KRS'larla bir ekstraksiyon testi gerçekleştirildiği ve canlılığın MTT ile değerlendirildiği (Mendoça ve ark 2007) ve klinik bir çalışmada insan pulpasının cevabı ile ilgili bir histoloji çalışması yapıldığı görülmektedir (Costa ve ark 2006). Literatürde kompozit rezin simanların hücresel olarak oksidatif stres oluşumu ile ilgili bir çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ilk olarak KRS'lerin sitotoksik etkileri insan ve sığır pulpa hücrelerinin monolayer kültürlerinde kristal viyole testi ile materyalden salınan maddelerin sitotoksik etkisi incelendi. İkinci olarak Kompozit rezin simanların sığır ve insan hücreleri üzerinde sebep oldukları oksidatif stres belirlenerek, sitotoksikite sonuçları ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu iki toksisite testinde hem insan hem sığır pulpa hücreleri kullanıldı ve karşılaştırıldı. Monolayer hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgular materyaller hakkında belli ölçüde bir fikir vermesine karşın bu materyallerin *in vivo* koşullardaki durumunu tam olarak yansıtamadığı da ileri sürülmektedir.

Bu yüzden bu çalışmada son olarak, KRS'lerin sitotoksitesitesi, *in vivo* şartları günümüzde gerçeğine en yakın şekilde taklit edebildiği literatürde tespit edilen (Schmalz ve ark 1999, Schuster ve ark 2001), dentin bariyer düzeneğinde üç boyutlu hücre kültürleri kullanılarak değerlendirildi.

Bir restoratif tedavide, materyal ile pulpa dokusu arasında monomerlerin pulpaya geçişini önleyen bir dentin bariyer mevcuttur. Dentin bariyer testinde de test materyali ile hedef hücreler arasında bir difüzyon veya adsorpsiyon bariyeri olarak dentin yerleştirilmektedir. Ayrıca kan akımını taklit edebilmek için hücreler üzerinden besi ortamının perfüzyonu sağlanmaktadır. Üç boyutlu hücre kültürü testi ile çeşitli kimyasalların sitotoksitesitesi üzerine yapılan daha önceki çalışmalar laboratuvar içi tekrarlanabilir olduğu ve hayvan deneylerinden elde edilen *in vivo* çalışmaların sonuçları ile de uyumlu olduğu görülmüştür (Schuster ve ark 2001, Schmalz ve ark 2001).

Dentin bariyer testlerinde sitotoksitesite değerlendirmeleri; belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında, canlı hücre sayımı (Schmalz ve ark 1996) veya MTT ile enzim aktivitesindeki değişikliklere göre yapılabilmektedir (Schmalz ve ark 2002). Mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesini ölçmeye yönelik MTT değerlendirmeleri dental materyallerin sitotoksitesite değerlendirmelerinde sıkça kullanılmaktadır (Keiser ve ark 2000).

Bu çalışmada kullanılan farklı *in vitro* sitotoksitesite testlerinde KRS'lerin sitotoksitesiteleri değerlendirildiğinde direk kontak testleri ile dentin bariyer testinin sonuçlarının farklı olması dikkat çekmektedir.

Bir dental materyal geliştirilirken, fiziksel ve estetik özellikleri yanı sıra klinik uygulamalar öncesinde biyouyumluluğu da dikkate alınmalıdır. Her geçen gün yeni materyaller piyasaya sürüldüğünden, materyal klinik olarak kullanılmadan önce potansiyel zararlı etkilerinin anlaşılması amacıyla kısa sürede sonuç veren *in vitro* testlerle değerlendirilmelidir. Bu testler daha kompleks hayvan veya insan deneylerinden önce materyallerin toksik etkileri ile ilgili bilgi verebilir. Araştırmacılar sitotoksitesite değerlendirmeleri için pek çok yöntem önermişlerdir (Schmalz 1988, Schmalz ve ark 1994, Wang ve ark 1998, Geurtsen 1999, Sjögren 2000, Saw ve ark 2005). *In vitro* hücre kültürü testlerinde dikkate alınması gereken bazı faktörler

vardır (Schmalz 1994). Test edilecek materyalin fiziksel formu ve kullanılacak hücre kültürü yöntemi sonuçların kliniğe aktarılmasında çok önemlidir. Bir materyal test edileceğinde hedef hücreler ile kontağı direk, indirek veya materyal ekstraktı yoluyla olabilir. Hücrelerle temasta olan materyal yüzey alanının, klinik koşullara yaklaştırılmasına çalışılmalıdır. Benzer şekilde, kültür ortamının hacmi ve materyalin yüzey alanının ilişkisi de klinik koşullara yakın olmalı ve hedef dokulara göre şekillendirilmelidir. *In vitro* test metotlarında dikkate alınması gereken diğer faktör ise, test hücreleridir. Deneyler için uygun hücre tipinin seçilmesi de çalışma sonuçlarının kliniğe aktarılması noktasında önemlidir (ISO 10993 kısım 5, 1999). Bu sebeple, örneğin, hedef doku diş pulpası ise, pulpanın temel hücresel elemanları olan fibroblastlar veya odontoblastlar test için uygun hücrelerdir (Thonemann ve Schmalz 2000, Galler ve ark 2006).

Rezin esaslı dental restoratif materyallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla insan ve hayvanlardan elde edilen primer ve/veya oral dokulardan derive edilmiş immortalize hücreler kullanılabilir (Ratanasathien ve ark 1995, Geurtsen ve ark 1998). Diş pulpasından elde edilen primer hücreler *in vitro* olarak odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabilir (Andrews ve ark 1993, MacDougall 1995). Ancak, odontoblastlara farklılaşmanın özel hücre metabolizmaları ve hücreler arası ilişkiler ile ilgili *in vitro* araştırmalar kısıtlı sayıdadır. Daha da önemlisi, primer hücreler orijinal dokunun özel doku metabolizmalarını yansıttığı halde çok çeşitlilik gösterirler, örneğin proliferasyon aktivitesi konağın yaşı, hücrelerin kaynağı veya pasaj sayısı ile açıklanamaz (Pinzon ve ark 1966, Moule ve ark 1995). Primer hücreler birkaç kez sub-kültür yapıldıktan sonra yaşlandıkları için (Hayflick ve Moorhead 1961), hücre kültürü deneylerinde primer hücrelerin kullanımı sınırlıdır (Thonemann ve Schmalz 2000).

Literatürde ilk kez fare odontoblastları ısıya hassas SV40 Large t antijeni kullanılarak immortal hale getirilmiştir (MacDougall ve ark 1995). Thonemann ve Schmalz (2000) sığır pulpa hücrelerini ve Galler ve ark (2005) insan pulpa hücrelerini SV40 Large t antijeni ile transfekte ederek immortal hale getirerek, *in vitro* çalışmalarda kullanmışlardır. Kompozit rezin simanların sitotoksikite değerlendirmelerine yönelik literatür taramasında, Mendoça ve ark'nın (2007) MDPC-23 hücreleri (fare dental pulpa hücrelerinin) ile *in vitro* bir çalışma yaptıkları

tespit edildi. Bu çalışmada KRS'lerin pulpaya zararlı etkilerinin olabileceği göz önünde bulundurularak insan ve sığırdan derive edilmiş pulpa hücreleri kullanılmıştır.

İmmortal insan pulpa hücrelerinin orijinal dokunun fenotipik karakteristiklerini gösterebildiği ve dentinogenezis için gerekli özel doku moleküllerini ve proteinleri üretebildiği (Couble ve ark 2000, Galler ve ark 2006). Ayrıca bu hücrelerin *in vitro* araştırmalarda hücre metabolizması ve hücreler arası ilişkileri anlamaya yardımcı olabilecek büyüme faktörleri, sitokinler gibi çeşitli molekülleri sentezleyebildikleri ve böylece bu hücreler dental materyallerin sitotoksik etkilerini belirlemede diğer hücrelerden daha gerçek cevap verebildiği ileri sürülmüştür (Galler ve ark 2006). Bu araştırmada kristal viyole test yönteminde, hücreleri kültüre etmek için materyal ekstratı içeren besi ortamları kullanıldı. Bu tür uygulamalarda, materyalin hem direkt temasında, hem de hücrelerden uzakta meydana getireceği etkiler belirlenebilmektedir. Keiser ve ark (2000) rapor ettiği gibi materyal ekstratlarının kullanılmasının bir diğer avantajı, dilüsyonlar yapılabilmesine izin vermesi ve doz-cevap ilişkisinin gözlenmesini sağlayarak, test edilen hücreler üzerindeki en ideal konsantrasyonun belirlenmesine yardımcı olmasıdır.

Kompozit rezin simanların biyouyumluluğunu belirlemek amacı ile *in vitro* koşullarda düzenlenen araştırmalarda, sitotoksosite testlerinin kullanıldığı görülmektedir (Costa ve ark 2006, Mendoça ve ark 2007). Dental materyallerin biyolojik uyumlarının değerlendirilmesinde, çalışmaları birbiri ile kıyaslamak için standart uygulamaların önemi üzerinde durulmaktadır (Schmalz, 1997). Çünkü farklı test metodları ile bazen aynı materyal için farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Schmalz 1994, 1996). Standart test metodlarını kullanmanın başlıca avantajı, yeniden tekrarlanabilirliği ve farklı laboratuvar koşullarında elde edilen verilerin karşılaştırılabilmesine olanak sağlamasıdır. Standardizasyon, aynı zamanda test seçimi ve adaptasyonunun usule uygun hale gelmesi anlamına gelmektedir. Ancak, standart uygulamalar daha fazla zaman alıcıdır. Ayrıca, böyle standartlarda yeni geliştirilen test metodları bulunmayabilir. Çünkü teknolojinin standartlardan daha hızlı ilerlemesinin, standartların sürekli olarak uygulanmasını güçleştirdiği rapor edilmektedir (Hanks ve ark 1996). Bununla birlikte, koşullar uygunsa, standart test metodlarının kullanılması ve standart testler uygulanmadığı durumlarda, açıklayıcı

nedenlerin ortaya konulması gerektiği vurgulanmaktadır (Schmalz 1994). Bu görüşlerden hareketle araştırmamızda, ISO 7405: 1997 ve ISO 10993: 5-1999'da *in vitro* sitotoksosite değerlendirmelerinde kullanılması önerilen test metotlarından ekstraksiyon testleri kullanıldı.

Ekstraksiyon testlerinde, değerlendirmede kristal viyole boyasının optik yoğunluğunun ölçülmesi sonucunda elde edilen veriler kullanıldı. Bu testte, kristal viyole fikse hücrelerdeki nükleer proteinlere bağlanmakta ve bu kimyasal bağlanma kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılı seyretmektedir. Bu çalışmada kullanılan kristal viyole testi gibi farklı yöntemler ile sitotoksosite belirlenebilmektedir (Schweikl ve Schmalz 2000, Schweikl ve ark 2005, Şen 2005, Demirci ve ark 2008). Ancak görülen sitotoksitenin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği sorusuna verilecek cevaplar ile materyaller içerisinde sitotoksositeye yol açan etmenlere yönelik geliştirmeler yapılabilir. Bu çalışmada hücre canlılığını değerlendirmede kristal viyole testleri ile materyallerin sitotoksisiteleri arasındaki farklar belirgin şekilde değerlendirilebilmiştir.

Bu çalışmamada kristal viyole ve ROS testlerinde materyal ekstratlarının hazırlanmasında, Schweikl ve ark.'nın (2005) yaklaşımı seçildi. Bu amaçla, materyaller standart teflon halkalar içinde hazırlandı ve materyallerin polimerizasyonları tamamlandıktan sonra 24 saat serum içeren besi ortamı içerisinde bekletildi. Dilusyonlarını hazırlamak amacıyla, materyal ekstraktı içeren kültür ortamlarının belirli oranlarda kültür ortamı ile seyreltildi ve farklı konsantrasyonlarda besi ortamları elde edildi. Kristal viyole testlerinde değerlendirmede, kristal viyole boyasının optik yoğunluğunun bir ELISA reader ile ölçülmesi sonucunda elde edilen veriler kullanıldı. Bu testte, kristal viyole boyası fikse hücrelerdeki nükleer proteinlere bağlanmakta ve bu kimyasal bağlanma kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılı seyretmektedir. Kristal viyole ile boyanma sonrasında lizise uğramış hücre alanlarının şeffaf görüntü sergilediği, canlı hücre alanlarının mavi-mor renkte görüldüğü izlendi.

Deney materyallerinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksosite bulguları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm materyallerin 1:1 konsantrasyonları ve bazı materyallerin 1:2 konsantrasyonlarında sitotoksosite gözlenirken, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

konsantrasyonlarında sitotoksisite bulguları gözlenmedi. Böylece kristal viyole ve ROS deneylerinde değerlendirmeler için 1:1 konsantrasyonları esas alınmıştır.

Bu çalışmada kullanılan tüm kompozit rezin simanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sığır pulpa hücreleri üzerinde önemli derecede sitotoksisite gösterdiler. İnsan pulpa hücreleri üzerinde ise sadece Maxcem ve Panavia F 2.0 gruplarında toksisite görülürken, diğer grupların kontrol grubu ile benzer olduğu bulundu. Sonuç olarak, bu çalışmadaki kristal viyole bulgularına göre kompozit rezin simanların ekstraktlarına karşı insan pulpa hücrelerinin gösterdiği hücre canlılığı sığır pulpa hücrelerinden daha fazlaydı.

Kristal viyole testinde materyaller birbirleri ile karşılaştırıldığında Maxcem KRS hem insan hemde sığır pulpa hücrelerinde diğer simanlara kıyasla en yüksek oranda toksisite gösterdi. KRS'ler insan pulpa hücreleri üzerinde değerlendirildiğinde Maxcem'in diğer test edilen KRS'ler içerisinde en yüksek toksisiteye (% 63) sahip olduğu görüldü. Rely X Unicem Clicker ise en az toksisiteye (% 3) sahip olduğu bulundu. Diğer simanların ise insan pulpa hücreleri üzerine % 20-30 dolaylarında toksisite gösterdiği izlendi.

Sığır pulpa hücreleri üzerinde KRS'lerin toksisitesi Kristal viyole testi ile değerlendirildiğinde insan pulpa hücreleri üzerindeki benzer şekilde Maxcem'in en yüksek (% 79) sitotoksositeye yol açtığı, Rely X Unicem Clicker'in ise en az (% 17) sitotoksositeye yol açtığı diğer üç simanın ise % 30-35 dolaylarında sitotoksosite ile sonuçlandığı görüldü.

Kompozit rezin materyallerinin bütün konsantrasyonları karşılaştırıldığında bütün gruplarda yüksek konsantrasyonlarda sığır pulpa hücrelerinin yüzdesi insan pulpa hücrelerinden daha az olduğu görülmektedir. Buna karşılık daha düşük konsantrasyonda sitotoksik etkinin olmadığı veya az olduğu gruplarda sığır pulpa hücrelerinin yüzdesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Sığır pulpa hücreleri laboratuvar koşullarında daha çabuk gelişen hücrelerdir, bu yüzden toksik etkinin az olduğu konsantrasyonlarda 24 saatlik ekspoz süresi sırasında bu hücrelerin sayısı daha çok artarak böyle bir cevabın ortaya çıktığı düşünülmektedir.

İnsan ve sığırdan derive edilmiş hücreler üzerinde kompozit rezin siman materyallerinin ekstraktlarının canlılığa etkisi karşılaştırıldığında ise insan hücrelerinin yüzdesi tüm gruplarda daha yüksek olmasına rağmen istatistik olarak sadece Rely X ve Biscem gruplarında farklılık bulunmuştur. Bir materyalin sitotoksitesisi değerlendirileceğinde hedef hücreler üzerinde materyalin uygulanması kliniğe daha yakın sonuç verebilir.

Son zamanlarda, rezin monomerler, reaktif oksijen ürünlerinin seviyesinin artmasıyla ve ardından apoptosis yoluyla oluşan hücre ölümleri ile sonuçlanan, stabil hücresel redoks dengesini bozan kimyasallar olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, reaktif oksijen ürünlerinin seviyesinin yükselmesi genotoksik etkilerin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülen ajandır. Schweikl ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada TEGDMA ve HEMA'nın genotoksik etkileri gösterilmiştir.

Schweikl ve ark (2006) rapor ettikleri üzere hücre ve dokular aerobik metabolizma sonucu az miktarda reaktif oksijen ürünleri oluştururlar. Glutation gibi hücresel antioksidanlar bu reaktif molekülleri detoksifiye ederler, ancak bu reaktif oksijen ürünleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulduğu zaman oksidatif stres oluşur. Eğer oksidatif stres kalıcı olursa, lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasarlar oluşur. Sonuç olarak hücresel hasarlar, mutajeniyeye ve hücre ölümüne sebep olabilir. Bu çalışmada pozitif kontrol materyali olarak kullanılan TEG-DMA bir çalışmada aynı konsantrasyonda süt dişi pulpasında apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Spagnuolo ve ark 2004b). Negatif kontrol olarak ise sadece serum içeren besi ortamı verilen, muamele edilmemiş, boyanmış hücreler kullanıldı. Başka bir kontrol materyali yada daha yüksek konsantrasyon kullanılabilir ancak pek çok materyal içinde bulunan ve toksik etkileri olduğu bildirilen böyle bir materyal ile klinik duruma yakın cevap alınabilir.

Sığır pulpa hücreleri üzerinde deney materyallerinin hazırlanan ekstraktlarının 1:1 konsantrasyonlarının ROS üretimi pozitif kontrol grubu ile benzer olduğu, negatif kontrol grubundan ise istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi. Tüm materyallerde önemli miktarda ROS üretimi saptandı. En yüksek ROS değeri sığır pulpa hücrelerinde Biscem grubunda saptandı.

İnsan pulpa hücreleri üzerinde kullanılan KRS'ların ekstraktlarının 1:1 konsantrasyonlarının ROS üretimi pozitif kontrol grubu ile benzer olduğu, negatif kontrol grubundan ise istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi. Bu çalışmada insan pulpa hücrelerinin sığır pulpa hücrelerine göre daha fazla ROS ürettiği tesbit edildi. Örneğin pozitif kontrol grubunda insan pulpa hücrelerinin ROS üretimi floresans faktör değeri 5.093 iken sığır pulpa hücrelerinin ROS üretimi floresans faktör değeri 2.006 olarak tespit edildi. En yüksek ROS değeri insan pulpa hücrelerinde Rely X Unicem Clicker grubunda saptandı.

Sığır ve insan hücrelerinin ROS üretimi floresans faktör değeri karşılaştırıldığında Biscem ve Bistite II DC grupları dışındaki tüm gruplarda hücrelerin cevaplarında fark olduğu tespit edildi.

Sığır pulpa hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda ROS üretimi görülememesinin sebebi, sitotoksik olan yüksek konsantrasyonların hücre lizisine yol açması ve ROS oluşumu aşamasının saptanamaması olabilir. Histogram grafiklerinde de yüksek konsantrasyonlarda ölü hücrelerin sayısının fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca kristal viyole test sonuçları ile karşılaştırdığında da sığır pulpa hücrelerine materyallerin sitotoksik etkilerinin daha fazla olduğu, 1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarında canlılığını yitirmiş hücrelerin sayısının insan pulpa hücrelerine göre daha az olduğu tespit edildi.

Bu araştırmada test edilen Biscem ve Bistite II DC grupları dışındaki kompozit rezin simanlar 1 saatlik ekspoz süresi sonunda insan ve sığır pulpa hücrelerinde sellüler redoks durumunda değişikliklere sebep olmuştur. Maxcem, Rely X Unicem Clicker, Panavia F 2.0 ve TEG-DMA DCF ile belirlenen ROS oluşumunu artırdı. İlginç olarak sığır pulpa hücrelerinde Maxcem, Rely X Unicem Clicker, Panavia F 2.0 ve Bistite II DC gruplarında 1:2 konsantrasyonlarında orijinal konsantrasyondan daha yüksek ROS üretimi floresans faktör değerleri kaydedildi. Sığır pulpa hücrelerinde histogram grafiklerinde yapılan incelemelerde 1:1 konsantrasyonunda değerlendirilen hücre sayısının daha az olduğu, orijinal ekstrakta maruz kalan hücrelerin bir kısmının öldüğü ve buna bağlı olarak ROS değerlerinin yüksek konsantrasyonlarda azalmasının sebebi hücre canlılığının azalması ile ilgili olabilir. Buna karşılık insan pulpa hücrelerinde 1:1 konsantrasyonundan 1:32 konsantrasyonuna doğru ROS üretimi değerleri azaldı. Bu durum kristal viyole

bulgularında da olduğu gibi insan pulpa hücrelerinin sitotoksik ajanlara karşı gösterdiği hücre canlılığı sığır pulpa hücrelerinden daha fazla olması bu bulguları desteklemektedir.

Sığır ve insan pulpa hücreleri kıyaslandığında hem kristal viyole hem de ROS bulguları hücrelerin verdikleri cevap açısından farklı oldukları görüldü. Sığır pulpa hücrelerinde hücre canlılığı yüzdesinin tüm gruplarda insan pulpa hücrelerinden daha az olduğu, reaktif oksijen ürünleri üretiminde ise sığır pulpa hücrelerinin florasan faktör değerlerinin insan pulpa hücrelerinden çok düşük olduğu tespit edildi.

Bu araştırmada pozitif kontrol materyali olarak kullanılan rezin monomer TEG-DMA'nın ROS üretimini artırdığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. TEG-DMA'nın sebep olduğu oksidatif stres bulguları birçok rezin esaslı dental materyalin içinde bulunan HEMA ve foto sensitizerlerin bulguları ile aynı doğrultudadır (Chang ve ark 2005, Winter ve ark 2005, Spagnuolo ve ark 2006, Demirci ve ark 2008).

Burada belirtilen verilere göre, spesifik bileşikler ile ilişkili ROS üretimi hakkında bir sonuca varmak zordur. Yine de, TEGDMA ve HEMA gibi monomerler tarafından üretilen ROS'un hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini düzenleyen hücresel sinyal iletim ağlarını engellediği konusunda deliller vardır (Schweikl ve ark 2006). Bu yolla, monomerlerin ürettiği ROS apoptozis ile hücre ölümüne neden olur ve ayrıca dental adezivler ile temastan sonra hücrelerde apoptozis gözlenmiştir (Mantellini ve ark 2003, Roll ve ark 2004, Schweikl ve ark 2006). Dentin bağlayıcı ajanların TEGDMA veya HEMA gibi hidrofilik bileşenleri dentin içerisine difüze olabilir. Özellikle derin kavitelerde, pulpa hücrelerinin redoks durumunu bozacak yoğunlukta monomerler dış pulpasına ulaşabilir (Gerzina ve Hume 1994, Noda ve ark 2002). Böylece, KRS'ler tarafından üretilen ROS bir saatlik bir muamele sonunda gözlendi ve büyük olasılıkla apoptotik yolları tetikledi.

In vitro testlerin sonuçları ile klinik deneylerin sonuçları farklı çıkabilmektedir. Bu durum literatürde çinko oksit öjenol materyali ile gösterilmiştir. Schmalz ve ark (1994) yaptıkları çalışmada çinko oksit öjenol siman materyalinin ekstraksiyon testleri sonucunda güçlü toksik reaksiyonlar gösterdiği ancak bunun hayvanlar üzerinde yapılan pulpa çalışmalarıyla çelişkili olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra Schmalz ve ark (1999) üç boyutlu hücre kültürleri üzerinde aynı

materyali denemişler ve toksik reaksiyon oluşmadığını, bulguların *in vivo* veriler ile paralel olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada daha önce dentin bariyer testlerinde başarılı şekilde kullanılan (Schmalz ve ark 2001, Schuster ve ark 2001) sığır pulpa hücreleri kullanıldı, insan pulpa hücreleri meşler üzerinde halen üretilemediğinden kullanılamadı.

Klinik koşulları doğrudan hücre-materyal teması sağlayan *in vitro* sitotoksisite test yöntemlerinden daha iyi taklit edebilen *in vitro* dentin bariyer testi geliştirilmiştir. Bu test yönteminin kısmen hayvan deneylerinin yerini alma potansiyeli vardır. Bu amaçla bariyer fonksiyonu gören bir dentin diski, bir test materyali ve üç boyutlu pulpa hücresi kültürleri bir hücre kültürü perfüzyon odasında bir araya getirilmiştir (Schmalz ve ark 1999, Schuster ve ark 2001). Dentinin birçok materyal ve kimyasalın neden olabileceği hücre zararını engelleyen etkin bir bariyer olduğu birçok kez gösterilmiştir (Schmalz ve ark 2001, Schuster ve ark 2001, Costa ve ark 2006, Demirci ve ark 2008). Örneğin araştırmacılar, dentin disk kalınlığı 100µ'dan 500µ'a doğru artırıldığında dental materyallerin sitotoksitesinin azaldığını belirtmişlerdir (Galler ve ark 2005). Bu etkinin seçici olduğu ve dentin ile temastaki materyalin kimyasal yapısına bağlı olduğu gözlenmiştir (Schmalz 1999, Schuster 2001, Galler ve ark 2005). Çalışmamızda sadece Maxcem KRS'nin dentin bariyer testinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitotoksik olmadığı, diğer tüm KRS'ların sitotoksik olduğu tespit edildi. Bu sonuç kristal viyole test sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Maxcem KRS kristal viyole testlerinde % 65 hücre ölümüne sebep olarak en toksik madde olduğu ayrıca önemli derecede ROS üretimine sebep olduğu tespit edildi. Muhtemelen, Maxcem KRS ekstraksiyon testlerinde örneklerin besi ortamında bekletilmesi sırasında salınan bileşikler, dentin bariyer testlerinde materyal ve hücreler arasına yerleştirilen 500 µ kalınlığındaki dentin diskinin koruyucu etkisi ile pulpaya ulaşamamaktadır. Materyallerin klinik uygulanması sırasında Maxcem KRS'nin en çabuk polimerize olan materyal olduğu gözlemlendi ve muhtemelen bu nedenle dentin bariyer testi sırasında dentinden difüze olmadığı düşünülebilir.

Rely X Unicem Clicker ve Panavia F 2.0 KRS sığır hücrelerinde insan hücrelerine göre hem daha yüksek toksisite hem de daha fazla ROS oluşturdu. Bu durum aynı grup hücrelerde olsa insan ve hayvan hücrelerinin nispeten farklı cevaplar oluşturabileceğini ispatlıyor. Kristal viyole testinde Maxcem KRS'ye göre daha az sitotoksik etki göstermelerine rağmen dentin bariyer testinde daha fazla

sitotoksik etki gösterdiler. Klinik uygulama sırasında özellikle Rely X Unicem Clicker ve Panavia F 2.0 KRS'nin akıcı kıvamı dikkat çekti. Dentin bariyer testinde yüksek toksik etki göstermelerinin sebebi bu akıcı kıvamları yüzünden dentinden kolay difüze olmaları olabilir.

Reaktif oksijen türleri genellikle genotoksiktir (Forth ve ark 2005). Bununla birlikte, dental rezin ve monomerlerin neden olduğu genotoksik etkiler ROS üretiminden kaynaklanan oksidatif yaralanmaların bir sonucu olarak gösterilmiştir (Chang ve ark 2005, Winter ve ark 2005, Sheweikl ve ark 2007). Test edilen KRS tarafından üretilen ROS ile sitotoksisite sonuçları arasında açık bir ilişki yoktu. Ancak KRS'ların sıgır hücrelerinde ROS üretimi bulguları ile dentin bariyer testi bulguları benzerdi. Maxcem KRS sıgır hücrelerinde en az ROS üretimini oluştururken dentin bariyer testinde ise hücre canlılığına en az etki eden materyal olduğu tespit edildi. Buna karşılık Bistite II DC sitotoksisite açısından kristal viyole ve dentin bariyer testinde hücre canlılığına en az etki eden materyallerden olduğu ancak önemli derecede ROS üretimine sebep olduğu tespit edildi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre dental materyallerin bu yönü daha karmaşık gibi görünmektedir.

Firmalardan alınan bilgilere göre Rely X Unicem Clicker ve Biscem KRS'lerin TEG-DMA içerdiği ve bu materyallerin dentin bariyer testlerinde hücre canlılığına en çok etki eden materyallerden olduğu, diğer materyallerin farklı metakrilat türevleri içerdiği tespit edildi. Biscem KRS hem insan hem de sıgır pulpa hücrelerinde önemli derecede ROS üretimine sebep olurken, dentin bariyer testinde de en sitotoksik olan materyaldi. Ancak bu materyal kristal viyole testinde sıgır pulpa hücrelerine toksik iken insan pulpa hücrelerine toksik olmadığı tespit edildi.

Mendoça ve ark (2007) yaptıkları *in vitro* çalışmada oto adeziv yeni bir rezin siman olan Rely X Unicem Clicker KRS pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve TEG-DMA, metakrilat asit fosfat esterleri, dimetrilatlar gibi bir çok toksik rezin monomer içeren Rely X Unicem KRS'in ekstraktlarının MDPC-23 hücreleri üzerine düşük toksik etki gösterdiği bildirilmiş. Bu bulgu mevcut çalışmanın Kristal viyole testi bulguları ile aynı doğrultuda olduğu, ancak ROS üretiminin yüksek olduğu ve dentin bariyer testinde üç boyutlu hücre kültürleri üzerine önemli derecede sitotoksik olduğu görüldü.

Altıntaş (2007) altı kompozit rezin simanın artık monomer salınımının *in vitro* şartlarda incelediği çalışmada Rely X Unicem KRS grubunda en az toplam monomer salınımının görüldüğü grup olduğunu belirtmiştir. Özellikle Rely X Unicem self-etch

rezin simanı yeni geliştirilmiş multifonksiyonel fosforik asit metakrilatları içeren organik matriksten oluşmaktadır. Fosforik asit metakrilatları yapıştırma ajanı içerisindeki temel doldurucularla ve dışteki hidroksiapatitlerle reaksiyona girmektedir (Mak ve ark 2002). Rely X Unicem'den salınan monomer miktarının az olması yeni geliştirilmiş multifonksiyonel fosforik asit metakrilatları içeren organik matriks yapısından kaynaklanabilir ve Kristal viyole testinde bu rezin simanın toksisitesinin düşük olması bu sebeple olabilir. Dentin bariyer testinde yüksek toksik cevap bu materyalin yüksek ROS üretimi ile alakalı olabilir.

Rely X Unicem KRS'de olduğu gibi Panavia F 2.0 KRS'nin sığır hücrelerinde hem daha fazla toksisite hem de daha fazla ROS oluşumu bu simanın da toksisitesini açıklamada yardımcı olabilir.

Materyallerinin sitotoksik etkileri salınan monomer miktarına bağlıdır. Salınan monomerlerin miktarında etkili olan faktörlerden biri de polimerin dönüşüm derecesidir. Resin esaslı materyalden dönüşüm derecesi ne kadar fazla olursa salınan monomer miktarı da o kadar azalır (Ferracane 1994). Resin esaslı materyallerde, monomerlerin dönüşüm oranına yani polimerizasyon derecesine kullanılan ışığın yoğunluğu ve süresi, materyal içerisindeki başlatıcı ve monomer sisteminin özellikleri gibi çeşitli faktörler etki etmektedir (Geurtsen 1998). Araştırmalar dual polimerize olan simanlarda ışığın ulaşamadığı bölgelerin, hiçbir zaman kimyasal sertleşen simanlardaki kadar tam sertliğe ulaşamadığını göstermiştir (Darr ve Jacobsen 1995). Bu araştırmada kullanılan dual cure KRS'ler kristal viyole ve ROS üretiminin tespit edilmesi testlerinde örnekler her iki taraftan polimerize edildi ancak dentin bariyer testinde ise klinik koşullara benzer şekilde sadece üst yüzeyden polimerize edildi. Ektstraksiyon testlerine göre dentin bariyer testinde Maxcem KRS'nin daha az toksisite göstermesi bu materyalin self-cure redoks başlatıcıları, foto başlatıcıları ile diğer materyallerden daha iyi polimerize olabilir ve dentinden difüze olan artık monomer miktarı daha az olabilir. buna karşılık diğer KRS'lar dentin bariyer düzeneğinde yetersiz polimerize olarak, sitotoksisite artmış olabilir.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre test edilen farklı deneylerde resin simanların sitotoksik etkileri görüldü. Kullanılan resin simanların diş hekimliğindeki

önemi ve yeri gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle rezin simanların biyouyumluluğun artırılması için çeşitli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, beş farklı kompozit rezin simanın insan ve sığır pulpa hücrelerinde reaktif oksijen üretimleri ve sitotoksik etkileri araştırılmış, çalışmanın yürütüldüğü deneysel koşullar içerisinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Kristal viyole testinde, 24 saatlik muamele sonunda hücrelerin hayatta kalabilmeleri esas alındığında test edilen bütün rezin simanlar sığır hücreleri üzerinde sitotoksik iken insan pulpa hücreleri üzerinde sadece Maxcem ve Panavia F 2.0 gruplarında sitotoksikite görüldü.
2. Üç boyutlu hücre kültürünün kullanıldığı dentin bariyer yöntemi ile test edildiğinde ise kristal viyole testlerinde yüksek oranda toksik olan Maxcem KRS'in toksik etki göstermediği diğer tüm materyallerin toksik olduğu bulundu. Bu bulgu göstermektedir ki, KRS'lar uygulandıktan hemen sonra pulpa dokusunda oluşabilecek yaralanmalara karşı dentin koruyucu görev görebilir. Ancak materyallerin tek düzlem kültürlerindeki sitotoksik potansiyellerinin klinik önemi de göz ardı edilebilir.
3. İnsan pulpa hücrelerinin KRS'lere ajanlara karşı gösterdiği hücre canlılığı kristal viyole testlerinde tüm gruplarda sığır pulpa hücrelerinden daha fazlaydı. Ancak kristal viyole testinde iki hücre kıyaslandığında sadece Rely X Unicem ve Biscem gruplarının cevapları arasında fark bulundu.
4. Kristal viyole testinde hem insan hem de sığır pulpaları üzerine Maxcem KRS'nin en toksik olan materyal olduğu saptandı.
5. Kristal viyole testinde hem insan hem de sığır pulpaları üzerine en az toksik olan materyalin Rely X Unicem KRS olduğu saptandı.
6. Pulpa hücrelerinin hücresel redoks durumunun bütün KRS tarafından bozulduğu gözlemlendi. Böylece, derin kavitelerde, koruyucu bir dentin tabakası olmadığı zaman ve pulpa hücreleri bu materyaller ile temas ettiğinde biyolojik olarak aktif bileşen konsantrasyonları pulpa hücrelerinin metabolizmasını bozacak kadar fazla olabilir.
7. Reaktif oksijen ürünleri üretimi açısından en yüksek floresans faktör değeri insan pulpa hücrelerinde Rely X Unicem Clicker ve sığır pulpa hücrelerinde ise Biscem grubunda olduğu belirlendi.

8. Reaktif oksijen ürünleri üretimi açısından en az florasans faktör değeri insan pulpa hücrelerinde Biscem ve sığır pulpa hücrelerinde ise Maxcem grubunda olduğu belirlendi.
9. KRS'lere karşı reaktif oksijen üretimi açısından hücreler kıyaslandığında insan pulpa hücrelerinin sığır pulpa hücrelerine göre florasans faktör değerlerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir, Maxcem, Rely X Unicem Clicker ve Panavia F 2.0 gruplarında bu iki hücre cevabı arasında fark bulundu.
10. Kompozit rezin simanların dentin bariyer testi ile elde edilen sitotoksosite bulgularına göre Maxcem KRS en yüksek hücre canlılığı ile kontrol grubuna benzer cevap gösterdi.
11. Dentin bariyer testinde en düşük hücre canlılığı Biscem grubunda saptandı.
12. ROS üretimi belirli bir düzeyde sitotoksosite ile ilişkili olduğu anlaşıldı. Ancak başka mekanizmalar da araştırılmalıdır.
13. Kristal viyolede sitotoksik sonuç veren bir materyal dentin bariyerinde farklı bir sonuç verebilmesi, materyallerin toksisitesi araştırılırken farklı metotların bir arada kullanmasının gerekliliği ispatlandı.

6. ÖZET

S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA 2009

Hayriye Esra Ülker

Danışman

Abdülkadir Şengün

Dentin Bariyer Testi ile Diş Hekimliğinde Kullanılan Kompozit Rezin Simanların Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Kompozit rezin simanlar kompozit ve seramik inlay, onlay simantasyonu, kron ve köprü simantasyonu, gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Sıklıkla direk olarak prepare edilmiş dentin üzerine uygulandıkları için kompozit rezin simanların biyouyumluluğu çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı, beş farklı kompozit rezin simanın sığır ve insan pulpa hücrelerinin canlılıkları üzerine etkilerinin ve oluşturdukları reaktif oksijen ürünlerinin direk kontak testleri ile ve günümüzde *in vivo* durumu en iyi şekilde taklit ettiği literatürde bildirilen dentin bariyer testleri ile değerlendirilmesidir.

Klonal SV 40 large T-antijeni ile transfekte edilmiş sığır ve insan pulpa hücreleri 96 yuvacıklı hücre kültür kaplarına alındı ve 24 saat 37°C’de inkübe edildi. Rely X Unicem Clicker, MaxCem, Panavia F 2.0, BisCem ve Bistite II DC Kompozit rezin simanlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda standart teflon halkalar içinde hazırlandı ve polimerize edildi. Örnekler 24 saat serum içeren kültür ortamında saklandı. Kristal viyole testi için, sığır ve insan pulpa hücreleri 24 saat materyal ekstraktı içeren kültür ortamına maruz bırakıldı ve hücre canlılığı kristal viyole boyası ile değerlendirildi. Kompozit rezin simanların monolayer hücre kültürlerinde reaktif oksijen ürünleri üretimi tespiti için materyal ekstraktı içeren kültür ortamına 1 saat maruz bırakılan insan ve sığır pulpa hücrelerinin reaktif oksijen ürünleri üretimi flow sitometre (FAC’S) cihazı ile değerlendirildi. KRS’lerin sitotoksitesi, dentin bariyer düzeneğinde üç boyutlu hücre kültürleri kullanılarak değerlendirildi. Yapay hücre kültürü perfüzyon odaları dentin diski ile iki odaya ayrıldı. Paslanmaz çelik bir taşıyıcı içinde üç boyutlu hücre kültürleri dentine temas edecek şekilde yerleştirilerek pulpa odası kısmı oluşturdu. Dentin diskinin kavite kısmına ise materyaller uygulandı ve polimerize edildi. Daha sonra, pulpal kısımda hücre kültürlerinin kültür ortamı ile perfüzyonları (2ml/dk) sağlandı, 24 saat sonra hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Mann-Whitney U testi ile istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

Kristal viyole testinde, bütün kompozit rezin simanların sığır pulpa hücreleri üzerine sitotoksik olduğu, ancak insan pulpa hücreleri üzerine sadece Maxcem ve Panavia F 2.0 KRS'lerin sitotoksik olduğu tespit edildi. Ayrıca hem insan hem de sığır pulpa hücreleri üzerinde bütün kompozit rezin simanların reaktif oksijen ürünleri üretimini önemli derecede artırdığı saptandı ve dentin bariyer testinde Maxcem kompozit rezin siman en yüksek hücre canlılığı ile kontrol grubuna benzer cevap gösterdi diğer tüm test edilen materyaller üç boyutlu hücre kültürleri üzerine sitotoksik olduğu belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada test edilen kompozit rezin simanların farklı deneylerde sitotoksik etkileri görüldü. Kullanılan kompozit rezin simanların diş hekimliğindeki önemi ve yeri gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kompozit rezin simanların sitotoksik potansiyelleri klinik kullanıma ışık tutabilir. Bazı kompozit rezin simanlar dentin kalınlığının yetersiz veya pulpa ile yakın temasta olduğu durumlarda biyolojik olarak aktif monomerler pulpa hücrelerinin metabolizmalarını bozabilir. Bu nedenle rezin simanların biyouyumluluğunun artırılması için çeşitli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

8. SUMMARY

Cytotoxicity Evaluation of Dental Composite Resin Cements by Dentin Barrier Test

Composite resin cements have a wide application area and are being use for cementation of composite or ceramic inlay, onlay, fractured teeth, cementation of crowns, bridges and often applied directly to the prepared dentin, so biocompatibility of composite resin cements are very important. The purpose of this study was to evaluate the effects of five self-etch dental composite resin cements on the cell viability of bovine and human pulp derived cells. We hypothesized that composite resin cements might cause cytotoxicity in pulp cells via the generation of reactive oxygen species (ROS), which may also contribute to genotoxic effects *in vitro*.

Clonal SV 40 large T-antigen transfected bovine and human pulp-derived cells were seeded into 96-well plates for 24h at 37°C. The composite resin cements; Rely X Unicem Clicker, MaxCem, Panavia F 2.0, BisCem and Bistite II DC were prepared according to the manufacturers' instructions in standart teflon disks and samples were extracted in complete cell culture medium for 24 hours. For Crystal violet test, the bovine-pulp derived cells and transformed human pulp-derived cells were exposed to extracts for 24 h and cell viability determined using a crystal violet assay. The generation of ROS in monolayer cultures was measured after a 1h exposure period by flow cytometry (FAC'S). The cytotoxicity of the same materials was also analyzed in a dentin barrier test device using three-dimensional pulp cell cultures. A commercially available cell culture perfusion chamber was separated into two compartments by dentin disk. The three-dimensional cell culture tissues were placed in direct contact with the dentin disk and held in place by the stainless-steel holder. Test materials were introduced into the upper compartment in direct contact with the cavity side of the dentin disks. Then, the materials were cured according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the pulpal part of the perfusion chamber containing the cell cultures was perfused with medium (2 ml/h). After an exposure period of 24 h, the cell survival was determined by the MTT assay. Statistical analysis were performed using the Mann–Whitney *U*-test.

In crystal violet test, all composite resin cements tested cytotoxic on bovine pulp cells but only Maxcem and Panavia F 2.0 were cytotoxic on human pulp cells. All composite resin cements increased the amounts of ROS on bovine and human pulp cells and in dentin barrier test cell survival was similar with Maxcem and negative control group, and all other tested materials were cytotoxic for three dimensional cell cultures.

As a conclusion, in this study tested composite resin cements showed cytotoxic effects in different experiments. Nowadays in dentistry the significance of composite resin cements are being more important. The cytotoxic potencies demonstrated by these materials might be of clinical relevance. Some composite resin cements the concentrations of biologically active ingredients of some of the composite resin cements may be high enough to modify pulp cell metabolism when the materials are used in deep cavities or directly contact pulp tissue. Therefore to increase biocompatibility of resin cements we must take some precautions.

9. KAYNAKLAR

1. Alanko K, Susitaival P, Jolanki R, Kanerva L. Occupational skin diseases among dental nurses. *Contact Dermatitis*. 2004;50:77-82.
2. Altıntaş S. Farklı rezin simanların artık monomer salınımının *in vitro* şartlarda incelenmesi. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2007.
3. Andrews PB, Tencate AR, Davies JE. Mineralized matrix synthesis by isolated mouse odontoblast-like cells in-vitro. *Cells Mater*. 1993;3:67-82.
4. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, Guida L. *In vitro* biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dent Materials*. 2006;22:1081-5.
5. Anusavice KJ. Biocompatibility of dental materials In "Philips science of Dental materials". 10th Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia, 1996;75-110
6. Arenholt-Bindslev D, Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies; tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int Endod J*. 1990;23:84-91.
7. Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. *Arch Oral Biol*. 2001;46:391-401.
8. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. *Oral Oncol*. 2007;43:933-9.
9. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. *In vitro* cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*. 1996;22:244-8.
10. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:47-60.
11. Bryan TM, Reddel RR. SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog*. 1994;5:331-57.
12. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol*. 2005;25:101-8.
13. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*. 2005;26:745-53.
14. Chang Y. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91:230-4.
15. Costa CS, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mat*. 2006;22:954-62.
16. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int*. 2000;66:129-38.
17. Çobanoğlu N. Bir antibakteriyel bonding ajanın pulpa cevabı ve marjinal bakteri sızıntısı üzerine etkilerinin in-vivo ve in-vitro incelenmesi. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2006.
18. Darr AH, Jacobsen PH. Conversion of dual cure luting cements. *J Oral Rehabil*. 1995;22:43-47.
19. Dayangaç B. Kompozit rezin restorasyonlar. Ankara Güneş Kitabevi LTD Şti. 2000;74-84.
20. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dental Mater*. 2008;24:362-71.
21. Diaz-Arnold AM, Vargas MA and Haselton DR. Current status of luting agents for fixed prosthodontic. *J Prosthet Dent*. 1999;81:135-41.
22. Dunkin RT, Chambers DW. Gingival response to class V composite resin restorations. *J Am Dent Assoc*. 1983;4:482-4.
23. Eriksen HM, Leidal TI. Monkey pulpal response to composite restorations in cavities treated with various cleansing agents. *Scand J Dent Res*. 1979;87:309-17.
24. Feilzer AJ, de Gee AJ, Davidson CL. Setting stresses in composites for two different curing modes. *Dent Mater*. 1993;9:2-5.
25. Ferracane IL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*. 1994;21:441-52.
26. Ferracane IL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6:302-18.
27. Freshney RI. Culture of Animal cells: A manual of basic techniques, 2nd Edition. Allan R. Liss, Inc, NY. 1987.
28. Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:138-46.

29. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin –resin composite combinations through dentin *in vitro*. J Dent. 1996;24:125-28.
30. Geurtsen W. Cellular compatibility of dental composite resins. Munich, Germany Carl Hanser Publ. Comp. ISBN 3-446-150. 1988;58-7.
31. Geurtsen W, Schoeler I. A 4-year retrospective clinical study of class I and II composite fillings. J Dent. 1997;25:229-32.
32. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials-histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. Clin Oral Invest. 1997;1:5-11.
33. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Sci. 1998;106:687-95.
34. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. J Dent Res. 1998;77:2012-19.
35. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. Biomed Mater Res. 1999;44:73-77.
36. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;3:333-35.
37. Geurtsen W. Toxicology of dental materials and 'clinical experience' [editorial]. J Dent Res. 2003;82:500.
38. Gilles RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem. 1986;159:109–13.
39. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:13–27.
40. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials. 1996;17:103-14.
41. Goracci G, Mori G, Bazzucchi M. Marginal seal and biocompatibility of a fourth-generation bonding agent. Dent Mater. 1995;11:343-47.
42. Gümüşderelioglu M. Biyomalzemeler. Bilim ve Teknik Dergisi. Temmuz. 2002.
43. Hanks CT, Diehl ML, Makinen PL, Pashley DH. Characterization of the “The *in vitro* pulp chamber” using the cytotoxicity of phenol. J Oral Pathol Med. 1989;18:97–107.
44. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res. 1991;70:1450-5.
45. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: A review. Dent Mater. 1996;12:186-93.
46. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1961;25:585-621.
47. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. J Dent. 1999;27:557-64.
48. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. Mutat Res. 1996;368:181-94.
49. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. Int Endod J. 1988;21:89-99.
50. Holleman AF, Wiberg E. Inorganic Chemistry. Academic Press: San Diego. 2001.
51. Hume WR. Methods of assessment *in vitro* of restorative material cytotoxicity using an intact human dentine diffusion step. Int Endod J. 1988;21:85-8.
52. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin based materials which are applied to teeth. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7:172–9.
53. International Organization for Standardization. ISO 7405. Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry: Test methods. 1997.
54. International Organization for Standardization. ISO 10993-5, Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods. 1999.
55. Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Occupational skin allergy in the dental profession. Dermatol Clin. 1994;12:517-32.
56. Kanerva L. Cross-reactions of multifunctional methacrylates and acrylates. Acta Odontol Scand. 2001;59:320-29.
57. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological evaluation of dental materials by means of tissue culture. Int Dent J. 1968;18:443-67.
58. Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. J Endod. 2000;26:288-91.
59. Kömürçüoğlu E, Ölmez S, Vural N. Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants *in vitro*. J Oral Rehabil. 2005;32:116-21.

60. Kramer N, Lohbauer U, Frankenberger R. Adhesive luting of indirect restorations. *Am J Dent.* 2000;13:60-76.
61. Kuşdemir M. Farklı dentin bağlayıcı ajanların dentin testi kullanarak 1-929 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin incelenmesi, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2007.
62. Lefevre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2005;26:5130-7.
63. Leinfelder KF. A great concept in self-etching luting agents. *Inside Dentistry.* 2006;2:1-2.
64. Leiskar J, Helgeland K. A methodologic study of the effect of Dental materials on growth and adhesion on animal cells *in vitro*. *Scand J Dent Res.* 1972;80:120-33.
65. Leyhausen G, Heil I, Reifferscheid G, Geurtsen W. The genotoxic potential of composite components, *Dtsch Zahnärztl Z.* 1995;50:134-36.
66. Macdougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res.* 1995;33:97-103.
67. Macorra J, Pradies G. Conventional and adhesive luting cements. *Clin Oral Invest.* 2002;6:198-204.
68. Mak YF, Lai SCN, Cheung GSP, Chan AWK, Tay FR and Pashley DH. *Micro-tensile bond testing of resin cements to dentin and indirect resin composite.* *Dent Mater.* 2002; 18:609-21.
69. McComb D, Ericson D. Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J Prosthet Dent.* 1987;66:1025-8.
70. McCormick A, Campisi J. Cellular aging and senescence. *Curr Biol.* 1991;3:230-34.
71. Mendonça AAM, Chaves Souza PP, Souza Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on theodontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:102-8.
72. Meryon SD. The effect of zinc on the biocompatibility of dental amalgams *in vitro*. *Biomaterials.* 1984;5:293-7.
73. Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:263-71.
74. Mjör IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int.* 2002;33:35-63.
75. Moule, AJ, Li H, Bartold PM. Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J.* 1995;40:110-4.
76. Myhre O, Andersen JM, Aernes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2_,7_-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:1575-82.
77. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res.* 2002;81:265-9.
78. O'Brien WJ. *Dental Materials and Their Selection.* Quintessence Publishing Co, Inc, Chicago. 2002.
79. Ortengren U. On composite resin materials. Degradation, erosion and possible adverse effects in dentists. *Swed Dent J Suppl.* 2000;141:1-61.
80. Öztürk Ö, Uludağ B. Kompozit rezin esaslı yapıştırma simanları ve adeziv simantasyon tekniği. *Türk Dişhekimleri Birliği Dergisi.* 2002;4:32-9.
81. Pagoria D, Lee A, Geurtsen W. The effect of camphorquinone (CQ) and CQ-related photosensitizers on the generation of reactive oxygen species and the production of oxidative DNA damage. *Biomaterials.* 2005;26:4091-9.
82. Pashley DH, Adringa HJ, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol.* 1987;32:519-23.
83. Pearson GJ, Longman CM. Water sorption and solubility of resin-based materials following inadequate polymerization by a visible-light curing system. *J Oral Rehabil.* 1989;16:57-61.
84. Pinzon RD, Toto PD, O'Malley JJ. Kinetics of rat molar pulp cells at various ages. *J Dent Res.* 1966;45:934-8.
85. Polyzois GL. *In vitro* evaluation of dental materials. *Clin Mater.* 1994;16:21-60.
86. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison IB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74:1602-6.
87. Rosenstiel SF, Land MF, Crispin BJ. Dental luting agents: A review of the current literature. *J Prosthet Dent.* 1998;80:280-301.

88. Ruyter IE. Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials in an aqueous environment. *Adv Dent Res.* 1995;9:344–7.
89. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12:136-51.
90. Saw TY, Tong C, Yap AUJ, NG MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro.* 2005;19:145-54. .
91. Schmalz G. Biological proof of filling materials in the Gotting miniature pig-a pilot study. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1981a;36:357-60.
92. Schmalz G. Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien-Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Stuttgart, Thieme. 1981b.
93. Schmalz G. A cell culture method for the screening the biocompatibility of dental materials, In 'Biomaterials'. John Wiley and Sons LTD, New York. 1982; 321-6
94. Schmalz G. The agar overlay method. *Int Endod J.* 1988;21:59-66
95. Schmalz G, Schweikl H. A semi automated cell culture evaluation system for cytotoxicity testing of dental materials. *J Mat Sci Mater Med.* 1990;4:228-32.
96. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22:6–11.
97. Schmalz G, Hiller KA ve Dörter-Aslan F. New developments in the filter test system for toxicity testing. *J Mat Sci Mater Med.* 1994;5:43-51.
98. Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod.* 1996;22:249-52.
99. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest.* 1997;1:154-62.
100. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:696–706.
101. Schmalz G, Schuster U, Nuetzel K, Schweikl H. An *in vitro* pulp chamber with three dimensional cell cultures. *J Endod.* 1999;25:24-9.
102. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod.* 2001;2:96-102.
103. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod.* 2002;28:188-92.
104. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod.* 2001;4:259-65.
105. Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res.* 1999;438:71-8.
106. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80:1615-20.
107. Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. Mutagenic activity of structurally related oxiranes and siloranes in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 2002;521:19-27.
108. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wiczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials.* 2005;26:1713-9.
109. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85:870-7.
110. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007;23:688-95.
111. Sengün A, Buyukbas S, Hakki SS. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;78:131-7.
112. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress, *Environ Health Perspect.* 1999;107:5-24.
113. Sigma-Aldrich. Fundamental Techniques in Cell Culture. Web sayfası: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/Key_Resource/s/ECACC_Handbook.html. 2007.
114. Smith DC. A new dental cement. *Br Dent J.* 1968;5:124:381–4.
115. Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEG-DMA induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res.* 2004a; 83,703-7.

116. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, et al. NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. J Dent Res. 2004b;83:837-42.
117. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-l-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. Biomaterials. 2006;27:1803-9
118. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. J Biomed Mater Res. 2003;66:476-82.
119. Stanley HR, Going RE, Chauncey HH. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. J Am Dent Assoc. 1975; 91:817-25.
120. Şen D. Sabit restorasyonların simantasyonlarında kullanılan simanlar, Türk Dişhekimleri Birliği Dergisi, 2005;86:62-67.
121. Şen Tunç E. Mineral Trioxide Aggregate'in Sitotoksik ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye. 2005.
122. Thonemann B, Schmalz G. Bovine dental papilla-derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. Eur J Oral Sci. 2000;108:432-41.
123. Torstenson B, Nordenvall KJ, Brannstrom M. Pulpal reaction and microorganisms under Clearfil composite resin in deep cavities with acid etched dentin. Swed Dent J. 1982;6:167-76.
124. Tyas MJ. A method for *in vitro* toxicity dental restorative materials. J Dent Res. 1977;56:1285-90.
125. Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA, Lewis JB, Lockwood PE, Ergle JW et al. *In vitro* cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. Clin Oral Investig. 1999;3:144-9.
126. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. J Prost Dent. 2001;86:203-9.
127. Winter K, Pagoria D, Geurtsen W. The effect of antioxidants on oxidative DNA damage induced by visible-light-irradiated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine. Biomaterials. 2005;26:5321-9.
128. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res. 1997;37:517-24.
129. Zaimoğlu A, Can G. Sabit protezler, Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, Ankara. 2004.

10. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul’da doğdu. İlköğrenimini İstanbul Mevlana İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini Konya Selçuklu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 1999 yılında Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesini kazandı. 2004 yılında mezun olup aynı yıl Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı ve halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.