

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**ÜÇ FARKLI PROTEZ KAİDE MATERYALİNİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN
İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seçil ÖZKAN ATA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hüsnü YAVUZYILMAZ

ANKARA
Nisan, 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**ÜÇ FARKLI PROTEZ KAİDE MATERYALİNİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN
İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seçil ÖZKAN ATA

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hüsnü YAVUZYILMAZ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 03/2006–17 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Nisan, 2010

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay

İçindekiler

Resimler

Grafikler

Tablolar, Şekiller

Semboller, Kısaltmalar

Önsöz

i

iv

v

vii

viii

x

1.	GİRİŞ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Protez Kaide Maddeleri	3
2.1.1.	Protez Kaide Maddelerinin Tarihsel Gelişimleri	3
2.1.2.	Protez Kaide Maddelerinde Aranan Özellikler	4
2.1.3.	Protez Kaide Maddelerinin Sınıflandırılması	6
2.1.3.1.	Isı ile Polimerize Olan Akrilik Rezın	7
2.1.3.1.1.	Konvansiyonel Basınçla Kalıplama Tekniğı Kullanılarak Isı ile Polimerize Olan Akrilik Rezın	7
2.1.3.1.2.	Enjeksiyonla Kalıplama Tekniğı Kullanılarak Isı ile Polimerize olan Akrilik Rezın	8
2.1.3.2.	Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezın	9
2.1.3.2.1.	Konvansiyonel Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezın	9
2.1.3.2.2.	Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akışkan Akrilik Rezın	9
2.1.3.3.	Işık ile Polimerize Olan Akrilik Rezın	10
2.1.3.4.	Mikrodalga ile Polimerize Olan Akrilik Rezın	11
2.2.	Polimerler	12
2.2.1.	Polimerlerin Uzaysal Yapısı	12
2.2.2.	Polimerlerin Sınıflandırılması	14
2.2.2.1.	Termoplastik Polimerler	14
2.2.2.2.	Elastomerik Polimerler	15
2.2.2.3.	Termoset Polimerler	15
2.3.	Polimerizasyon	16
2.3.1.	Polimerizasyon Tipleri	16
2.3.1.1.	Yoğunlaşma (Kondenzasyon) Polimerizasyonu	16
2.3.1.2.	Katılma Polimerizasyonu	17
2.4.	Asetal Rezın	20
2.4.1.	Asetal Rezının Avantajları	21
2.4.2.	Asetal Rezının Dezavantajları	21
2.4.3.	Asetal Rezının Dişhekimliğinde Kullanım Alanları	21
2.4.3.1.	Estetik Kroşeler	21

2.4.3.2.	Postlar	22
2.4.3.3.	Hareketli Bölümlü ve Tam Protezler	22
2.4.3.4.	İmplantoloji	22
2.4.3.5.	Ortodontik Apareyler	22
2.4.3.6.	Pekiştirme Apareyleri	23
2.5.	Biyouyumluluk	23
2.5.1.	Biyolojik Test Yöntemlerinin Sınıflandırılması	24
2.5.1.1.	Öncül Testler	24
2.5.1.2.	İkincil Testler	26
2.5.1.3.	Kullanım Testleri	27
2.6.	Hücre Kültürü	28
2.6.1.	Hücre Kültürünün Tarihçesi	30
2.6.2.	Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması	31
2.6.2.1.	Primer Hücre Kültürleri	31
2.6.2.2.	Devamlı Hücre Kültürleri	31
2.6.2.3.	Diploid Hücre Kültürleri	32
2.6.3.	Hücre Kültürünün Kullanım Alanları	32
2.6.4.	Hücre Kültürü Yöntemlerinin Avantajları ve Dezavantajları	32
2.6.5.	Hücre Kültürü Test Yöntemleri	33
2.6.5.1.	Agar Overlay Test Yöntemi	34
2.6.5.2.	Agarose Test Yöntemi	35
2.6.5.3.	Milipore Filtre Test Yöntemi	35
2.6.5.4.	Krom Salınım Test Yöntemi	36
2.6.5.5.	Model Kavite Test Yöntemi	36
2.6.5.6.	Diş Kavite Test Yöntemi	36
2.7.	MTT Test Yöntemi	37
2.8.	Hücre Kültürü Laboratuvarı	39
2.8.1.	Hücre Üretme Yüzeyleri	40
2.8.2.	Hücre Kültürü Vasatları	40
2.8.3.	Kontaminasyon	42
2.8.4.	Pasajlama	42
2.9.	Fibroblast	43
2.10.	Konu İle İlgili Çalışmalar	44
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1.	Gereçler	48
3.1.1.	Deney Örneklerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Gereçler	48
3.1.2.	Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Gereçler	49

3.2.	Yöntem	55
3.2.1.	Test Örneklerinin Hazırlanması	56
3.2.2.	Örneklere Ait Ekstraksiyon Sıvılarının Elde Edilmesi	59
3.2.3.	Hücre Kültürünün Hazırlanması	60
3.2.4.	96 Gözlü Hücre Üretme Kaplarının (Mikropleyt) Hazırlanması	61
3.2.5.	MTT Testinin Uygulanması	62
3.3.	İstatistiksel Değerlendirme	64
4.	BULGULAR	65
4.1.	Protez Kaide Maddelerinin Altı Farklı İnkübasyon Periyodunda Sitotoksisitelerinin Karşılaştırılma Bulguları	68
4.2.	Farklı İnkübasyon Sürelerinde Protez Kaide Maddelerinin Sitotoksisitelerinin Karşılaştırılma Bulguları	73
5.	TARTIŞMA	84
6.	SONUÇLAR	99
7.	ÖZET	100
8.	SUMMARY	101
9.	KAYNAKLAR	102
10.	ÖZGEÇMİŞ	118

RESİMLER

- Resim 1: MTT sonrası formazan kristalleri canlı ve ölü hücrelerin görünümü
- Resim 2: Fare fibroblast hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü
- Resim 3: Deneyde kullanılan protez kaide materyalleri: a) Isı ile polimerize olan akrilik rezin, b) Asetal rezin, c) Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin
- Resim 4: Deney örneklerinin hazırlanmasında kullanılan araç ve gereçler:a) Pembe mum, b) Çelik kalıp, c) Kumpas
- Resim 5: Asetal rezin örneklerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler:a) Asetal rezin tableti,b) Renk Skalası, c) Özel mufla, d) Asetal rezin tüpü ve tableti
- Resim 6: Asetal rezin enjeksiyon makinesi
- Resim 7: a) Steril kabin, b) İnkübatör
- Resim 8: Deneyde kullanılan kaplar ve pipetler: a) 96 gözlü hücre üretme kabı, b) 6 gözlü hücre üretme kabı, c) Steril plastik T25 cm² kap, d) Pipet uçları, e) Santrifüj tübü, f) Pipetler
- Resim 9: Hücre kültürü deney aşamasında kullanılan solüsyonlar: a) DMEM, b) FBS, c) MTT, d) Tripsin/ EDTA solüsyonları.
- Resim 10: Hemositometre.
- Resim 11: a) Işık mikroskobu, b) İnverted doku kültürü mikroskobu
- Resim 12: Elisa okuyucusu
- Resim 13: a) Mum örnekler, b) Mufla içine yerleştirilmiş mum örnekler
- Resim 14: Asetal rezinin mufladan çıkmış hali
- Resim 15: 6 gözlü hücre salınım kaplarına yerleştirilmiş materyal örnekleri
- Resim 16: Örneklerin salınım sonrası ekstraksiyon sıvılarının konulduğu steril

tüpler

- Resim 17: L-929 hücrelerinin inverted doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü
- Resim 18: Hücrelerin MTT ile reaksiyonundan sonra oluşan formazan kristalleri (10X)
- Resim 19: 96 gözlü hücre üretme kapları
- Resim 20: Kontrol grubuna ait mikropleytin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü
- Resim 21: Asetal rezine ait mikropleytlerinin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü. (a: 1.saat, b: 1. gün, c: 3. gün, d: 5.gün, e: 7.gün, f: 14.gün)
- Resim 22: Isı ile polimerize olan akrilik rezine ait mikropleytlerinin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü.(a: 1.saat, b: 1. gün, c: 3. gün, d: 5.gün, e: 7.gün, f: 14.gün)
- Resim 23: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ait mikropleytlerinin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü.(a: 1.saat, b: 1. gün, c: 3. gün, d: 5.gün, e: 7.gün, f: 14.gün).

GRAFİKLER

- Grafik 1: Üç farklı protez kaide maddesi örneklerinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 2: Asetal rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 3: Isı ile polimerize olan akrilik rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar

- Grafik 4: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 5: Üç farklı protez kaide maddesi ve kontrol gruplarına ait örneklerin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar (A: Asetal rezin, B: Isı ile polimerize olan akrilik rezin, C: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin)
- Grafik 6: 1 saatlik inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 7: 1 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 8: 3 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 9: 5 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 10: 7 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar
- Grafik 11: 14 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar

Grafik 12: Farklı inkübasyon sürelerinde üç farklı protez kaide maddesine ait sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerinin ortalamaları.

TABLolar

Tablo 1: Polimerlerin sınıflandırılması

Tablo 2: Biyolojik test yöntemlerinin sınıflandırılması

Tablo 3: Hücre serileri ve kökenleri

Tablo 4: MTT Testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait bulguların standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ve hücre canlılık yüzdeleri

Tablo 5: Üç farklı protez kaide maddesinin altı farklı inkübasyon periyodunda sitotoksisiteleri arasında istatistiksel anlamlılık tablosu

Tablo 6: Üç farklı protez kaide maddesi ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık tablosu

ŞEKİLLER

Şekil 1: Polimerlerin uzaysal yapısı.

SEMBOLLER, KISALTMALAR

ADA	Amerikan Diş Hekimleri Birliği
ASTM	American Society for Testing and Materials
cm	Santimetre (10^{-2} m)
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
⁰ C	Santigrad derece
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
FBS	Fötal sığır serumu
FDI	Uluslararası Diş Hekimliği Birliği
Gr	Gram
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
kPa	Kilopaskal
L929	Fare fibroblast hücresi
ml	Mililitre ($=10^{-3}$ litre)
mm	Milimetre (10^{-3} m)
MHz	Megahertz
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
PMMA	Polimetil metakrilat
POM	Polioksimetilen
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TRIAD-VLC	Triad visible light cure
UV	Ultraviyole ışını
W	Watt

3T3	Fare fibroblast hücresi
μm	Mikrometre (10^{-6} m)
<	Küçüktür
>	Büyüktür

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin her aşamasında yol göstericiliği, engin bilgi ve deneyimi ile bana her zaman destek olan çok değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Hüsnü YAVUZYILMAZ'a,

Çalışma hayatım süresince değerli fikirlerinden yararlandığım Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Cihan AKÇABOY'a,

Tez çalışmamdaki büyük ilgi ve katkılarından dolayı Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünde görevli Biyolog Taibe YÜCEL ARSOY ve Şükran YILMAZ'a,

İstatistiksel değerlendirmedeki yardımlarından dolayı Kara Harp Okulu İstatistik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Filiz ERSÖZ'e,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok sevgili aileme,

Desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim, her konuda beni teşvik eden, sevgili eşim Dr. Nazım ATA'ya,

Gönülden teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Diş hekimliğinde protetik tedavi, kaybedilen diş ve çevre dokularının yapay materyaller ile tamamlanması olarak tanımlanır. Diş protezi, aşağıda dizelenen sorunları gidermeyi amaçlayan bir tedavi türüdür:

- Fonksiyonel: Beslenebilme ve çiğneme fonksiyonunu sağlamak,
- Fonetik: Güzel ve anlaşılabilir konuşmayı sağlamak,
- Kozmetik: Estetiği sağlamak,
- Biyolojik: Dokuların devamlılığını ve bütünlüğünü korumak,
- Psikolojik: Diş kaybından kaynaklanan psikolojik sorunları ortadan kaldırmaktır¹.

Restorasyonların estetik, fonksiyonel, ekonomik ve dayanıklı olmalarının yanında kullanılan materyallerin canlı dokularla biyolojik olarak uyumlu olmaları da istenmektedir. Diş eksikliğine bağlı olarak kaybolan ya da azalan fonetik ve fizyolojik gereksinimlerin karşılanması; dişin biyomekanik özellikleriyle uyumlu, estetik beklentilere cevap verebilecek yeterlilikte ve canlı dokulara toksik olmayan bir materyalin geliştirilmesi, dişhekimliğinde çok sayıda çalışmanın yapıldığı geniş bir alanı oluşturmaktadır.

Günümüzde, bir materyalin rutin klinik uygulamalara girebilmesi için, biyouyumluluk değerlendirmelerinin yapılması gerekliliği tartışmasız olarak kabul edilmektedir². İlgili literatürler incelendiğinde, protez kaide maddesi olarak kullanılan geleneksel akrilik rezinlerin biyouyumluluk değerlendirmelerinin yapıldığı çeşitli araştırmalar bulunmaktadır^{3,4,5,6,7}. Ancak 30 yıldır protez kaide maddesi olarak kullanılan asetale akrilik rezinler ile ilgili biyouyumluluk değerlendirmelerinin son derece kısıtlı olduğu dikkati çekmektedir. Bu nedenle, araştırmamızda; rutin pratikte kullanılan; ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ve

asetal rezinlerin sitotoksisitelerinin in vitro hücre kültüründe değeriendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Protez Kaide Maddeleri

Protez kaidesi, hareketli protezlerin yumuşak dokular üzerine yerleşen ve yapay diş içermeyen bölümleridir.

2.1.1. Protez Kaide Maddelerinin Tarihsel Gelişimleri

Protez kaide maddelerinin tarihsel gelişimi o dönemdeki teknoloji ile paralellik gösterir. Tarihte diş kayıplarının telafisi için, her dönemin teknolojisine göre malzemelerin kullanıldığı görülür. Malzemeler, zaman geçtikçe ve teknoloji ilerledikçe gelişme göstermiştir^{8,9,10}.

İlk protezler tahta, kemik ve fildişi gibi doğal materyaller kullanılarak elde edilmiştir. Döküm ve işleme yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte altın, gümüş, alüminyum gibi metal ve metal alaşımlarından elde edilen kaideler kullanılmaya başlanmıştır. 18. yüzyılın ikinci yarısında DeChemant ve DuChateau, porseleni protez kaide materyali olarak kullanıma sunmuşlardır. Porselen protez kaide materyalleri tahta, kemik ve fildişi kullanılarak hazırlananlara göre birçok avantaj sergilese de, manipülasyonlarının zor olması ve kırılganlıkları nedeniyle kullanımları terk edilmiştir¹⁰.

19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren protez kaidelerinin yapımında, vulkanize kauçuk, polistiren, epoksi, polivinil akrilik, polikarbonat, poliamid, naylon ve polimetil-metakrilat kullanılmaya başlanmıştır^{10,11}.

1839'da Dr. Charles Goodyear doğal kauçuğu sülfürle karıştırarak "Vulkanit" adı verilen vulkanize kauçuğu bulmuştur. Kolay kalıplanıp şekillendirilebilen bir termoplastik materyal oluşu, tükürükle

reaksiyona girmemesi ve çözünmemesi, uzun yıllar çiğneme kuvvetlerine dayanabilmesi gibi avantajlarına rağmen, koyu kahverengi ve opak oluşu nedeniyle estetik beklentileri karşılayamamıştır. 1869 yılında Vulkanit'e alternatif olarak daha ucuz ve daha doğal bir renge sahip olan "Sellüloid" geliştirilmiş ancak zamanla şekil değiştirmesi, kötü kokusu ve renk değiştirmesi yüzünden terkedilmiştir. 1891'e kadar Vulkanit, yaygın protez kaide materyali olarak kullanılmıştır^{12,13,14}.

1910 yılından 1950'ye kadar olan dönem "Termoplastik Dönem" olarak adlandırılabilir. Sonraki yıllarda, polimer teknolojisi ilerlemiş ve çapraz bağlı polimerler bulunmuştur. Yüzyılın ilk otuz yılında, günümüzde de çeşitli alanlarda hala kullanılmakta olan yeni materyaller geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları polistiren, polivinil akrilik, poliamid ve epoksi rezindir^{12,13,14}.

Akrilikler, 1937 yılında Walter H. Wright tarafından ilk kez tanıtılmıştır^{15,16}. Akrilik rezinlerin diş hekimliğine girmesini takiben 1946'ya kadar protez kaideleri büyük oranda bu materyallerden üretilmeye başlanmıştır.

2.1.2. Protez Kaide Maddelerinde Aranılan Özellikler

Protez kaide maddelerinde aranılan özellikler, fiziksel, mekanik, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir:

- Fiziksel özellikler:

1. Ağız dokularının doğal yapısını taklit edebilmelidir.
2. Ağız ortamındaki ısı artışlarına karşı dayanıklı olmalıdır.
3. Kuvvet karşısında şekli, hacmi ve boyutu değişmemelidir.
4. Hafif olmalıdır.

5. Isıyı yeterli derecede iletmemelidir.
6. İdeal olarak radyopak olmalıdır.
7. Renk değiştirmemelidir.

- Mekanik özellikler:

1. Esneme direnci yeterli olmalıdır.
2. Basma direnci yeterli olmalıdır.
3. Aşınmaya dirençli yüzey özellikleri göstermelidir.
4. Çiğneme kuvvetleri altında daimi deformasyon oluşmaması için yüksek elastisite modülüne sahip olmalıdır.

- Kimyasal özellikler:

1. Su emmemelidir.
2. Ağız sıvılarında çözünürlükleri az olmalıdır.

- Biyolojik özellikler:

1. Polimerizasyon öncesi ve sonrası, tüm yapım aşamalarında teknisyene ve hekime zarar vermemelidir.
2. Hastada irritasyon ve toksik etki yapmamalıdır.
3. Bakteri ve mantar üremesine olanak sağlamamalıdır.
4. Lokal doku reaksiyonu ve alerjiye neden olmamalıdır.

Ayrıca, ideal bir kaide maddesi; ekonomik olmalı, raf ömrü yeterli olmalı, tamiri ve yapımı kolay olmalı, protezin diğeri yapı elemanlarına tutunması iyi olmalıdır^{11,13,17}.

2.1.3. Protez Kaide Maddelerinin Sınıflandırılması

Protez kaide maddeleri, polimer yapıları ve polimerizasyon tipleri gibi kriterler göz önüne alınarak farklı şekillerde sınıflandırılabilirler:

- Polimer yapısına göre:

1. Poliakrilik asit ester,
2. Polivinil ester,
3. Polistiren,
4. Polikarbonat,
5. Polisülfon,
6. Lastik modifiye polimetakrilik asit ester,
7. Polidimetakrilik asit ester,
8. Poliasetal rezin/ Polioksimetilen (POM).

- Polimerizasyon Yolu ve Tekniğine Göre:

1. Isı İle Polimerize Olan Akrilik Rezin;
 - 1.1. Konvansiyonel Basınçla Kalıplama Tekniği İle Polimerize Olan Rezin,
 - 1.2. Enjeksiyon Kalıplama Tekniği İle Polimerize Olan Rezin.
2. Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezin;
 - 2.1. Konvansiyonel Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezin,
 - 2.2. Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akışkan Akrilik Rezin.
3. Işık İle Polimerize Olan Akrilik Rezin.
4. Mikrodalga İle Polimerize Olan Akrilik Rez^{11,12,17,18}.

2.1.3.1. Isı İle Polimerize Olan Akrilik Rezın

2.1.3.1.1. Konvansiyonel Basınçla Kalıplama Tekniği Kullanılarak Isı İle Polimerize Olan Akrilik Rezın

Günümüzde protez kaide maddesi elde etmek için en sık kullanılan yöntemdir. Akrilik rezın hamurunun mufla içindeki protez boşluğuna yerleştirilip preslenmesi ve sıcak suda polimerize edilmesi esasına dayanır. Polimer/monomer oranı hacimsel olarak 3/1'dir. Polimer ile monomerin fiziksel reaksiyonu sırasında ıslak kum aşaması, liflenme aşaması, hamurlaşma-çalışma aşaması ve lastik aşaması olmak üzere dört aşama mevcuttur. Muflalama hamurlaşma aşamasında yapılır¹⁹.

Sıcak su içerisinde polimerizasyon işlemi iki şekilde gerçekleştirilebilir:

Hızlı kaynatma işleminde muflalar preslendikten sonra brit ile sıkılır ve tamamı suyun içinde kalacak şekilde soğuk su dolu bir kaba yerleştirilir. Isı kaynağı uygun şekilde ayarlanarak kaynar suda en az 30 dk. kalması sağlanır. Sonra muflalar kendi suyu içinde ya da sudan çıkartılarak soğumaya terk edilir.

Yavaş kaynatma işleminde ise muflalar 65°C'de su içerisinde sekiz saat, ya da 70°C'de yedi saat; sonra 100°C'de üç saat bırakılmak suretiyle polimerize edilir²⁰.

Konvansiyonel basınçla kalıplama tekniği kullanılarak ısı ile polimerize olan rezınların avantajları; estetik uyumu, maliyetin düşük olması, yapımının, tesviye ve cilalama işlemlerinin kolay olmasıdır. Dezavantajları ise; darbe dayanıklılığının ve bükülme dayanıklılığının düşük olması, lokal doku

reaksiyonuna ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmesi şeklinde sıralanabilir¹².

2.1.3.1.2. Enjeksiyonla Kalıplama Tekniği Kullanılarak Isı İle Polimerize Olan Akrilik Rezin

Bu teknikte akrilik hamuru işlem boyunca devam eden 6 atmosferlik hava basıncı altında özel mufla içerisindeki protez boşluğuna enjeksiyon tekniğiyle gönderilerek ısı ile polimerize edilmektedir. Polimerizasyon büzülmesinin tamamen ortadan kaldırılarak doku uyumunun mükemmel olduğu protezler yapılması prensibini esas alan bu sistemde mekanizma sürekli ve sabit basınçla ilave rezinin daima hazırda bulunması şeklindedir.

Akrilik rezin dozu ayarlanmış özel kutusu içerisinde bulunmaktadır. Böylece hatalı dozaj söz konusu olmaz. Karışım el ile değil, vibratör aracılığıyla yapılır. Bu sayede daha homojen bir yapı elde edilir. Ayrıca materyalin kirlenmesi ve herhangi bir deri irritasyonu da önlenmiş olur¹⁷.

Enjeksiyonla kalıplama tekniği kullanılarak ısı ile polimerize olan akrilik rezinlerin avantajları; prova kapanışının yapılmaması, daha homojen bir yapıya sahip kaide plaklarının elde edilmesi, protezin dokulara uyumunun iyi olması, porözitenin hemen hiç görülmemesi olarak sıralanabilir^{12,17}. Özel muflalar, yardımcı enjeksiyon ekipmanı gibi özel araçlar gerektirmesi, pahalı olması, çatlak oluşumu ve akma direncinin düşük olması dezavantajlarıdır^{12,21}.

2.1.3.2. Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezın

2.1.3.2.1. Konvansiyonel Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezın

Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezınler dışarıdan ısı uygulanmadan oda ısısında polimerize olabilen kaide maddeleridir. Genellikle soğuk akrilik, kendi kendine sertleşen akrilik, otopolimerizan rezın ya da tamir akriliğı olarak adlandırılırlar. Diğır polimerize olan rezınlerden farkı, polimerizasyonu başlatıcı ajan olan benzoil peroksitin parçalanarak serbest radikaller oluşturmaları olayının, ısı yerine kimyasal bir aktivatörle sağlanmasıdır²¹. Çoğı durumda, kimyasal aktivasyon monomer içırsine dimetil-para-toluidin gibi bir tersiyer amin ilavesi ile sağlanır. Sülfirik asit veya bu asidin daha stabil olan tuzları da bu amaçla kullanılmaktadır^{17,22}.

Konvansiyonel kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezının avantajları; laboratuar işlemlerinin daha basit ve kısa olması, polimerizasyonun hızlı gerçekleşmesidir. Yapay dişlerle olan bağlantı zayıflığı, artık monomer oranının yüksek olması ise dezavantajlarıdır.

2.1.3.2.2. Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akışkan Akrilik Rezın

Karıştırıldığında düşük viskoziteye sahip, dökülebilir özellikte kimyasal olarak polimerize olan rezınlerdir. Bu tip rezınlerin polimerleri ince ve düzenli taneciklere sahiptir. Yüksek monomer / polimer oranı kullanılarak çok akışkan kıvamda karıştırılırlar. Karıştırma ve dökme aşamasında gereksiz viskozite artışını önlemek için yüksek molekül ağırlıklı polimer içerirler²¹. Bu teknikte protezin modelasyonu yapıldıktan sonra özel bir muflaya yerleştirilir. Kalıp materyali olarak alçı yerine hidrokolloid kullanılır. Hidrokolloidin jelleşmesinden sonra model ve üzerinde dişler olan kaide plağı çıkarılır. Daha sonra dişler ve ayırıcı ortam ile kaplanmış olan model muflaya yerleştirilir.

Akışkan rezin mufla deliklerinden mufla içine akıtılır. Mufla, rezin sertleşene kadar oda sıcaklığında basınçlı bir bölmede tutulur.

Akışkan rezin tekniğinin avantajları; daha iyi doku uyumu, dişlerde ve kaideye daha az hasar oluşması, daha az malzeme sarfı ve muflalama işlemlerinin daha basit olmasıdır. Dezavantajları ise; hava kabarcıklarının oluşması, muflalama sırasında dişlerin kayması, akrilik rezin dişlerin kaideye iyi bağlanamaması ve işlemlerin hassasiyet gerektirmesidir²².

Kimyasal olarak polimerize olan bazı akışkan rezinler enjeksiyon tekniği ile kalıplanarak da şekillendirilebilirler. Bunlar için özel bir düzene ve araç gerekmektedir²¹.

2.1.3.3. Işık ile Polimerize Olan Akrilik Rezin

Görünür ışıkla aktive edilen rezinler uzun yıllardan beri diş hekimliğinde kullanılmaktadır. Yüksek bir dirence sahip olan ışıkla polimerize akrilik rezinlerin boyutsal stabilitesi ve doku adaptasyonu son derece iyi, renk stabilizasyonları yüksek ve manipulasyonları kolaydır²⁰.

Günümüzde görünür ışıkla sertleşen en gelişkin protez kaide materyali TRIAD-VLC'dir. Bu materyal, üretan dimetakrilat matriks, akrilik kopolimer, küçük silika doldurucular ile kamforokinon amin fotoinitiatörünü içermektedir. Polimerizasyon, sisteme özgü bir kürleme ünitesi ile sağlanır. Işık kaynağına üniform bir şekilde maruz kalması için protez ünitedeki tabla üzerine yerleştirilerek rotasyon yaptırılır ve yüksek yoğunlukta kuartz halojen lambaları ile üretilen 400-500 nm dalga boyundaki mavi ışıkla sağlanır³.

Görünür ışıkla polimerize olan rezinlerin avantajları; muflalama, mum eritme ve presleme işlemlerinin ortadan kalkması sonucu yapım

aşamalarının kolay, çalışma süresinin kısa olması; doku uyumlarının iyi, toksik ve alerjik reaksiyon oluşturmamalarıdır. Diğer akrilik rezinler ile bağlantısı ısı ile polimerize olan akrilik rezinler kadar iyi olmaması, polimerizasyon aşamasında basınç uygulanmadığından polimerizasyon büzülmesi gözlenebilmesi, polimerizasyon sırasında mikro porözite ve hava kabarcığı oluşma olasılığı dezavantajlarıdır.

2.1.3.4. Mikrodalga ile Polimerize Olan Akrilik Rezın

Mikrodalga ile polimerize olan akrilik rezinler, içerisindeki MMA moleküllerinin 2450 MHz frekansta, elektromagnetik bir alanda saniyede 5 milyar kez dönme hareketini sağlayarak çok sayıda kutuplaşmış moleküllerin oluşumunu gerçekleştirirler. Sonuçta, moleküler sürtünmeden ısı meydana gelir ve oluşan ısı monomerin polimerizasyonunu sağlar^{23,24}.

Mikrodalga ile polimerizasyon yönteminde, karbon fiber ile güçlendirilmiş plastik muflalar ve bunları sabitlemek için özel olarak hazırlanmış metalik olmayan polikarbon sıkıştırma vidaları kullanılır.

Mikrodalga ile polimerize olan akrilik rezinlerin avantajları; zaman tasarrufu, laboratuarda daha temiz bir çalışma ortamının sağlanması, polimerizasyon büzülmesinin ve boyutsal değişikliğin düşük olması, protez kaidesinin alçıya olan adaptasyonunun artması, muflanın kenarı ile orta kısmı arasında ısı farkının olmaması, renk sabitliği, yüzey düzgünlüğü ve artık monomer miktarının düşük seviyelerde olması olarak sıralanabilir^{17,23,25,26}. Dezavantajları ise; özel mufla ve akrilik rezin ile mikrodalga fırınına ihtiyaç olması, maliyetin fazla olması ve birkaç protez yapımından sonra muflalarda bozulma görülmesidir^{18,25}.

2.2. Polimerler

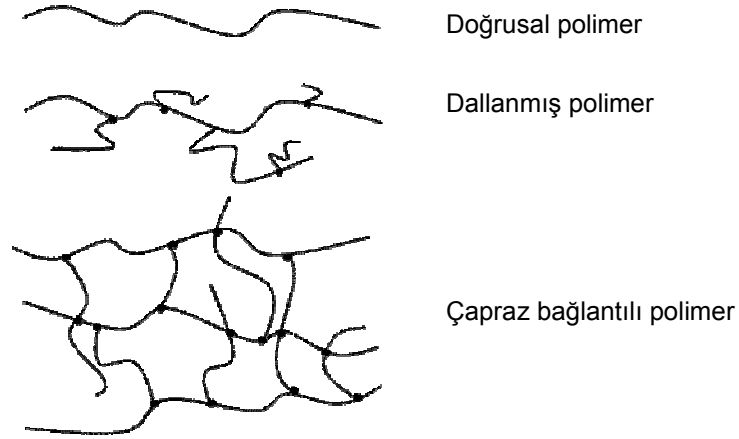
Monomer, birbirine kovalent bağlarla bağlanarak daha büyük moleküller oluşturabilen küçük bir moleküldür. Polimer ise birden çok monomerin birbirine kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşan büyük moleküldür. Polimer kelimesinin kökünü incelediğimizde, poly çok anlamına gelir ve meros küçük parça demektir. Orta büyüklükte oluşan moleküllere oligomer adı verilir. Bu moleküllerin molekül ağırlıkları aralığı da oldukça geniştir. Yapıları, sonsuz sayıda konformasyon ve konfigürasyona sahip olabilir.

Materyale polimer denilebilmesi için tekrarlayan monomerlerin sayısının en az 100 olması gerekmektedir. Bu sayı için üst sınır yoktur ve sonsuza kadar devam edebilmektedir. Çok sayıda monomerin oluşturduğu uzun polimer molekülü bir zincire benzediği için, polimer zinciri olarak da adlandırılır. Polimeri oluşturan monomerler aynı kimyasal yapıya sahip olabileceği gibi, kimyasal formülü farklı monomerleri de birbirine bağlayarak polimer zincirini yaratmak mümkündür. Tek tip monomerden oluşan polimere homopolimer adı verilirken, farklı monomerlerin oluşturduğu polimer zincirine kopolimer denir. Tekrar eden birim molekülü genellikle monomerin aynısı ya da çok benzeridir^{12,13,15,19}.

2.2.1. Polimerlerin Uzaysal Yapısı

Polimerlerin üç temel uzaysal yapısı bulunur (Şekil 1)^{18,27}:

- a. Doğrusal Polimer (Linear),
- b. Dallanmış Polimer (Branched),
- c. Çapraz Bağlantılı Polimer (Cross-linked).



Şekil 1: Polimerlerin uzaysal yapısı.

Doğrusal ve dallanmış polimerlerde, monomerler birbirlerine zayıf, fiziksel bağlarla bağlanırlar. Ortam ısıtıldığında bu bağlar kırılır, zincirler birbirleri üzerinde kayar hale gelir ve materyal yumuşar. Soğuma ile bağlar tekrar oluşur, eski halini alır ve sertleşme meydana gelir. Olayda kimyasal bir değişim söz konusu değildir. Bu tip polimerlere “Termoplastik Polimerler” denir. Polistiren, polivinil akrilikler, PMMA bu gruba örnek olarak verilebilirler.

Çapraz bağlantılı polimerlerde, ağ yapısı kovalent bağlı atomlardan oluşurken, esas bağlantılar zincirler arasındadır. Bunun sonucunda polimer tek makromolekül şeklinde ortaya çıkar. Çapraz bağlantılı polimerlerde, ısıtma sonucu zincirlerin birbiri üzerinden kayması olayı meydana gelmez. Bu yüzden ısıtmayla yumuşamazlar ve “Termoset Polimerler” olarak adlandırılırlar. Silikonlar, cis-poliisopren, bisfenol A-diakrilat ve çapraz bağlantılı PMMA bu gruba örnek olarak verilebilirler^{12,17}.

2.2.2. Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerler;

2.2.2.1. Termoplastik Polimerler,

2.2.2.2. Termoset Polimerler,

2.2.2.3. Elastomerik Polimerler olarak üç gruba ayrılırlar (Tablo 1).

Tablo 1: Polimerlerin Sınıflandırılması²⁸.

Termoset Polimerler	Elastomerik Polimerler	Termoplastik Polimerler
Aminoplastikler	Bütül	Asetal
Üre ve melamin reçineleri	Noepren	Akrilik (PMMA)
Poliester	Nitril	Selülozikler
Fenolik	Stiren bütadien	Polietilen
Epoksi	Silikon	Naylon (poliamid)
Dialil ftalat		Polikarbonat
Alkid		Polisülfon
Poliüretan		

2.2.2.1. Termoplastik Polimerler

Isı ve basınç altında yumuşayıp akan, bu durumda herhangi bir şekil alabilen, soğutulduğunda sertleşebilen ve katılaşan plastiklerdir. Isı ve basınç altında materyale defalarca değişik şekiller vermek mümkündür. Termoplastik polimerler şekil değiştirme sırasında hiçbir kimyasal değişikliğe uğramazlar ve uygun çözücülerde çözünebilirler^{11,15,28}. Çizgisel ve dallara

ayrılmış moleküller ayırılır, fakat birbirlerine zayıf fiziksel bağlarla bağlanır. Isı karşısında, zayıf bağlar kırılır ve zincirlerin birbirleri üzerinde kayma yeteneği materyalin yumuşaması ile sonuçlanır. Soğuma sırasında bağlar tekrar oluşur ve sertleşme gerçekleşir. Böyle polimerler "Termoplastik" olarak adlandırılır^{15,28,29,30}. Termoplastik grubunu içeren plastikler polivinil akrilikler, naylon, polistiren, polietilen, karbonflorür, selülozikler ve vinillerdir^{15,28,29,30}. Protez kaide materyali olarak kullandığımız akrilik rezinler ve asetal rezinler de bu gruba örnektir^{18,22}.

2.2.2.2. Elastomerik Polimerler

Esnek ve elastik olan materyallerdir. Çekme ile polimer zincirleri birbirleri üzerinde kayar ve yüksek oranda uzama gösterirlerken, kuvvet kalktığı zaman polimer zincirlerindeki az sayıda çapraz bağdan dolayı hızla ilk moleküler pozisyonlarını alırlar^{18,22}.

2.2.2.3. Termoset Polimerler

Kimyasal bir reaksiyon sonucu meydana gelen, bir kez ısı ve basınç altında şekillendirildikten sonra, tekrar şekillendirilemeyen plastiklerdir. Isı ve basınç işleminden sonra katı, sert ve plastik olmayan bir madde elde edilir ve polimerizasyondan sonra ilk yapıdan kimyasal olarak farklı bir yapı meydana gelir. Termosetler, Polikondenzasyon Polimerizasyonu ile elde edilirler ve genellikle çapraz bağlı yapıya sahiptirler. Çözünemezler, suda erimezler ve yanıcı değildirler^{11,28,29}. Çapraz bağlantı atomlarının kovalent bağlarla bağlanması, zincirler arasında primer bağların oluşmasını sağlar. Isınma ile zincirlerde kayma olmaz ve çapraz bağlantılı polimerler ısıyla yumuşamazlar. Fenolformaldehit ve vulkanit, çapraz bağlantılı PMMA ve silikonlar bu gruba örnektir^{11,18,22}.

2.3. Polimerizasyon

Kimyasal olarak bir ana molekülün tekrarlanmasıyla oluşan, zincir yapı gösteren polimerler, tek bir monomer molekülünün birbirini tekrar etmesi ve birbirine bağlanması sonucunda oluşan büyük molekül yapısındaki materyallerdir. Monomerlerin birbirleriyle bağlanarak polimer oluşturduğu kimyasal reaksiyona polimerizasyon adı verilir¹⁷.

2.3.1. Polimerizasyon Tipleri

Polimer biliminin gelişmesi sırasında bilimsel olarak tercih edilen iki tip sınıflama sistemi oluşmuştur.

- Polimerizasyon polimer yapısına göre;
 1. Yoğunlaşma (Kondenzasyon) Polimerizasyonu,
 2. Katılma Polimerizasyonu,
- Polimerizasyon reaksiyon mekanizmasına göre;
 1. Basamak- Büyüme Polimerizasyonu,
 2. Zincir- Büyüme Polimerizasyonu olarak sınıflandırılır.

2.3.1.1. Yoğunlaşma (Kondenzasyon) Polimerizasyonu

Bu polimerizasyon, iki veya daha fazla sayıdaki basit molekül arasında meydana gelen kimyasal reaksiyonla aynı mekanizma ile tekrarlanır. Ana moleküllerin reaksiyonu sonucunda su, alkol, amonyak ve halojen asitleri gibi küçük moleküllü yan ürünler meydana getirmesinden dolayı katılma polimerizasyonu reaksiyonundan farklılık gösterir. Bu yöntemde polimerizasyon işlemi kondenzasyon reaksiyonları üzerinden ilerleyip polimerin molekül ağırlığı sürekli artarak polimerizasyonun sonunda çok

yüksek değerlere ulaşır. İki monomer molekülü birleşerek “dimer” oluşur, buna bir monomer ilavesiyle “trimer” ve bir monomer molekülü daha ilave edilerek “tetramer” oluşur. Reaksiyon böyle devam ederek birbirlerine ilave edilip zincir büyütülür. Kondenzasyon yöntemi ile polimer oluşturulması son derece yavaş bir işlem olup, moleküller dev bir boyuta ulaşınca hareketlilik ve sayılarının azalmasından dolayı yavaş yavaş işlem durur. Amid, üretan, ester veya sülfid gibi fonksiyonel gruplara bağlanan polimerler, bir ara ürün oluşturmamasına rağmen kondenzasyon polimerleri sınıfına girmektedir^{11,19}.

2.3.1.2. Katılma Polimerizasyonu

Bu polimerizasyon tipinde, iki molekül birleşerek daha büyük üçüncü molekül oluşturur. Katılma polimerizasyonu, monomerle tekrar polimerize olabilecek reaktif grupların oluşması ile karakterizedir^{13,19}. Başlatıcı olarak adlandırılan reaktif grup, iyonik veya serbest köklü olabilir. Diş hekimliği uygulamalarında kullanılan rezinlerin büyük çoğunluğu serbest köklerin açığa çıktığı yöntemle üretilmektedirler. Bu serbest köklerden biri monomer molekülü ile reaksiyona girer ve yeni bir serbest kök oluşmasını sağlar. Bu diğer bir monomer molekülüne yapışır ve zincir reaksiyon böyle devam eder. Basit bir olay olmasına rağmen kontrolü son derece güçtür. Reaksiyonlar ekzotermiktir ve büyük miktarda ısı açığa çıkar^{13,22}.

Akrilik rezinler, metil metakrilat monomerlerinin “Serbest Radikal Katılma Polimerizasyonu” ile polimerize olurlar. Katılma Polimerizasyonu’nda monomer molekülleri, çok kısa bir süre içerisinde birbirlerine eklenerek zincir oluşturur³¹. Bu polimerizasyon yöntemi serbest radikallerin oluşumuna bağlıdır. Paylaşılmamış elektron içeren bir serbest radikal monomerle reaksiyona girerek zincir büyümesini başlatır¹⁹. Katılma polimerizasyonu

aktivasyon, başlama, büyüme ve sonlanma aşaması olmak üzere dört aşamada gerçekleşir:

a) Aktivasyon Aşaması:

Başlatıcı ajan ısı ile, kimyasal yolla veya ışıkla aktive edilir. PMMA'da bu olay benzoil peroksidin ısı etkisiyle ayrışarak serbest kökler oluşturması ile gerçekleşir. Kimyasal yolla aktive olan akrilik rezinlerde ise aynı olay muflanın kaynatılması ile oluşan ısı yerine dimetil-para-toluidin ya da dihidroksietil-para-toluidin gibi katalizörler yardımıyla gerçekleşir.

b) Başlama Aşaması:

Bu aşama, başlatıcıların bozunmasını ve serbest radikallerin (paylaşılmamış elektronu bulunan kimyasal gruplar) oluşmasını içerir. Protez kaidelerinin yapımında kullanılan akrilik rezinlerin polimerizasyon yöntemlerindeki farklılıklar, serbest radikallerin oluşması için kullanılan enerjinin de farklı olmasına neden olur^{12,19}. Isı ile polimerize olan rezinlerde polimerizasyon reaksiyonu ısı ile başlatılır. Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin sistemlerinde ise serbest radikaller genellikle benzoil peroksit ve tersiyer aromatik aminin reaksiyonu ile oluşturulur^{19,31}. Işıkla aktive olan rezin sistemleri ise mavi-mor bölgedeki ışığa maruz kaldığında, serbest radikaller oluşur. Polimerleşme için UV, X ve gama ışınları gibi iyonize ışınlar kullanılabilir^{10,18}.

c) Büyüme Aşaması:

Bu aşama, monomerlerin aktif merkeze katılmasıyla polimer zincirinin büyüdüğü aşamadır. Oluşan serbest kökler tekrar monomerlerle

reaksiyona girerek yeni serbest kökler oluşturur. Bu şekilde bir zincirleme reaksiyon başlar ve monomerler hızla polimere dönüşür.

d) Sonlanma Aşaması:

Sonlanma aşaması, birleşme veya orantısız sonlanmayla gerçekleşebilir. Büyüme reaksiyonunun yapı içindeki monomer molekülleri bitinceye kadar devam etmesi beklenir²⁷.

Serbest radikallerce başlatılan bir polimerizasyon inhibisyon ve geciktirilmeye de maruz kalır. Geciktirici olarak davranabilen maddeler diğer radikallerle reaksiyona girebilecek kararlı radikaller içerirken, monomerlerle reaksiyona giremezler. İnhibitörler ise normal orandaki polimerizasyonları takip eden indüksiyon periyoduna neden olan kimyasal maddelerdir. Hem inhibitörler hem de geciktiriciler başlatıcı radikallerle reaksiyona girerler; ancak inhibitörler daha hızlı, geciktiriciler ise daha yavaş reaksiyon verir. Sonuç olarak inhibitörler hızlı bir şekilde tüm radikalleri tüketirlerken, geciktiriciler sadece bazılarını tüketirler ve diğerlerinin zincir büyümesini başlatmalarına izin verirler. Hidrokinon yüksek konsantrasyonlarda çok etkili bir inhibitördür. Ancak düşük konsantrasyonlarda sadece geciktirici olarak davranır. Oksijen de serbest radikal katılma polimerizasyonunda önemli bir rol oynar^{13,17}.

Yapı içindeki monomer molekülleri polimere dönüşüncüye kadar bu zincirleme reaksiyon devam eder. Ancak yapı içinde bir miktar monomer daima kalır ve buna “artık monomer” denir. Gerçekte polimerizasyon hiç bitmeyen bir süreçtir. Ancak pratikte, polimer zincirinin bitimine neden olan reaksiyonlar ilave reaksiyonu engelleyebilir. Bu reaksiyonlar ölü polimer zincirleri oluşturur, ilave reaksiyona uğramazlar^{13,17,27}.

2.4. Asetal Rezin

Asetal rezin (POM), Clark, Scott, Brew ve Ward tarafından keşfedilip, Japon mühendisler tarafından geliştirilmiş sentetik bir materyaldir³². 1960 yıllarından itibaren mühendislik alanında kullanılmaktadır^{33,34,35}. Asetal rezin mekanik olarak iyi dengelenmiş bir plastik türüdür. Homopolimer veya kopolimer olarak üretilmektedir³⁶. Tıp alanında implant materyali olarak kullanılmıştır³⁷. Doku uyumunun iyi olması ve alerjik potansiyelinin az olması nedeniyle özellikle kalp kapakçığı ve kalça ekleminde protez uygulamaları ile ilgili in vivo çalışmalar yapılmıştır^{38,39,40}. Asetal rezinlerin diş hekimliğinde kullanımı, daha çok hareketli bölümlü protezlerde estetik açıdan yeterli olmayan metal kroşelerin yerine alternatif olarak düşünülmesiyle yaygınlaşmıştır. İlk olarak İtalya'da 1986 yılında bölümlü protezlerde estetik kroşe olarak kullanılan aset al rezinlerin uygulanması, daha sonraları Avrupa ve diğer ülkelerde artarak devam etmiştir³³.

Diş hekimliğinde aset al rezinin iki tipi kullanılmaktadır:

1. Sert tip,
2. Yumuşak tip.

Sert tip aset al rezin, protezlerde beyaz ve pembe olarak iki farklı renkte kullanılmaktadır. Beyaz aset al rezinin 20, pembe aset al rezinin ise 6 değişik renk tonu işlenebilmektedir. Yumuşak tip aset al rezin daha çok ortodontik konumlandırıcı olarak değerlendirilmektedir^{38,41}.

2.4.1. Aset al Rezinin Avantajları

- Özgöl ağırlığı düşüktür.

- Mukoza ile uyumludur.
- Elektriği iletmediği için ağızda galvanik akım oluşturmaz.
- Isıya karşı dirençlidir.
- Özellikle üst çenede torus palatinusun çok belirgin olduğu vakalarda elastikiyeti ve kırılmaya direnci nedeniyle protez kaidesi olarak kullanılabilir.
- Destek diş rengiyle uyumludur^{33,35,38}.

2.4.2. Asetal Rezinin Dezavantajları

- Güçlü asitlere karşı dirençsizdir.
- Protez temizleme tabletleri kullanılması uygun değildir.
- Ürün çeşitliliği azdır.
- Diğer materyallerle kimyasal bağlanma özelliği yoktur^{33,35,38}.

2.4.3. Asetal Rezinin Dişhekimliğinde Kullanım Alanları

2.4.3.1. Estetik Kroşeler

Bölümlü protezlerde estetiği önemli ölçüde etkileyen unsur, kişinin gülümsemesi ve konuşması sırasında ön bölgede konumlanan metal kroşelerin görünmesidir ve bu da hastaların proteze adaptasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle aset al rezinin renginin destek diş rengine benzerlik göstermesi kroşe materyali olarak tercih edilmesine neden olmuştur^{33,42,43,44}.

2.4.3.2. Postlar

Endodontik tedavi görmüş ve kron boyu kısalmış, aşırı doku kaybı olan dişlerde post-kor uygulaması yapılabilir. Basma ve çekme dayanıklılığı sayesinde çok köklü dişlerde uygulanabilmektedir. Ayrıca ısı iletkenliğinin olmaması ve hafif olması asetale resin postların avantajlarıdır⁴¹.

2.4.3.3. Hareketli Bölümlü ve Tam Protezler

Aşınmaya karşı dirençli olması, iyi cilalanabilmesi, alerjik ve toksik etkisinin olmaması, hafif olması nedeniyle daimi hareketli bölümlü ve tam protezlerde kaide maddesi olarak kullanılabilmektedir³⁸.

2.4.3.4. İmplantoloji

İmplantoloji cerrahisi sonrası uzun süreli iyileşme periyodunda asetale resin ile yapılacak geçici protez ile uzun süreli bekleme sürecinde komşu ve antagonist dişlerin yer değiştirmesi engellenir, estetik ve fonksiyon sağlanır, ayrıca protez altındaki dokular korunur³⁷. Bu materyal ile gerçekleştirilmiş implant üst yapıları komşu yumuşak doku üzerinde oluşacak metal yansımasını ve doku harabiyetini önleyerek hijyenik ve estetik problemleri ortadan kaldırır³⁸.

2.4.3.5. Ortodontik Apareyler

Asetale resinin fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri ortodontik apareylerin yapımına imkan verir. Ortodontik apareylerde asetale resinin elastik özellikleri nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir³⁸.

2.4.3.6. Pekiştirme Apereyleri

Asetal rezin ile hazırlanan pekiştirme apereylerinde fonksiyon ve estetik ideal bir kombinasyonda oluşabilmektedir. Materyalin hassaslığı, elastisitesi ve kırılganlığa karşı yüksek direnci nedeniyle apereyin küçük boyutta hazırlanması daha estetik sonuçlar vermektedir. Geleneksel pekiştiricilerle karşılaştırıldığında hastanın diş rengine uygun yapılan aperey, kullanıcının apereye karşı psikolojik uyumunu çabuklaştırır. Asetal rezinin elastisitesi sayesinde önceden planlanmış küçük diş hareketlerinin kolaylıkla sağlanabileceği ifade edilmiştir³⁸.

2.5. Biyouyumluluk

Biyolojik uyum, canlı dokularla temasta olan herhangi bir malzemenin, sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik, karsinojenik etki yapmaması, vücudun yumuşak ve sert dokularında doku reaksiyonu oluşturmaması olarak ifade edilir^{44,45}.

Biyouyumluluk, bulunduğu ortamla karşılıklı etkileşime giren materyalin bir özelliğidir. Alınan biyolojik cevap, hastaya, materyalin uygulanışına ya da uygulanan materyale göre değişebilir.

Biyolojik uyum için; materyalin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku temasının şekli, yeri ve dokunun özellikleri gibi pek çok faktörün bir arada uyum içinde olması gerekmektedir. Biyolojik uyumu olmayan materyaller, değişik doku reaksiyonlarına neden olurlar^{44,45,46,47}.

2.5.1. Biyolojik test yöntemlerinin sınıflandırılması:

Bir materyalin biyouyumluluğun ölçülmesi için kullanılan yöntemler hızla gelişmektedir. Biyouyumluluk testleri, FDI, ISO ve ADA tarafından sınıflandırılmıştır^{48,49,50,51,52,53} (Tablo 2).

Tablo 2: Biyolojik test yöntemlerinin sınıflandırılması.

Öncül Testler	İkincil testler	Kullanım Testleri
a) LD50 ağız içi test, b) LD10 karın içi test, c) Soluma testi, d) Hemolizis testi, e) Ames testi, f) Styles testi, g) Dominant letal test, h) Sitotoksikite testi.	a) Kemik implantasyon testi, b) Oral mukoza membran testi, c) Sensitizasyon testi, d) Subkutanöz implantasyon testi.	a) Restoratif malzemeler için pulpa ve dentin testi, b) Kuafaj ve pulpatomi malzemeleri testi, c) Endodontik malzeme testi, d) Kemik içi implant malzemesi testi.

2.5.1.1. Öncül Testler:

Bu testler deneysel olarak kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve ekonomiktir; hayvan ve insan çalışmalarının etik sorunlarını elimine ederler. Bu testler diş hekimliğinde kullanılan materyallerin ağız içine yerleştirildikleri kısa dönemde sergiledikleri toksik etkilerinin gösterilmesine yardımcı olurlar^{15,45,48,54}.

a) LD50 Ağız İçi Testi: Deney hayvanlarında, ağırlıklarının her kilogramı için belirli bir oran esas alınarak denek grubunun %50' sinin ölümüne neden olan dozun belirlenmesi için malzemenin oral olarak uygulandığı test yöntemidir.

b) LD10 Karın İçi Testi: Ağız içi test yönteminde kullanılan yöntem, karın içi enjeksiyonu olarak kullanılır.

c) Soluma Testi: Gaz halindeki maddelerin soluma yoluyla deney hayvanlarına verilmesi ile toksisite değerlerinin belirlendiği test yöntemidir.

d) Hemolizis Testi: Test edilen malzemenin kanda oluşturduğu hemoliz değerleri ile bir akut toksisite indeksinin oluşturulduğu test yöntemidir.

e) Ames Testi: “Salmonella Typhium” bakterilerinin kültürleri kullanılarak yürütülen bu test yönteminde hücrelerdeki mutasyon farklılıkları gözlenerek malzemenin mutajenik etkisi belirlenir.

f) Styles Testi: Ames testinin “Fibroblast hücre kültürleri” kullanılarak uygulanan şeklidir.

g) Dominant Letal Test: Deney hayvanları ile yürütülen bu test yönteminde, toksik olduğu düşünülen malzemenin üreme üzerine etkisi araştırılır.

h) Sitotoksosite Testleri: Test malzemesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir^{15,51,52}.

Sitotoksosite testleri genellikle malzemelerin;

- Hücre sayısı veya büyümesi,
- Hücre membran bütünlüğü,

- Biyosentez veya enzim aktivitesi,
- Hücre genetik malzemesi üzerindeki etkilerini ölçer.

Sitotoksisite testlerinin avantajları^{44,53}:

1. Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında özel bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,
5. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesidir.

Sitotoksisite testlerinin dezavantajları^{44,53}:

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. Kültür ortamında iltahap ve diğer doku koruyucu mekanizmaların olmamasıdır.

Tüm sitotoksisite testlerinde, test sisteminin toksik olmayan, steril ve tekrarlanabilir olması önemlidir.

2.5.1.2. İkincil Testler:

Alınan biyolojik cevap in vitro testlere oranla daha kapsamlıdır. Bununla beraber, hayvan testlerinde değişkenlerin kontrolü genellikle zordur. Bu testler zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca uygulayıcı için diğer bir faktör de hayvan türlerinin insanlardaki cevabı aynı şekilde vermemesidir^{48,54,55}.

a) Kemik İmplantasyon Testi: Standart bir yöntem olmamakla birlikte malzemenin kemik içine implantasyonu sonrasında oluşacak reaksiyonların değerlendirildiği yöntemdir.

b) Ağız Mukozası Membran Testi: Deney hayvanlarının palatinal ya da yanak mukozası içine yerleştirilen test malzemesinin mukozada oluşturduğu reaksiyonların izlendiği test yöntemidir.

c) Sensitizasyon Testi: Deney hayvanlarında derinin hassaslaştırılmasından sonra 24 saat – 2 haftalık dönemde deri üzerine yama testi ile uygulanan malzemenin duyarlılık etkileri değerlendirilir.

d) Subkütanöz İmplantasyon Testi: Test örneklerinin cerrahi yöntem kullanılarak deri altında derin dermis bölgesine yerleştirilmesi esasına dayanır^{51,52,55}.

2.5.1.3. Kullanım Testleri

Bu testler materyaller için önemli klinik denemelerdir. Materyal son kullanılacak haliyle gönüllü bir insana yerleştirilir. Kullanım testleri en yararlı biyouyumluluk testleridir. Ancak birtakım yan etkileri ve problemleri de bulunmaktadır. Maliyetli, zaman alıcı, kontrolü ve yorumlanmaları oldukça zordur. Ayrıca hukuksal ve etik açıdan da oldukça karmaşıktırlar⁴⁸.

a) Restoratif Malzemeler için Pulpa ve Dentin Testi: Deney hayvanlarında pulpa üzerinde 1 mm. sağlam dentin kalıncaya kadar açılan kavitelere yerleştirilen test malzemelerinin etkisinin kontrol grupları ile karşılaştırılması ile uygulanan yöntemdir.

b) Kuafaj ve Pulpatomi Malzemeleri Testi: Steril frez ile perfore edilen pulpa üzerine direk test malzemesi uygulanarak belirlenen zaman aralıklarında tamir dentini oluşumu ya da enflamasyon izlenir.

c) Endodontik Malzeme Testi: Kanal içerisine yerleştirilen malzemenin etkisi belirlenen zaman aralıklarında klinik ve histolojik olarak değerlendirilir.

d) Kemik İçi İmplant Malzemesi Testi: Kemik ile uzun dönem temasta kalacağı düşünülen malzemelere ait test örneklerinin toksisitelerinin in vivo olarak değerlendirildiği yöntemdir^{51,52,53}.

2.6. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla, bunu takiben proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına; bunların bir besi yeri ile, cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir⁵⁵.

Günümüzde, kültürler çoğunlukla dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonları ile yapılmaktadır. Ancak çoğu doku hücreleri, süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu olmadıklarından bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Bu gereksinim, plastik doku kültür kaplarının yüzeyleri ile karşılanmaktadır^{56,57,58}. Yaygın olarak kullanılmakta olan hücre serileri ve köken aldıkları dokular Tablo 3'te gösterilmiştir.

Hücre kültürleri temel olarak fizyolojik özelliklerin ve patojen hücre ilişkilerinin tespit edilebilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, in vivo şartlarda kısa zaman aralıklarında incelenmesi mümkün olmayan bir materyalin fiziksel ve kimyasal etkileri araştırılabilir. Yöntem ayrıca, ilaçların,

biyomateryallerin, yapısal ve kromozomal bozuklukların değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır⁵⁹.

Tablo 3: Hücre serileri ve kökenleri.

Hücre serisi	Hücre tipi ve kökeni
L 929	fibroblast hücresi (fare)
3T3	fibroblast hücresi (fare)
BHK21	fibroblast hücresi (hamster)
MDCK	epitel hücresi (köpek)
HeLa	epitel hücresi (insan)
PtK1	epitel hücresi (rat)
L6	miyoblast hücresi (rat)
SP2	plazma hücresi (fare)
COS	böbrek hücresi (maymun)
DT40	lenfoma hücresi (civciv)
R1	embriyonik kök hücreler (fare)
HepG2	karaciğer epitel hücresi (insan)
HEK293	böbrek epitel hücresi (insan)
HL60	lösemi (lenfoblastik hücre) (insan)
SH-SY5Y	nöroblastoma hücresi (insan)
H1, H9	embriyonik kök hücresi (insan)
PC 12	kromaffin hücresi (rat)
293	böbrek hücresi (insan), adenovirüsle transforme edilmiş
CHO	over hücresi (hamster)
E14	embriyonik kök hücresi (fare)
T24	mesane epitel hücresi (insan)
S2	makrofaj benzeri hücresi (drosophila)
BY2	farklılaşmamış meristematik hücreler (tütün)

2.6.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi:

Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllara kadar uzanır. İlk olarak 1866 yılında in vitro doku kültürü çalışılmış ve amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmesi sağlanmıştır.

1885'te Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun medüller tabakasını alarak, ılık salin solüsyonu içinde günlerce canlı tutarak doku kültürünün temellerini atmıştır. 1903 yılında Jolly, in vitro koşullarda hücre bölünmesi ve yaşamı ile ilgili ilk detaylı gözlemleri yapmıştır. Semenderlerden bir ay boyunca aşılı damlalar şeklinde lökosit elde etmiştir. Bu çalışma 1906 yılında, Ewing ve Beebe tarafından takip edilmiş ve doku kültürü kavramına ilk gerçek girişimi oluşturmuştur⁵⁹.

1910-1914 yılları arasında temel hücre, doku ve organ kültürlerinde önemli adımlar atılmıştır. Aseptik koşullarda çalışmalar yapılmış ve 1914 yılında da gerçek anlamda ilk doku kültürü yapılmıştır. 1913 yılında Burrows ve Carrell, hayvan hücrelerinin aseptik koşullar altında düzenli beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre büyüebileceğini göstermişlerdir. 1955–1960 yılları arasında Eagle, bugün de kullanılmakta olan temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır. 1979 yılında Green ve arkadaşları epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır. 1981 yılında Schmalz, materyallerin sitotoksitesini test etmek için agar overlay tekniğini ilk kullanan dişhekimliği araştırmacısı olmuştur. 1992'de Rosenfield ve arkadaşları genetik olarak modifiye edilmiş hücreleri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır⁵⁹.

2.6.2. Hücre Kültürlerinin Sınıflandırılması

Hücre kültürleri, primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürleri, diploid hücre kültürleri olarak sınıflandırılır^{44,60}.

2.6.2.1. Primer Hücre Kültürleri

Orijinal dokudan yeni ayrılan hücreleri içerir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir. Primer kültürlerin kromozomal anomalileri olmadığından daha normal fenotipleri vardır. Ancak bu hücrelerin deneysel çoğalma imkanları sınırlıdır⁶¹.

Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınırlar. Bu işleme subkültür denir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluştururlar. Hücre hatları, hücrelerin orijinali olan dokunun özelliklerine göre değişmek şartıyla çeşitli sayılarda subkültürlere izin verirler^{50,62,63}.

Primer hücre kültürleri, üreme aşamasındaki zorluklar, hücrelerin hassasiyeti, çalışma sürecinde ortaya çıkabilecek sorunlar ve kontrol güçlüğü gibi benzer sakıncalarına rağmen, pek çok araştırmada örnek sistem olarak kullanılmaktadır^{44,64,65}.

2.6.2.2. Devamlı Hücre Kültürleri

Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri, orijinali olan dokulardan ayrı olarak geliştirilmiş olan kültürlerdir. Araştırmalar herhangi bir kültürün, devamlı doku kültürü olabilmesi için en az 70 defa subkültürünün yapılmış olması gerektiğini göstermiştir⁶⁶. Devamlı hücre

kültürleri standart kültür örnekleri olarak embriyonik veya kanserli dokulardan üretilerek kodlanmış ve kullanıma sunulmuştur⁵⁴.

2.6.2.3. Diploid Hücre Kültürleri

Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilir. Bu kültürlerdeki bütün hücreler orijinal olan dokunun % 85 karyotipine sahiptir. Diploid kültürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilir ve yerine başka bir tip yerleşir. Bu hücrelere pseudodiploid hücreler adı verilir⁶⁶.

2.6.3. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Hücre kültürlerinin çok yaygın kullanım alanları vardır. Bu alanlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir⁶⁷:

1. Viral aşılar ve viral teşhis amaçlı,
2. Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi,
3. İnterferon üretimi,
4. İnsektisit ve insekt aşı üretimi,
5. İnterlökin gibi immüno-regulatorlerin üretimi,
6. Hormon üretimi,
7. Enzim üretimi,
8. Büyüme faktörlerinin üretimi.

2.6.4. Hücre Kültürü Yöntemlerinin Avantajları ve Dezavantajları

A. Avantajları:

1. Uygulamalar standart şartlarda tekrarlanabilir. Hücre kültürü ortamında sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ lokal basınçları gibi fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilir.

2. Kısa süreli etkileşimlerin incelenmesinde kullanışlı bir yöntemdir.
3. Hücreler üzerindeki etkiler direk olarak gözlenerek standart ölçümler yapılabilir.
4. Ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilirler^{57,67,68}.

B. Dezavantajları:

1. Primer kültür ile işleme başladıktan sonra birbirini takip eden pasajlarda hücreler farklılaşabilir ve bir miktar ölüm gerçekleşebilir. Her zaman istenilen saflık ve miktarda hücre elde edilemeyebilir.
2. Hijyen çok önemli olduğu için, primer kültürlerin elde edildiği doku ve bulunduğu ortam ve koşullar hücre kültürlerini etkileyebilir.
3. Kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler pahalıdır.
4. Deneyim önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme bir uzmanlığı gerektirir^{57,67,68}.

2.6.5. Hücre Kültürü Test Yöntemleri

Diş hekimliği materyallerinin sitotoksitesi in vitro koşullarda değerlendirilirken; hücre büyümesi, mitotik aktivite, oksijen alımındaki, glikoz metabolizmasındaki ve membran geçirgenliğindeki değişiklikler ile mitokondrial enzim fonksiyonlarının saptanması olmak üzere beş ayrı ölçüt kullanılmaktadır^{69,70,71,72}.

Hücre kültürleri kullanılarak diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin biyolojik uyumlarının belirlenmesi için çok sayıda in vitro test yöntemi kullanılmaktadır. FDI ve ISO teknik raporlarında hücre kültürü test yöntemlerini;

1. Agar Overlay Test Yöntemi,
2. Agarose Test Yöntemi,
3. Milipore Filtre Yöntemi,
4. Krom Salınım Test Yöntemi,
5. Model Kavite Test Yöntemi,
6. Diş Kavite Test Yöntemi olarak belirlemişlerdir.

2.6.5.1. Agar Overlay Test Yöntemi

Çoğu sitotoksisite testinde, hücre ile materyal arasında direk temas vardır. Araştırmacılar in vivo durumlarda bu şekilde bir direk kontak olmadığını, hücre ve materyalin keratinize epitel, dentin veya ekstra sellüler matriks ile ayrıldığını belirterek bu in vivo durumu taklit etmek amacı ile bariyer testi adı verilen yöntemler geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden biri Agar Overlay Test Yöntemi'dir⁷³.

Agar Overlay Test Yöntemi için her vasatta, toksisitesi bilinmekte olan bir materyal ile toksik olmayan bir materyal kullanılır. Genellikle dibutilasetat içeren polivinil klorid pozitif kontrol olarak, yüksek yoğunluklu polietilen ise negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra sitotoksisite, toksik maddelerin difüze olduğu bölgelerdeki hücrelerde görülen boya kaybı ile değerlendirilir. Difüzyon bölgelerinde hücre erimesi görülmesi ise, toksik maddelerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir^{69,71,74}. Sitotoksik cevap, renk değişikliği gösteren bölgelerdeki difüze alanın büyüklüğü ve lizis görülen bölgedeki hücrelerin yüzdesi ile değerlendirilir^{51,69,71,72}.

Agar Overlay Test Yöntemi'nin avantajları; rutin hücre kültürü yapan laboratuvarlarda ucuz bir maliyet ile yapılabilmesi, mevcut malzemenin

kolaylıkla temin edilebilmesi, radyokimyasal malzemelere gerek duyulmaması, basit bir teknik ile uygulanabilmesi olarak özetlenebilir⁷¹.

2.6.5.2. Agarose Test Yöntemi

1973 yılında, agar tabakasından daha yüksek difüzyon yeteneğine sahip agarose bulunmuş ve difüzyon yeteneğinin daha iyi olmasından dolayı Agar Overlay Test Yöntemi yerine güvenle kullanılabilecek hassas bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür⁷³.

Agarose Test Yöntemi'nde, agarose'un jel haline gelme noktası 32°C'dir. Böylece agar overlayın 40-45°C'deki hazırlanma aşamasında oluşan termal şoklardan kaçınılmış olur⁷³.

2.6.5.3. Milipore Filtre Test Yöntemi

Hücre ve materyal arasında direk temas oluşturan hücre kültür testlerinde problem, kayıp diş yapısını restore etmek için kullanılan materyallerin hücre ile direk bir temasının olmamasından dolayı klinik şartları yansıtmaktan uzak olmasıdır. Bu amaçla geliştirilen ikinci bariyer testi de Milipore Filtre Test Yöntemidir^{69,73}.

Bu test yönteminde hücreler, selüloz esterden yapılan filtrenin bir yüzeyine yerleştirilmektedir. Materyal ise filtrenin karşıt yüzeyi ile temastadır. Böylece süzülen maddelerin hücreler üzerinde toksik etki oluşturabilmesi için 0.45 µm'lik filtre deliklerinden geçmesi gerekmektedir^{29,69,73,74}. Materyale karşı gelişen toksik cevap, etkilenen bölgenin çapına, genişliğine ve boyalı bölgenin yoğunluğuna göre standart bir belirleme sistemi ile değerlendirilir^{51,69}.

2.6.5.4. Krom Salınım Test Yöntemi

Bu yöntemle likit ve katı yapıdaki materyallerin sitotoksitesini değerlendirilmektedir. Bu amaçla hücreler $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ile işaretlenmektedirler. $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ içerisindeki heksavalent Cr^{51} , hücrelerin içine girdikten sonra hücre proteinleri ile hücresel yapılara tutunmakta ve trivalent forma dönüşmektedir. Hücrelerin işaretlenmesinden sonra, hücre ve materyaller direk temas halinde 4- 24 saat süreyle inkübe edilmektedir. Hücrelerin ölümü, hücre zarı geçirgenliğini değiştirdiğinden trivalent formdaki Cr^{51} hücre dışına çıkmaktadır. Hücre dışına çıkan Cr^{51} 'in radyoaktivitesinin ölçülmesiyle hücre ölümü konusunda net ve kesin bir sayı ve bilgi edinilmektedir. Bu yöntemle hücre ölümünü takiben gelişen subletal değişiklikler ölçülememektedir^{52,69,75,76}.

2.6.5.5. Model Kavite Test Yöntemi

Tyas tarafından 1977'de restoratif materyallerin toksisitesini değerlendirmek için tanımlanmış ve test edilen materyallerin klinik kullanımlarını taklit etmek amacı ile geliştirilmiş bir yöntemdir^{69,77}. Bu test yönteminde materyal polimetil metakrilat bir kaviteye yerleştirilir ve kavite tabanı olarak da milipore filtre veya dentin tabakası kullanılır. Hücre kültürleri bu tabakanın alt kısmına yerleştirilir ve hücrelerin yapışması sağlanır. Hücresel hasarın tespiti, lizozomal ve mitokondrial enzimler olan asit fosfotaz ve süksinat dehidrogenazdaki değişikliklerin sitokimyasal yöntemlerle belirlenmesi ile yapılmaktadır⁶⁹.

2.6.5.6. Diş Kavite Test Yöntemi

Hume tarafından 1985 yılında tanımlanan bu yöntem, in vivo şartlara oldukça yakın bir aşamadır. Bu test yöntemi, toksik maddelerin difüze

olduğu restoratif maddelerin kimyasal toksisitesi için kullanılmaktadır. Bu test yöntemi ile çeşitli restoratif materyallerin sitotoksitesi belirlenmekte ve in vivo verilere oldukça uyumlu sonuçlar elde edilmektedir⁶⁹.

2.7. MTT Test Yöntemi

MTT testi, sitotoksitenin değerlendirilmesi, hücre canlılığının tespiti ve yaşayan hücrelerdeki proliferasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biridir⁷⁸.

Mosmann tarafından tanımlanan bu test; sarı renkte, suda çözünebilen tetrazolium tuzlarının [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] metabolizmaları aktif olan canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondrial bir enzim olan “succinate dehidrogenase” tarafından parçalanarak mor suda çözülmeyen tetrazolium formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan) yan ürünü salınması esasına dayanır^{79,80,81,82,83,84,85,86}.

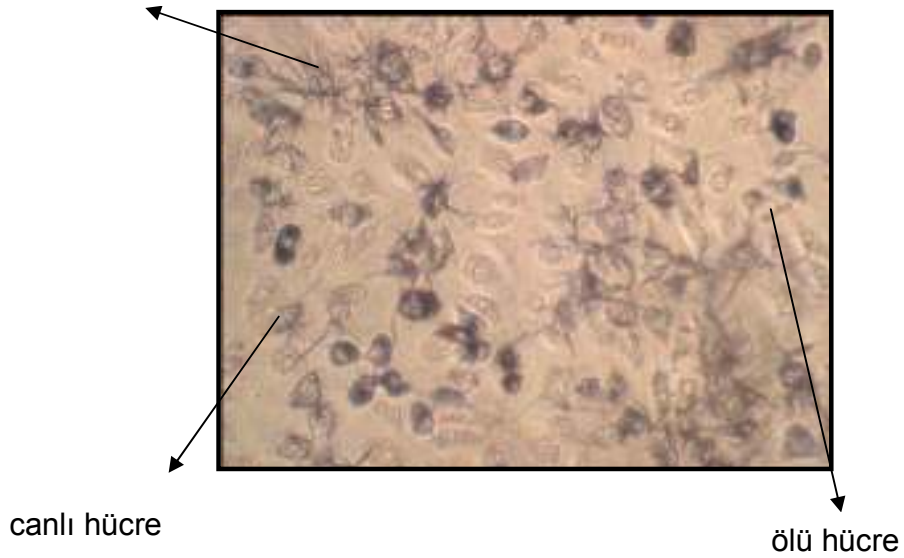
Formazan bileşiğinin oluşumu yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür ve yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir^{87,88,89,91,92}. Suda çözülmeyen formazan kristalleri DMSO veya başka bir organik çözügen (isopropanol) içinde çözünebilir ve çözünen materyallerin optik yoğunlukları (absorbans) spektrofotometre (570-690 nm) yardımı ile ölçülür. Elde edilen değer, hücre hattında metabolizmaları aktif olan hücre sayısı ile doğru orantılıdır⁷⁹.

Materyallerin toksik etkileri sonucunda, çoğunlukla hücrelerin metabolizmaları etkilenmektedir. Özellikle hücrelerdeki mitokondrileri etkileyen bazı kimyasal maddeler MTT testi ile değerlendirilmektedir. Hücre kültürlerinde metabolik olarak aktif hücrelerin sayısıyla bağlantılı olarak

boyanın konsantrasyonu ve emilim değerleri değişmektedir. MTT yöntemi, büyük sayılardaki hücre kültürlerinde canlı hücre oranının belirlenmesinde hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir. MTT değerlendirmeleri, büyüme döngüsünün herhangi bir aşamasındaki canlı hücre yoğunluğu hakkında fikir vermektedir^{2,80}.

MTT testinde oluşan formazan kristallerinin yoğunluğu hücre hatlarına ve kültürün yaşına göre değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle her hücre hattı için optimize edilmelidir. Ayrıca test, pH ve besiyeri glikoz değişimlerine hassas olduğundan titiz çalışılması gerekmektedir.

formazan kristalleri



Resim 1: MTT sonrası Formazan kristalleri, canlı ve l hücrelerin görünümü.

Van de Loosdrecht ve arkadaşları⁸¹ MTT test yönteminin sitotoksitenin belirlenmesinde kullanışlı, hassas ve hızlı bir yöntem olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmadığını

belirtmişlerdir. Wilson ve arkadaşları⁸², MTT'den oluşan formazonun yoğunluğunun direk olarak yaşayan hücrelerin sayısı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir⁸³.

2.8. Hücre Kültürü Laboratuvarı

Hücre kültürü laboratuvarlarını diğerlerinden ayıran en önemli özellik, aseptik koşulların çok iyi sağlanması zorunluluğudur. Hücre kültürü işlemlerinde, hayvansal hücreler ile bakteri ve mantarların meydana getirdiği kontaminasyonlar risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, kullanılan malzemelerden, çalışılan odaya kadar temizlik ve sterilizasyon çok önem taşımaktadır.

“Laminar Flow Kabinleri” içindeki hava akımı ve taşıdıkları hepa filtreler sayesinde kabin içinde steril bir ortam sağlar.

Bir hücre kültürü laboratuvarında bulunması gereken cihazlar şunlardır^{56,84}:

- Laminar Flow Kabin,
- İnkübatör,
- Sterilizatör,
- Buzdolabı (+4°C),
- Derin Dondurucu (-20°C, -80° C),
- Mikroskop,
- Yıkama Düzenegi,
- Masa Santrifüjü,
- Sıvı Azot Tankı,
- pH Metre,

- Hücre Sayaçları.

2.8.1. Hücre Üretim Yüzeyleri

Hayvan hücrelerinin üretilmesinde kullanılan yüzeyler genel olarak cam veya tek kullanımlık plastik malzemeden yapılmıştır. Cam, kolay temizlenebilir olması, maliyetinin ucuz olması, büyümeyi destekleyici, ekstra maddelere gerek duyulmaması ve sterilizasyonunun kolay olması nedeniyle tercih edilen bir malzemedir. Tek kullanımlık plastikler ise optik özellikleri ve düzgün yüzeylere sahip oluşları nedeniyle tercih edilebilirler. Bu malzemeler değişik şekillerde modifiye edilerek de kullanılabilirler. Pahalı olmalarına rağmen, günümüzde en çok bu materyaller kullanılmaktadır. Hücre üretim yüzeyleri, özellikle yüzeye bağımlı olarak üreyen hücreler için önemlidir. Çünkü, bu hücrelerin kültür ortamında canlılıklarını sürdürüp üreyebilmeleri, ancak bir yüzeye tutunmaları ile mümkün olmaktadır. Hücre üretim yüzeyleri için sıklıkla kullanılan malzemeler aşağıdaki gibidir^{55,84};

1. Polistiren (PS),
2. Polivinil Klorür (PVC),
3. Polikarbonat (PC),
4. Politetrafloroetilen (PTFE).

2.8.2. Hücre Kültürü Vasatları

Hücre üremesi için uygun ortamın oluşturulmasında hücre kültürü vasatlarından yararlanılır. Toz halinde olup kullanıcı tarafından hazırlanabildiği gibi, sıvı olarak da satılırlar. Hazır sıvı olanlar daha güvenilir olması nedeniyle tercih edilirler. Toz vasatlar, sterilizasyonları yapılmış ve içinde gerekli bütün bileşenleri içerecek şekilde satılır. Bunlar gerekli miktarlarda su ile çözülürler. Serum, antibiyotik ve sodyum bikarbonat ve

gerekiyorsa glutamin ilavesi yapılır. Hazırlanan vasatların sterilizasyonu, otoklav veya filtrasyon ile yapılır. Otoklav her vasat için geçerli değildir. Filtrasyon, daha sıklıkla ve güvenle kullanılan bir yöntemdir.

Filtrasyonda iki tip filtre kullanılır:

1. Asbest filtreler,
2. Membran filtreler.

Hücre üretme vasatlarının fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir:

1. pH ve ozmolorite gibi fizikokimyasal şartların devamlılığını sağlamak,
2. Hücre ve hücre ürünlerinin sentezi için gerekli besinleri sağlamak,
3. Hücrelerin yapısal ve metabolik aktivitelerini yerine getirmeleri için gerekli maddeleri oluşturmak⁵⁶.

Vasatların bileşiminde⁸⁵:

- Dengelenmiş Tuz Çözeltileri,
- Enerji Kaynakları,
- Aminoasitler,
- Vitaminler,
- Gazlar,
- Eser Elementler,
- Organik Tampon Çözeltileri,
- Antibiyotikler,
- Su,
- Serum,
- Nükleik Asit Sentezini Teşvik Edici Maddeler bulunmaktadır.

Vasatlarda, serumun total hacime oranı %10 olarak ayarlanır. Antibiyotikler bakteri üremesini önlemek için ortama ilave edilirler. Kültür yapılan hücreler, özel kaplarda 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 hava içeren ortamda inkübe edilirler. Vasatların içindeki maddelerin özelliklerinin iyi bilinmesi, toksik olmamaları, suda eriyebilmeleri ve stabil olmaları gerekmektedir^{55, 85}.

2.8.3. Kontaminasyon

Kontaminasyon, kültür vasatı, hava, cam malzeme ya da hücrenin kendisinden kaynaklanabilir. Bakteri, mantar, miyoplazma veya viral kaynaklı olabilir. Çalışan kişi önemli bir risk faktörüdür. Giyim şekli ve steril çalışma koşullarına uyulması gerekmektedir. Kontaminasyonun nedenleri arasında, çalışılan odanın işlem esnasında kapısının açılması, çalışan kişinin arkasından geçilmesi veya duvara monte edilmiş klimalardan kaynaklanan ani hava akımları sayılabilir. Bu nedenle, hücreler ile çalışılan ortamın, laboratuvar girişinden uzakta bulunması gerekmektedir⁵⁶.

2.8.4. Pasajlama

Pasajlama için ilk neden, hücre yoğunluğunun artmasıdır. Yoğunluk artınca ortam pH'ı düşer, besin maddeleri azalır ve artık ürün miktarı artar. Bu olumsuz etkilerden korunmak için, hücreler daha büyük bir hacime alınırlar ve yoğunlukları azaltılmış olur. Bunun için, bir yüzeye tutunmuş olarak üreyen hücrelerin, yüzeyden kaldırılarak yeni bir yüzeyde üremeleri sağlanır^{56,85}.

Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

- Mekanik yöntem: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte, bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda tercih edilebilir.
- Proteolitik enzimlerin kullanım yöntemi: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz, genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir⁸⁴.

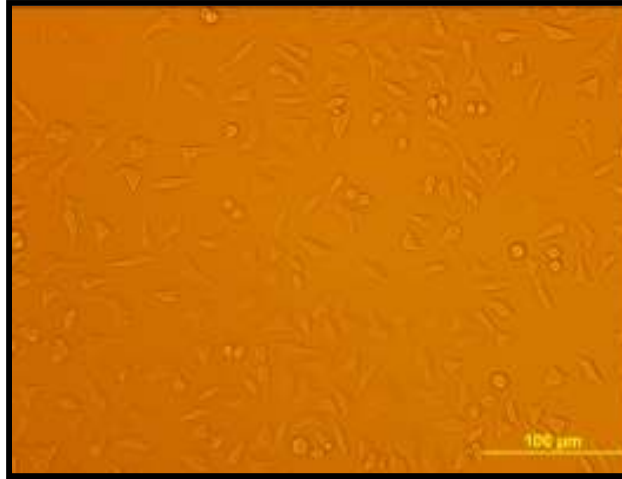
2.9. Fibroblast

Olgun bağ dokusunda sayıca en çok bulunan ve bağ dokusunun fibrillerini, amorf maddesini sentezleyip salgılayan hücrelerdir. Bu nedenle bağ dokusunun ana hücreleridirler. Düzensiz dallanmalar yapan uzantıları, ökromatik fakat nispeten yoğun kromatinli çekirdeği, protein sentezi yapan hücrelere özgü gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumu, geniş golgi kompleksi, bazofilik stoplazması bu hücrelerin tipik özellikleridir.

Fibroblastların aktif olmayan yani fibril ve ara madde sentezlemeyen inaktif şekillerine fibrosit denmektedir. Fibrositler de uzantılı fakat fibroblastta göre çok az sitoplazmalı hücrelerdir. Bu nedenle mikroskopta sadece çekirdekten ibaretmiş gibi görülürler. Her iki hücrenin de şekli düzensizdir. Genellikle yassı-uzun, mekik şeklinde, oval yapıdadırlar; gövde kısımlarından stoplazmik uzantılar çıkar. Bu hücreler birbirlerine dönüşebilirler. Mitotik yetenekleri sınırlı olmakla beraber, doku yaralanmalarında fibroblastta gereksinim arttığından bölünerek çoğalabilirler.

L-929 fare fibroblast hücresi, monolayer olarak yani bir yüzeye tek tabaka halinde tutunarak üreyen bir hücredir. Bu hücrelerin dublikasyon

süresi denilen yani başlangıçtaki sayısının iki katına ulaştığı ikilenme süresi oldukça kısadır ve elde edilen ürün de kalitelidir. Bu hücreler bir yüzeye tutundukları için besi ortamının değiştirilmesi oldukça kolaydır. Bu da çalışmalarda büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu hücrelerin biyouyumluluk çalışmalarında kullanılma nedenlerinin en önemli özelliği ise hassasiyetlerinin çok yüksek oluşudur. Ortamdaki değişikliklere kısa sürede cevap verirler. pH 7,2 - 7,5; sıcaklık 35-37 °C ve % 5 CO₂'li ortam optimum üreme koşullarını sağlar^{85,86}. L-929 hücre kültürü birçok uluslararası standart kuruluşu tarafından sitotoksikite çalışmaları için önerilmektedir^{51,52}. Fare fibroblast hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü resim 2'de sunulmuştur^{87,88}.



Resim 2: Fare fibroblast hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü.

2.10. Konu ile ilgili Çalışmalar

Günümüze dek, protez kaide maddelerinin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde farklı hücre kültürü teknikleri, hücre türleri ve boyama yöntemleri gibi birçok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Sheridan ve arkadaşları⁷, ısı ile, kimyasal olarak ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan akrilik rezinlerin sitotoksik etkilerini gingival fibroblastlar üzerinde incelemiş, kimyasal olarak polimerize olan akrilik kaide rezinlerin toksisitelerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Tsuchiya ve arkadaşları⁸⁹ ısı ile, mikrodalga enerjisi ile ve kimyasal yolla polimerize olan akrilik rezin örneklerin tükürük içinde salınımı gerçekleşikten sonra salınan metil metakrilat ve formaldehit konsantrasyonlarını inceledikleri çalışmalarında, hem metil metakrilatın hem de formaldehitin sitotoksik etki oluşturduğunu gözlemişlerdir.

Huang ve arkadaşları⁹⁰, ısı ve kimyasal yolla polimerize olan protez kaide polimerlerinden 1., 3. ve 5 gün sonunda elde edilen ekstraktların in vitro sitotoksik etkilerini oral epidermoid karsinom hücresi ve primer oral fibroblast hücrelerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar elde edilen invitro sitotoksikite değerlerinin materyallere ve kullanılan hücre kültürlerinin çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermesinin yanı sıra, en fazla sitotoksik etkinin kimyasal yolla polimerize olan protez kaide polimerlerinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Cimpan ve arkadaşları⁹¹ tarafından yapılan çalışmada ısı ile, kimyasal olarak ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan üç farklı kaide maddesinin L-929 fare fibroblast hücre kültürleri üzerinde oluşturdukları sitotoksikite dereceleri ve hücre ölüm mekanizmaları incelenmiş, sonuç olarak en toksik kaide maddesinin kimyasal olarak polimerize olan kaide maddesi olduğu ve bu materyalden ısı ve mikrodalga ile polimerize olan kaide maddelerine oranla daha fazla toksik madde salındığı bildirilmiştir.

Lefebvre ve arkadaşları⁵, 5 gün süreyle hücre kültür vasatında ekstraksiyon yapılan ısı ve kimyasal yolla polimerize edilen protez kaide

polimerlerinden salınan ekstraktların pH'ının ağız epitel hücrelerinde oluşturduğu in vitro sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, sitotoksik etkiler oluşturan komponentlerin protez kaide polimerlerinden değişik hızlarda ve miktarlarda salındığını, bu salınımın da ekstraksiyon ortamının pH'sına bağlı olarak değiştiğini ileri sürmüşlerdir.

Ergün ve arkadaşları⁹², ısı ile, mikrodalga enerjisi ile ve kimyasal yolla polimerize olan akrilik rezin protez kaide materyallerinde, agar overlay, milipore filtre ve 3H-timidin testleri kullanarak in vitro sitotoksisiteyi değerlendirmiştir. Araştırmacılar, çalışmanın sonucunda en yüksek sitotoksik bulgunun kimyasal yolla polimerize olan akrilik rezinlerde; en düşük sitotoksik bulgunun ise mikrodalga enerjisi ile polimerize olan ısı ile polimerizasyon işlemi için üretilmiş akrilik rezinlerde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Sipahi ve arkadaşları⁹³, beş farklı protez kaide maddesinin gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyon oranı üzerine yaptıkları çalışmada kimyasal olarak polimerize olan kaide maddesinin en fazla toksisite gösterdiğini, en az toksisiteyi ise mikrodalga enerjisi ile polimerize olan kaide maddesinin gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Rose ve arkadaşları⁹⁴, ısı ile polimerize olan akrilik rezinlerin L-929 hücrelerine kimyasal yolla polimerize olan akrilik rezinlerden daha az sitotoksik etki oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Formaldehit polimerizasyonundan oluşan asetale resin kalp kapakçığı protezleri^{34,95,96}, ortopedik implantlar^{32,97}; total kalça, eklem protezleri^{40,98,99} gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu materyal ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Pennick ve arkadaşları⁹⁹, 5 gün süre ile 1, 5, 10, 15 ve 20 defa otoklavdan geçirilen beyaz asetal rezinin, insan mezenşimal kök hücrelerinin çoğalmasına ve kondrogenik farklılığına negatif etkisinin olup olmayacağını incelemişlerdir. Sonuç olarak, insan mezenşimal kök hücrelerinin POM'u etkilemediğini, bir haftalık periyotta POM'dan salınımının gerçekleştiği ekstraksiyon sıvısının, hücrelerin çoğalma oranında belirgin bir değişiklik oluşturmadığını belirtmişlerdir.

Laluppa ve arkadaşları¹⁰⁰, çeşitli plastik materyallerinin sitotoksik etkilerini hematopoetik kök hücrelerinde in vitro olarak incelemiştir. POM'un hücrelere direk veya indirek temasında, koloni oluşumunu ve hematopoetik kök hücrelerinin büyümesini azalttığını gözlemlemişlerdir.

Kusy ve Whitley¹⁰¹, ortodontik braket olarak kullanılan POM braketlerin kimyasal olarak oluşturduğu ürünleri, braketin termal analizi sırasında ve abrazyonu sonrasında incelemişler, POM'un ısıyla veya kimyasal olarak aşındığında toksik formaldehit oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Bu araştırmada; rutin pratikte kullanılan; ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinin yanı sıra; asetal rezinlerin L-929 fare fibroblastları üzerinde sitotoksitelerinin MTT testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Rutin pratikte kullanılan ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ve asetale resin materyallerin in vitro koşullarda L-929 fare fibroblast hücre kültüründe, MTT test yöntemi ile sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bu çalışma, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı ve Mega Dental Diş Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1. Gereçler

Araştırmamızda kullanılan gereçler iki grup altında dizelenmiştir:

3.1.1. Deney Örneklerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Gereçler,

3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Gereçler.

3.1.1. Deney Örneklerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Gereçler

- Isı ile polimerize olan akrilik resin (Isı ile polimerize olan akrilik resin örneklerin hazırlanmasında kullanıldı. Meliodent Denture Acrylic, Bayer UK Dental, İngiltere.)
- Kimyasal olarak polimerize olan akrilik resin (Kimyasal olarak polimerize olan akrilik resin örneklerin hazırlanmasında kullanıldı. Meliodent Denture Self Cure Acrylic, Bayer UK Dental, İngiltere.)
- Asetale resin (Asetale resin örneklerin hazırlanmasında kullanıldı. Pressing Dental, San Marino, İtalya.)
- Paslanmaz çelik kalıp (Mum örneklerin hazırlanma aşamasında kullanıldı.)
- Pembe mum (Örneklerin hazırlanma aşamasında kullanıldı. Cavex set up modelling wax, Haarlem, Hollanda.)

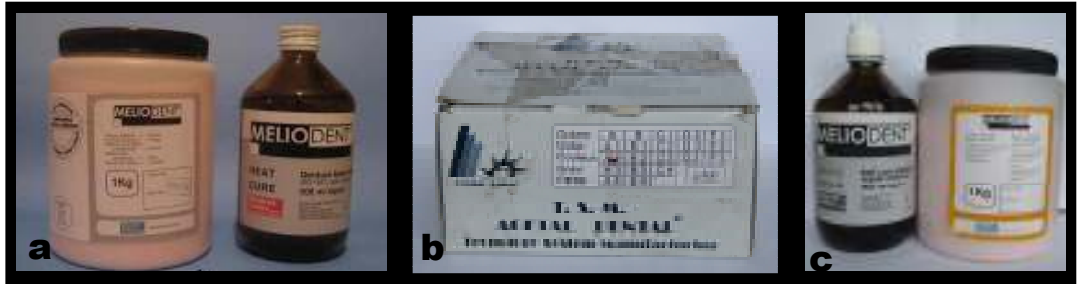
- Lak (Örneklerin hazırlığında mufla aşamasında izolasyonu sağlamak amacıyla kullanıldı. Akribel, Atlas-Enta, İzmir.)
- Özel mufla (Asetal rezin örneklerin hazırlanma aşamasında kullanıldı. Muffle-Type 100, Pressing Dental San Marino, İtalya.)
- Sert alçı (Örneklerin muflaya alınma aşamasında kullanıldı. Marble Stone, Pressing Dental San Marino, İtalya.)
- Enjeksiyon tüpü (Asetal rezin tabletlerin içine yerleştirildiği tüp. Pressing Dental San Marino, İtalya.)
- Enjeksiyon makinesi (Asetal rezin örneklerin muflasının, enjeksiyon tüpünün ve asetal rezin tabletlerin yerleştirildiği makine. J-100 Pressing Dental San Marino, İtalya.)
- Milimetrik kumpas (Örnek boyutlarının ölçülmesi amacıyla kullanıldı. Newman, Notre Dame West. Montreal, Quebec, Kanada.)
- 320 numara silikon karpid zımpara (Örneklerin tesfiyesi için kullanıldı. Waterproof Silicon Carbid Paper, English Abrasives Ltd., Londra, İngiltere.)
- Ultraviyole cihazı (Örneklerin dezenfeksiyonu için kullanıldı. CanCan Ltd, İstanbul, Türkiye.)

3.1.2. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Gereçler

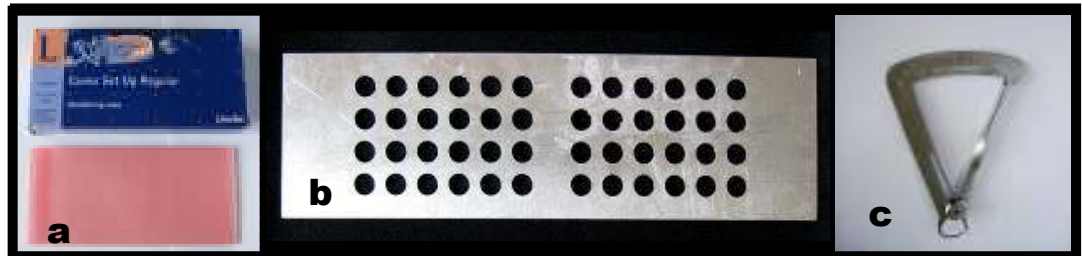
- Dikey akışlı steril kabin (Hücre kültürü test çalışmasının gerçekleştirilmesinde kullanıldı. Class II Holten Laminar Flow, Danimarka.)
- İnkübatör (Hücre kültürünün ve deney örneklerinin DMEM solusyonunda bekletilmesi aşamasında kullanıldı. Heracell, Almanya.)
- Işık mikroskopu (Hücre sayımı ve hücre canlılığı kontrolü için kullanıldı. Olympus CH, Japonya.)

- İverted doku kültürü mikroskobu (Hücrelerin kültür kabının yüzeyini kaplamaları ve üremeleri incelendi. Olympus CK 40, Japonya.)
- Sıcak su banyosu (Besi ortamını 37⁰C'ye getirmek için kullanıldı.)
- Santrifüj cihazı (Hücre kültürünün hazırlanmasında kullanıldı. Eppendorf, Almanya.)
- Çeşitli boyutlarda pipetler. (Besiyeri ve diğer sıvıları çekmek için kullanıldı. Nunc., Roskilde, Danimarka.)
- Steril plastik T25 cm² kaplar. (Kültür içerisinde hücrelerin üremesi aşamasında kullanıldı. Nunc., Roskilde, Danimarka.)
- 6 gözlü hücre üretme kabı. (Örneklerin besi ortamına konulup salınım yapması aşamasında kullanıldı. Nunc., Roskilde, Danimarka.)
- 96 gözlü hücre üretme kabı. (MTT testi sırasında kullanıldı. Nunc., Roskilde, Danimarka.)
- Tripan mavisı (Hücre sayımı öncesi kullanıldı. Sigma, ABD.)
- Hemasitometre (Hücre sayımı, hücre canlılığı kontrolü için kullanıldı. Bürker, Almanya.)
- PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu pH= 7.0) (Tripsinizasyon işleminde kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla kullanıldı. Biochrom AG, Almanya.)
- Tripsin / EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit (% 0,05 / 0,02)) (Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmasını sağlamak amacıyla kullanıldı. Biochrom AG, Almanya.)
- DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) besi yeri (Örneklerinin salınımının yapıldığı ve hücre kültürünün ürettiği besi yeri. Biochrom AG, Almanya.)
- Fötal sığır serumu (FBS) (DMEM besi yerinin içindeki %10 oranında serum. Biochrom AG, Almanya.)

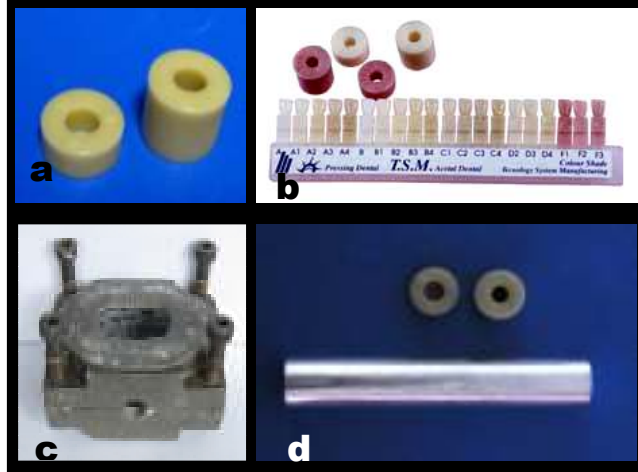
- RPMI 1640 besi ortamı (MTT solusyonu hazırlanma aşamasında fenol kırmızısı içermeyen bu besi ortamı MTT tuzu ile karıştırıldı. Biochrom AG, Almanya.)
- MTT tuzu (MTT testi sırasında kullanıldı. Sigma, ABD.)
- İzopropil alkol (Formazan kritallerini çözmekte kullanıldı. Applichem, Almanya.)
- Elisa okuyucusu. (MTT analizi sonrası sonuçların optik yoğunluk değerlerinin belirlenmesinde kullanıldı. Bio-Tek, Burlington, VT, ABD.)
- L-929 Fare Fibroblast Hücresi. (Araştırmada kullanılan hücre dizisi. L-929 An₂ HÜKÜK 95030802: Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye.)



Resim 3: Deneyde kullanılan protez kaide materyalleri: a) Isı ile polimerize olan akrilik rezin, b) Asetal rezin, c) Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin.



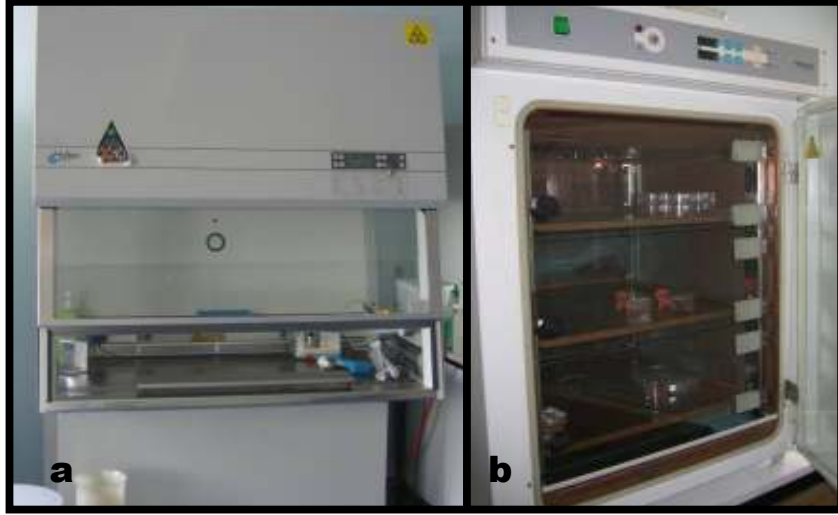
Resim 4: Deney örneklerinin hazırlanmasında kullanılan araç ve gereçler: a) Pembe mum, b) Çelik kalıp, c) Kumpas.



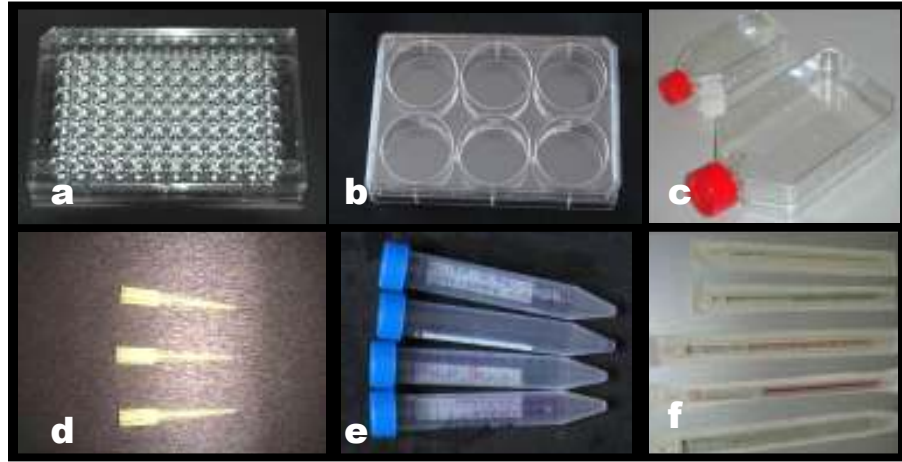
Resim 5: Asetal rezin örneklerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler: a) Asetal rezin tableti, b) Renk Skalası, c) Özel mufla, d) Enjeksiyon tüpü ve tableti.



Resim 6: Asetal Rezine Enjeksiyon Makinesi.



Resim 7: a) Steril kabin, b) İnkübatör.



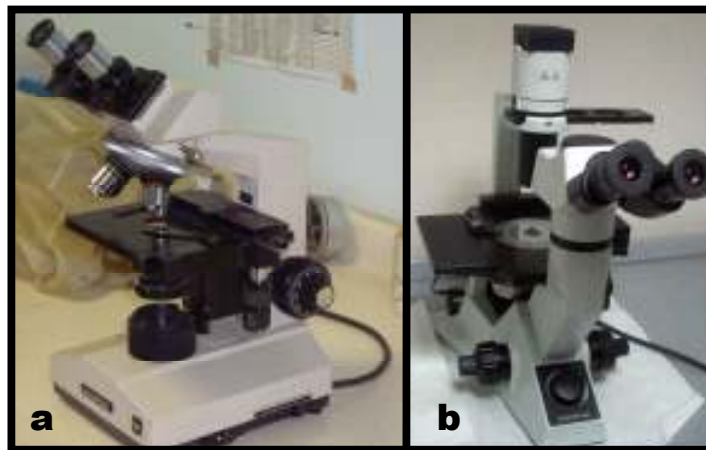
Resim 8: Deneyde kullanılan kaplar ve pipetler: a) 96 gözlü hücre üretme kabı, b) 6 gözlü hücre üretme kabı, c) Steril plastik T25 cm² kap, d) Pipet uçları, e) Santrifüj tübü, f) Pipetler.



Resim 9: Hücre kültürü deney aşamasında kullanılan solüsyonlar: a) DMEM, b) FBS, c) MTT, d) Tripsin/ EDTA solüsyonları.



Resim 10: Hemositometre.



Resim 11: a) Işık mikroskobu, b) İverted doku kültürü mikroskobu.



Resim 12: Elisa Okuyucusu.

3.2. Yöntem

Rutin pratikte kullanılan ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ve asetal rezin materyallerin in vitro koşullarda L- 929 fare fibroblast hücre kültüründe, MTT test yöntemi ile sitotoksitelerinin değerlendirildiği bu çalışma, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü.

Araştırma yöntemi;

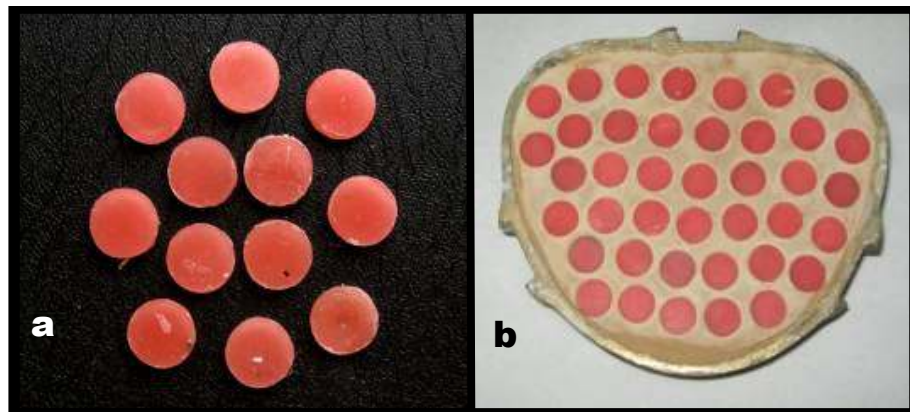
1. Test örneklerinin hazırlanması,
2. Örneklerle ait ekstraksiyon sıvılarının elde edilmesi,
3. Hücre kültürünün hazırlanması,
4. 96 gözlü hücre üretme kaplarının hazırlanması,
5. MTT testinin uygulanması sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Test Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada üç farklı protez kaide materyaline ait 30'ar adet mum örnek, 10 mm çapında ve 1 mm kalınlıkta olacak şekilde, paslanmaz çelik kalıplar içerisinde hazırlandı. Bu boyutların seçilme nedenleri şöyle sıralanabilir:

1. Tam ve bölümlü protezlerde 1 mm, minimum kalınlık ölçüsüdür.
2. Deney düzeneğinde örneklerin besi yeri içine tamamen gömülebilmesi gerekmektedir.
3. Sitotoksisite test yöntemi için, diskler besi yeri içine yerleştirildiğinde, yüzey / vasat oranı $0.5-6 \text{ cm}^2 / \text{ml}$ olmalıdır^{3,52,72,102,103}.

Deney materyallerinin polimerizasyon işlemleri, oluşabilecek kontaminasyon risklerini önlemek amacıyla aseptik koşullara uyularak gerçekleştirildi. Tüm polimerizasyon işlemleri üretici firmaların talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu işlemler için ilk olarak yukarıda da belirtildiği gibi, 10 mm çapında ve 1 mm kalınlığında mum örnekler hazırlandı (Resim 13).



Resim 13: a) Mum örnekler, b) Mufla içine yerleştirilmiş mum örnekler.

Isı ile, ve kimyasal olarak polimerize olacak akrilik rezinler için hazırlanan mum örnekler metal muflalara alındı ve mum artıklarının uzaklaştırılması için kaynar su içinde 5 dk bekletildi.

Eriyen mumlar basınçlı sıcak su ile yıkandı ve muflaların soğumaları beklendi. Muflalar soğuduktan sonra örnek boşlukları lak ile izole edildi.

Isı ile polimerize olan akrilik rezin polimer- monomer formunda bulunmaktadır. Bu materyalin polimerizasyon işlemi için üretici firmanın talimatları doğrultusunda, 23 gr/ 10 ml olacak şekilde akril karışımı hazırlandı. Rezinin kıvamına ulaşması için karışımın hazırlandığı kabın üzeri kapatılarak 10 dk beklendi. Rezin hamur kıvamına ulaştıktan sonra, rutin uygulanan yöntemlerle metal muflalardaki negatif boşluklara yerleştirildi. Prova kapanışı yapıp taşan kısımlar temizlendikten sonra mufla 15 dk preste bekletildi. Polimerizasyon için üretici firmanın talimatları doğrultusunda, muflalar 100°C'de 20 dk boyunca termostatlı su banyosunda kaynatıldı.

Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinler, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 20 gr/ 10 ml oranında polimer/ monomer karışımı ile hazırlandı. 3 dk'lık manipülasyon süresi sonrası mufladaki örnek boşluklara yerleştirilerek, preste 15 dk basınç altında bekletildi. Oda ısısında 30 dk bekletildikten sonra örnekler mufladan çıkarıldı.

Asetal rezin örneklerin hazırlanması için, özel muflanın alt parçası içine üretici firma talimatlarına uygun olarak karıştırılan sert alçı döküldü, mum örnekler enjeksiyon deliğinden yaklaşık 2 cm uzağa alçı içine yerleştirildi, mum enjeksiyon kanalları hazırlandı.

Mufla üst parçası yerleştirildikten sonra, üst kapakta bulunan delikten mufla iç boşluğu alçı ile dolduruldu. Alçı sertleştikten sonra mufla su içinde ısıtıldı. Kaynama derecesine geldikten sonra 30 dk kaynatıldı, mufla

açıldı ve eriyen mum uzaklaştırıldı. Mufla tekrar kapatıldı. Enjeksiyon tüpüne asetal rezin tablet yerleştirildi. Enjeksiyon tüpü ve mufla özel enjeksiyon makinesine yerleştirildi.

Makine aşağıda belirtilen şekilde programlandı;

- Erime derecesi: 220°C,
- Enjeksiyon öncesi 220°C bekletme zamanı: 20 dk,
- Enjeksiyon sonrası 220°C bekletme zamanı: 3 dk,
- Enjeksiyon basıncı: 4 bar.

Program otomatik olarak tamamlandıktan sonra mufla açıldı ve örnekler alçıdan çıkarıldı (Resim 14).

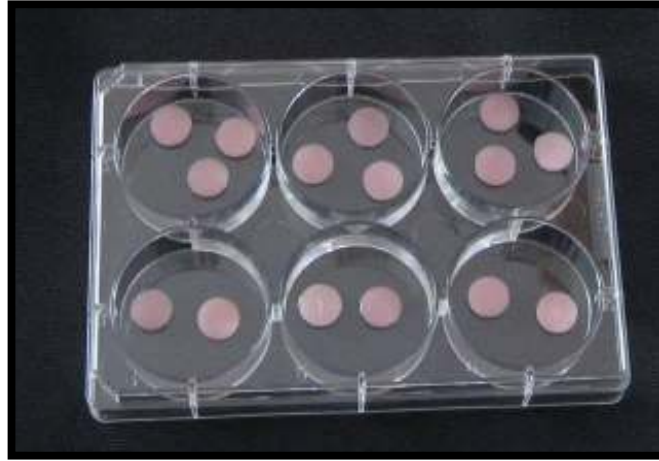


Resim 14: Asetal rezinin mufladan çıkmış hali.

Tüm örnekler, polimerizasyonları tamamlandıktan sonra milimetrik kumpas ile ölçüldü. Tesfiye ve polisaj işlemleri için mikroçatlaklara neden olabileceği göz önünde bulundurularak turlu aletler kullanılmadı. Bu işlemler için 320 numara zımpara kullanıldı. Tesfiye ve polisaj işlemleri tamamlandıktan sonra test örnekleri steril su ile yıkandı ve kurutuldu. Örnekler, 6 gözlü hücre üretme kaplarına yerleştirildikten sonra, 30 dk süreyle ultraviyole ışınına maruz bırakılarak dezenfeksiyonları sağlandı (Resim 15).

3.2.2. Örneklere Ait Ekstraksiyon Sıvılarının Elde Edilmesi

Dezenfeksiyon işlemini takiben steril kabin içerisinde, 6 gözlü hücre salınım kaplarına yerleştirilmiş örneklerin üzerine % 10 FBS ve % 1 Gentamisin içeren DMEM besi ortamı konuldu. % 5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde 1.saat, 1.,3.,5.,7.,14. günlük sürelerde inkübasyona bırakıldı. Her bir inkübasyon süresi sonunda salınımın gerçekleştiği ekstraksiyon sıvıları, steril kabin içerisinde, pipetler yardımı ile steril tüplere alınarak -20°C'ye kaldırıldı (Resim 16).



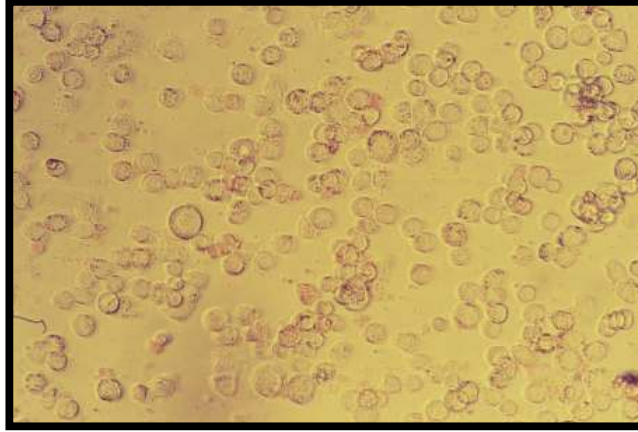
Resim 15: 6 gözlü hücre salınım kaplarına yerleştirilmiş materyal örnekleri.



Resim 16: Örneklerin salınım sonrası ekstraksiyon sıvılarının konulduğu steril tüpler.

3.2.3 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Araştırmada kullanılan L-929 fare fibroblast hücre kültürü şap Enstitüsü hücre kültürü koleksiyonundan sağlandı (Resim 17). Hücreler saklama ortamları olan -196 C'den çıkarılarak 37 C'deki su banyosunda kısa sürede çözünmeleri sağlandıktan sonra 800 devirde 5 dk santrifüje edildi. Santrif gasyondan sonra üstteki süpernatan kısım atılarak pleyt içerisindeki hücreler, içinde % 10 FBS ve % 1 Gentamisin içeren DMEM besi ortamı ile T25 cm² hücre kültürü üretme kabına alınarak ve 37  C, % 5 CO₂ 'li etüve kaldırıldı.



Resim 17: L-929 hücrelerinin invert mikroskop altındaki görünümü.

Hücrelerin kültür kabının yüzeyini kaplamaları ve üremeleri doku kültürü mikroskobunda kontrol edildi. Yüzeyi tamamen kapladıklarında kültür kabındaki besi ortamı kültür ortamından aspire edildi. Kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla divalent katyonları (Ca²⁺, Mg²⁺) içermeyen PBS ile hücrelerin yüzeyi yıkandı.

Sonrasında tripsin- EDTA (% 0,05- %0,02 g/ml) solüsyonu ile yıkanarak tripsinize edilerek, 37 C' deki inkübatörde yaklaşık 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak

incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları görüldü. Yüzeyden ayrılan hücreler % 10 serum içeren besi ortamı ile 5 dk santrifüje edilmiş (800-1000 rpm); süpernatant kısım atıldıktan sonra pleytdeki hücrelerin sıcaklığı tekrar 37°C'ye getirilerek, % 10 serum ve % 1 antibiyotikli DMEM besi ortamı ile homojenize edilmiş ve hücre süspansiyonu 3 adet T25 cm² kültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlanmıştır. Bu şekilde 3 seri pasaj yapılmıştır.

3.2.4. 96 Gözlü Hücre Üretme Kaplarının Hazırlanması

Logaritmik üreme fazında olan, aktif ve yüzeyi % 90-95 oranında kaplamış hücreler, pasajlama işleminde olduğu gibi kültür kabı yüzeyinden ayrılarak ve serumlu besi ortamı ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre sayımı için 0.9 ml hücre süspansiyonu üzerine 0.1 ml tripan mavisi solüsyonu ilave edilerek, hemasitometre ile ışık mikroskopunda hücre sayımı yapıldı ve aynı zamanda hücre canlılığı kontrol edildi.

96 gözlü hücre üretme kapları için istenilen yoğunluktaki hücre sayısı hesaplandı ve bu sayıdaki hücre % 10 FBS ve % 1 antibiyotik içeren DMEM besi ortamı ile homojenize edilerek mililitresinde 4×10^4 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 96 gözlü hücre üretme kaplarına 100 µl/göz olacak şekilde taksim edilerek % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda 96 gözlü hücre üretme kaplarındaki hücreler inverted doku kültürü mikroskopunda üremeleri ve ortamın sterilitesi kontrol edildikten sonra kültür ortamındaki DMEM besi ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı. Yerine daha önceden hazırlanan -20°C'den çıkartılarak sıcak su banyosunda 37°C sıcaklığa getirilen salınım besi ortamları, 100 µl/göz olarak taksim edildikten sonra yine % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

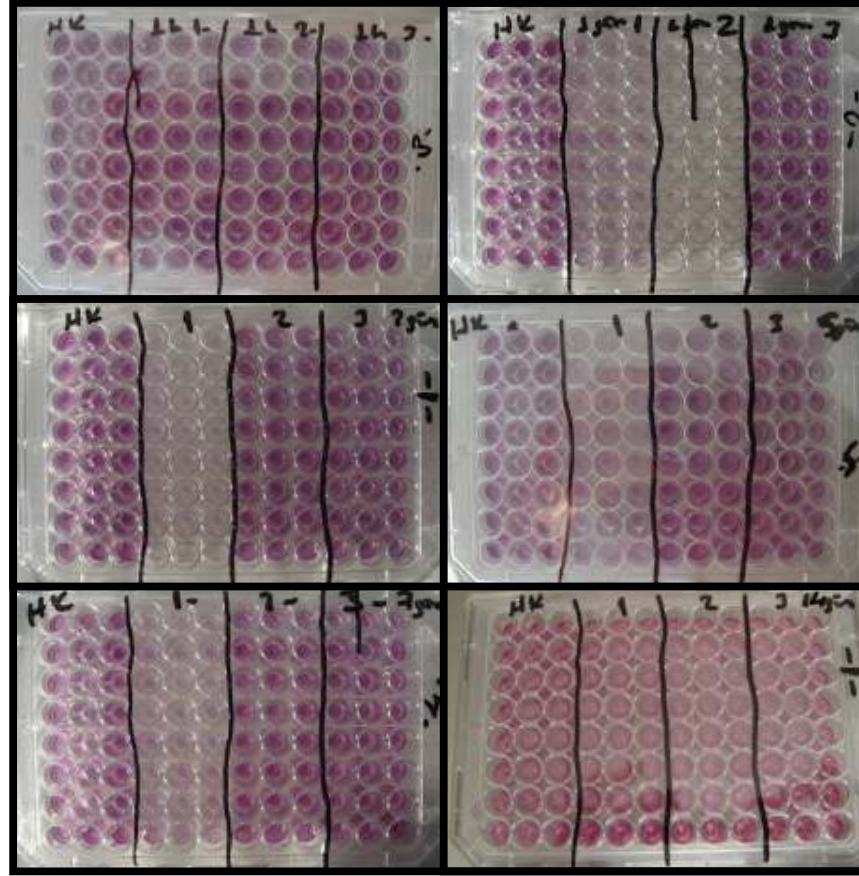
3.2.5. MTT Testinin Uygulanması

MTT, fenol kırmızısı içermeyen RPMI 1640 besi ortamı ile karıştırılıp homojenize edilerek 5 mg/ml olan MTT solüsyonu hazırlanmıştır.

24 saat inkübasyona bırakılan 96 gözlü hücre üretme kaplarındaki ekstraksiyon sıvıları ve hücre kontrol gözü inkübasyon sonrası uzaklaştırılmış ve hücre üretme kaplarına 100 µl/göz olacak şekilde DMEM besi ortamı ve 13 µl/göz MTT solüsyonu koyularak karanlık bir ortamda 37 C°'de %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. 96 gözlü hücre üretme kaplarına izopropil alkol 100 µl/göz olacak şekilde koyulmuştur ve formazan kristallerinin tamamen çözünmesi ile almış olduğu mor renge dönüşümünü takiben hücre üretme kapları ELISA okuyucusuna yerleştirilmiştir (Resim 12). Oluşan formazonun optik yoğunluğu 570 nm okunarak belirlenmiştir.



Resim 18: Hücrelerin MTT ile reaksiyonundan sonra oluşan formazan kristalleri (10X).



Resim 19: 96 Gözlü Hücre Üretim Kapları.

Çalışmamızda asetal rezin ve akrilik rezin örneklerinden 1.saat, 1.,3.,5.,7.,14. günlerde elde edilen salınım vasatlarının sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla uyguladığımız MTT üçer kez tekrarlanmıştır (Resim 19).

Deney sonucunda grupların optik yoğunluk değerleri elde edilmiştir. Hücre kontrol grubu dikkate alınarak hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Hücre kontrol grubu, sadece hücre ve hücre kültürü üretmek için kullanılan besi ortamından oluşmakta, çalışmada kullanılan rezin örneklerinden elde edilen salınım vasatlarını içermemektedir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Protez kaide maddelerinin MTT testi ile elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalarının istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS 15.0.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA) istatistik programında yapılmıştır.

Deney sonuçlarından elde edilen verilerin dağılımının normal olup olmadığı Shapiro-Wilks Testi ile araştırılmıştır. Grup ortalamalarının karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre grup ortalamalarının istatistiksel olarak farklı bulunması durumunda farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespit edilmesi için çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnett; diğer karşılaştırmalarda Tukey HSD yapılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde güven düzeyi %95 olarak kabul edilmiştir ($p < 0.05$).

4. BULGULAR

Araştırma bulguları aşağıdaki şekilde dizelenmiştir:

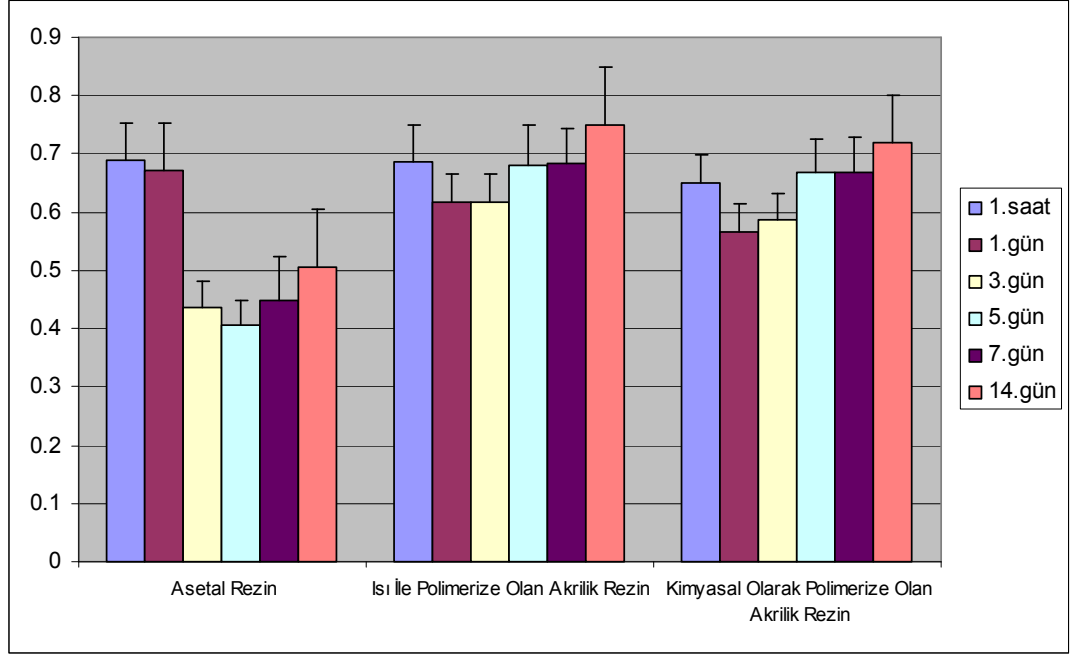
4.1. Protez kaide maddelerinin altı farklı inkübasyon periyodunda sitotoksitelerinin karşılaştırılma bulguları,

4.2. Farklı inkübasyon sürelerinde protez kaide maddelerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılma bulguları.

Çalışmamızda kullanılan üç farklı protez kaide maddesi örneklerinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamaları, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ve hücre canlılık yüzdeleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4'te gösterilen hücre canlılık yüzdeleri, hücre kontrol grubu ortalama değeri % 100 kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeridir ve canlı hücre oranını simgelemektedir.

Üç farklı protez kaide maddesi örneklerinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamaları Grafik 1 ve 5'de gösterilmiştir.



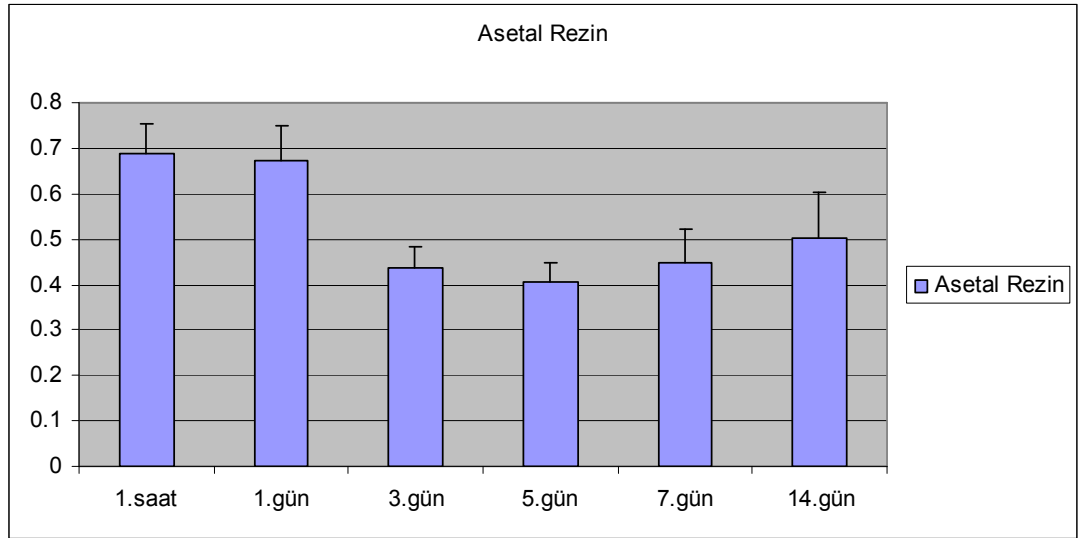
Grafik 1: Üç farklı protez kaide maddesi örneklerinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

Tablo 4: MTT Testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait bulguların standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ve hücre canlılık yüzdeleri.

Protez Kaide Materyali	Zaman	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Minimum	Maksimum	Hücre Canlılık Yüzdesi (%)
Kontrol		24	.7471	.0730	.0150	.64	.89	100.00
Asetal Rezín	1.saat	24	.6883	.0645	.0132	.60	.84	92.12
	1.gün	24	.6725	.0790	.0161	.55	.83	90.01
	3.gün	24	.4363	.0457	.0093	.37	.54	58.39
	5.gün	24	.4063	.0410	.0084	.33	.50	54.38
	7.gün	24	.4500	.0731	.0149	.31	.63	60.23
	14.gün	24	.5042	.1001	.0204	.31	.73	67.48
Isı İle Polimerize Olan Akrilik Rezín	1.saat	24	.6863	.0622	.0127	.60	.79	91.86
	1.gün	24	.6158	.0482	.0099	.54	.71	82.45
	3.gün	24	.6175	.0473	.0097	.53	.72	82.65
	5.gün	24	.6804	.0699	.0143	.55	.78	91.07
	7.gün	24	.6838	.0608	.0124	.58	.80	91.52
	14.gün	24	.7404	.0970	.0198	.58	.90	99.10
Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Rezín	1.saat	24	.6512	.0479	.0098	.55	.75	87.16
	1.gün	24	.5654	.0494	.0101	.49	.66	75.67
	3.gün	24	.5875	.0440	.0090	.50	.66	78.63
	5.gün	24	.6692	.0554	.0113	.55	.77	89.57
	7.gün	24	.6696	.0588	.0120	.52	.74	89.62
	14.gün	24	.7200	.0815	.0166	.58	.88	96.37

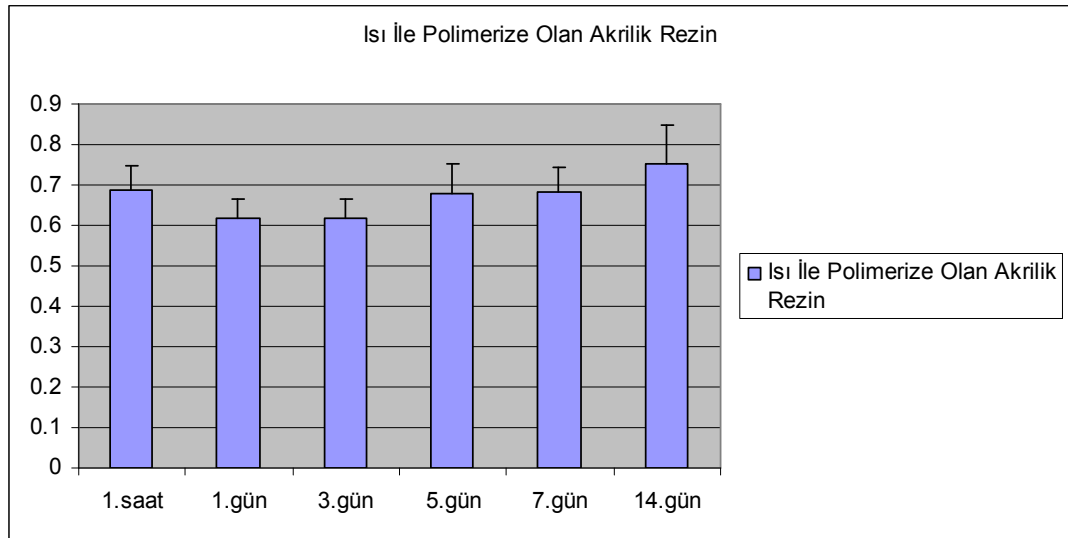
4.1. Protez kaide maddelerinin altı farklı inkübasyon periyodunda sitotoksisitelerinin karşılaştırılma bulguları

Asetal rezinin inkübasyon süreleri açısından hücre canlılığı değerlendirildiğinde; en yüksek canlılık değeri % 92.12 ile 1. saatte; en düşük canlılık değeri ise % 54.38 ile 5. günde gözlenmiştir (Grafik 2) (Tablo 4). Asetal rezinin sitotoksik etkisi, 1.saat ile 3.,5.,7.,14. günler; 1.gün ile 3.,5.,7.,14. günler; 3. gün ile 14. gün; 5. gün ile 14. gün inkübasyon periyotları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0.05$) (Tablo 5).



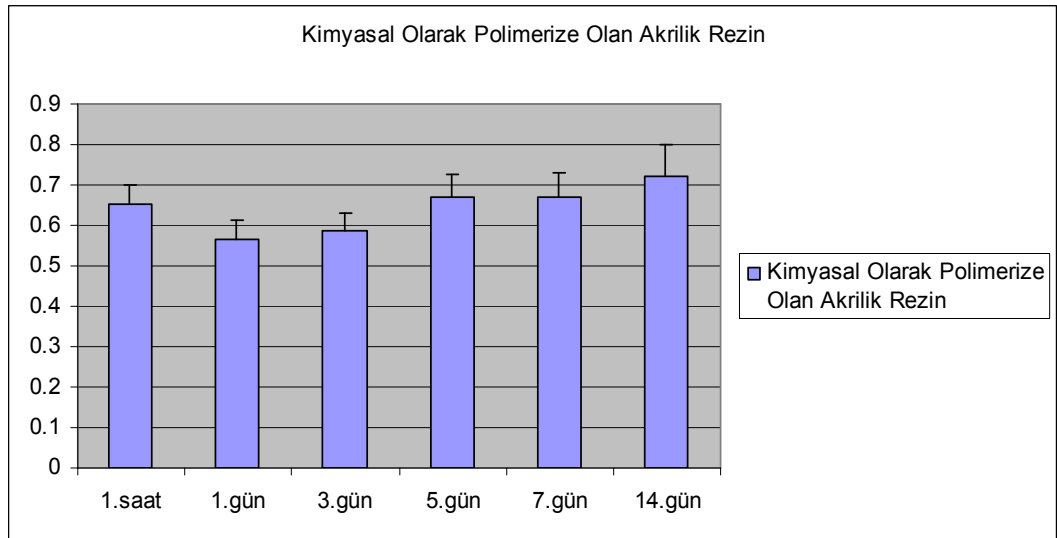
Grafik 2: Asetal rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksisite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

Isı ile polimerize olan akrilik rezinin inkübasyon süreleri açısından hücre canlılığı değerlendirildiğinde; en yüksek canlılık değeri % 99.10 ile 14. günde; en düşük canlılık değeri ise % 82.45 ile 1. günde gözlenmiştir (Grafik 3) (Tablo 4). İnkübasyon süreleri arasındaki sitotoksik etki değerlendirildiğinde; 1. saat ile 1.,3.,14. günler; 1.gün ile 5., 7.,14, günler; 3. gün ile 5., 7.,14. günler; 5. gün ile 14. gün; 7. gün ile 14. gün inkübasyon periyotları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0.05$) (Tablo 5).

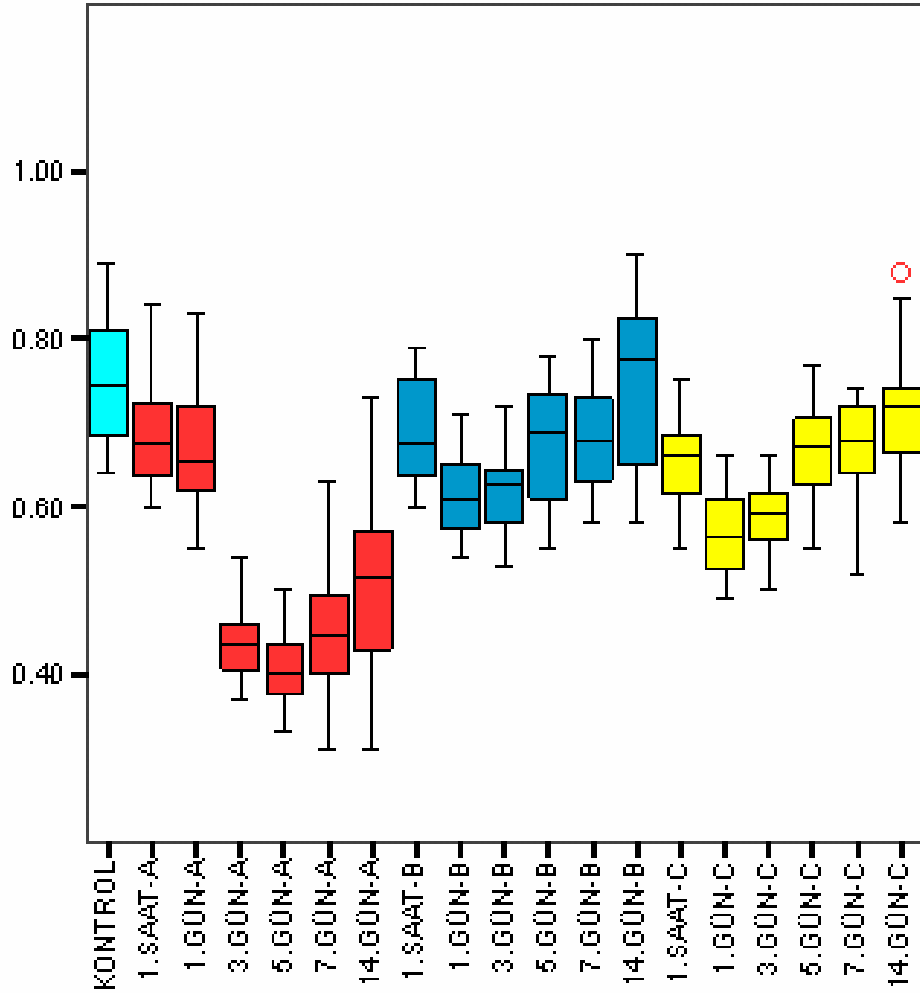


Grafik 3: Isı ile polimerize olan akrilik rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinin inkübasyon süreleri açısından hücre canlılığı değerlendirildiğinde; en yüksek canlılık değeri % 87.16 ile 14. günde; en düşük canlılık değeri ise % 75.67 ile 1. günde gözlenmiştir (Grafik 4) (Tablo 4). Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinin sitotoksik etkisi, 1.saat ile 1.,3.,14. günler; 1.gün ile 5.,7.,14. günler; 3. gün ile 5.,7.,14. günler; 5. gün ile 14. gün; 7. gün ile 14. gün inkübasyon periyotları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p<0.05$) (Tablo 5).



Grafik 4: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksisite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.



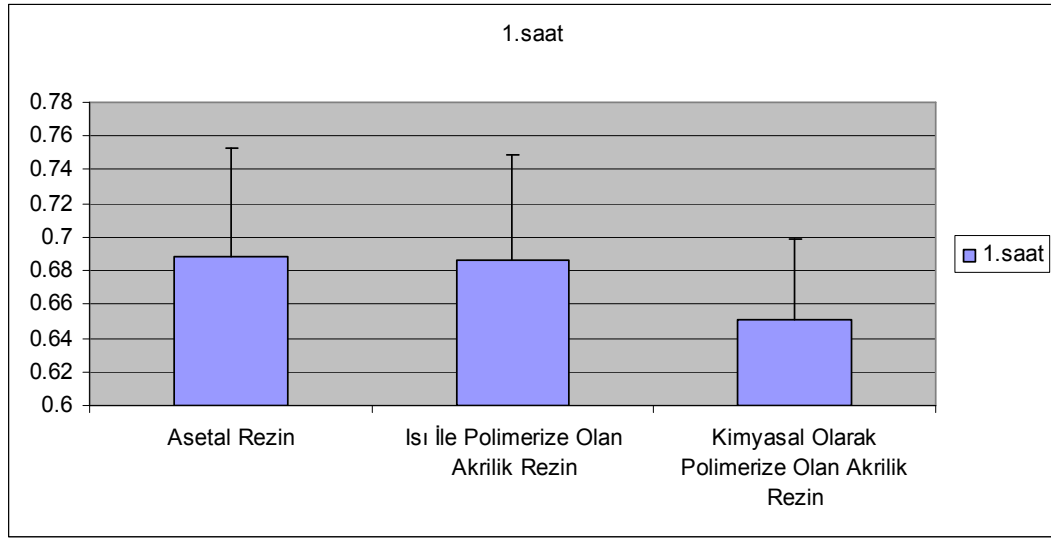
Grafik 5: Üç farklı protez kaide maddesi ve kontrol gruplarına ait örneklerin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük süreler sonundaki sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar (A: Asetal rezin, B: Isı ile polimerize olan akrilik rezin, C: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin).

Tablo 5: Üç farklı protez kaide maddesinin altı farklı inkübasyon periyodunda sitotoksiteleri arasında istatistiksel anlamlılık tablosu.

		1.SAAT	1.GÜN	3.GÜN	5.GÜN	7.GÜN	14.GÜN
Asetal Resin	1.SAAT		.970	.000	.000	.000	.000
	1.GÜN	.970		.000	.000	.000	.000
	3.GÜN	.000	.000		.676	.984	.013
	5.GÜN	.000	.000	.676		.263	.000
	7.GÜN	.000	.000	.984	.263		.087
	14.GÜN	.000	.000	.013	.000	.087	
Isı İle Polimerize Olan Akrilik Resin	1.SAAT		.004	.006	1.000	1.000	.013
	1.GÜN	.004		1.000	.012	.007	.000
	3.GÜN	.006	1.000		.016	.009	.000
	5.GÜN	1.000	.012	.016		1.000	.005
	7.GÜN	1.000	.007	.009	1.000		.009
	14.GÜN	.013	.000	.000	.005	.009	
Kimyasal Olarak Polimerize Olan Akrilik Resin	1.SAAT		.000	.003	.889	.879	.001
	1.GÜN	.000		.768	.000	.000	.000
	3.GÜN	.003	.768		.000	.000	.000
	5.GÜN	.889	.000	.000		1.000	.031
	7.GÜN	.879	.000	.000	1.000		.033
	14.GÜN	.001	.000	.000	.031	.033	

4.2. Farklı inkübasyon sürelerinde protez kaide maddelerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması bulguları

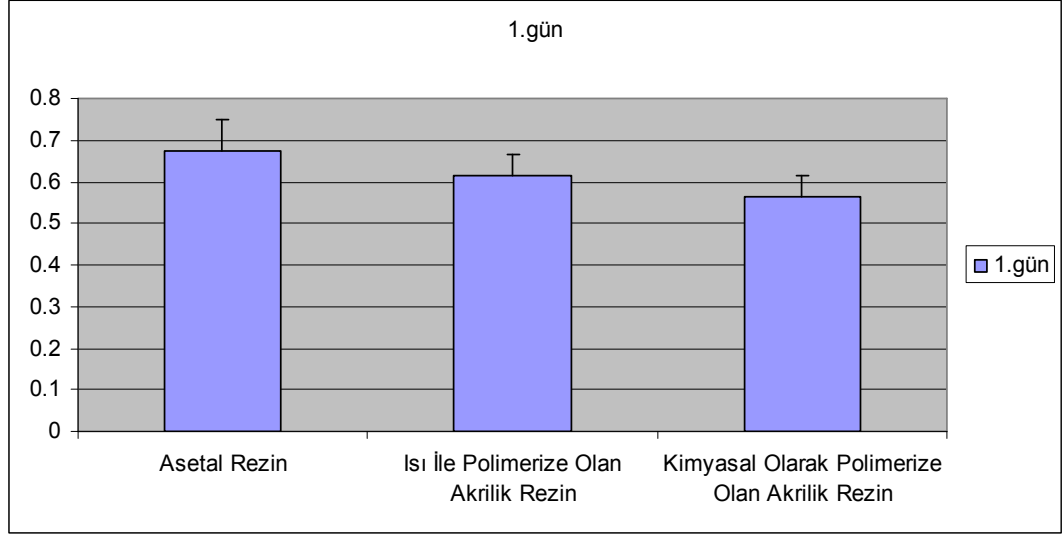
1 saatlik inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin hücre canlılıkları değerlendirildiğinde en yüksek canlılık değeri % 92.12 ile asetale resin, en düşük canlılık değeri ise % 87.16 ile kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezine aittir (Grafik 6) (Tablo 4).



Grafik 6: 1 saatlik inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

1.saatte kimyasal olarak polimerize olan akrilik resin ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık varken diğer protez kaide maddeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 6).

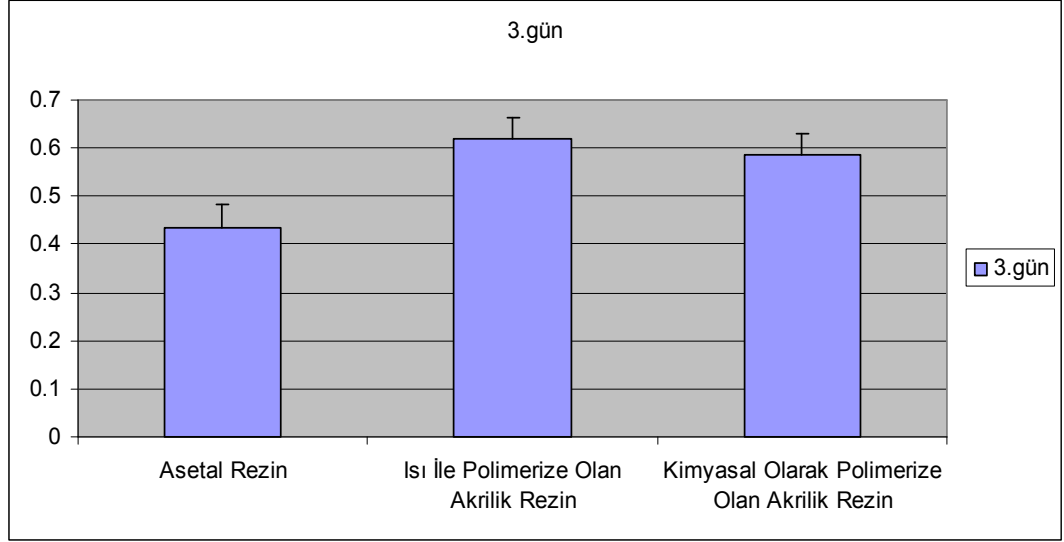
1.günde en yüksek canlılık değeri %90.01 ile asetale resin iken en düşük canlılık değeri %75.67 ile kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezine aittir (Grafik 7) (Tablo 4). 1.günde bütün gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 6).



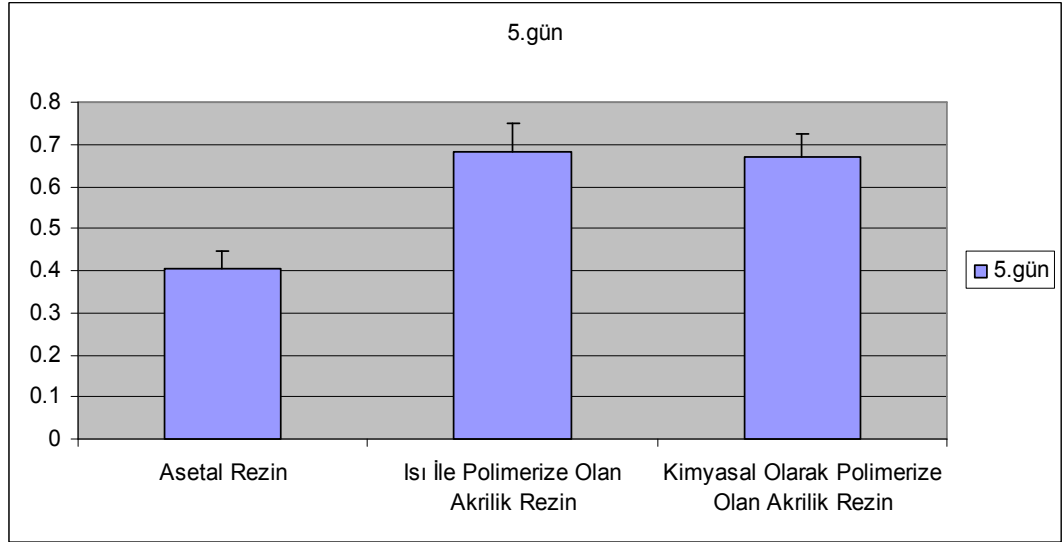
Grafik 7: 1 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

3. günde en yüksek canlılık değeri %82.65 ile ısı ile polimerize akrilik rezin en düşük canlılık değeri %58.39 ile asetale aittir (Grafik 8) (Tablo 4). 3.günde ısı ile polimerize akrilik rezin ile kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin arasında anlamlı bir farklılık yokken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 6).

5. günde en yüksek canlılık değeri %91.07 ile ısı ile polimerize olan akrilik rezin en düşük canlılık değeri %54.38 ile asetale aittir (Grafik 9) (Tablo 4). 5.günde ısı ile polimerize olan akrilik rezin ile kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin arasında anlamlı bir farklılık yokken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 6).

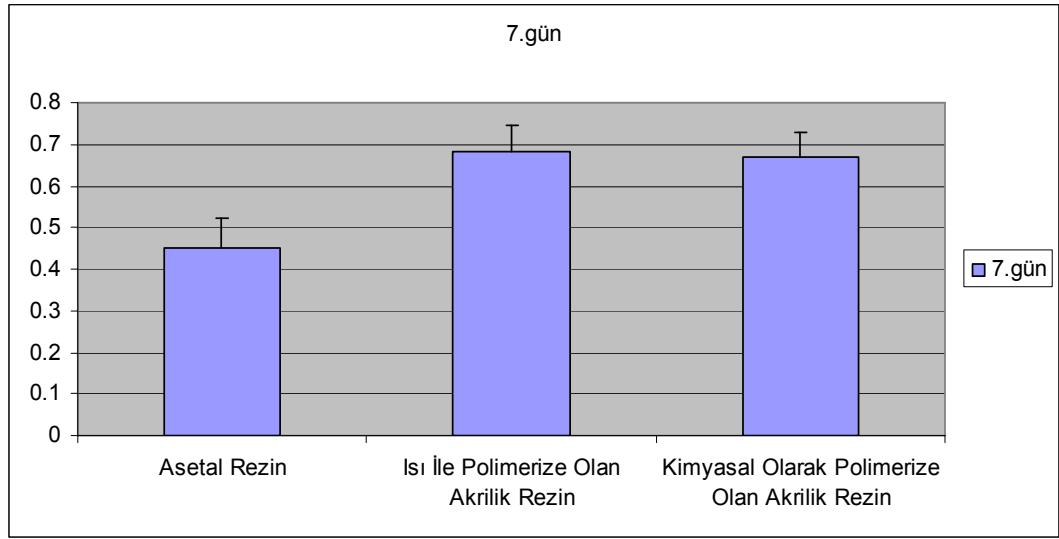


Grafik 8: 3 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.



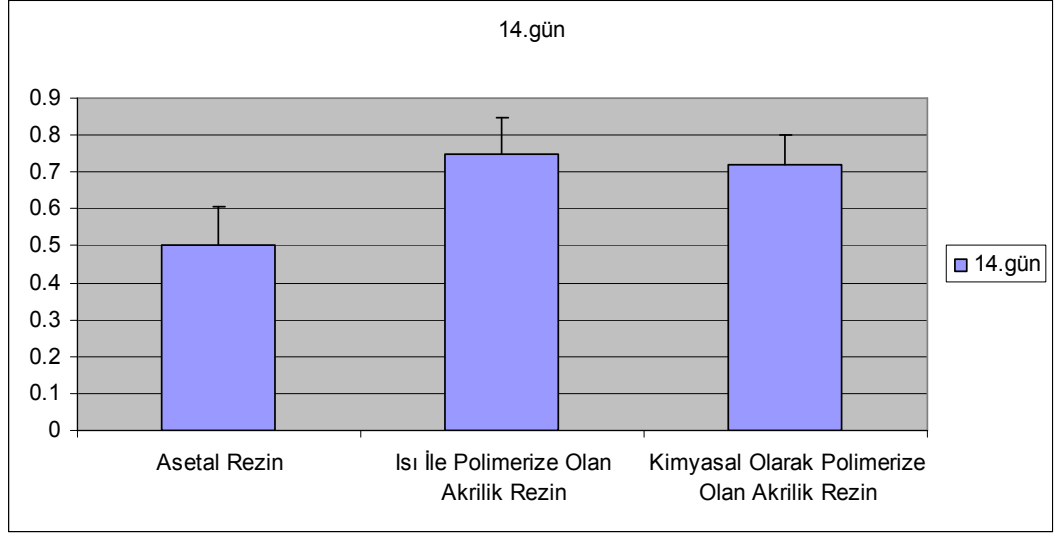
Grafik 9: 5 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

7. günde en yüksek canlılık değeri %91.52 ile ısı ile polimerize olan akrilik rezin en düşük canlılık değeri %60.23 ile asetale aittir (Grafik 10) (Tablo 4). 7.günde ısı ile polimerize olan akrilik rezin ile kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin arasında anlamlı bir farklılık yokken diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 6).

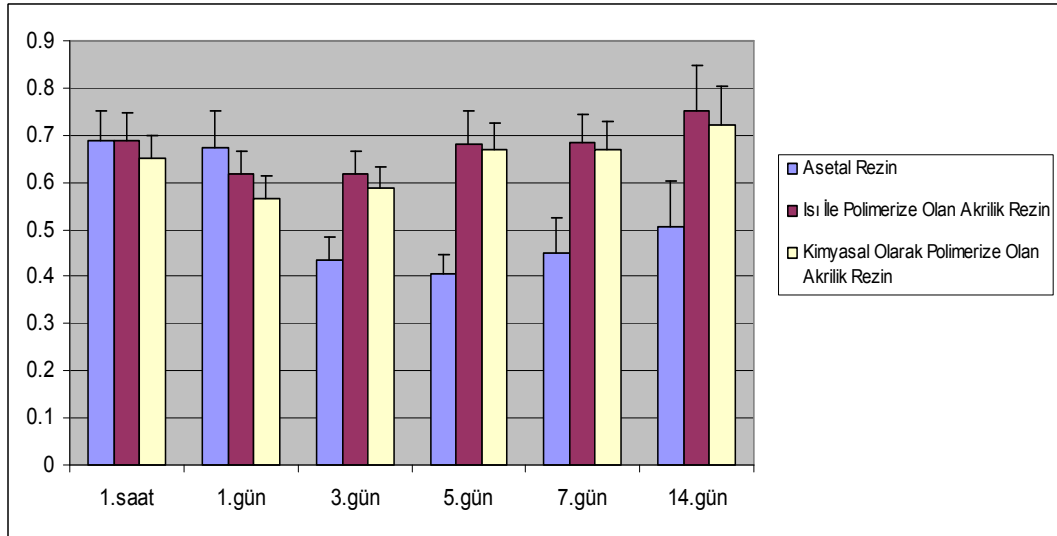


Grafik 10: 7 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.

14. günde en yüksek canlılık değeri %98.44 ile ısı ile polimerize akrilik rezin en düşük canlılık değeri %67.48 ile asetale aittir (Grafik 11) (Tablo 4). 14.günde asetale resin ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık varken ($p<0.05$); diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 6).



Grafik 11: 14 günlük inkübasyon süresinde protez kaide maddelerinin sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerine ait ortalamalar.



Grafik 12: Farklı inkübasyon sürelerinde üç farklı protez kaide maddesine ait sitotoksosite değerlendirmeleri sonrası elde edilen optik yoğunluk değerlerinin ortalamaları.

Tablo 6: Üç farklı protez kaide maddesi ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık tablosu (ASR: Asetal rezin, ISI: Isı ile polimerize olan akrilik rezin, KİM: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin).

		KONTROL	ASR	ISI	KİM
1.SAAT	KONTROL		.005	.003	.000
	ASR	.005		.999	.176
	ISI	.003	.999		.219
	KİM	.000	.176	.219	
1.GÜN	KONTROL		.000	.000	.000
	ASR	.000		.015	.000
	ISI	.000	.015		.037
	KİM	.000	.000	.037	
3.GÜN	KONTROL		.000	.000	.000
	ASR	.000		.000	.000
	ISI	.000	.000		.222
	KİM	.000	.000	.222	
5.GÜN	KONTROL		.000	.001	.000
	ASR	.000		.000	.000
	ISI	.001	.000		.920
	KİM	.000	.000	.920	
7.GÜN	KONTROL		.000	.004	.000
	ASR	.000		.000	.000
	ISI	.004	.000		.883
	KİM	.000	.000	.883	
14.GÜN	KONTROL		.000	.998	.585
	ASR	.000		.000	.000
	ISI	.998	.000		.635
	KİM	.585	.000	.635	

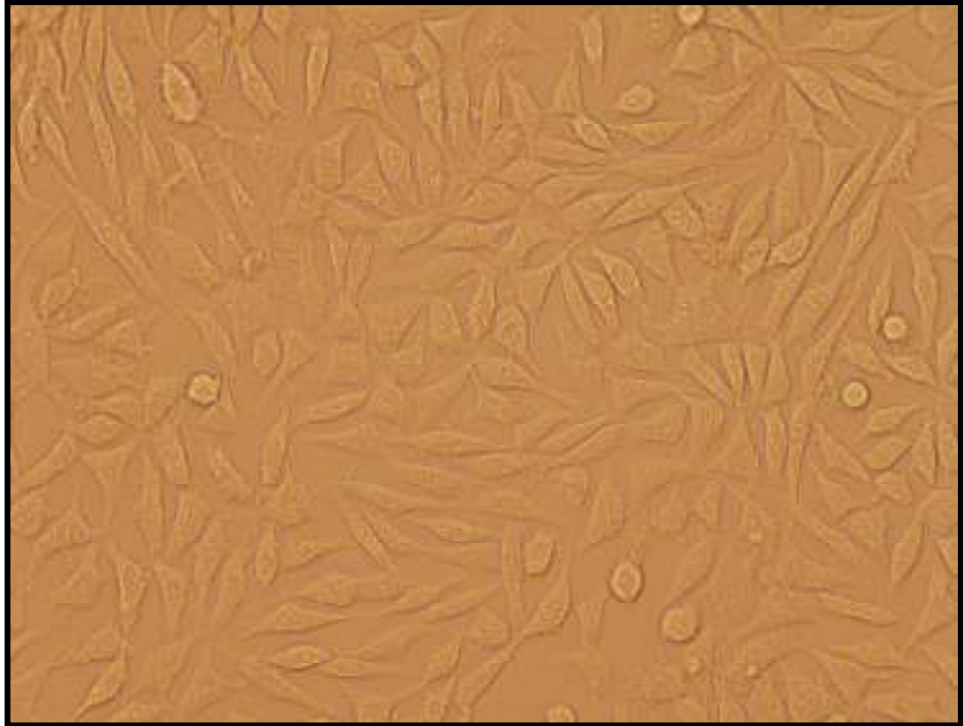
Bütün materyallerin MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde; 1., 3., 5., 7. günlerde, üç protez kaide maddesinde kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gözlenmiştir ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 6).

Elde edilen veriler sonucunda, asetale resin için; 1.günde, 1. saate göre sitotoksitesinde artma (hücre canlılığında azalma) gözlenirken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Asetale resinin sitotoksitesindeki artma, diğer inkübasyon periyotları ile karşılaştırıldığında, 3. ve 5. günlerde maksimum seviyeye ulaşmış ve sitotoksitedeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 1.ve 3. günden sonra sitotoksik etkide artma (hücre canlılığında azalma) gözlenmektedir. 5. günden sonra sitotoksik etkide azalma vardır.

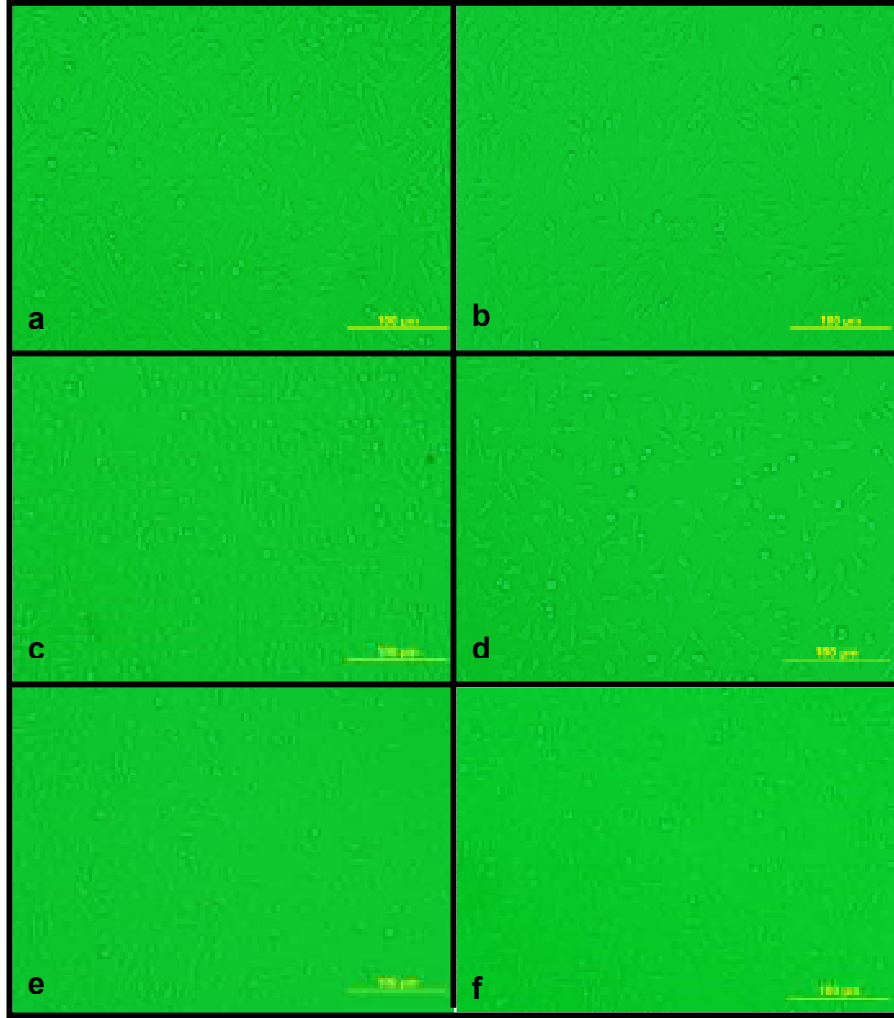
Elde edilen veriler sonucunda, protez kaide maddeleri arasında 3.,5.,7.,14, günlerde en fazla sitotoksik etki asetale rezinde gözlenmiştir. Ancak 1. saat ve 1.günde, üç protez kaide maddesi karşılaştırıldığında, en az sitotoksik etki asetale rezinde gözlenmiştir (Grafik 1, 4).

Bütün inkübasyon sürelerinde, ısı ile polimerize olan akrilik resin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinden daha az sitotoksik etki göstermiştir (Grafik 1, 4).

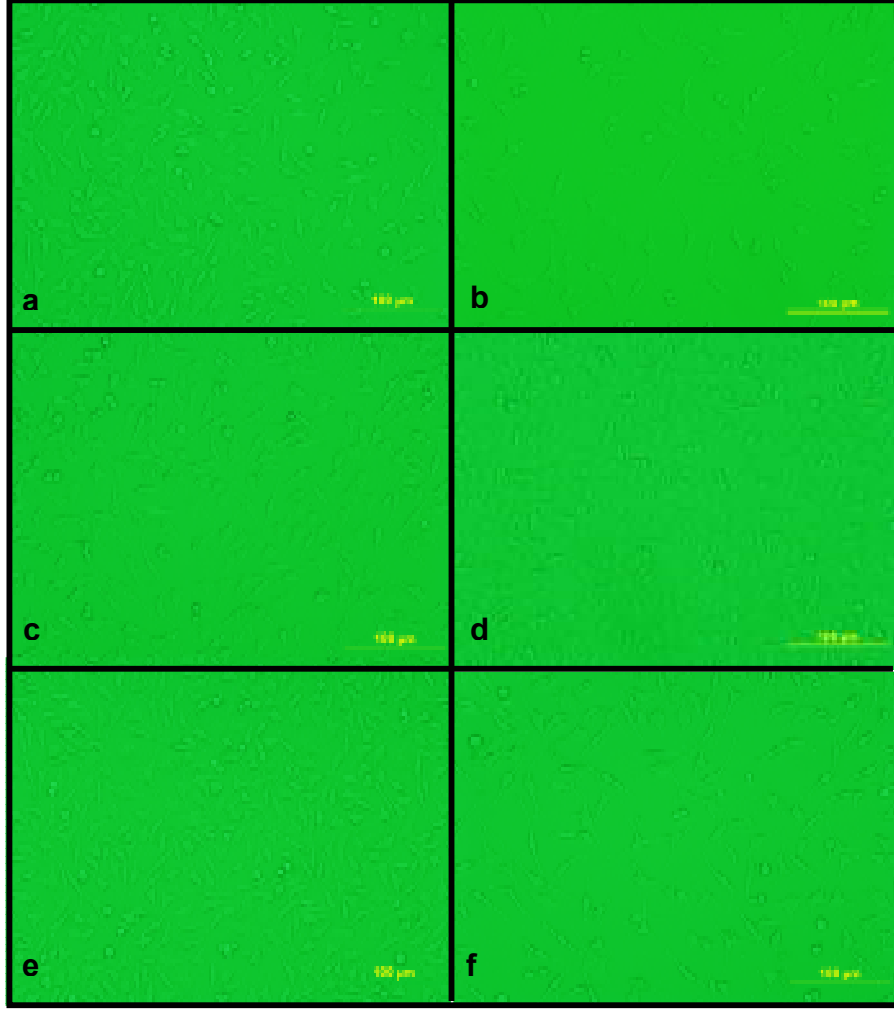
MTT testi sonucunda elde ettiğimiz hücre canlılığın sayısal değerleri dışında gruplara ait pleytlerdeki hücrelerin, doku kültürü mikroskobu altındaki görünüşleri sayesinde değerleri tekrar gözden geçirmek ve sonuçların sağlamasını yapmak mümkün olmuştur. Fibroblast hücrelerinin normal görüntüsünde, hücreler pürüzsüz ve iç yapısındadır. Hücre kontrol grubunun mikroskobik görüntülerinde hücrelerin kenar konturlarının parlak olduğu ve membran yapısının sağlam olduğu görülmektedir (Resim 20). Sitotoksositeye bağlı olarak hücre yapılarında bazı değişiklikler oluşmaktadır. Toksisiteyi gösteren bulgular; hücrelerin yuvarlaklaşması, yüzeyden ayrılması, hücre yapılarındaki morfolojik bozukluk ve devleşmiş hücre yapılarının varlığıdır. Hücre yapılarındaki zamana ve sitotoksitedeki artışa bağlı ortaya çıkan değişiklikler Resim 21, 22, 23' te yer almaktadır.



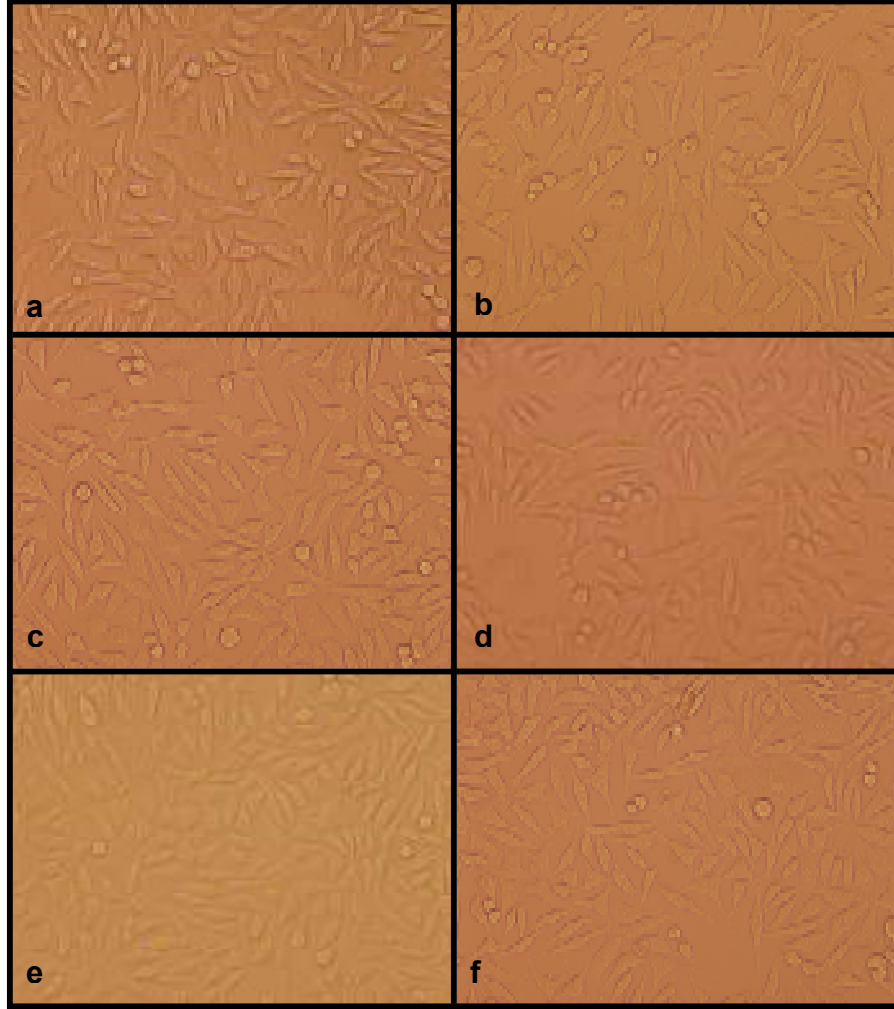
Resim 20: Kontrol grubuna ait mikropleytin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü.



Resim 21: Asetal rezine ait mikroyeytlerinin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü. (a: 1.saat, b: 1. gün, c: 3. gün, d: 5.gün, e: 7.gün, f: 14.gün).



Resim 22: Isı ile polimerize olan akrilik rezine ait mikropleytlerinin doku kültürü mikroskobu altındaki görünümü. (a: 1.saat, b: 1. gün, c: 3. gün, d: 5.gün, e: 7.gün, f: 14.gün).



Resim 23: Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ait mikropleytlерinin doku kьltьrь mikroskobu altındaki gьrьnьmь (a: 1.saat, b: 1. gьn, c: 3. gьn, d: 5.gьn, e: 7.gьn, f: 14.gьn).

5. TARTIŞMA

Diş hekimliği pratiğinde kullanıma sunulan materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, biyolojik testlerle de standardize edilmiş olmaları son derece önemlidir. Canlı dokularla sürekli temas halinde olan maddelerin biyolojik yönden uyumlu olmaları gereklidir.

Protetik diş tedavilerinde hareketli ve tam protezler başta olmak üzere, kaide maddelerinin geniş uygulama alanları bulunmaktadır. Isı ile ve kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinlerin; formaldehit, benzoik asit, metil metakrilat, metakrilik asit gibi toksik maddeler içerdiği gösterilmiştir^{3,89,104}. Protez kaide maddelerinin toksisiteleri ve alerjik olma potansiyelleri ile ilgili problemler alternatif materyal arayışlarını gündeme getirmiştir. Formaldehitin polimerizasyonu ile elde edilen asetal rezin, protez kaide maddesi olarak 50 yıl önce piyasaya sunulmuştur¹⁰⁵. İlgili literatürler incelendiğinde asetal rezinin fiziksel özellikleri ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen, biyolojik uyumluluğu ile ilgili diş hekimliği literatüründe çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında rutin pratikte kullanılan kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin, ısı ile polimerize olan akrilik rezin ve protez kaide maddesi olarak kullanılabilen asetal rezinin, klinik başarı açısından önemli belirleyicilerden olan biyouyumluluğunun in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada, protez kaide maddelerine ait mum örnekler, 10 mm çapında ve 1 mm kalınlıkta hazırlanmıştır. Bu boyutların seçilme nedenleri; tam ve bölümlü protezlerde 1 mm'nin minimum kalınlık ölçüsü olması, deney düzeneğinde örneklerin besi yeri içine tamamen gömülmesi gerekliliği, sitotoksikite test yönteminde, diskler besi yeri içine yerleştirildiğinde, yüzey/vasat oranının 0.5- 6 cm²/ml olması gerekliliğidir^{3,52, 72, 102,103}.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin dokular üzerinde yarattığı toksik etkilerinin değerlendirilmesinde in vitro ve in vivo koşullarda yürütülen yöntemler kullanılmaktadır^{106,107,108}. Hayvan deneylerinin pahalı ve zaman alıcı olması, hayvanların beslenme ve bakımıyla ilgili sorunlarla karşılaşılabilmesi, bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımı sınırlandırmaktadır^{109,110}.

İn vitro koşullarda yürütülen test yöntemleri, materyallerin temel biyolojik fonksiyonlar üzerine etkilerinin ve bunlara karşı oluşan hücresel yanıtların belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. İn vitro çalışmalar; kontrol edilebilen koşullarda yürütülen ve hücresel toksisitenin mekanizmasını açıklayan, uygulanması kolay araştırmalardır⁵⁰.

Hücre kültürü test yöntemleri, diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyolojik uyumluluğunun değerlendirilmesi konusunda son yıllarda tercih edilen önemli yöntemlerden biri olmuştur^{58,107,111}. Hücre kültürü test yöntemleri, bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, tekrarlanabilirlik özellikleri, ara aşamalarda kontrollerinin kolay olması, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir^{65,112,113}. Bu çalışmada da, protez kaide maddelerinin sitotoksiteleri, in vitro koşullarda hücre kültürü test yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Materyallerin test edilmeleri esnasında izlenecek yolları standart hale getirmek amacıyla ASTM, ISO, ADA gibi bazı kuruluşlar bulunmaktadır. Test örneklerinin hazırlanmasında "ISO'nun 10993 – 5 numaralı protokolünün "Sitotoksite testleri - in vitro yöntemler" bölümü rehber alınmıştır.

İn vitro çalışmalarla materyallerin biyouyumluluğu belirlenirken kullanılan test yöntemlerinin yanı sıra, materyalin etkisinin inceleneceği hücre tipi de önem taşımaktadır. Hücre kültürü çalışmaları genel olarak farklı

dokulardan üretimi sağlanabilen 2 tip (primer ve devamlı) hücre kültürü üzerinde yapılmaktadır². Primer hücre kültürleri, kontrollerinin son derece güç olması, hücrelerin standardizasyonun sağlanamaması, üretim aşamasındaki zorlukları ve hassas hücreler olmaları nedeniyle çalışma sırasında ortaya çıkabilen sorunlara rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri ve kromozomal anomalilerin görülmemesi nedeniyle pek çok çalışmada kullanılmaktadır. Spesifik metabolik potansiyele sahip primer hücrelerin kullanımı, in vivo şartlara daha yakın deneysel koşullar oluşturmaktadır¹¹⁴. Devamlı hücre kültürleri, aneuploid kromozoma sahiptirler, hızlı üremektedirler ve doğru pasajlandıklarında uzun süre yaşatılmaları mümkündür ve elde edilmeleri primer hücre kültürlerine göre daha kolaydır. Ayrıca genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonu kolay gerçekleştirilmekte ve uzun dönem fenotipik özelliklerinde kayıp söz konusu olmamaktadır. Bu çalışmada, avantajları nedeniyle devamlı hücre kültürlerinin kullanımı tercih edilmiştir.

Diş hekimliğinde kullanılan rezinlerin sitotoksik özelliklerini belirlemek amacı ile günümüze kadar düzenlenen araştırmalarda, insan gingival fibroblastları^{7,90,91,115,116}, oral epitelial hücreler^{4,5,90,107}, 3T3 fare fibroblast hücreleri^{117,118}, L929 fare fibroblast hücreleri^{91,93,117,119,120} gibi çeşitli hücre dizilerinin kullanıldığı görülmektedir.

Schedle ve arkadaşları¹¹¹, metal alaşımlarının sitotoksik etkilerini, L-929, dişeti fibroblast ve mast hücrelerinde 7 gün süre ile incelemiştir. Araştırmacılar çalışma sonucunda, in vitro sitotoksikite testlerinde L-929 fibroblastlarının, primer dişeti fibroblast ve mast hücre kültürlerine oranla, üreme yeteneklerinin gelişmiş olması nedeniyle kullanımlarının uygun olacağını belirtmişlerdir.

Thonemann ve arkadaşları¹²¹, rezin bileşiklerin sitotoksikitesini; primer sığır diş papillası hücreleri (CPC), SV40T antijeniyle transforme edilen

CPC hücreleri (tCPC B), E6/E7 onkojeni ile transforme edilen CPC hücreleri (tCPC E) ve L-929 fare fibroblast hücrelerinde değerlendirmiş; 24 saat inkübasyon sonunda sonuçları MTT analizi ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda kullanılan hücrelerin hassasiyetleri $CPC = tCPC B < tCPC E < L-929$ şeklinde sıralamışlar, L929 fare fibroblast hücrelerinde daha hassas sonuçlar elde edildiğini göstermişlerdir.

Saw ve arkadaşları¹²², yaptıkları sitotoksikite çalışmalarında geçerliliği, popülerliği ve in vitro koşullarda üreyebilmesi nedeniyle L929 hücrelerini tercih etmişlerdir.

Taira ve arkadaşları¹¹⁷, dört farklı fibroblast kültüründe metil metakrilat monomerinin sitotoksik etkisini 6 gün süre ile incelemişlerdir. L929, C3H10T1/2, Balb3T3 klon A31, MC3T3-E1 hücre kültürlerinin hepsinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki oluşturduklarını gözlemişlerdir. Balb3T3 klon A31 hücrelerinin toksik maddelere en hassas olduğunu belirtmişlerdir.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik özelliklerinin incelenmesinde L-929 veya 3T3 fare fibroblastları, kolay bulunabilmeleri, çoğalma oranları ve biyolojik cevapları nedeniyle sitotoksikite testlerinde rutin olarak kullanılmakta; ISO tarafından başlangıç sitotoksikite değerlendirmelerinde kullanılması önerilmektedir^{117,123}.

Bu araştırmada da, protez kaide maddelerinden hazırlanan deney örneklerinden 1.saat ve 1.,3.,5.,7.14. gün sonundaki inkübasyon periyotlarında elde edilen ekstraktların in vitro olarak sitotoksikite testlerinin karşılaştırılmasında, standart biyolojik cevabın elde edilebilmesi amacıyla L-929 fare fibroblast hücrelerinin kullanımı tercih edilmiştir.

Sitotoksikite testlerinde, hücre ölümü en önemli değerlendirme kriterlerinden biridir. Literatürde, sitotoksikite, süksinik dehidrogenaz (SDH)

isimli mitokondriyal enzimin aktivitesinin MTT testi kullanılarak ölçülmesiyle değerlendirilen çeşitli çalışmalar mevcuttur^{124,125,126,127}.

Schweikl ve Schmalz¹²⁷, kimyasal olarak farklı yapıda olan diş hekimliği materyalleri üzerinde MTT, nötral kırmızı ve kolorimetrik hücre çoğalmasını ölçen test yöntemlerinin hassasiyetini inceledikleri çalışmalarında; MTT testinin sitotoksosite çalışmalarında kullanılabilecek güvenilir, etkili ve ekonomik bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bean ve arkadaşları¹²⁸ da, aynı anda çok sayıda örneğin test edilebilmesine olanak sağlayan MTT test yönteminin hücre içi biyokimyasal değişiklikleri göstermesi ve tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılabilmesi nedeniyle tercih edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Wataha ve arkadaşları¹²⁹, diş hekimliğinde kullanılan alaşımların toksik etkilerini farklı sitotoksosite test yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuçta, MTT yönteminde kullanılan boyanın, hücre içerisinde kısa sürede metabolize edilebilmesi; verilerin Elisa okuyucusunda ya da spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi nedeniyle tekrarlanabilir olması; farklı zamanlarda yapılan araştırmalara ait sonuçların karşılaştırılabilmesi gibi nedenlerden dolayı; bu yöntemin diğer sitotoksosite testlerine oranla daha avantajlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Araştırmamızda, enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT testi, sitotoksosite testleri içerisinde tekrarlanabilirliği, uygulama kolaylığı, hızlı sonuç elde edilmesi, materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin bile değerlendirilmesine imkan vermesi gibi avantajları nedeniyle tercih edilmiştir^{93,130,131}.

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde, elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Shapiro-Wilks Testi kullanılmıştır. Shapiro-Wilks testinin kullanılmasının

nedeni, küçük örneklem hacimlerine uygulanabilecek normallik varsayımını sınanan en güçlü test olmasıdır. Tüm gruptaki verilerin normal dağılıma uyduğu test edildikten sonra grup ortalamalarının karşılaştırılması için parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Tek yönlü varyans analizinin kullanılma nedeni, grup ortalamaları karşılaştırılırken şayet veriler sürekli ise, gruplar bağımsızsa ve karşılaştırılan grup sayısı 3'ten fazla ise gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı test etmek için kullanılabilecek en uygun yöntem olmasıdır. Tek yönlü varyans analizi sonucunda grup ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve farkın hangi grup ya da gruptan kaynaklandığını tespit etmek için çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Çalışmadaki her bir deney grubu ile kontrol grubunu karşılaştırmak için çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnett yöntemi; gruplar arasındaki diğer karşılaştırmalarda Tukey HSD yöntemi kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde güven düzeyi %95 olarak kabul edilmiştir ($p < 0.05$).

İn vitro sitotoksite testleri tasarlanırken, testlerin materyalin klinik kullanımını, direk ve indirek temas yollarını taklit etmesi hedeflenir. Direk hücre materyal teması test örneklerinin hücrelerin üzerine yerleştirilmesi ile sağlanır^{111,132,133,134}. Diğer bir direk temas şekli ise ekstraktlarının kullanılması ile gerçekleşir^{135,136,137}. İn vitro olarak indirek temasın sağlanması ise agar overlay, milipor filtre veya dentin bariyer gibi sert ara bir katmanın hücreler ve materyal arasına yerleştirilmesi ile gerçekleşir^{50,136,138,139,140}.

Cao ve arkadaşları¹²³, dört farklı ışık kaynağında polimerize olan kompozit materyallerin, L-929 hücrelerine direk temas, indirek temas ve ekstraksiyon sıvılarının direk teması olmak üzere üç şekilde sitotoksitelerini 24 saat süre ile değerlendirmişlerdir. Direk ve indirek temas yöntemlerinde benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen, ekstraksiyon sıvılarının teması sonucu elde edilen verilerin hassasiyetinin daha az olduğunu gözlemlemişler,

hücre-materyal direk temas yönteminin in vivo fizyolojik ortamı daha iyi taklit ettiğini öngörmüşlerdir.

Saw ve arkadaşları¹²², kompozit materyallerin sitotoksitesini L-929 hücre dizisinde, üç farklı temas yöntemi ile incelemiştir. MTT testi sonuçlarına göre hassasiyet derecelerine göre ekstraksiyon sıvısı teması<direk temas testi<indirek temas testi olarak sıralamışlardır.

Tang ve arkadaşları¹⁴¹ altı çeşit metakrilat polimerinin sitotoksitesini, insan oral fibroblast kültüründe, farklı hücre-materyal temas yöntemleri ile incelemiştir. İndirek yöntemdeki bariyerin varlığının, hücre canlılığını etkilediğini, rezin toksitesinde bilinmeyen faktörlerin ortaya çıkmasına neden olduğunu açıklamışlardır. Sitotoksitenin belirlenmesinde direk yöntemin kullanımını önermişlerdir. Araştırmamızda hücre- materyal teması için ekstraksiyon test yönteminin seçilmesinin nedeni, ağız mukozasının protez kaide maddelerinden tükürüğe salınan komponentler ile direk temasta olmasıdır.

ISO 10993-5 numaralı “Sitotoksite testleri-in vitro yöntemler” bölümüne göre ekstraksiyon süresi olarak 37°C’ de 24 saatlik süreyi önermektedir. Ancak çalışmalarda farklı ekstraksiyon sürelerinde değerlendirilmeler yapılmaktadır. Ayrıca daha belirleyici sonuçlar elde etmek için vasat ile test materyalinin daha uzun süreli temas etmesi gerektiği bildiren çalışmalar vardır^{113,142}. Sitotoksite değerlendirmeleri, 24 saat öncesi akut, 24 saat sonrası subakut sitotoksik etkiler şeklinde belirtilmiştir. Bu çalışmada, rezinlerin sitotoksitesini belirlemek amacıyla 1 ve 24 saat akut dönem; 3,5,7,14 gün subakut, uzun dönem inkübasyon periyotları seçildi.

İn vitro sitotoksite testleri ile ilgili düzenlemelerin yer aldığı ISO 10993- 5’de belirtilen kriterlere göre; negatif kontrol materyaline oranla hücre proliferasyonunu % 25’ten daha az inhibe eden (% 75’ten fazla hücre

proliferasyonu) materyaller “non-sitotoksik”, % 25-50 arasında inhibe eden (% 50-75 hücre proliferasyonu) materyaller “hafif derecede sitotoksik”, % 50-75 (% 25-50 hücre proliferasyonu) arasında inhibisyon oluşturan materyaller “orta derecede sitotoksik” ve % 75’ten fazla inhibisyon oluşturan (% 25’ten az hücre proliferasyonu) materyaller ise “yüksek derecede sitotoksik” olarak sınıflandırılmaktadır.

Araştırmamızda, protez kaide maddelerinin biyolojik ortamda (hücre kültürü vasatında) ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların direk olarak hücre kültürlerine uygulanması sonucunda belirlenen in vitro hücre proliferasyon değerlerine dayanarak; incelenen deney gruplarının ISO 10993-5 'de belirtilen kriterlere göre in vitro sitotoksik özellikleri ‘hafif derecede sitotoksik’ ile “non-sitotoksik” dereceler arasında değişmektedir. Bu çalışmada, ısı ile, ve kimyasal yolla polimerize olan deney gruplarının in vitro sitotoksik etkileri 1. gün en yüksek değerde iken, ilerleyen zaman periyotlarında doğru orantılı olarak canlılık yüzdeleri artış göstermekte; bir başka deyişle in vitro sitotoksik etkileri azalmaktadır. Asetal rezinde 5. günde en yüksek değerde sitotoksikite gözlenirken; 7. ve 14. günlerde sitotoksik etkide azalma gözlenmiştir.

Vallittu ve Ekstrand¹⁴², protez kaidesinde bulunan artık metil metakrilat monomerinin 1. günde en fazla, % 96’sının ilk 7 günde daha fazla salınım gösterdiğini; kalanının ise 30 gün içinde azalarak salındığını belirtmişlerdir. Uzayan sürelerde elde edilen ekstraktların sitotoksitesinin düşme nedenini, ilk 24 saat içinde besi yerine salınan maddelerin zamanla parçalanması veya besi yeri içindeki kimyasallar ile etkileşime girmesi olarak açıklamışlardır.

Huang ve arkadaşları⁹⁰, ısı, ışık ve kimyasal olarak polimerize olan kaide maddelerinden elde ettikleri 1, 3 ve 5 günlük ekstraktları insan ağız epitelyal KB hücre dizisinde ve primer insan ağız fibroblastlarında

incelemişlerdir. En fazla sitotoksik etkinin bütün rezinlerde 1. günde meydana geldiğini gözlemlemişler; bütün periyotlarda otopolimerizan akrilik rezinin, ısı ile polimerize olan akrilik rezinden daha sitotoksik olduğunu, 5 gün süre ile toksik etkinin azalarak devam ettiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçların polimerizasyon oranı veya kaide maddeleri içinde bulunan materyallerin miktarı ile ilgili olabileceği bildirilmektedir^{3,91}.

Bu araştırmada da, ısı ile, ve kimyasal yolla polimerize olan rezin, 1. gün en yüksek değerde sitotoksik etki göstermektedir. Bütün zaman periyotlarında kimyasal yolla polimerize olan akrilik rezin, ısı ile polimerize olan akrilik rezinden daha toksiktir. Protez kaide materyallerinin temel içeriklerinin deney grupları arasında zaman zaman benzerlik göstermesine rağmen, yine de kullanılan monomerlerin farklı olması ve polimerizasyon yöntemlerini farklılığı, ortaya çıkan bu sonuçların temel nedeni olduğunu düşündürmektedir.

Sheridan ve arkadaşları⁷, farklı yöntemlerle polimerize olan kaide maddelerinin sitotoksisiteyi üzerinde yaptıkları çalışmada en yüksek toksisiteye, kimyasal olarak polimerize olan kaide maddesinin ve en düşük toksisiteye ise mikrodalga ile polimerize olan kaide maddesinin sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer şekilde Cimpan ve arkadaşları⁹¹, ısı ile, kimyasal olarak ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan 3 farklı kaide maddesinin L929 fare fibroblast hücre kültürleri üzerinde oluşturdukları sitotoksisite dereceleri ve hücre ölüm mekanizmaları incelenmiş, kimyasal olarak polimerize olan kaide maddesinden salınan maddelerin ısı ve mikrodalga ile polimerize olan kaide maddelerine oranla daha fazla olduğunu ve bu nedenle de materyallerin daha fazla sitotoksisiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Ergün ve arkadaşları⁹², kimyasal, ısı ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan 4 protez kaide rezin monomerlerinin toksik etkilerini primer insan gingival fibroblastlar hücre kültürü kullanarak in vitro olarak değerlendirmişlerdir. Sonuçta test edilen tüm materyallerin monomerlerinin farklı konsantrasyonlarda ve zaman periyotlarında sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Protez kaide rezinlerinin monomerlerinde görülen sitotoksitenin, saf metil metakrilata ilave edilen çapraz bağlantı ajanlarına (glikol dimetakrilat, treetilen, tetraetilen) ve inhibitör maddelere (hidrokinon) bağlı olarak arttığını ifade etmişlerdir.

Tsuchiya ve arkadaşları⁸⁹, ısı, mikrodalga ve kimyasal yolla polimerize olan protez kaide rezinlerinden formaldehit ve MMA salınımını ve bunların sitotoksite potansiyellerini in vivo ve in vitro olarak incelemişlerdir. Akrilik rezinlerin her üçünde de in vivo ve in vitro şartlar altında formaldehit ve MMA salındığını ortaya koymuşlar, ancak önemli salınımın oto polimerize edilen akrilde görüldüğünü bildirmişlerdir. Mikrodalga ve ısı ile polimerize olan rezinlerde salınım oranını çok daha düşük bulmuşlardır. Sonuç olarak tam ve bölümlü protezlerin hastaya takılmadan önce suda bekletilmesinin ön salınım ile hem MMA'ı hem de formaldehiti önemli oranda uzaklaştıracağını bildirmişlerdir.

Melilli ve arkadaşları¹⁴³, dört tip akrilik rezinin (iki ısı ile, bir oto-polimerize ve bir ışık ile polimerize) sitotoksitesini BALB/C 3T3 fibroblast hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon periyotlarında incelemiş, otopolimerize akrilik rezinde en düşük canlılık yüzdesinin (%57) İlk 24 saatte gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Oto polimerize akrilik rezinde yüksek sitotoksite gözlenirken, ısı ve ışıkla polimerize rezinlerde kimyasal içeriklerindeki serbest monomer yokluğuna bağlı olarak biyouyumluluk gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Araştırmamızda üç materyal örnekleri ve kontrol grubu karşılaştırıldığında 14. gün salınım sonuçlarında hücre canlılık değerleri “non

-sitotoksik” çıkmıştır. Bunun nedeni salınımın ilk 7 günde fazla olmasına bağlı hücre ölümü, 7- 14. günler arasında ise salınan artık monomer miktarının azalmasına bağlı olarak tekrar hücre oluşumunun gözlenmesi olarak açıklanabilir.

Ergün ve arkadaşları¹⁴⁴, kimyasal, ısı ve mikrodalga enerjisi ile polimerize edilen dört protez kaide materyalinin sitotoksitesini primer insan gingival fibroblast hücre kültüründe agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Polimerize edilen rezin örnekler, agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemlerinde toksisite bulgusu göstermemiştir.

Aykent ve arkadaşları¹⁴⁵, üç farklı protez kaide rezin materyalinden hazırlanan örnekleri tavşan damak mukozasına yerleştirerek sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Örnekler yerleştirildikten 8 hafta sonra denekler kurban edilmiştir ve alınan doku örnekleri patolojik olarak incelenmiştir. Sonuç olarak, Acron MC (mikrodalga enerjisi ile polimerize olan akrilik rezin) Ivocap ve Paladent’ e göre daha düşük sitotoksik etki göstermiştir. Üç rezin materyali de kollajen dokusunda yıkıcı etki oluşturmamıştır. Fakat tüm rezin materyalleri epidermal büyüme faktör reseptörünü önemli ölçüde uyarmıştır.

Sipahi ve arkadaşları⁹³, araştırmalarında ısı, ışık, kimyasal ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan akrilik rezin materyalinin hücre proliferasyonu ve gingival fibroblastlar üzerindeki toksik etkilerini karşılaştırmışlardır. Hazırlanan test örneklerinin toksisitesini değerlendirmek için, hücre canlılığı MTT hücre kültürü test yöntemi ile 48. ve 120. saatlerde ölçülmüştür. Protez kaide materyalleri, içeriklerine ve polimerizasyon işlemlerine bağlı olarak orta ve düşük seviyelerde toksisite göstermiştir. Test örnekleri arasındaki en fazla toksik etkiyi kimyasal olarak sertleşen kaide materyali göstermiştir. Toksisite sırasıyla ısıyla sertleşen, görülebilir ışıkla

sertleşen, mikrodalga ile sertleşen kaide materyalinde gözlenmiş. Kimyasal olarak sertleşenlerde; 48 saatte % 75, 120. saatte % 78, ısı ile sertleşen örneklerde, 48. saatte % 80, 120. saatte % 82 hücre canlılığı elde edilmiştir. Bizim çalışma sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda, ısı ile ve kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinlerin 1. ve 3. gün zaman periyodundaki hücre canlılık değerleri, Sipahi ve arkadaşlarının 48. ve 120. saat çalışma bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde akrilik rezin protez kaidelerinin polimerizasyon yöntemlerinin in vitro sitotoksitesinin incelendiği birçok çalışma yer almaktadır^{3,5,7,44,73,90,91,94,107,112,143,146,147}.

Kaide maddelerinin sitotoksite değerlendirmelerine yönelik literatür taramasında, genellikle akrilik rezinlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirmelerinin yapıldığı görülmektedir^{3,5,7,119,144}. 1960'lerden sonra protez kaide maddesi olarak kullanımı piyasaya sürülen asetal rezin ile akrilik rezinlerin biyouyumluluklarının karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Formaldehit polimerizasyonundan oluşan asetal rezin kalp kapakçığı protezleri^{95,96}, ortopedik implantlar⁹⁷, total kalça, eklem protezleri^{96,99} gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Pennick ve arkadaşları⁹⁹, 5 gün süre ile 1,5,10,15 ve 20 defa otoklavdan geçirilen beyaz asetal rezinin, insan mezenşimal kök hücrelerinin çoğalmasına ve kondrogenik farklılığına negatif etkisinin olup olmayacağını incelemişlerdir. Sonuç olarak, MSC hücrelerinin POM'u etkilemediğini, bir haftalık periyotta POM'dan salınımının gerçekleştiği ekstraksiyon sıvısının, hücrelerin çoğalma oranında belirgin bir değişiklik oluşturmadığını belirtmişlerdir. POM materyalinin özellikle insan MSC hücreleri için zararsız bir materyal olduğunu bildirmişler, nedenini ise değişik hücre kültürlerinin hassasiyetindeki farklılık, materyalin hazırlanış şekli olarak açıklamışlardır.

Materyalin hazırlanma aşamasında 20 defa otoklavlanması formaldehit veya diğer termal olarak yıkılan ürünlerin azalmasına neden olabilir. Bu çalışma, bizim çalışmamızla farklılık göstermektedir. Asetal rezin örnekleri, ISO standartlarına göre “orta derecede sitotoksik”; kimyasal olarak ve ısı ile polimerize olan akrilik rezin örneklerinden ise istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki göstermiştir.

1959 yılında, Dupont araştırmacıları, enzimler, ısı, asitler, radyasyonla moleküllerine parçalanmadığı müddetçe stabil kalan polimer geliştirmişlerdir. Kusy ve Turner¹⁴⁸, sekiz polimerin kimyasal analizini incelemiş ve en etkili hassasiyeti POM'un termal depolimerizasyonunda gözlemlemişlerdir. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında, POM ısıya maruz kaldığında, polimerizasyonunda geriye dönüş gerçekleşmekte, bu da zararlı olduğu bilinen artık monomerlerin açığa çıkmasına neden olabilmektedir.

Ohlin ve Linder³⁹, POM'un toksisitesini, albino tavşanlarında in vitro olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak makrofajik ve dev hücre aktivasyonu ile yabancı doku reaksiyonu gözlemlemişlerdir. POM'un kullanıldığı total kalça protez ameliyatı geçiren birçok hastada, fibrinoid nekroz ve rezorbsiyon gözlemlendiğini, buna neden olan şüpheli materyalin ise POM olduğunu belirtmişlerdir.

Kusy ve Whitley¹⁰¹, ortodontik braket olarak kullanılan POM braketlerin kimyasal olarak oluşturduğu ürünleri, braketin termal analizi sırasında ve abrazyonu sonrasında incelemişler, POM'un ısıyla veya kimyasal olarak aşındığında toksik formaldehit oluşturduğunu belirlemişlerdir. Termal analiz sonucu, POM braketin erime sıcaklığının 178⁰C, POM ürünlerinin ayrıştığı sıcaklığının 250⁰C olduğunu bildirmişler; 420⁰C'de formaldehit'e dönüşümün gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Sonuç olarak POM, olumlu mekanik ve fiziksel özellikleri nedeniyle; formaldehit salınımına neden olabilecek kimyasal (asitler, alkaliler, enzimler), mekanik (abrazyon,

sürtünme) veya radyolojik (x ışını) etkilere maruz kalınmadığı müddetçe kullanılabilir. Ancak, termokimyasal analizler ve radyokimyasal çalışmalar sonucu, POM braketlerin ve kronların ortodontide ve pedodontide kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Laluppa ve arkadaşları¹⁰⁰, çeşitli plastik materyallerinin sitotoksik etkilerini hematopoetik kök hücrelerinde in vitro olarak incelemiştir. POM'un hücrelere direk veya indirek temasında, koloni oluşumunu ve hematopoetik kök hücrelerinin büyümesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Bunun nedeninin, plastik materyalden salınan toksik maddelere bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma sonuçları bizim çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada, asetale resinin hücre canlılık değerinde, akrilik rezinlerle karşılaştırıldığında, 3. ve 5. günlerde azalma gözlenmiştir. Hücre proliferasyonu değerlerindeki bu azalmanın nedeni, polimerizasyonu tamamlanmamış kimyasal maddeler, kültür ortamında meydana gelebilecek negatif bir koşula bağlı olabilen biyolojik cevaba bağlı olabilir.

Çalışmamızda, pembe renkte asetale resin kullanılmıştır. Özkan ve arkadaşları¹⁴⁹, pembe ve beyaz asetale resinin renk stabilitesini incelemişler, beyaz asetale resinin daha az renk stabilitesinin olduğunu gözlemişlerdir. Bunun nedenini, polimerizasyon aşamasında fazla ısıtma, etkisiz basınç, renkliliği sağlayan akrilik fiberlerin oluşturduğu poröziteye bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da asetale rezine renk veren akrilik fiberler veya olası porözite varlığı sitotoksik etkiyi arttırmış olabilir.

Resin materyalinin neden olduğu sitotoksitenin, materyalden salınan reaksiyona girmemiş bileşiklerden veya ürünlerden kaynaklı olduğu bilinmektedir. Protez kaide rezinlerinde toksik reaksiyon oluşturma potansiyeline sahip maddeler metil metakrilat, formaldehit, benzoil peroksit, hidrokinon, boya maddeleri, metakrilik asit, dibütilfitalat, fenil benzoat, fenil

salisilat ve disikloheksil fatalatdır. Bu maddelerden birinin ya da birkaçının salınımı sitotoksositeye neden olmaktadır. Ancak asıl neden polimer içindeki polimerize olmamış artık monomerdir ve rezindeki artık monomer oranındaki artış hassasiyeti arttırmaktadır.

Formaldehit %37 H₂CO, %47-%53 su, %10-%15 metanol içeren gazdır. CH₂O buharının mukoza membranında irritasyon yaptığı ve dermatit oluşturduğu bilinmektedir. Su ile reaksiyona girdiğinde veya yutulduğunda, CH₂O karın ağrısı, hematüri, hatta ölüme neden olabilmektedir¹⁰¹.

Artık monomer miktarı; kaide maddelerinin kompozisyonu, polimerizasyon yöntemleri ve koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Rezinlerin kimyasal içeriği ve saflığı, monomerin polimere dönüşme miktarı rezinin biyolojik ve fiziksel özelliklerini etkilemektedir³. Yapılan çalışmanın bir in vitro test olması sebebi ile in vivo koşullar ile doğrudan bağdaştırılamasa bile bu tür testlerin, biyomateryallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde önemli rollerinin olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca meydana gelen hücre ölümlerinin kaide maddelerinden salınan spesifik maddelere bağlı olarak meydana gelebileceği düşünüldüğünden ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

Rutin pratikte protez kaide maddesi olarak kullanılan ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ve asetale resinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük inkübasyon süreleri sonunda sitotoksiklerinin MTT testi ile değerlendirildiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Bütün inkübasyon sürelerinde, çalışmamızda kullanılan kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin, ısı ile polimerize olan akrilik rezinden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir.
2. Bütün materyallerin MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde; 1.,3.,5.,7. günlerde, üç protez kaide maddesinde de kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gözlenmiştir ve farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).
3. Çalışmamızda kullanılan ısı ile polimerize olan akrilik rezin ve kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin 1. günde en yüksek değerde sitotoksik etki gösterirken; ilerleyen zaman periyotlarında doğru orantılı olarak hücre canlılık yüzdelerinde artış göstermektedir.
4. Asetale resin, 5. günde en yüksek değerde sitotoksikite gösterirken; 7. ve 14. günlerde sitotoksik etkide azalma gözlenmiştir.

7. ÖZET

ÜÇ FARKLI PROTEZ KAİDE MATERYALİNİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ.

Bu çalışmanın amacı, ısı ile polimerize olan akrilik rezin, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin ve asetale resinin 1. saat ve 1.,3.,5.,7.,14. günlük inkübasyon süreleri sonunda sitotoksiklerinin L-929 fare fibroblast hücrelerinde incelenmesidir.

Her bir inkübasyon süresi için 5 örnek, aseptik koşullarda 10 mm çapında ve 1 mm kalınlığında olacak şekilde, steril kalıplarda hazırlanmıştır. Sitotoksikite sonuçları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Grup ortalamalarının karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılmasında çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnet; diğer karşılaştırmalarda Tukey HSD yapılmıştır. Resin örneklerin bütün inkübasyon periyotlarında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bütün inkübasyon sürelerinde, kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin, ısı ile polimerize olan akrilik rezinden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Isı ile polimerize olan akrilik rezin ve kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezin 1. günde en yüksek değerde sitotoksik etki göstermiştir. Asetale resin, 5. günde en yüksek değerde sitotoksikite gösterirken; 7. ve 14. günlerde sitotoksik etkide azalma gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrilik Resin, Asetale resin, Sitotoksikite.

8. SUMMARY

EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF THREE DIFFERENT DENTURE BASE RESIN MATERIALS IN VITRO.

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effects of the heat-polymerized and auto-polymerized acrylic resins; and acetal resin as denture base materials on L-929 mouse fibroblast cells over 1st hour, 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th days period.

Five samples of each resin were fabricated under aseptic conditions in sterile moulds 12 mm in diameter and 1 mm thick for every incubation period. Cytotoxicity of resins was measured by MTT test. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Tukey and Dunnet tests were used to determine differences among the groups. Statistically significant difference was found among test groups at all time incubation periods.

The results showed that; the auto-polymerized resin showed more cytotoxic effect than heat-polymerized resin in all time periods. The autopolymerized resin and heat-polymerized resin showed highest cytotoxic effect on the first day; however acetal resin showed highest cytotoxic effect on the 5th day than heat and auto-polymerized resin; the cytotoxic effect of acetal resin decreased on 7th and 14th days periods.

Keywords: Acrylic resin, Acetal resin, Cytotoxicity.

9. KAYNAKLAR

1. Keskin H, Özdemir T, Tuncer N, Aksoy C. Gnatoloji. 1.Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi; 1997.
2. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. J Dent 1994; 22: 6-11.
3. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster G. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. J Prosthet Dent 1994; 72(6): 644-50.
4. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. Int J Prosthodont 1993; 6(5): 495-501.
5. Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, Caughman WF. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. Int J Prosthodont 1991; 4(4): 371-6.
6. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. Int J Prosthodont 1995; 8(2): 122-8.
7. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. Int J Prosthodont 1997; 10(1): 73-7.
8. Rodford RA. Further development and evaluation of high impact strength denture base materials. J Dent 1990; 18(3):151-7.
9. Woelfel JB. Processing complete dentures. Dent Clin North Am 1977; 21(2): 329-38.
10. Anusavice KJ. Phillips' science of dental materials. 11 th Ed. St. Louis: Saunders: Elsevier Science Ltd.; 2003.

11. Philips RW. Skinner's science of dental materials. 8 th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp.; 1982.
12. O'Brien WJ. Dental materials and their selection. 2 nd Ed. Chicago: Quintessence Publishing Co; 2002.
13. McCabe JF, Walls AWG. Applied dental materials. 8 th Ed. Cambridge: Blackwell Scientific Publications, 1999.
14. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. J Prosthet Dent 2002; 87(4): 364-79.
15. Craig, RG, Powers JM, Wataha JC. Dental materials: Properties and manipulation. 7th Ed. St Louis: Mosby; 2004.
16. Whitters CJ, Strang R, Brown D, Clarke RL, Curtis RV, Hatton PV, et al., Dental materials: 1997 literature review. J Dent 1999; 27(6): 401-35.
17. Çalikkocaoğlu S. Tam protezler.4. Baskı. İstanbul: Protez Akademisi ve Gnatoloji Derneği; 2004.
18. Kökçü D. Protez Kaide Materyallerinde Farklı Polisaj Yöntemlerinin mikrosertlik ve bakteriyel kolonizasyon üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2007.
19. Zaimoğlu A, Can G, Ersoy E, Aksu I. Dişhekimliğinde Maddeler Bilgisi. Ankara: Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları; 1993.
20. Çalikkocaoğlu S. Dişhekimliğinde Maddeler Bilgisi. 3. Baskı. İstanbul: Yeditepe Üniversitesi Yayınları; 2000.
21. Ulusoy M, Aydın AK. Dişhekimliğinde Hareketli Bölümlü Protezler. Ankara: Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, 2003.

22. Bayrak Ö. Silikon Yağı İlave Edilen Polimetilmetakrilat (PMMA) Protez Kaide Materyalinin Mekanik ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Araştırılması. Doktora. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2007.
23. Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. J Oral Rehabil 2004; 31(12): 1165-72.
24. Oliveria VM, Leon BL, Del Bel Cury AA, Consani S. Influence of number and position of flasks in the monomer release, knoop hardness and porosity of a microwave-cured acrylic resin. J Oral Rehabil 2003; 30(11): 1104-8.
25. Levin B, Sanders JL, Reitz PV. The use of microwave energy for processing acrylic resins. J Prosthet Dent 1989; 61(3): 381-3.
26. Compagnoni MA, Barbosa DB, Souza RF, Pero AC. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. J Prosthet Dent 2004; 91(3): 281-5.
27. Nayır E. Dişhekimliği Maddeler Bilgisi. 7. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi; 1999.
28. Akkurt S. Plastik Malzeme Bilgisi. İstanbul: Birsan Yayınevi; 1991.
29. Craig RG, Powers JM. Restorative Dental Materials. 11 th Ed. St. Louis: Mosby; 2002.
30. Sali S. PMMA Dental Kaide Malzemesinin Cam Fiber Destekleri ile Mekanik Özelliklerindeki Artışların İncelenmesi. Yüksek Lisans. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi; 1999.
31. Rawls HR. Dental Polymers. In: Phillips' Science of Dental Materials, Ed.: K. J. Anusavice. St. Louis: Elsevier Science Ltd.; 2003.

32. Fister JS, Memoli VA, Galante JO, Rosteker W, Urban RM. Biocompatibility of Delrin 150: A Creep-resistant polymer for total joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1985; 19(5): 519-33.
33. Fitton JS, Davies EH, Howlett JA, Pearson GJ. The physical properties of a polyacetal denture resin. *Clin Mater* 1994; 17(3): 125-9.
34. Gasser B, Misteli G, Mathys R Jr. Biocompatibility of polyoxymethylene (Delrin) in bone. *Biomaterials* 1993; 14(15): 1188-9.
35. Turner JW, Radford DR, Sherriff M. Flexural properties and surface finishing of acetal resin clasps. *J Prosthodont* 1999; 8(3): 188-95.
36. Masamoto J, Iwaisako T, Matsuzaki K. Development of an advanced process for manufacturing polyacetal resin. *J Macromol Sci-Pure Appl Chem A*. 1992; 29(6): 441-56.
37. Kirsch A, Ackerman KL. The IMZ osseointegrated implant system. *Dent Clin North Am*. 1989; 33: 733-791.
38. Arda T. Asetal Rezin Kroşelerle Kobalt- Krom Kroşelerin Tutuculuk ve Deformasyonunun Karşılaştırılması. Doktora. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2004.
39. Ohlin A, Linder L. Biocompatibility of polyomethylene (Delrin) in bone. *Biomaterials* 1993; 14(4): 285-9.
40. Teoh SH. Effect of saline solution on creep fracture of Delrin. *Biomaterials* 1993; 14(2): 132-136.
41. Corigliano M, Sacco L, Chiavarelli L, Mirra H. The abutment in radio-opaque acetal resin. *The Probe* 1995; 37(1): 27-8.
42. Arda T, Arikan A. An in vitro comparison of retentive force and deformation of acetal resin and cobalt-chromium clasps. *J Prosthet Dent* 2005; 94(3): 267–274.

43. Davenport JC, Basker RM, Heath JR, Ralph JP, Glantz PO. Retention. Br Dent J 2000; 189(11): 646-57.
44. Ergün G. Farklı Yöntemlerle Polimerize Edilen Bazı Akrilik Rezinlerin Biyolojik Uyumlarının İnvitro İncelenmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 1999.
45. Kansu G. Ağızda Kullanılan Muhtelif Metal Alaşımlarının Biyolojik Uyumluluklarının Toksik ve Allerjenik Potansiyeller Yönünden Değerlendirilmesi. Doktora. Ankara: Ankara Üniversitesi; 1991.
46. Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. J Prosthet Dent 1993; 69(4): 406-15.
47. Hochman N, Zalkind M. Hypersensitivity to methyl methacrylate: mode of treatment. J Prosthet Dent 1997; 77(1): 93-6.
48. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. J Prosthet Dent 2001; 86(2): 203-9.
49. Doğan MC. Erken Kaybedilmiş Daimi Kesici Diş Eksikliğinde Kullanılan Fiberle Güçlendirilmiş Kompozit Materyalinin Bazı Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2001.
50. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996; 12(3): 186-93.
51. ISO 10993 part 5, 1999. International Standard 10993 "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods." International Organization for Standardization. Geneva; 1999.
52. ISO 7405, 1997. International Standard 7405. "Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials." International Organization for Standardization. Geneva; 1997.

53. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. Clin Oral Investig 1997; 1(4): 154-62.
54. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res 1998; 41(3): 474-80.
55. Freshney RI. Animal cell culture: A practical approach. Oxford: IRL Press Limited; 1986.
56. Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture. Cambridge: Cambridge University Press; 1997.
57. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D. Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater 1994; 15(3): 173-90.
58. Van Wyk CW, Oliver A, Maritz JS. Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? J Oral Pathol Med 2001; 30(3): 168-77.
59. Paul J. Cell and tissue Culture. 4 th Ed. Edinburgh and London: Livinstone; 1970.
60. Kısa Ü. Hücre Çoğalma Siklusuna Etki Eden Faktörler. Doktora. Ankara; Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 1993.
61. Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. J Prosthet Dent 1990; 63(5): 513-21.
62. Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys: A Review. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(1):71-84.

63. Imei Y, Watanabe A, Chang PI, Masuhara E. Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J Dent Res* 1982; 61(8): 1024-7.
64. Mjör IA, Hensten-Pettersen A. The biological compatibility of alternative alloys. *Int Dent J* 1983; 33(1): 35-40.
65. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials- does it have a role? *Int Endod J* 1988; 21(2): 50-8.
66. ISO 7405, 1984. International Standard 7405. "Technical Report." International Organization for Standardization. Geneva; 1984.
67. Aydınтуğ YS. Hücre Kültürü Ve Dişhekimliğindeki Uygulamaları. Doktora. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 2003.
68. Freshney RI. Culture of animal cells, a manual basic technique. 3 rd Ed. New York: Wiley-Liss; 1994.
69. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 1988; 21(2): 89-99.
70. Yeşilsoy C, Feigal RJ. Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. *J Endod* 1985; 11(9): 401-7.
71. Schmalz G. Agar overlay method. *Int Endod J* 1988; 21(2): 59-66.
72. Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent* 1991; 66(5): 656-9.
73. Hensten-Pettersen A, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 1981; 39(2): 101-6.
74. Arslan Güner Ç. Cam fiberle güçlendirilen akrilik rezinlerde farklı polimerizasyon yöntemlerinin rest monomer miktarına etkisinin ve

sitotoksitesinin değerlendirilmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.

75. Özdemir GK. Farklı Yumusak Astar Materyallerinin Sitotoksitelerinin Fare Fibroblastları Üzerinde Hücre Kültürü Yöntemi ile İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
76. Spangberg LS, Al-Nazhan SA. The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int Endod J* 1988; 21(2): 72-8.
77. Meryon SD. The model cavity method incorporating dentine. *Int Endod J* 1988; 21(2): 79-84.
78. Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci* 2004; 23(2): 181- 8.
79. Holst-Hansen C, Brünmer N. MTT- Cell Proliferation Assay, In *Cell Biology*. 2nd Ed. New York: Academic Press; 1998.
80. Demir E. Hipoalerjenik Akrilik Kaide Maddelerinin Fibroblastlar Üzerinde Apoptoz ve Nekroza Dayalı Sitotoksite Değerlerinin İncelenmesi. Doktora. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2007.
81. Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified calorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991; 141(1): 15-22.
82. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 1990; 62(2): 189-94.

83. Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 2003; 19(6): 487-92.
84. Scott MF, Bentley CM, Marshall CT. Setting up a new cell culture laboratory, In *Animal cell biotechnology*. Indianapolis: Humana Press;1999.
85. Wise C. Epithelial Cell Culture Protocols in *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press; 2002.
86. Yılmaz Ş. BHK 21 Hücre kültürünün seri süspanse pasajlarında integrin reseptörünün tesbiti. Yüksek Lisans. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2005.
87. Sağlam M. Genel Histoloji. 5. Baskı. Ankara: Yorum Basım Evi; 1997.
88. Bağ ve Destek Dokusu [online]: 2009 [cited 2009 Mar 17]. Available from:URL; [http:// www. aof. anadolu. edu.tr/ kitap/ EHSM// 1219/ unite 04. pdf](http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM//1219/unite%2004.pdf).
89. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71(6): 618-62.
90. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont* 2001; 14(5): 439-43.
91. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 2000; 58(5): 217-28.

92. Ergün G, Sağesen LM, Doğan A, Özkul A, Demirel E. Metilmetakrilat monomerlerinin primer insan gingival fibroblastları üzerine sitotoksik etkisinin in vitro değerlendirilmesi. GÜ Diş Hek Fak Derg 2006; 23: 97-103.
93. Sipahi C, Özen J, Ural AU, Dalkız M, Beydemir B. Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi. Gülhane Tıp Der 2005; 47: 275-8.
94. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity. J Orofac Orthop 2000; 61(4): 246-57.
95. Zilberman U, Fister JS. Formaldehyde from POM brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005; 128(2): 147-9.
96. Eschbach L. Nonresorbable polymers in bone surgery: A Review. Injury 2000; 31 (4): 22-7.
97. Buch F, Albrektsson T, Herbst E. Effects of direct currents on bone growth into delrin implants. Scand J Plast Reconstr Surg 1985; 19(3): 223-30.
98. McKellop HA, Röstlund T, Bradley G. Evaluation of wear in an all-polymer total knee replacement. Part 1: laboratory testing of polyethylene on polyacetal bearing surfaces. Clin Mater 1993; 14(2): 117-26.
99. Penick KJ, Solchaga LA, Berilla JA, Welter JF. Performance of polyoxymethylene plastic (POM) as a component of a tissue engineering bioreactor J Biomed Mater Res A 2005; 75(1): 168-74.

100. Laluppa JA, McAdams TA, Papoutsakis ET, Miller WM. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(3): 347-59.
101. Kusy RP, Whitley JQ. Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldehyde. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005; 127(4): 420-7.
102. Hensten-Petersen A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res* 1981; 89(1): 102-7.
103. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent* 1994; 71(2): 178-85.
104. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Hoshino Y, Takagi N, Kawano J. High-performance liquid chromatographic estimation of eluates from denture base polymers. *J Dent* 1989; 17(2): 84-9.
105. Smith DC. Recent developments and prospects in dental polymers. *J Prosthet Dent* 1962; 12(6): 1066-78.
106. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 2004; 32(3): 229-34.
107. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod* 2001; 27(4): 259-65.
108. Goldberg M..In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008; 12(1): 1-8.

109. Rollin BE. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: a conceptual history. *Theor Med Bioeth* 2006; 27(4): 285-304.
110. Smith SJ, Evans RM, Sullivan-Fowler M, Hendee WR. Use of animals in biomedical research. Historical role of the American Medical Association and the American physician. *Arch Intern Med* 1988; 148(8): 1849-53.
111. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Füveder W, Sperr WR, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995; 74(8): 1513-20.
112. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent* 2003; 90(2): 190-3.
113. Dahl OE, Garvik JL, Lyberg T. Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 147-53.
114. 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(2): 84-91.
115. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater* 2007; 23(1): 40-4.
116. Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts

- derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40(5): 329-37.
117. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont* 2000; 13(4): 311-5.
 118. Imazato S, Horikawa D, Ogata K, Kinomoto Y, Ebisu S. Responses of MC3T3-E1 cells to three dental resin-based restorative materials. *J Biomed Mater Res A* 2006; 15; 76(4): 765-72.
 119. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology* 2007; 24(1): 52-7.
 120. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40(5): 329-37.
 121. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 2002; 18(4): 318-23.
 122. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(1): 145-54.
 123. 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(2): 101-8.

124. 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(3); 28: 188-192.
125. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003; 28(4):440-4.
126. Ergün G, Eğilmez F, Uçtaşı MB, Yilmaz S. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *Int Endod J* 2007; 40(3): 216-23.
127. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; 104(3): 292-9.
128. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater* 1995; 11(5): 327-331.
129. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater* 1992; 8(1): 65-70.
130. Nalcaci A, Oztan MD, Yilmaz S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. *Int Endod J* 2004; 37(2): 151-6.
131. Thumwanit V, Kedjarune U. Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust Dent J* 1999; 44(4): 248-52.
132. Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod* 2010; 36(1): 40-4.

133. Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002; 23(19): 4001-10.
134. Monteiro GQ, Souza FB, Pedrosa RF, Sales GC, Castro CM, Fraga SN, Galvão BH, Braz R. In vitro biological response to a self-adhesive resin cement under different curing strategies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 92(2):317-21.
135. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand* 1999; 57(6): 316-22.
136. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent* 2000; 84(2): 229-36.
137. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using MTT and neutral red tests. *Acta Odontol Scand* 2003; 61(1): 52-6.
138. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J Biomed Mater Res* 1979; 13(1): 109-20.
139. Terhune WF, Sydiskis RJ, Davidson WM. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod* 1983; 83(6): 501-6.
140. Ulker HE, Sengun A. Cytotoxicity Evaluation of Self Adhesive Composite Resin Cements by Dentin Barrier Test on 3D Pulp Cells. *Eur J Dent* 2009; 3(2):120-6.
141. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 1999; 45(3): 214-22.

142. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil* 2001; 26(8): 666-71.
143. Melilli D, Curro G, Perna AM, Cassaro A. Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol.* 2009; 58(9): 425-34.
144. Ergün G, Sağesen LM, Doğan A, Özkul A, Demirel E. Protez kaide materyallerinin sitotoksitesinin agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemleri ile incelenmesi. *GÜ Diş Hek Fak Derg* 2006; 23: 31-7.
145. Aykent F, Avunduk MC, Durmuş E, Üşümez A. Farklı protez kaide rezinlerinin oluşturdıkları doku reaksiyonları. *Türk Diş Hekimliği Der* 2004; 55: 21-6.
146. Kedjarune U, Charoenworaluk N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 1999; 44(1): 25-30.
147. Nakamura M, Kawahara H. Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. *J Prosthet Dent* 1984; 52(5): 694-9.
148. Kusy RP, Turner DT. Influence of gamma-irradiation on the transition temperatures of crystalline polytetrafluorethylene. *J Polym Sci Part A-1* 1972; 10(6): 1745-62.
149. Ozkan Y, Arıkan A, Akalın B, Arda T. A study to assess the colour stability of acetal resins subjected to thermocycling. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2005; 13(1): 10-4.

10. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler:

Adı Soyadı: Seçil Özkan Ata

Doğum yeri ve tarihi: Eskişehir, 1980.

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli.

II. Eğitimi:

2004- : Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Protetik Diş Tedavisi
Anabilim Dalı/ Doktora.

1998-2003: Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Lisans-

Yüksek Lisans.

1991-1998: Eskişehir Anadolu Lisesi.

1986-1991: Cengiz Topel İlkokulu.

Yabancı Dili: İngilizce.