

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜNCEL ADEZİV RESTORATİF SİSTEMLERİN
BİYOUYUMLULUKLARININ İN VİTRO VE İN VİVO
KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Tuğba TOZ

Tedavi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2011

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜNCEL ADEZİV RESTORATİF SİSTEMLERİN
BİYOUYUMLULUKLARININ İN VİTRO VE İN VİVO
KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Tuğba TOZ

**Tedavi Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Arlin KİREMİTÇİ**

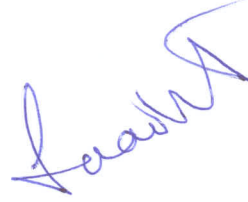
ANKARA

2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Tedavi Programında Doktora Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Saadet Gökarp
Hacettepe Üniversitesi

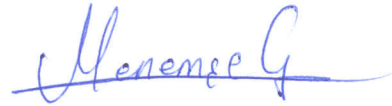


Üye:

Danışman: Prof. Dr. Arlin Kiremitçi
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Gül Özgünaltay
Hacettepe Üniversitesi



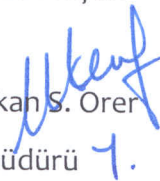
Üye: Prof. Dr. Mine Betül Uçtaşı
Gazi Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Örer
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinin yanı sıra, doktora sürecim boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen; iyi bir akademisyen olmadan önce, iyi bir insan olabilmeyi hedeflemenin önemini bana öğreten çok değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Arlin Kiremitçi'ye şükranlarımı sunarım.

Tezimi planlamamda ve gerçekleştirmemde değerli fikirlerinden yararlandığım, çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı bana sağlayan Sn. Prof. Dr. Saadet Gökalp, Sn. Prof. Dr. Erhan Palaska, Sn. Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Sn. Prof. Dr. Nuran Diril ve Sn. Prof. Dr. Alp Usubütün'e

Tez çalışmam süresince yanımda olan, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve dostluklarını kazanabilme fırsatını bana veren çok değerli arkadaşlarım, Oya Ünsal Tan, Anıl Sera Kahraman, Zeliha Soysal, Harika Gözükkara Bağ, Burcu Yıldırım, Yusuf Tuncer, Yonca Korkmaz, Doruk Engin, Keriman Özadalı, Fatma Zilifdaroglu, Çiğdem Özen, Ayşan Kölemen, Hande Görücü, Soner Çakmak ve Soner Şimşek'e

Çalışmamın deneysel kısmında bana yardımcı olan Sn Vedat Mutlu, Sn Aybüke Kabaoğlu, Sn Mehmet Ali Dinçer ve Sn Mümtaz Kayaoğlu'na

Diş hekimliği mesleğinin alfabesini öğrenmemi sağlayan, iyi bir akademisyen olma yolunda bana ışık tutan ve meslek hayatım boyunca her zaman örnek alacağım Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nın çok değerli öğretim üyelerine,

Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nın bir parçası olduğum süre boyunca, hayatımın acı tatlı her anını paylaştığım ve dostluklarını kaybetmeyeceğimi bildiğim, başta Dt Ceren Özge Biçer olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Sahip olduğum herşey için hergün teşekkür etmeme sebep babam Selahattin Toz, annem Nartane Toz, hayattaki en değerli varlığım kardeşim Pelin Toz ve özellikle en zor zamanımda yanımdan hiç ayrılmayan canımdan çok sevdiğim anneannem Şahber Şahbudak'a teşekkür ederim.

ÖZET

Toz T. Güncel Adeziv Restoratif Sistemlerin Biyouyumluluklarının *İn Vitro* ve *İn Vivo* Koşullarda Değerlendirilmesi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tedavi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2011. Bu çalışmanın amacı, dört güncel adeziv restoratif sistemden (XP Bond ve Quixfill, Silorane, Equia ve Ketac N 100) salınan toksik etkiden sorumlu monomer miktarını saptamak ve ardından bu materyallerin biyouyumluluklarını *in vitro* ve *in vivo* koşullarda değerlendirmektir. Üç farklı sürede (1, 2 ve 7 gün) elde edilen materyal ekstraktlarındaki monomer miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile saptanmıştır. Materyallerin sitotoksik etkileri, L929 hücreleri üzerinde ekstrakt yönteminin kullanılmasının ardından metiltetrazolyum (MTT) testi ile değerlendirilmiştir; tüm materyallerin farklı iki zaman periyodunda elde edilen ekstraktlarının (1 gün ve 1 hafta) mutajenik potansiyelleri, Ames Salmonella/mikrozom testi ile saptanmıştır. Dört restoratif sistemin iki farklı süreç sonunda (1 hafta ve 1 ay) 48 adet insan premolar dışında oluşturduğu pulpal reaksiyonlar histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Bulgular, tüm rezin materyallerden monomer salımı gerçekleştiğini göstermiştir. En yüksek monomer salımı Ketac N 100 Primer’de izlenmiş ve Bisfenol A (BPA) veya dekametilsiklopentasiloksan (D5) saptanmamıştır. En yüksek toksik etki 72 saat sonunda izlenmiştir. Silorane Restoratif ve Quixfill hücre kültürüne biyouyumlu bulunmuş, Ketac N 100 Primer, XP Bond, Silorane Primer ve Ketac N 100 Restoratif’in yüksek toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 48 ve 72 saat sonunda en yüksek toksik etkiye sahip Fuji IX GP Extra’nın bu etkisinin, çözünürlüğü ve asiditesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Hiçbir materyal mutajenik potansiyel göstermemiştir. Histopatolojik değerlendirmelerde hiçbir restoratif sistemin pulpal inflamasyon göstermediği saptanmıştır.

Keywords: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, adeziv restoratif sistemler, sitotoksisite, mutajenite, *in vivo* biyouyumluluk

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:010To9102002).

ABSTRACT

Toz T. *In Vitro* and *In Vivo* Biocompatibility of Current Adhesive Restorative Systems Hacettepe University Health Sciences Institute PhD Thesis in Conservative Dentistry, Ankara, 2011. The objective of this experiment was to determine the quantity of leachable residual monomers that were responsible for toxicity, by using four current adhesive restorative systems (XP Bond and Quixfill, Silorane, Equia and Ketac N 100) and to compare these various materials' biocompatibility *in vitro* and *in vivo*. The extracts of the specimens collected after three different time periods (1, 2 and 7 days) were analyzed by high performance liquid chromatography using a water system liquid chromatograph to determine residual monomers. Cytotoxicity of these adhesive restorative materials were evaluated with respect to L929 cells using the extract method and the methyltetrazolium (MTT) assay and the potential mutagenicity of the all materials' extracts from two time periods (1 day and 1 week) were tested by Ames Salmonella/microsome test. The pulpal reactions of 48 human premolar teeth after two time periods (1 week and 1 month) to these four restorative systems were evaluated histopathologically. The results showed that all resin materials showed monomer release. The most release was observed from Ketac N 100 Primer and nor Bis-Phenol A (BPA) neither decamethylpentasiloxane (D5) was detected. The most cytotoxicity was observed at 72 hour; Silorane Restorative and Quixfill were biocompatible to the cell culture and the most toxic materials were Ketac N 100 Primer, XP Bond, Silorane Primer, Ketac N 100 Restorative. The cytotoxic effect of Fuji IX GP Extra observed at 48 and 72 hours was the highest due to its solubility and acidity. None of the materials had mutagenic potential. The histopathologic evaluations showed that, none of the restorative systems caused pulpal inflammation.

Keywords: High performance liquid chromatography, adhesive restorative systems, cytotoxicity, mutagenicity, *in vivo* biocompatibility

Supported by Hacettepe University Department of Scientific Research (Project Number: 010T09102002).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER.....	xvi
TABLolar	xviii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Diş Dokuları.....	5
2.1.1. Mine	5
2.1.2. Pulpa-Dentin Kompleksi	5
2.1.3. Pulpa Dokusunun Histopatolojisi	14
2.2. Adeziv Restoratif Sistemler	18
2.2.1. Adeziv Sistemler	18
2.2.2. Direkt Adeziv Restoratif Materyaller	28
2.3. Adeziv Restoratif Sistemlerde Biyouyumluluk	39
2.3.1. Adeziv Restoratif Sistemlerin Biyouyumluluktan Sorumlu Monomer İçeriği ve Analiz Yöntemleri (Kromatografi).....	42

2.3.2. Toksik Etkinin Değerlendirilmesi	61
2.3.3. Mutajenite Değerlendirmeleri	71
2.3.4. Pulpa hasarı ve pulpa/dentin testi	80
3. BİREYLER VE YÖNTEM	83
3.1. Adeziv Restoratif Materyallerden Salınan Artık Bileşenlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Saptanması.....	86
3.1.1. Materyallerin Üretici Firmaların Önerileri Doğrultusunda Hazırlanması	86
3.1.2. Materyallerin Ekstraktlarının Hazırlanması	87
3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	87
3.2. Materyallerin Sitotoksik Etkilerinin <i>İn Vitro</i> Olarak Değerlendirilmesi ..	91
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışması	91
3.2.2. Materyallerin Üretici Firmaların Önerileri Doğrultusunda Hazırlanması	92
3.2.3. Materyallerin Ekstraktlarının Hazırlanması	92
3.2.4. Sitotoksisite Testlerinin Uygulanması	93
3.3. Materyallerin Mutajenik Etkilerinin <i>İn Vitro</i> Olarak Değerlendirilmesi	95
3.3.1. Test Hazırlıklarının Yapılması	95
3.3.2. Çalışmada Kullanılan Restoratif Materyallerin Hazırlanması	103
3.3.3. Mutajenite Testinin Uygulanması	104
3.4. Materyallerin Pulpa Dokusu Üzerindeki Etkilerinin <i>İn Vivo</i> Olarak Değerlendirilmesi	106
3.4.1. Materyallerin Bireylere Uygulanması	106
3.4.2. Histopatolojik Değerlendirmelerin Yapılması	109
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	111

4. BULGULAR	113
4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bulguları	113
4.1.1. Hibrit Posterior Kompozit Restoratif Sistem'e ait	
HPLC Bulguları (XP Bond ve Quixfill)	114
4.1.2. Siloran Sistem'e ait HPLC Değerlendirmeleri (Silorane)	116
4.1.3. Güçlendirilmiş Geleneksel Cam İyonomer Sistem'e ait	
HPLC Değerlendirmeleri (Equia)	119
4.1.4. Nano-iyonomer Restoratif'e ait HPLC Değerlendirmeleri	
(Ketac N-100)	120
4.2. Test Materyallerinin Sitotoksosite Değerlendirmeleri	121
4.2.1. Adeziv Restoratif Materyallerin MTT Testi Bulguları	121
4.2.2. Monomer Salımı İle Toksisite İlişkisinin Değerlendirilmesi	136
4.3. Test Materyallerinin Mutajenik Etkilerinin Değerlendirilmesi	137
4.3.1. Posterior Hibrit Kompozit Restoratif Sistem'e ait	
Mutajenite Değerlendirmeleri (XP Bond Ve Quixfill)	138
4.3.2. Siloran Sistem'e ait Mutajenite Değerlendirmeleri (Silorane) ...	143
4.3.3. Güçlendirilmiş Geleneksel Cam İyonomer Sistem'e ait	
Mutajenite Değerlendirmeleri (Equia)	149
4.3.4. Nano-iyonomer Restoratif'e ait Mutajenite	
Değerlendirmeleri (Ketac N-100)	153
4.4. Test Materyallerinin Biyouyumluluklarının İn Vivo	
Koşullarda Değerlendirilmesi	157
4.4.1. Posterior Hibrit Kompozit Restoratif Sistem	
XP Bond+Quixfill'in Uygulanması Sonucu Elde Edilen Bulgular .	159
4.4.2. Silorane Sistem'in Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular	160

4.4.3. Güçlendirilmiş Cam İyonomer Restoratif Equia'nın Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular	161
4.4.4. Nanoiyonomer Restoratif Sistem Ketac N 100'ün Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular	162
5. TARTIŞMA	163
5.1. HPLC bulgularının değerlendirilmesi	163
5.2. İn Vitro Hücre Kültürü Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	174
5.3. İn Vitro Ames Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	189
5.4. İn Vivo Bulguların Değerlendirilmesi	195
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	207
KAYNAKLAR	211
EKLER.....	264

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADA	Amerikan Dişhekimleri Birliği (American Dental Association)
Ag⁺	Gümüş
Al₃⁺	Alüminyum
Atm	Atmosfer
BADGE	Bisfenol A diglisidil eter
BADPE-4OH	Bis-(2,3-dihidroksipropil)eter
Balb₃T₃	Fare fibroblastları
BHT	2,4,6-tritersiyeer bütilfenol
Bis-DMA	Bisfenol-A dimetakrilat
Bis-EMA	Bisfenol-A etoksile dimetakrilat
Bis-GMA	Bisfenol A glisidil metakrilat
BPA	Bisfenol-A
BPDM	Bifenil dimetakrilat
BSS	Balanced Salt Solution (Dengelenmiş tuz çözeltisi)
°C	Santigrad derece
Ca	Kalsiyum
cm²	Santimetrekare
CO₂	Karbondioksit
COO⁻	Karboksil
Cr	Krom
dak	Dakika
DPICI	Difeniliyodiyum klorür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMPA	2,2-dimetoksifenilasetofenon
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
D5	Dekametilsiklopentasiloksan
EBPADMA	Etoksile bisfenol A dimetakrilat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
FDI	Uluslararası Dışhekimliği Birliği
Fe⁻	Demir
g/mol	Gram/mol
GSH	Tripeptid glutatin
GSSH	Oksidize tripeptid glutatin
HCL	Hidroklorik asit
HeLa	İnsan epitel hücreleri
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
his⁻	Histidin gerektiren
his⁺	Histidin gerektirmeyen
HMBP	2-hidroksi-4-metoksibenzofenon
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek performanslı sıvı Kromatografisi)
HPRT	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
HÜKÜK	Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğüne ait Hücre ve Virüs Bankası
IL-1	İnterlökin-1
IR	İnfrared (kızılötesi)

ISO	International organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu)
LED	Light Emitting Diode
LC/MS	Likit Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi Uygulaması
LDH	Laktat dehidrogenaz
LD50	Deney popülasyonunun %50'sinin ölümüne yol açan doz
L929	Fare fibroblastları
MA	Moleküler ağırlık
MDPC-23	Odontoblast benzeri hücreleri
mg	Miligram
MDP	10-metakrilooksidesil dihidrojen fosfat
ml	Mililitre
ml/dak	Mililitre/Dakika
MMA	Metil Metakrilat
mm	Milimetre
Mm	Milimolar
mol/l	mol/litre
mW/cm²	Miliwatt/santimetrekare
MTT	3-4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H tetrazolyum
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
Na	Sodyum
NAC	N-asetilsitein
nm	Nanometre

NRU	Nötral kırmızı alım testi
NTGGMA	N-Tolylgisin glisidil metakrilat
OH⁻	Hidroksil
PCE	Psödokolinesteraz
PEGDMA	Polietilen glikol dimetakrilat
PENTA	Fosfatlanmış penta-akrilat esteri
pH	Power of hydrogen (Hidrojenin gücü)
PMDM	Pyromellitik asit gliserol dimetakrilat
PMP	4-metoksifenol
PO₄	Fosfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart Deviation (Standart sapma)
SDH	Süksinik dehidrogenaz
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
sn	Saniye
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Sr²⁺	Stronsiyum
S₉	Memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant
TC 50	Hücre metabolizmasını %50'ye düşüren ya da %50 hücre ölümüne neden olan doz
TEGDMA	Trietilen glikol dimetakrilat
(TGF)-β₁	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü
UDMA	Üretan dimetakrilat
UV	Ultraviyole (morötesi)
V79	Chinese, Hamster akciğer hücreleri
WST-1	(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5- tetrazolio]-1,3-benzol disulfonate)

XTT	(2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazo-lium hydroxide)
Zn₂⁺	Çinko
%	Yüzde
α	Alfa
4-META	4-Metakriloksetil trimellitat anhidrit

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1.	Reaksiyoner ve reperatif dentin oluşumu	16
Şekil 2.3.1.	Kolon kromatografisi ile A, B ve C maddelerinin birbirinden ayrılması	52
Şekil 2.3.2.	Kromatogram. Zamana karşı konsantrasyonun grafiklenmesi	53
Şekil 2.3.3.	Bir HPLC cihazının temel bileşenleri	54
Şekil 2.3.4.	HPLC kromatogramlarında rezolüsyon ve hesaplanması için kullanılan formül	56
Şekil 2.3.5.	Piramit test protokolleri	59
Şekil 2.3.6.	Test protokol şemaları	60
Şekil 3.1.	HPLC (LC/MS) Sistemi (Waters 2695)	88
Şekil 3.2.1.	Test ekstraktlarının hazırlanması	93
Şekil 3.2.2.	MTT testi uygulama aşamaları	94
Şekil 3.3.1.	Ames testi uygulaması	105
Şekil 3.4.1.	Histopatolojik değerlendirmelerin yapılması	110
Şekil 4.1.1.	Bir, 2 ve 7 günlük ekstraktlarda gözlenen monomer salımı miktarı	114
Şekil 4.1.2.	XP Bond'un 1 günlük ekstraktına ait kromatogram	115
Şekil 4.1.3.	Quixfill'in 1 günlük ekstraktına ait kromatogram	115
Şekil 4.1.4.	Silorane Primer'in 2 günlük ekstraktına ait kromatogram	116
Şekil 4.1.5 .	Silorane Bond'un 2 günlük ekstraktına ait kromatogram	117
Şekil 4.1.6.	Silorane Restoratiften gözlenen monomer salımı	118
Şekil 4.1.7.	Silorane'nın 2 günlük ekstraktına ait kromatogram	119
Şekil 4.1.8.	G Coat Plus'ın 1 günlük ekstraktına ait kromatogram	119
Şekil 4.1.9.	Ketac N 100 Primer'in 7 günlük ekstraktına ait kromatogram.....	120
Şekil 4.1.10.	Ketac N 100'ün 7 günlük ekstraktına ait kromatogram.....	121

Şekil 4.2.1.	MTT testi bulguları.....	123
Şekil 4.2.2.	Yirmidört saat sonunda MTT testi bulguları	125
Şekil 4.2.3.	Yirmidört saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre morfolojileri	126
Şekil 4.2.4.	Kırksekiz saat sonunda MTT testi bulguları	128
Şekil 4.2.5.	Kırksekiz saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre morfolojileri	129
Şekil 4.2.6.	Yetmişiki saat sonunda MTT testi bulguları	131
Şekil 4.2.7.	Yetmişiki saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre Morfolojileri	132
Şekil 4.2.8.	Bir günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları.....	133
Şekil 4.2.9.	İki günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları	134
Şekil 4.2.10.	Yedi günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları.....	135
Şekil 4.3.1.	Ames testi sonrası gözlenen bakteri kolonizasyonları	138
Şekil 4.4.1.	Brown and Brenn boyama sonrası kesitlerin görünümü.....	158
Şekil 4.4.2.	XP Bond+Quixfill'in uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü	159
Şekil 4.4.3.	Silorane Sistem'in uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü	160
Şekil 4.4.4.	Güçlendirilmiş cam iyonomer restoratif Equia'nın Uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü	161
Şekil 4.4.5.	Nanoyonmer restoratif sistem Ketac N 100'ün uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü	162

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Biyouyumluluk değerlendirmelerinde uygulanan test yöntemleri	58
Tablo 3.1. Çalışma özeti	83
Tablo 3.2. Test edilen adeziv restoratif sistemler	85
Tablo 3.1.1. Çalışma çözeltilerini hazırlamada kullanılan monomerler	89
Tablo 3.1.2. Lineer regresyon analiz bulguları	90
Tablo 3.3.1. Vogel-Bonner-E tuz çözeltisi içeriği	96
Tablo 3.3.2. Minimal glukoz agarlı besiyeri içeriği	96
Tablo 3.3.3. Ampisilin çözeltisi içeriği	97
Tablo 3.3.4. Histidin-Biyotin ve Tetrasiklinli besiyeri içeriği	97
Tablo 3.3.5. Histidin-Biyotin çözeltisi içeriği	98
Tablo 3.3.6. Üst agar içeriği	98
Tablo 3.3.7. Kristal viyole çözeltisi içeriği	99
Tablo 3.3.8. Nutrient Broth içeriği	99
Tablo 3.3.9. Nutrient agarlı besiyeri içeriği	99
Tablo 3.4.1. Tez çalışmasında kullanılan adeziv restoratif sistemler	107
Tablo 4.1.1. Adeziv restoratif materyallerde saptanan monomer salımı miktarı	113
Tablo 4.2.1. MTT Testi bulguları	122
Tablo 4.2.2. Yirmidört saat sonunda MTT testi bulguları	124
Tablo 4.2.3. Kırksekiz saat sonunda MTT testi bulguları	127
Tablo 4.2.4. Yetmişiki saat sonunda MTT testi bulguları	130
Tablo 4.2.5. Monomer salımı yüzde hücre canlılığı etkileşimi	136
Tablo 4.3.1. XP Bond ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	139
Tablo 4.3.2. XP Bond'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	140

Tablo 4.3.3. Quixfill ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	141
Tablo 4.3.4. Quixfill'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	142
Tablo 4.3.5. Silorane Primer ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	143
Tablo 4.3.6. Silorane Primer'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu ..	144
Tablo 4.3.7. Silorane Bond ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	145
Tablo 4.3.8. Silorane Bond'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	146
Tablo 4.3.9. Silorane ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	147
Tablo 4.3.10. Silorane'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	148
Tablo 4.3.11. Fuji IX GP Extra ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	149
Tablo 4.3.12. Fuji IX GP Extra'ya ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu.	150
Tablo 4.3.13. G Coat Plus ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	151
Tablo 4.3.14. G Coat Plus'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	152
Tablo 4.3.15. Ketac N100 Primer ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	153
Tablo 4.3.16. Ketac N100 Primer'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	154
Tablo 4.3.17. Ketac N100 Restoratif ile Salmonella Typhimurium TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları	155
Tablo 4.3.18. Ketac N100 Restoratif'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu	156
Tablo 4.4.1. Adeziv restoratif sistemlerin uygulandıkları örneklerden elde edilen histopatolojik cevaplara ait veriler	157

1. GİRİŞ

Günümüz diş hekimliğinde mümkün olduğunca az doku kaybı ile en iyi fonksiyon ve estetiğin sağlanması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda kullanıma sunulan adeziv restoratif materyaller; fiziksel, mekanik, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde kaydedilen gelişmelerle, diş hekimliğinde sıklıkla uygulanmaktadır. Araştırmacıların, dental materyallerin estetik ve fiziksel özelliklerini geliştirme yönündeki çalışmalarının doğurduğu bir sonuç olarak; çok sayıda ürün, kimi zaman yeterli laboratuvar ve klinik testleri yapılmadan kullanıma sunulmaktadır. Pulpa canlılığı üzerinde önemli etkileri olan bu restoratif sistemlerin biyouyumlulukları, diş hekimleri için en az geliştirilen fiziksel özellikleri kadar önemlidir. Bu tez çalışmasında; diş sert dokularına adezyon (kimyasal ve/veya mikromekanik olarak) gösteren materyaller olarak tanımlanan adeziv restoratif sistemler içinde sınıflandırdığımız, kimyasal bağlanma gösteren cam iyonomer restoratifler, adeziv sistemler ve adezyonu bu adeziv sistemler gibi ara bağlayıcı ajanlar ile sağlanan rezin kompozitlerin biyouyumluluk özelliklerinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

Canlı dentinle direkt temas halinde bulunmaları dolayısı ile dentin ve pulpa dokusuna olan etkilerinin çok önemli olduğu adeziv sistemler, klinik uygulama basamaklarına ve diş dokularıyla etkileşimlerine göre etch&rinse sistemler, self-etch sistemler ve cam iyonomer içerikli sistem olarak sınıflandırılmaktadır (1). Adeziv sistemlerle birlikte uygulanan rezin içeren restoratif dental materyallerin geliştirilmesi ve yaygın kullanımı daha konservatif, estetik ve uzun ömürlü restorasyonların uygulanmasına olanak sağlamıştır. Bu materyaller üzerinde yapılan çalışmaların çoğunluğunun estetik ve fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi için doldurucu içerikleri üzerinde yapılması ile birlikte, metakrilat monomerlerden oluşan matriks yapı ile ilgili çok fazla bir gelişme gözlenmemiştir (2). Geleneksel metakrilat yapısından farklı siloksan esaslı kompozitlerin geliştirilmesi sonucunda, bu materyallerde sıklıkla rastlanan; kenar sızıntısı, kenar renklenmesi, sekonder çürük, mikroçatlak, kaspal gerilim, tüberkül

kırığı, post-operatif duyarlılık gibi klinik sorunların görülme olasılığının büyük ölçüde azaltılabileceği öngörülmüştür (3).

Wilson ve Kent'in geliştirdiği cam iyonomerler, diş dokusuna adezyonu ve florür salımı sebebi ile diş hekimliğinde yaygın olarak uygulanmaya başlanmıştır (4). Mekanik özelliklerinin yetersiz olması sonucunda, kısıtlı kullanıma sahip olan geleneksel cam iyonomerlerin fiziksel özelliklerini arttırmak için materyale rezin ilave edilmesi, rezin modifiye cam iyonomerlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Sertleşme reaksiyonu, geleneksel cam iyonomer restoratiflerin bilinen asit baz reaksiyonu ve 2-Hidroksietil metakrilat'ın (HEMA) polimerizasyonu ile gerçekleşen rezin modifiye cam iyonomerlerin; biyolojik olarak uyumlu, diş kimyasal olarak bağlanan, florür salabilen, hidrofilik, kısmen estetik, kolay uygulanabilir ve ağız dokularında nispeten az çözünen bir materyal olduğu bildirilmiştir (5). Cam iyonomerlerin daha yeni bir jenerasyonu olarak, hızlı sertleşen ve yüksek dayanıklılığa sahip olarak nitelendirilen materyaller geliştirilmiş, güçlendirilmiş cam iyonomer restoratifler olarak kullanıma sunulmuştur. Bunun yanı sıra, nanoteknolojinin diş hekimliğine girmesi sonucunda izlenen gelişmelerle ise cam iyonomerlerin avantajları ile nanoteknolojinin birleştirildiği ışıkla sertleşen nano iyonomer restoratif diş hekimliğinde kullanılmaya başlanmıştır.

Restoratif sistemlerin matriks içeriği "ağır" monomer sistem [Bisfenol glisidil metakrilat (Bis-GMA), Üretan dimetakrilat (UDMA)] , ve monomerlerin viskozitesinin düşürülmesi amacı ile tercih edilen "hafif" komonomer sistemden [Trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) ve HEMA] oluşur (2,6). Bu restoratif materyaller polimerizasyon büzülmesi (7), ya da tamamlanmamış polimerizasyon sonucu rezin matriksten monomer salımı (8) gibi dezavantajlara sahiptir. Restoratif materyal içinde kullanılan monomerler bu materyallerin viskozitesi, polimerizasyon büzülmesi, mekanik özellikleri, su emilimi (9,10) ve sitotoksik ya da mutajenik özellikleri üzerinde etkilidir. Materyallerin biyouyumlulukları üzerinde etkili bu monomerlerin miktar tesbitinde sıklıkla kullanılan, en güvenilir yöntemlerden biri Yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisidir (HPLC)

(8,11). Adeziv sistemlerden salınan monomerler üzerinde yapılan çalışmalarla, materyal içeriğinin, monomer miktarlarını direkt olarak etkilediğinin gösterilmesinin (12) yanısıra; test edilen materyallerde en çok salınan monomerin, TEGDMA olduğunun belirtildiği çalışmalar da bulunmaktadır (13).

Diş hekimliğinde kullanılan bu adeziv restoratif sistemlerin, dentin ve pulpa hücrelerine olası toksik etkileri, materyallerin biyouyumluluk çalışmalarının önemini arttırmaktadır. Restoratif materyaller, klinikte uygulanmaya başlanmadan önce; bu materyallerin oral dokular üzerindeki olası zararlı etkileri *in vitro* testler ile incelenmeli, ardından hayvan çalışmalarından elde edilecek bulgular göz önünde bulundurularak materyalin toksisitesi hakkında fikir sahibi olunmalı, sonrasında ise klinik kullanıma geçilmelidir (14). Bu nedenle diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumlulukları *in vitro* testlerin ardından, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile değerlendirilmektedir (15-17).

İlk adımda uygulanan *in vitro* biyouyumluluk testlerinin amacı, vücut dokuları üzerine veya içine yerleştirildiklerinde, materyallere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonun test ortamında oluşturulmasıdır (18). Materyal ve bileşenlerinin, hücrelerle moleküler düzeyde gözlenen etkileşimi; inflamasyon, nekroz (19), immünolojik değişiklikler, genotoksosite (20) ve apoptozis (21) gibi doku reaksiyonlarından sorumludur. Bir materyalin sitotoksisitesi, bu materyal ya da ekstraktının hücre kültürü üzerindeki toksikolojik riski olarak tanımlanmaktadır (16). Sitotoksosite testleri, test materyallerinin uygun hücre kültüründeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği *in vitro* testlerdir (22).

Mutajenite, diş hekimliğinde kullanılan adeziv restoratif sistemlerin biyolojik uyumluluklarının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Diş hekimliğinde kullanılan tüm materyallerin mutajeniteleri bir çok test yöntemi (20,23-29) ile değerlendirilmektedir. Önemli bakteriyel testler arasında ise Ames testi ve Umu-test gelmektedir (30).

Bir çok *in vitro* çalışmada, adeziv materyallerden salınan farklı bileşenlerin düşük konsantrasyonlarda bile hücrelerde kimyasal hasara yol açabileceğinin

bildirilmesi ile birlikte (31) *in vivo* çalışmalar, tam olarak polimerize olmamış rezin bileşenlerinin, pulpa dokusunda makrofajlar aracılığı ile oluşan inflamatuvar cevaba neden olduklarını göstermektedir (32,33).

Adeziv materyallerin biyouyumlulukları ile ilgili literatür bilgisi ışığında bu tez çalışmasında, dört farklı adeziv restoratif sistemin biyouyumluluklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu dört farklı adeziv restoratif sistemden ilki, iki aşamalı etch&rinse adeziv sistem XP Bond ile uygulanan metakrilat esaslı posterior hibrit kompozit Quixfill'dir. İkinci adeziv restoratif sistem; geleneksel metakrilat kompozit rezinlere alternatif olarak kullanıma sunulan ve kendi self-etch adeziv sistemi (Silorane primer, Silorane Bond) ile birlikte uygulanan Silorane sistemdir. Güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer restoratif Fuji IX GP Extra ve sonrasında bu restoratif materyalin aşınmaya karşı direncinin artırılması ve güçlendirilmesi amacı ile uygulanan yüzey örtücüsü G Coat Plus'dan oluşan Equia, test edilmesi planlanan üçüncü adeziv restoratif sistem olarak kabul edilirken; dördüncü sistem nanoiyonomer restoratif olarak kullanıma sunulmuş Ketac N100 ve bu restoratif materyal öncesinde uygulanan Ketac N 100 Primer'dir.

Adeziv restoratif materyallerden salınan monomer miktarı, HPLC ile değerlendirildikten sonra, bu monomerlerin neden olduğu düşünülen olası sitotoksik etkilerinin ekstraksiyon yönteminin kullanılmasının ardından 3-4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi uygulanarak değerlendirilmesi; materyallerin mutajenik değerlendirmelerinin ise gen düzeyinde meydana gelen mutasyonları tespit eden, ve hassas olarak bilinen Ames testi ile yapılması amaçlanmıştır. *In vitro* değerlendirmelerin sonrasında, bu güncel adeziv restoratif materyallerin ortodontik amaçla çekim endikasyonu olan insan dişlerine uygulanması ve belirlenen süreç sonunda dişlerin histopatolojik incelemeleri ile, bu sistemlerin pulpa dokusu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Sözü edilen tüm testler sonrasında elde edilen bulgular doğrultusunda, dört farklı adeziv restoratif sistemin biyouyumluluklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Buonocore'un mineye asit uygulama tekniğini (34) geliştirmesi sonucunda; diş hekimliği minimal invaziv yaklaşım geleneği ile tanışmış ve diş hekimleri güncel adeziv materyalleri kullanarak, daha estetik restorasyonlar uygulamaya yönelmişlerdir. Hastaların kaybettikleri doğal diş görünümünün ve işlevinin yeniden kazandırılmasındaki başarı, hekimin diş ve çevre dokuların anatomik ve biyolojik doğası hakkında bilgi sahibi olması ile ilgilidir.

2.1. Diş Dokuları

2.1.1. Mine

Ameloblast hücreleri tarafından oluşturulmuş mine, inorganik içerik olarak ağırlıkça yüksek yüzdeye (%93-95) sahiptir. Esas olarak kalsiyum, fosfor, karbon, magnezyum, ve sodyumdan oluşur. Organik kısmı, %1,5-4 oranında su ve %0,5-3 oranında lipit, protein, sitrat, laktat ve karbonhidrat oluşturur (35,36).

2.1.2. Pulpa-Dentin Kompleksi

Dentin ve pulpa dokuları, diş tomurcuğunun dental papillasından oluşan mezoderm kökenli özelleşmiş bağ dokularıdır. Aynı embriyonik kökenden gelmelerinin yanısıra, dişin canlılığı boyunca yakın ilişkide olmaları dolayısı ile, pulpa dokusu, hücre farklılaşmasının ve olgunlaşmasının gerçekleştiği mineralize dentinle birlikte, pulpa-dentin kompleksini oluşturan tek bir doku olarak kabul edilmektedir (37-39).

Dentin

Diş yapısının en büyük kısmını oluşturan dentin; ağırlıkça %60-70 inorganik materyal, %20-30 organik materyal, %10 sudan meydana gelmiştir (35,40). Dentin dokusunu oluşturan inorganik kısım, mine dokusunda olduğu gibi hidroksiapatit

iken organik içeriğini, %93 oranında tip I kollajen ve az miktarda tip V kollajen oluşturur. Dentini oluşturan ana yapılar; tübüller, odontoblast uzantıları, intratübüler dentin ve tübüller arasını dolduran intertübüler dentindir. Dentin tübülleri pulpadan başlayıp yaklaşık olarak 2,5-3,5 mm uzunluğunda, mine-dentin ya da sement-dentin sınırına kadar uzanan ve dentin hacminin %20-30' unu oluşturan kanallardır (37,41-43). Homojen bir yapıda olmayan dentin dokusunun organik ve inorganik içerik oranları, dentinin yapısına göre değişkenlik gösterir. Tübül sayısı ve yoğunluğunun fazla olması nedeni ile, derin dentin yüzeysel dentine göre daha fazla su, daha az mineralize doku içerir (40). Yüksek derecede geçirgen olan dentin tübülleri, pulpa ile direk temasta olan odontoblastik uzantılar içerirler (44). Hücre gövdeleri pulpa kavitesinde, uzun silindirik şekilli sitoplazmik hücre uzantıları ise dentin tübülleri içinde bulunan odontoblastlar, dentin ve pulpa dokusunun bir parçası olarak kabul edilir. Odontoblastik hücre uzantıları nedeniyle dentin dokusu, minenin tersine dış etkenlere, uyarılara karşı savunma mekanizması geliştirebilen ve diş kütlesinin büyük bir kısmını oluşturan canlı ve dinamik bir dokudur.

Dentin dokusu, “*intertübüler dentin*” ve “*intratübüler dentin*” olmak üzere iki farklı yapısal kısımda incelenebilir. Organik yapıyı oluşturan kollajen ağ üzerine çökelmiş hidroksiapatit kristallerinden meydana gelmiş, dentin tübülleri arasında yer alan ve tüm dentinin büyük kısmını oluşturan doku *intertübüler dentin* olarak adlandırılır. *Intratübüler dentin* ise tübüller arasında kollajen ağın bulunmadığı hipermineralize alanlar olarak tanımlanabilir (45). *Intratübüler dentinin*, yaş ya da restoratif işlemler gibi nedenlere bağlı olarak devam eden büyümesi, dentin tübüllerinin tıkanması ile sonuçlanır (40). *Interglobüler dentin* ise dentin dokusu gelişiminin bazen homojen kütle oluşumunda başarısız olan küçük globüllerinde başlaması ile oluşan hipomineralize alanlar ile karakterizedir (46,47).

Dentin, *predentin* adı verilen ve pulpal yüzey boyunca uzanan mineralize olmamış dentin dokusu olarak meydana gelir (37,48). *Predentin*, genellikle odontoblast aktivitesi nedeni ile 2-6 µm arasında değişebilen genişliğe sahip (46,49) ve dentin oluşumunun iki safhada gerçekleştiğini kanıtlayan dentin

dokusudur. Mineralizasyon dentin-predentin birleşiminden başlar ve predentin yeni dentin dokusuna dönüşür (45). Makromoleküler içerik olarak genellikle tip I ve II trimer kollajenlerden oluşur. Kollajen olmayan elementler ise çeşitli proteoglikanlar, glikoproteinler, fosforin ve glikozaminoglikanlardır. Bununla birlikte TGF-beta gibi büyüme faktörleri de bu doku içinde bulunmaktadır. Dentin dokusunda bulunan büyüme faktörleri, dentin rezorpsiyonu sonrasında pulpa salınarak dokunun biyolojik fonksiyonlarında değişikliğe ve tersiyer dentin oluşumunun uyarılmasına neden olurlar (47). Diş gelişimi yönünden incelendiğinde dentin dokusunda, *primer dentin*, *fizyolojik sekonder dentin* ve *tersiyer dentin* olmak üzere üç tip dentin oluşumu görülür (38).

Diş kütesinin büyük bir çoğunluğu pulpa odasının etrafında kümelenmiş ve *circumpulpal dentin* olarak adlandırılan düzenli tübüler yapıya sahip primer dentinden gelişir (41,48). Sekonder dentin; primer dentin yapımının tamamlanmasından sonra, belirgin bir uyarı olmadan fizyolojik olarak primer dentinin yapımından sorumlu odontoblastlar tarafından sentezlenir ve pulpa-dentin sınırı boyunca günde yaklaşık olarak 0.5 µm kalınlığında salgılanır (50).

Pulpa-dentin kompleksi dış uyaranlara karşı dentin sklerozisi, ölü boşluklar (*dead tracts*), veya reparatif dentin oluşumu ile cevap verir (51). Pulpa dokusu, primer ve sekonder dentin dokusundan farklı olarak; çürük, kavite preparasyonu, yaşlılık, mikrosızıntı ve travma gibi çok çeşitli dış etkenler karşısında kalsifiye materyal oluşumuna sebep olabilir. Dişin farklı gelişim aşamalarında, farklı çeşitlilikte ve şiddette uyaranlara maruz kalması; sekonder dentin dokusuna benzeyen düzenli tübül yapısına sahip ya da tübül içermeyen farklı görünüm ve yapıda dentin dokusunun oluşumu ile sonuçlanır. Tüm bu farklılıklardan dolayı bu cevap dokusu *irregüler sekonder dentin*, *reparatif dentin*, *reaksiyoner dentin*, *cevap dentini* ve *osteodentin* olmak üzere birçok isimle adlandırılır. Bu nedenle, tüm dış uyaranlara karşı oluşan bu dokular tersiyer dentin olarak kabul edilmiştir (52). Tersiyer dentin, kimyasal uyaranlar, çürük, restoratif uygulamalar, atrizyon ya da diğer travmalar gibi farklı dış uyaranlara cevap olarak oluşturulan (38,53), dişin zarar gören bölgesinin hemen altındaki pulpa odasının duvarında lokalize

dentin birikimi olarak tanımlanabilir. *Reparatif* ve *reaksiyoner* olarak iki grupta sınıflandırılır. Uyarılar sonrasında canlılığını devam ettiren primer odontoblastlar tarafından oluşturulan lokalize tersiyer dentin dokusu *reaksiyoner dentin*; primer odontoblastların ölümünü takiben pulpadaki farklılaşmamış hücrelerden oluşan, yeni sekonder odontoblastların yaptığı tersiyer dentin dokusu ise *reparatif dentin* olarak adlandırılır (54-56).

Hafif bir uyarı etkisi ile oluşan dentin dokusu ise *sklerotik dentin* olarak adlandırılır. Dentin sklerozu, tübüllerin kalsifiye materyalle dolarak, kısmen ya da tamamen tıkanması veya intratübüler dentinin aşırı genişlemesi ile karakterizedir ve mine-dentin sınırından pulpaya doğru ilerler. Bu alanlar, daha serttir ve daha az geçirgenlik ve duyarlılık gösterirler (37).

Dentin Geçirgenliği

Geçirgenlik, bir maddenin bir diffüzyon bariyerinden ya da bariyer içine geçme kolaylığıdır (57,58). Dentin geçirgenliği ise, bakteri veya bakteri ürünlerinin, restoratif materyallerin alerjik ve toksik bileşenlerinin pulpaya ulaşabilme ve etki oluşturabilme durumlarını belirleyen önemli bir özelliktir. Dentin dokusu; dişin yaşı, tübüllerin mineralizasyon derecesi ve dentin dokusundaki dağılımları, kalan dentin kalınlığı (59) ve derinliği (60), tübül-intertübül oranı, tübüllerin açıklığı ve yoğunluğu, odontoblast bariyeri (61), dentin sıvı akımı, dentin dokusundan geçebilecek maddelerin moleküler boyutları ve konsantrasyonları (62) ve pulpal bileşenlerin varlığı (63) ile değişkenlik gösteren geçirgenliğe sahip bir bariyer olarak değerlendirilebilir (59,64).

Pulpayı çürük lezyonundan ayıran en kısa sağlıklı dentin mesafesi olarak tanımlanan kalan dentin kalınlığı (65), dentin geçirgenliğinin en belirleyici faktörlerinden biridir (66). Materyallerin dentinden geçişi, dentin dokusunun yüzey alanı ile doğru (63,67), kalınlığı ile ters orantılı olarak değişiklik gösterir (59,68). Kalan dentin kalınlığının azalması ile tübüllerin boyları kısalmış ve dentin iletkenliği artar (69). Restoratif materyallerin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada (70) sitotoksik etkinin kalan sağlam dentin kalınlığının azalması ile

artış gösterdiği bildirilmiş; 1 mm kalan sağlam dentin kalınlığında pulpaya ulaşan madde konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu, fakat bu mesafenin 0.5 mm'ye düşürüldüğü durumlarda pulpada toksik etkiler oluşabileceği gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada (66) ise değerlendirilen toksik bileşenlerin yayılma miktarının kalan sağlam dentin kalınlığının azalmasıyla arttığı saptamıştır. Dentin kalınlığı ayrıca, adeziv sistemlerin kullanıldığı restoratif tedavilerdeki başarıyı da etkiler. Derin dentinin daha nemli olması, hidrofobik materyallerin bağlanmasını azaltabileceği için dentin ve adeziv materyaller arasındaki bağlanma kuvveti kavite derinliğinden etkilenmektedir (61).

Dentin tübüllerinin yoğunluk ve boyutlarının dentinin farklı bölgelerinde değişiklikler göstermesi nedeni ile, dentin geçirgenliği diş içindeki konumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir (64). Mine-dentin sınırından pulpaya doğru gidildikçe artan yoğunluk ve çapları nedeni ile okluzal yüzeyde dentin geçirgenliği; pulpa boynuzları üzerinde en fazla iken, merkezde en azdır (69).

Çürük dentin dokusunun geçirgenliği, tübüllerdeki bakteri varlığına ve demineralizasyon remineralizasyon döngüsü sonucunda tübüller içinde oluşan çürük kristallerine bağlı olarak sağlıklı dentinden daha düşüktür (58). Sklerotik dentin geçirgenliği ise, sklerozisin fizyolojik ya da patolojik olmasından bağımsız olarak oldukça düşük bulunmuştur (38,71). Sklerotik dentinde tübüller mineral birikimlerle dolmakta ve çürük kristallerinin varlığının da tübüllerdeki sıvı hareketini engellemede etkili olduğu düşünülmektedir (38,58). Fizyolojik sekonder dentin ve tersiyer dentin arasında düzensiz olmakla birlikte atübüler bir yapıya sahip olan arayüz dentini bulunmaktadır. “Hyalin alan” olarak adlandırılan bu dokunun, dentin tübüllerinin birbirini takip etmemesi nedeni ile, geçirgenlikte azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (39).

Tur veya el aletleri ile yapılan kavite preperasyonu sonucunda (72); yığıntı, mine, inorganik ve organik dentin bileşenleri, mikroorganizmalar, su, dentin sıvısı ve tükürükle karışmış dentin tübüllerinin içeriğinden oluşan 0.5-5 µm kalınlığındaki yapı “*smear tabakası*” olarak adlandırılır (39,73). Smear tabakası ve tıkaçları, dentin tübüllerini tıkadığı için doğal bir bariyer görevi görmekle beraber

(74,75); ağız sıvılarında 7 gün içinde çözünmesi nedeni ile geçici koruyucu etkiye sahiptir (74). Dentindeki sıvı akımını azaltarak dentin geçirgenliğinde azalmaya neden olduğu bilinen smear tabakası (42) düşük de olsa geçirgenlik özelliği gösterir (76). Sıvı akışı, hidrolik iletkenlik veya dentin geçirgenliğinin asit uygulanması sonucunda arttığı bildirilmiştir (77,78).

Odontoblastlar arasındaki sıkı birleşimler, seçici geçirgen bir bariyer oluşturur. Bu bariyer, pulpa ve dentin tübülleri arasındaki sıvıların ve besinleri de içeren erir maddelerin hareketini düzenler (79). Çürük lezyonlarında bakterilerin ya da restorasyonun tabanından yayılan toksik materyallerin pulpaya girişlerini engelleyerek, pulpayı koruyucu bir rol üstlenir (38,80) ve dentin geçirgenliğinde azalmaya neden olur (80). Odontoblast tabakasının bozulması ile bu alanı destekleyen kapillerlerde doğrudan hasarlar oluşur ve dentin sıvısıyla ilişkide olan doku boşluklarına, fibrinojen gibi plazma proteinlerinin sızması sonucu kavite preparasyonunu takiben gözlenen dentin geçirgenliğindeki azalma hızlanır (81).

Dentin geçirgenliği iki şekilde sınıflandırılmıştır (38,82). Hidrodinamik uyarılara cevap olarak oluşan sıvı akımları gibi, maddelerin dentin tübüllerinden hareketi, *transdental geçirgenlik* olarak adlandırılır (38). Transdental geçirgenlik aynı zamanda, pulpadan dışarı sıvı hareketine bağlı olarak açığa çıkan dentin yüzeylerinin nemliliğinden sorumludur (82). İntertübüler dentinin asitle demineralize edilmesi veya rezinin bağlanması sırasında, demineralize dentin yüzeylerine hidrofilik adeziv rezinlerin infiltrasyonu ile beraber oluşan eksojen maddelerin intertübüler dentine hareketi ise, *intradental geçirgenlik* olarak tanımlanır (38).

Pulpa

Diş pulpası, %25'i organik yapı, %75'i ise su'dan oluşan mineralize dentin dokusu ile sınırlı; bağ dokusu hücreleri, hücreler arası madde, fibriller, arter ve venler, lenf kanalları, sinirler, odontoblastlar, fibroblastlar, makrofajlar ve kollajen içeren bir bağ dokusudur. Santral (merkezi) ve perifer (çevresel) olmak üzere iki bölgeye ayrılarak incelenebilir. Santral bölge; hücreden zengin tabakanın

çevrelediği, pulpanın ana bölümüdür; damar ve sinirler içerir. Santral bölgenin çevresinde farklılaşmamış mezenşim hücreleri ve fibroblastlar bulunur. Perifer bölgede ise; hücreden fakir tabaka, myelin kılıfını kaybetmiş ağrı reseptörleri olan duyu sinirleri, odontoblast tabakası ve predentin bulunur (44).

Sağlıklı pulpa dokusunun en dış kısmındaki hücrelerden oluşan tabaka odontoblast tabakası olarak adlandırılmıştır. Predentine komşu olarak izlenen bu tabaka, odontoblastların hücre gövdelerinin yanısıra kapillerler, sinir lifleri ve dentritik hücrelerden oluşur (47). İlişkili olduğu dentin tübülü içerisine odontoblastik uzantı bırakan; pulpa odası ve kök kanalları duvarında sıralanmış uzantıları dentin kanalları içinde bulunan pulpanın en özelleşmiş hücreleri *odontoblastlardır* (38,42,44). Pulpanın yüksek derecede farklılaşmış bu hücreleri, dentin yapımından sorumludur; primer, sekonder ve tersiyer dentini oluşturmaktadırlar. Birincil odontoblast hücreleri, zarar görmedikçe ömür boyu dentin yapma özelliğine sahiptir. Ancak zarar gördüklerinde, pulpanın mezenşimal öncü hücreleri, yeni odontoblast benzeri hücrelere dönüşür ve *reparatif dentini* oluştururlar (38). Odontoblast hücreleri, protein ve proteoglikan üretimi ile ilgili tüm karakteristik organellere sahiptir. Odontoblastik uzantı ise, hücre gövdesindeki organellerin çoğunluğunu içermez. Sadece mikrotübüller ve filamentler içerdikleri gibi mitokondri ve ribozom benzeri yapıları da bulundurabilirler. Sinir uçlarının odontoblast hücre gövdelerinde sonlanması nedeni ile odontoblast hücreleri ve uzantılarının, pulpa sinirleri ile sıkı bir ilişki içinde olduğu bilinmektedir (42). Komşu odontoblastlar arasında özelleşmiş hücreler arası birleşimler bulunur (*cell-to-cell junction*). Bu birleşimlerin kavite preparasyonu sonrasında hasar görmesi ise dentin geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (47).

Gerçek pulpa (*pulp proper*) pulpa dokusunun merkezini oluşturur ve geniş kan damarları ile sinirlerini barındırır. Bu alandaki pulpa hücreleri ise *fibroblastlar* ve bağ dokusu hücreleridir (39,47). *Fibroblastlar*, bağ dokusunun yıldız veya fuziform şeklindeki temel hücreleridir. Uzantıları birbirleri ile birleşerek pulpa içinde bir ağ oluşturur, kollajen sentezinde aktif olarak rol alırlar ve bağ dokusu

matriksini sentezlerler. Bağ dokusu içinde yayılmışlardır ancak sıklıkla hücreden zengin tabakada izlenirler. Tip I ve tip II kollajen sentezi, kollajen olmayan ekstrasellüler hücre matriks içeriklerinin (proteoglikan ve fibronektin) sentezlenmesi ve salgılanmasından sorumludurlar (38,83). Bu hücreler hiçbir zaman büyümedikleri için “*peter pan*” olarak adlandırılmışlardır (47).

Sağlıklı pulpa dokusunda izlenebilen makrofajların sayısı travma ile artar (39). Makrofajlar uyarılmaları ile birlikte tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), sitokinler ve büyüme faktörlerinin üretimini sağlarlar. Hareketli olmaları ve fagositik aktivitelerinin yüksek olması nedeni ile damar dışına çıktıklarında ölü hücreleri ve yabancı hücreleri dokulardan temizleyebilme özelliğine sahiptirler. Langerhans hücreleri adını da alan *dentritik hücreler*, immün sistemin yardımcı hücreleridir. Bir kısmı odontoblastlara yakın, diğer bir kısmı ise daha çok pulpanın merkezinde bulunur. Bu hücreler, pulpa inflamasyonu ile sayıca artış gösterirler ve pulpa tamirinde rol oynadıkları gibi T-lenfositlerinde çoğalmaya neden olabilirler (47).

Lenfositler, gezici lenfoid hücreler veya gezici ameboid hücrelerdir (83). Farklı antijenleri algılamalarından dolayı özelleşmiş immün sistem cevabının ortaya çıkmasını sağlarlar (38). Sağlıklı insan pulpasında T lenfositleri tesbit edilirken B lenfositleri ise nadir olarak gözlenirler (47). Sağlıklı pulpa dokusunda çok fazla gözlenmeyen *Mast Hücrelerinin* pulpaya gelişleri, inflamatuvar eksudanın bir parçası olarak kan dolaşımı ile olabileceği gibi; bu hücreler pulpada öncü hücre şeklinde de bulunabilirler (38,83). Bağ dokusunda sıklıkla yayılmış bu hücreler kan damarları ile ilişkili olarak gözlenirler. Kronik inflamasyon gösteren pulpa dokusunda rutin olarak bulunurlar (47). *Ameboid hücreler* ise patolojik durumlarda izlenen pulpa dokusundaki geçici hücrelerdir (83). Ana madde (*ground substance*) bağ dokusu ve ekstrasellüler matrikste dağılmış hücreler ve fibrillerden oluşur. Esas yapının bozulması yüksek konsantrasyonda makrofaj ve lizozomal enzimlerinin gözleendiği inflamatuvar lezyonlarda izlenir (47) . Bu yapı; en belirgin olarak moleküler bileşenler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanları içerir ve pulpa dokusu içinde meydana gelen bütün metabolik olayların

gerçekleştirdiği yerdir. Bu yapı hormonların, vitaminlerin ve diğer metabolik maddelerin etkileri ile enfeksiyonun yayılması ve hücrel cevapları üzerinde etkilidir (38).

Pulpa dokusunda bulunan lifler, kollajen ve retiküler olmak üzere iki kısımda gruplandırılmış ince ve uzun protein polimerleridir. Retiküler lifler, odontoblastların ve kan damarlarının çevresinde bulunurlar. Bu liflerin odontoblast tabakasının hemen altında yoğun olarak bulunanları “Von Korff Lifleri” olarak adlandırılır ve dentin yapımında görevlidirler. Kollajen lifleri ise pulpanın her tarafında bulunur ve kollajen molekülünü yapan zincirlerin bileşimlerine göre “Tip I, II, III ve IV” olarak adlandırılırlar. Tip I kollajen, odontoblastlar tarafından sentezlenir, fibroblastlar ise Tip I ve Tip III kollajen yapımından sorumludur (47).

Dış kesitleri mikroskopik olarak değerlendirildiklerinde dıştan içe doğru dentin, predentin, odontoblast tabakası, hücreden fakir (hücresiz) ve hücreden zengin (hücreli) tabakalar gözlenir (84). Odontoblast tabakası, pulpanın en dış kısmını çevreler ve predentinin hemen altında odontoblast hücre gövdelerinin dizilmesi ile oluşur. Odontoblast hücrelerinin gövdesi dışında, bu hücreler üzerinde sonlanmış sinirler ve kapiller izlenir (42). “Weil tabaka” olarak da adlandırılan hücreden fakir tabaka odontoblast tabakasının hemen altında bulunur ve kan damarları, myelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların ince sitoplazmik uzantılarını içerir. Hücreden zengin tabaka pulpanın merkezine göre daha çok fibroblast, farklılaşmamış mezenşimal hücre ve bunlara ek olarak makrofaj, lenfosit, dentritik hücre ve plazma hücreleri içerir (38). Sağlıklı pulpa dokusunda, bu bölgede hücre çoğalması pek görülmezken, odontoblastların ölmesi halinde, hızlı bir mitoz izlenmektedir. Dönüşümsüz olarak zedelenmiş odontoblastlar, bu tabakadan göç eden hücrelerle yer değiştirmektedir. Gözlenen mitotik hareketler, odontoblast tabakasının yenilenmesinin ilk basamağıdır. Primatlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, hücreden zengin tabakadaki fibroblastların, pulpa açılımı sonrasında artmış mitotik hareketler gösterdiği bildirilmiştir (85,86).

2.1.3. Pulpa Dokusunun Histopatolojisi

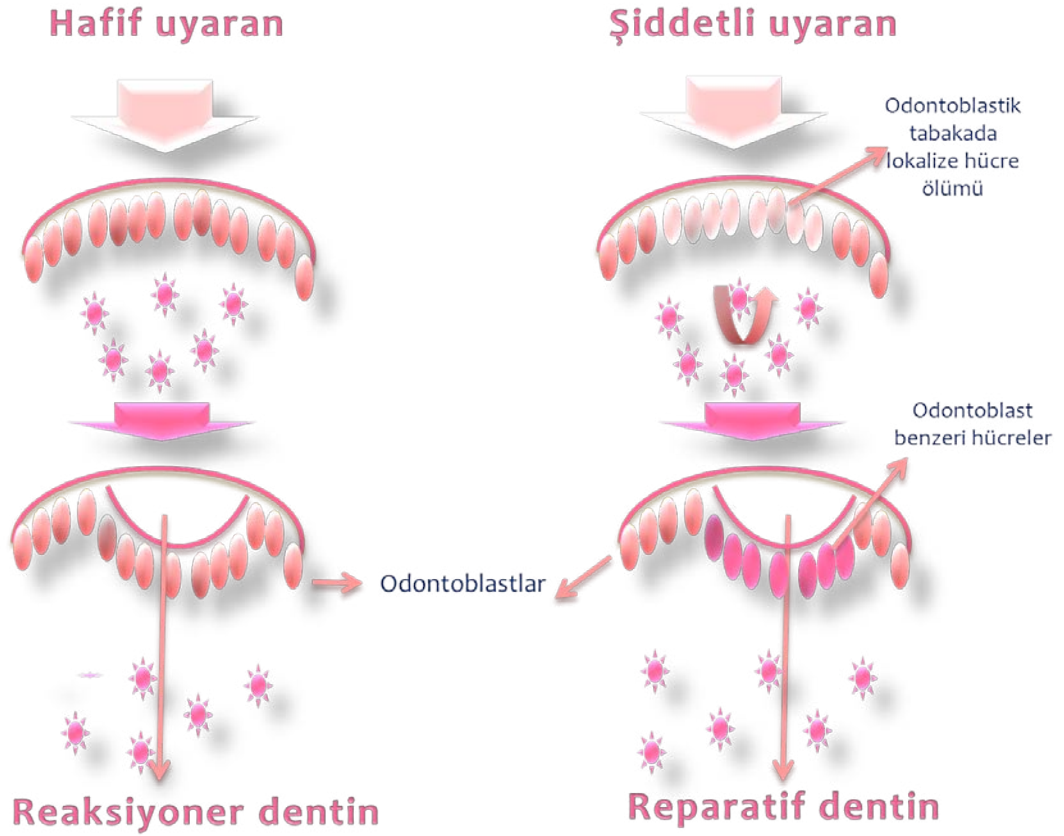
Belirli uyaranlara karşı dokuda gözlenen cevap, hücre hasarından ölümüne kadar değişkenlik gösterdiği gibi bu etkilerin birleşimi ile de sonuçlanabilir (87). Pulpa hücreleri normal koşullarda ısı şoku proteinlerinin aktivasyonu ile farklı moleküler cevapları oluştururlar; daha sonrasında ise lokal ya da daha geniş çapta hücre ölümü gözlenebilir (88). Bu durum pulpanın canlılığı için tehdit oluşturabilir ve yenilenme özelliğini baskılar. Çürük varlığında gözlenen hücresel hasar, mine ve dentinden pulpaya diffüze olan bakteriyel asit ve diğer metabolitlerin etkisi ile oluşur. Güncel bulgular, çözünabilir dentin matriks bileşenlerinin pulpa hücreleri üzerinde doza bağlı etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Odontoblast benzeri hücrelerin düşük konsantrasyonda çözünabilir dentin matriksi ile kültüre edilmesi sonucunda, bu bileşenlerin hücre sayıları üzerinde düşük etkileri olduğunun gözlemlendiği; yüksek konsantrasyonlarda ise bu bileşenlerin hücre canlılığını baskıladıkları bilinmektedir (87). Eşit konsantrasyonlarda “*Transforming growth factor Beta*” (TGF)- β_1 faktörü kullanımı sonucunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (89). Bu durum büyüme faktörünün düşük konsantrasyonlarda doku yenilenmesini indükleyici etkiye, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre ölümüne neden olduğunu gösterir.

Pulpal hasara neden olan etkenlerden ikisi restoratif materyallerden salınan toksik ürünler ile kavite ve restorasyon arasındaki bakteriler ve toksinleridir. Dentin dokusu ise bu etkenlerin dentin tübüllerinden ilerlemesinde bir bariyer görevi üstlenir. Bariyer etkisi, kavite preparasyonu sonucunda oluşan smear tabakası etkisi ile artış gösterir (90,91).

Dentin dokusunun bariyer özelliği smear tabakasını ortadan kaldırarak dentin tübüllerinin açılmasını sağlayan asit uygulaması ile azalır (92,93). Bununla birlikte asit, dentin dokusu ile temas ettiğinde nötralize olur ve toksik etkisi ortadan kalkar (94). Bariyer özelliği, tübüllerden toksik materyal geçişini tamamen engelleyemez. Dentin topografisine bağlı olan dentin geçirgenliği, daha sık izlenen ve daha yüksek hacimdeki dentin tübülleri nedeni ile pulpaya yaklaştıkça artış gösterir (92). Bariyer etkisi, dentin kalınlığının artması ile azalan

dentin geçirgenliğinden de etkilendir (91). 0,5 mm'den az olan arda kalan dentin dokusu pulpada oluşabilecek inflamasyon riskinde artışa neden olur (95). Bu etki derin kavitelerde daha sık olanlarla karşılaştırıldığında farklı reaksiyonlar izlenmesine neden olur. Dentin sklerozu ise dentin geçirgenliğinde düşüşe neden olur fakat düşük moleküler ağırlığa sahip materyallerin geçişi engellenmez (96). Restoratif materyallerden salınan monomer miktarı materyalin sertleşmesi veya polimerizasyonu ve geçen zaman ile de azalma gösterir. Bununla birlikte restorasyon altında bakteri penetrasyonu ile gözlenen toksin sentezi zamanla artış gösterir. Bu durum gözlenen pulpal reaksiyonların açıklaması olarak kabul edilir (97).

Pulpa; bahsedilen bu iki faktöre, hasarın şiddetine bağlı olarak geri dönüşebilen veya geri dönüşümsüz inflamasyonla cevap verebildiği gibi, tersiyer dentin oluşumu da gözlenir (Şekil 2.1.). Şiddetli uyaranlar sonrasında lezyon bölgesinin altındaki lokalize odontoblastlar ve pulpa hücreleri canlılıklarını kaybedebilir ve uygun koşullarda *pulpal kök/progenitör* hücrelerden odontoblast benzeri hücreler farklılaşabilir (87). Sekonder odontoblastların oluşumu ile karakterize odontoblast dejenerasyonu, stoplazmik granüllerin sentezi ile devam eden, sonrasında da kollajen fibrillerin oluşumu ve mineral tuzların çökmesi ile tamamlanan süreci takiben, atipik, farklı yapı ve boşluklar içeren “*rejeneratif*”, “*tersiyer*”, “*reparatif*”, “*irregüler*”, “*defansif*” veya “*irritasyon*” dentini oluşumu gözlenir (87,98,99). Reparatif dentin oluşumu pulpa ekspozu sonrasında uygulanan pulpa kaplaması tedavileri ile gerçekleşen dentin köprüsü oluşumundan da sorumludur. Düşük şiddette uyaranlar sonrasında ise primer odontoblastlar ve pulpa hücreleri canlılıklarını sürdürürler ve dentin tübüllerinin tıkanması ile (99) “*reaksiyoner*” dentin dokusunu oluştururlar.



Şekil 2.1. Reaksiyoner ve reparatif dentin oluşumu (87)

Reaksiyoner ve reparatif dentin dokularının; hasar bölgesi ile lokalize pulpa dentin arayüzünde matriks depozisyonu ile karakterize olmaları gibi benzer özellikler göstermelerinin yanısıra, özellikle reparatif dentinde gözlenmeyen tübüler devamlılık açısından farklılıklar olduğu bilinmektedir. Reparatif dentin ise primer dentin dokusuna benzer şekilde düzenli tübüler yapıda olması ile birlikte atübüler görünümde de olabilir. Tübüler yapıdaki bu farklılıklar değişken dentin geçirgenliğinde ve yüzeydeki hücrelerin (canlı kalan primer odontoblastlar ya da oluşan odontoblast benzeri hücreler) derin dentin dokusu ile etkileşim kabiliyetleri üzerinde etkilidir (87). Kavite preparasyonunun da pulpal cevaba sebep olduğu bilinmektedir ve bu preparasyonun derinliği hücresel hasarın derecesinde etkilidir. Kalan dentin kalınlığının düşük olduğu derin restoratif işlemlerde odontoblast canlılığı baskı altına alınır ve arda kalan dentin kalınlığı, rejeneratif dentin oluşumunda büyük etkiye sahip olur (95).

Daha uzun süreli veya şiddetli irritasyon, odontoblast çekirdeği ve plazma membranında geridönüşümsüz etki yaparak alttaki bağ dokusunda inflamasyona neden olabilir. inflamasyon başlangıcı sonrasında uyaranın etkisini kısa sürede kaybetmesi ile geri dönüş olabilir. Ancak şiddetli uyaran varlığında spesifik ve nonspesifik immünolojik reaksiyonlar pulpa dokusunda geri dönüşümü olmayan hasarlara yol açabilirler (100).

Çeşitli uyaranların etkisi ile hücre ve dokularda meydana gelen hasar sonrası oluşan atıkları ve bu etkeni yok etmek, vücuttan uzaklaştırmak, sonunda da o bölgede görülen doku kaybını onarmak için gelişen bir dizi reaksiyonun tümü inflamasyon olarak adlandırılır (101). Pulpal inflamasyon ise, diğer bağ dokusu inflamasyonlarına benzer olarak akut ve kronik olarak sınıflandırılabilir. Akut inflamasyon, vasküler bir cevaptır; plazma proteinlerinin kan dolaşımını kolaylıkla terk etmesi ile karakterize eksüdasyon gözlenir. Bu tip inflamasyon alanında nötrofiller ve makrofajlar gözlenir. Kronik inflamasyon ise devamlıdır ve bir haftadan fazla sürebilir. Makrofajlar, T hücreleri ve fibroblast hücreleri kronik inflamasyondan sorumludurlar. Ancak akut ve kronik inflamasyon arasında belirgin bir sınır yoktur (42).

Pulpal reaksiyonlar hafif, orta ve ileri derece olmak üzere üç grup olarak da sınıflandırılmışlardır. Hafif derecede reaksiyon hücreden fakir tabakada ve komşu pulpa dokusunda, artmış fibroblast ve farklılaşmamış hücre sayısı ile karakterizedir. Kapiller damarlarda bir artış ve birkaç damar dışına çıkmış kırmızı kan hücresi ve inflamatuvar hücre gözlenir. Cevap sadece ilgili dentin tübülü bölgesindedir. Orta derecede reaksiyonda ise akut veya kronik olmasına bağlı olarak nötrofilik ve mononükleer lökositlerin, odontoblast-predentin bölgesine göç etmesi ile karakterize lokalize reaksiyon gözlenir. Genellikle normal görünümülerinden farklı odontoblast hücreleri içerir ve tübüllerin içinde odontoblast çekirdekleri izlenebilir. İnflamasyon alanında kan damarları ve kapillerlerin artması ile karakterizedir. Hücre infiltrasyonu, apse oluşumları, polimorfonükleer ve mononükleer lökositlerin sıklıkla gözlendiği; odontoblast tabakasının morfolojik bir bütün olarak izlenemediği sınırlı cevabı içeren reaksiyon

ise ileri derecede reaksiyon olarak adlandırılır. Bu reaksiyonda dentin tübüllerinde odontoblast çekirdekleri ve hücre yoğunluğunun etrafında ise çok sayıda kan damarları izlenir (42,102).

2.2. Adeziv Restoratif Sistemler

Adeziv restoratif sistemler diş sert dokularına adezyon (kimyasal ve /veya mikromekanik) gösteren restoratif sistemler olarak tanımlanabilirler. Bu sistemler içinde kabul edilen cam iyonomer restoratifler diş dokularına kendiliğinden adezyon gösterirken; rezin kompozitlerin adezyonu adeziv sistemler gibi ara bağlayıcı ajanlar ile sağlanır. Bu nedenle cam iyonomer restoratifler ya da adeziv sistemlerle kombine olarak uygulanan rezin kompozit restoratifler adeziv restoratif sistemler olarak ele alınmıştır.

2.2.1. Adeziv Sistemler

Latincedeki adhaerere kelimesinden köken alan adezyon (bağlanma), iki farklı yüzeyin yüzeyler arası kuvvetlerle birbirine bağlanması ve bu farklı yüzeyler arasındaki moleküler etkileşimdir. Bir maddenin başka bir maddeye yapışması olarak tanımlanan adeziv terminolojisinde bağlanmanın gerçekleştiği madde ya da yüzey *adherent*, adezyonu oluşturan madde ise *adeziv* olarak adlandırılır (103,104). Adeziv bağlanmanın genellikle iki veya daha fazla yüzeyi ilgilendiren bir tanımlama olarak bilinmesine rağmen adeziv sistemlerin diş yüzeyine bağlanması daha karmaşıktır. Diş hekimliğinde adezivin bağlandığı substrat olarak bilinen *adherent* çeşitlilik gösterir (mine, dentin, amalgam, kompozit, seramik veya cam iyonomer restoratif), adezivler ise basit bağlanma (seramik veya metal üzerine uygulanan silanlar); ya da çoklu bağlanma arayüzeyi (dentine bağlanan kompozit rezin, dişe bağlanan seramik restorasyonlar) içerebilirler (105,106).

Adezyonda fiziksel, kimyasal ve mekanik olmak üzere üç mekanizma etkilidir (104). Mekanik bağlanma makromekanik, mikromekanik tutunma ve nano-interdijitasyon olarak izlenebilir. Makromekanik bağlanma intra ve ekstrakoronal restorasyonlarda izlenen bağlanma türü iken, mikromekanik

bağlanma güncel adeziv diş hekimliğinin temelini oluşturur. Bu bağlanma, adeziv penetrasyonuna olanak sağlayan mine ve dentin yüzeylerindeki mikroboşluklar ile ilgilidir. Bu mikroboşluklar asit uygulaması ile oluşturulur. Adezyonun iki aşamada gerçekleştiği kabul edilebilir; dentin tübülleri veya mine çubukları etrafında oluşan mikrotaglar ve nanotaglar. Nanotaglar bağlanma için daha önemlidir ve nano-interdijitasyon mekanizması olarak kabul edilebilir (106,107).

Bağlanmanın dayanıklılığı ve kalıcılığı birkaç faktöre bağlıdır. Adherentin heterojen olan dokusal özellikleri, kavite preparasyonu süresince oluşan yüzey kontaminasyonu (yüzeyin temiz olması), pürüzlülüğü, uygun kontak açısı ve iyi ıslatılması, smear tabakası, bağlanmaya karşı koyan dış kuvvetlerin gelişimi, birleşim yüzeyindeki yüklerin dağılımı ve adezivin fiziksel ve kimyasal özellikleri bağlanmayı etkileyen faktörlere örnek olarak verilebilir. Diğer etkenler arasında ise nem, fiziksel stresler, sıcaklık değişimleri, pH, beslenme, çiğneme alışkanlıkları gibi ağız içi şartlar kabul edilebilir (44,106).

Bağlanmadaki asıl amaç çok iyi bir adaptasyon sağlanmasıdır ve bunun sağlanması dentin dokusunda daha zordur (108). Mine %96 oranında inorganik, dentin ise daha fazla organik içerik ve su içerir. Dentinin bu nemli ve organik yapısı bağlanmayı zorlaştırır (41,109). Pulpal basınç, dentin dokusunun nemliliği ve kalınlığı, dentin dokusuna bağlanmadaki önemli kriterlerdendir (41). Tübüllerin uzunluğu, çapı, açıklığı, dentin sıvısının viskozitesi ve içinde çözünen maddelerin moleküler hacmi ve pulpal sirkülasyon ile maddelerin uzaklaştırılma oranı, dentin nemliliğini etkileyen faktörlerdendir. Dentin tübüllerinde hermetik tıkanma sağlanmamışsa dentin geçirgenliğinin yüksek olması nedeni ile bakteri ve toksinler, kolayca pulpaya doğru penetre olurlar. Tübüllerden sızan dentin sıvısı da bağlanmada etkilidir. Çünkü su, hidroliz ile sert doku üzerindeki tüm adezyon alanı için etkili olarak rekabet eder (44). Bağlanmayı etkileyen faktörlerden bir diğeri ise, polimerizasyon süresince monomerlerin boyutsal olarak yeniden düzenlenmesi sonucu gerçekleşen polimerizasyon büzülmesidir. Restoratif materyalin kavite duvarlarına bağlanması ile sınırlanan rezin büzülmesi, rezin ile

diş dokusu arasındaki bağlanmayı bozan polimerizasyon büzülmesine (gerilimlerine) neden olur (44,104).

Adeziv sistemler; yüzey koşullarının değiştirilmesi, primer uygulaması ve adeziv rezin uygulaması olmak üzere üç temel basamak içerirler (110).

Yüzey Koşullarının Değiştirilmesi

Bu uygulama ile kimyasal, ısısal ve mekanik yöntemlerle adeziv sistemlerin mikromekanik olarak bağlanmalarını sağlayacak uygun bir yüzey oluşturulur. Kimyasal yöntemde asit ve kalsiyum şelatörleri, ısısal yöntemde lazer, mekanik yöntemde ise mikroabrazyon tekniği kullanılır (104). Günümüzde yaygın olarak asit ile pürüzlendirme tekniği kullanılmaktadır. Mineye bağlanmada asit uygulamasının başarılı sonuçlarının ardından dentinin asitle pürüzlendirilmesi kavramı doğmuştur. Bazı çalışmalarda, fosforik asit gibi güçlü asitlerin rezinin dentine bağlanmasını zorlaştırdığının ve pulpal hasara yol açtığı belirtilmesi ile kullanımı önerilmemiştir; fakat sonrasında yapılan farklı çalışmalarla oluşan pulpal inflamasyonun asıl sebebinin, yetersiz marjinal tıkanma olduğu gösterilmiştir (108). Maleik, sitrik, fosforik ve nitrik asit gibi çeşitli ve farklı asitler belirli bir süre dentin yüzeyine uygulanır sonrasında su ile yıkanarak uzaklaştırılır (44,104). En sık kullanılan ise mine ile dentinde kuvvetli etkisi olduğu düşünülen %30-37,5 'lik fosforik asittir. Yüzey koşullarının değiştirilmesi için uygulanan fosforik asit, jelin içinde dağılmış silikon dioksit ve yoğunlaştırıcı ajan olarak eklenen polimer partikülleri ile birleştirilmiş halde kullanılmaktadır (111).

Uygulanan asitin konsantrasyonuna, etki süresine ve türüne göre farklılıklar gösteren demineralizasyon (104,110) sonucunda minerallerin çözünmesi ile kollajen fibriller açığa çıkar, intertübüler dentinin mikropörözitesi artar ve intratübüler dentinin demineralizasyonu ile huni şekilli tübül ağızları oluşur. Smear tabakası ve smear tıkaçlarının ortadan kalkması sonucunda ise rezinin, intertübüler ve intratübüler penetrasyonu kolaylaşır (44,104,112,113). Nakabayashi ve diğ. (113) asitle demineralize edilmiş bu alanı, infiltrasyona olanak veren geçirgen bir tabaka olarak tanımlamışlardır. Kanca ve diğ. (114) ise bu

tabakayı, çevresel koşullara çok hassas bir yapı olarak belirtmiş ve hafif derecede nemli bir koşulun sağlanması ile daha iyi bir bağlanma elde edileceğini vurgulamışlardır. Asit uygulamasından sonra desteğini kaybeden kollajen ağların büzülmesi sonucunda fibriller arasındaki mesafe azalır ve adeziv rezinin kollajen fibriller arasına girmesi zorlaşır. Asit uygulanan yüzeylerin yıkanmasının ardından apatit kristallerinin yerini su alır ve fibriller arası mesafe eski haline döner (114,115). Yıkama işleminden sonra yüzeyin aşırı derecede kurutulması hidroksi apatitini kaybetmiş desteksiz kollajen fibrillerin tekrar büzülmesine neden olarak rezin infiltrasyonunu sınırlandırır. Hidrofilik monomerlerin, büzülmüş kollajen ağını kısmen genişletebildiği göz önüne alındığında; dentin yüzeyinin hafif nemli bırakılması ile karakterize nemli bağlanma tekniği sonucunda rezinin kollajen ağa infiltrasyonu kolaylaşır (116) ve in vitro bağlanma dayanıklılığında artış gözlenir (114). Su veya su ve HEMA içerikli primerlerin rezin dentin bağlantısını güçlendirebileceği fikri Kanca ve diğ.'nin (117) nemli bağlanma tekniğini tanıtmaya yol açmıştır. Dentin yüzeyinde aşırı nem varlığı ise primeri sulandırarak etkisinin azalmasına ya da hibrit tabakası içindeki rezin polimerizasyonunun olumsuz etkilenmesine ve adeziv tabakada su içeren kusurlu bölgelerin oluşumuna neden olur (44,118). Asit uygulanması sonucu açığa çıkan yüksek protein içeriği, dentinin kritik yüzey gerilim değerinin (44.8 dyne/cm) düşmesine (29,48 dyne/cm) ve daha kötü bağlanmaya neden olur (44,104). Düşen kritik yüzey gerilim değerini arttırmak amacı ile bu yüzeylere primer uygulanır (104).

Primer Uygulaması

Hidrofilik nemli dentin yüzeyi ile hidrofobik rezin arasındaki bağlanmayı arttırdığı kabul edilen primerler (44) su, aseton, etanol gibi organik çözücülerde çözülmüş HEMA, Bifenil dimetakrilat (BPDM), 4-Metakriloksetil trimellitit anhidrit (4-META) gibi düşük vizkositede hidrofilik monomerler içerirler. Günümüz dentin bağlayıcı sistemlerde HEMA'nın yanında N-Tolylgisin glisidil metakrilat (NTGGMA), Pyromellitik asit gliserol dimetakrilat (PMDM) ve

Fosfatlanmış penta-akrilat esteri (PENTA) gibi monomerler de bulunur (44,119). Bu monomerler hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki fonksiyonel gruba sahiptir. Hidrofilik gruplar (karboksil gruplar) uçucu karakterleri ile dentin yüzeyindeki ve nemli kollajen ağındaki su ile yer değiştirerek, monomer infiltrasyonunu kolaylaştırırlar (44,107,113,120,121). Aşırı kurutulmuş dentin yüzeyinde ise büzülmüş kollajen ağını genişleterek bu ağına girerler. Primer, uygulandığı yüzeylerde çökmüş kollajenleri restore eder ve rezinin dentine daha iyi diffüze olmasını sağlayarak hibrit tabakanın kalitesini ve bağlanma dayanıklılığını artırır. Hidrofobik gruplar (metakrilat gruplar) ise dentin yüzeyinin üst kısmında yer alır ve yüzeye uygulanan adeziv rezin ile kopolimerize olurlar (44,119,122,123).

Hidrofilik dentin ile hidrofobik rezinden oluşan iki farklı kimyasal yapıyı birbirleri ile uyumlu hale getiren primerlerin, dentin sıvısındaki proteinlerin denatürasyonuna ve çökmesine neden olarak dentin geçirgenliğini azalttığı ve aşırı dentin duyarlılığını önledikleri düşünülür (44).

Adeziv Rezin Uygulaması

Bağlayıcı (Bonding) ajan olarak da adlandırılan adeziv rezinler öncelikle dentine yeterince infiltre olabilmesi için HEMA gibi hidrofilik gruplardan; monomerlerle kopolimerizasyon için Bis-GMA, UDMA gibi hidrofobik monomerlerden ve TEGDMA gibi viskozite düzenleyicilerden oluşurlar (44). Genellikle doldurucu içermeyen bu ajanlar (107,124) asit uygulaması sonrasında dentin tübülleri içine girerek rezin tagları oluşturur ve hibrit tabakayı meydana getirirler (104,110). Bununla birlikte polimerizasyon büzülmesi sonucu oluşan stresleri azaltarak rezin-diş bağlantısını korurlar (44,119).

Adeziv Sistemlerin Sınıflandırılması

Adeziv diş hekimliğindeki gelişmelerle birlikte adeziv sistemlerin kullanıma sunulması ve geliştirilmesini izleyen tarihler esas alınarak yapılan “kronolojik sınıflandırma” ve bu sistemlerin kimyasal içeriklerine göre yapılan “yapısal

sınıflandırma”, birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (125). Adeziv sistemler, smear tabakası üzerindeki etkilerine göre; smear tabakası üzerinde değişiklik yaratan sistemler, smear tabakasını kısmen uzaklaştıran ya da tamamen uzaklaştıran sistemler olarak da sınıflandırılmışlardır (121,126-129). Klinik uygulama basamaklarının ve diş dokularıyla etkileşimin göz önünde bulundurulduğu sınıflamada ise güncel adeziv sistemleri; etch&rinse (asidi yıkanan sistemler), self-etch (kendinden asitli sistemler) ve cam iyonomer içerikli sistem olmak üzere üç başlık altında incelemek mümkündür (1,121,130,131).

Etch & Rinse Sistemler

Ayrı bir basamak olarak asit uygulamasını içeren ve uygulama tekniğine göre iki gruba ayrılan bu sistemlerin temel bağlanma mekanizmaları difüzyon merkezlidir (1). Aseton içerikli bir primerin kullanıldığı durumlarda nemli bağlanmanın (*wet bonding*) zorunlu olduğu belirtilmiş, su veya etanol içerikli primer kullanıldığında ise hafifçe hava ile kurutma ve kuru bağlanma (*dry bonding*) tekniğinin etkili bağlanmayı sağladığı gözlenmiştir (1,121,132). Nemli bağlanma tekniğinde primerler içindeki çözücüler kollajen fibriller arasındaki suyu uzaklaştırarak HEMA gibi hidrofilik monomerlerin kollajen fibriller arasına girmesini sağlar. Hava ile kurutulma sonrasında çözücüler su ile birlikte uzaklaşır ve kalan monomerler (HEMA) kollajen fibriller tarafından absorbe edilir. Demineralize dentinde konsantrasyonu artan monomerler, adeziv rezin ile etkileşime girerek hibrit tabakayı oluştururlar (132-134).

Üç aşamalı etch&rinse sistemlerde; asit aşamasını aseton, etanol, su ve bir veya daha fazla bifonksiyonel rezin monomerden oluşan primer (110) ve ardından üçüncü aşama olarak adeziv rezin uygulanması izler (121,135). İki aşamalı etch&rinse sistemler ise asit uygulama basamağını takiben hidrofilik ve hidrofobik rezinlerin karışımı olan ve etanol, aseton, su gibi çözücülerden birini içeren kombine tek şişe bağlayıcı ajanların uygulandığı sistemlerdir (44,136). Mine dokusuna olan bağlanmaları üç aşamalı sistemlerle kıyaslanabilen (131,137-139) bu sistemler asit uygulanması aşamasından sonra dentin yüzeyinin kurutulmasının

teknik hassasiyet gerektirmesi, dentin tübüllerini tıkayan smear tıkaçlarının kaldırılması ile birlikte dentin sıvısının hareketine karşı direncin düşmesi ve dentin geçirgenliğinin artması nedeni ile postoperatif duyarlılık oluşumu gibi dezavantajlara sahiptir (118,140).

İki aşamalı etch&rinse sistemlerde adezivin demineralize dentindeki kollajen ağa diffüze olmasında kolaylık sağlamak amacı ile çözücü olarak etanol, aseton veya su yerine tersiyer butanol içeren XP Bond (Dentsply Konstanz, Almanya) (141) diş hekimliğine sunulmuştur. Etch&rinse sistemlerde karşılaşılan sorunların önüne geçebilmek ve uygulama işlemlerini basitleştirebilmek için self-etch sistemler geliştirilmiştir.

Self-Etch Sistemler

Yıkama gerektirmeyen asidik resin monomerlerin kullanılması ile asit uygulama aşamasının elimine edildiği bu sistemlerde (130) dentinin yüzeyel demineralizasyonu ve monomer penetrasyonunun eş zamanlı ve aynı derinlikte olması ile dentin ve adeziv resinin devamlılık göstermesinin sağlanması ve smear tabakasının bağlantı substratı olarak kullanılıp hibrid tabakaya dahil edilmesi amaçlanmıştır (121,142). Etch&rinse sistemlerden farklı olarak, primerin hava ile uzaklaştırılarak smear tabakasının modifikasyonuna neden olduğu için bazı araştırmacılar tarafından “etch&dry” olarak da adlandırılmışlardır (143). Self-etch primerler, asiditelerine bağlı olarak smear tabakasına 2 µm kadar penetre olabilmekte, pulpayı koruyan ve dentinal sıvı akışını önleyen doğal bariyer özelliğine sahip smear tabakasını modifiye ederek bağlanma sağlamaktadırlar (115,121,142). Asit uygulama aşamasının elimine edilmesi ile demineralize dentinde tam oluşmayan tıkanmanın üstesinden gelineceği ve (131), etch&rinse sistemlerin dezavantajlarının ortadan kaldırılacağı öngörülmektedir (115,130,144-146). Self-etch adeziv sistemlerin primer ajanları; çeşitli monomerlerin yanı sıra, fosfat esterleri veya karboksilik asit gibi asidik monomerlerin sudaki çözeltileri ve HEMA içerir (147). Maleik asit ve itakonik asit gibi organik ve inorganik asitler, doldurucular, taşıyıcılar (aseton, etanol,su) ve MDP (10-metakrilooksidesil

dihidrojen fosfat), Bis-GMA, 4-META, TEGDMA, UDMA ve PENTA gibi monomerler de self-etch adezivlerin yapısında bulunurlar (148). Bu sistemler de iki grup altında incelenir (149,150).

İki aşamalı self-etch sistemlerde ilk olarak asidik self-etch primeri içeren hidrofilik solüsyonun olduğu ilk şişenin kullanılmasını takiben hidrofobik dentin bağlayıcısı uygulanır. İki ayrı solüsyonun uygulama sırasında karıştırıldığı ya da hepsi bir arada (*all in one*) olarak da adlandırılan asit, primer ve bağlayıcı ajanlarının tek bir şişede birleştirildiği sistemler ise tek aşamalı self-etch sistemlerdir (151).

Self-etch sistemler asiditelerine göre zayıf, orta ve kuvvetli asidik olarak üç grupta sınıflandırılırlar. Kuvvetli asidik self-etch adezivlerin pH'ları 1 den küçük iken orta asidik self-etch adezivlerin 1,5, zayıf asidik self-etch adezivlerinki ise 2'den büyüktür. Kuvvetli asidik self-etch adezivler düşük pH'da olmalarından dolayı etch&rinse sistemlere benzer bağlanma mekanizması ve arayüz morfolojisi gösterirler. Orta asidik self-etch adezivler, zayıf ve kuvvetli asidik self-etch adezivler arası özellik gösterir, dentin yüzeyini kısmen çözer ve buna bağlı olarak da hibrid tabaka içinde az miktarda hidroksiapatit kristallerinin kalmasına neden olurlar. Bazı iki aşamalı sistemlerde bulunan asidik monomerlerin (pH'ı yaklaşık olarak 2 olan sistemler) hibridizasyona ek olarak, cam iyonomerlerde kullanılan asidik polimerlere benzer bir şekilde kimyasal bağlanmaya neden olduğu belirtilmektedir (152,153). Yoshida ve diğ., konsantrasyon ve pH'larından bağımsız olarak asit solüsyonlarının içindeki karboksilik asit tuzlarının diş sert dokularında oluşturduğu dekalsifikasyon ve kimyasal emilim ile açıkladıkları “adezyon dekalsifikasyon konseptini” ortaya koymuşlardır (154). Self-etch adezivlerin oluşturduğu parsiyel demineralizasyon sonrasında artık hidroksiapatitler, kimyasal bağlanma için reseptör gibi davranırlar (155). Hidroksiapatit dekalsifikasyonu ve kimyasal bağlanma adezivin dokuya uygulanmasının hemen ardından başlar. Self-etch adezivlerin içindeki fosforik asit esterlerinin karbon zincirleri, apatit ağ dışında lokalize olur ve bu esterlerin çift bağları in situ olarak polimerize olurlar. Bir çok hidrojen bağlı grubun (COOH, OH vb) varlığı göz

önünde bulundurulduğunda, tutunma bu gruplar ve hidrofobik içerik (hidrokarbon zinciri) varlığına bağlıdır (153). Bu bağlanma mekanizması sayesinde; mikromekanik bağlanma ile ani kuvvetlere karşı direnç sağlanırken, kimyasal bağlanma ile hidrolitik kopmalara karşı direncin arttırıldığı, ayrıca adeziv monomerin dekalsifiye dokuya infiltrasyonu ile sinerjik olarak daha yüksek bağlanma dayanıklılığının elde edildiği bildirilmiştir (130,156). Bu tutunmanın mikromekanik bağlanma kadar etkili olmadığı da öngörülmektedir (157).

Zayıf asidik self-etch adezivler dentinde sıg demineralizasyon oluşturarak fibriller arasında hidroksiapatit kalmasına izin verirler; smear tıkaçlarını ortadan kaldırmazlar ve submikron boyutunda oldukça yüzeyel hibrit tabaka oluştururlar. Self-etch sistemlerde kollajen ağın bütünlüğü ve doku ile rezinin devamlılığı amaçlanmış olsa da bağlanma kuvvetleri etch&rinse sistemlere göre daha düşük bulunmuştur (1,156,158,159).

Mine Dokusuna Bağlanma

Adeziv restoratif sistemlerin mine ve dentin dokusuna bağlanma etkinlikleri bu dokuların organik, inorganik içeriklerindeki farklılıklar nedeni ile değişiklik göstermektedir (160). Mineye bağlanmanın dikkate alındığı ilk çalışmalarda araştırmacılar prepare edilmiş yüzeylerin smear tabakası ile örtülü olduğunu gözlemişlerdir (73,161,162). Mine dokusuna asit uygulanmasının amacı, prepare edilmemiş mine yüzeyi üzerindeki organik pellicül, prepare edilmiş mine yüzeyinde ise smear tabakasını uzaklaştırmak ve retantif bir alan oluşturabilmek için mine kristallerinin çözünmesini sağlamaktır (162,163). Asit uygulanması sonucunda smear tabakası ortadan kalkar, prizmatik ve interprizmatik mine kristallerinin çözünmesi ile yüzey üzerinde üç farklı mikromorfolojik patern oluşur ve mikropörözite artar. Sonuç olarak minenin ıslanabilirliği, yüzey enerjisi ve bağlanma alanında da artış gözlenir ve rezin esaslı restoratif materyaller için ideal bir bağlanma yüzeyi oluşur. Adeziv sistemlerin oluşan pöröz alanlara akması ve polimerize olması sonucu mikromekanik bir bağlantı gerçekleşir (164,165). Bağlanma, rezin materyalin mikroboşluklara penetre olması ile ilgilidir. Gwinnett

ve Matsui (163) tarafından ortaya atılan bu mine hibridizasyonu görüşü, Nakabayashi'nin (166) dentin dokusu üzerinde yaptığı çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Nemli dentine bağlanmanın sağlanması için hidrofilik rezin monomer içeren güncel dentin adezivlerin geliştirilmesi ile bu adezivlerin mine ve dentin dokusuna birlikte uygulandıkları bir model gelişmiştir (160,162,167).

Self-etch sistemler, mine yüzeyinde asidik primer ile demineralizasyon yaparlar. Zayıf asiditeye sahip primerler mine dokusunda, kuvvetli olanlar ve asit uygulanan sistemlerle kıyaslandığında derinliği daha az olan demineralizasyon gerçekleştirirler (168). Bu sistemlerde mineye bağlanma, yüzey özellikleri değiştirilmiş (asit uygulanmış) alanlara polimerlerin tutunması ile karakterize mikromekanik bağlanmanın yanısıra, mine apatitlerinin kalsiyum iyonları ile birleşmesi ya da fosfat veya hidroksil grupları ile reaksiyona girmesi ile oluşan kimyasal bağlanmayı da içerir (131).

Dentin Dokusuna Bağlanma

Adeziv diş hekimliğinde, mine dokusundan yapısal olarak farklı dentin dokusuna optimum bağlanma elde edebilmek için çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Fusayama ve diğ. (169) dentine asit uygulanmasının zararlı olduğu inancını değiştirmiş ve iyi bir bağlanma için total etch yönteminin uygulanması gerekliliğini vurgulamışlardır. Aynı dönemde Nakabayashi ve diğ. (112,113) dentin yüzey koşullarının değiştirilmesi ile mineral içeriğin yüzeyden uzaklaştırılmasının bağlanma substratı olarak dentin kollajenlerini açığa çıkardığını ve bu durumun güvenilir ve pratik bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Dentin dokusunun hidrofilik özelliği nedeni ile, hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahip monomerlerin kullanımını önermişlerdir. Adeziv sistemler, hidrofilik özellikleri nedeni ile kollajen matrikse penetre olarak kollajen-rezin birleşimi ile ifade edilen ve ilk defa 1982 yılında Nakabayashi ve diğ. (44,112) tarafından tanımlanan hibrit tabakayı oluştururken; hidrofobik özelliği ile restoratif materyalin hidrofobik içeriğine bağlanır (165). Resin monomerler ve dentin bileşenlerinin mekanik kenetlenmesi hibrit tabakanın yanısıra rezin-dentin interdifüzyon alanı (resin

infiltrated/reinforced layer) olarak da adlandırılır (41,129,170). Hibridizasyon teorisi ile tanımlanan bu tabakanın kalınlığı uygulanan materyale, dentin bölgesine ve dentinde oluşturulan demineralizasyon derinliğine bağlıdır. Kullanılan adeziv sisteme bağlı olarak hibrit tabaka, üç bölüme ayrılmıştır. Üst kısım denatüre kollajenlerden oluşmuş smear jel bir yapıdadır. Diğer iki tabaka, kollajenden oluşmuş orta tabaka ve rezinle çevrili hidroksiapatit kristalleri içeren kısmen demineralize olmuş dentin dokusundan sağlıklı dentin dokusuna uzanan taban kısmıdır (171).

2.2.2. Direkt Adeziv Restoratif Materyaller

Toplumsal bilinç düzeyinin giderek yükselmesi sonucunda insanların sağlıklarına verdikleri önemin artması; bu hassasiyetin diş hekimliği alanına da yansiyarak, hastaların daha uzun ömürlü, estetik ve fonksiyonel restorasyonlar talep etmelerine sebep olmuştur. Bu amaçla geliştirilen diş renginde direkt estetik restoratif materyaller silikat simanlar, akrilik rezinler, cam iyonomer restoratifler ve kompozit rezinlerdir (104,172).

Akrilik rezin ve kompozitlerden önce silikat siman esaslı estetik dolgu materyallerinin kullanımı ile gözlenen olumsuzluklar kompozit rezinlerin geliştirilmesine neden olmuştur. İlk kez 1956 yılında R.L. Bowen tarafından diş hekimliğine sunulan kompozit rezinler, epoksi rezin ve eriyip birbiriyle kaynaşmış kuartz veya porselen partiküllerinin birleşimi sonucu elde edilmiştir (173,174).

Adeziv diş hekimliğinde Buonocore'un pürüzlendirilmiş mineye rezin bağlama çalışmalarıyla attığı temel sonrasında materyaller ve teknikler büyük bir hızla gelişme göstermişlerdir (136). Günümüzde estetik amaçla kullanılan bu restoratif materyaller kompozit rezinler, geleneksel cam iyonomer restoratifler ve hibrit restoratif materyaller olarak üç grup altında incelenebilir (170,175).

Kompozit Rezinler

Kompozit terimi birbiri içinde tamamı ile çözünmeyen farklı yapı ve özellikteki iki veya daha fazla maddenin birleşimini ifade eder; bu birleşimin amacı

içeriğinde bulunan maddelerin tek başına taşımadıkları özelliklere sahip bir materyal geliştirebilmektir (170). Diş hekimliğinde kullanılan kompozit rezinleri oluşturan iki bileşen; sert inorganik partiküller ve bu partiküllerin dağıldığı taşıyıcı bir rezin matrikstir (124,176). Kompozit rezin dolgu maddesi organik polimer matriks fazı (*continuous phase*), inorganik faz (*dispersed phase*) ve ara faz (*coupling agent*) olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır (111,177).

Organik Polimer Matriks Fazı

Monomer sistem (monomer ve ko-monomerler), polimerizasyon başlatıcılar, aktivatörler, polimerizasyon inhibitörleri ve ultraviyole stabilizatörlerden oluşur (178,179). Monomerler polimerize olmamış restoratif materyalin akışkan özelliğinden sorumludur (37). Sıklıkla kullanılan monomer Bis-GMA'nın yanısıra, bu yapıya çok benzeyen ve daha iyi bağlanmaya neden olmakla birlikte renk değişimine daha dirençli olan UDMA üretilmiştir. Bis-GMA ve UDMA'nın yüksek viskoziteleri nedeniyle alifatik bir monomer olan TEGDMA, metil metakrilat (MMA) veya etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) gibi daha düşük viskoziteye sahip komonomerler de kullanılmaktadır (104,180). Etoksile bisfenol A dimetakrilat'ın (EBPADMA) su emilimini azaltmak için kullanıldığı bilinmektedir (35).

Polimerizasyon reaksiyonunun ilk evresi olarak kabul edilmiş serbest radikallerin oluşumuna yol açan maddeler, başlatıcılar (initiatör); polimerizasyon reaksiyonunu hızlandıran maddeler de aktivatörler olarak adlandırılır. Ultraviyole ışıkla başlatılan sistemlerde ışığın etkisi ile harekete geçen kamforokinon aktivatör olarak ilave edilen alifatik aminle reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşumunu sağlar (170,176). Kompozit rezinlerin ısı, ışık ve diğer kimyasal yollarla kendi kendine polimerize olmasını engellemek ve raf ömrünü uzatabilmek amacı ile organik matriks içerisine eklenen %0,1 veya daha az 4-metoksifenol (PMP) ya da 2,4,6-tritersiyeer bütülfenol (BHT) gibi fenol türevi materyaller ise polimerizasyon inhibitörleridir (124,176).

İnorganik Faz

Rezinin diş dokusuna benzer niteliklere sahip olabilmesi için polimer özelliklerini tamamlayan bu faz, doldurucu partikül olarak matriks içerisine dağılmış farklı şekil ve boyutlarda kuartz (kristalin silika), borosilikat cam, lityum alüminyum silikat, stronsiyum, baryum, çinko, yitriyum cam, baryum alüminyum silikat içerir (104,176,177). Kompozit rezinler inorganik faza sahip olmaları nedeni ile doldurucu içermeyen silikat ve akrilik restoratif materyallerden daha üstün fiziksel özellikler gösterirler (181). Günümüzde kullanılan rezin restoratif materyaller doldurucu miktarları ve boyutları açısından çeşitlilik göstermektedir.

Ara Faz (Bağlayıcı Faz)

Kompozit rezin özelliklerinin iyileştirilmesi ve kimyasal yapının devamlılığının sağlanması için, doldurucu partiküller ve rezin matriks arasında oluşması gereken bağlanma organik silisyum bileşiği olan silanlar (silikon ve metan kelimelerinin birleşimi ile adlandırılmıştır) ile gerçekteşir (37,176). Silanlar iki fonksiyonlu moleküllerdir; organik matriksteki metakrilat grubu ile kovalent bağlar kurarken, doldurucu partiküllerin yüzeyindeki hidroksil gruplarına bağlanırlar (104,176,177). Uygulanan silan tipi genellikle doldurucu içeriğine bağlıdır. Silorane esaslı kompozitlerde metakrilat yerine silan içindeki epoksi gruplar kullanılmıştır (111).

Kompozit Rezinlerin Sınıflandırılması

Kompozit rezinler, içerikleri, doldurucu oranları ve özellikleri, matriks fazları ve manipölasyonları dikkate alınarak çok farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır. Yaygın olarak kullanılanlar ise doldurucu içeriği, partikül boyutu ve ilave edilme şekline göre yapılan sınıflamalardır. Kompozitler ayrıca matriks içeriklerine; polimerizasyon yöntemlerine veya doldurucu partikül boyutlarına göre sınıflandırılmaktadırlar (37,104,182).

Partikül boyutlarına göre kompozit rezinler, megafil, makrofil, midifil, mikrofil ve nanofil olarak sınıflandırılmışlardır. Makrofil kompozitlerden sonra geliştirilen midifil kompozitler popülerlik kazanmışlar ve geleneksel kompozitler olarak adlandırılmışlardır. Sonrasında üretilen 0,02-0,04 μm doldurucu içeriğine sahip mikrofil kompozitler ise iyi polisajlanabilen kompozitler olarak da adlandırılır. Yüksek oranda doldurucu içeren mikrofil kompozitlerin uygulanmasında yaşanan zorluklar nedeni ile bu materyallere, 2-5 μm boyutunda partikül karışımların eklenmesi sonucunda hibrit kompozitler üretilmeye başlanmıştır. Doldurucu partiküllerinin 0,1-1 μm aralığında olduğu kompozitler ise mini-mikrohibrit olarak adlandırılmıştır. Rezin matriks içerisine inorganik dolduruculardan farklı olarak, onlar kadar güçlü olmayan kristalin polimer doldurucuların da eklenmesinin yanısıra mikrofil ve hibrit kompozitlerde mikrodoldurucu silika partiküllerinin kullanıldığı da bilinmektedir. Posterior kompozit restorasyonlarda cam insörtler de (megadoldurucu) kullanılmaktadır (37). Posterior dişlerde uygulanan %86 doldurucu içeriğine sahip, minimum 800 mW/cm^2 ışık gücü ile 10 sn'de 4mm derinliğinde polimerizasyonu sağlanan ve sadece translusent renge sahip olması ile bukalemun etkisi yarattığı düşünülen ve hacimce %1,7 polimerizasyon büzülmesi gösteren Quixfill (Dentsply, De Trey, Almanya) diş hekimliğinde uygulanmaya başlanmıştır (183).

Doldurucu partikül boyutu, dağılımı, morfolojisi ve monomer teknolojisindeki ilerlemeler, özel manipülasyon şekillerine sahip kompozitlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Sıkıştırılabilen (kondanse edilebilir) ve akışkan kompozitler ise bu materyallere örnek olarak geliştirilmişlerdir. Amalgam ve altın alaşımlarına alternatif olarak estetik restoratif materyallerin arka dişlerde de uygulanması amacı ile posterior, kondanse edilebilir ya da sıkıştırılabilir kompozitler geliştirilmiştir (184-186). Akıcı kompozit rezinler olarak da adlandırılan akışkan kompozit rezinler 1995'te kullanıma sunulmuş çoğu mikrofil kompozitlerden daha az doldurucu içeren ve bir bakıma daha düşük vizkoziteli hibrit kompozitler olarak da kabul edilen materyallerdir (104,135,187-189).

Kompozit rezinlerin sınıflandırılmalarındaki zorluk nedeni ile yapılan farklı bir sınıflandırmada ise kompozit rezinler üç gruba ayrılmışlardır. Düşük viskoziteye sahip akışkan rezinler *light-body* kompozit rezinler olarak adlandırılırken, ön ve arka grup dişlerde kullanılabilen mikrofil, hibrit ve mikro hibrit olan *medium-body* kompozit rezinler; kondanse edilebilir rezinler ise *heavy-body* kompozit rezinler olarak gruplandırılmıştır (181). Kompozit rezin teknolojisindeki gelişmeler sonucunda her geçen gün farklı türde güncel materyaller diş hekimlerinin kullanımına sunulmaktadır. Bu materyaller ormoserler, nanodolduruculu kompozitler ve siloranlar gibi gruplardır.

Nanodolduruculu Kompozitler

“Nano” kelimesi Yunanca kökenli olup nanometre 10^{-9} m veya 10^{-3} μm 'yi ifade eden, çok küçük boyutlarda bir ölçü birimidir (190). 1959'da Richard P Feynman tarafından ortaya atılan nanoteknoloji, 1990'ların başından beri özellikle tıp ve diş hekimliği uygulamalarındaki temel bilimsel düşünce haline gelmiştir (191). Nanoteknolojinin diş hekimliğinde kullanılmaya başlanması ile, rezin esaslı kompozitlerden sonra mikrofil kompozitlere benzer olarak yüksek estetik özelliklere sahip, hibrit kompozitlere benzer olarak yüksek aşınma direnci ile streslere karşı koyabilme gücünü beraberinde barındıran ve ağız içinde her alanda kullanılabilen bir materyalin geliştirilmesi amaçlanmıştır (190,192-194). Çok farklı boyutlarda partikül boyutlarına ve farklı doldurucu içeriğine sahip nanohibrit kompozitler ve standart boyutta (nano boyutta) partikül içeren nanofil kompozitler, nanokompozitler olarak adlandırılan materyallerin iki alt grubudur (191).

Siloranlar

BisGMA, UDMA, TEGDMA, gibi çeşitli metakrilat monomerlerden oluşan matriks yapıya sahip kompozit rezinler (2) başta polimerizasyon büzülmesi olmak üzere bir çok klinik soruna neden olabilecek radikal zincir reaksiyonu ile polimerize olurlar (7). Polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmemesi ile salınan

monomerlerin lokal ve sistemik toksisite, pulpal reaksiyonlar, alerjik ve östrojenik etkilerini içeren biyolojik etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (30,111,195,196). Kompozit rezinlerde karşılaşılan tüm bu yetersizlikleri ortadan kaldırmak; fiziksel ve mekanik özellikleri geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalar devam etmektedir (196,197). Bu gelişmelerden en önemlisi yapısal olarak siloksan ve oksiran içeren ve dimetakrilat monomerlerin serbest radikallerinin polimerizasyonu yerine siloranların halka açılması polimerizasyonunun gerçekleştirildiği hibrit monomer sistem olan siloran sistemlerin geliştirilmesidir (3).

“Siloran” terimi materyalin içeriğinde bulunan siloksan ve oksiran yapıtaşlarından gelmektedir. Siloksanın materyale kazandırdığı hidrofobik özellikleri ağız içinde kompozit rezinin uzun dönem fiziksel ve mekanik dayanıklılığında etkilidir. Bununla birlikte siloranlar, hidrofobik yapılarından dolayı dış faktörlere bağlı renklenmelere de daha az duyarlıdırlar (198). Oksiran monomerinin gösterdiği halka-açılımı ile ise düşük polimerizasyon büzülmesi özelliğini kazanmışlardır (3,199-203). Siloran ağı; sikloalifatik oksiran bileşeninin katyonik halka-açılımlı polimerizasyonu sonucunda oluşur. Polimerizasyonları sırasında "halka-açılımlı" monomerler; açılarak düzleşir, birbirlerine doğru uzarlar ve bağlanırlar. Sonuçta da metakrilat esaslı kompozitlere oranla belirgin şekilde daha az büzülme gerçekleşir ve polimerizasyon stresleri azalır. Farklı kimyasal yapıya sahip oksiran fonksiyonlu silikon esaslı monomer içeren siloranlar, düşük polimerizasyon büzülmesi göstermeleri nedeni ile metakrilatlara bir alternatif olarak gösterilmişlerdir (3,200,204). Siloranlarda izlenen bu katyonik halka-açılımlı reaksiyon oksijene duyarlıdır ve deaktive olmuş polimerizasyon başlatıcı radikaller sebebi ile metakrilat esaslı kompozitlerde gözlenen oksijen inhibisyon tabakasının dezavantajlarına sahip değildir (199,200). Lien ve diğ. (201) bu materyallerin fiziksel özelliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında metakrilat esaslı kompozitlerle karşılaştırdıkları siloran kompozitlerin düşük polimerizasyon büzülmesinin yanısıra, ortalama mekaniksel özelliklere sahip olduklarını vurgulamışlardır. Bu materyaller yüksek bükülme ve kırılma dayanıklılığı

göstermelerinin yanısıra daha düşük sıkışma dayanıklılığı ve mikrosertliğe sahip bulunmuştur. Siloranların sahip oldukları bu özelliklerin yanısıra azalmış su emilimi, çözünürlük ve difüzyon katsayısı (198) sayesinde, geleneksel metakrilat esaslı kompozit rezinlerde sık rastlanan; kenar sızıntısı, kenar renklenmesi, sekonder çürük, mikroçatlak, debonding, kaspal gerilim, tüberkül kırığı, post-operatif duyarlılık gibi klinik sorunların görülme olasılığı büyük ölçüde azaltılmıştır (3,202,203).

Siloran kompozitlerin içeriğinin metakrilat esaslı kompozitlerden farklı olması nedeni ile bu restoratiflerin diş dokularına daha iyi bağlanması için, farklı bir adeziv sistem geliştirilmiştir. Hidrofilik yapıdaki ve metakrilat esaslı olan primeri ve hidrofobik siloranı daha iyi ıslatmak ve bağlanmak için geliştirilmiş metakrilat yapıda adezivi içeren iki basamaklı bu adeziv sistem, siloranların metakrilat esaslı kompozitlere göre hidrofobik olmasından dolayı hidrofilik diş yüzeyi ve hidrofobik siloran maddesi arasında bağlanma sağlar (3). Tipik bir iki aşamalı self-etch adeziv sistemden farklı olarak; ilk aşamada hidrofilik rezinin uygulanmasının ardından hidrofilik diş yüzeyi ve hidrofobik materyal arasında bağlanmayı sağlayıcı hafif hidrofobik bir rezinin uygulanması aşamasının gerçekleştirildiği, ışıkla polimerizasyon gerektiren iki basamak içerir (205).

Cam İyonomer Restoratifler

Cam iyonomer restoratifler geliştirildikleri dönemde “A”limino, “S”ilikat tozu ve “P”oliakrilik “A”sit kelimelerinin başharflerinden oluşan ASPA ile adlandırılmıştır. Bu materyaller, silikat cam tozunun dayanıklılık, sertlik ve florür salımı özellikleri ile poliakrilik asit likitin adeziv özelliklerinin birleştirilmesi sonucu elde edilmişlerdir. Esas olarak cam, poliasit, tartarik asit ve su içeren bu materyaller, fluoro-alumino-silikat cam toz ve poliasidin sulu solüsyonu arasındaki asit-baz reaksiyonu ile sertleşen, su bazlı bir materyal olarak tanımlanabilirler (136,206). Asit-baz reaksiyonu çözünme, jelasyon ve sertleşme olmak üzere üç aşama ile gerçekleşir. Toz ve likitin karıştırılmasının ardından cam partikül yüzeylerinde bozunma sonrasında metal (stronsiyum, kalsiyum, aliminyum vb.),

florür ve silisilik asit iyonlarının salımı ile devam eden bu reaksiyonda, metal iyonları siman matriksini meydana getiren poliasit tuzunu oluşturmak için karboksil grupları (COO^-) ile iyonik reaksiyona girerler ve cam partiküllerinin yüzeyleri silika hidrojele dönüşür. Reaksiyona girmeyen cam partikülleri ise doldurucu görevini üstlenir. Klinik sertleşmenin birkaç dakikada gerçekleşmesine rağmen tamamen sertleşmesi için birkaç ay geçmesi gerekmektedir. Bu durum aliminyum iyonlarının yavaş reaksiyonuna bağlıdır ve nem hassasiyetine neden olur (136,207).

Cam iyonomer restoratiflerin mine ve dentine bağlanma mekanizması tam olarak kesinleşmemiştir. Bağlanma ile ilgili teorilerden biri poliasit moleküllerinin diş yüzeyindeki kalsiyumla şelasyon yapmasıdır. Mineye bağlanmanın daha iyi olması, bağlanmada kalsiyumun rolü olduğunun göstergesidir. Diğer bir teori ise diş yüzeyindeki apatitlerin dış tabakalarının asit varlığında çözünmesi ile açıklanmıştır. Daha fazla apatitin çözünmesi ve cam iyonomerin sertleşme reaksiyonunun tamamlanması ile birlikte ortam pH'sı yükselmeye başlar. Bu durum apatitlerin yapısından çözünmüş olan kalsiyum fosfatın ve poliasit kalsiyum tuzlarının diş yüzeyine tekrar çökmesi ile sonuçlanır. Polisait zincirleri ise çökme gözlenen tabakaya bağlanma gösterir. Dentin dokusunda ise, cam iyonomerin karboksilik asit grupları ile kollajenlerin reaktif grupları arasında hidrojen bağlanması veya metalik iyon köprüleri ile ilişkili bağlanma olduğu gözlenmiştir (170).

Cam iyonomer restoratiflerin dentin dokusuna daha iyi bağlanmasını sağlayabilmek için araştırmacılar, farklı yaklaşımlarda bulunmuşlardır. Bu yaklaşımlar, smear tabakasını uzaklaştırmak veya modifiye etmekle özetlenebilir. Sitrik asit solüsyonları, “kavite temizleyicileri” olarak kullanılır ve smear tabakasını uzaklaştırır. Sitrik asit uygulaması, dentin yüzeyinde demineralizasyona ve bağlanma için gerekli kalsiyumun uzaklaşmasına neden olduğu için bağlanma dayanıklılığında değişiklik oluşturmadığı, poliakrilik asit uygulamasının ise bağlanma dayanıklılığında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, smear tabakasının çözünmesi ve sonrasında

çökmesi ile özetlenmiştir. Cam iyonomer restoratiflerin bağlanma dayanıklılığını arttırmada başvurulmuş bir diğer yöntem ise kalsiyum fosfat ya da kalsiyum sülfat solüsyonları uygulanarak dentinin mineral içeriğinin artırılmasıdır (170).

Diş hekimliğine sunulmalarından bu yana cam iyonomerlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar devam etmektedir. 1980'li yılların başında Mc Lean ve Simmons tarafından geliştirilen sermet simanlar cam iyonomer siman tozu ile altın veya gümüş tozlarının birlikte sinterize edilmesinden elde edilir. Asit baz reaksiyonu ile sertleşen bu materyaller radyopak özellik göstermelerinin yanı sıra geleneksel cam iyonomerlere göre daha yüksek aşınma direncine ve daha iyi mekanik özelliklere sahiptirler (104).

Cam iyonomer teknolojisinde izlenen değişikliklerin en önemlisi geleneksel “su esaslı (bazlı)” cam iyonomerlere 1990’ların başında suda çözünebilen rezin eklenmesi ile ışıkla polimerize edilen “rezin modifiye” cam iyonomer restoratiflerin geliştirilmesidir (136,206,208,209). Bu amaçla diş hekimlerinin kullanımına sunulan ilk materyal günümüzde Vitrebond olarak adlandırılan Vitrabond’dur (3M/ESPE, St Paul, ABD). Resin modifiye cam iyonomerler “rezin iyonomer”, “resinomer”, “hibrit iyonomer” ve “ışıkla sertleştirilen cam iyonomer” olarak adlandırılır (210).

Cam iyonomer restoratiflerle ilgili en pratik sınıflandırma klinik uygulamalarına göre yapılan sınıflamadır (136,211). Tip I cam iyonomerler yapıştırıcı simanlardır, restoratif olarak uygulanan tip II cam iyonomerler ise iki alt grupta değerlendirilir. Birinci grupta estetik simanlar (geleneksel ve resin modifiye cam iyonomerler olabilir), ikinci grupta ise güçlendirilmiş (aşınmaya daha dayanıklı) cam iyonomerlerdir. Tip III cam iyonomerler ise düşük viskozitesi ve hızlı sertleşme reaksiyonu nedeni ile kavite taban maddesi, liner, fissür örtücü olarak kullanılan materyallerdir. 1990’ların ortalarında ise yüksek toz-likit oranına sahip geleneksel cam iyonomer restoratifler “kondanse edilebilir” veya “yüksek viskozitede” olmak üzere kullanıma sunulmuştur (136).

Geleneksel Cam İyonomer Restoratifler

Cam iyonomerler Wilson ve Kent tarafından 1970 yılında geliştirilmiş, 1977 yılında ise Mclean ve Wilson tarafından ilk kez tanıtılmıştır. Örtücülük özelliği, florür salımı ile sağlanan karyostatik etkisi, rezin esaslı dolgu materyallerinin altında kuvvet kırıcı olarak rol oynaması cam iyonomerlerin uzun yıllardır başarıyla kullanımını sağlamıştır (136,212). Cam iyonomer simanların özellikleri kimyasal içeriğine, toz içinde dağılan partikül büyüklüğüne ve yapısına, moleküler ağırlığına ve likidi oluşturan poliasidin konsantrasyonuna bağlıdır (213).

Cam iyonomerlerin daha yeni bir jenerasyonu olarak geliştirilen, hızlı sertleşen ve yüksek dayanıklılığa sahip olarak nitelendirilen materyaller güçlendirilmiş cam iyonomer simanlardır. Bu materyallere örnek olarak Ketac Molar (3M/Espe, Seefeld, Almanya), Chemflex ve Chemfil Rock (Dentsply De Trey, Kanstanz, Almanya), İonofil Molar (Voco, Cuxhaven, Almanya) ve Fuji IX GP Extra GP, (GC, Tokyo, Japan) olarak verilebilir (136). Geliştirilmiş erken fiziksel özellikleri ve çözünmeye karşı arttırılmış dayanıklılıkları (geleneksel cam iyonomerlerle kıyaslandığında) üretici firmalar tarafından belirtilmektedir. Bu gelişim matris içindeki cam partiküllerin boyutlarının küçültülmesi ve bu şekilde cam ve poliakrilik asit reaksiyonunun daha hızlı bir hale getirilmesidir. Estetik ve kondanse edilebilir cam iyonomer olan Fuji IX GP Extra ve nanodolduruculu yüzey örtücü G Coat Plus (GC, Tokyo, Japan) kombinasyonu olan EQUIA (GC, Tokyo, Japan) geleneksel cam iyonomerlere oranla daha estetik ve dayanıklı olarak üretilen bir materyaldir. Geleneksel cam iyonomerlerin avantajlarına sahip bu materyal üzerine uygulanan vernik, özel adeziv monomerleri aracılığı ile cam iyonomere kimyasal olarak bağlanabilmektedir. EQUIA'nın ilk parçası olan Fuji IX GP Extra translusensi özelliği ile bu materyale geleneksel cam iyonomerlerden daha estetik bir özellik kazandırırken ikinci parçası G Coat Plus sadece aşınmaya karşı dayanıklılığının artmasına neden olmamış daha parlak ve estetik bir görünüm kazandırmış ve uzun dönemde oluşacak renklenmelerin daha az gözlenmesine neden olmuştur (214).

Hibrit Restoratif Materyaller

Diş renginde restoratif materyallerden kompozit rezinler ve geleneksel cam iyonomer restoratiflerin hiçbirinin tek başına tüm dental uygulamalar için uygun olmadığı görüşü ve sınırlı uygulama alanlarına sahip olmaları; bu iki grup materyalin avantajlarına sahip bir “hibrit” materyal geliştirilmesine neden olmuştur. Cam iyonomer kimyası ve iyi bilinen rezin kimyasının birleştirilmesi üzerine yapılan çalışmalarla rezin modifiye cam iyonomerler ve modifiye kompozit rezinler diş hekimliğine sunulmuştur (170,215).

Rezin Modifiye Cam İyonomer Restoratifler

Geleneksel cam iyonomerlerin fiziksel özelliklerini geliştirmek amacı ile materyale rezin ilave ederek, rezin modifiye cam iyonomer simanlar üretilmiştir (170). Temel mekanizma, bu materyallerin içeriğinde bulunan su yerine su/HEMA karışımı ilave edilmesidir (211). Polimerize edilmeden önce toz ve likitin karıştırıldığı bu materyallerde toz esas olarak iyon salabilen camdan oluşurken likit dört ana bileşenden oluşur. Bu bileşenler polimerizasyonu sağlayan metakrilat rezin, asit baz reaksiyonunu gerçekleştiren iyon salabilen camla reaksiyona giren poliasit, polimerizasyonda rol oynayan hidrofilik metakrilat HEMA ve asit-baz reaksiyonunun başlamasından sorumlu asit içeriğinin iyonizasyonunu sağlayan sudur. Diğer minör bileşenler ise polimerizasyon aktivatörleri ve stabilizatörlerdir (170). Sertleşme, cam iyonomerlerin bilinen asit baz reaksiyonu ve HEMA'nın polimerizasyonu ile gerçekleşmektedir (104). Rezin modifiye cam iyonomerler daha uzun çalışma süresine olanak sağlaması, ışıkla sertleşmesi ve materyalin yüzeyinde hızlı bir sertleşme olması nedeni ile geleneksel cam iyonomerlere göre daha avantajlıdır (216). Sertleşme sırasında daha fazla polimerizasyon büzülmesi göstermesi, bunun sonucunda gözlenen mikrosızıntı, daha zayıf adezyon, daha az florür salımı eğiliminde olması geleneksel cam iyonomerlere göre dezavantajlarını oluşturmaktadır (217). Bazı rezin modifiye cam iyonomerler, serbest poliasit gruplarının mineral içeriği ile ilişkiye girmesi sonucu uygulandıkları diş yüzeyine geleneksel cam iyonomerlere

benzer mekanizma ile bağlanma gösterirler. Bağlanma dayanıklılığı mine ve dentine asit uygulanması ile arttırılabilirken, bir çok üretici smear tabakanın uzaklaştırılması için poliakrilik asit kullanımını önermektedir. Farklı üreticiler ise metakrillenmiş poliasit içeren primerlerin kullanımını önermektedir (170).

0,1-100 nm boyutlarında partikülleri içeren yapıların ve materyallerin geliştirilmesi sonucunda, bir çok alanda kullanılan nanoteknoloji ile geliştirilmesine olanak sağlanan nanoionomer Ketac N100 (3M-ESPE, Seefeld, Almanya) süt dişleri ve anterior dişlerin restorasyonunda sıklıkla kullanılmaya başlanan rezin modifiye cam iyonomer restoratiftir. Işıkla sertleşen bu nanoionomerin içeriğinde bulunan nanodoldurucular ile materyalin mekanik özellikleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu materyalin asit ile teması sonrasında çürük inhibisyon alanı oluşturduğu gösterilmiştir (218). Ketac N 100 nanoteknolojinin kullanıldığı ilk cam iyonomerdir. Cam iyonomerlerin avantajlarına sahip olmasının yanısıra, bu materyallerin yeni bir kategorisinde “nanoionomer” olarak tanımlanmaktadır. Bu materyalin teknolojisi floroalimünosilikat teknolojisi ve Filtek Supreme Universal (3M-ESPE, Seefeld, Almanya) restoratif için geliştirilen nanoteknolojiyi birleştirmiştir. Bu kombinasyon, aşınma ve polisajlanabilirlik özelliklerinin geliştirilmesini sağlamış, dayanıklılık, optik özellikleri ve aşınma direnci üzerinde etkili olmuştur. Nano boyutta partiküller ve nanokümeciklerin floroalimünosilikat ile kullanılması, estetik özellikleri ve florür salımı gibi özellikleri üzerinde etkilidir (219). Bis-GMA, TEGDMA, *Polietilen glikol dimetakrilat* (PEGDMA) ve HEMA içerir ve ışıkla polimerize edilmesinin yanısıra, en önemli farklılığı üçte ikisini oluşturan doldurucu içeriğidir (220).

2.3. Adeziv Restoratif Sistemlerde Biyoyumluluk

Biyoyumluluk, bir biyomateryalin canlı dokularla temas halinde iken vücudun yumuşak ve sert dokularında, lokal veya sistemik toksisite, alerji, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi “doku reaksiyonları” oluşturmaması (15) ya da uygun cevabı oluşturmaması olarak tanımlanır (111,217). Genel olarak bir

materyalin biyouyumluluğu, materyalin allerjenitesi, sitotoksitesisi, genotoksitesisi, oluşturduğu sistemik cevaplar ve karsinojenik özellikleri ile değerlendirilmektedir (10,221).

Diş hekimliği alanında kullanılan materyallerden alerjik özelliğe sahip olanlar “birincil alerjen”, bir bileşikle başlayan alerjik reaksiyonun bir ya da daha fazla bileşikle devam etmesi ile karakterize çapraz reaksiyon potansiyeli bulunan materyaller ise “ikincil alerjen” olarak adlandırılırlar (222,223). Alman Sağlık Kurumu’na bağlı bir yayında alerjenler üç grupta değerlendirilmiştir (224). A grubu alerjenler önemli alerjenler, B grubu alerjenler insanlardaki şüpheli alerjenler, C grubu alerjenler ise önemsiz alerjenler olarak sınıflandırılmışlardır. *Bisfenol A diglisidil eter* (BADGE), belirli metakrilatlar, formaldehit ve gluteraldehit, A grubu alerjenler içinde kabul edilirler (111). Diş hekimliğinde kullanılan monomerlerin genellikle çapraz reaksiyon potansiyellerinin bulunduğu ve bu materyallerle temas halindeki bireylerde (diş hekimi, yardımcı personel) alerjik kontak dermatit veya iritan kontak dermatit gibi “alerjik kökenli aşırı duyarlılık” (hipersensitivite) olgularına rastlandığı bildirilmiştir (222,223). Alerjik reaksiyonlar ise Tip I, II, III ve IV olmak üzere dört şekilde sınıflandırılırlar. Tip I reaksiyonlar anafilaktik ve geçici reaksiyonlar, Tip II reaksiyonlar sitotoksik reaksiyonlar, Tip III reaksiyonlar immün kompleks oluşumu ile karakterize reaksiyonlar, Tip IV reaksiyonlar ise gecikmiş reaksiyonlardır (111). Biyouyumluluk değerlendirmeleri ile ilgili tanımlamalar yapılırken; sitotoksitenin hücrenin temel organellerinde kimyasal etkenlerin oluşturduğu yıkım olarak tanımlanmasının yanısıra (225), genlerde DNA (deoksi ribo nükleik asit) molekülleri ile toksik ajanların etkileşmesi sonucu ortaya çıkan durum “genotoksite” olarak adlandırılır (226). Bu genetik hasarın sonraki nesile aktarılması, programlanmış hücre ölümü (apoptozis) ile engellenebilir. Genetik hasarın gelecek nesillere aktarılması olarak tanımlanan mutajenite ise hücre çekirdeğini etkileyen ve genellikle DNA üzerinde mutasyon gibi kalıcı nitelikte değişiklikler oluşturan durum olarak kabul edilir (111,227). Restoratif materyallerden salınan monomerlerden bazıları, kötü huylu tümoral oluşumlara ya da başka bir deyişle karsinojenik etkiye neden olabilir. Karsinojenite, *in vivo*

olarak kanser oluşturma yeteneğidir. Mutajenite ise materyallerin olası karsinojenik etkisinin belirteci olarak kabul edilir (111). Mutajenlerin karsinojen olup olamayacakları gibi karsinojenler de mutajen olabilirler ya da değildirler (228).

Bir materyalin biyoyumluluğu materyalin çözünürlüğü veya korozyon nedeni ile salınan bileşenleri ile ilişkilidir (111). Yapılan çalışmalarla rezin restoratif materyallerden salınan monomerler ile bu monomerlerin sitotoksik, genotoksik, mutajenik veya östrojenik etkileri ve pulpal inflamasyon oluşturma potansiyelleri belirtilmiştir (9,11,229,230). Bakteriyel metabolizma ürünleri, su, enzimler, polar ve non polar çözücüler gibi kimyasal faktörler, bileşiklerin salımını arttırmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu [Food Drug Administration (FDA)], ağız ortamı ile kısa süreli temasta bulunan ölçü maddesi ya da restoratif materyaller gibi uzun dönem kullanılan materyallerin oluşturabileceği yan etkileri göz önünde bulundurarak yapılan çeşitli testler sonucunda kullanım onayı vermektedir (231).

Yetersiz su soğutması altında uygulanan kavite preparasyonu ve restoratif materyaller, pulpal hasardan sorumlu olabilirler. Restoratif materyallerin direkt toksik etkileri dışında kavite duvarındaki mikrobiyal kolonizasyona bağlı bakteriyel toksinlerin etkisi (indirekt etki), adeziv restoratif sistemlerle ilişkili doku reaksiyonlarının bir sebebinin de bakteriler olduğunu kanıtlayabilir. Bu nedenle restoratif sistemlerin bakteri çoğalması üzerine etkileri araştırılmış ve kompozit rezin ve yapıştırıcı kompozitlerin çürük oluşumunda etken olan *Streptococcus mutans*'ların üremesini artırdığı gözlenmiştir (111). Hansel ve diğ. (232) monomer (Bis-GMA, UDMA) ve komonomerlerin (TEGDMA, EGDMA) çürükle ilişkili mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında monomerlerin çok az etkili olduğunu veya etkilerinin bulunmadığını, komonomerlerin ise bakteriyel çoğalmayı arttırdığını gözlemlemişlerdir. Adeziv restoratif sistemlerden salınan komonomerlerin, monomerlerden daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenmesi nedeni ile bu restoratif materyallerle ilişkili bakteriyel çoğalmanın olasılığı düşünülmektedir. Modern rezin kompozitler su emilimi, su ile genleşme ve dış renklenmeler gibi dezavantajlarının elimine

edilmesi amacı ile nispeten hidrofobik monomerler içermektedir. Bu durumun klinik olarak bakteri tutunmasını kolaylaştırdığı da bilinmektedir. Yüzeydeki negatif elektrik potansiyelinin mikrobiyal tutunmayı azalttığı varsayılmaktadır (111).

2.3.1. Adeziv Restoratif Sistemlerin Biyouyumluluktan Sorumlu Monomer İçeriği ve Analiz Yöntemleri (Kromatografi)

Rezin esaslı dental materyaller; çoğunluğu Bis-GMA veya UDMA ‘dan oluşan “organik polimer matriks fazı”, “inorganik faz” ile, bu iki fazı birbirine bağlayan “ara faz” dan oluşur (124).

Bis-GMA

512 g/mol moleküler ağırlığa sahip (111) Bis-GMA, Bowen tarafından diş hekimliğinde kullanılan ilk multifonksiyonel (birden fazla çift bağ içeren) metakrilatlardan biridir. Nem varlığının epoksi rezinlerin polimerizasyonunu engellemesi sonucunda Bowen’in bu materyalin sonuna metilmetakrilat grubu eklemesi ile Bowen’in rezini ya da Bis-GMA adı ile geliştirilmiştir (174). Molekülde sertliği sağlayan iki fenil grubu ile moleküller arası hidrojen bağlantısını oluşturan hidroksil grubunun yer alması sonucunda aşırı visköz bir kıvam kazanmıştır (233,234). Bis-GMA’ da epoksi rezindeki epoksi gruplarının yerine metakrilat grupları bulunmaktadır ve bunun sonucunda ağız ortamında daha çabuk polimerize olabilmektedir (124,174). Sert bir yapıya sahip (124) bu monomer, hidrofobik (235) olması nedeni ile rezinlerin higroskopik genleşmesini de azaltmaktadır (124). Yüksek viskozitesi nedeni ile seyreltildiği durumlarda polimerizasyon büzülmesinin artmasına, fazla miktarda bulunduğu ise, polimerizasyon sırasında hızlı sertleşmesi ve hareketsiz kalması sonucu polimerizasyon derecesinde düşüşe neden olmaktadır.

Önceleri *bisfenol-A* (BPA) ve *glisidilmetakrilattan* sonraları ise bisfenol-A’nın diglisil eteri ile metakrilik asit bileşiminden elde edilen Bis-GMA sıklıkla kullanılan büyük bir monomerdir (104,180) (236). Diş hekimliğinde, adeziv

restoratif sistemler genellikle saf halde BPA değil BPA türevlerini içerirler yani BPA matriks monomerlerinin sentezinde kullanılır. (236). Bu türevler kimyasal olarak ya da ışıkla polimerize edildiklerinde katı hale geçen sıvı monomerlerdir. BPA bu rezinlerin içinde bir artık olarak gözlenebilir fakat formülasyonuna eklenemez; bunun nedeni ise tükürükteki nem sebebi ile iki uç hidroksil gruplarının hidrolizi sonucunda polimerizasyonunun inhibe olmasıdır. Bis-GMA, BPA dimetakrilat (Bis-DMA), BADGE ve BPA etoksile dimetakrilat (Bis-EMA), sıklıkla kullanılan BPA türevi monomerlerdir (237). BPA bir fissür örtücünün ekstraktında ve bir kompozit rezinle temasta olan tükürük örneğinde saptanmıştır (238). Bu bulgular bazı araştırmacılar (239,240) tarafından çalışmanın metodolojisine bağlanırken; Wada ve diğ. (241) 24 farklı kompozit rezini değerlendirdikleri çalışmalarında BPA'ya rastlamamışlardır. İçerisinde BPA saptanmamış 6 ekstraktın östrojenik etkisi gözlenmiş; bu etkiye ise bir başlatıcının [2,2-dimetoksifenilasetofenon (DMPA)] ya da UV stabilizatörünün [2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (HMBP)] neden olabileceği belirtilmiştir (241). Az miktarda BPA ise UDMA ve Bis-GMA esaslı iki materyalde belirlenmiştir (242). Bazı kimyasalların ilgili hücrelerin östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojen benzeri biyolojik reaksiyonlar oluşturdukları bilinmektedir (111). Yapılan çalışmalarda BPA ve Bis-DMA'nın diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerde östrojeniteden sorumlu olduğu ve tükürük içine salındığı gözlenmiştir (238,239). Bazı araştırmacılar, tükürüğün enzimatik aktivitesi, esterazlar, yüksek pH ve tükürük birikiminin dimetakrilat türlerinin hidrolizine neden olabilmesi ile Bis-GMA'nın, BPA için kaynak oluşturduğunu belirtmekte ve Bis-GMA'nın bu nedenle BPA'nın neden olduğu reaksiyonların sebebi olarak östrojenik bileşikler sınıfında değerlendirmektedirler (225,238). Bis-DMA'nın BPA'ya hidrolize olduğu fakat Bis-GMA'nın kimyasal yapısının, ester zincirlerinin hidrolizine engel olarak böyle bir reaksiyonu engellediği bildirilmiştir (237). Bis-GMA, Bis-DMA ve BPA gibi bileşikler ksenoöstrojenler içerebildiği; ksenoöstrojenlerin ise, yapısal olarak östrojene benzemeseler de bu doğal steroid hormonunun etkilerini taklit edebilme yeteneklerinin olduğu ve karsinojenik

potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir (174,243). Fakat yapılan farklı bir çok *in vitro* değerlendirmede (26,239) ise Bis-GMA'nın östrojen benzeri bir etki göstermediği gibi bozunma ürünü olan *bis*-(2,3-dihidroksipropil)eter'in de (BADPE-4OH) böyle bir etkiye sahip olmadığı vurgulanmıştır (244).

0,02 ve 0,6 mM gibi düşük konsantrasyonlarda Bis-GMA'nın, materyallerin insan genlerinde mutajenik etkilerini ölçmede kullanılan DNA-sentezi inhibisyon (*DNA-synthesis inhibition test*) testinde pozitif cevap verdiği bilinmektedir (245). Bis-GMA'nın ayrıca insan dişeti fibroblast hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne ve *glutation* konsantrasyonuna etki ettiği de bildirilmiştir (246). Fare fibroblastları üzerinde yapılan bir araştırmada, Bis-GMA karşılaştırıldığı UDMA, TEGDMA ve HEMA'dan daha sitotoksik olarak gözlenmiştir (31).

UDMA

Rezin sistemlerin mekanik özelliklerini arttıran (124) ve 1974'te Foster ve Walter tarafından geliştirilen (247) UDMA bağlanmayı güçlendirir ve materyalin renk değişikliklerinden daha az etkilenmesine sebep olur (232). 470 g/mol moleküler ağırlığa sahip olan (111), düşük viskozitesi, esnekliği ve hareketliliği nedeni ile adeziv restoratif materyallerin içeriğinde sıklıkla bulunan (248) bu monomer, üretan zincirleri dolayısı ile sahip olduğu elastisite sonucunda yüksek sertliğe ulaşması ve artmış doldurucu içeriğine olanak sağlaması dolayısı ile Bis-GMA'ya alternatif olarak kullanılmaktadır (249). Sitotoksik etkisinin yanısıra, düşük konsantrasyonlarda çeşitli hücrelerde farklılaşmaya yol açtığı gözlenmiştir. TEGDMA ve HEMA'ya benzer şekilde UDMA, insan pulpa hücrelerinin odontoblast hücrelerine dönüşümüne neden olur (250). UDMA'nın ayrıca immün sistem hücrelerini aktive ettiği de bilinmektedir (251). Schweikl ve diğ., bazı örneklerinde DNA inhibisyon testi sonucunda Bis-GMA'ya bağlı DNA hasarı tesbit ettikleri çalışmalarında; insan lenfosit hücrelerinde genotoksik olduğu gözlenen UDMA (226) ve Bis-GMA'nın gen mutasyonuna etkisi olmadığını bildirmişlerdir (245). Dental materyallerden salınan UDMA'nın insan dişeti fibroblast hücrelerinde nekroz oluşturabilecek toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (252). Bir çok *in*

vitro çalışmada ise UDMA'nın hücre ölümüne neden olduğu fakat sitotoksik etki mekanizmasının tam olarak bilinmediği belirtilmektedir (253,254).

TEGDMA

286 g/mol moleküler ağırlığa sahip (111) TEGDMA , eter bağları sebebiyle esnek bir özelliğe sahip olması sonucunda aşırı visküz olan Bis-GMA ve UDMA'ya karşı viskoziteyi azaltmak için kullanılan dilüe edici bir monomerdur (104,124) . Rezin içerisine daha fazla doldurucu eklenmesine izin vererek, polimerize olan materyalin sertliğini arttıran bu monomerin insan fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, son yıllarda inceleme konusu olmuştur (245,255). Kompozit rezinlerde en fazla salım gösteren monomer olduğu belirtilen (232,256) TEGDMA'nın doza bağlı olarak memeli hücrelerinde mutajenik etki gösterdiği ve V79 (Chinese, Hamster akciğer hücreleri) hücrelerinde subtoksik konsantrasyonlarda kısmen mutajenik olduğu bildirilmiştir (232,257). Farklı çalışmalarda ise memeli hücre kültürlerinde gözlenen gen mutasyon frekansının TEGDMA ile 10 kat arttığı ve mikronükleus oluşumunun gözlemlendiği belirtilmiştir (226,258). TEGDMA'nın *Lactobacillus acidophilus* ve *Streptococcus sobrinus* gibi karyojenik mikroorganizmaların çoğalmasını arttırdığı da gözlenmiştir (232). HEMA ve TEGDMA'nın dentin tübüllerinden geçip pulpaya ulaşan konsantrasyonlarının toksik etki oluşturabilecek düzeyde olduğu vurgulanmıştır (259). İnsan lenfosit hücreleriyle gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise TEGDMA ve UDMA'nın DNA göçüne bağlı olarak genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (227).

HEMA

Hidrolize olduğunda metakrilik asit ve etilenglikol oluşumunun gözlemlendiği (260) 130 g/mol molekül ağırlığına sahip (111) HEMA, hidrofilik özelliğe sahip birçok adeziv sistem içinde, viskoziteyi azaltabilmek ve rezin materyalin dentine bağlanmasını arttırmak için kullanılan bir komonomerdur (6). Metakrilat esaslı monomerlerin, asit uygulaması sonrasında dentine penetrasyonunu ve diffüzyonunu arttıran (261) HEMA, su ve aseton içinde yüksek çözünürlüğe

sahiptir (66,70,261). HEMA, dentinin su içeriği nedeni ile dentin tübüllerinden diffüze olur ve kollajen lifler etrafındaki suyla yer değiştirir (70,261). Bu monomerin difüzyonunun, asit uygulanmış dokularda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (262,263). HEMA'nın, TEGDMA, Bis-GMA, UDMA gibi monomerlerle birlikte kullanıldığı durumlarda ise bütün karışım için yeterli hidrofilik özelliği sağlayarak bu moleküllerin difüzyonunu arttırdığı belirtilmiştir (264).

İnsan dişeti fibroblast hücrelerindeki mutajenik etkisinin (265) yanısıra lenfosit hücrelerinde DNA göçüne (20) ve apoptozise (266) sebep olan HEMA, hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında da sitotoksik etki göstermiştir (70,267-270). Farklı çalışmalarda ise HEMA'nın rezin modifiye cam iyonomer restoratiflerde ve poliasit modifiye kompozit rezinlerde direkt olarak su içerisine ve dentine salındığı ve (271) hastalarda pulpal cevabın oluşmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (70). Hücre ölümünü ve apoptozisini tetiklediği düşünülen (272) bu monomerin gen mutasyonuna sebep olmadığı (245), ancak yüksek konsantrasyonlarda kromozal bozukluklar oluşturduğu gözlenmiştir (258).

Falconi ve diğ. düşük konsantrasyonlarda HEMA'nın insan gingival fibroblast hücrelerindeki toksik etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında bu monomerin hücre ölümünde etken olmadığını fakat fibroblast hücrelerinin yüzey morfolojisinde modifikasyonlar, ve tip I kollajen miktarında azalma gibi hücre ölümünden sorumlu etkilere neden olduğunu göstermişlerdir (273).

Monomerler içinde daha düşük toksik etkiye sahip olan HEMA'nın konsantrasyonu artan dentin kalınlığı ile azalmaktadır. Birçok monomeri bünyesinde bulunduran sistemlerde HEMA içinde çözünebilen ya da HEMA ile birlikte taşınabilen diğer monomerlerin, sitotoksik etkiyi arttırabileceği bilinmektedir (70). Björkner ve diğ.'nin (274) HEMA içerikli olan metakrilatların domuzlarda alerjik reaksiyonları tetikleyici etkisi olduğunu ifade etmelerinin yanı sıra Katsuno ve diğ. (275) dentin primerlerin biyolojik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, HEMA içeren iki dentin primerin domuzlarda “gecikmiş aşırı duyarlılık” reaksiyonuna sebep olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada Bis-

GMA'nın HEMA'dan 100 kat daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (228).

BPA içeren BADGE ise dengeleyici bileşik olarak kullanılır (179). Farklı sistemlerdeki östrojenik etkisi bilinen bu monomerin, DNA ile temasa geçerek mutasyona sebep olduğu bildirilmiştir (225). V79 hücrelerinde DNA yapısının bozulması ile klastojenik aktiviteye sebep oldukları gösterilen (258) MMA'ya karşı oluşan alerjik reaksiyonlar ise birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (276,277).

Genel olarak önemli rezin monomerlerin sitotoksik etkilerine göre sıralaması yüksekten düşüğe doğru Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, HEMA ve MMA olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte rezin materyaller içinde en yüksek salımın TEGDMA için gözlemlendiği de bilinmektedir (278).

Reaksiyona Girmemiş Artık Monomer

Metakrilat esaslı kompozitler radikal zincir polimerizasyonu olarak adlandırılan, monomerlerin metakrilat kısımlarındaki çift bağlarının açılması ile karakterize reaksiyonlar sonucu polimerize olurken; siloranlarda epoksi zincirlerinin açılarak eter bağları oluşturduğu katyonik polimerizasyon gerçekleşir (111). Metakrilat esaslı kompozitlerde karbon çift bağlarının reaksiyona girerek polimer zincirinde yer aldığı polimerizasyon sürecinde; materyal içindeki reaksiyona girmemiş monomer miktarının reaksiyonun başlangıcına göre azalması, artmış viskozite sebebi ile monomerlerin hareketliliğini kaybederek polimerizasyon alanlarına difüzyonunun yavaşlamasına bağlı olarak monomer-polimer dönüşümü yavaşlamakta ve bir miktar monomer, reaksiyona katılamayıp “artık monomer” olarak kalabilmektedir (279). Karbon çift bağlarının ($C=C$) karbon tek bağlarına ($C-C$) dönüşme oranı konversiyon ya da polimerizasyon derecesi olarak adlandırılır (111,280). Konversiyon derecesinin; düşük olduğu durumlarda yüksek geçirgenlik (281) ve su emiliminin yanısıra (282) daha fazla monomer salımı söz konusudur (242,283). Bu nedenle konversiyon derecesinin yüksek olması gerekliliği vurgulanır (284). Farklı araştırmacılar tarafından monomer polimer dönüşümünün çift bağ oranı olarak adlandırılan (283) bu

tanımlamanın, materyalin monomer ve doldurucu içeriğine, ışığa duyarlı başlatıcıların ve inhibitörlerin tür ve oranlarına, ışığın dalga boyu, yoğunluğu ve uygulama süresine, ortam ısısına ve oksijen varlığı gibi birtakım faktörlere bağlı olduğu ifade edilmektedir (280). Klinik olarak adeziv sistemlerden ve kompozit rezinlerden salınan monomerlerin dentin dokusundan pulpaya ya da restorasyondan oral kaviteye ulaştığı bilinmektedir. Adeziv sistemler daha hidrofilik ve düşük moleküler ağırlıklı monomer içeriklerinden dolayı olası toksik etkileri bakımından rezin kompozitlerden daha çok önem verilmesi gerekli materyallerdir (283). Kaga ve diğ. çalışmalarında kullandıkları adeziv sistemlerden salınan monomer miktarının toplam adeziv ağırlığının %1,5-2,5'u olduğunu bildirmişlerdir (264). Rezin restoratif materyaller içindeki monomer-polimer dönüşümü miktarının (reaksiyona giren monomer çift bağlarının yüzdesi) Bis-GMA içeren materyallerde %55-75 (234) Bis-GMA ve TEGDMA içeren restoratiflerde %25-60, UDMA, TEGDMA ve Bis-GMA içeren materyallerde ise %60-70 olarak gözlenmiştir (285,286).

Oksijenle reaksiyona girmeye daha eğilimli olan serbest radikaller, oda sıcaklığında oksijenle birlikte reaktif olmayan peroksi radikalleri oluştururlar. Oksijene temas eden yüzeylerde polimerizasyon gerçekleşmemesi nedeni ile monomerler reaksiyona giremez. Polimerizasyonun oksijen tarafından inhibisyonu olarak bilinen bu olayda yüzeyde oluşan tabakaya oksijen inhibisyon tabakası adı verilmektedir (111,287). Polimerizasyon derecesinin, yüzeydeki bu oksijenle inhibe olmuş tabakada %35' e kadar düştüğü gözlenmiştir (288). Artık monomer salımının gerçekleştiği bilinen bu tabakanın uzaklaştırılmasının gerektiği düşünülmektedir. Monomer salımının bu tabakanın dışında, zamana bağlı olarak materyalin yüzeyinde ve içyapısında oluşan bozunmalar ile de gerçekleştiği bilinmektedir (289). Reaksiyona girmemiş artık monomer tanımının konversiyon derecesinden farklı olduğu ve monomerlerin rezin materyallerden çeşitli ekstrakt ortamlarında salınan miktarı olarak tanımlandığı bilinmektedir (111). Ferracane (288) konversiyon derecesi ile monomer salımı arasındaki ilişkiyi ekstrakt solüsyonu olarak su kullanıldığında daha düşük gözlemlerken, bu ilişkinin

etanol-su karışımı ile daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Matriks içinde dağılmış halde bulunan reaksiyona girmemiş artık monomer salımı, monomerlerin türü, büyüklüğü ve birbirleriyle kombinasyonu, materyalin yüzeyinde oluşan aşınmaların miktarı ve tükürük kompozisyonundaki farklılıklar gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (279). Yetersiz polimerizasyon, termal, mekanik ve kimyasal kaynaklara bağlı olarak gözlenen artık monomer salımı restoratif materyalin polimerizasyonunu izleyen ilk saatlerde başlar. Materyallerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar artık monomer miktarının azalması ile sonuçlanmasına rağmen tam bir başarı elde edilememiştir (290,291).

Adeziv materyal içindeki monomer kombinasyonları, bu materyallerin sitotoksik özellikleri üzerinde etkilidir. Bileşenler arasındaki ilişki (sinerjik veya antagonistik) adeziv materyallerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilebilir (292). Ratanashian ve diğ.'nin (31) 24 ve 72 saat sonunda dört monomer arasındaki TC 50 değerlerini Bis-GMA, UDMA, TEGDMA ve HEMA olarak sıralamasının yanısıra; 25 mol/L Bis-GMA'nın HEMA konsantrasyonundan bağımsız olarak sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir. HEMA, 4-META, ve TEGDMA gibi düşük moleküler ağırlığa sahip monomerlerin ise daha visköz olan Bis-GMA ve UDMA gibi monomerlere çözücü etkisi yaparak hücre ve dokularda diffüze olabilme etkinliklerini arttırdıkları belirtilmiştir (15).

Adeziv restoratif sistemlerden salınan monomerlerin dağılımı veya metabolizması hakkında literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte özellikle kolin esteraz olmak üzere esterazlar, inflamatuvar hücre enzimleri ve psödokolinesteraz (PCE) gibi tükürük esterazlarının; matriks bileşenlerini hidrolize ettiği bildirilmiştir (293-296). Bu materyallerin biyolojik olarak bozunması ile ilgili çalışmalar, *in vitro* olarak kolin esteraz enzimleri ile ya da hayvan deneylerinin uygulanması yoluyla yapılmıştır (111). Bu esterazlar, Bis-GMA'yı 2 molekül metakrilat kaybı ile BADPE-4OH'na dönüştürürken (297); TEGDMA trietilen glikol ve metakrilik asit'e bozunur (295). HEMA'nın ise asidik koşullarda hidrolize olarak etilen glikol ve metakrilat aside dönüştüğü gözlenmiştir (298).

Rezin modifiye cam iyonmer restoratif ekstraktında HEMA, etilen-glikol bileşikleri, kamforokinon ve özel bir başlatıcının [difenil iyot klorür (DPICl)] tesbit edildiğinin bildirilmesi dışında organik bileşenlerle ilgili literatürde çok fazla bulgu gözlenmemektedir (299). Bu materyallerden salınan HEMA'nın in vitro olarak dentinden diffüze olduğu gösterilmiştir (70,74).

Kromatografi

Reaksiyona girmeyerek polimerleşmeyen monomer miktarını belirlemede, çeşitli analitik metodlardan yararlanıldığı görülmektedir. Bu yöntemler arasında mikro raman spektroskopisi (*Micro-Raman Spectroscopy*) (283), diferansiyel tarama kalorimetrisi (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*) (300), FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) (301) spektroskopik metodları yer almakla beraber, esas olarak kromatografik yöntemlerden (10,302,303) yararlanılmaktadır.

Kromatografi, birbirine yakın özellikteki madde karışımlarını kalitatif ve kantitatif olarak ayırmak için kullanılan güçlü bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı, mobil faz) bir faz yardımıyla, sabit (durgun, stasyoner faz) [304] bir faz üzerinde değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır (304). Kromatografi terimi yunanca -kroma- (*colour-writig*) kelimesinden gelmektedir. Kromatografi ile ilgili ilk çalışma 1903 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada; Rus botanikçi Tswett kolon kromatografisinin temelini oluşturan bir denemede, 1-5 cm çapında ve 50-500 cm uzunluğunda cam silindirler içine doldurduğu tebeşir benzeri bir toz ile, yeşil bitki yaprağındaki klorofillerin renklerine göre ayırımını gerçekleştirmiştir. 1938 yılında İsmailov ve Shraiber isimli araştırmacılar kromatografik yöntemleri kullanarak ilk kez tıbbi bitki ekstraktlarının ayırım ve karakterizasyonu üzerinde araştırmalar yapmışlardır. 1940'lı yıllarda sıvı-sıvı kromatografisinin bir uygulama türü olan kağıt kromatografisinde ilerleme kaydedilmiş, destek görevi gören şerit şeklinde bir kağıt parçasının, sıvı sabit faz ile doyurulmasını takiben test materyalinin kağıda uygulanması ve mobil fazla sürüklenmesi sağlanmıştır. Aynı yıllarda kağıt

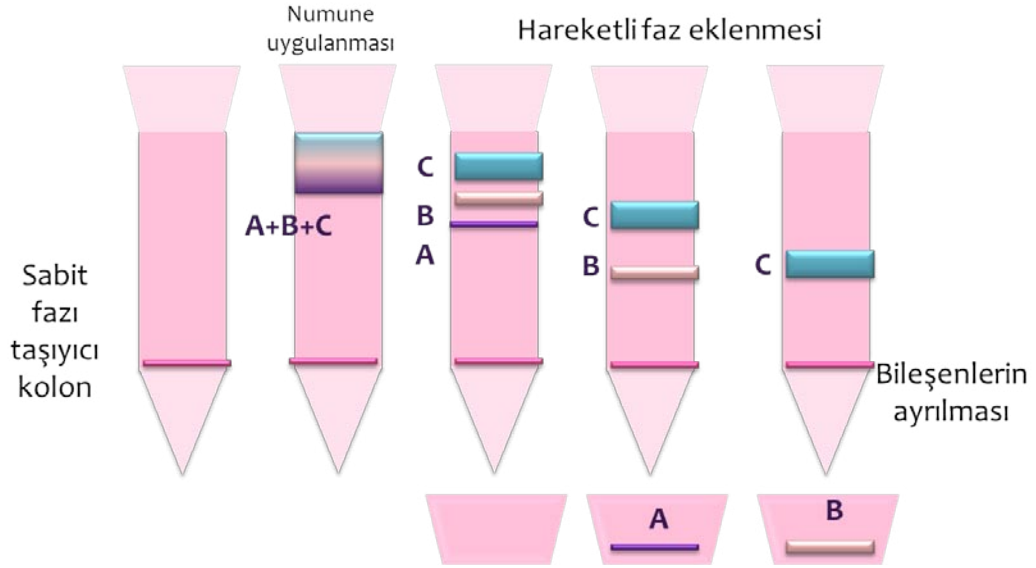
yerine ince bir silikanın sabit faz olarak kullanıldığı ince tabaka kromatografisi (*Thin Layer Chromatography*, TLC) geliştirilmiştir. Gaz kromatografisinin temelleri, 1957 yılında James ve Martin tarafından atılmış, gaz yerine sıvı kullanılarak yapılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ilk kez 1969'da uygulanmıştır. Bu konudaki çalışmalar, günümüzde daha modernize edilmiş halde devam etmektedir (304,305).

Kromatografi, ayrılma mekanizmalarına, sabit ve hareketli fazların yapısına göre, ayırma işleminin uygulanış şekline göre, uygulama biçimine göre çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. Ayrılma mekanizmalarına göre; adsorpsiyon, partiyon, iyon değiştirme, jel filtrasyonu, ve afinite kromatografisi olarak sınıflandırılan kromatografik yöntemler sabit ve hareketli fazların yapısına göre; sıvı-katı, sıvı-sıvı, gaz-katı, ve gaz-sıvı kromatografisi olarak ayrılmıştır. Bu kromatografik yöntemler ayrıca uygulama biçimine göre; düzlemsel kromatografi, kağıt, ince tabaka (TLC), kolon, gaz (GC) ve yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi (HPLC) olarak kategorize edilmiştir.

Kolon kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan maddelerin başlıcaları sakkaroz, inülin, talk, kalsiyum oksit, kalsiyum karbonat, magnezyum karbonat, magnezyum oksit, kireç, poliamit, silisilik asit (silikajel), magnezyum silikat (florisil), aliminyum oksit (alumina) dir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde bu katı fazlar silica, sentetik polimerler ve bazı polisakkarit yapılı bileşiklerden oluşmaktadır (305,306).

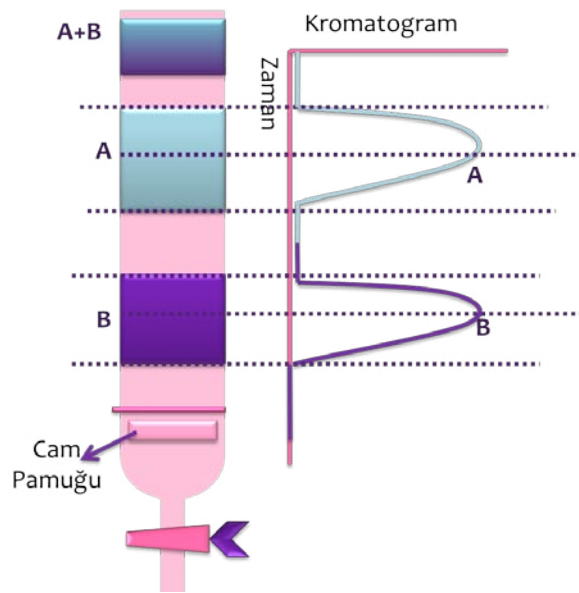
Kromatografide hareketli sıvı faz olarak, su dahil bütün organik çözücüler kullanılabilir. Kromatografik ayırımlarda bu çözücüler ayrı ayrı kullanılabileceği gibi, bazen bir çözücü yerine, çözücü karışımları kullanmak gerekebilir. Çözücü karışımlarında; birinin içinde diğerinin yüzdesi düzenli olarak artırılarak, karışımının polaritesi düzenli olarak değiştirilebilir. Kromatografik yöntemlerde temel olarak karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulması nedeniyle her bir bileşik sistemi farklı zamanlarda terk eder. Böylece bileşikleri birbirinden ayırmak, tanımak ve ayrı ayrı toplamak olasıdır. Hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasındaki fiziksel ve

kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Bundan dolayı kolon içinde ilerleyen maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan, en yavaş yol alırken sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde en hızlı yol alır (Şekil 2.3.1.).



Şekil 2.3.1. Kolon kromatografisi ile A, B ve C maddelerinin birbirinden ayrılması

Kromatografik yöntemlerde kolondan çıkan çözelti, içindeki maddelere duyarlı bir dedektöre gönderilirse sinyaller elde edilir. Sinyaller zamana karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen pikler serisine kromatogram denir. Bir kromatogramdaki pik sayısı numunedeki bileşen sayısı kadardır. Bir kromatogramdaki zaman üzerindeki pikin yeri onun hangi maddeye ait olduğunu belirlerken, kromatogramlarda pik altındaki alanın hesaplanması ile miktar tayinleri yapılabilmektedir (307) (Şekil 2.3.2).



Şekil 2.3.2. Kromatogram. Zamana karşı konsantrasyonun grafiklenmesi

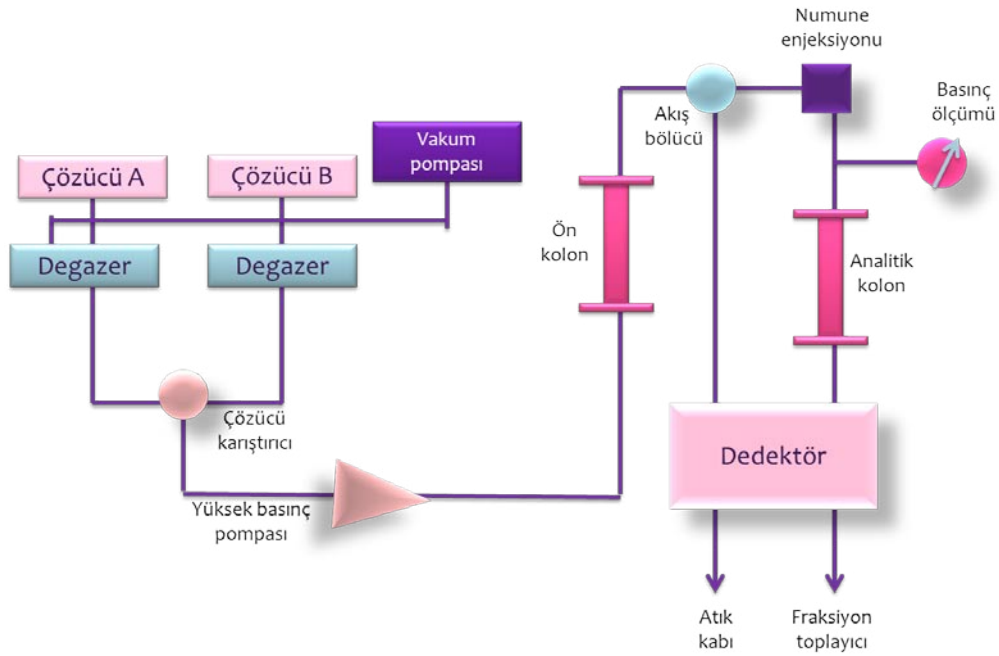
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)

Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografik sistemlerdir. Mobil fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği kromatografik sistemlere yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilir. HPLC biyolojik, farmasötik, gıda, çevresel ve endüstriyel örnekler içerisindeki organik ve inorganik maddelerin ayırımı, tanımlanması ve miktar tayinlerinde (308) ve özellikle yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Birçok rezin kompozit (288,309-311), rezin karışımları (10,312) ve ortodontik adezivlerden (313) salınan monomer miktarları HPLC ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemle yapılan değerlendirmeler aşağıdaki avantajları sağlamaktadır:

1. Kolon kromatografisi ile analiz saatlerce, günlerce sürebilir. HPLC ile en fazla yarım saat sürer.
2. HPLC ile oda ısısında çalışılabilir, bu durum yüksek ısıda bozulan bileşiklerin analizinde avantaj sağlar. Örneğin, yüksek ısı nedeniyle gaz kromatografisinde bozulan Bis-GMA ve UDMA gibi ağır monomerlerin analizi HPLC ile yapılabilmektedir (179).

3. Ön işlemleri çok azdır. Direkt olarak biyolojik materyal bile tatbik edilir.
4. Pek çok polar bileşik türevine geçmeden tatbik edilebilir. Her türlü yapıda kimyasal maddelerle çalışılabilir.
5. Hem kalitatif hem kantitatif analiz aynı anda yapılabilir.
6. Tekrarlanabilir bir yöntemdir. Otomatik enjeksiyon sayesinde onlarca analiz hiçbir operatöre gerek kalmaksızın yapılabilir.

HPLC sistemi; bir bilgisayar ile kontrol edilen oto örnekleyici (autosampler) ve enjektör, çözücü (Mobil faz) haznesi ve degazeri, pompa (çözücü dağıtıcı sistem), ön kolon ve analitik kolon, dedektör, kaydedici olmak üzere altı kısımdan oluşur (Şekil 2.3.3) (314).



Şekil 2.3.3. Bir HPLC cihazının temel bileşenleri

Analizi yapılacak örneklerin kolona otomatik enjeksiyonunun sağlandığı oto örnekleyici ile, analizde kullanılan çözücü kolon içine sabit bir basınç ve akış hızı ile pompalanır. HPLC analizlerinde dolgu materyalini taşıyan kolonlar, paslanmaz çeliktir. 2-5 mm çapında, 10-100 cm arasında değişen boyutlara sahiptir. Dolgu materyali yani stasyoner faz, sistemin performansını büyük ölçüde etkileyen faktördür. Analizin başarısı, büyük ölçüde doğru kolon seçilmesiyle orantılıdır. Kolonların sınırlı olan ömürleri, kullanan kişinin bilgisine ve kullanımına

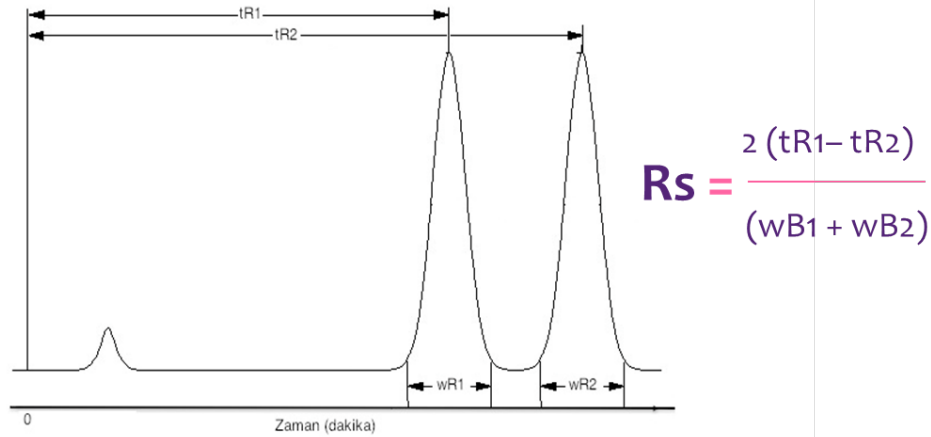
bağlıdır. Kolonun ömrü bittiğinde; sistemde yüksek bir geri basınç gözlenir, rezolüsyon zayıflar pikler yayvanlaşır, kısalan veya yokolan retansiyonla seyreden düşük kapasite gözlenir. Kolonun ömrünü uzatan somut faktörlerden biri, kolonla enjektör arasına ömrü uzatmak amacıyla önkolon denilen ufak bir kolonun konmasıdır.

Sabit (stasyoner) fazın üç karakteristiği önemlidir. Partikül büyüklüklerine göre çapı 35-125 μ olanlar büyük partiküllü iken küçük partiküllerde ise 5-10 μ 'dur. Bunun la birlikte, son geliştirilen 2-3 μ 'luk kolonlar da söz konusudur. Partiküller, preparatif amaçla kullanılan porlu ve analitik amaçla kullanılan peliküler olmak üzere iki ana yapıdadır. Partikül çapı küçük, porlu yapılar hem analitik hem de preparatif amaçla kullanılabilir. Tüm bunlara ek olarak, HPLC ile analiz yapabilmek için maddenin belirli bir solvanda çözünmüş olması; maddenin belli polar veya nonpolar karakterleri taşıması gerekir. Uygun stasyoner fazın seçimi molekülün polarite özelliğine bakılarak yapılır. HPLC analizleri, polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip mobil faz ile yapılırsa normal faz (örn: siyano, aminoalkil silan türevleri), apolar sabit faz, polar mobil faz ile yapılırsa ters faz (örn: alkil silan türevleri) sıvı kromatografisi adını alır ve genellikle ters faz sıvı kromatografik analizleri yapılmaktadır. Bu analizlerde uzunluğu 10-25 cm bu kolonlarda, sabit faz olarak, ters faz 5-10 μ m makroporöz alkil silika (C8 ve C18) dolgu materyalleri seçilmektedir.

Sıvı kromatografisi için sabit fazı değiştirmek zor ve kısıtlıdır. Bu nedenle retansiyon ve selektivite mobil fazın terkbini değiştirmek suretiyle ayarlanır. Mobil faz; elüsyon sırasında mobil fazın terkbinin değişmediği izokratik sistem ve çözücü karışımlarının tercih edilmesi ile birlikte mobil fazın terkbinin değiştiği iki sistemden oluşturulabilir.

Mobil fazda çözünen moleküller sabit fazla farklı derecelerde etkileşmelerine bağlı olarak, farklı sürelerde kolonu terk ederler [314]. Sabit faza afinitesi en fazla olan en geç gelir. Kolonun uzunluğu arttıkça bantlar genişler, kolon çok kısa olursa maddeler iyi ayırlamaz. İyi bir ayırım için bantlar birbirinden tamamen uzak, homojen olmalıdır. Rezolüsyon ayırımın bir ifadesidir. İki komşu

pikin orta noktalarının uzaklığının, iki pikin genişliğinin ortalamasına bölünerek elde edilir (Şekil 2.3.4.)



Şekil 2.3.4. HPLC kromatogramlarında rezolüsyon ve hesaplanması için kullanılan formül

t_{R1} , t_{R2} : pikin alıkonma süresi ; w_{B1} , w_{B2} : band genişliği

Dedektörler, kolonu terkeden ayırımı yapılan materyale ait bileşenlerin ve bu bileşenlere ait miktarı tayin eden HPLC donanımdır. HPLC analizlerinde fotometrik dedektörler (UV, görünür bölge, IR spektrofotometreleri), floresan, elektrokimyasal, refraktometrik, radyoaktivite, elektron yakalayıcı dedektörler ve kütle (mass) spektrometreleri kullanılmaktadır (315). HPLC cihazlarının çoğunda optik ölçüme dayalı dedektörler bulunmaktadır. Bunların bazıları iki boyutlu veri sağlarken, floresans, diyot dizi (diode array dedector, DAD) ve UV-Vis dedektörleri üç boyutlu veri sağlamaktadır. Üç boyutlu veriler, sadece sinyal kuvvetini içermezler aynı zamanda tüm zamanlar için spektral veriler ortaya koymaktadır. Aynı zamanda kütle spektrometreleri ile de üç boyutlu veriler elde edilmektedir. Son yıllarda gelişen teknolojilere bağlı olarak moleküler kütle, yapı, nicelik ve saflık gibi çeşitli bilgiler sağlayan kütle spektral veriler elde edilmesini sağlar. Kütle spektral veriler, nitel ve nicel analiz sonuçlarındaki spesifikliği ve güveni artırmaktadır. Birçok bileşik için kütle spektrometri (MS) diğer HPLC dedektörlerine göre daha duyarlı ve spesifiktir. Kütle dedektörü ile kromofor özellik göstermeyen bileşiklerin de analizi yapılabilmektedir. Aynı zamanda

çözünürlüğü kötü olan kromatografik piklerin de tanımlanmasına olanak sağlar. Böylece mükemmel olmayan kromatografik bir çalışmanın bile yorumlanmasına yardımcı olur (305,316).

Dental Materyallerin Biyouyumluluk Değerlendirmeleri

Materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri, istenmeyen doku reaksiyonlarının çeşitlilik göstermesi nedeni ile karmaşık ve kapsamlı bir alandır. Yapılan tek bir testle bir materyalin oluşturabileceği çok farklı olası reaksiyon içinden sadece biri değerlendirilmiş olur. Örneğin uygulanan pulpa/dentin testleri ile materyalin pulpaya etkisi değerlendirilirken; bu testler, materyalin oluşturabileceği alerjik etki ile ilgili bilgi sağlamaz. Bununla birlikte tek başına uygulanan test yöntemleri genellikle sadece belirli bir reaksiyonu tek açıdan değerlendirmede yeterlidir. Bu durum hücre kültürü testlerinin bir materyalin sadece izole hücreler üzerinde olan etkisini saptaması ile örneklenebilir (111). Bir materyalin biyolojik uyumluluğunun saptanmasında en temel ve sıklıkla tercih edilen yöntem hücre kültürü ile uygulanan basit *in vitro* testlerdir. Bu deneyler sonucunda materyalin başarılı cevap vermesi ile daha karmaşık olan hayvan ve kullanım testleri (*in vivo* testler) uygulanabilir. Klinik çalışmalar ise bu saptamadaki son basamaktır (111,228).

Biyoyumluluk değerlendirilmesinde en önemli aşama uygun test yönteminin seçilmesidir (15,317,318). Kolay kontrol edilebilir, tekrarlanabilir, etkili, güvenilir ve materyallerin temel özelliklerini değerlendirmek için uygun olmaları *in vitro* sitotoksikite testlerinin avantajları arasında kabul edilirken (319); yapılan değerlendirmelerin biyolojik reaksiyonların *in vivo* sistem mekanizmasından bağımsız olması ve uygulanan test yöntemleri için her test sürecinde benzer sonuçlara ulaşılacak standartlar geliştirilmesi gerekliliği bu test sistemlerinin dezavantajlarıdır. Biyolojik uyum standartlarının belirlenmesi ile diş hekimliğinde izlenen teknik ilerlemelerin farklı hızda gerçekleşmesi; hücresel ve moleküler biyolojideki hızlı ilerlemeler, materyalin biyouyumluluğunu belirleyecek çok çeşitli testlerin varlığı, bu testlerin standardize edilememesi sonucunu doğurur (15). Bu

amaçla, 1982 yılında Uluslararası Diş hekimliği Birliği (FDI), Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu “*International organization for Standardization*” (ISO) ve Amerikan Diş hekimleri Birliği [*American Dental Association (ADA)*] tarafından ortak görüş ile yayınlanan klavuzda; biyolojik testler öncül, ikincil testler ve kullanım testleri olarak üç grupta sınıflandırılmıştır (15,22,318,320). Schmalz (111) biyoyumluluk değerlendirilmesinde uygulanacak test yöntemlerinin seçimini aşağıdaki tablo ile özetlemiştir.

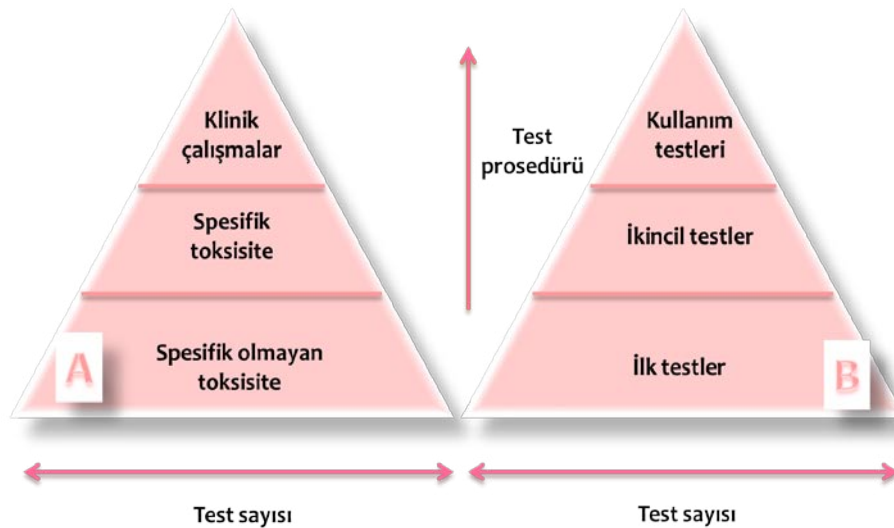
Tablo 2.1. Biyoyumluluk değerlendirmelerinde uygulanan test yöntemleri (111)

	Sistemik Reaksiyonlar	Lokal Reaksiyonlar	Alerjik Reaksiyonlar	Diğer Reaksiyonlar
İn Vitro	Hücre kültürü testleri Spesifik problemler için kullanılır.	Hücre Kültürü Testleri - Agar Üstü Testler *MTT Test - Dentin-bariyer Testi	Hücre kültürü modelleri geliştirilmektedir	Mutajenite - Ames Testi - Mikronükleus Testi - HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase)Test - Fare Lemfoma Testi
Hayvan Deneyleri	- Akut LD₅₀ (Oral Uygulamalar) - Kronik LD₅₀ (Oral Uygulamalar)	- İmplantasyon Testleri - Kullanım Testleri - Pulpa/Dentin Testleri - Endodontik Testler - İmplantasyon Testleri	- Modifikasyonlu Maksimizasyon Testi - Lokal Lenf Nodu Testi	- Mikronükleus test (kemirgen) - Teratojenite (kemirgen) - Üreme üzerindeki toksisite (kemirgen)
Hasta	← Klinik Çalışmalar →			
Diğer	← Mesleki Temas, Zehirlenme ^a →			

^a gerçek bir test yöntemi olmamakla birlikte değerlendirme için yardımcıdır.

Araştırmacılar, endüstri ve sağlık kuruluşları, yeni bir materyalin biyoyumluluğunun saptanmasında en kesin ve etkili yolun *in vitro*, hayvan ve kullanım testlerinin kombine uygulanması sonucu elde edildiği sonucuna varmışlardır. Bu sonuç doğrultusunda ise tek başına uygulanan bir test yönteminin bir materyalin biyoyumluluğu hakkında yeterli olmadığı görüşü yaygınlık kazanmıştır. Testlerin kombine uygulanması yaklaşımında ilk olarak (Şekil 2.3.5 A) tabanda tüm materyallerin değerlendirilmelerinin yapıldığı ve seçildiği piramit test protokolünden yararlanılmıştır. Spesifik olmayan toksisite

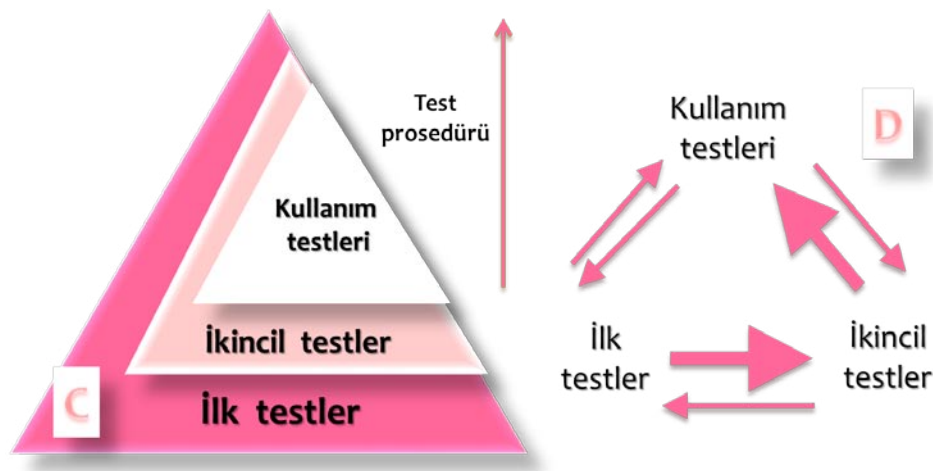
testleri olarak adlandırılan bu testlerin materyalin kullanımını yansıtmaya zorunluluğu bulunmamaktadır. Sonraki basamakta uygulanan spesifik toksisite testleri materyalin uygulanma şekline daha benzer testleri içerir. Piramitteki en üst katman ise klinik çalışmalarca oluşturulur. Sonrasında oluşturulan farklı bir test protokolü piramidinde (Şekil 2.3.5 B) ise tabandan tavana doğru basamaklar ilk testler, ikincil testler ve kullanım testleri olarak kategorize edilmiş, hayvanlarda uygulanan kullanım testleri de eklenmiştir. Test protokollerinin standardize edilmesinde oluşturulan bu piramitlerde ancak ilk basamağı geçebilen materyaller, ikinci basamakta uygulanan test protokolleri ile muamele edilirler ve sonrasında klinik çalışmalarda test edilebilirler. Bu nedenle klinik çalışmalara ancak daha güvenilir materyallerle erişilmiş olunur. Klinik çalışmaların çok zaman alıcı ve pahalı yöntemler olması nedeni ile bu piramit stratejileri kabul görmüştür. Bununla birlikte, sadece basamaklardan geçebilen materyallerin klinik kullanımının kabul edilmesi ve uygulanan birçok test yöntemi ile materyal etkileri hakkında çok yönlü bilgi sahibi olunması bu piramitlerin kabul görmesindeki etkenlerdir.



Şekil 2.3.5. Piramit test protokolleri (228)

Bu stratejilerin günümüzde geçerliliğini koruması ile birlikte, *in vitro* ve hayvan testlerinin materyallerin etkilerini yansıtmada gözlenen uyumsuzluklar

farklı test protokol şemalarının geliştirilmesine sebep olmuştur (Şekil 2.3.6.). Oluşturulmuş iki yeni şema da farklı önemli fikirler öne sürmektedir. İlk olarak (Şekil 2.3.6 C) tüm testlerin biyouyumluluk değerlendirmelerinde önem taşıdığı görüşü ortaya atılmıştır. Bu görüşe örnek olarak ise hayvan testlerinin bir materyalin değerlendirilmesinde önemli olduğu gibi materyal kullanıma sunulduktan sonra ortaya çıkabilecek herhangi bir yan etki sonrasında dikkate alınabilecek bir sonuç verdiği sayılabilir. İkinci olarak (Şekil 2.3.6 D) güncel test yöntemlerinin, materyalin biyouyumluluğunu kesin ve uygun olarak yansıtamayabildiğinin farkındalığı sağlanmıştır. Ayrıca bu felsefe ile biyouyumluluğun devam eden (birbirini izleyen) bir protokol olmadığı görüşü hakimiyet kazanmıştır. Şüphesiz ki kullanıma sunulan farklı materyaller ve yeni test teknolojilerinin gelişmesi, farklı test kombinasyon protokollerinin geliştirilmesine neden olacaktır (228).



Şekil 2.3.6. Test protokol şemaları (228)

Dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri; materyallerin sistemik toksisitelerinin değerlendirilmesi çalışmaları, lokal toksisitenin değerlendirilmesi, mutajenite testleri ve teratojenik etkiler ve üreme üzerine etkilerin değerlendirilmesi, implantasyon testleri, pulpa hasarı ve pulpa/dentin testleri, mukozal hasar ve mukozal kullanım testleri, periapikal hasar ve endodontik kullanım testleri, kemik içi implantasyon testleri, allerjik özelliklerin

değerlendirilmesi, klinik çalışmalar ve hastalarda uygulanan tanımlayıcı testler olarak gruplandırılmıştır (111).

2.3.2. Biyouyumluluğun Belirlenmesinde Toksisite Değerlendirmeleri

Sistemik Toksisitenin Değerlendirilmesi

Bir materyalin toksisitesi kimyasal olarak biyolojik bir sisteme verdiği hasar olarak tanımlanır. Materyalin uygulandığı alanla sınırlı reaksiyon lokal toksisite olarak adlandırılırken bu alanın dışında da gözlenen reaksiyonlar sistemik toksisiteyi gösterir. Sistemik toksisitenin değerlendirilmesinde genellikle deney hayvanları tercih edilir. Diş hekimliğinde materyaller deneklere oral yolla uygulanır (deney hayvanının materyalin ekstraktı veya toz hali ile beslenmesi) ve akut LD₅₀ saptanır. LD₅₀ deney popülasyonunun %50'sinin ölümüne yol açan doz olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde daha tedbirli olan ve limit-testler olarak adlandırılan testler uygulanmaktadır. Bu testlerde uygulanan standardize konsantrasyon LD₅₀ için yeterli ise farklı testlerin gerekliliği ortadan kalkar. Kronik toksisite değerlendirmesi için ekstrakt veya materyalin uzun süre (birkaç ay) uygulanması gereklidir. Bu süre bazen deney hayvanlarının tüm hayatını kapsayabilir. Deney sonunda hayvanların canlı kalma oranları ya da temel organlarında gerçekleşen histopatolojik etkiler değerlendirilir. Bu test yöntemlerinin yanı sıra kronik toksisitenin değerlendirilmesinde mesleki temasın göz önünde bulundurulması veya yaralanmalar dikkate alınır. Amalgam dışında dental materyallerin kronik temasına bağlı oluşan kronik toksisite ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır (111).

Lokal Toksisitenin Değerlendirilmesi

Toksik bir materyalin ilişkili olduğu biyolojik yapı üzerindeki kimyasal etkisi olarak tanımlanan lokal toksisite, lokal doku uyumluluğu ile karıştırılmaması gereken bir kavramdır. Doku uyumluluğu ise materyal toksisitesinin yanı sıra restorasyon sebebi ile gözlenen bakteri invazyonu ve/veya otopolimerize rezinin

sertleşmesi sırasında oluşan ısı ile de ilişkilidir. Materyallerin lokal toksik etkileri çok çeşitli testlerle saptanabilir. Uygulanan basit test yöntemleri (hücre kültürü, implantasyon testi) hedef dokuyu tam olarak yansıtmadığı için materyalin spesifik olmayan toksisitesini belirtirler. Sonrasında ise deney materyallerinin hayvanlarda veya nadir olarak insanlar üzerinde değerlendirildiği kullanım testleri tercih edilir (111).

***In vitro* hücre kültürü çalışmaları**

Hücre ve doku yaralanmalarının dejeneratif (*reversible*) ve nekrotik (*irreversible*) aşamalarında spesifik olayları inceleyen *in vitro* testlerden (288) biyouyumluluk testlerinde; vücut dokuları üzerine veya içine uygulanan materyallere karşı oluşacak biyolojik reaksiyon, uygun test ortamında oluşturulmaktadır (15). Bu test sistemleri canlı organizma dışında, test tüpü veya hücre kültüründe gerçekleştirilir ve test materyalinin hücre, enzim veya farklı bir izole sistemle temasını gerektirir. Bu temas ise direkt bir bariyer kullanılarak ya da indirekt olarak gerçekleştirilir (228). Materyale maruz kalan hücrelerin sayısı, gelişim hızı, çeşitli metabolik veya hücresel fonksiyonları ölçülür. Bu testler, tekrarlanabilen, çabuk sonuç alınan, uygulaması daha kolay testlerdir (16-18) ve hayvan ve insan çalışmalarının etik sorunlarını elimine ederler. *In vitro* sitotoksikite testleri günümüzde de dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmakta (74) ve materyal bileşenlerinin hücre sistemi üzerindeki etkilerini bulmaya olanak tanımaktadır (18,321-323).

Gerçek akut kimyasal toksisitenin belirlenmesi ağız içinde polimerize edilen restoratif materyallerin, test hücreleri ya da dokuları ile herhangi bir immünolojik etkileşim olmadan temasının sağlandığı hücre kültürü test yöntemlerinin kullanılması ile mümkün olmaktadır (317). Kawahara ve diğ. (324) hücrelerin kullanıldığı *in vitro* test yöntemlerinin kontrol edilebilir olduğunu ve yüksek değerlerde istatistiksel bilgi verdiğini bildirerek klinik kullanımdan önce dental malzemelerin analitik-biyolojik cevaplarının *in vitro* çalışmalarla belirlenmesi gerekliliğini vurgulamışlardır.

Hücre kültürü:

Üretici firmaların kullanıma sundukları materyallerle ilgili bulguları genellikle hücre kültürü testlerine dayanır. Hücre kültürü bir dokudan, kendiliğinden göç, mekanik ve enzimatik yöntemlerle ayrılmış, *in vitro* şartlarda yaşatılan ve üretilen tek tip hücre topluluğudur. Canlı dokuların vücut ısısında kültüre edilmesi ve vücudun özgün fizyolojik konumunu taklit eden ve hayvan embriyo ekstraktları, plazma, serum, amino asit, mineraller, şeker, tuz, vitamin ve antibiyotikleri içeren besleyici sıvılarda çoğaltılması sonucunda elde edilirler. Canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretilmesini ve gelişimini ifade ederler (22,320). Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri, primer hücre kültürleri, hücre hatları ve diploid hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanır (325). Bir organizmanın dokularından doğrudan alınarak, *in vitro* hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan kültürler “primer kültür” olarak adlandırılır (228,326,327). Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içeren bu hücrelerin deneysel çoğalmaları sınırlıdır. Primer hücre kültürlerinin ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınması ise subkültür olarak adlandırılır (22,320). Primer hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen “sekonder kültür” asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmaya devam eder. Kültürlerin genellikle dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonları ile yapılmasına rağmen çoğu doku hücreleri, süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu olmadıkları için bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Bu yüzeyler; genel olarak kolay temizlenebilir olması, maliyetinin ucuz olması, büyümeyi destekleyici ek maddeler gerektirmemesi ve sterilizasyonunun da kolay olması nedeniyle kullanılan cam veya optik özellikleri ve düzgün yüzeylere sahip oluşları nedeniyle tercih edilen tek kullanımlık plastik malzemeden yapılmıştır (326). Hücre hatları, subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir (327,328). Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilen diploid hücre kültürlerinde bulunan bütün hücreler alındıkları dokunun

karyotipini %85 oranında korurlar. L929 ve Balb3T3 hücre hatları; dental malzemelerin sitotoksikite testlerinde standart olarak kullanılan fibroblast hücre kültürleridir (22,320,329).

Önceleri, sitotoksik etkiler, materyallerin tek tabakalı (monolayer) kültür ile elde edilen hücreler üzerine direkt temas ettirilmesi sonucu, hücre sayımı ile değerlendirilmiştir. Günümüzde kolay üretilmeleri ve bilinen özelliklere sahip olmaları nedeni ile hücre hatları tercih edilmektedir. Sıklıkla fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitel hücreleri (HeLa) tercih edilir. Bunun dışında gingival veya pulpal fibroblastlar gibi hedef dokulardan elde edilen primer hücre kültürleri de kullanılmaktadır (111). Hücreler in vivo koşulları simüle etmek için üç-boyutlu olarak çoğaltılabilirler (111,330).

Hücre kültürleri, uygulamaların standart şartlarda tekrarlanabilir olması, kısa süreli etkileşimlerin incelenmesinde kullanışlı olmaları, hücreler üzerindeki etkilerin direkt olarak gözlenerek standart ölçümlerin yapılabilmesi, hücrelerin pH, ısı, ozmotik basınç, nem, oksijen ve karbondioksit miktarının standart olduğu ve kontrol edilebildiği bir ortamda saklanabilmesi ve endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptirler. Dezavantajları ise primer kültür ile işleme başladıktan sonra birbirini takip eden pasajlarda hücrelerin farklılaşabilmesi, primer kültürlerin elde edildiği doku ve bulunduğu koşulların hücre kültürlerini etkileyebilmesi, pahalı olması, sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik incelemenin uzmanlık gerektirmesi olarak sayılabilir (326).

Hücre kültürü işlemlerinde, hayvansal hücreler ile bakteri ve mantarların meydana getirdiği kontaminasyonların risk oluşturması nedeni ile aseptik koşulların çok iyi sağlanması zorunludur. Bu nedenle, kullanılan malzemeler kadar temizlik ve sterilizasyon açısından önem taşıyan hücre kültürü laboratuvarında bulunması gereken cihazlar; laminar flow kabin, inkübatör, sterilizatör, buzdolabı (+4°C), derin dondurucu (-20°C ve -80°C), faz kontrast ve floresan mikroskoplar, yıkama düzeneği, masa santrifüjü, sıvı azot tankı, manyetik karıştırıcılar, CO₂'li etüv ve pH metredir (331,332).

Hücre üremesi için uygun ortamın oluşturulmasında başlangıçta toz halinde olup kullanıcı tarafından hazırlanabilen hücre kültürü vasatlarının yanısıra, sıvı hücre kültürü vasatlarından da yararlanılır. Sıvı hücre kültürü vasatları daha güvenilir olması nedeniyle daha çok tercih edilir. pH ve ozmolarite gibi fizikokimyasal şartların devamlılığının, hücre ve hücre ürünlerinin sentezi için gerekli besinlerin sağlanması ve hücrelerin yapısal ve metabolik aktivitelerini yerine getirmeleri için gerekli maddelerin oluşturulması hücre üretme vasatlarının fonksiyonları olarak kabul edilir. Vasatların bileşiminde; dengelenmiş tuz çözeltileri (BSS), enerji kaynakları, aminoasitler, vitaminler, gazlar, iz elementler, organik tampon çözeltileri, bakteri üremesini önlemek için antibiyotikler, su, serum (%10) ve nükleik asit sentezini teşvik edici maddeler bulunur (332).

Hücre Kültür Yöntemleri

Değişik dokular kullanılsa da primer kültür yöntemleri temelde aynıdır. İdeal olarak dokuların, hemen kullanılması gereklidir; kullanılmadığı durumlarda ise, genellikle 1–2 gün boyunca canlılığını sürdürebildiği dengeli tuz çözeltilerinin kullanıldığı taşıma solüsyonları içinde 4–8 °C’de saklanabilir. Hücre kültürü işlemleri kullanım öncesinde UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla steril edilmesi gereken laminar flow kabinlerinde uygulanır . Hücreler yaklaşık olarak %5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden yararlanılır ve günlük olarak kontrol edilmesi gereken hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu dikkate alınmalıdır.

Primer kültürden sonra, pasajlama ile *hücre hattı* olarak tanımlanan alt kültür elde edilir. Hücre yoğunluğunun artması nedeni ile ortam pH’sı düşer, besin maddeleri azalır ve artık ürün miktarı artar. Bu nedenle hücreler daha büyük bir hacime alınarak yoğunluklarının azaltılması için pasajlama yapılır. Pasajlama için, bir yüzeye tutunmuş olarak üreyen hücrelerin, yüzeyden kaldırılarak yeni bir yüzeyde üremeleri sağlanır (332). Hücrelerin kültür kabından alınmaları için bir spatül kullanarak hücrelerin yüzeyden fiziksel olarak ayrıldığı mekanik yöntem

veya tripsin, kollajenaz ya da pronaz gibi proteolitik enzimlerin genellikle etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile kombine edilerek ya da tek başına EDTA kullanılmasının hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olduğu farklı yöntemler kullanılabilir. Mekanik yöntem, hızlı bir yöntem olmakla birlikte hücrelerin zarar görmesi olasılıkları nedeni ile hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda tercih edilir. Enzimlerin kullanıldığı yöntem, hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilecek etkiye sahip proteolitik reaksiyon, ortama serum içeren tam kültür vasatının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir (331). Hücre vasatının uzaklaştırılmasının ardından bir seri yıkama işlemi yapılır ve hücrelerin üzerine bir miktar tripsin eklenerek belli bir süre etüvde bekletilir. Tripsin etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra vasat ile süspanse edilerek yeni bir kültür kabında inkübasyona bırakılırlar.

Kültür kapları, CO₂ etüvüne (37°C, %5 CO₂) gaz giriş çıkışının sağlanması için hafif açık bırakılarak saklanmalıdır. Nemli ve görünür ışıktan korunan bir ortamda pasajlanan hücrelerin vasatları, iki pasaj arasında geçen süre en az üç gün olacak şekilde iki günde bir değiştirilir. Toplam ve canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılan protokole göre, seyreltik hazırlanan süspansiyondan hemositometre lamının her dış köşesindeki karelere birer damla damlatılır. Dört dış karedeki hücreler, ışık mikroskobu altında sayılır ve her bir karedeki ortalama sayıyı belirlemek için dörde bölünür. Bu sonuç, hücre sayısı $\times 10^4$ olarak ifade edilir. Bu sayı seyreltme faktörü ile çarpılarak mililitredeki süspansiyon başına düşen hücre sayısı elde edilir. Canlı hücreleri belirleme yöntemlerinden bazıları, çeşitli boya ile ölü hücrelerin boyanması temeline dayanır. Böylece ölü ve canlı hücrelerin oranı bulunur. Tripan mavisi canlı hücreleri belirlemek için yararlanılan boyalardan biridir (327).

Günümüzde biyomateryallerin sitotoksitelerinin belirlenmesinde test edilen materyal ile kullanılan hücre hattının teması açısından direkt kontakt, indirekt kontakt ve ekstrakt (özüt) testleri olmak üzere üç farklı in vitro test yöntemi kullanılmaktadır (16).

Direkt kontakt testleri

Sıvı ve katı materyaller için uygun olan bu yöntemde katı materyaller belirlenen miktarlarda hazırlandıktan sonra direkt olarak daha önceden hazırlanmış kültür kaplarına ekilmiş olan hücreler üzerine yerleştirilir ya da hücreler, kültür kabı tabanına yerleştirilen materyal üzerine ekilir (320). Sıvı materyaller ise test edilecek konsantrasyonlarda sulandırılarak daha önceden kültüre edilmiş olan hücreler üzerine uygulanır (333,334).

İndirekt kontakt testleri (Bariyer yöntemi)

In vivo koşullara benzerliğin amaçlandığı bu yöntemde hücreler ve test edilecek materyal arasında bir bariyer bulunmaktadır. Sıklıkla kullanılan bariyerler keratinize epitel, dentin veya ekstrasellüler matriksten elde edilebilir (228). Test edilecek materyalin belirlenen miktarda hazırlanıp bariyerler üzerine yerleştirilmesi ve belirlenen süre sonunda herhangi bir test yöntemi ile materyallerin hücre aktiviteleri üzerine olan etkilerinin saptanması hedeflenmiştir (320). Bu test sistemlerine örnek olarak gösterilebilecek agarüstü test, agar ya da agarozun nötral kırmızısı gibi vital boyalarla kombine olarak kullanılıp bariyer elde edilmesi ile karakterizedir ve direkt kontakt testleri ve tavşanlardaki kas içi implantasyon testler ile benzer sonuçlar vermektedir. Başka bir test yöntemi ise selüloz esterinden elde edilen filtrelerin kullanıldığı milipor filtre test yöntemidir. Bu yöntem MTT testi ile kombine olarak uygulanabilir. Farklı bir test sistemi örneği olarak dentin bariyer testi de kabul edilebilir (228).

Dentin dokusu üzerine uygulanan materyallerin fiziksel ve biyolojik özelliklerini modifiye ederek değiştirebilme gücüne sahip olması nedeni ile, direkt temas yönteminin etkinliği üzerine şüpheler duyulmuştur. Bu amaçla uygulanan, üç boyutlu pulpal fibroblast hücrelerinin tercih edildiği, hedef hücre ve materyal arasına diş dokusunu simüle etmek için dentin diskinin yerleştirilmesi ile karakterize dentin-bariyer testleri ise güncel uygulamalar arasındadır. Hücre kültürü, haftalarca canlı tutulabilmek için besi ortamı ile muamele edilir (111). Adeziv sistemlerin dentin bariyeri kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirildiği bir

çalışmada, hedef hücreye ulaşan toksik materyallerin etkin konsantrasyonlarının azaldığı belirtilmiştir (289). Bununla birlikte HEMA ve TEGDMA gibi hidrofilik monomerlerin özellikle dentin bariyeri ince (1 mm) olduğu durumlarda diffüze olduğu da kanıtlanmıştır (70,74) . Bu monomerlerin diffüze olan miktarlarının *in vivo* olarak pulpa hücrelerinde toksik etki oluşturabilecek düzeyde olduğu da vurgulanmıştır (74).

Ekstrakt testleri (Ekstraksiyon yöntemi)

Adeziv restoratif materyallerin belirlenen boyutlarda hazırlanarak hücre besiyerinde belirlenen sürelerde %5 CO₂ içeren nemli etüvde 37°C 'de bekletilmesi ile ekstrakt elde edilir ve bu materyallerin içindeki tam olarak polimerize olmayan monomerlerin besiyerine salınması sağlanmış olur. Ekstraktların elde edilmesinde hidrofilik (saline solüsyonu) ve lipofilik [dimetilsülfoksit (DMSO)] sıvılar veya etanol-su gibi karışımlar kullanılır (111,288,335). Bekleme sürelerinin sonunda elde edilen ekstraktlar hücreler üzerine uygulanır ve belirlenen sürelerde %5 CO₂ içeren nemli etüvde 37 °C'de bekletilmelerinin ardından seçilen bir test yardımı ile materyalin hücre aktivitesi üzerindeki etkileri saptanır (320).

Hücre kültürü sitotoksikite testlerinin temeli, hücrenin bir materyale karşı canlılık belirtilerine dayanır. Canlılık, hücrelerin yaşamını sürdürmeleri ve üremelerini devam ettirebilmeleri olarak tanımlanır. Bir materyalin sitotoksik etkisini belirlemek için kullanılan testlerin tekrarlanabilir olmasının yanısıra, test edilen konsantrasyonların doz-cevap eğrisini vermeleri, hücre sayısı ve test sonucu arasında doğrusal ilişkinin olması, test sonucunda ortaya çıkan doz-cevap eğrisinin *in vivo* koşullara uyarlanabilir olması gereklidir.

Hücrelerin materyaller ya da ekstraktları ile muamele edilmesi sonucunda canlı kalan hücre sayısı, protein sentezi, enzim aktivitesi, veya inflamatuvar ajan sentezi gibi bir çok parametre değerlendirmesi kullanılabilir (111). Toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücrelerin oranını belirleyen canlılık testlerinde genellikle vital boyalar ya da izotoplar kullanılır. Kullanılan vital boyalara örnek olarak nötral kırmızısı; vital olmayan boyalara örnek olarak ise tripan mavisi ve

propidyum iyodür verilebilir. Testlerde, eozin, nigrosin, tripan mavisi gibi bazı boyaların canlı hücre içine girememesi özelliklerinden; nötral kırmızısı, diasetil floresan gibi bazı boyaların ve Cr izotopunun canlı hücre içine girebilme yeteneklerinden yararlanılır (228,334,336,337).

Bazı *in vitro* testlerde sitotoksik etkinin gözlenebilmesi için hücrelerin biyosentez ya da enzimatik aktiviteleri değerlendirilir. Deoksiribonükleik asit (DNA) ya da protein sentezini değerlendiren gen aktivasyonu, ekspresyonu, hücresel oksidatif stres ve diğer spesifik hücresel fonksiyonların değerlendirildiği testler bu tip testlere örnek olarak gösterilebilir (228). Hücre metabolizmalarında oluşan değişikliklerin tesbit edilebildiği çok sayıda örneğin incelenmesine olanak vermesinin yanı sıra, hızlı ve ucuz olduğu bilinen testlere örnek olarak ise 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfopenil)-2H tetrazolyum (MTS), MTT, 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazo-lium hydroxide (XTT) testleri verilebilir (327,338,339) . Hücre immün fonksiyonlarının veya doku reaksiyonlarının değerlendirildiği farklı test yöntemlerine örnek olarak lenfosit ve makrofajların sitokin üretiminin ölçülmesi, lenfosit çoğalması, kemotaksis (*chemotaxis*) veya T-hücrelerinin koyun kırmızı kan hücrelerinde (*rosetting*) saptaması verilebilir (228).

MTT (3-4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) Testi

Mosmann tarafından geliştirilen (340) ve sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan MTT testi, sarı renkte, suda çözünabilen tetrazolyum tuzlarının (MTT), metabolizmaları aktif olan canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondriyal bir enzim olan süksinik dehidrogenaz tarafından parçalanarak suda çözülmeyen mor renkli tetrazolyum formazan yan ürünü salınması esasına (hücresel dehidrogenaz aktivitesi) dayanır (228). Canlı hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi olarak bilinen indirgenme ve ölü hücrelerin bu boyayı indirgeme özelliğini yitirmesi prensibinden yararlanılır. Bu yöntemle, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, kolorimetrik yöntemle nicel olarak

saptanabilmektedir (341). Formazan oluşum miktarının hücre sayısı ile doğru orantılı olması esas alınarak kalan canlı hücre sayıları MTT testi ile belirlenebilir. (18,342,343) . Sitotoksik etki nedeni ile dehidrogenazların aktif olmadığı durumda formazan oluşumu gözlenmez. Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renk boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Ölçümler ise, plak okuyucusunda, absorbans değerleri 570 nm dalga boyu kullanılarak yapılır (332). Suda çözünmeyen formazan kristalleri DMSO veya başka bir organik çözücü içinde çözünebilir ve çözünen materyallerin optik yoğunlukları (absorbans) spektrofotometre (570-690 nm) yardımı ile ölçülür ve hücre hattında metabolizmaları aktif olan hücre sayısı ile doğru orantılı bir değer elde edilir. Diğer formazan oluşturan kimyasallara örnek olarak ise *yellow oxidized nitroblue tetrazolium* (NBT) ve XTT verilebilir. (228).

Hücre kültürü testleri; kısa süreli, kolay uygulanabilir ve sonuçlarının tekrarlanabilir olması gibi birçok avantaja sahiptir. Elde edilen verilerin seçilen test yöntemine bağlı olması nedeni ile, test materyaline benzer materyallerin karşılaştırılarak test edilmesini gerektirmesi bu testlerin dezavantajlarındandır. Hücre kültürü yönteminde gözlenen en büyük sorun ise *in vivo* koşullara yorumlanabilir olup olmadığı ile ilgilidir. Bazı durumlarda bu yorumlamalar doğru olabilir; örneğin birçok materyalin hücre kültüründe oluşturduğu hasar polimerizasyonunun ya da sertleşmesinin hemen ardından izlenir. Bu duruma benzer olarak derin restorasyonlarda gözlenen pulpal değişikliklerin restorasyon uygulandıktan hemen sonra izlenmesi ve pulpanın sağlıklı olması ve rejeneratif özelliğinin devam ediyor olması ile birkaç hafta içinde ortadan kaybolması sözkonusudur. Gözlenen bu reaksiyonlar restoratif materyalin başlangıç toksisitesi ya da kavite preparasyonunun yarattığı travma ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte hücre kültürü testlerinden elde edilen bulgularla hasta reaksiyonlarının benzerlik göstermediği durumlar da vardır. Bu duruma örnek olarak hücre kültüründe yüksek sitotoksik etki gösteren çinko oksit ojenolün

pulpa ekspoz olmadığı durumlarda diş dokularına toksik etkisinin olmaması verilebilir (111).

Dentin-pulpa kompleksinin canlılık ve fonksiyonunu sürdürebilmesini amaç edinen tedavi seçenekleri, gün geçtikçe gelişmeler göstermektedir. Bu gelişmeler ışığı altında; diş hekimliğine sunulan restoratif sistemlerin, diş ve ağız yumuşak dokuları üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde hücre kültürü tekniklerinden faydalanılmakta ve ilerlemelere ayak uyduracak değerlendirme testlerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalara devam edilmektedir. Restoratif materyallerin sitotoksik etkilerinin bilinmesiyle, uygulanması planlanan tedavilerde materyal seçim aşamasında, insan sağlığının korunması gerekliliği göz önünde bulundurularak biyouyumluluğu daha yüksek olan materyallerin tercih edilmesi gerekmektedir.

2.3.3. Biyouyumluluğun Belirlenmesinde Mutajenite Değerlendirmeleri

Mutajenite, hücre çekirdeğini etkileyen ve genellikle DNA üzerinde mutasyon gibi kalıcı nitelikte değişiklikler oluşturan durum olarak tanımlanırken canlının genetik bilgisinde meydana gelen ve kuşaktan kuşağa aktarılan bu kalıtsal değişiklikler mutasyon olarak adlandırılır. DNA moleküllerinin bilgiyi depolama, eşleme (replik etme), aktarma ve deşifre etme becerisi genetik fonksiyonun temelini oluşturur. Fakat DNA'nın hatalar yapması da aynı oranda önemlidir. DNA dizilerindeki değişikliklerden kaynaklanan varyasyonlar olmaksızın fenotipik çeşitlenme, çevresel değişikliklere uyum ya da evrimin gerçekleşmeyeceği de bilinmektedir. Gen mutasyonları, çoğu yeni allellerin ve popülasyonlardaki genetik çeşitlenmenin kaynağıdır. Hücre ölümü, genetik hastalıklar ve kansere yol açan genetik değişiklikler ise olumsuz tarafları olarak kabul edilmiştir (344).

Rezin esaslı dental materyallerden salınan bazı monomerler direkt olarak ya da “reaktif oksijen türleri” (ROS; H_2O_2 , süperoksit anyon, OH radikali) üzerinden indirekt olarak mutajenik etki gösterirler (225,227). Olası toksik etkiye sahip materyallerin hücrelerdeki enzimatik olmayan detoksifikasyonunda anahtar molekül, *tripeptid glutatindir* (GSH). GSH aynı zamanda hücredeki redoks

(Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonu) dengesinden sorumludur. Gingival veya pulpal fibroblast hücrelerinin HEMA ve TEGDMA ile 2-6 saat etkileşimi sonucunda GSH seviyesinde düşüş gözlenirken, yükselmesi gereken oksidize GSH'nin yani GSSH'nin miktarında artış gözlenmemiştir. Bu durum GSH'nin monomerlerle direkt etkileşime girmesi ile açıklanabilir. Sonuç olarak HEMA, TEGDMA veya kompozit rezin ekstraktları ile temas sonrasında hücre içi ROS seviyesinde yükselme gözlenir. Bununla birlikte polimerizasyon sonrasında kamforokinonun, hücre içi ve hücre dışı ROS konsantrasyonun da arttırdığı bildirilmiştir (111,345). Ayrıca TEGDMA'nın mitokondriyal hasara neden olduğu belirtilmektedir (346). Kalıtsal özelliklerin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre; UV ışığa, iyonize radyasyona ya da kimyasal ajanlara ve monomer içeren dental rezinlere maruz kalınması ile bozulma gösterebilirken; genellikle mitokondri ve peroksizomların içinde ve sitokrom P450 enziminde bulunan hücre içi ROS miktarının, bu etkenler ile artış gösterdiği bilinmektedir. ROS üretiminin hücredeki mevcut anti-oksidan kapasitesini aşması sonucunda lipitler, proteinler ve DNA gibi hücresel makromoleküller tahrip olabilirler (227). TEGDMA'nın DNA molekülünü tahribi, direkt olarak her iki çift sarmal yapının nükleofilik merkezine kovalent bağ aracılığıyla bağlanmasıyla ya da indirekt olarak ROS üretimiyle gerçekleşir. Tahrip olan DNA'nın replikasyonunun gen mutasyonlarına neden olmasının yanı sıra, zarar gören DNA bölgesinin başarılı bir şekilde tamir edilmesi ile hücre yaşamını sürdürebilir. Tamir sürecinin tamamlanamaması, DNA çift sarmalının bozulması ile DNA replikasyonunun blokajına sebep olarak, hücre döngüsünde gecikme ya da programlanmış hücre yıkımı (apoptozis) gibi ciddi ve geri dönüşümsüz bir tahribata yol açar. Apoptozis, hücre içi ROS'tan bağımsız olarak; metakrilatların hücresel kolesterol ve fosfolipitlerle etkileşime girerek membrana bağlı fonksiyonları değiştirmesi nedeni ile de gerçekleşebilir (272,347). Genotoksisite ve hücre döngüsündeki gecikmenin, ROS süpürücü reseptör [*N*-asetilsistein (NAC)] varlığında engellendiği bilinmektedir (227,348).

Gen Mutasyonları

Mutasyonlar, protein kodlayan bir genin bölgeleri içinde ya da genin nasıl ifade edileceğini etkileyen gen dışı bölgelerde olabilir ya da olmayabilir. Bu nedenle mutasyonlar, fenotipte tanımlanabilen bir değişikliğe yol açabilirler ya da açmayabilirler. Mutasyonun bir organizmanın karakteristiğini değiştirme derecesi nerede oluştuğuna ya da geni ne derecede değiştirdiğine bağlıdır. Mutasyonlar, çeşitliliklerinin ve etkilerinin değişkenlik göstermesi nedeni ile farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır (344).

Kendiliğinden Oluşan (Spontan), yapay (uyarılmış) ve adaptif (uyumsal) Mutasyonlar

Belirli bir dış etki olmaksızın, normal hücresel etkinlikler ya da ortamla geliş güzel etkileşimlerin sonucunda ortaya çıkan spontan mutasyon oluşumu ile ilişkilendirilmiş bir ajan (etken) yoktur. Genlerin nükleotid dizilerindeki rastgele değişiklikler olarak kabul edilen bu etkiler enzimatik DNA eşlenmesi (replikasyonu) işlemi sırasında oluşur. Genetik şifrelemedeki bir hata, kodlanan proteinin aminoasit konsantrasyonuna da yansıyabilir. Aminoasit değişikliği proteinin yapısal ya da biyokimyasal aktivitesi için önemli olduğu durumlarda fenotipik değişiklikleri ortaya çıkarabilir. Yapay mutasyonlar doğal ya da yapay olarak sınıflandırılan ve mutajen adı verilen kimyasal ya da fiziksel etkenlerle meydana gelen mutasyonlardır. Adaptif mutasyon algılaması, tartışmalı olan ve organizmaların belirli bir çevresel baskıya uyum sağlamak için gen mutasyonunun doğasını “seçebildiği” ya da “yönlendirebildiği” düşüncesi etrafında şekillenmiştir (349).

Mutasyonların oluştuğu bölgeye göre sınıflandırılması

Mutasyonlar, somatik hücrelerde ya da germ (soyhattı) hücrelerinde olabilir. Gametlerde oluşan soyhattı mutasyonları kalıtılabilir, kalıtımla geçebilir ve genetik hastalıklar kadar genetik çeşitliliğin ve evrimin de temelini oluştururlar. Otozomal mutasyonlar, otozomlar üzerinde yer alan genlerde oluşurken, X’e

bağlı mutasyonlar X kromozomu üzerinde bulunan genlerde oluşur. Somatik hücrelerde izlenen mutasyonlar ise lokalize hücre ölümü, hücresel fonksiyon değişikliği ya da tümör oluşumuna yol açabilirler ve gelecek nesillere aktarılmazlar.

Moleküler değişiklik tipine göre sınıflandırma

Gen mutasyonları sıklıkla, mutasyonu oluşturan nükleotid değişikliklerine göre sınıflandırılırlar. Bir DNA molekülünde bir baz çiftinin diğer bir baz çiftine dönüşmesi baz yerdeğiştirme ya da nokta mutasyonu olarak adlandırılır. Yanlış anlamlı mutasyon (*missense mutation*) bir genin protein kodlayan kısmındaki bir tripletteki bir nükleotidin değişmesi sonucu protein ürününde farklı bir aminoasidi kodlayan yeni bir triplet oluşumu ile karakterizedir. Tripletin bir durdurucu kodona dönüşmesi ve protein sentezinin (*translasyon*) sonlanması, anlamsız (*nonsense mutation*) mutasyon olarak tanımlanabilir. Sessiz (*silent mutation*) mutasyon ise nokta mutasyonunun kodonda değişikliğe neden olmasına rağmen proteinin o pozisyonda bir aminoasit değişikliğine yol açmaması olarak ifade edilebilir. Nükleotid yerdeğiştirmeleri değerlendirildiğinde pirimidinin pirimidinle pürinin ise pürinle yerdeğiştirmesi transisyon (geçiş) olarak adlandırılırken, transversiyon (değişim) pürin ve pirimidin yerdeğiştirmesidir (344). Gen içindeki herhangi bir noktaya bir ya da daha fazla nükleotidin girmesi (*insersiyon*) veya çıkması (*delesyon*) gibi değişiklikler ile genin ürününü belirleyen sınırlar (okuma çerçevesi) içinde kodonların kayması ve bunun sonucunda da genin ürününe ait bilginin değişmesi gözlenir. Bu durum çerçeve kayması (*frameshift*) mutasyonları olarak adlandırılır ve baz çiftinin aradan çıktığı veya yeni bir baz çiftinin yapıya girdiği noktadan itibaren tüm kodonların değişmesine neden olabilir (344,349).

Fenotipik etkilerine göre sınıflandırma

Yerleşim yerleri ve tiplerine göre mutasyonlar, sessiz mutasyonlardan dominant/baskın öldürücülere kadar geniş bir fenotipik etki gösterebilirler. Bu etkiye göre yapılan sınıflandırmada mutasyonlar; işlev-kayıbı (*loss-of-function*),

işlev kazancı (*gain-of-function*), morfolojik bir özelliği etkileyen mutasyonlar, besinsel/nütrisyonel veya biyokimyasal etkiler gösteren mutasyonlar, davranış mutasyonları, düzenleyici mutasyonlar, öldürücü/letal mutasyonlar, koşullu (şarta bağlı) ve sıcaklığa duyarlı mutasyonlar olarak kategorize edilebilirler.

Temel olarak, materyalin bakteri ya da memeli hücresi genomu üzerindeki etkisinin değerlendirildiği birçok araştırma bulunmaktadır. Bakteriyel testlerin iki hedefi vardır; bunlardan ilki karsinojenik olan ve olmayan kimyasalları ayırtedebilmek, ikincisi ise genotoksik ajanların etki mekanizması hakkında bilgi sahibi olmaktır. Bakteriyel testlerle elde edilen bulguların tam olarak gerçeği yansıtmayı yansıtmadığı ile ilgili düşünceler olsa da kimyasalların bakteriler üzerindeki genotoksik etkileri ile memelilerdeki mutajenik ve tümör oluşturabilecek etkileri arasındaki yüksek ilişki de bilinmektedir (350). Karsinojenite değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada, rodentler üzerinde çok farklı dental materyallerin uzun süreli (hayvanın ömrü) etkileri değerlendirilmiş ve hiçbir materyalin tümoral oluşuma neden olmadığı belirtilmiştir (351). Çoğu *in vitro* olmak üzere, kök kanal dolgu patlarının, adeziv restoratif sistemlerin ve simanların mutajenik etkilerini inceleyen araştırmalar dışında literatürde dental materyallerin mutajenitelerinin değerlendirildiği çok fazla çalışma bulunmamaktadır (226,245,323,352). Gluteraldehit içeren dentin bağlayıcılar, epoksi esaslı kök kanal sealerları ve bazı akrilik materyallerin, özellikle polimerize olmadıklarında ya da sertleşmediklerinde gösterdikleri mutajenik etkiler de literatürde belirtilmektedir (27,226,245,352).

Maddelerin, hücrelerin genetik materyalleri üzerindeki etkilerinin saptandığı (228) mutajenite testlerinin bulgularının değerlendirilmesi çok zordur. Mutajenitenin materyallerin olası karsinojenik etkisinin belirtici olarak kabul edilmesinin yanısıra tüm mutajenlerin karsinojen ya da tüm karsinojenlerin mutajen olup olmadığı tartışma konusudur (111,228). 300 kimyasalın Ames (Salmonella/mikrozom) testi kullanılarak incelendiği bir çalışmada karsinojenik materyallerin yaklaşık olarak %90'nının mutajenik olduğu, karsinojenik etki göstermeyen materyallerin ise %87'sinin mutajenik olmadıkları gösterilmiştir

(353). Daha güncel çalışmalar ise DNA ile direkt etkileşime giren karsinojenlerle girmeyenler arasındaki farklılıkları ortaya koymaktadırlar. DNA ile direkt etkileşime giren karsinojenlerin %80'i, Ames testinde pozitif sonuç verirken bu oran direkt etkileşimde olmayan karsinojenler için %10'un altındadır (354).

Literatürde, dental materyallerin karsinojenik etkisini gösteren klinik bir çalışma bulunmamaktadır. Kötü huylu bir tümöral oluşumun gerçekleşmesi için uzun süre gereksiniminin olması, klinik çalışma yapılması olasılığını azaltmaktadır. Olası karsinojenik etkinin belirlenmesinde indirekt çıkarımlarda bulunmak mümkün olmaktadır (111).

Hücrelerin genetik materyalleri üzerindeki etkilerin, çok farklı mekanizmalarla olduğu bilinmektedir. Genotoksik mutajenler, farklı mutasyonlarla hücre DNA'sında değişiklik oluştururlar. Farklı kimyasallar spesifik DNA mutasyonları ile ilişkilendirilebilirler. Genotoksik kimyasallar, mutajen olabilirler ya da aktivasyon veya biyotransformasyon yolu ile mutajen etkiye sahip olarak promutajen olarak adlandırılırlar. Epigenetik mutajenler tekbaşlarına DNA'da değişikliğe neden olmazlar; fakat hormon gibi davranarak ve hücre biyokimyasında ve immün sistemde değişikliğe neden olur ve tümör oluşumunu sağlayabilirler (228).

Kısa zamanlı in vitro test sistemleri, diş hekimliğine sunulan restoratif materyallerin kullanıma başlanmadan önce genotoksik ve mutajenik potansiyelleri açısından test edilmeleri gerekliliği nedeni ile sıklıkla uygulanmaktadırlar. Bu nedenle araştırmacılar, karsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemlerini geliştirmişlerdir (355). Kısa zamanlı bakteriyel testler; kimyasal tarafından oluşturulan DNA hasarı, mutasyon türü ve metabolizma sonucu ortaya çıkan yan ürünler veya DNA onarımının genotoksik aktivite üzerindeki etkileri hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar. Genotoksik ajanın etki mekanizması hakkında bilgi sahibi olunması karsinojenite tahmini açısından önem taşımaktadır (350). Genetiği değiştirilmiş bakterilerin kullanıldığı Ames testi bu yöntemler içinde en sıklıkla tercih edilenidir (356) ve bulguları genomda değişiklik oluşup oluşmadığı ve

bakterilerin sonraki jenerasyonlarına aktarılıp aktarılmadığı (mutajenite) hakkında bilgi verir (111). Mutajenitenin değerlendirildiği farklı bir test yöntemi, bakteriyel testlere alternatif olarak memeli hücrelerinde uygulanabilen “*Styles’ cell transformation*” testidir. Ames testi ile birlikte kromozomal aberasyon, “*sister chromatid exchange*” ve fare lemfoma L5178Y hücre mutajenite testleri kısa zamanlı mutajenite testlerine örnek olarak verilebilir (228). *Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz* enzimi (HPRT) kodundaki gen değişikliklerinin saptandığı HPRT testi ve kromozomlardaki morfolojik değişikliklerin değerlendirildiği mikronükleus testi oluşan DNA hasarının diğer jenerasyonlara aktarılmadan (genotoksisite) tesbit edilebildiği in vitro testlere örnek olarak verilebilir (257). Midyeler gibi düşük organizasyonlu hayvanlar üzerinde uygulanan genotoksisite testleri genellikle çevresel toksikoloji çalışmalarında kullanılır (245).

Mutajenite test sistemleri içinde, kısa zamanlı bakteriyel testler daha basit, hızlı ve ekonomik olmaları nedeni ile tercih edilmekte, genotoksik ajanların, taranması ve yasal uygulamaların gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar (355,357). 1973’ten beri geliştirilen kısa zamanlı bakteriyel testlerden Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi ile yapılan ilk çalışmadan sonra, çok fazla gelişme gösterdiği bilinmektedir. Bu durum genotoksik ajanların belirlenmesi gerekliliğine verilen önemi ortaya koymaktadır (358).

Salmonella-Mikrozom Mutajenite (Ames) Test Sistemi

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak adlandırılan *Salmonella* mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test sistemi, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği kabul edilmiş geri mutasyon testidir (355,356,359,360). Değerlendirmeler; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, okzotrofik, histidin aminoasitine ihtiyaç duyan, mutant *Salmonella typhimurium* test bakterileri kullanılarak yapılmaktadır (361). *Salmonella*-mikrozom testi, başta

ABD ve Japonya olmak üzere birçok ülke tarafından kullanılmaktadır. Bu test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonla elde edilen *Salmonella typhimurium* his- mutantları, his operonunun değişik bölgelerinde değişik birer mutasyon içerir. Salmonella-mikrozom testi ile kimyasal maddelerin, bu test suşlarını his+ revertantları haline dönüştürme özellikleri saptanmaktadır (355).

Salmonella-mikrozom testi, bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona neden olan ajanların insan dahil diğer türlerde de muhtemel mutasyonlara yol açma yeteneğinde olabileceği ve karsinojenite ile yüksek korelasyon varsayımlarına dayanmaktadır. Ames test sistemi aynı zamanda, kimyasalların mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bu kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikanserojenlerin tayininde de kullanılmaktadır (362-364)

Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla gelişmek için, histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır. Sonrasında ise özgül baz çifti değişimlerini gösteren diğer suşlar geliştirilmiştir. Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA98, TA 100 kombinasyonu genel olarak kabul görmüş test suşlarıdır (365).

Mutajenite testlerinde kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri aşağıda verilmiştir:

Histidin gereksinimi

Salmonella/mikrozom mutajenite test sisteminde kullanılan her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan baz değişimleri ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden

olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir (355). DNA baz dizisi analizleri yapılarak *Salmonella typhimurium* his- (histidin gerektiren) mutantların mutasyonlarının yerleri ve karakterleri saptanmıştır. *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA1535 suşlarından saptanan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzimi kodlayan his G üzerindedir. Bu mutasyon, his G geninde, losin aminoasidin kodonu olan –GAG-, -CTC-, yerine prolin aminoasitinin kodonu olan –GGG-, -CCC-’nin gelmesine neden olur. *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA1535 üzerinde meydana getirilen ve baz çifti değişimine neden olan mutasyon, yine baz çifti değişimine neden olan mutajenler tarafından geri döndürülür (355) His D3052 mutasyonu, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA1538 suşlarında bulunur ve histidin biyosentezindeki son enzim olan ve histidinolü histidine çeviren histidinol dehidrogenazı kodlayan his D geni üzerindedir. His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup, tek bir nükleotidin eksikliği (çerçeve kayması) sonucu oluşmuştur. His D 3052 mutasyonu, His D geni içinde, - GCGCGCGC-, CGCGCGCG- dizimi olan, 8 kere tekrarlanan GC dizisine sahiptir ve bu dizi -1 çerçeve kayması mutasyon bölgesinin yanında bulunmaktadır (366). *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA1538 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajen maddelerle tekrar his+ hale geri dönüştürülmektedir (355).

rfa mutasyonu

Bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelen rfa mutasyonu, bakteri yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasına neden olur ve normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücreye girişini kolaylaştırır (355).

uvrB mutasyonu

DNA onarım sisteminde nükleotid kesip çıkarma (*excision repair*) onarım sisteminde görev alan uvrB proteinini kodlayan genin delesyonu ile oluşan uvrB mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden

olur. Ancak, teknik nedenlerden ötürü bu delesyon ile birlikte istenmeden, biyotin ve nitroredüktaz enzimini kodlayan chl genleri de delesyona uğramıştır.

R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *Salmonella typhimurium* TA1538 ve TA1535 suşlarına, ampiciline dirençlilik geni taşıyan pKM101 R faktörü plazmidinin eklenmesiyle *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları elde edilmiştir (355). R faktörü plazmidi içeren suşların mutajenik ajanlara karşı cevapları, plazmidi içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmit içeren yeni suşlar, gerçekte mutajen özellikte olmasına rağmen orijinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap vermişlerdir. (355)

S9 fraksiyonu (Metabolik aktivasyon sistemi)

Prokarsinojenlerin mutasyona neden olan DNA'ya kovalent olarak bağlanma yeteneğindeki elektrofilik bileşiklerin enzimatik transformasyonuna kadar inaktif halde kalmaları nedeni ile (367) Ames testine, sıçan karaciğer 9000xg supernatantını ve kofaktörlerini içeren aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır. İnsanlarda ve yüksek yapılı canlılarda bulunan P450 sitokrom aktivasyon sistemi bu enzimleri metabolize edebilme yeteneğindedir. Sitokrom P450 aktivasyon sistemi akciğer ve böbreklerde çok düşük, karaciğerde ise yüksek düzeyde bulunmaktadır . Ames testinde kullanılan bakteriler bu sisteme sahip olmadığı için memeli egzogen organ aktivasyon sisteminin test kimyasalları ve bakterilerle birlikte petrilere ilave edilmesi gerekir. Metabolik aktivasyon sistemi; fenobarbital, 5,6-benzoflavon veya karaciğer enzim aktivitesini indükleyen Aroclor 1254 ile beslenen sıçan karaciğerinden elde edilir (355)

2.3.4. Pulpa hasarı ve pulpa/dentin testi

Diş hekimleri için dikkat edilmesi gerekli bir konu olan pulpal uyumluluğun değerlendirilmesinde, ortodontik nedenle çekilmesi planlanan insan dişleri ya da

deney havyalarının dişleri kullanılır (111,320). Deneysel olarak restoratif materyallerin pulpa üzerindeki etkilerinin histolojik olarak değerlendirilmesi ilk olarak 1985'te Stanley tarafından klinik öncesi kullanım testleri olarak açıklanmıştır (368). Dişlerde oluşturulan sınıf V kavitelere test materyallerinin uygulanmasından sonra belirlenmiş bir zaman sonunda dişlerin çekilmesi, pulpanın akut veya kronik inflamasyonu ve odontoblastik reaksiyon açısından histopatolojik olarak incelenmesi gerçekleştirilir. Lezyonların şiddeti doku üzerindeki yapının dağılımına ve inflamatuvar hücre miktarına bağlıdır. Pulpanın vereceği cevap ise hafif (hafif hiperemi, az miktarda inflamatuvar hücre bulunması, odontoblastik alanda hafif hemoraji), orta şiddetli (inflamatuvar hücre miktarında anlamlı artış, hiperemi, odontoblastik alanda hafif bozulma) veya şiddetli (inflamatuvar göç, hiperemi, restorasyon alanındaki odontoblastik tabakanın tamamında bozulma, predentin miktarında azalma ya da izlenmemesi veya lokalize apse) olarak sınıflandırılabilir. Çürüklü dişlerde inflamatuvar cevapta en önemli hücreler mononükleer hücrelerdir. Nötrofiller ise bakteri ya da bakteri ürünleri varlığı şüphesini doğurur (228). Kavite duvarı bakteriyel penetrasyon açısından da değerlendirilir.

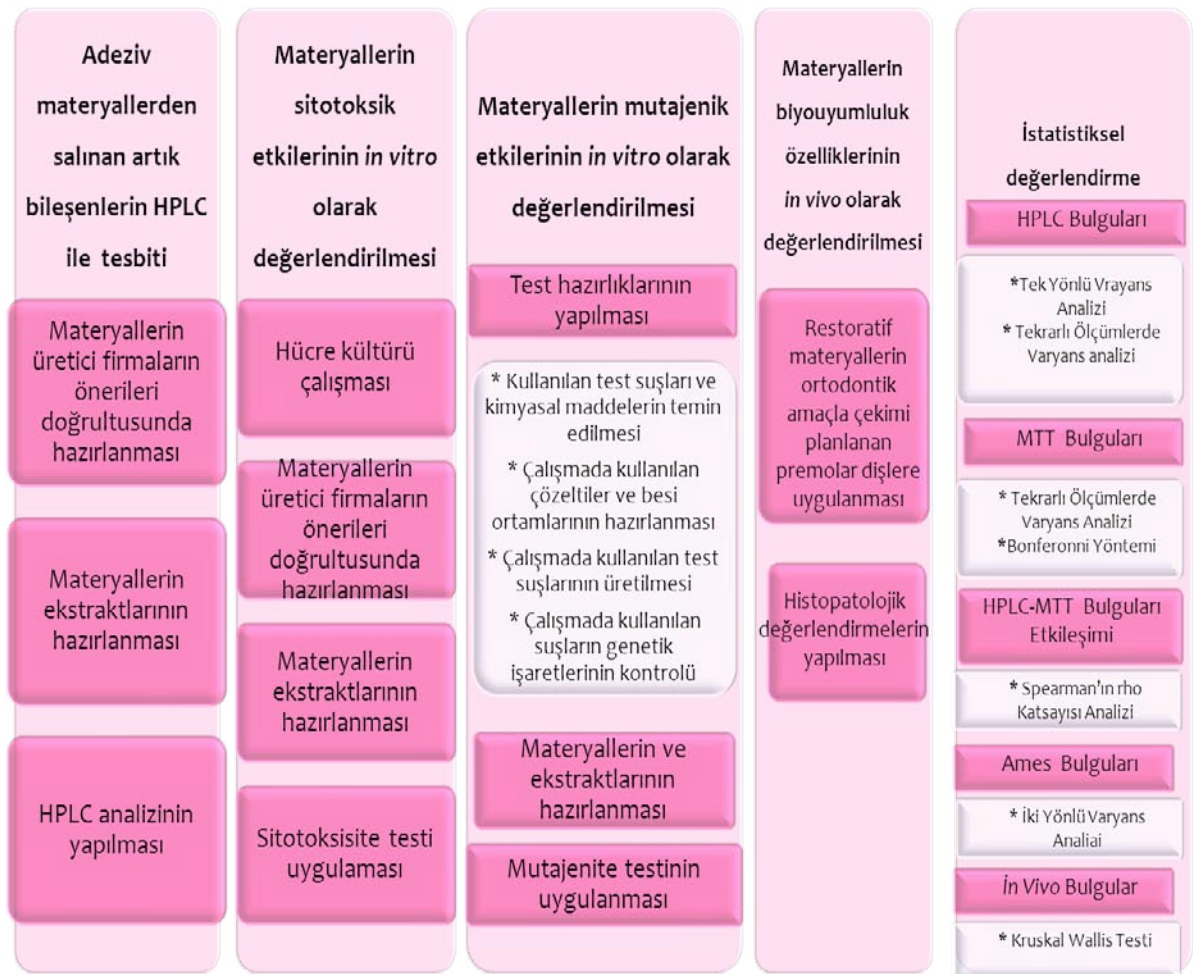
Pulpa/dentin testlerinde genellikle oblitere olmuş dentin dokusunun izlenmediği sağlıklı dişlerin kullanılmasının çürük dentinin altında skleroze dentinle karakterize klinik durumla farklılık yaratabileceği bilinmektedir. Skleroze dentinden olası toksik etkiye sahip materyallerin penetrasyonu azalmıştır; fakat kron restorasyonu amacı ile prepare edilmiş dentin dokusu ise pulpa/dentin testlerine benzer bir durum oluşturabilir. Ek olarak sağlam bir diş pulpası hasar görmüş bir dişteki pulpa ile farklı tepkiler gösterebilir; kronik inflamasyona sahip bir diş pulpasının savunma mekanizması sağlam pulpaya kıyasla azalmıştır (111). Bu yanılgıları elimine etmek amacı ile pulpa dokusunda oluşan bakteriyel hasarın değerlendirilmesine yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Pulpitis gözlenen dişler üzerinde uygulanan kullanım testleri oluşan cevabın şiddeti veya beklenen reparatif dentin oluşumu hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlamaktadır (228).

Pulpa/dentin çalışmalarının direkt pulpa kaplamaları sonrasında insanlarda pulpa nekrozu ile sonuçlanmasına rağmen deney hayvanlarında düşük reaksiyon gösterdiği ya da inflamatuvar reaksiyon gözlenmediği bildirilmiştir. Deney hayvanlarının, özellikle maymun pulpasının kimyasallara daha dayanıklı olduğu fakat bakterilere ve bakteri toksinlerine daha az dirençli olduğu bilinmektedir. Başka bir sorun ise hayvanların deneylerde kullanılmasının düşündürücü olmasıdır. Klinisyen açısından bilinmesi gereken nokta ise pulpa/dentin testlerinin klinik sonuçlara uyarlanabilir olduğudur. Bu yöntemin dezavantajları göz önünde bulunduğunda ise bu bulguların hücre kültürü testleri ve klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (111).

3. BİREYLER GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı ve Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı; Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda *in vitro* ve *in vivo* koşullarda 4 bölüm olarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.1.'de çalışma basamakları belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma özeti



Diş hekimliğinde direkt olarak dişlere uygulanan adeziv restoratif materyaller, kompozit rezinler ve cam iyonomerlerdir. Herbiri kendi içinde bir takım uygulama basamaklarını içeren bu materyallerden kompozit rezinler, adeziv sistemlerle; cam iyonomer restoratifler ise primer ve/veya yüzey örtücüleri ile uygulanırlar. Bu tez çalışmasında; adeziv restoratif sistemler olarak tanımladığımız ve kliniğimizde rutin olarak uygulanan dört güncel sistemin biyouyumlulukları değerlendirilmiştir. Adeziv restoratif materyallerin olası toksik etkilerinden sorumlu oldukları düşünülen artık bileşenlerinin salım miktarının tesbitinin ardından, hücre kültüründeki sitotoksik ve bakteri suşlarındaki mutajenik etkileri saptanmış ve bunlara ek olarak; materyallere karşı oluşan pulpal cevap *in vivo* koşullarda gözlemlenmiştir. Biyouyumlulukları değerlendirilen bu adeziv restoratif sistemler ve özellikleri Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Test edilen adeziv restoratif sistemler

Adeziv Restoratif Sistem	Materyal Türü	Üretici Firma	Seri No	Kımyasal İçerik
XP Bond ve Quixfill	XP Bond	İki Aşamalı Etch&rinse Adeziv Sistem	0707000223	Karboksilik asitle modifiye dimetakrilat, fosforik asitle modifiye akrilat rezin, Üretan dimetakrilat, TEGDMA, HEMA, bütillize benzendiol, etil-4 dimetilaminobenzoat, kamforokinon, fonksiyonelize amorf silika, t-butanol
	Quixfill	Metakrilat Esaslı Hibrit Posterior Kompozit Rezin Restoratif	07030000799	Matriks: UDMA, TEGDMA, Di- ve tri metakrilat rezinler, karboksilik asitle modifiye dimetakrilat rezin, bütillize hidroksitolüen, UV stabilizatörü, kamforokinon, etil-4-dimetilaminobenzoat Doldurucu: Silanize stronsiyum, alüminyum, sodyum florür, fosfat, silikat cam
Silorane	Silorane Primer	Primer	20090220	HEMA, BIS-GMA, su, etanol, fosforik asit-metakriloksi- hegzilester, silanla muamele edilmiş silika, 1,6-hekzandiol dimetakrilat, akrilik ve itakonik asit kopolimer, (dimetilamino) etil metakrilat, dl-kamforokinon, fosfin oksit
	Silorane Bond	Adeziv Rezin	20090220	Sübstitüye dimetakrilat, silanla muamele edilmiş silika, TEGDMA, fosforik asit- metakriloksi-hegzilester, dl-kamforokinon, hekzandiol dimetakrilat
	Silorane	Siloran Restoratif	20090220	3,4 epoksisiklohegziletilsiklopolimetilsiloksan, bis-3,4- epoksisiklohegziletilmetilsilan, silanize cam, yitriyum florür, kamforokinon
Equia	Fuji IX GP Extra	Güçlendirilmiş Cam İyonomer Restoratif	0802252	Toz: poliakrilik asit, fluoroaluminio-silikat cam Likit: poliakrilik asit, su
	G Coat Plus	Yüzey Örtücü	0808181	Üretan metakrilat, MMA, kamforokinon, silikon dioksit, fosforik ester monomer
Ketac N 100	Ketac N 100 Primer	Nanoiyonomer Primer	20070917	Su, HEMA , akrilik/itakonik asit kopolimer, ışıklı-başlatıcılar
	Ketac N 100	Işıklı Sertleştirilen Nanoiyonomer Restoratif	20070917	Pat A: silanla muamele edilmiş cam, silanla muamele edilmiş ZrO ₂ silika , silanla muamele edilmiş silika, PEGDMA ,HEMA , Bis-GMA , TEGDMA Pat B: silanla muamele edilmiş seramik, silanla muamele edilmiş silika, su , HEMA, akrilik/itakonik asit kopolimer

3.1. Adeziv Restoratif Materyallerden Salınan Artık Bileşenlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Saptanması

3.1.1. Materyallerin Üretici Firmaların Önerileri Doğrultusunda Hazırlanması

Posterior Hibrit Kompozit Restoratif Sistem “ XP Bond ve Quixfill”

Etch&rinse adeziv sistem XP Bond, 5 mm çapında ve 1 mm yüksekliğindeki teflon kalıp içerisine uygulanarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10 saniye (sn) LED “*Light Emitting Diode*” ile (Elipar Free Light, 3M Espe, AG, Almanya, 1007 mW/cm²) polimerize edilmiştir. Restoratif materyal Quixfill ise 5 mm çapında 4 mm yüksekliğinde teflon kalıplara 2 tabaka halinde uygulanmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40’ar sn polimerize edilmiştir.

Silorane Sistem “Silorane ”

Bu restoratif sistem, primer ve adeziv rezinden oluşan self-etch adeziv sistem ve restoratif materyalden oluşur. Restoratif materyal, 5 mm çapında 4 mm yüksekliğinde teflon kalıba 2 tabaka olacak şekilde uygulanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40’ar sn polimerize edilmiştir. Silorane primer ve Silorane Bond ise 1 mm yüksekliğinde ve 5 mm çapında olan teflon kalıplara uygulanarak 10 sn polimerize edilmiştir.

Güçlendirilmiş Geleneksel Cam İyonomer Restoratif Sistem “Equia ”

Kapsül şeklindeki restoratif materyal Fuji IX GP Extra’nın, amalgamatörde (Ultram 2, SDI, Avustralya) 10 sn karıştırılması ve uygulama aparatı ile 5 mm çapında 4 mm yüksekliğindeki teflon kalıplara aktarılmasının ardından, sertleşmesi beklenmiştir (2 dak, 30 sn). Klinik uygulamada bu restoratif materyalin birlikte kullanıldığı G Coat Plus yüzey örtücü ise 5 mm çapında 1 mm yüksekliğindeki teflon kalıp içerisine uygulanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10 saniye polimerize edilmiştir.

Işıkla Sertleşen Nanoiyonomer Restoratif Sistem “ Ketac N 100 ”

Ketac N 100 Primer, 5 mm çapında 1 mm yüksekliğindeki teflon kalıp içerisine uygulanmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusundan daha fazla olmakla birlikte 20 sn polimerize edilmiştir. Restoratif materyal ise pat kıvamındaki baz ve katalizörünün uygulama aparatından eşit oranlarda karıştırma kağıdına aktarılmasının ardından, üretici firmanın önerileri doğrultusunda karıştırılmış ve 5 mm çapında 4 mm yüksekliğindeki teflon kalıp içerisine, her bir tabaka 40 sn polimerize edilerek 2 tabaka halinde uygulanmıştır.

Tüm materyallerin şeffaf matriks band ile kapatılması ve teflon kalıp içinde ve çıkarıldıktan sonra polimerize edilmesinin ardından; içeriğinde monomer bulunmayan Fuji IX GP Extra dışında test edilmesi amaçlanan toplam 8 grup materyal örneği HPLC [likit kromatografisi/kütle spektroskopisi (LC/MS)] analizi için hazırlanmıştır.

3.1.2. Materyallerin Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplam 10 ml ekstrakt ortamı kullanabilmek amacı ile, her gruptan restoratif materyaller için 9; primer, adeziv rezin ve yüzey örtücüler için 18 adet test materyali örneği hazırlanmıştır. 1, 2, 7 günlük ekstraktların elde edilmesi amacı ile toplamda restoratif materyaller için 27, primer, adeziv sistem ve yüzey örtücü için ise 54 örnek hazırlanmış ve örnekler hazırlanmalarının ardından tartılarak (Mettler Toledo, Kolombus, ABD), ağırlıkları miligram (mg) cinsinden kaydedilmiştir. Silorane dışındaki örnekler %70 metanol- deiyonize su karışımında (Sigma Aldrich, St Louis, ABD), Silorane Restoratif'e ait örnekler metanol içinde karanlık ortamda 1, 2 ve 7 gün bekletilmiştir.

3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Likit Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi)

Ekstraktların değerlendirilmesinde, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Bölümü'ne ait Waters Alliance 2695 Separations Module HPLC Sistemi, Waters 2996 Photodiode Array Dedektör ve Waters

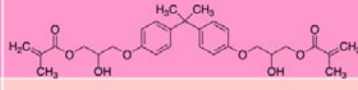
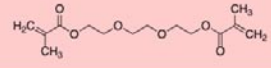
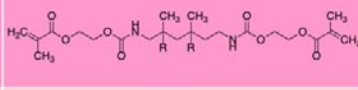
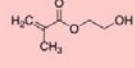
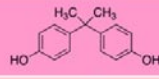
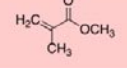
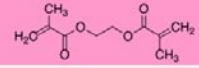
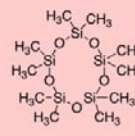
Micromass ZQkütle spektrometresi kullanılmıştır (Meadows Instrumentation Inc., ABD) (Şekil 3.1.1.). HPLC çalışmaları öncesinde, cihazın kromatografi şartlarının sağlanması ve kalibrasyonunun yapılabilmesi amacı ile standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Adeziv restoratif materyallerden salımı gerçekleştiği düşünülen test monomerlerinin stok çözeltileri [Decametilsiklopentasiloksan (D5), metanol içinde; diğer tüm monomerler, %70 metanol-deiyonize su karışımında] belirli hacimlerde seyreltilerek (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 ve 0.8 mg/mL olmak üzere) altı farklı konsantrasyonda çalışma çözeltileri elde edilmiştir. Her bir monomere ait kromatogramdaki pikin altında kalan alan ve konsantrasyon, grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.1. HPLC (LC/MS) Sistemi (Waters 2695)

Test edilen monomerler ve hazırlanan standart çalışma çözeltilerine ait bilgiler Tablo 3.1.1.'de verilmektedir.

Tablo 3.1.1. Çalışma çözeltilerini hazırlamada kullanılan monomerler

Monomerler	Kısaltma İsimleri	Molekül Formülleri	Moleküler Ağırlıkları g/mol	Monomer yapıları	Üretici Firma
Bisfenol A-dimetakrilat	Bis-GMA	$C_{29}H_{36}O_8$	512		Sigma-Aldrich Corporate Offices Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD
Trietilenglikoldimetakrilat	TEGDMA	$C_{14}H_{22}O_6$	286		
1,6-Bis(metakriloksi-2-etoksikarbonilamino)-2,4,4-trimetilhekzan	UDMA	$C_{23}H_{18}N_2O_8$	470		
2-Hidroksietilmetakrilat	HEMA	$C_6H_{10}O_3$	130		
Bisfenol A	BPA	$C_{15}H_{16}O_2$	228		
Metilmetakrilat	MMA	$C_5H_8O_2$	100		
Etilenglikol dimetakrilat	EGDMA	$C_{10}H_{14}O_4$	198		
Dekametilsiklopentasiloksan	D5	$CH_3[Si(CH_3)_2O]_nSi(CH_3)_3$	370		

Standart çalışma çözeltileri ile çalışma sonrasında test edilen adeziv retoratif materyallerin ekstraktları; 25°C’de 0,7 ml/dak akış hızında izokratik elüsyon ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında kullanılan kolon; 15 cm uzunluğunda, 4 mm çapında ve 5 µm partikül büyüklüğüne sahip 121-1504 katalog nolu C-18 kolondur (Ace, İngiltere). Silorane dışındaki tüm materyaller için mobil faz olarak %70 metanol - %30 deiyonize su çözeltisi, Silorane için ise metanol kullanılmıştır. Silorane için kütle dedektör, diğer tüm materyaller için photo diode array (PDA) dedektör kullanılmıştır. Kütle dedektör, analizi yapılan monomerlerin moleküler ağırlığında (Kon voltaj:27,20 V, Kapiller voltaj; 3,84 kV, elektrosprey+, kaynak sıcaklığı: 100°C, desolvation sıcaklığı:120°C, kon gaz akışı: 50 L/saat; desolvation gaz akışı: 500 L/saat +); diyot dizi dedektör ise tüm monomerler için 200-220 nm arasında olmak üzere belirlenmiştir. Her örnekten kolona enjekte edilen sıvı hacmi 20 µl olarak belirlenmiştir. Silorane içinde bulunan monomerlerin

belirlenmiş moleküler ağırlıklarına ve diğer monomerlerin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunda üç boyutlu kromatogramlar elde edilmiştir. Her bir analizin süresi yaklaşık olarak Bis-GMA içeren adeziv restoratif materyaller için 15, içermeyen materyaller için ise 6 dakika sürmüştür ve her bir analiz 3 kere tekrarlanmıştır.

Elde edilen ekstraktlar içindeki monomer miktarının belirlenmesi amacı ile, monomerin HPLC standartları için önceden hazırlanmış kalibrasyonlar referans alınmıştır. Standart çözeltilerin HPLC ile analizleri sonunda, monomerlerin pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Monomerlerin lineer kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısını elde etmek amacı ile, standart çözeltideki konsantrasyonları lineer regresyon analizine tabi tutulmuştur. Lineer kalibrasyon denklemlerine ait bilgiler Tablo 3.1.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1.2. Lineer regresyon analiz bulguları

Monomerler	Dalga boyu (nm)	r^2	Denklem
Bis-GMA	201	0,989	$y=(3 \times 10^{-8})x-0,0233$
TEGDMA	206	0,96	$y=(6 \times 10^{-8})x-0,0798$
UDMA	206	0,9962	$y=(6 \times 10^{-8})x-0,0151$
HEMA	207	0,9292	$y=(9 \times 10^{-8})x-0,1595$
BPA	202	0,9678	$y=(5 \times 10^{-8})x-0,1312$
MMA	206	0,9978	$y=(3 \times 10^{-8})x-0,0047$
EDGMA	206	0,9857	$y=(2 \times 10^{-8})x-0,0038$

x: konsantrasyon, y: alan, r^2 : korelasyon katsayısı Katsayılar model doğrusallaştırıldıktan sonra elde edilmiştir.

Silorane içindeki bileşen standartlarının temin edilememesi nedeni ile, bu materyalin farklı günlerde elde edilen ekstraktları için lineer kalibrasyon

denklemlerinin ardından kromotogramlarda elde edilen alanlar kaydedilmiştir. Silorane dışındaki tüm materyaller için kromotogramlarda elde edilen alanlar, konsantrasyonları $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplanarak istatistik değerlendirme için kullanılmıştır.

3.2. Materyallerin Sitotoksik Etkilerinin *In Vitro* Olarak Değerlendirilmesi

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışması

Bu tez çalışmasında, toksisite testlerinde kullanılan ve fare deri altı bağ dokusundan elde edilen fibroblast kökenli ve *L Strain* hücrelerinden türetilmiş L929 fare fibroblastlarından oluşan klonal hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı, devamlı olarak pasaj yapılan Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğüne ait Hücre ve Virüs Bankası'ndan (HÜKÜK) elde edilmiş (Hücre Kültürü Koleksiyonu 92123004), 3. pasajda dondurulan L929 fare fibroblastı hücreleri (16/05/2008 = dondurma tarihi) kullanılmıştır. Hücreler öncelikle, 25 cm^2 'lik flasklarda %10 serum (FBS, Hyclone) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) ortamında kültüre edilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu, 37 °C'de, %5 CO_2 ortamında gerçekleştirilmiştir. L-929 hücreleri, 75 cm^2 'lik kültür kabında (Nunc, Danimarka) DMEM hücre kültür ortamı içerisine %10 oranında FBS (FBS, Hyclone Utah ABD), %1 oranında antibiyotik solüsyonu (Penicillin, streptomisin, Hyclone Utah ABD) ilave edilerek 37°C'de %5 CO_2 , %95 hava içeren %95 bağıl nemli ortamın sağlandığı etüvde (Heraeus, Almanya) inkübe edilerek üretilmiştir. Hücreler, monolayer (tek tabaka) olarak üretildikten ve kültür kabının tabanındaki yüzeyi tamamen kapladıktan sonra pasajlanmıştır. Hücre pasajı yapılmadan önce 25 cm^2 'lik kültür kabı öncelikle DPBS (Hyclone Utah ABD) ile yıkanmıştır. Daha sonra, Trypsin-EDTA Solüsyonu (Hyclone Utah ABD) ilave edilmiş ve 5 dak beklenmiştir. Tripsinin proteolitik etkisi ile birlikte hücreler yüzeyden kalkmış ve ortam içerisine alınan bu hücrelerin santrifüjde 1000 rpm'de 5 dak çöktürülmesi ile süpernatant uzaklaştırılmıştır. Üzerine 5 mL ortam ilave

edilerek süspansiyon haline getirilen hücreler, sitotoksosite testlerini gerçekleştirmek amacı ile 24 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir.

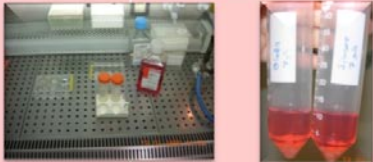
3.2.2. Materyallerin Üretici Firmaların Önerileri Doğrultusunda Hazırlanması

Tez çalışmasında değerlendirmeyi planladığımız toplam 9 grup adeziv restoratif materyal, daha önce belirtildiği şekilde teflon kalıplarda üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

3.2.3. Materyallerin Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplam 10 ml ekstrakt ortamı elde edebilmek için; her gruptan restoratif materyaller için 9 (5 mm çapında 4 mm yüksekliğinde); primer, adeziv sistem ve yüzey örtücü için 18 adet (5 mm çapında 1 mm yüksekliğinde) olmak üzere; tüm örnekler steril teflon kalıplarda üretici firmaların önerileri doğrultusunda laminar flow (Bioair, İtalya) içinde steril şartlarda hazırlanmıştır. Örnekler %10 serum içeren DMEM içinde 37°C'de inkübe edilmiş, örneklerin yüzey alanı birim hacim başına restoratif materyaller için 0,9184 cm², primer, adeziv sistem ve yüzey örtücü için 0,9891 cm² olacak şekilde hazırlanmıştır [0,5-6 cm²/mL,(22)].

Örneklerin besi ortamı içinde bekleme sürelerine göre 3 grup (1, 2 ve 7 gün) oluşturulması amacı ile; ekstraktları alınmadan hemen önce her gruptan toplamda restoratif materyaller için 27, adeziv sistemler için 54 örnek hazırlanmıştır. Belirlenen süreler sonunda örnekler uzaklaştırılmış ve besi ortamları 0,2 µm'lik filtrelerden geçirilerek sterillenmiştir (Şekil 3.2.1.).

Test materyalleri	Test materyallerinin ve ekstraktların hazırlanması		
XP Bond ve Quixfill		Laminar Flow	
Silorane		Test örneklerinin hazırlandığı teflon kalıp ve polimerizasyonun gerçekleştirildiği ışık cihazı	
Equia		Ekstraktların hazırlanması	
Ketac N 100		Test ekstraktlarının inkübe edildiği etüv	

Şekil 3.2.1. Test ekstraktlarının hazırlanması

3.2.4. Sitotoksikite Testlerinin Uygulanması

Test edilecek ekstraktların, L 929 hücre kültürü üzerinde, sitotoksik etkilerinin olup olmadığı MTT testi ile araştırılmıştır. Hücreler deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde, tripsinlenerek toplanmış; Tripan mavisini ile boyanarak, Neubauer lamı ile sayılmış ve mililitrede 5×10^4 hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra, hücreler 24 gözlü kültür kaplarına (Nunc, Danimarka) 1 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklara yapışmaları için 24 saat beklenmiştir. Ardından besiyeri, hücreler üzerinden uzaklaştırılmış ve hücreler üç farklı sürede (1, 2 ve 7 gün) hazırlanmış ekstraktlar ile muamele edilmişlerdir. Her bir göze 1 mL ekstrakt eklenmiş ve yapılan tüm analizlerde üç paralel örnekle çalışılmıştır. Hücreler test maddeleri ile 37°C 'de, %5 CO_2 'li nemli ortamda 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında morfolojik incelemeleri gerçekleştirilmiş ve mikroskoba

bağlı dijital kamera (Olympus C-400, Japonya) ile fotoğrafları çekilmiştir. Hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) belirlemek amacı ile, MTT testi uygulanmıştır. Ekstraktın eklenmediği grup, kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücrelerin inkübe edildiği test ekstraktlarını içeren besi ortamı, hücreler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT (2,5 mg/mL steril PBS) çözeltisi eklenmiştir.

Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde 3 saat inkübe edilmişlerdir. MTT solüsyonunun canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristallerine dönüştürülmesi ve formazan kristallerinin isopropanol içinde çözdürülerek absorbans değerlerine bakılması sonucu formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak hücre canlılığı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. 3 saatin sonunda örnekler üzerindeki ortam çekilerek, yerine 400 µL isopropanol (0,04 M HCL içeren) eklenmiş ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi beklenmiştir. Her bir örneğin üzerinden 200 µL süpernatant alınarak, 96-gözlü kültür kabına koyulmuştur. Bu sürenin sonunda hücrelerin optik yoğunlukları 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropate okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2.2.).



Şekil 3.2.2 MTT testi uygulama aşamaları

Hücrelerin ölçülen optik yoğunluklarının kontrol gruplarına göre yüzdelere alınması sonrasında % hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir “Formül 3.1.”

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = 100 \times \frac{\text{Test gruplarının optik yoğunluğu}}{\text{Kontrol gruplarının optik yoğunluğu}}$$

Formül 3.1. Hücre canlılığının tesbitinde uygulanan formül (290)

3.3. Materyallerin Mutajenik Etkilerinin *In Vitro* Olarak Değerlendirilmesi

3.3.1. Test Hazırlıklarının Yapılması

Kullanılan Test Suşları ve Kimyasal Maddelerin Temin Edilmesi

Test Suşları

Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları Dr. Bruce N Ames’ten (California Üniversitesi , Berkeley) temin edilmiştir. Tüm çalışmalarda, her bir bakteri suşu, her 10 mililitreye 100 µl gecelik kültür ekilerek, çalkalamalı etüvde, 37°C’de, $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml olacak şekilde üretilmiştir.

Pozitif Mutajenler

Ames test sisteminde, rat karaciğer S9 fraksiyonu yokluğunda, TA 98 suşu için pozitif mutajen olarak 6 µg/plak Danomisin (Daunomicina, Deva Holding A.Ş), TA100 suşu için ise 1,5 µg/plak Sodyumazid (NaN_3) (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

Diğer Kimyasal Maddeler

D- biyotin, L- histidin- HCl monohidrat, kristal viyole, tetrasiklin, sitrik asit monohidrat, sodyum amonyum fosfat ve D- glukoz Sigma’dan (Sigma Aldrich, Almanya); ampicilin trihidrat ve etanol (%99 saflıkta) Fluka’ dan (Fluka, Almanya);

50xVB tuzları ve glukoz ayrı olarak steril edildikten sonra agar ile karıştırılarak yaklaşık 9,5 cm çaplı plaklar için yaklaşık olarak 25 ml olacak şekilde dökülmüştür. Bu besi yeri, kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının incelenmesinde ve mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Ampisilin Çözeltisi (8 mg/ml)

Tablo 3.3.3. Ampisilin çözeltisi içeriği

100 ml için	
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 N NaOH	100 ml

Bu çözelti, pKM101 plazmidi (R faktör) taşıyan suşların genetik işaretlerinin kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Histidin- Biyotin- Ampisilin ve Tetrasiklinli Besiyeri

Tablo 3.3.4. Histidin-Biyotin ve Tetrasiklinli besiyeri içeriği

1000 ml için	
Distile su	670 ml
Bacto agar	15 g
50X VB tuzları	20 ml
% 20 glukoz çözeltisi	10 ml
Steril histidin HCl (% 0,5)	10 ml
Steril 0,05 mM biyotin	6 ml
Steril ampisilin çözeltisi	3,15 ml

Bu besi yeri, pKM101 plazmidini taşıyan suşların dirençlilik özelliklerinin test edilmesi ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır. Besi yeri içinde yer alan %0,5 L-histidin HCl çözeltisi ile 0,05 mM biotin çözeltisi, steril bir kapta steril distile su ile çalkalanarak hazırlanmıştır.

0.05 mM Histidin-Biyotin Çözeltisi

Tablo 3.3.5. Histidin-Biyotin çözeltisi içeriği

250 ml için	
Distile su	250 ml
L-histidin HCl (MA: 191,7)	24 mg
D-biyotin (MA: 244,3)	30,9 mg

Bu çözelti, her 100 ml'lik üst agara 10 ml eklenerek kullanılmıştır. Deney sisteminde kullanılan suşlar; histidin oksotrofu olmaları sebebi ile, histidin-biotin çözeltisi eklenmeyen ortamda üreme göstermezler. Ortama eser miktarda eklenen 0,05 mM histidin-biotin çözeltisi bakterilerin birkaç bölünme geçirmesine olanak sağlamaktadır. Çözelti, otoklavda 121°C'de 20 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Üst Agar (Top Agar)

Tablo 3.3.6 Üst agar içeriği

100 ml için	
Distile su	100 ml
NaCl	0.5 g
Bacto agar	0.6 g

Karışım, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Mutajenite deneylerinde test edilen kimyasal madde, bakteri ve 0.05 mM histidin-biotin çözeltisi karışımının homojen olarak karıştırılmasına olanak sağlayıp, minimal glukoz agarlı plaklar üzerine ikinci bir tabaka olarak eklenmesi amacı ile kullanılmıştır.

Kristal Viyole Çözeltisi (%0,1'lik)

Tablo 3.3.7 Kristal viyole çözeltisi içeriği

100 ml için	
Distile su	100 ml
Kristal viyole	0,1 g

Suşların rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarının kontrol edilmesi sırasında kullanılmıştır.

Sıvı Ortam (Nütrient Broth)

Tablo 3.3.8. Nutrient Broth içeriği

100 ml için	
Distile su	1000 ml
Oxoid nütrient broth No:2	15 g

Bakterilerin üretilmesinde kullanılan bu ortam, 121C°'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Nütrient Agarlı Besi Yeri

Tablo 3.3.9. Nutrient agarlı besiyeri içeriği

1000 ml için	
Distile su	1000 ml
Oxoid nütrient broth No:2	15 g
Bacto agar	15 g

Bu besi yeri, bakteri üretmek için kullanılan katı ortamdır. Deney sisteminde kullanılacak suşların uvrB, rfa mutasyonlarının kontrolünde ve

sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır. 121C°'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çalışmada Kullanılan Test Suşlarının Üretilmesi

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşları, ya sıvı ortamda üretilip küçük steril filtre disklerle emdirilmiş olarak ya da liyofilize olarak temin edilmiştir. Diske emdirilmiş olarak elde edilen suşlarda, bakteri emdirilmiş diskin yüzeyi öncelikle nütrient agarlı plağa sürülerek temizlenmiş ve daha sonra sıvı ortam içerisine aktararak üremesi sağlanmıştır. Liyofilize halde gelen suşları kullanabilmek için ise, aseptik şartlarda kültürü sulandırmak amacıyla üzerine sıvı ortam eklenmiştir. Sulandırılan kültürden nütrient agarlı plağa tek koloni ekim tekniği uygulanarak bakteri ekimi yapılmıştır.

Nütrient agarlı plaklar, 37°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından üreme açısından kontrol edilmiştir. Tek kolonilerin gözlenebilmesi durumunda, sağlıklı görünen bir koloni alınarak yeterli histidin, biotin ve ampisilin ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklara tek koloni ekim tekniği yapılmıştır. Bu saflaştırma basamağı en az 2 defa tekrar edilmiştir. Saflaştırma basamağında, uygun çözeltiler ve besinler (nütrient) ile desteklenmiş minimal glukoz agarlı ortamlar yerine nütrient agarın da kullanılabildiği, fakat bu durumda kontaminasyon riskinin arttığı bilinmektedir. Minimal glukoz agarlı plaklar üzerinde iyi bir üreme gözlemek için 37°C'de 2 günlük inkübasyon gereklidir (355).

Ames test sistemi uygulanırken, sitotoksikite ve mutajenite deneyleri sırasında $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml kullanılması öngörülmektedir. Üreme miktarı spektrofotometrik ölçümlerle veya nütrient agarlı plak üzerinde canlı hücre sayımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada Kullanılan Suşların Genetik İşaretlerinin Kontrolü

Histidin Gereksiniminin Kontrolü

Kullanılan test suşlarının tümü, *histidin oksotrofudurlar* (*his⁻*). Suşların bu karakterleri, aynı koloninin minimal glukoz agarlı plağa ve histidin ile desteklenmiş minimal agara ekilerek üremelerinin karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Bu karakter, suşların minimal glukoz agarlı ortamda üreme göstermemeleri ile birlikte, histidin ile desteklenen ortamda üremeleri sonucunda doğrulanmaktadır. Histidin gereksinim kontrolünde kullanılan minimal glukoz agarlı petri'ler; 20 ml 50×VB tuzları, 100 ml %20'luk glukoz solüsyonu, 8ml %0,5'lik histidin solüsyonu, 8ml %0,01'lik biyotin solüsyonu, 15 gr agar, 900ml distile su kullanılarak; histidinsiz minimal glukoz agarlı petri'ler sadece histidin solüsyonunun ilave edilmemesi ile hazırlanmıştır.

Biyotin Gereksiniminin Kontrolü

Test sisteminde kullanılan suşlar, *bio* genini kapsayan *uvrB* delesyonuna sahip oldukları için biyotine de ihtiyaç duymaktadırlar. Suşlar; histidin-biyotin ile zenginleştirilmiş minimal glukoz agarlı ortama ve yalnızca biyotin ile zenginleştirilmiş minimal glukoz agarlı ortama ekilirler. Yalnızca biyotin ile zenginleştirilen ortamda üreme gözlenmemesine rağmen diğer plakta üreme gözlemlenmesi ise bu karakteri doğrular. Biyotin ihtiyacının kontrolü çok gerekli değildir. Çünkü *bio* geninde meydana gelen mutasyon geri döndürülemez.

pKM101 Plazmid Varlığının Kontrolü

Deney sisteminde kullanılan tüm suşlar, ampisilin direnç faktörünü taşımaları açısından kontrol edilmiştir. Dirençlilikten sorumlu bu plazmid, SOS onarım sistemine ait genler taşıması sebebi ile kimyasal mutajenlere ve UV ile indüklenen mutasyonlara karşı hassasiyeti artırır. Plazmid üzerinde, bir belirteç olarak kullanılabilecek ampisilin direnç geni bulunmaktadır. Dolayısıyla daha önceden *his⁻* karakteri doğrulanan koloniler histidin-biyotin-ampisilin ile

desteklenmiş minimal glukoz agarlı plaklara ekilmiştir. Bu plaklarda üremenin gözlenmesi, kolonilerin plamidi taşıdıklarını gösterir.

***rfa* Mutasyonu Varlığının Kontrolü**

his⁻ ve plazmid taşıma özellikleri doğrulanan kolonilerin gecelik kültürlerinden bir miktar alınarak (yaklaşık 0,1 ml), nütrient agarlı plaklara aktarılmıştır. Yayma ekim tekniği ile agar üzerine yayılmış; plağın orta kısmına ise filtre kağıdından hazırlanmış, 10 µl kristal viyole çözeltisi emdirilmiş (1mg/ml) disk yerleştirilmiştir. Plaklar, bir gece 37°C’de inkübe edildikten sonra diskler etrafında inhibisyon zonu gözlenmiştir. Diskin çevresinde kalan bu inhibisyon zonu, oldukça büyük bir molekül olan kristal viyolenin hücre içerisine girerek bakterinin ölümüne neden olduğunu gösterir.

***uvrB* Mutasyonunun Kontrolü**

his⁻, *rfa*, plazmid taşıma karakterleri doğrulanan koloniler nütrient agarlı plaklara ekilmiş, her bir suş için aynı kolonilerden 2 set hazırlanmıştır. Bu plaklardan bir tanesi, kapağı açılarak 15 watt’lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye boyunca ışınlanmıştır. Her bir suş için hazırlanan diğer set ise kontrol plağı olmak üzere, ışınlanan plaklar ile 37°C’de gecelik inkübasyona kaldırılmıştır. Kontrol plaklarında üreme olmasına rağmen, ışınlanan plaklarda üreme olmaması *uvrB* mutasyonunu doğrular.

Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısının Kontrolü

Deney sisteminde, test suşlarının histidinsiz ortamda üremelerine olanak sağlayan kendiliğinden geriye dönüş frekansları kontrol edilmiştir. Bu bakterilerin oluşturduğu koloniler, düzenli bir dağılım gösteren bir çayır üzerinde kolayca gözlenebilirler. Her suşun, kendine özgü bir geriye dönüş frekansı vardır. Bu değerler, S9 fraksiyonu yokluğunda, TA98 için yaklaşık olarak 30-50, TA100 için 120-200 olabilmekte; S9 fraksiyonu varlığında ise değişim gösterebilmektedir (356). Geriye dönen koloni sayısının hesaplanması amacıyla, 100 ml steril üst

agara 10 ml 0,05 mM steril histidin-biotin çözeltisi eklenmiş ve karışım her bir steril deney tüpünde 2,5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Üst agarın donma eğilimi sebebi ile çalışmalar sırasında sıcak su banyosu 37°C'ye ayarlanmış ve tüpler deney sırasınca bu banyoda bekletilmiştir. Bu tüplere son olarak her suşun gecelik kültüründen 0,1 ml eklenmiş ve minimal glukoz agarlı plaklara dökülerek tüm yüzeye yayılması sağlanmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyonun ardından, geriye dönen kolonilerin sayımı yapılmıştır. Geriye dönüş testi, her suş için her deneyde yapılarak ortalama değerler alınmıştır (356).

Master Plakların Hazırlanması

Mutajenite çalışmalarında kullanılmak üzere, genetik işaretleri kontrol edilmiş TA98 ve TA100 suşları için, master plaklar hazırlanmıştır. İkinci veya daha sonraki saflaştırma plaklarından alınan en az 5 tek koloni uygun çözelti ve besinlerle desteklenmiş plaklara ekilmiştir, +4°C'de saklanan master plaklar ise 2 ay süreyle, genetik işaretleri kontrol edilmeksizin kullanılabilir.

3.3.2. Çalışmada Kullanılan Restoratif Materyallerin Hazırlanması

Materyallerin Üretici Firmaların Önerileri Doğrultusunda Hazırlanması

Tez çalışmasında değerlendirmeyi planladığımız adeziv restoratif materyaller, daha önce belirtildiği şekilde teflon kalıplarda üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır.

Materyallerin Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplam 5 ml ekstrakt ortamı kullanabilmek amacı ile, her gruptan restoratif materyaller için 15, primer, adeziv rezin ve yüzey örtücü için 30 adet hazırlanan; örneklerin besi ortamı içinde bekleme sürelerine göre 2 grup (1gün, 7 gün) oluşturulmuş ve örnekler ekstraktları alınmadan hemen önce üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Örnekler DMSO içinde 37°C'de inkübe edilmiş ve örneklerin yüzey alanı birim hacim başına yaklaşık olarak 3 cm²

(restoratif materyaller için 3,06 cm², primer, dentin bağlayıcı ve yüzey örtücüler için 3,29 cm²) olarak hazırlanmıştır (369).

3.3.3. Mutajenite Testinin Uygulanması

Mutajenik değerlendirmeler, test bileşiklerinin bakteri için öldürücü olmayan dozlarının belirlenmesi sonrasında yapılmıştır.

Sitotoksik Etkinin Saptanması

Ames test sisteminde kullanılan restoratif materyal ekstraktlarının, bakteri için öldürücü olmayan dozlarının saptanabilmesi amacı ile üst agarın her bir steril tüpe 2,5 ml olacak şekilde dağıtılmasının ardından; bu agara uygun derişimdeki TA 100 suşunun gecelik kültüründen 0,1 ml ve restoratif materyallerin belirlenen konsantrasyonlarından en fazla 0,1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Karışım nütrient agarlı plaklar üzerine yayılmış ve 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ekstrakt eklenen plaklar ile kontrol plaklarındaki koloni sayıları karşılaştırılarak bileşiklerin sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

Mutajenite Testi (Plak İnkorporasyon Testi)

AMES/Salmonella mikrozom test sisteminde plak inkorporasyon yöntemi (*standart plate incorporation*) uygulanmıştır. Bu teknikte; restoratif materyal ekstraktı ve bakteriyel test suşu üst agara ilave edilerek minimal glukoz agarlı plaklara dökülmektedir (355). 37°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra ise *his*⁺ haline dönüşen koloniler sayılır. Mutajenite testinde, restoratif materyal ekstraktı ve bakteriyel test suşu kültürü üst agara eklenerek, homojen bir şekilde minimal glukoz agarlı plaklar üzerinde yayılmıştır. Her bir suş için ayrıca pozitif ve negatif kontrol plakları hazırlanmış, TA 98 için pozitif kontrol olarak danomisin, TA100 için ise sodyum azid her deneyde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol plakları ile birlikte bütün plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve *his*⁻ karakteri geri dönen, yani *his*⁺ hale gelen, koloniler sayılmıştır.

Çalışma sırasında her bir steril tüpe 0,5 mM histidin-biyotin çözeltisi eklenmiş 48°C'deki 2,5 ml üst agar, restoratif materyal ekstraktından en fazla 0,1 ml ve test suşunun uygun derişimdeki gecelik kültüründen 0,1 ml eklenerek vorteks yardımı ile 3 saniye boyunca karışması sağlanmıştır. Üst agarın donma eğiliminde olması nedeni ile, bu işlemler kısa bir süreç içinde tamamlanarak minimal glukoz agarlı plaklar üzerine yayılmış ve test bileşığının her bir dozu için 3 plak kullanılmıştır. Deneyde test suşlarının geriye dönme frekanslarını kontrol etmek amacıyla kullanılan negatif ve pozitif kontrol plaklarından da üçer adet hazırlanmıştır. Ames mutajenite test sisteminde mutasyon; ortamdaki histidin tükenmesinden sonra, agar üzerinde koloni oluşturan histidin prototroflarının sayılması sonucunda hesaplanır. Mutajen tanımlamasının yapılabilmesi için histidin prototroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katından fazla olup, doza bağılı bir artışın söz konusu olması gerekmektedir.



Şekil 3.3.1. Ames testi uygulaması

3.4. Materyallerin Pulpa Dokusu Üzerindeki Etkilerinin *İn Vivo* Olarak Değerlendirilmesi

3.4.1 Materyallerin Bireylere Uygulanması

Hacettepe Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Etik Kurulundan (03.07.2008 tarihli, 2008/08 sayılı toplantı ve HEK 08/136-26 sayılı karar) çalışma için olur raporu alındıktan sonra, Diş hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'na başvuran; alt ve üst çenede yer darlığı nedeniyle çekim endikasyonu olan birinci veya ikinci premolar dişlere sahip bireyler seçilmiştir. Araştırmaya katılacak gönüllü bireylerde aranacak kriterler şu şekilde belirlenmiştir:

- Sistemik hastalığı olmaması,
- Dişleri tamamen sürmüş ve kök oluşumlarının tamamlanmış olması,
- Dişlerinde çürük olmaması,
- Dişlerinde restorasyon bulunmaması,
- Diş yüzeylerinde aşınma olmaması,
- Periodontal problemi bulunmaması,
- Alt ve üst çenede yer darlığı nedeniyle çekim endikasyonu olan

premolar dişlere sahip olması, ve

- Hacettepe Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'na başvurmuş olmasıdır.

Araştırmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastalara ve reşit olmayan bireyler ve ailelerine, yapılacak restoratif işlemler ve çalışma hakkında bilgi verilerek yazılı onamları alınmıştır. Çalışma kapsamına almak için seçilen gönüllü bireylerin bütün dişlerinden aproksimal çürük ve apikal patoloji açısından incelemek üzere radyograf alınmış ve vitalite testi yapılarak dişlerin canlılıkları tesbit edilmiştir.

Restorasyonlar yaşları 12-34 arasında değişen (ortalama $16,8 \pm 4,7195$), 14 kız 6 erkek olmak üzere 20 bireyde toplam 48 adet premolar dişte uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilmesi planlanan dişlerin değerlendirmeleri yapıldıktan sonra, gönüllü bireylerin istekleri doğrultusunda lokal anestezi (Safecaine, VEM ilaç, Türkiye) uygulanmıştır. Restorasyonların uygulanacakları diş yüzeyindeki plağı uzaklaştırmak amacı ile polisaj patı (Sultan, ABD) eşliğinde polisaj yapılmıştır. Tüm gruplar için dişlerin bukkal yüzeylerinde su soğutması altında, yüksek devirde elmas fissür frezle (835-012-4, Diatech, İsviçre) 2 mm derinliğinde, servikookluzal olarak 1,5 mm ve meziodistal olarak 3 mm boyutlarında standart beşinci sınıf kaviteler oluşturulmuştur. Restorasyonda kullanılan fissür frezler, dişte ısı ve travma oluşturmaması için 4 kereden fazla kullanılmamıştır. Araştırma için uygun bulunan bu 48 adet diş 4 gruba (n:12) ayrılmıştır:

Tablo 3.4.1 Çalışmada kullanılan adeziv restoratif sistemler

 Grup 1 Asit ve dentin bağlayıcı “XP Bond” ile uygulanan kompozit rezin “Quixfill”	 Grup 2 Özel primer ve bağlayıcı ajanı ile uygulanan siloran sistem “Silorane”	 Grup 3 Özel yüzey örtücüsü ile uygulanan güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer “Equia”	 Grup 4 Primeri ile uygulanan ışıkla polimerize edilen nano-iyonomer restoratif “Ketac N-100”
--	--	---	---

Grup 1: Kavite preparasyonundan sonra mineye (30 sn) ve dentine (15 sn) %37,5'lik ortofosforik asit (3M ESPE, St Paul, ABD) uygulanmıştır. Kavite, 15 sn su ile yıkandıktan sonra hafifçe hava sıkılarak kurutulmuş ve ardından XP Bond üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmış ve 5 sn hava sıkılmasının ardından 10 sn LED ile polimerize edilmiş ve kompozit rezin restoratif materyal olan Quixfill kavitelere yerleştirilerek yine üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40 sn polimerize edilmiştir. Restorasyonlar tamamlandıktan sonra polisaj diskleri (Optidisc, Kerr, Belçika) ile polisajları yapılmıştır.

Grup 2: Kavite preparasyonundan sonra, dişler rulo pamuklar ile izole edilmiş ve Silorane adeziv sistemin ilk aşaması olan Silorane Primer kaviteye uygulandıktan sonra üretici firmanın önerileri doğrultusunda 15 sn beklenerek hafifçe hava sıkılmış ve ardından 10 sn polimerize edilmiştir. Ardından Silorane adeziv sistemin bond bileşeni kaviteye uygulanarak yine üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10 sn polimerize edilmiştir. Dentin bağlayıcının uygulanmasından sonra, restoratif materyal Silorane restoratif, kaviteye yerleştirilerek üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40 sn polimerize edilmiştir. Restorasyonlar tamamlandıktan sonra polisaj diskleri ile polisajları yapılmıştır.

Grup 3: Kavite preparasyonunun ardından gerekli izolasyon rulo pamuklarla sağlanarak güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer restoratif olan Fuji IX GP Extra amalgamatörde 10 sn süre ile karıştırıldıktan sonra özel uygulama aparatı ile kaviteye yerleştirilmiş ve sertleşmesi beklenmiştir (2 dak 30 sn). Restoratif materyalin sertleşmesinin ardından polisaj diskleri ile polisajı yapılan restorasyon üzerine, bu restoratif materyalin birlikte kullanıldığı G Coat Plus yüzey örtücüsü uygulanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda 20 sn polimerize edilmiştir.

Grup 4: Kavite preparasyonundan sonra nanoiyonomer restoratif Ketac N 100 sisteminde bulunan primer, 15 sn boyunca kavite yüzeyine uygulanmış hafifçe hava sıkıldıktan sonra 10 sn üretici firmanın önerileri doğrultusunda polimerize edilmiştir. Primer uygulamasının ardından; uygulama aparatından karıştırma kağıdına aktarılan nanoiyonomer restoratif Ketac N 100, spatül yardımı ile 20 sn

boyunca karıştırılarak kavitelere yerleştirilmiş ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda 30 sn ışık uygulanarak sertleşmesi sağlanmıştır. Restorasyonlar tamamlandıktan sonra polisaj diskleri ile polisajları yapılmıştır.

Tüm gruplar restorasyonların uygulandığı 7. ve ya 30. günlerde lokal anestezi altında çekilmek üzere (toplamda n=6 olan 8 grup oluşturacak şekilde) iki alt gruba ayrılmıştır.

3.4.2. Histopatolojik Değerlendirmelerin Yapılması

Araştırmanın *in vivo* kısmının laboratuvar değerlendirmeleri, H.Ü Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Tüm gruplar için çekimi takiben, dişlerin köklerinin apikal üçlülere, su soğutması altında, yüksek devirde, elmas fissür frezlerle (85-012-4, Diatech, İsviçre) kesilmiş ve %10'luk formaldehit solüsyonunda 96 saat bekletilerek fikse edilmiştir. Dişler, fiksasyonu takiben %20'lik formik asit ile solüsyonun zaman zaman değiştirildiği 6-8 hafta boyunca dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifiye edilmelerinin ardından dişler, su ile yıkanarak parafine gömülmüş ve kalınlıkları 7-10 mikron arasında değişen, bukkolingual yönde, kavite tabanından pulpaya doğru kesitler alınmıştır. Alınan kesitler histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin, bakteri varlığının tesbiti için ise gram boyası ile boyanmıştır. Kesitlerin histopatolojik değerlendirmeleri ve kavite tabanı ile pulpa arasında kalan dentin dokusunun kalınlık ölçümleri ışık mikroskobu (Zeiss, Axioskop 2, Almanya) altında yapılmıştır (Şekil 3.4.1.)



Şekil 3.4.1. Histopatolojik değerlendirmelerin yapılması

Histopatolojik değerlendirmeler, Cox ve diğ.'nin (370) tanımladığı ve aşağıda belirtilen kriterlere göre yapılmıştır :

a. İnflamatuvar hücre cevabı kriterleri:

1. Kavite tabanında kesilmiş dentin tübüllerinin altındaki pulpa dokusunda inflamatuvar hücrelerin olmaması ya da çok az miktarda bulunması
2. Akut (A): Polimorfonükleer lökositlerin izlendiğı akut doku lezyonu
Kronik (K): Mononükleer lenfositlerden oluşan kronik inflamatuvar hücre yanıtı
3. Koronal pulpanın 1/3'ünü veya daha fazlasını kaplayan kısmında polimorfonükleer lökositlerin yoğun göçü veya abse şeklinde oluşan inflamatuvar hücre yanıtı.
4. Nekrotik pulpa

b. Doku düzensizliği kriterleri:

1. Kalan dentin dokusundaki dentin tübüllerinin veya kavite tabanı altındaki pulpada, doku morfolojisinin normal veya normale yakın olması.
2. Kavite tabanı altında doku morfolojisinin bütünlüğünün bozulması, ancak derinde, pulpa dokusunun normal olması.
3. Kavite tabanı altında, genel pulpa morfolojisi ve hücre organizasyonu bozukluğu.
4. Pulpanın en az koronal üçlüsüne kadar ilerlemiş nekroz.

c. Tamir dentin oluşumu:

1. Kavite preparasyonu altında, pulpayı çevreleyen dentin kalınlığında bir artış gözlenmemesi.
2. Kavite preparasyonu sınırındaki kesik tübüllerin altında ince, küçük hacimli tamir dentini görülmesi.
3. Kavite preparasyonu altındaki kesik tübüllerin altında yeni, büyük hacimli tamir dentini izlenmesi.

d. Bakteri boyanma kriterleri

1. Bakteriyel boyanmanın olmaması.
2. Kavite duvarları boyunca pozitif (+) bakteriyel boyanma görülmesi.
3. Kavite preparasyonu altındaki kesik dentin tübüllerinin içinde pozitif (+) bakteriyel boyanma görülmesi.
4. Pulpa içinde pozitif (+) bakteriyel boyanma görülmesi.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS 16.0 paket programı kullanılmıştır. HPLC analizi sonrasında monomer salımının değerlendirilmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi; 1, 2 ve 7 günlük ekstraktlarda gözlenen monomer salımının karşılaştırılmasında Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi uygulanmıştır ($p=0,05$).

Hücre kültürü üzerinde uygulanan MTT testinin istatistiksel değerlendirmesinde, adeziv restoratif materyallerin toksik etkileri Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi ile; bu materyallerin sitotoksik etkilerinin kendi aralarında karşılaştırılması ise Bonferonni Yöntemi ile analiz edilmiştir ($p=0,05$). Adeziv restoratif materyallerden gözlenen monomer salımı ile bu materyallerin hücre kültürü üzerinde gösterdiği toksik etki arasındaki ilişki ise Spearman'ın rho Katsayısı ile analiz edilmiştir ($-1 < r < 1$). Ames testi bulgularının değerlendirilmesinde, materyallerin her iki test suşu üzerinde, farklı dozlarda mutajenik etkilerinin olup olmadığının tesbiti için İki Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır ($p=0,05$). Çalışmasının *in vivo* kısmında, dört adeziv restoratif sistemin inflamasyon hücre cevabı, yumuşak doku organizasyonu, tamir dentin oluşumu ve bakteri boyanması kriterleri , kalan dentin kalınlığı ve yaş faktörleri arasındaki ilişki Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir ($p=0,05$).

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, güncel adeziv restoratif sistemlerden salınan monomer miktarı tesbitinin ardından bu materyallerin biyouyumlulukları *in vitro* ve *in vivo* koşullarda değerlendirilmiştir.

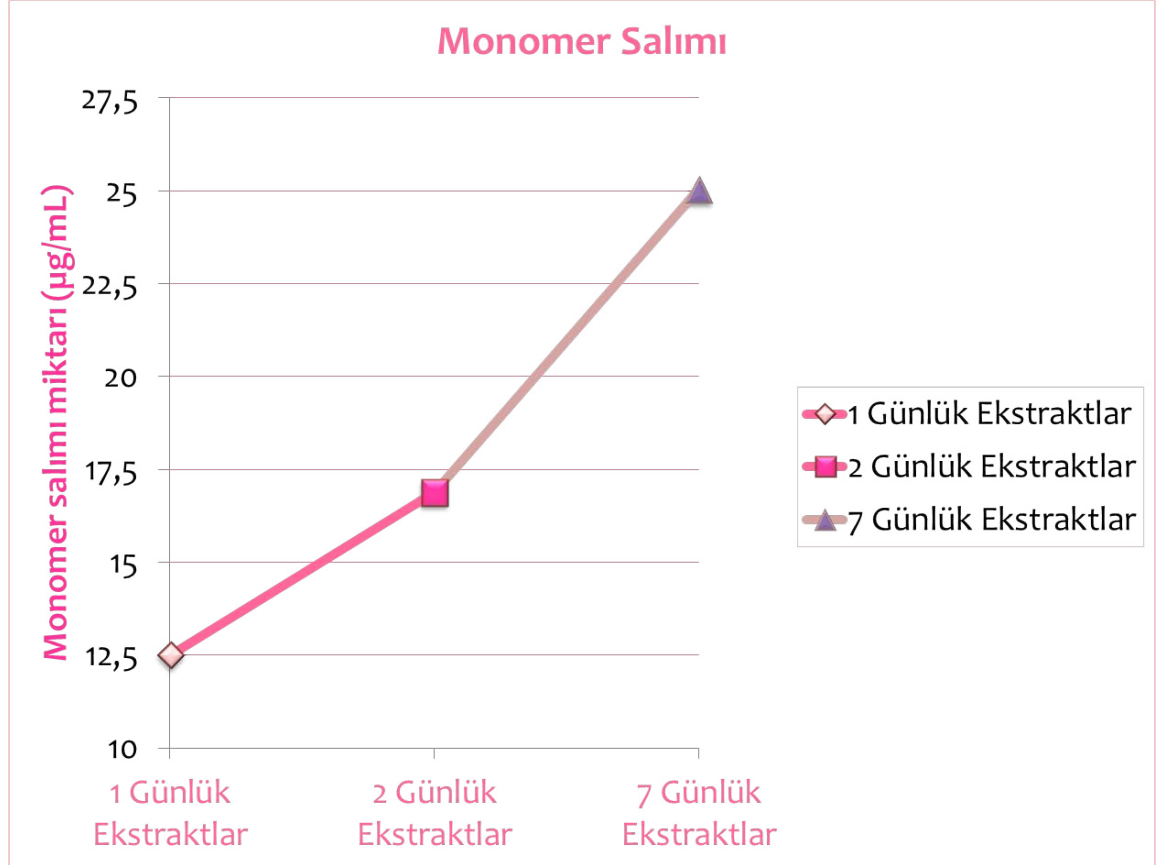
4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Bulguları

HPLC sonrasında test edilen adeziv restoratif materyallerden salınan artık monomer miktarı Tablo 4.1.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1.1. Adeziv restoratif materyallerde saptanan monomer salımı miktarı

Materyaller	Monomerler	Monomer salımı $\pm$ Ss ($\mu\text{g/mL}$)		
		1 günlük ekstraktlar	2 günlük ekstraktlar	7 günlük ekstraktlar
XP Bond	UDMA	22,85 $\pm$ 0,06	26,49 $\pm$ 0,11	38,98 $\pm$ 1,07
	TEGDMA	0,66 $\pm$ 0,14	2,17 $\pm$ 0,02	10,0 $\pm$ 0,43
	HEMA	36,31 $\pm$ 0,15	62,92 $\pm$ 0,22	93,30 $\pm$ 0,56
Quixfill	UDMA	0,38 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,005
	TEGDMA	0,76 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,02
Silorane Primer	HEMA	4,02 $\pm$ 0,60	9,97 $\pm$ 0,93	27,14 $\pm$ 1,31
	Bis-GMA	11,47 $\pm$ 0,07	16,66 $\pm$ 0,19	14,10 $\pm$ 0,13
	BPA	Tesbit edilmedi	Tesbit edilmedi	Tesbit edilmedi
Silorane Bond	TEGDMA	1,44 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,00	3,11 $\pm$ 0,05
G Coat Plus	UDMA	7,09 $\pm$ 0,58	7,43 $\pm$ 0,13	9,87 $\pm$ 0,17
	MMA	0,84 $\pm$ 0,00	7,45 $\pm$ 0,02	16,50 $\pm$ 2,24
Ketac N 100 Primer	HEMA	101,94 $\pm$ 0,96	112,64 $\pm$ 0,45	143,78 $\pm$ 0,16
Ketac N 100 Restoratif	HEMA	0,08 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,02	6,35 $\pm$ 0,09
	Bis-GMA	0,02 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,00	4,81 $\pm$ 0,08
	TEGDMA	0,08 $\pm$ 0,00	3,49 $\pm$ 0,00	6,48 $\pm$ 0,00
	EGDMA	0,09 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00
	BPA	Tesbit edilmedi	Tesbit edilmedi	Tesbit edilmedi

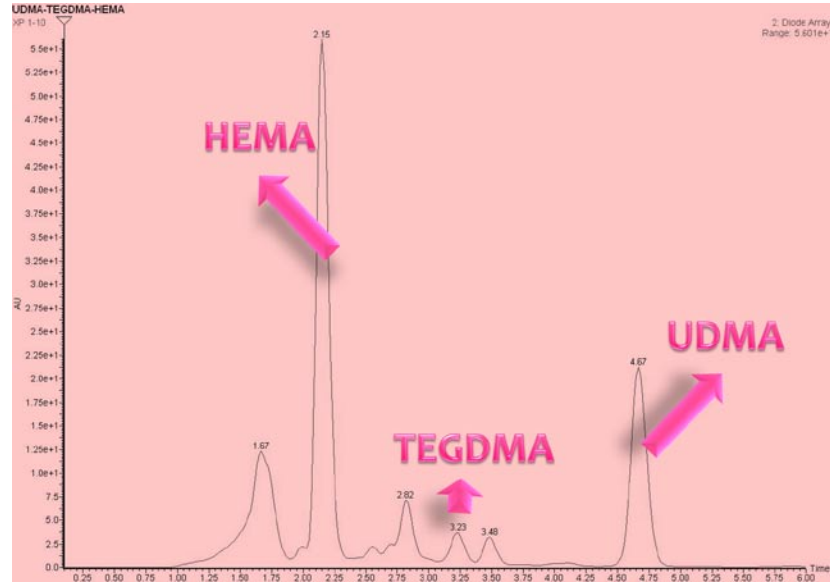
Elde edilen bulguların Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesinin ardından (Şekil 4.1.1.) en yüksek monomer salımının 7 günlük ekstraktlarda olduğu tesbit edilmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.1.1. Bir, 2 ve 7 günlük ekstraktlarda gözlenen monomer salımı miktarı

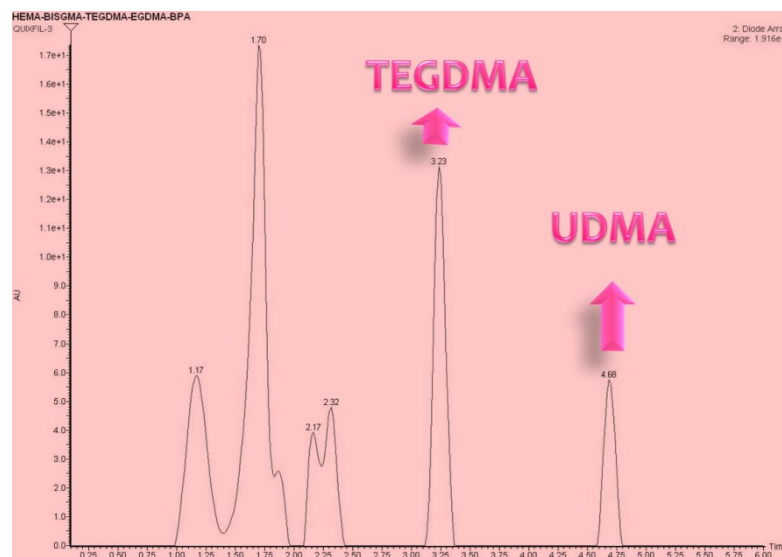
4.1.1. Hibrit Posterior Kompozit Restoratif Sistem'e ait HPLC Bulguları (XP Bond ve Quixfill)

Test edilen adeziv restoratif materyallerden ilki, içeriğinde UDMA, TEGDMA, ve HEMA bulunduran iki aşamalı etch&rinse sistem XP Bond'dur. Bu materyal içinde en yüksek salımın HEMA'ya ait olduğu ($p<0,001$) ve en fazla 7 günlük ekstraktta salım gözlemlendiği saptanmıştır. Şekil 4.1.2.'de XP Bond'a ait 1 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan monomerlerin kolondan ayrılma süreleri UDMA için 4,93, TEGDMA için 3,32 ve HEMA için 2,17 dak'dır.



Şekil 4.1.2. XP Bond'un 1 günlük ekstraktına ait kromatogram

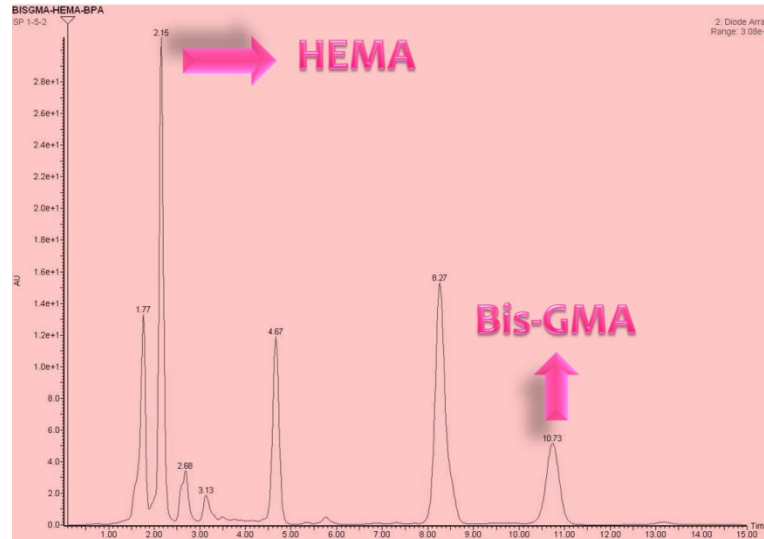
XP Bond ile kombine olarak uygulanan posterior hibrit kompozit rezin Quixfill ise en düşük monomer salımının izlendiği materyaldir. Fakat UDMA ve TEGDMA içeren bu materyalden gözlenen monomer salımı ile Silorane Primer, Silorane Bond ve G Coat'dan gözlenen salımlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,005$). Şekil 4.1.3.'te Quixfill'e ait 1 günlük ekstraktan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan monomerlerin kolondan ayrılma süreleri UDMA için 4,93, TEGDMA için 3,32 dak'dır.



Şekil4.1.3. Quixfill'in 1 günlük ekstraktına ait kromatogram

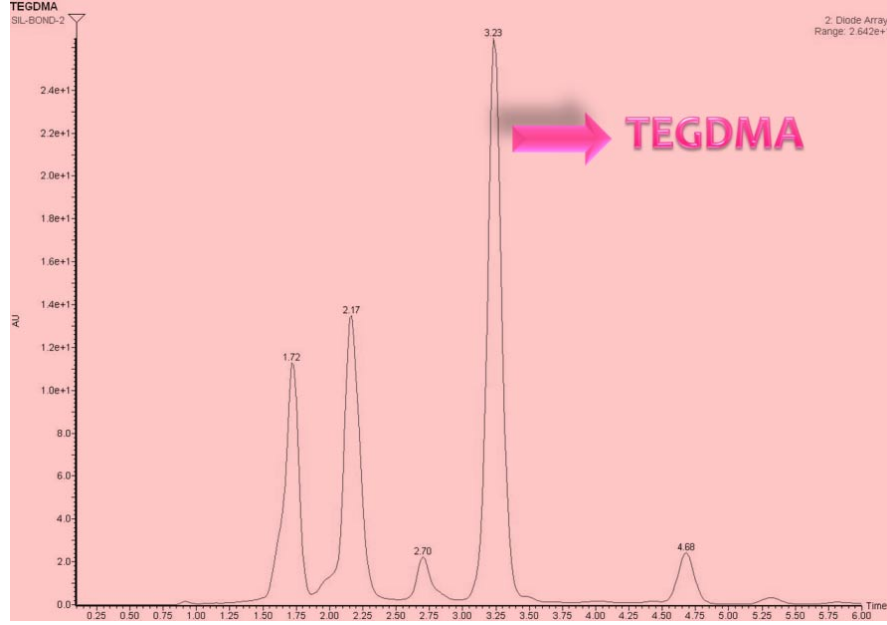
4.1.2 Silorane Sistem'e ait HPLC Değerlendirmeleri (Silorane)

Silorane sistem içinde uygulanan adeziv sistemin ilk basamağı Silorane Primer, içeriğinde HEMA ve Bis-GMA bulunduran bir materyaldir. Elde edilen bulgular sonucunda HEMA salımının en yüksek 7 gün sonunda izlenmesinin yanısıra Bis-GMA için ekstrakt süresi ile doğru orantılı bir salım artışı gözlenmemiştir. Şekil 4.1.4.'te Silorane Primer'e ait 2 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan monomerlerin kolondan ayrılma süreleri Bis-GMA için 11,17 ve HEMA için 2,17 dak'dır.



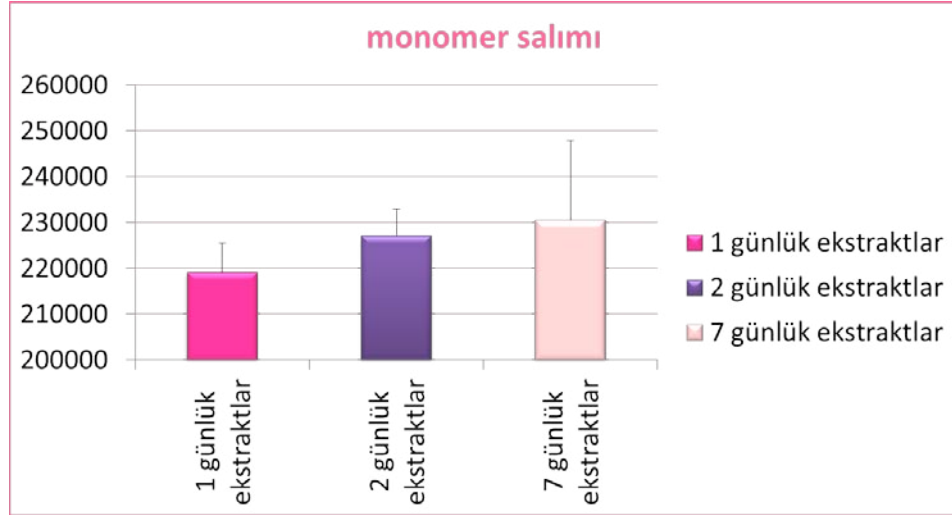
Şekil 4.1.4. Silorane Primer'in 2 günlük ekstraktına ait kromatogram

Silorane Primer ardından uygulanan Silorane Bond içeriğinde TEGDMA bulundurur. Bu materyalden gözlenen TEGDMA salımı ekstrakt süresinin artması ile bir artış göstermiştir. Şekil 4.1.5'de Silorane Bond'a ait 2 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan TEGDMA'nın kolondan ayrılma süresi 3,32 dak'dır.



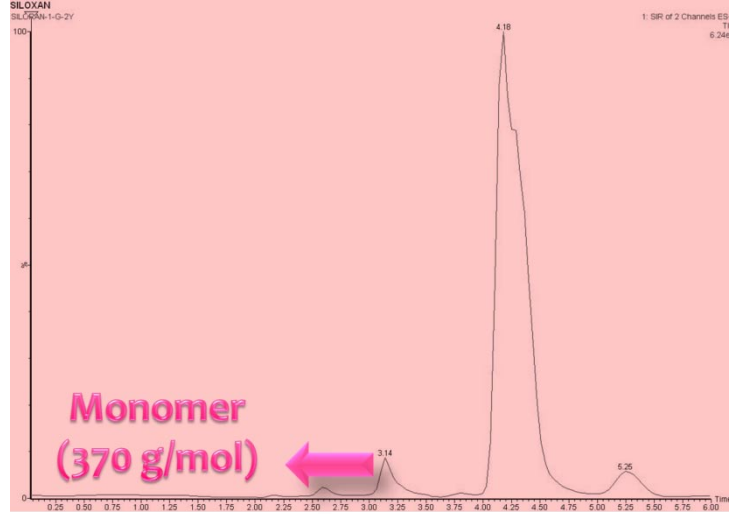
Şekil 4.1.5. Silorane Bond'un 2 günlük ekstraktına ait kromotogram

Silorane Restoratif, içeriğinde bulunan 4 farklı monomerin kütle dedektör ile saptanmasının ardından moleküler ağırlığı 370 g/mol olan monomerin salımı dışında moleküler ağırlıkları 736, 920 g/mol olan monomerlerin salımları gözlenmemiştir. Bununla birlikte Silorane Restoratif içinde bulunan monomerlerin bozunma ürünü olarak ortaya çıkabilme ihtimali düşünülen ve moleküler ağırlığı 370 g/mol olan D5 salımı da gözlenmemiştir. Salımı gözlenen materyalin, referans monomerler elde edilemediği için miktarları belirlenememiş; pik noktasının altında kalan alanların hesaplanması ile günler arasında farklılık olup olmadığı değerlendirilmiş ve daha uzun ekstrakt süresinde daha fazla monomerin salındığı izlenmiştir (Şekil 4,1,6.).



Şekil 4.1.6. Silorane Restoratif'ten gözlenen monomer salımı

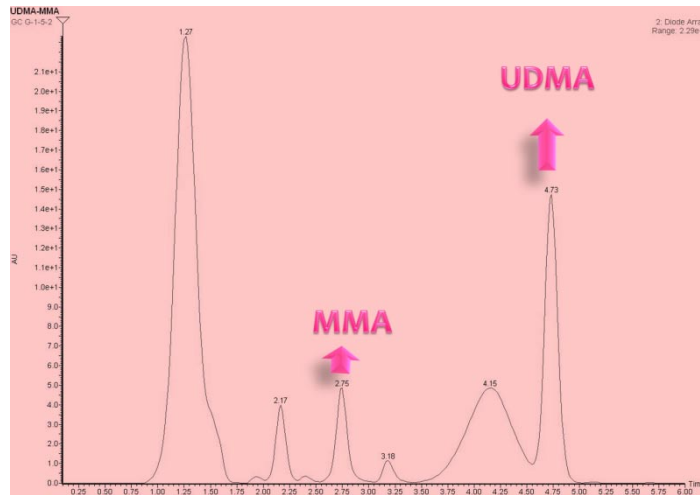
Üçyüzyetmiş g/mol moleküler ağırlığa sahip olan iki monomerin birbirinden ayırte dilmesinde kolondan ayrılış süreleri dikkate alınmıştır. D5'e ait çalışma çözeltisinde bu monomerin kolondan ayrılma süresi 4,66 dak'dır. Silorane Restoratif ekstraktında aynı moleküler ağırlığa sahip monomerin kütle dedektörle saptandığında kolondan ayrılma süresi ise 3,14 dak'dır. Bu iki sürenin farklı olması, Silorane Restoratif'e ait ekstraktta bulunan monomerin D5 olmadığını ortaya koymuştur. Şekil 4.1.7.'de Silorane'a ait 2 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Bu kromatogramda 4,18 dakikada pik oluşturan Silorane Restoratif içeriği referans makale ile moleküler ağırlığı kütle dedektörde saptanmaya çalışılmış 337 g/mol moleküler ağırlığa sahip bir başlatıcı olan izopropil-metil-difeniliyodinyum'dur.



Şekil 4.1.7. Silorane'nın 2 günlük ekstraktına ait kromatogram

4.1.3. Güçlendirilmiş Geleneksel Cam İyonomer Sistem'e ait HPLC Değerlendirmeleri (Equia)

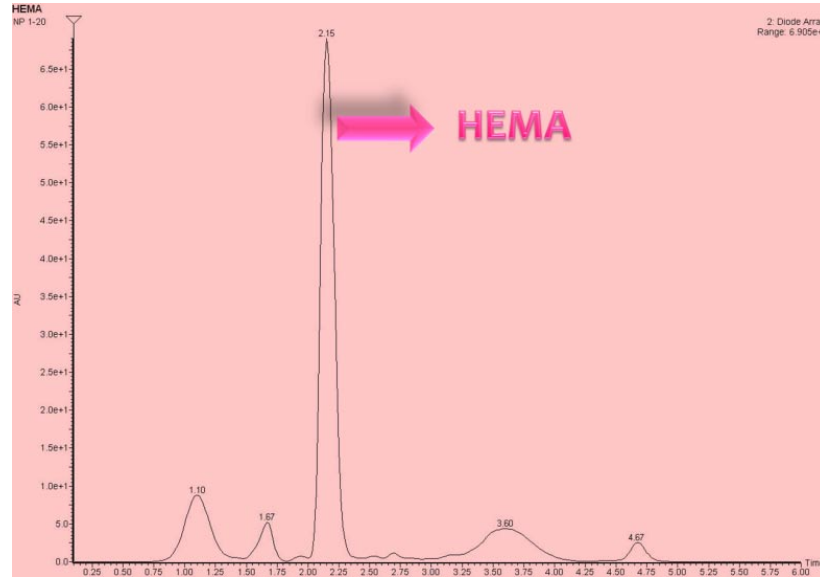
Fuji IX GP Extra monomer içermediği için HPLC ile monomer salımı yönünden değerlendirilmemiştir. Bu materyalin ardından restorasyon üzerine uygulanan G Coat Plus ise UDMA (üretanmetakrilat) ve MMA içeren bir yüzey örtücüdür. Bu materyalden gözlenen UDMA ve MMA salımı en yüksek 7 günlük ekstraktlarda gözlenmiştir. Şekil 4.1.8'de G Coat Plus'a ait 1 günlük ekstraktan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan monomerlerin kolondan ayrılma süreleri UDMA için 4,93, MMA için 2,77 dak'dır.



Şekil 4.1.8 G Coat Plus'ın 1 günlük ekstraktına ait kromatogram

4.1.4. Nano-iyonomer Restoratif'e ait HPLC Değerlendirmeleri (Ketac N-100)

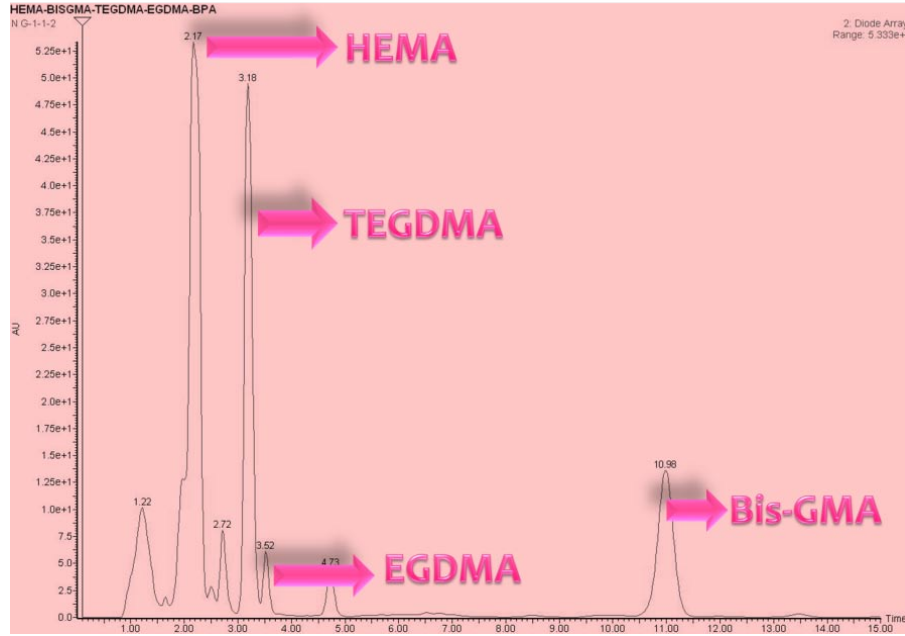
Ketac N 100 Primer, içeriğinde HEMA bulunduran ve nanoiyonomer retoratif Ketac N 100 öncesinde kaviteye uygulanan bir materyaldir. Bu materyalden salımı gözlenen HEMA miktarı en fazla 7 günlük ekstraktlardan elde edilmiştir. Adeziv restoratif materyaller içinde en yüksek salım gözlenen materyaldir ($p<0,001$). Şekil 4.1.9'da Ketac N 100 Primer'e ait 7 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan HEMA'nın kolondan ayrılma süresi dak'dır.



Şekil 4.1.9. Ketac N 100 Primer'in 7 günlük ekstraktına ait kromatogram

Nanoiyonomer restoratif Ketac N 100 içinde ise HEMA, Bis-GMA, TEGDMA ve PEGDMA bulundurur. Materyalden salımı gözlenen PEGDMA'nın monomeri EGDMA dışındaki monomerlerde ekstrakt süresi ile doğru orantılı artış gözlenmiştir. EGDMA ise farklı sürelerde benzer salım göstermiştir. Şekil 4.1.10.'da Ketac N 100'e ait 7 günlük ekstrakttan elde edilen kromatogram belirtilmiştir. Materyalin içinde bulunan monomerlerin kolondan ayrılma süreleri HEMA için 2,17, Bis-GMA için 11,17, TEGDMA için 3,32, EGDMA için 3,53 dak'dır. Bu materyal ekstraktında kolondan ayrılma süresi 3,18 dak olan BPA ile 3,32 dak olan TEGDMA'nın maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyları değerlendirildiğinde, BPA için 202, TEGDMA için 206 nm olarak belirlenmiştir.

Materyal ekstraktında 3,18 dakikada kolondan ayrılan monomerin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunun 206 nm olması bu materyalin TEGDMA olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.1.10 Ketac N 100 Restoratif'in 7 günlük ekstraktına ait kromatogram

4.2. Test Materyallerinin Sitotoksikite Değerlendirmeleri

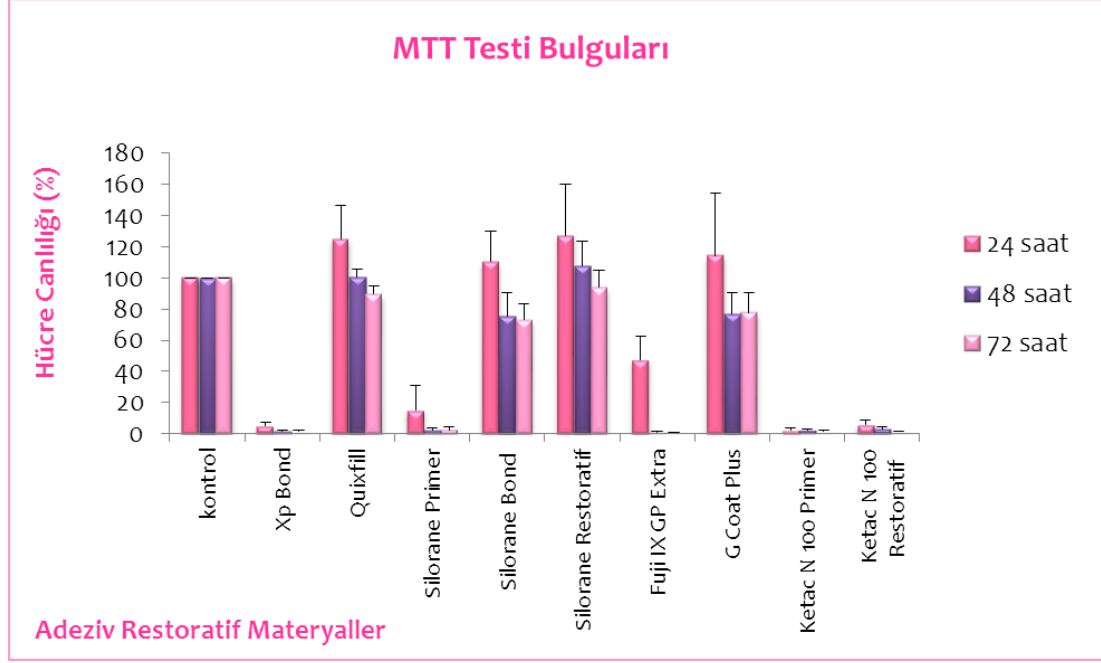
4.2.1 Adeziv Restoratif Materyallerin MTT Testi Bulguları

Test edilen materyallerin L929 hücre kültürü üzerine uygulanması sonucunda belirlenen yüzde hücre canlılığı, Tablo 4.2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.1 MTT Testi bulguları

Materyaller	Ekstrakt Süresi	Test Sonucunda Gözlenen Hücre Canlılığı (%)		
		Ortalama± Ss		
		24 saat	48 saat	72 saat
XP Bond	1 gün (n=3)	3,98 ± 0,81	1,28 ± 0,77	1,80 ± 0,38
	2 gün (n=3)	3,86 ± 2,29	1,68 ± 0,67	1,30 ± 0,70
	7 gün (n=3)	7,61 ± 1,55	2,10 ± 0,46	1,10 ± 1,42
	Toplam	5,15 ± 2,34	1,69 ± 0,66	1,40 ± 0,87
Quixfill	1 gün (n=3)	140,67 ± 20,52	101,06 ± 4,48	91,04 ± 6,87
	2 gün (n=3)	125,91 ± 20,09	103,07 ± 7,53	89,94 ± 5,96
	7 gün (n=3)	108,56 ± 16,86	98,77 ± 1,99	87,72 ± 2,97
	Toplam	125,05 ± 21,70	100,96 ± 4,86	89,56 ± 5,00
Silorane Primer	1 gün (n=3)	2,18 ± 1,98	2,21 ± 0,24	2,16 ± 0,87
	2 gün (n=3)	11,30 ± 2,68	1,31 ± 0,98	1,22 ± 0,43
	7 gün (n=3)	31,94 ± 17,12	3,84 ± 0,86	4,01 ± 2,12
	Toplam	15,14 ± 15,82	2,45 ± 1,29	2,46 ± 1,69
Silorane Bond	1 gün (n=3)	97,41 ± 12,99	77,72 ± 16,02	80,38 ± 6,92
	2 gün (n=3)	110,46 ± 8,49	80,73 ± 21,75	75,48 ± 8,51
	7 gün (n=3)	123,77 ± 26,74	68,99 ± 7,20	63,32 ± 8,23
	Toplam	110,55 ± 19,22	75,81 ± 14,94	73,06 ± 10,24
Silorane Restoratif	1 gün (n=3)	98,23 ± 34,68	117,23 ± 15,12	100,08 ± 5,78
	2 gün (n=3)	144,07 ± 24,50	116,60 ± 3,73	100,24 ± 8,94
	7 gün (n=3)	139,09 ± 25,15	89,47 ± 5,69	81,32 ± 6,19
	Toplam	127,13 ± 32,91	107,76 ± 16,03	93,88 ± 11,25
Fuji IX GP Extra	1 gün (n=3)	50,77 ± 19,07	1,12 ± 1,51	0,95 ± 0,84
	2 gün (n=3)	36,02 ± 10,12	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,00
	7 gün (n=3)	55,84 ± 10,77	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,00
	Toplam	47,54 ± 15,00	0,50 ± 0,88	0,46 ± 0,56
G Coat Plus	1 gün (n=3)	90,02 ± 2,36	74,32 ± 9,06	92,82 ± 3,52
	2 gün (n=3)	97,81 ± 3,83	86,54 ± 16,68	72,89 ± 7,39
	7 gün (n=3)	155,15 ± 51,77	70,73 ± 11,96	68,23 ± 8,38
	Toplam	114,33 ± 40,29	77,20 ± 13,32	77,98 ± 12,73
Ketac N 100 Primer	1 gün (n=3)	1,96 ± 2,30	2,13 ± 1,33	1,86 ± 1,00
	2 gün (n=3)	1,90 ± 0,50	2,15 ± 0,80	1,19 ± 0,77
	7 gün (n=3)	3,07 ± 1,34	1,56 ± 1,37	0,63 ± 0,34
	Toplam	2,31 ± 1,47	1,95 ± 1,07	1,22 ± 0,84
Ketac N 100 Restoratif	1 gün (n=3)	8,66 ± 0,65	4,29 ± 1,34	1,35 ± 0,37
	2 gün (n=3)	6,85 ± 0,66	3,19 ± 0,34	1,33 ± 0,59
	7 gün (n=3)	1,90 ± 0,16	2,49 ± 0,34	1,52 ± 0,58
	Toplam	5,80 ± 3,06	3,32 ± 1,05	1,40 ± 0,46

Yapılan istatistiksel analizlere göre değerlendirilen materyallere 24, 48 ve 72 saat sonrasında uygulanan MTT testlerinin bulguları ekstrakt süresi faktörü gözardı edilerek, Şekil 4.2.1.'de gösterilmiştir. Farklı sürelerde uygulanan test sonuçları, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuş ve 72 saat sonunda sitotoksik etki daha yüksek gözlenmiştir ($p<0,01$).



Şekil 4.2.1 MTT testi bulguları

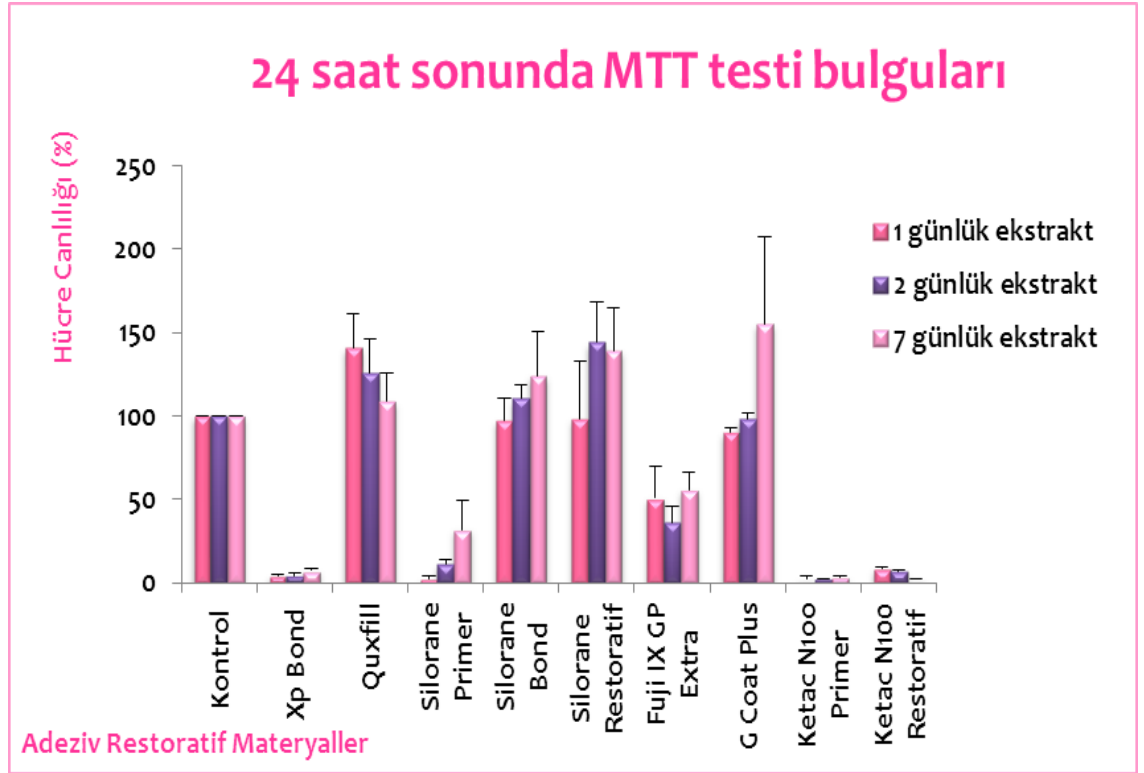
Test edilen materyallerin MTT testinin uygulandığı sürelerde gösterdikleri sitotoksik etkiler karşılaştırıldığında; 24 saat sonunda Quixfill, Silorane Restoratif, Silorane Bond ve G Coat Plus'a ait 1, 2, ve 7 günlük ekstraktların hiçbirisi toksik etki göstermemiştir. 1 günlük ekstraktlar değerlendirildiğinde Ketac N 100 Primer'in en yüksek toksik etkiyi gösterdiğinin saptanması ile birlikte bu materyalin gösterdiği toksik etki ile XP Bond, Ketac N 100 Restoratif ve Silorane Primer'in toksik etkileri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Tablo 4.2.2.). İki ve 7 günlük ekstraktlar içinde en toksik materyalin Fuji IX GP Extra olduğu saptanırken bu materyalin 2 günlük ekstraktının toksisitesi ile, XP Bond, Ketac N100, Ketac N100 Primer, Silorane Primer'in; 7 günlük

ektraktın toksik etkisi ile ise XP Bond, Ketac N100 Restoratif, Silorane Primer'in toksik etkileri arasındaki farklılıklar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.2.2. Yirmidört saat sonunda MTT testi bulguları

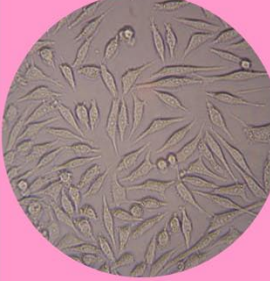
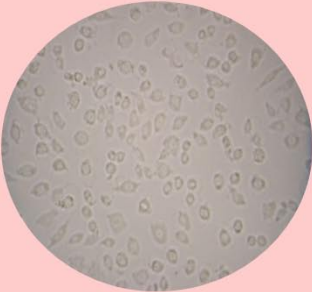
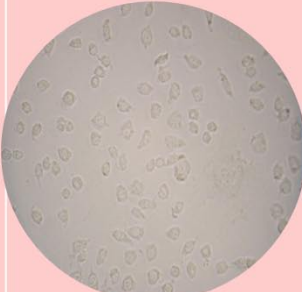
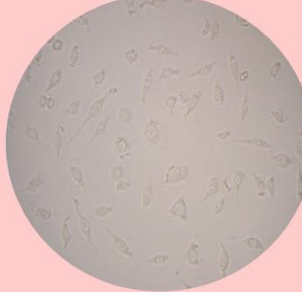
Gruplar (24 saat)	P değeri tablosu								
1 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p=0,157)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p=0,039	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p= 0,051)	Fark yok (p=0,053)	Fark yok (p=0,052)	p=0,041	Fark yok (p=0,273)		
	G Coat Plus	p=0,027	P<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	Fark yok (p= 0,125)	P<0,001	Fark yok (p>0,05)					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p=0,147)	P<0,001						
	XP Bond	p<0,001							
2 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p=0,696)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p=0,974)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p=0,002		
	G Coat Plus	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p=0,068)	Fark yok (p>0,05)	P<0,01			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p=0,760)					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p>0,05)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							
7 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p=0,013	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p=0,017	
	Fuji IX GP Extra	p=0,017	p=0,045	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	Fark yok (p=0,063)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p>0,05)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							

Yirmidört saat sonunda uygulanan MTT testi bulgularına göre 1, 2 ve 7 günlük ekstraktlar arası farklılıklar değerlendirildiğinde (Şekil 4.2.2.); Quixfill, XP Bond, Silorane Primer, Silorane Bond, Ketac N100 Restoratif, Ketac N 100 Primer ve Fuji IX GP Extra için 1, 2 ve 7 günlük ekstraktların sitotoksik etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Silorane Restoratif ($p=0,006$) ve G Coat Plus'a ($p<0,01$) ait 1 günlük ekstraktların uygulandığı hücre kültüründe 7 günlük ekstraktlara göre izlenen canlı hücre miktarının daha düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2.2. Yirmidört saat sonunda MTT testi bulguları

L 929 hücrelerinin test ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmesinin ardından optik mikroskop altında yapılan morfolojik değerlendirmelerde; sitotoksik etki göstermeyen G Coat Plus'ın 2 ve 7 günlük ekstraktlarına ait hücreler kontrol grubundakilerine benzer olarak iğ şeklinde gözlenirken, Ketac N 100 Primer'in toksik etki gösterdiği hücreler, uzamış morfolojilerini kaybederek kümelenmişler ve sitoplazmik kayba uğramışlardır. Hücreler arasında gözlenen geniş boşluklar ise geniş miktarda hücre lizisinin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2.3.).

	1 gün	2 gün	7 gün
G Coat Plus	 Hücre canlılığı (%) = $90,02 \pm 2,36$	 Hücre canlılığı (%) = $97,81 \pm 3,83$	 Hücre canlılığı (%) = $155,15 \pm 51,77$
Ketac N 100 Primer	 Hücre canlılığı (%) = $1,96 \pm 2,30$	 Hücre canlılığı (%) = $1,90 \pm 0,50$	 Hücre canlılığı (%) = $3,07 \pm 1,34$
Kontrol	 Hücre canlılığı (%) = 100		

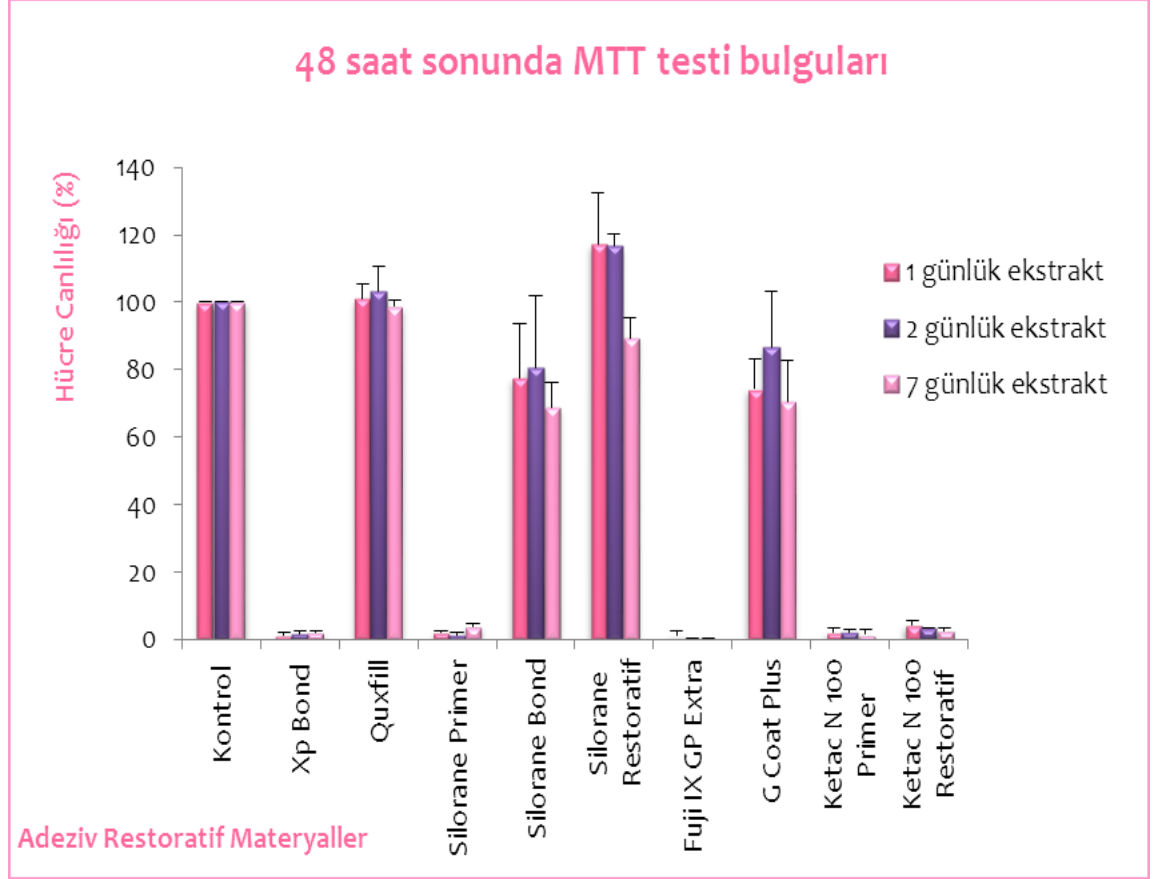
Şekil 4.2.3. Yirmidört saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre morfolojileri

Kırksekiz saat sonrasında uygulanan MTT testi bulgularına göre; Silorane Restoratif'e ait 1 ve 2 günlük ekstraktlar ile Quixfill'e ait hiçbir ekstrakt toksik etki göstermemiştir. En yüksek sitotoksik etki Fuji IX GP Extra'da gözlenmiş, bu materyalin toksisitesi ile, XP Bond, Ketac N100 Restoratif, Ketac N100 Primer, Silorane Primer'in toksik etkileri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.2.3.).

Tablo 4.2.3. Kırksekiz saat sonunda MTT testi bulguları

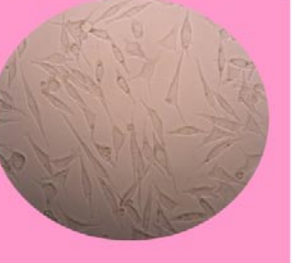
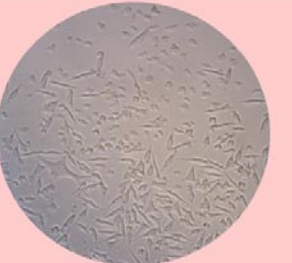
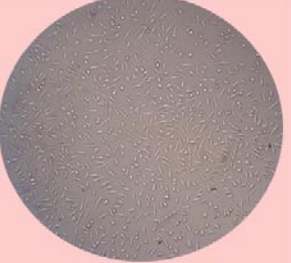
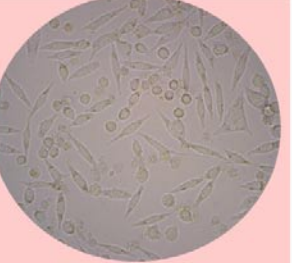
Gruplar (48 saat)	P değeri tablosu								
1 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	Fark yok (p> 0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	p= 0,004	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p> 0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	p= 0,021	p<0,001	p<0,001					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p= 0,517)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							
2 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	Fark yok (p=0,448)	p<0,001	p=0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	p=0,034	p<0,001	p<0,001					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p>0,05)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							
7 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)		
	G Coat Plus	p=0,002	p<0,001	Fark yok (p=0,177)	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,005)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	p=0,001	p<0,001	Fark yok (p=0,082)					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p>0,05)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							

Kırksekiz saat sonunda uygulanan MTT testi bulgularına göre 1, 2 ve 7 gün sonunda alınan ekstraktlar karşılaştırıldığında; Silorane Restoratif dışında hiçbir materyalin toksik etkisi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Silorane Restoratif'in ise 1 ve 2 günlük ekstraktları toksik etki göstermezken 7 günlük ekstrakt grubunda toksisite izlenmiştir (Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4. Kırksekiz saat sonunda MTT testi bulguları

L 929 hücrelerinin test ekstraktları ile 48 saat inkübe edilmesinin ardından sitotoksik etki göstermeyen Quixfill'e ait ekstraktların eklendiği hücreler, iğ şeklinde gözlenirken, Silorane Bond'un uygulandığı hücrelerde sitotoksik etkiye bağlı olarak iğ şeklini kaybetmiş yuvarlaklaşmaya ve kümelenmeye başlamış hücreler izlenmiştir. İkinci günün sonunda en yüksek toksik etkiye sahip olduğu gözlenen Fuji IX GP Extra'ya ait ekstraktın uygulandığı hücrelerin de sitoplazmik kayba uğradığı ve hücreler arası boşlukların lizise bağlı arttığı saptanmıştır (Şekil 4.2.5.).

	1 gün	2 gün	7 gün
Quixfill	 Hücre canlılığı (%) = $101,06 \pm 4,48$	 Hücre canlılığı (%) = $108,07 \pm 7,53$	 Hücre canlılığı (%) = $98,77 \pm 1,99$
Silorane Bond	 Hücre canlılığı (%) = $77,72 \pm 16,02$	 Hücre canlılığı (%) = $80,73 \pm 21,75$	 Hücre canlılığı (%) = $68,99 \pm 7,20$
Fuji IX GP Extra	 Hücre canlılığı (%) = $1,12 \pm 1,51$	 Hücre canlılığı (%) = $0,19 \pm 0,04$	 Hücre canlılığı (%) = $0,21 \pm 0,00$

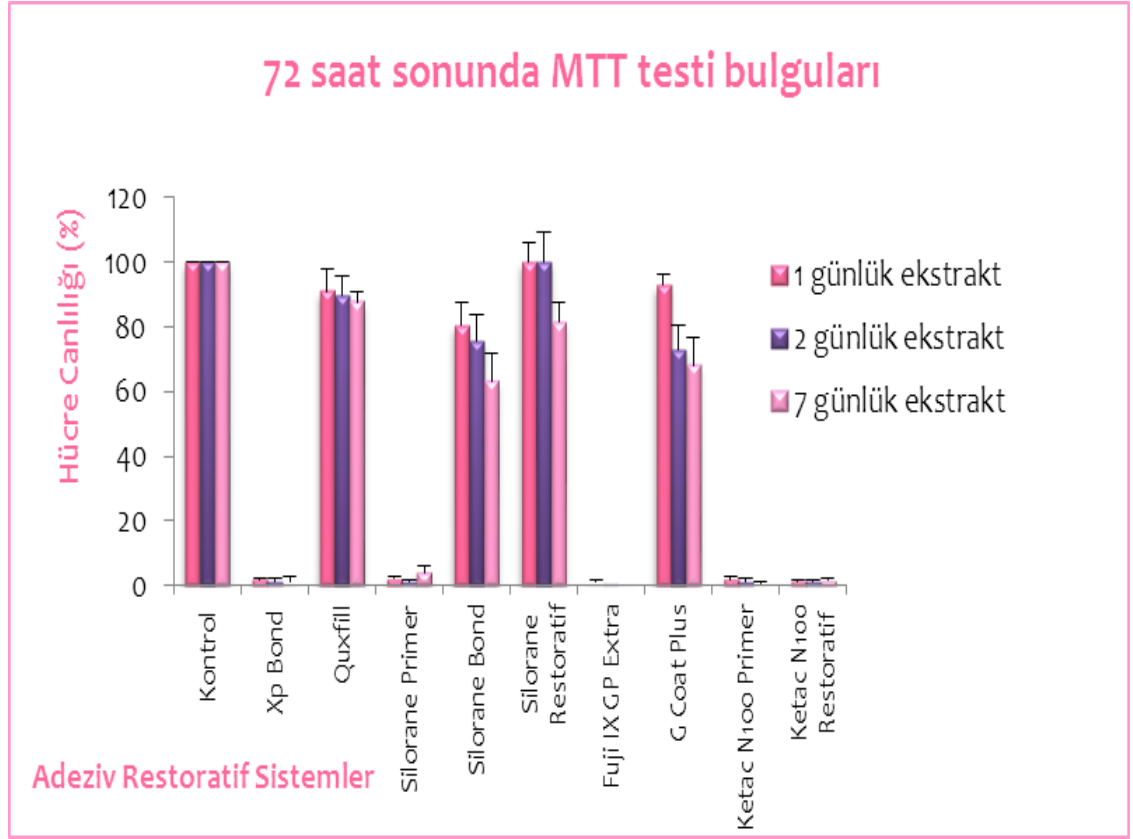
Şekil 4.2.5. Kırksekiz saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre morfolojileri

Yetmişiki saat sonunda elde edilen bulgulara göre Silorane Restoratif ve Quixfill'in 1 ve 2 günlük; G Coat Plus'ın 1 günlük ekstraktları dışında adeziv restoratif materyallerin tüm ekstraktlarının toksik etkiye sahip oldukları izlenmiştir (Şekil 4.2.6). En yüksek sitotoksik etki Fuji IX GP Extra için gözlenirken 1, 2 ve 7 günlük ekstraktlar değerlendirildiğinde bu materyalin toksik etkisi ile XP Bond, Ketac N100 Restoratif, Ketac N100 Primer, Silorane Primer'in etkileri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.2.4.).

Tablo 4.2.4. Yetmişiki saat sonunda MTT testi bulguları

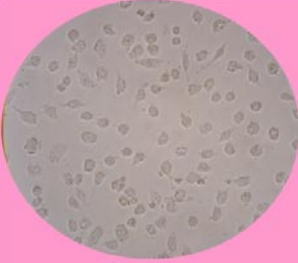
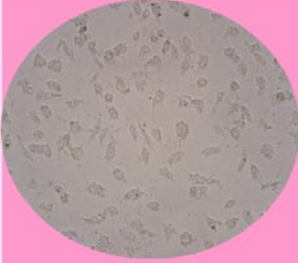
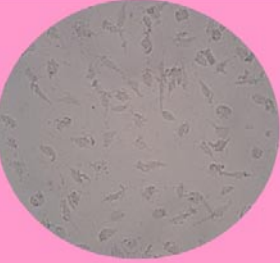
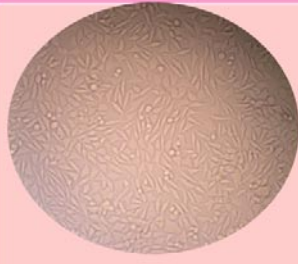
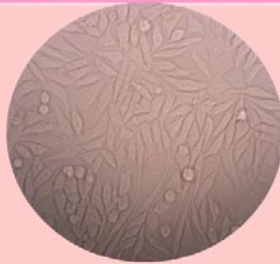
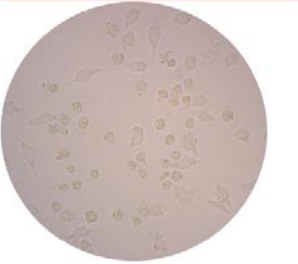
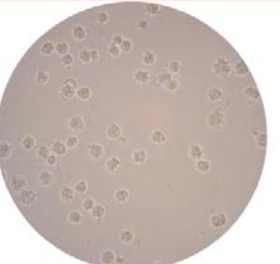
Gruplar (72 saat)	P değeri tablosu								
1 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p=0,177)	Fark yok (p=0,064)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)				
	Silorane Bond	Fark yok (p=0,244)	p<0,001	p=0,082					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p=0,737)	Fark yok (p>0,05)						
	XP Bond	p<0,001							
2 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	p=0,001	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	p=0,012	Fark yok (p>0,05)	p<0,001					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p=0,316)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							
7 günlük ekstrakt		Quixfill	XP Bond	Silorane Restoratif	Silorane Bond	Silorane Primer	G Coat Plus	Fuji IX GP Extra	Ketac N 100 Primer
	Ketac N 100 Restoratif	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	Fark yok (p>0,05)
	Ketac N 100 Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	
	Fuji IX GP Extra	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001		
	G Coat Plus	p<0,001	p<0,001	p=0,038	Fark yok (p>0,05)	p<0,001			
	Silorane Primer	p<0,001	Fark yok (p>0,05)	p<0,001	p<0,001				
	Silorane Bond	p<0,001	p<0,001	p=0,001					
	Silorane Restoratif	Fark yok (p>0,05)	p<0,001						
	XP Bond	p<0,001							

Yetmişiki saat sonunda uygulanan MTT testi bulgularına göre; 3 farklı sürede hazırlanan ekstraktlar karşılaştırıldığında (Şekil 4.2.6.), Quixfill, XP Bond, Silorane Primer, Ketac N100 Restoratif, Ketac N 100 Primer ve Fuji IX GP Extra için 1, 2 ve 7 günlük ekstraktların sitotoksik etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Silorane Restoratif'in 7 günlük ekstraktı sitotoksik etki gösterirken; G Coat Plus için 7 günlük estraktların sitotoksik etkisi 1 günlük ekstrakta göre daha yüksektir ($p<0,01$).



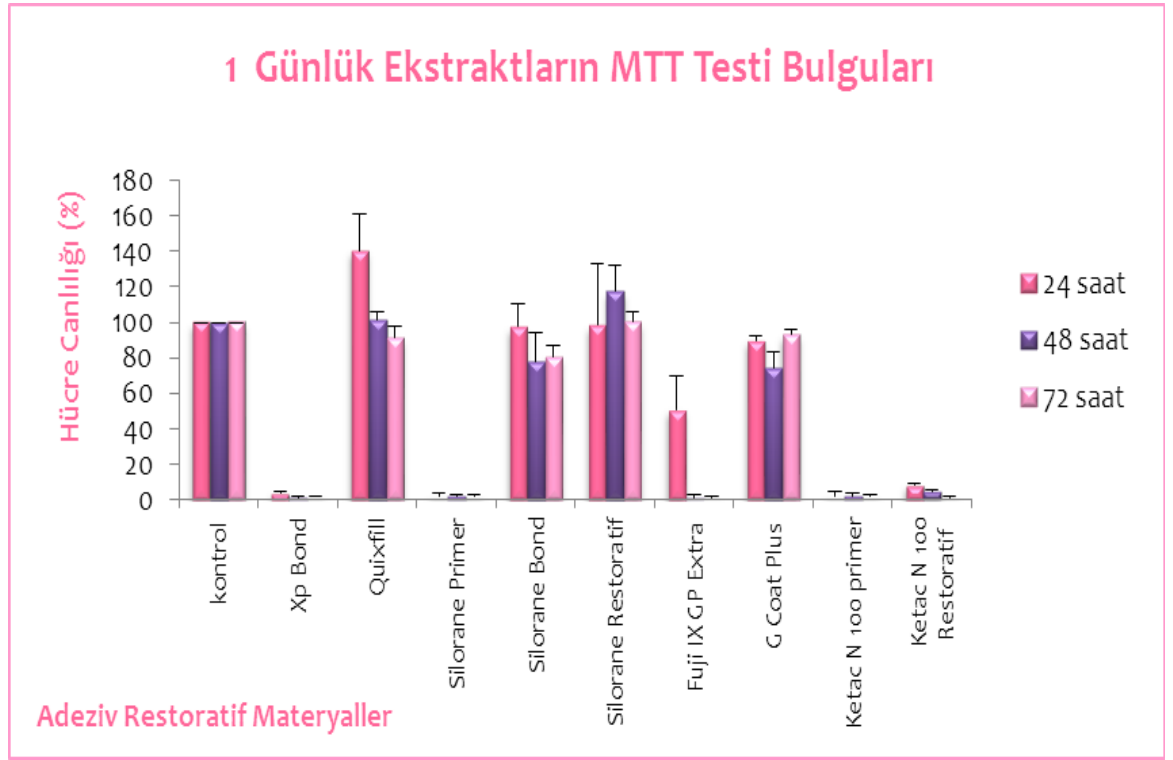
Şekil 4.2.6. Yetmişiki saat sonunda MTT testi bulguları

L 929 hücrelerinin test ekstraktları ile 72 saat inkübe edilmesinin ardından, optik mikroskop altında yapılan morfolojik değerlendirmelerde; 1 ve 2 günlük ekstraktları sitotoksik etki göstermeyen Silorane Restoratif'e ait hücreler kontrol grubundakilerine benzer olarak iğ şeklinde gözlenirken, Silorane Primer ve Ketac N100'ün toksik etki gösterdiği hücreler, iğ şekillerini kaybederek kümelenmişler ve sitoplazmik kayba uğramışlardır. Hücreler arasında gözlenen geniş boşluklar ise geniş miktarda hücre lizisinin olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2.7.).

	1 gün	2 gün	7 gün
Silorane Primer	 Hücre canlılığı (%) = $2,16 \pm 0,87$	 Hücre canlılığı (%) = $1,22 \pm 0,43$	 Hücre canlılığı (%) = $4,01 \pm 2,12$
Silorane	 Hücre canlılığı (%) = $100,08 \pm 5,78$	 Hücre canlılığı (%) = $100,24 \pm 8,94$	 Hücre canlılığı (%) = $81,39 \pm 6,19$
Ketac N 100	 Hücre canlılığı (%) = $11,35 \pm 0,37$	 Hücre canlılığı (%) = $1,33 \pm 0,59$	 Hücre canlılığı (%) = $1,52 \pm 0,58$

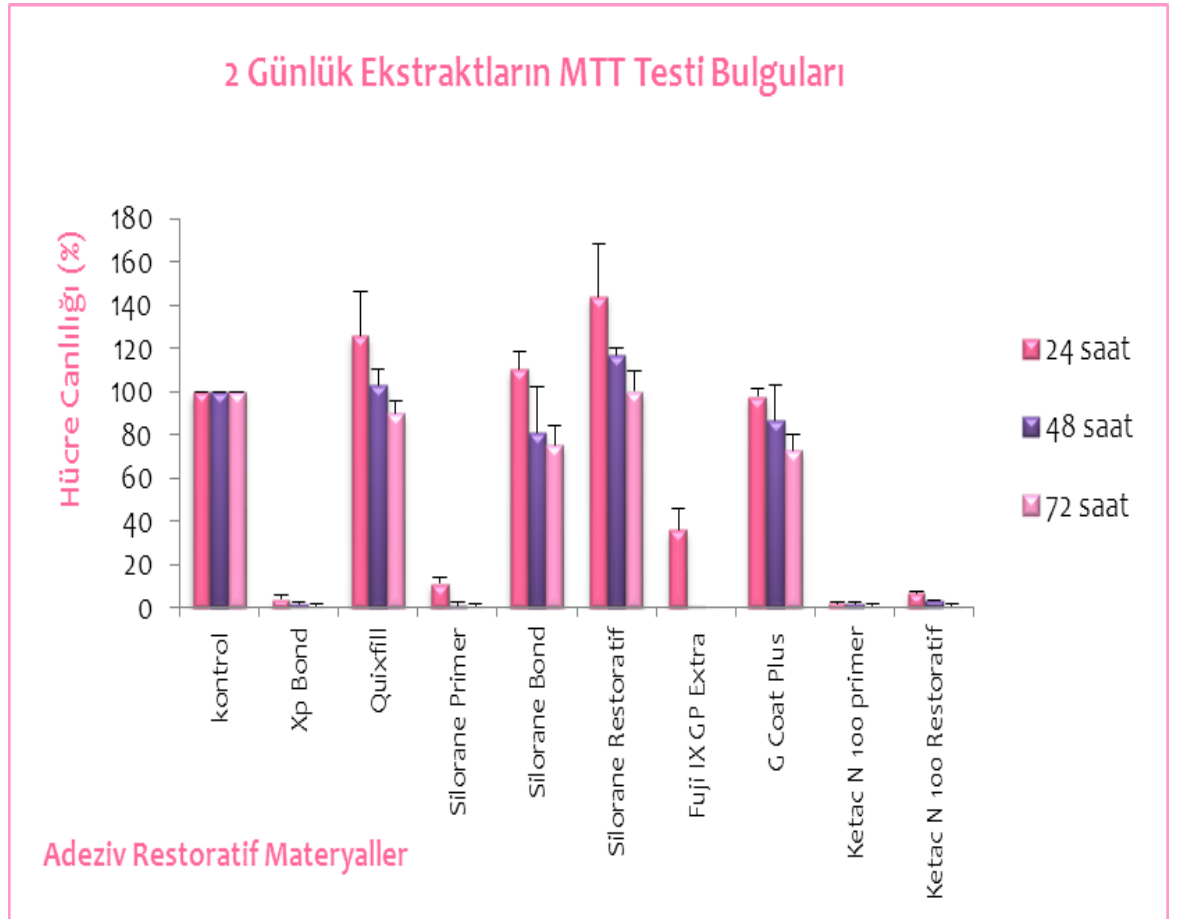
Şekil 4.2.7. Yetmişiki saat sonunda farklı gruplar için izlenen hücre morfolojileri

Bu çalışmada test edilen materyallerin 1 günlük ekstraktlarının, farklı test sürelerinde gösterdikleri sitotoksik etkiler karşılaştırıldığında (Şekil 4.2.8.); 24 ve 72 saat sonrasındaki ölçümlerde Silorane Restoratif, Silorane Bond ve Quixfill'in; 48 saat sonrasında ise Silorane Restoratif ve Quixfill'in toksik etki göstermedikleri saptanmıştır. Bu değerlendirmelerde toksik etki gösteren Ketac N 100 Restoratif, Ketac N 100 Primer, Silorane Primer, Fuji IX GP Extra ve XP Bond'a ait 1 günlük ekstraktların toksisiteleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



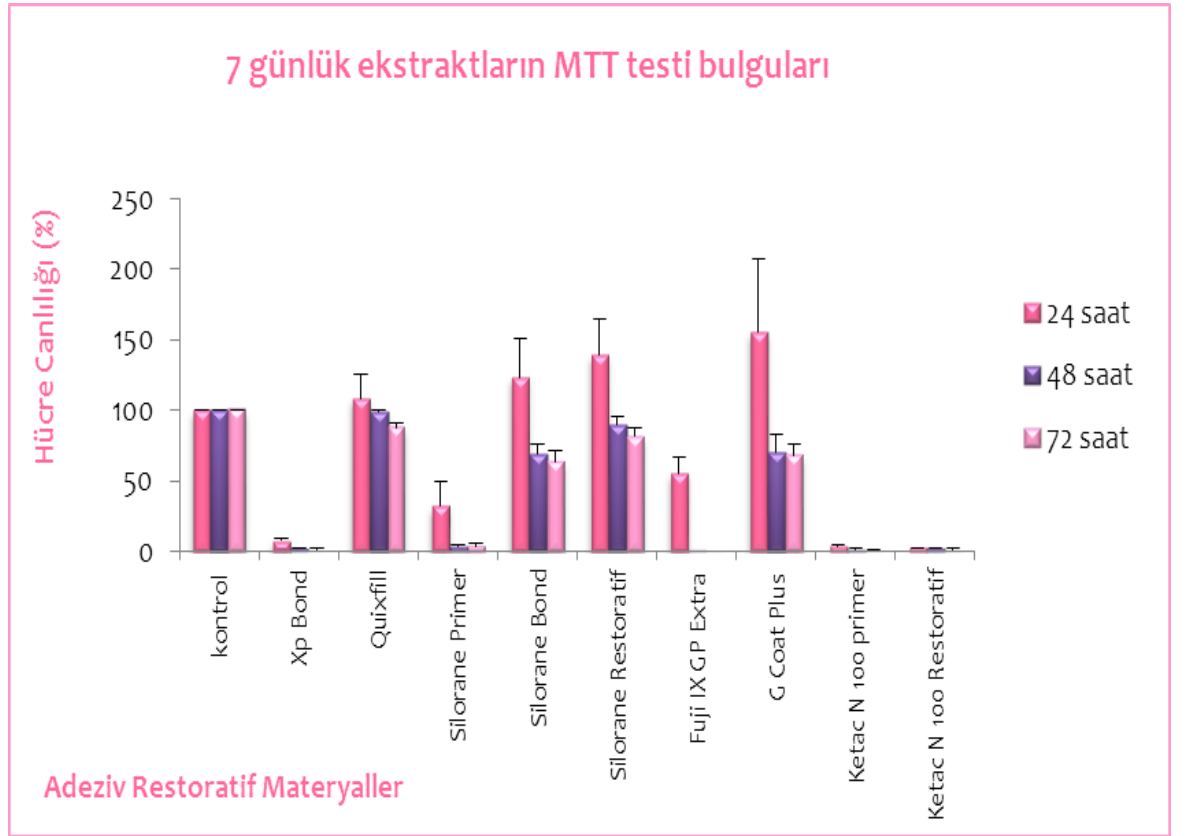
Şekil 4.2.8. Bir günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları

Materyallerin 2 gün sonunda elde edilen ekstraktlarının farklı günlerde uygulanan MTT testinde gösterdikleri toksik etkilerin karşılaştırılması ile 24 saat sonunda (Şekil 4.2.9.) G Coat Plus, Silorane Bond, Silorane Restoratif ve Quixfill'in; 48 saat sonrasında Silorane Restoratif, G Coat Plus ve Quixfill'in; 72 saat sonra ise Quixfill ve Silorane Restoratif'in toksik etki göstermediği saptanmıştır. Fuji IX GP Extra, en düşük toksik etkiyi 24 saat sonra göstermiş ve bu materyal ile benzer olarak toksik etki gösteren Ketac N 100 Primer, Silorane Primer, XP Bond ve Ketac N 100 Restoratif grupları arasındaki farklılıklar da istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.



Şekil 4.2.9. İki günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları

Yedi günlük ekstraktların farklı günlerdeki toksik etkilerinin karşılaştırılması ile (Şekil 4.2.10.) 24 saat sonunda G Coat Plus, Silorane Bond, Silorane Restoratif ve Quixfill; 48 saat sonunda Quixfill ve Silorane Restoratif toksik etki göstermezken 72 saat için tüm materyallerin 7 günlük ekstraktları toksik etki göstermişlerdir. Fuji IX GP Extra, G Coat Plus ve Silorane Bond en düşük toksik etkiyi ilk günün sonunda göstermişlerdir. Toksik etkileri saptanan Ketac N 100 Primer, Silorane Primer, XP Bond ve Ketac N 100 Restoratif grupları arasındaki farklılıklar da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.2.10. Yedi günlük ekstraktların 3 farklı süreç sonunda uygulanan MTT testi bulguları

4.2.2 Monomer Salımı ile Toksisite İlişkisinin Değerlendirilmesi

Adeziv restoratif materyallerin 1,2 ve 7 günlük ekstraktlarından gözlenen monomer salımı ile, toksik etkilerinin karşılaştırılması Spearman'ın rho katsayısı ile değerlendirilmiştir. Bu katsayı -1 ve +1 arasındadır. Bu sayının "0" olması değerlendirilen gruplar arasında bir etkileşim olmadığını belirtir. -1 ve +1 ise etkileşimin kuvvetini göstermekte, "-" etkileşimin ters orantılı, "+" ise doğru orantılı bir etkileşimi bildirmektedir. Bu durumda, p değerinin 0,005'ten küçük olması etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğunun göstergesidir. Bu karşılaştırmaya monomer salımının gözlenmediği Fuji IX GP Extra dahil edilmemiştir. Materyaller gözardı edilerek monomer salımı toksisite etkileşiminin 24, 48 ve 72 saat sonundaki ölçümler için karşılaştırılması sonucunda elde edilen bulgular Tablo 4.2.5'te verilmiştir. 24 ve 72 saat sonunda uygulanan MTT testi sonucunda gözlenen yüzde hücre canlılığı ve zaman içerisindeki monomer salımı arasındaki ilişki, negatif yönde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 48 saat sonunda elde edilen yüzde hücre canlılığı ve monomer salımı etkileşimi ise istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte negatif yöndedir ($p=0,017$). Monomer salımı ve yüzde hücre canlılığı ters orantılıdır. Bu durum artan monomer salımı ile adeziv restoratif materyallerin 48 saat sonrasındaki ölçümlerde daha yüksek toksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.2.5 Monomer salımı hücre canlılığı etkileşimi

	24 saat	48 saat	72 saat
r	-0,147	-0,342	-0,175
p	0,318	0,017	0,235

r: Spearman'ın korelasyon katsayısı, p: önemlilik düzeyi, $p<0,05$ iken etkileşim anlamlıdır

4.3. Test Materyallerinin Mutajenik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Test edilen toplam dokuz adet adeziv restoratif materyalin DNA üzerinde mutasyon oluşturma potansiyelleri, Ames testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle test suşlarının genetik işaretleri doğrulanmıştır.

Ames Test Sisteminde Kullanılan Test Suşlarının Üreme Durumları

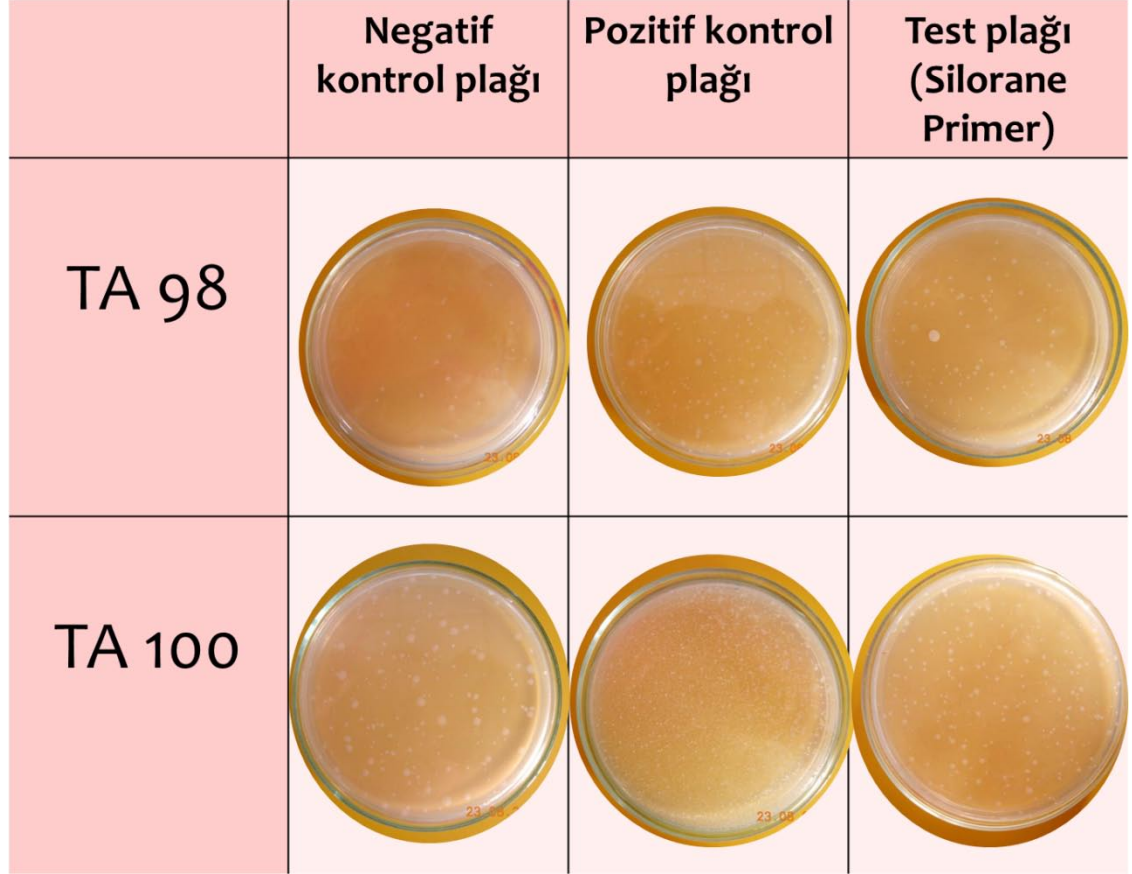
Ames test sisteminde kullanılması planlanan test suşlarının, gecelik kültürlerinin yoğunluğunun $1-2 \times 10^9$ bakteri kolonisi/mililitre olması gerekmektedir. *Salmonella typhimurium* TA 98 test suşunun mililitrede bulundurması gerekli canlı bakteri sayısına 5. saatte ulaştığı bilindiğinden gece boyunca üretilen TA 98 ve TA 100 suşları, taze ortamlara aktarılmasının ardından çalkalamalı etüvde 5 saat boyunca inkübe edilmiş ve sonrasında %0.9'luk NaCl çözeltisi ile uygun oranlarda seyreltilerek nütrient agarlı plaklara 0.01 ml'lik hacimlerde nokta ekimleri yapılmıştır. Bu plaklar, 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve plaklardaki koloniler sayılarak her iki suş için de gecelik kültürlerin beklenen yoğunluğa ulaştıkları doğrulanmıştır.

Ames Testi Bulguları

Mutajenite değerlendirmelerinden önce, çalışmada test edilmesi planlanan tüm adeziv materyallerin test suşları üzerindeki sitotoksik değerleri belirlenmiştir. Mutajenite değerlendirmeleri, sitotoksik etkinin gözlenmediği en yüksek dozdan başlanılarak belirlenen dört farklı dozda yapılmıştır. Yapılan değerlendirmelere göre test edilmesi planlanan doz miktarları test suşları üzerinde sitotoksik etki göstermemişlerdir.

Kırksekiz saatlik inkübasyon sonrasında test edilen adeziv restoratif materyallerin uygulandığı test plakları ile negatif ve pozitif kontrol plakları üzerinde koloni oluşturan histidin prototroflarının sayılması sonrasında elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Mutajen tanımlamasının yapılabilmesi için test edilen plaklarda tesbit edilmiş histidin prototroflarının sayısının, negatif kontrol plaklarındaki kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katından fazla olup, doza bağlı bir artışın olması gerekliliği gözönünde bulundurulmuştur. Şekil

4.3.1’de Ames testi sonucunda elde edilen TA 98 ve TA 100 suşuna ait mutajenik etki göstermedikleri tesbit edilmiş test, negatif kontrol ve pozitif kontrol plakları bulunmaktadır.



Şekil 4.3.1 Ames testi sonrası gözlenen bakteri kolonizasyonları

4.3.1. Posterior Hibrit Kompozit Restoratif Sistem’e ait Mutajenite Değerlendirmeleri (XP Bond ve Quixfill)

Quixfill restoratif materyalin öncesinde uygulanan adeziv XP Bond ’a ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.1.’de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.2.’de verilmiştir.

Tablo 4.3.1. XP Bond ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (μ L/plak)	Geri dönen koloni sayısı $\pm$ Ss (n=3)	
1 gün		TA 98	TA 100
	25	55,67 $\pm$ 7,57	181,33 $\pm$ 61,23
	50	51,33 $\pm$ 14,57	170,00 $\pm$ 30,26
	75	56,33 $\pm$ 8,50	209,33 $\pm$ 47,72
	100	53,00 $\pm$ 4,35	166,00 $\pm$ 29,59
	negatif kontrol	42,66 $\pm$ 18,14	182,00 $\pm$ 20,29
	pozitif kontrol	470,00 $\pm$ 75,49	1533,33 $\pm$ 305,50
1 hafta	25	61,67 $\pm$ 6,65	163,67 $\pm$ 11,84
	50	66,33 $\pm$ 7,23	165,67 $\pm$ 9,71
	75	57,66 $\pm$ 15,37	185,33 $\pm$ 12,85
	100	47,00 $\pm$ 28,82	166,00 $\pm$ 15,10
	negatif kontrol	44,66 $\pm$ 5,03	182,00 $\pm$ 20,29
	pozitif kontrol	470,00 $\pm$ 75,49	1533,33 $\pm$ 305,50

Yapılan istatistiksel analizlere göre XP Bond, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.2. XP Bond'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	100,83	0,472
	TA 100	1	634,80	0,418
Doz	TA 98	4	264,36	0,268
	TA 100	4	995,45	0,396
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	88,33	0,757
	TA 100	4	181,38	0,938

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

XP Bond'un *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde; ekstrakt süresi, doz etkenleri ve ekstrakt süresi, doz etkileşimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

Quixfill 'e ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.3.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.3.3. Quixfill ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı ± Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	24,33 ± 11,37	165,00 ± 7,00
	50	28,33 ± 5,50	185,67 ± 19,39
	75	20,00 ± 16,64	206,33 ± 11,50
	100	27,66 ± 4,50	171,67 ± 8,50
	negatif kontrol	25,33 ± 2,30	189,33 ± 10,05
	pozitif kontrol	182,67 ± 16,77	3146,67 ± 1300,66
1 hafta	25	30,66 ± 4,04	174,00 ± 7,93
	50	36,00 ± 7,81	181,33 ± 16,44
	75	34,33 ± 6,65	180,33 ± 23,50
	100	42,67 ± 2,08	182,33 ± 17,61
	negatif kontrol	31,33 ± 2,08	189,33 ± 10,05
	pozitif kontrol	97,00 ± 2,64	3146,67 ± 1300,66

Yapılan istatistiksel analizlere göre Quixfill, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.4. Quixfill'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	730,13	0,002 *
	TA 100	1	34,13	0,686
Doz	TA 98	4	72,63	0,331
	TA 100	4	546,45	0,060
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	29,46	0,738
	TA 100	4	325,05	0,213

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Quixfill'in *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde TA 98 suşunda ekstrakt süresinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,002$). Dozlar gözönünde bulundurulmadığında 1 haftalık ekstraktların uygulandıkları TA 98 suşuna ait plaklarda daha fazla bakteri kolonizasyonu gözlenmiştir.

4.3.2 Siloran Sistem'e ait Mutajenite Değerlendirmeleri (Silorane)

Silorane, iki aşamalı bir self-etch adeziv sistemi bünyesinde barındıran bir restoratif sistemdir. İlk aşamada Silorane Primer uygulamasının ardından Silorane Bond ve ardından restorasyon uygulaması gerçekleştirilir. İlk aşamada uygulanan Silorane Primer'e ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.5.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.3.5. Silorane Primer ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı ± Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	53,33 ± 4,16	166,67 ± 51,31
	50	51,67 ± 7,37	216,00 ± 21,16
	75	57,33 ± 2,51	258,00 ± 19,69
	100	27,33 ± 16,25	241,33 ± 40,06
	negatif kontrol	41,00 ± 13,89	208,66 ± 10,26
	pozitif kontrol	266,66 ± 115,47	1426,66 ± 205,26
1 hafta	25	44,66 ± 11,67	250,66 ± 10,06
	50	57,66 ± 10,01	232,66 ± 12,22
	75	55,00 ± 11,35	246,00 ± 31,43
	100	39,33 ± 26,57	209,67 ± 54,50
	negatif kontrol	45,66 ± 6,02	208,66 ± 10,26
	pozitif kontrol	266,66 ± 115,47	1400,00 ± 200,00

Yapılan istatistiksel analizlere göre Silorane Primer, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.6. Silorane Primer'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	40,83	0,624
	TA 100	1	974,700	0,323
Doz	TA 98	4	519,867	0,036 *
	TA 100	4	1884,667	0,136
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	95,667	0,679
	TA 100	4	2936,533	0,039 *

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Silorane Primer'in *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde TA 98 suşunda dozlar arasında ve TA 100 suşunda ekstrakt süresi, doz etkileşiminde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. TA 98 suşunda, 75 ve 100 $\mu\text{L}/\text{plak}$ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte farklılık gözlenmiştir ($p=0,058$). Ekstrakt süresi doz etkileşimi dikkate alındığında, TA 100 suşunda 25 $\mu\text{L}/\text{plak}$ dozunda 1 gün ve 1 haftalık ekstraktların anlamlı farklılıklar gösterdiği saptanmıştır ($p=0,003$). TA 100 suşu için 1 haftalık ekstraktlarda dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmezken, 1 günlük ekstraktlarda 25 ve 75 $\mu\text{L}/\text{plak}$ dozlarında saptanan farklılıklar anlamlı bulunmuştur ($p=0,017$).

Silorane Primer'den sonra uygulanan Silorane Bond'a ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.7.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.3.7. Silorane Bond ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı $\pm$ Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	57,33 $\pm$ 8,32	225,33 $\pm$ 24,54
	50	45,33 $\pm$ 7,50	241,33 $\pm$ 49,36
	75	50,33 $\pm$ 13,57	227,66 $\pm$ 52,50
	100	37,33 $\pm$ 4,61	208,67 $\pm$ 41,29
	negatif kontrol	41,00 $\pm$ 13,89	208,66 $\pm$ 10,26
	pozitif kontrol	266,66 $\pm$ 115,47	1426,66 $\pm$ 205,26
1 hafta	25	47,00 $\pm$ 7,81	252,00 $\pm$ 24,97
	50	55,00 $\pm$ 7,54	206,00 $\pm$ 5,29
	75	50,66 $\pm$ 9,07	262,66 $\pm$ 42,01
	100	52,33 $\pm$ 18,58	282,33 $\pm$ 20,81
	negatif kontrol	45,66 $\pm$ 6,02	208,66 $\pm$ 10,26
	pozitif kontrol	266,66 $\pm$ 115,47	1426,66 $\pm$ 205,26

Yapılan istatistiksel analizlere göre Silorane Bond, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.8. Silorane Bond'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	112,133	0,326
	TA 100	1	3060,300	0,104
Doz	TA 98	4	89,867	0,532
	TA 100	4	1540,133	0,252
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	139,633	0,318
	TA 100	4	2519,800	0,086

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Silorane Bond'un *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde; ekstrakt süresi, doz etkenleri ve ekstrakt süresi, doz etkileşimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmadığı saptanmıştır.

Silorane Restoratif'e ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.9.'da, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.10.'da verilmiştir.

Tablo 4.3.9. Silorane Restoratif ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı $\pm$ Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	26,00 $\pm$ 2,00	191,67 $\pm$ 45,39
	50	26,33 $\pm$ 4,04	168,00 $\pm$ 26,23
	75	25,66 $\pm$ 5,03	195,66 $\pm$ 58,10
	100	27,33 $\pm$ 9,50	138,00 $\pm$ 12,16
	negatif kontrol	25,33 $\pm$ 2,30	215,66 $\pm$ 9,50
	pozitif kontrol	182,67 $\pm$ 16,77	2546,67 $\pm$ 2199,03
1 hafta	25	15,66 $\pm$ 3,78	159,33 $\pm$ 21,54
	50	16,33 $\pm$ 4,04	171,67 $\pm$ 39,57
	75	23,00 $\pm$ 7,00	165,67 $\pm$ 20,55
	100	15,66 $\pm$ 5,50	174,33 $\pm$ 27,30
	negatif kontrol	24,33 $\pm$ 11,06	184,66 $\pm$ 28,30
	pozitif kontrol	266,67 $\pm$ 115,47	1266,67 $\pm$ 115,47

Yapılan istatistiksel analizlere göre Silorane Restoratif, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.10. Silorane Restoratif'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	381,63	0,005 *
	TA 100	1	853,33	0,375
Doz	TA 98	4	20,88	0,695
	TA 100	4	1554,53	0,240
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	36,21	0,446
	TA 100	4	1376,66	0,294

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Silorane Restoratif'in *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde; TA 98 suşunda ekstrakt süresinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,005$). 1 günlük ekstraktların eklendiği TA 98 suşuna ait plaklarda gözlenen bakteri kolonizasyonu miktarı daha yüksek saptanmıştır.

4.3.3. Güçlendirilmiş Geleneksel Cam İyonomer Sistem’e ait Mutajenite Değerlendirmeleri (Equia)

Equia, Fuji IX GP Extra uygulamasından sonra yüzey koruyucu G Coat Plus uygulaması gerektiren bir restoratif sistemdir. Fuji IX GP Extra’ya ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.11.’de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.12.’de verilmiştir.

Tablo 4.3.11. Fuji IX GP Extra ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon test sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı ± Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	19,33 ± 12,89	141,33 ± 10,97
	50	26,67 ± 6,50	148,33 ± 47,71
	75	24,33 ± 6,35	181,67 ± 31,34
	100	25,33 ± 2,51	159,33 ± 32,34
	negatif kontrol	24,00 ± 5,56	141,33 ± 26,63
	pozitif kontrol	266,66 ± 115,47	1733,33 ± 230,94
1 hafta	25	52,33 ± 2,51	150,67 ± 19,73
	50	48,00 ± 2,64	189,33 ± 78,52
	75	44,00 ± 14,00	176,00 ± 28,84
	100	56,33 ± 3,51	204,00 ± 18,33
	negatif kontrol	44,33 ± 6,65	208,67 ± 63,12
	pozitif kontrol	333,33 ± 115,47	1700,00 ± 100,00

Yapılan istatistiksel analizlere göre Fuji IX GP Extra, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.12. Fuji IX GP Extra'ya ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	4712,53	0,000 *
	TA 100	1	7363,33	0,050 *
Doz	TA 98	4	46,20	0,518
	TA 100	4	1224,71	0,584
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	61,36	0,379
	TA 100	4	1282,58	0,563

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Fuji IX GP Extra'nın *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, her iki suş için de ekstrakt süresinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. TA 98 ($p < 0,001$) ve TA 100 ($p = 0,05$) suşlarında 1 haftalık ekstraktların eklendiği plaklarda daha fazla bakteri kolonizasyonu izlenmiştir.

Equia cam iyonmer restoratif sistem içinde bulunan yüzey koruyucu G Coat Plus'a ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.13.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.14.'de verilmiştir.

Tablo 4.3.13. G Coat Plus ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µLplak)	Geri dönen koloni sayısı ± Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	43,00 ± 8,00	206,33 ± 22,27
	50	42,66 ± 7,02	213,33 ± 18,90
	75	48,00 ± 8,71	191,33 ± 43,46
	100	45,33 ± 6,50	168,33 ± 61,17
	negatif kontrol	36,66 ± 3,05	191,33 ± 8,08
	pozitif kontrol	266,67 ± 115,47	1416,66 ± 225,46
1 hafta	25	39,66 ± 7,37	217,33 ± 58,56
	50	38,00 ± 5,29	190,66 ± 10,06
	75	40,33 ± 7,93	254,67 ± 28,37
	100	42,00 ± 4,72	191,33 ± 34,31
	negatif kontrol	39,66 ± 5,31	208,67 ± 63,12
	pozitif kontrol	333,33 ± 115,47	1700,00 ± 100,00

Yapılan istatistiksel analizlere göre G Coat Plus, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.14. G Coat Plus'a ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	80,03	0,203
	TA 100	1	2539,20	0,223
Doz	TA 98	4	35,16	0,562
	TA 100	4	1536,25	0,452
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	80,03	0,203
	TA 100	4	1418,45	0,491

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

G Coat Plus'ın *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde; ekstrakt süresi, doz etkenleri ve ekstrakt süresi doz etkileşimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

4.3.4. Nano-iyonomer Restoratif'e ait Test Mutajenite Değerlendirmeleri (Ketac N-100)

Ketac N 100 restoratif sistem, restoratif materyal öncesinde primer uygulamasını içerir. Ketac N 100 Restoratif'ten önce uygulanan Ketac N 100 Primer'e ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.15.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.16.'da verilmiştir.

Tablo 4.3.15. Ketac N100 Primer ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (µL/plak)	Geri dönen koloni sayısı ± Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	45,66 ± 5,50	174,67 ± 50,33
	50	44,00 ± 5,29	185,33 ± 38,85
	75	42,00 ± 2,00	130,67 ± 10,06
	100	44,33 ± 6,02	146,67 ± 22,03
	negatif kontrol	34,00 ± 8,00	182,00 ± 20,29
	pozitif kontrol	353,33 ± 136,13	1600,00 ± 200,00
1 hafta	25	34,67 ± 4,72	136,66 ± 38,27
	50	59,67 ± 8,08	154,66 ± 14,22
	75	54,67 ± 10,97	129,66 ± 21,22
	100	62,33 ± 5,85	131,00 ± 23,51
	negatif kontrol	46,33 ± 6,08	182,00 ± 20,29
	pozitif kontrol	353,33 ± 136,13	1533,33 ± 305,50

* p<0,05 iki yönlü varyans analizinde kontrole göre anlamlı farklılık gösteren grubu belirtmektedir.

Yapılan istatistiksel analizlere göre Ketac N-100 Primer, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.16. Ketac N100 Primer'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	681,63	0,001 *
	TA 100	1	4224,53	0,049 *
Doz	TA 98	4	237,55	0,005 *
	TA 100	4	1747,91	0,167
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	205,71	0,009 *
	TA 100	4	347,11	0,834

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Ketac N100 Primer'in *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde her iki suş için ekstrakt süresinde, TA 98 suşu için ise doz etkenleri ve ekstrakt süresi ile doz etkileşimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. TA 98 suşu ($p=0,001$) için 1 haftalık ekstraktların eklendiği plaklarda daha fazla bakteri kolonizasyonu gözlenirken, TA 100 suşu ($p=0,049$) için durum tam tersidir. Ekstrakt süresi gözönünde bulundurulmadığında, TA 98'in 25 ve 100 $\mu\text{L}/\text{plak}$ dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tesbit edilmiştir ($p=0,029$). Doz ekstrakt süresi etkileşimi göz önünde bulundurulduğunda TA 98 suşunda 25 $\mu\text{L}/\text{plak}$ dozu dışında tüm dozlarda 1 günlük ve 1 haftalık ekstraktlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir.

Ketac N-100 Restoratif'e ait plak inkorporasyon test sonuçları Tablo 4.3.17.'de, iki yönlü varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.3.18.'de verilmiştir.

Tablo 4.3.17. Ketac N100 Restoratif ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşlarında plak inkorporasyon testi sonuçları

Ekstrakt süresi	Dozlar (μ L/plak)	Geri dönen koloni sayısı $\pm$ Ss (n=3)	
		TA 98	TA 100
1 gün	25	39,00 $\pm$ 12,16	136,67 $\pm$ 12,58
	50	39,66 $\pm$ 12,05	108,00 $\pm$ 11,13
	75	35,00 $\pm$ 8,54	134,00 $\pm$ 7,54
	100	37,66 $\pm$ 16,56	138,00 $\pm$ 40,58
	negatif kontrol	30,33 $\pm$ 12,89	107,00 $\pm$ 31,00
	pozitif kontrol	266,67 $\pm$ 115,47	1416,66 $\pm$ 225,46
1 hafta	25	21,00 $\pm$ 4,35	152,33 $\pm$ 32,19
	50	24,66 $\pm$ 4,50	107,67 $\pm$ 13,05
	75	25,66 $\pm$ 2,51	122,33 $\pm$ 10,69
	100	27,00 $\pm$ 11,79	118,33 $\pm$ 20,59
	negatif kontrol	23,33 $\pm$ 2,30	132,66 $\pm$ 33,00
	pozitif kontrol	135,33 $\pm$ 5,03	1426,66 $\pm$ 205,26

Yapılan istatistiksel analizlere göre Ketac N-100 Restoratif, TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermemiştir.

Tablo 4.3.18. Ketac N100 Restoratif'e ait bulguların iki yönlü varyans analizi tablosu

	Test suşu	sd	KO	p
Ekstrakt süresi	TA 98	1	1080,0	0,004 *
	TA 100	1	28,03	0,828
Doz	TA 98	4	29,58	0,877
	TA 100	4	1078,86	0,156
Ekstrakt süresi x doz	TA 98	4	29,58	0,877
	TA 100	4	528,20	0,475

* $p < 0,05$ iken etkileşimler arası farklılık önemlidir. sd: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, p: önemlilik düzeyi

Ketac N100 Restoratif'in *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında verdiği sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, TA 98 suşu için ekstrakt süresinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,004$). Bir günlük ekstaktların eklendiği plaklarda, daha yüksek bakteri kolonizasyonu gözlenmiştir.

4.4. Adeziv Restoratif Sistemlerin Biyouyumluluklarının *İn Vivo* Koşullarda Değerlendirilmesi

Bu çalışmada uygulanan histopatolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 4.4.1.'de belirtilmiştir.

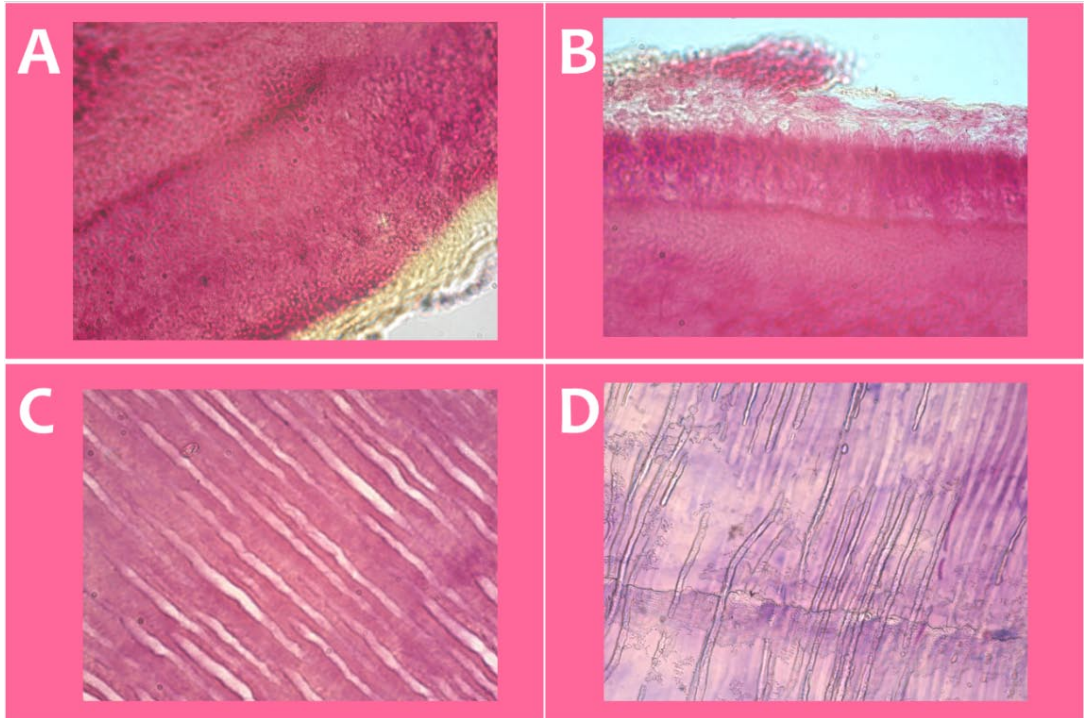
Tablo 4.4.1. Adeziv restoratif sistemlerin uygulandıkları örneklerden elde edilen histopatolojik cevaplara ait veriler

Gruplar		İnflamatuar hücre cevabı				Doku düzensizliği				Tamir dentini			Bakteri boyama				Kalan dentin kalınlığı ortalama $\pm$ Ss (mm)	Bireyin yaşı
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4		
			A	K														
XP Bond ve Quixfill	1 hafta (n=6)	6	-	-	-	4	2	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,40 $\pm$ 0,32	15,66 $\pm$ 3,66
	1 ay (n=6)	6	-	-	-	5	1	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,55 $\pm$ 0,17	18,00 $\pm$ 3,09
Silorane	1 hafta (n=6)	6	-	-	-	4	2	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,33 $\pm$ 0,29	13,83 $\pm$ 1,32
	1 ay (n=6)	6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,21 $\pm$ 0,38	16,33 $\pm$ 0,51
Equia	1 hafta (n=6)	6	-	-	-	5	1	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,46 $\pm$ 0,39	15,33 $\pm$ 0,81
	1 ay (n=6)	6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	6	-	-	-	1,31 $\pm$ 0,16	15,66 $\pm$ 1,03
Ketac N-100	1 hafta (n=6)	6	-	-	-	4	-	2	-	6	-	-	6	-	-	-	1,23 $\pm$ 0,30	19,00 $\pm$ 7,97
	1 ay (n=6)	6	-	-	-	5	-	1	-	6	-	-	6	-	-	-	1,30 $\pm$ 0,25	18,00 $\pm$ 7,87

A: akut, K: kronik

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; tüm adeziv restoratif sistemler için restorasyonların altında inflammatuar hücre cevabının yanı sıra tamir dentini oluşumu ve bakteri boyanması (Şekil 4.4.1.) gözlenmediği saptanmıştır. Posterior hibrit kompozit restoratif sistemin (XP Bond ve Quixfill) uygulandığı dişlerde 1

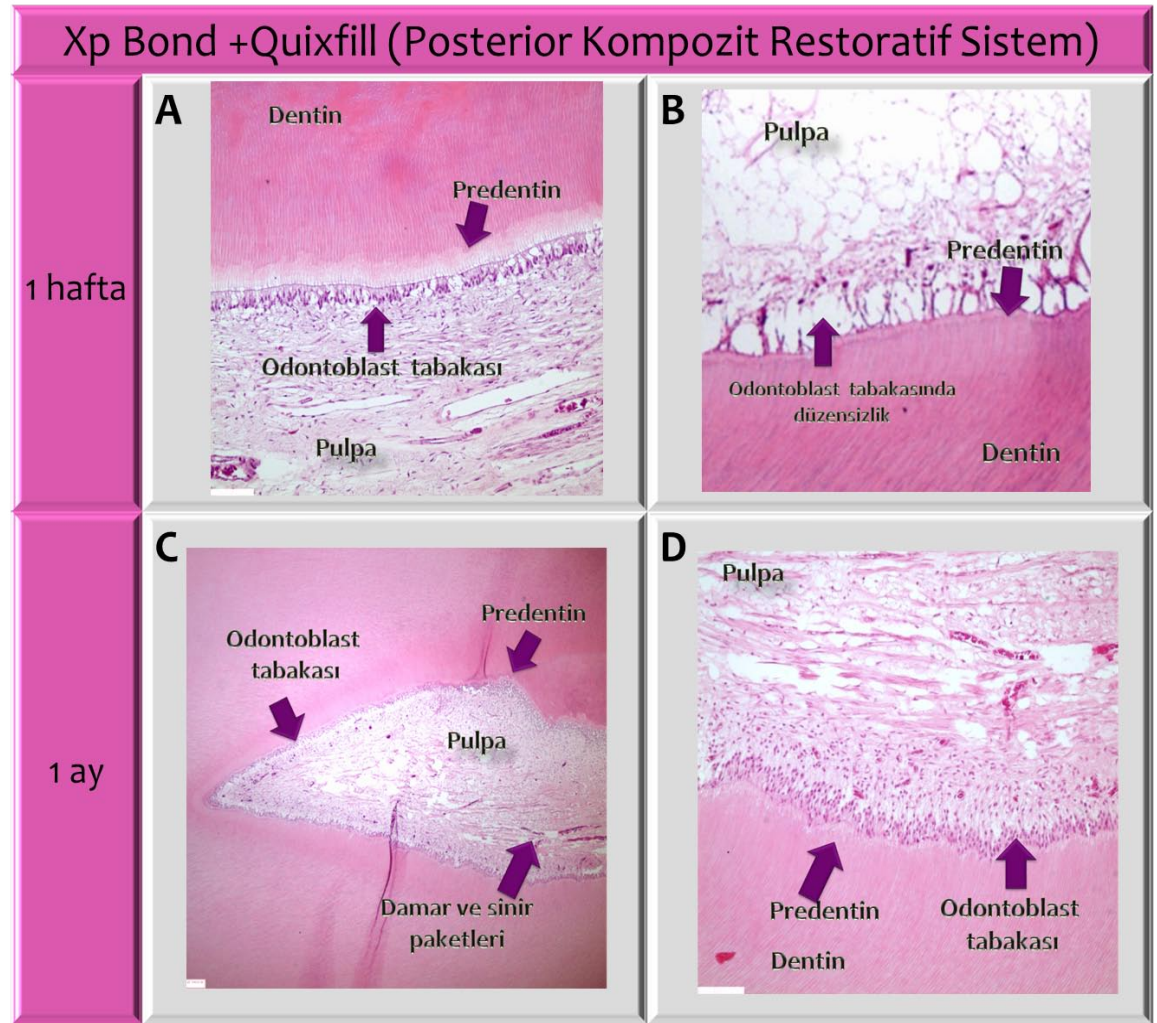
hafta sonrasında 2, 1 ay sonrasında değerlendirilen dişlerden 1 tanesinde, Silorane grubuna ait 1 hafta sonrasında çekimi yapılan 2 dişte, Equia sistemine ait grupta 1 hafta sonrasında çekilen ve değerlendirilen 1 dişte restorasyonların altındaki alan ile sınırlı olmak üzere doku morfolojisinde bozulmalar ve odontoblast tabakasında az miktarda düzensizlikler gözlenmiştir. Ketac N100'e ait grupta 1 hafta sonrasında çekilen 2 dişte, 1 ay sonra çekimi yapılarak değerlendirilen 1 dişte ise restorasyonların altında genel pulpa morfolojisi ve hücre organizasyonunda bozulmalar gözlenmiştir. Değerlendirmeler sonrasında elde edilen verilerin Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak analiz edilmesi sonucunda inflamatuvar hücre cevabı, yumuşak doku organizasyonu, tamir dentini oluşumu ve bakteri boyanması olmak üzere tüm kriterler için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p=0,429$). Kalan dentin kalınlığı ile yumuşak doku organizasyonu arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,744$).



Şekil 4.4.1 Brown and Brenn boyama sonrası kesitlerin görünümü A (Silorane) ,B (Equia) : X 40 büyütme altında kavite tabanı görüntüsü C (Ketac N 100) , D (XP Bond+ Quixfill) : X 100 büyütmede dentin tübüllerinin görüntüsü

4.4.1. Posterior Hibrit Kompozit Restoratif Sistem XP Bond ve Quixfill'in Uygulanması Sonucu Elde Edilen Bulgular

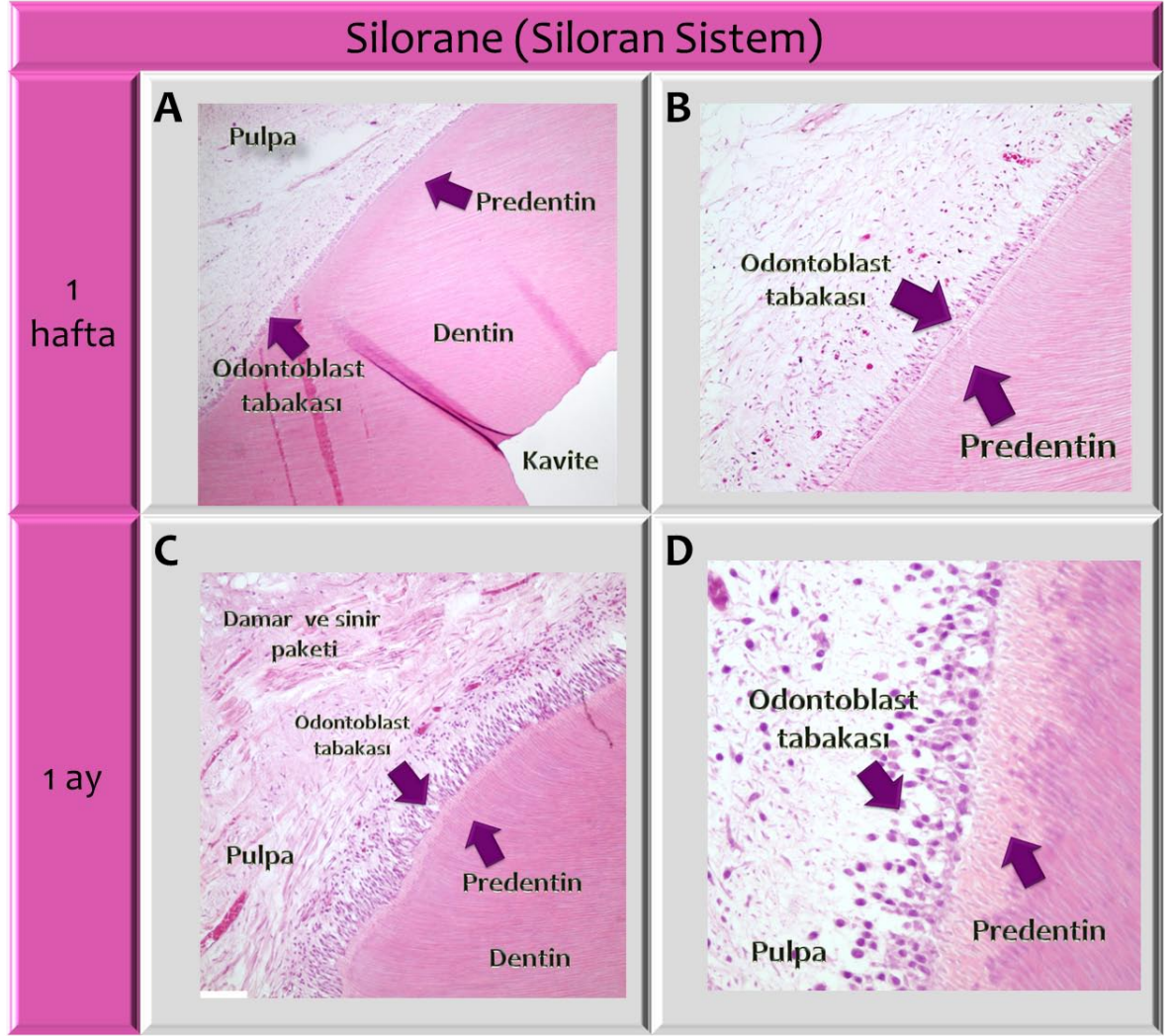
Etch&rinse adeziv sistem XP Bond ile birlikte uygulanan posterior hibrit kompozit rezin Quixfill ile restore edilen ve farklı zamanlarda çekilmelerinin ardından değerlendirilen toplam 12 dişte pulpal inflamasyon, tamir dentini oluşumu ya da bakteri varlığı saptanmamıştır. Bir hafta sonra çekilen 2 dişte ve 1 ay sonra çekilen 1 dişte odontoblast tabakasında restorasyon alanı ile sınırlı olmakla birlikte düzensizlikler gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.).



Şekil 4.4.2. XP Bond+Quixfill'in uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü (A,B,D :HE X 100, C: HE X 40). A: düzenli odontoblast tabakası, B: odontoblast tabakasında hafif düzensizlik, derindeki pulpa dokusu normal görünümde, C,D: düzenli odontoblast tabaka ve pulpa dokusu

4.4.2. Silorane Sistem'in Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular

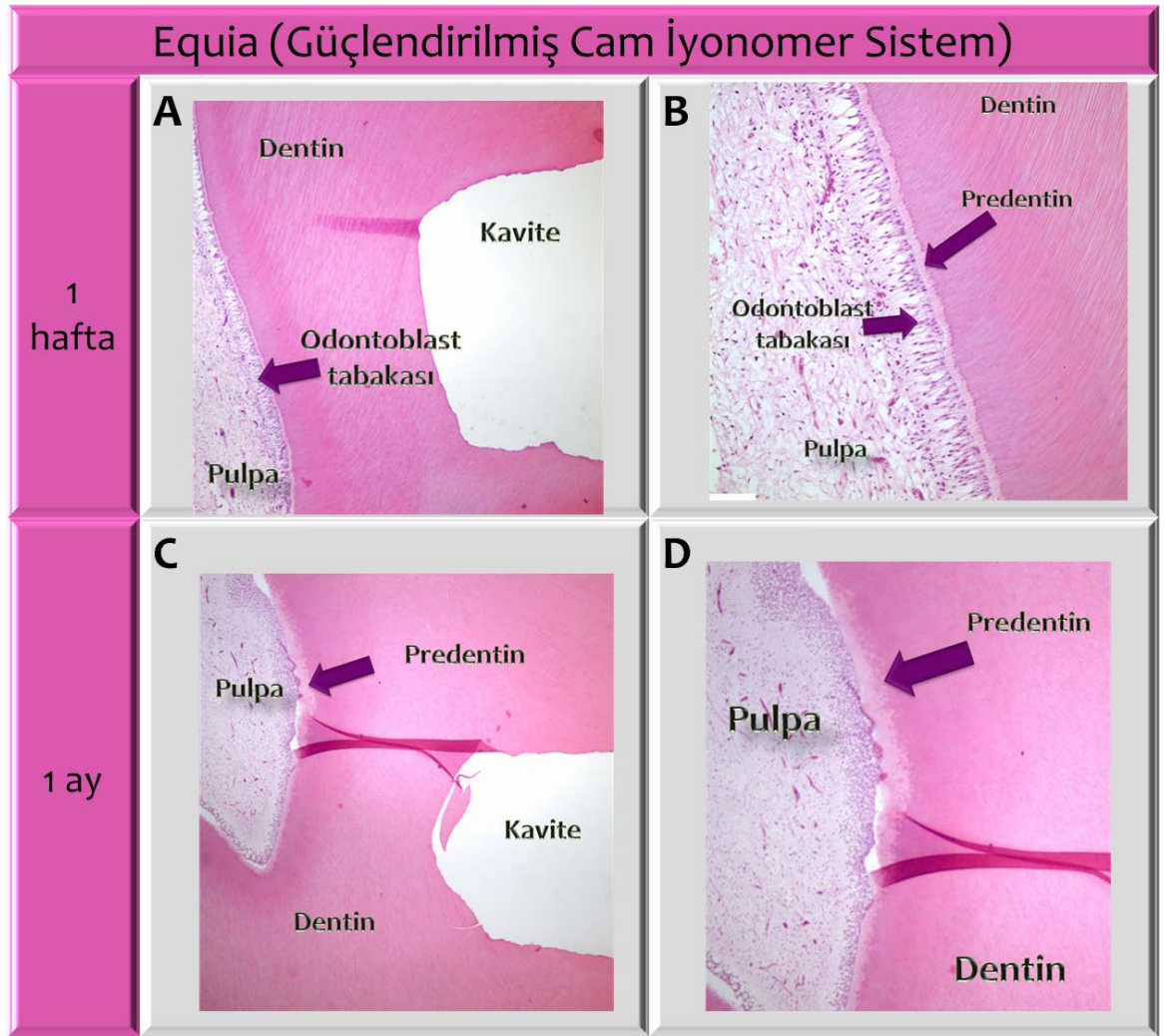
Silorane sistem uygulandıktan 1 hafta veya 1 ay sonra değerlendirilen toplam 12 dişte pulpal inflamasyon, tamir dentini oluşumu ya da bakteri varlığı tesbit edilmemiştir. Sadece 1 hafta sonra çekilen 2 dişte, odontoblast tabakasında restorasyon alanı ile sınırlı olmakla birlikte düzensizlik gözlenmiştir (Şekil 4.4.3.).



Şekil 4.4.3 Silorane Sistem'in uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü (A:HE X 40, B,C,D: HE X 100) A,B,C,D: düzenli odontoblast tabakası ve pulpa dokusu

4.4.3. Güçlendirilmiş Cam İyonomer Restoratif Equia'nın Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular

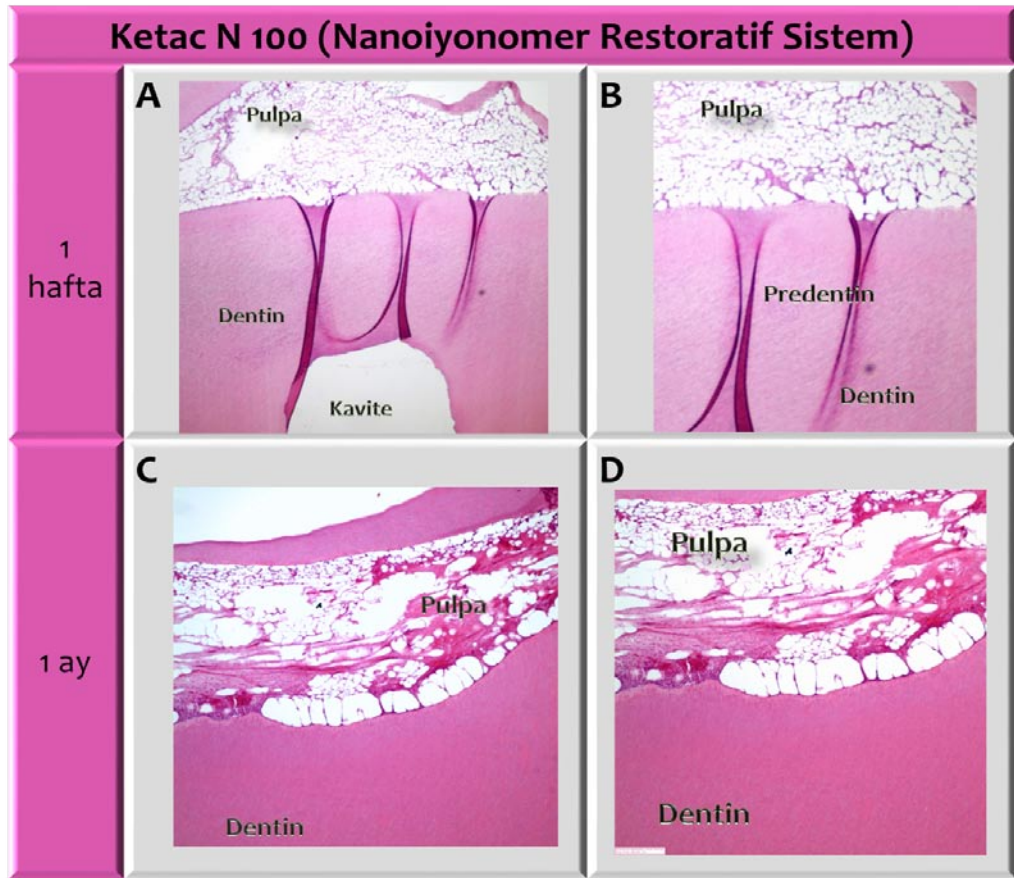
Güçlendirilmiş cam iyonomer restoratif Equia'nın restoratif materyali Fuji IX GP Extra ve ardından yüzey örtücüsü G Coat Plus'ın uygulandığı toplam 12 dişten, sadece 1 hafta sonrasında çekimi gerçekleştirilen bir tanesinde doku morfolojisi bütünlüğünde bozulma izlenirken; diğer 11 dişte pulpal inflamasyon, yumuşak doku organizasyonu bozukluğu, tamir dentini oluşumu ya da bakteri varlığı tesbit edilmemiştir (Şekil 4.4.4.).



Şekil 4.4.4. Güçlendirilmiş cam iyonomer restoratif Equia'nın uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü (A,C:HE X 40, B,D: HE X 100). A,B,C,D: düzenli odontoblast tabakası ve pulpa dokusu

4.4.4. Nanoiyonomer Restoratif Sistem Ketac N 100'ün Uygulandığı Dişlerden Elde Edilen Bulgular

Asidik primeri ile uygulanan rezin modifiye cam iyonomer restoratif Ketac N 100 ile restore edilen toplam 12 dişin 9 tanesinde dişte pulpal inflamasyon, yumuşak doku organizasyonu bozukluğu, tamir dentini oluşumu ya da bakteri varlığı tesbit edilmemiştir. 1 hafta sonrasında çekimi gerçekleştirilen 2 dişte odontoblast tabakasında yaygın düzensizlikler gözlenmiştir. Damarlarda ise hafif derecede genişlemelerin izlenmesi ile birlikte, damar dışına çıkan eritrositlere rastlanmamıştır. 1 ay sonrasında çekilerek değerlendirilen 1 dişte ise odontoblast tabakasında yaygın düzensizlikler ve damarlarda gözlenen genişlemelerin dışında fibrozis gözlenmiştir (Şekil 4.4.5.).



Şekil 4.4.5. Nanoiyonomer restoratif sistem Ketac N 100'ün uygulanması sonrasında elde edilen kesitlerde izlenen görüntü (A,C:HE X 40, B,D: HE X 100). A, B: odontoblast tabakasında düzensizlik, derindeki pulpa dokusunda bozulma C,D: odontoblast tabakada düzensizlik, fibrozis

5. TARTIŞMA

5.1. HPLC bulgularının değerlendirilmesi

Giderek artan toplumsal bilinç düzeyi, diş hekimliği alanında da kişilerin daha uzun ömürlü, daha estetik ve daha fonksiyonel restorasyonlar talep etmelerine neden olmaktadır. Diş dokusunu en iyi taklit edebilen materyali geliştirebilmek ve en az doku kaybı ile en iyi estetik ve fonksiyonu sağlayabilmek amacı ile takip edilen minimal invaziv diş hekimliği, adeziv restoratif sistemlerdeki hızlı gelişmelerin temelini oluşturmaktadır (371). Araştırmacıların, materyal özelliklerini geliştirebilmek için yaptıkları çalışmalar sonucunda; çok sayıda ürün ise kimi zaman yeterli laboratuvar ve klinik testleri yapılmadan kullanıma sunulmaktadır. İdeal restoratif materyalin uygun mekanik ve fiziksel özelliklere sahip olmasının yanısıra, bu materyallerin temasta olduğu dokulara biyolojik olarak uyumlu olması gerekliliği göz ardı edilmemelidir (372). Bu nedenle adeziv restoratif materyaller, klinik kullanımdan önce biyouyumluluklarının saptandığı bir seri test protokolünden geçmek zorundadırlar.

Pulpal hasar oluşturan etkenlerden biri, dentin tübülleri boyunca pulpa dokusuna diffüze olabilen artık monomer salımı olarak kabul edilmektedir (179). Adeziv restoratif materyaller; biyouyumluluk özelliklerini etkileyen farklı metakrilat veya akrilat monomerleri, dimerleri veya oligomerlerinden oluşan polimer matriks, doldurucu partikülleri (13), başlatıcılar, polimerizasyon inhibitörleri ve stabilizatörler gibi bileşenlerden oluşur (229). Kompozit rezinler, zaman içinde tamamlanmamış polimerizasyonları ve ağız sıvılarının etkisi ile bozunmaya uğrarlar (13,335). Bu bozunma; monomer, dimer ve oligomerlerin kimyasal yapısı, polimerize matriks içindeki çapraz bağların oranı, konversiyon derecesi ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir (288). Rezin esaslı restoratif materyallerin polimerizasyonu sırasında bağların oluşumu ile, monomer ve oligomerik moleküllerin hareketinin sınırlandırılması, tamamlanmamış metakrilat grupları ile reaksiyona girmemiş monomerlerin kalmasına sebep olur. (373-375). Polimer matriks içinde reaksiyona girmemiş monomerler, polimer

sistemden dışarı diffüze olarak çevre dokularda hasar oluşturlar (375,376). Bununla birlikte pulpa hücrelerinin, bu monomerler dışında restoratif sistemlerin başlatıcılar veya radikaller gibi farklı bileşenlerinden de etkilenebildiği bilinmektedir (375).

Adeziv restoratif materyallerden salınan artık monomer miktarı ve bozunma ürünleri ile diğer materyallerin tesbitine yönelik ilk araştırmalar, Spahl ve diğ.'nin (179) gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi yöntemini kullanarak, ışıkla polimerize kompozit rezinleri değerlendirdikleri çalışmalarla başlamıştır. Gaz kromatografisi, hızlı bir yöntemdir ve genellikle HEMA gibi düşük moleküler ağırlığa sahip kimyasalların saptanmasında kullanılır (377). Gaz kromatografisine ek olarak Miseller Elektrokinetik Kromatografi (*Micellar Electrokinetic Chromatography*) (378) ve Elektrosprey İyonizasyon/kütle Spektrometrisi de (*Electrospray Ionization/mass Spectrometry*) (303) kullanılmaktadır. Bis-GMA ve TEGDMA gibi çözünabilen ve uçucu olmayan daha büyük reaktif bileşenler, gaz kromatografisinde ayrışır ve ayrışma ürünleri saptanır. Bu nedenle özellikle büyük monomerlerin saptanmasında sıklıkla kullanılan yöntem HPLC'dir (10,379). HPLC'nin ayırtetmede etkin ve sıklıkla uygulanan bir yöntem olması dolayısı ile, adeziv restoratif materyallerden salınan monomer miktarının belirlenmesinde tercih edildiği bilinmektedir. Bu çalışmada; monomerlerin sıvı olan mobil faz içinde çözünmesi nedeni ile, gaz kromatografisinden daha kontrollü ayrılma sağlayan kromatografik yöntem HPLC, kullanılmıştır (11).

Adeziv restoratif sistemlerden salınan monomer miktarına etki eden çözücü türü ve ekstraksiyon süresinin değerlendirildiği, çok sayıda çalışma bulunmaktadır (377,380). Moharamzadeh ve diğ. (11), üç farklı monomerin esas alındığı kompozit rezinlerden, farklı çözücülerde monomer salımlarını değerlendirdikleri araştırmalarında; TEGDMA esaslı kompozitlerden gerçekleşen monomer salımının daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Ekstrakt elde edilmesinde kullanılan çözücülerin ise monomer salımında anlamlı etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Distile su, tükürük, etanol, metanol ve asetonitril, monomer salımını belirlemede kullanılan çözücülerdendir. Etanol, metanol veya

karışımları gibi organik çözücüler, oral koşulları taklit ettikleri için daha sık tercih edilen çözücülerdir. Bu organik çözücüler, polimer ağına penetre olma özelliğine sahiptirler. Çözücünün bu matrikse penetre olması ile birlikte, polimer zincirleri arasındaki açıklıklar genişler ve oligomerler diffüze olur (221). Çalışmamızda bu avantajlarından dolayı, %70 metanol-deiyonize su karışımı kullanılmıştır.

Bu çalışmada gerçekleştirilen HPLC analizi, klinik koşullara uyarlanabilme açısından birtakım zorluklar içermektedir. Farklı adeziv restoratif materyallerin değerlendirilmesinin yanısıra, sınırlı sayıda olan bu materyal miktarı ile bir genelleme yapmak güçtür ve *in vitro*, *in vivo* testler ve klinik kullanım arasında kurulan ilişki, sınırlamalar içermektedir. Bununla birlikte HPLC analizi sonucunda, artık monomerlerin adeziv restoratif materyallerden farklı sürelerde salımı ile ilgili kaydadeğer bulgular elde edilmiştir (240,310,381). Artık monomerlerin salımı; rezin içerik özellikleri, polimerizasyon koşulları ve *in vitro* koşullarda tercih edilen çözücü kimyasına bağlıdır. *In vivo* koşullarda ise monomer salımı birçok faktörden etkilenir. Bunlardan biri, restorasyonu uygulayan hekim faktörüdür. Bu açıdan değerlendirildiğinde, uygulama aşamaları ve üretici firmaların uygulama önerileri önem kazanmaktadır (382). Salınan monomer miktarı, restoratif materyallerin polimerizasyon dereceleri ile ters orantılı olarak değişkenlik gösterir. Restoratif materyallerin konversiyon derecesi; genellikle ışık kaynağının şiddeti, türü ve yoğunluğu ile ilişkilidir (221). Polimerizasyon süresinin arttırılması ile artık monomer miktarında düşüş gözlemlendiği bilinmektedir (377). Bu nedenle tez çalışmasında; restoratif materyaller, üretici firmaların önerileri doğrultusunda polimerize edilmişlerdir. Klinik koşullarda, adeziv sistemlerin daha ince bir tabaka olarak uygulanıp, sonrasında kompozit restorasyonun uygulanması sırasında da ek bir polimerizasyona maruz kaldığı düşünüldüğünde, *in vitro* koşullarda 1 mm kalınlığında hazırlanan adeziv sistemlere ait örneklerin ekstraktlarında gözlenen artık monomer salımının daha fazla olması, öngörülmesi gerekli bir noktadır. Bu etkenlerin dışında, klinik koşullarda uygulanan adeziv restoratif materyaller ve pulpa dokusu arasında bariyer görevini üstlenen dentin dokusunun varlığı da unutulmamalıdır.

Literatürde; kompozit rezinlerden (288,310,311,383), rezin karışımlarından (10,312,384) ve ortodontik adezivlerden (313) salınan monomerlerin HPLC ile belirlendiği, çok sayıda çalışma bulunmaktadır (310,385). Salınan monomer miktarı ve tam salımın gerçekleştiği süre ise dikkat edilen konular arasındadır. Bazı çalışmalarda, monomer elüsyonunun 1 ile 7 gün arasında tamamlandığı; bazılarında ise daha uzun sürede gerçekleştiği belirtilmektedir (382,386). Ferracane ve Condon, 1990 yılında gerçekleştirdikleri araştırmalarında (309); rezin kompozitleri su ve %75 etanol'de bekletmeden önce ve sonrasında tartarak, bu salımın 24 saatte tamamlandığını göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında, üç farklı sürede metanol-deiyonize su karışımı veya metanolde bekletilmeleri sonrasında elde edilen materyal ekstraktlarında bulunan artık monomer miktarı saptanmıştır. Çözücü içinde bekletilme süresine bağlı olarak salınan monomer miktarında artış gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada; 24 veya 72 saatin, reaksiyona girmemiş Bis-GMA salımının %85'inin gerçekleştiği bir süreç olduğu; 9-72 saat sonunda salınan Bis-GMA miktarının ise 0-6 saat sonunda gözlenen miktardan yüksek olduğu bildirilmiştir (387). Bu tez çalışmasında da beklenildiği üzere, ekstrakt süresi ile doğru orantılı olarak saptanan monomer miktarında artış gözlenmiştir. Altıntaş ve diğ. araştırmalarında, iki adeziv sistemden farklı sürelerde (10 dakika, 1 saat, 24 saat, 3, 7, 14, 21 gün) salınan HEMA miktarını değerlendirmişler ve bu tez çalışmasında elde edilen bulgularla paralel olarak; bir adeziv sistem için salınan monomer miktarını en fazla 21 gün sonunda gözlemlmeleri ile birlikte 14 gün ve 21 günlük ekstraktlardaki farklılığın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptamışlardır. Bununla birlikte test ettikleri diğer adeziv sistem için, zaman içinde monomer salımında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını rapor etmişlerdir (382). Bu tez çalışmasında; ekstrakt süresi ile doğru orantılı bir artış gözlenmesi ile birlikte bu sürenin en fazla 7 gün olması nedeniyle, daha sonraki süreçte monomer salımının devam edip etmeyeceğinin merak konusu olması, daha uzun dönemde monomer salımının değerlendirildiği daha farklı araştırmalara gereksinim doğurmaktadır. Söz konusu çalışmalardan farklı olmak

üzere, Polydorou ve diğ. (388) ekstraktların belirlenen sürelerde yenilenerek elde edildiği çalışmalarında (24 saat, 7 gün, 28 gün ve 1 yıl), bir nanohibrit kompozit, bir ormoser ve kimyasal sertleşen bir kompozitten salınan monomer miktarını değerlendirmişler ve TEGDMA salımının 28 gün ve 1 yıl içinde azaldığını, Bis-GMA'nın ise farklı süreler içinde benzer salım gösterdiğini bildirmişlerdir. Manojlovic ve diğ (389) de, oluşturdukları standart sınıf 5 kavitelere uyguladıkları restoratif materyallerden gözledikleri TEGDMA, HEMA ve UDMA salımının 28 gün sonra da devam ettiğini bildirmişlerdir. Lee ve diğ. (390) ise salınan monomer miktarını 7, 14 ve 30 gün içinde değerlendirdiklerinde; 30 gün sonunda 7 güne oranla daha fazla monomer tesbit etmişlerdir.

Rezin restoratif materyallerin bozunması, genellikle siloksan ya da ester bağlarının hidrolizi ile gerçekleşir (391,392) ve bozunma sonucu salınan ürünler bu bileşenlerin moleküler büyüklükleri ile ilişkilidir. Daha küçük moleküller, büyük moleküllere göre daha hızlı hareket ederler. Ortengren ve diğ. (13); test ettikleri dental materyallerin bileşiminde bulunan en düşük moleküler ağırlığa sahip TEGDMA'nın, materyal ekstraktlarında saptanan temel monomer olduğunu ve maksimum monomer konsantrasyonunun, yedi gün sonunda gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında test edilen materyallerden salınan monomerler molekül ağırlıklarına göre sıralandıklarında, küçükten büyüğe doğru MMA (100 g/mol), HEMA (130 g/mol), EGDMA (198 g/mol), BPA (228 g/mol), TEGDMA (286 g/mol), dekametilpentasiloksan (370 g/mol), UDMA (470 g/mol) ve Bis-GMA'dır (512 g/mol) (111). HEMA düşük moleküler ağırlığına bağlı olarak içeriğinde bulunduğu XP Bond'dan UDMA ve TEGDMA'ya göre daha yüksek salım gösterirken; bu salım, Silorane Primer'de Bis-GMA'ya ve Ketac N 100 Restoratif'te ise TEGDMA ve Bis-GMA'ya göre daha düşük gözlenmiştir. Monomer olarak sadece HEMA içeren Ketac N 100 Primer ise en yüksek monomer salımına sahip olarak gözlenmiştir.

Polydorou ve diğ. (247), UDMA teriminin tek bir molekülden ziyade, farklı moleküler ağırlıklarda ve yapıda kimyasalları tanımladığını belirtmişler ve kütle dedektör ile bu farklılıkların saptanabileceğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada

UDMA salımının değerlendirildiği adeziv restoratif materyaller, Dentsply firmasına ait XP Bond ve Quixfill ile GC firmasına ait yüzey örtücüsü G Coat Plus'tır. Farklı moleküler ağırlıklara sahip olduğu düşünülen bu monomerlerin saptanmasında kütle dedektörden ziyade diyot dizi dedektör tercih edilmiştir. Çalışma çözeltisinin hazırlanmasında ise Sigma Aldrich'den temin edilen 470 g/mol moleküler ağırlığa sahip ürethan dimetakrilat kullanılmıştır.

Ak ve diğ. (8) TEGDMA ve Bis-GMA salımını değerlendirdikleri çalışmalarında; tesbit ettikleri monomer salımının, diğer araştırmalardan daha yüksek olduğunu gözlemlemişler ve bu farklılığı materyalleri polimerize etmelerinin hemen ardından çözücü içerisinde yerleştirmelerine bağlamışlardır. Bu tez çalışmasında da materyaller hazırlanmalarının hemen ardından ekstraktlarının alınması için çözücü içerisinde bırakılmışlardır.

Adeziv sistemlerin, zaman içinde bağlanmayı kötü yönde etkileyen hidrolitik bozunmaya uğradıkları bilinmektedir (393). Kollajen ve rezin içeren hibrit tabaka, endojen matriks metalloproteinaz enzimi nedeni ile bozunmaya uğrar ve nanosızıntı görülen alanlardan, küçük molekül ve iyonların difüzyonu gözlenir (394). Dentin sıvısı ile temasta olan adezivler; dentin tübülleri, primer dentin ve odontoblast tabakasında da gözlenebilen küçük rezin partiküllerin varlığından sorumludur (21) ve bu rezin partikülleri pulpada da izlenebilir (32,111). Tüm bu bilgiler dahilinde, adeziv restoratif materyallerden salınan monomer miktarının pulpa üzerindeki etkisinin önemi kanıtlanmıştır.

Materyal bazında ele alındığında; UDMA, TEGDMA ve HEMA içeren XP Bond için en yüksek salımın, en düşük moleküler ağırlığa sahip HEMA için saptandığı gözlenmiştir. Literatürde XP Bond'dan gözlenen monomer salımının değerlendirildiği bir araştırma bulunmamaktadır. İçeriğinde HEMA'nın yanısıra Bis-GMA bulunduran Silorane Primer'in 1 günlük ekstraktında ise XP Bond'dan farklı olarak Bis-GMA salımının daha yüksek olduğu gözlemlenirken, bu farklılık 7 günlük ekstraktlarda HEMA lehine olmuştur. HEMA'nın düşük moleküler ağırlığının yanısıra, farklı monomerlerle birlikte kullanıldığında, yeterli hidrofilik özellik sağlayarak monomerlerin difüzyonunu arttırdığı bilinmektedir (264).

Silorane Primer'in 1 günlük ekstraktında Bis-GMA salımının daha fazla izlenmesi, HEMA'nın sağladığı hidrofilik özellik ile ilişkilendirilebilir; 7 günlük ekstraktta ise düşük moleküler ağırlığına bağlı olarak daha yüksek oranda HEMA saptandığı düşünülebilir. Farklı ışık cihazları ile polimerize edilen ve Silorane Primer ile benzer şekilde HEMA ve Bis-GMA içeren Adper Single Bond 2'den farklı çözücülerde (su ve %75 etanol-su karışımı) ve 2 farklı süre sonunda (7 gün, 30 gün) salınan monomer miktarının değerlendirildiği bir çalışmada; su içinde Bis-GMA salımına rastlanmamış; LED ile polimerize edilmiş örneklerden %75 etanol-su karışımında gözlenen Bis-GMA salımının ise HEMA salımı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa sahip olmadığı tesbit edilmiştir (395).

Literatürde; Silorane adeziv sistemden gözlenen monomer salımının HPLC analizi ile değerlendirildiği, tek bir araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada, farklı adeziv sistemlerden monomer salımları dentin diskleri üzerine uygulayarak değerlendirilmiş ve bu yöntem ile Silorane Bond, disk üzerine üretici firmanın önerileri doğrultusunda primerin ardından uygulanmıştır (283). Raman Spektroskopisi ile yapılan değerlendirmede, Silorane adeziv sistemin uygulanması ile primer ve bond olmak üzere iki ayrı tabaka gözlemlendiği de bildirilmiştir (396). Miletic ve diğ. (283) bahsedilen bu çalışmada, Silorane Primer içeriğindeki HEMA ve Bis-GMA salımının gerçekleştiğini gözlemlemişler ve bu durumu, konversiyon derecesi ile ilişkili olduğu (281) bildirilen bond geçirgenliğine bağlamışlardır. HEMA ve Bis-GMA salımı arasındaki farklılıkların moleküler ağırlıkları ile açıklandığı bu çalışmada, Silorane Bond'dan gözlenen TEGDMA salımının 1 saat sonrasında tamamlandığı ve 7 günlük süreçte daha fazla salım gerçekleşmediği gözlenmiştir. Miletic ve diğ.'nin TEGDMA salımı ile ilgili bulgularından farklı olarak bu tez çalışmasında, Silorane Bond'un yanısıra yüzey örtücüsü G Coat Plus'a ait 1, 2 ve 7 günlük ekstraktları monomer miktarı ekstrakt süresi ile artış göstermiştir.

Metakrilat esaslı adeziv restoratif materyallerden farklı olarak siloksan içeren Silorane Restoratif'ten salımı gözlenen monomerlerin saptanması için gerekli monomerlerin temin edilememesi nedeni ile, daha önce bu materyalden

salınan monomer miktarının değerlendirildiği tek bir çalışma (397) referans alınmıştır. Referans alınan çalışmada gerçekleştirildiği gibi, Silorane Restoratif'ten farklı sürelerde salımı gerçekleşen monomer miktarı birbiri ile karşılaştırılmıştır. Silorane monomerleri, silan veya siloksan kor ve bu kora bağlanmış bir ya da daha çok oksiran fonksiyonel gruptan esas alırlar ve bu grupların halka açılımı polimerizasyonu ile polimerize olurlar. Polimerizasyon, metakrilat esaslı kompozitlerde olduğu gibi kamforokinon başlatıcının ışıkla irradiye olması ile başlar. Bununla birlikte iyot tuzları gibi farklı başlatıcıların da gerekli olduğu bildirilmiştir (3).

Silorane Restoratif içeriğinde bulunan monomerlerin saptanmasında, diğer adeziv restoratif materyallerden farklı olarak kütle dedektör tercih edilmiştir. Referans alınan çalışmada moleküler ağırlıkları 370, 736 ve 920 g/mol olan ve 3M/ESPE'den sağlanan monomerler, kütle dedektörle saptanmaya çalışılmıştır. Silorane içeriğinde salımı test edilen bir başka monomer ise, bu sıklık siloran monomerler'in kimyasal yapısına benzeyen ve birçok bakım ürününün yapısında bulunan dekametilsiklopentasiloksan'dır (D5).

D5, en sıklıkla kullanılan sıklık uçucu metil siloksanlardan biridir (cVMS) (398). cVMS'ler hidrofobiklik ve uçuculuk gibi sıradışı fiziko-kimyasal özelliklere sahiptirler. Günümüzde, önemli kabul edilen biyokonsantrasyon faktörlere sahip olmaları, biyoakümüülasyon için potansiyel içermeleri ve atmosfere dağılarak uzak mesafelere dağılmaları nedeni ile bu monomerlerin çevresel etkileri önem kazanmıştır (399,400). D5'in farelerde solunumla birlikte alındığında, 100 ppm üzerindeki bir dozda karsinogenik olarak belirtilmesinin yanısıra uzun dönemde ya da ani olarak çevresel zararlı etkileri olabileceği bildirilmiştir (401). Silorane Restoratif'ten salımı değerlendirilen bu monomerlerden, sadece 370 g/mol ağırlığa sahip olan bir monomer tesbit edilmiştir. D5 de benzer şekilde 370 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Kalibrasyon çözeltisinde test edilen D5'in ayrılma süresi 4,66 dak iken Silorane Restoratif'te tesbit edilen 370 g/mol moleküler ağırlığa sahip monomerin ayrılma zamanı 3,14 dak olarak saptanmış ve bu

monomerin D5 olmadığı sonucuna varılmıştır. Salımı gözlenen bu monomerin ise zamanla artış gösterdiği izlenmiştir.

Kopperud ve diğ. (397) referans olarak kabul edilen çalışmalarında; Silorane Restoratif'ten farklı sürelerde su ve etanol solüsyonu içerisine salınan monomer miktarlarını değerlendirmişlerdir. Su içinde monomerin saptanmadığı bu araştırmada, etanol solüsyonunda D5 dışındaki monomerlerin salımlarının farklı sürelerde (1, 4, 24 ve 72 saat) çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma çözeltilerinin standart monomerlerin temin edilememesi sonucunda hazırlanamaması nedeni ile bu çalışmada miktar tayini yapılamamış, farklı sürelerde salımı gözlenen monomerlerin miktarının karşılaştırılması, bu monomerlere ait pik değerlerinin altında kalan alanların değerlendirilmesi ile sağlanmıştır. İçerdiği monomerlerin kor yapısına benzemesi nedeni ile Kopperud ve diğ. tarafından D5 için kaynak oluşturabileceği varsayılan Silorane Restoratif'in bozunma ya da parçalanma ürünü olarak bu monomeri salmadığı belirtilmiştir. Test edilen tüm monomerlere ek olarak Silorane Restoratif içinde bulunduğu bilinen 337 g/mol moleküler ağırlığa sahip bir başlatıcı olan izopropil-metil-difenil iyot varlığı da saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da bahsedilen başlatıcının moleküler ağırlığı kütle dedektör ile taranmış ve Silorane Restoratif'ten salındığı belirlenmiştir.

Literatürde, Ketac N 100'den salınan monomerlerin değerlendirildiği herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Nanoiyonomer restoratif öncesinde uygulanan Ketac N 100 Primer'den salınan HEMA, test edilen restoratif materyaller içinde en yüksek miktarda saptanan monomerdir. Ekstraktların alındığı günlerle doğru orantılı olarak artış gözlenmiştir. Sideridou ve diğ. (402) materyallerin bileşenleri için, artan dolduru miktarı ile azalan bir su emilimi ve çözünme vurgulamışlardır. Bununla birlikte; adeziv sistemlerde yüksek organik içerik (monomer) yüzdesine bağlı olarak, daha fazla çözünme ve elusyon gözlenmesinin beklenir bir durum olduğu da belirtilmektedir (395). Bu durum, doldurucu içermeyen bu primerden gözlenen yüksek HEMA salımına neden

olarak gösterilebilir. HEMA'nın düşük moleküler ağırlığa sahip olmasının yanısıra hidrofilik özelliği de yüksek salımı (264) ile ilişkilendirilebilir.

Birçok çalışmada, rezin modifiye cam iyonmer restoratiflerden HEMA salımı gösterilmiştir (70,403,404). Işıkla sertleşen cam iyonmer restoratiflerden salınan florür ve HEMA miktarlarının değerlendirildiği bir çalışmada (405); kompomerlerle karşılaştırıldıklarında rezin modifiye cam iyonmer restoratiflerden daha fazla florür daha düşük HEMA salımı olduğu gözlemlenmiştir. Materyal pH'larının değerlendirildiği bu çalışmada 8 saat sonrasında kompomer ve rezin modifiye cam iyonmer ekstraktlarında benzer pH izlenirken, 24 saat sonrasında, rezin modifiye cam iyonmer restoratif ekstraktlarında kompomer ekstraktlarından daha yüksek pH saptanmıştır. Resin modifiye cam iyonmer restoratifler ve kompozit rezinlerden salınan monomer miktarının tesbit edildiği farklı bir çalışmada ise monomer olarak Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA, TEGDMA ve HEMA saptanması ile birlikte difenil iyot klorür kamforokinon ve 4-(dimetilamino)etilbenzoat gibi başlatıcılar, BHA gibi inhibitörlerin varlığı da belirtilmiştir (406). Bu tez çalışmasında rezin modifiye cam iyonmer Ketac N 100 Restoratif; monomer içeriği olarak HEMA, Bis-GMA, TEGDMA, PEGDMA bulundurmaktadır. Bu materyal içeriğinde bulunan monomerlerden en düşük salım, polimer yapıdaki PEGDMA'nın monomeri olan EGDMA için gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında; içeriğinde Bis-GMA bulunduran Ketac N100 Restoratif ve Silorane Primer'den BPA salımı da değerlendirilmiştir. BPA 1940'lardan beri plastiklerin yapısında kullanılan ve diğer moleküllere bağlanarak polistren yada polikarbonat gibi polimerleri oluşturan tek bir hidrokarbon moleküldür. Uzun süreden beri sıklıkla kullanılan bir molekül olmasının yanısıra araştırmacılar BPA'nın östrojen benzeri özelliği nedeni ile insan sağlığına zararlı olduğunu bildirmişlerdir (407).

Bis-GMA içeren adeziv materyallerdeki BPA içeriğinin ya da salınan BPA miktarının değerlendirildiği araştırmalar sonucunda, farklı sonuçlara ulaşılmıştır (179,229,239,408). Polydorou ve diğ. (388) ve bazı araştırmacılar, test ettikleri

ekstraktlarda BPA saptadıklarını bildirmişlerdir (12,409). Darmani ve diğ. (410), dört farklı kompozit rezinden (Z100, Solitaire 2, Filtek P60 ve Synergy) salınan monomer miktarını ve bu materyallerin sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, Bis-EMA ve BPA tesbit etmişler ve bu materyallerin sitotoksik etkilerinin kimyasal içeriklerine ve salınan monomer miktarına bağlı olduğunu vurgulamışlardır.

Al-Hiyasat ve diğ. (12), bir rezin kompozit (Z-100) ve BPA'nın, fare doğurganlığı üzerinde etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında; test ettikleri kompozit rezinden BPA salındığını ve her iki test materyalinin de farelerin doğurganlığı üzerinde etkileri olduğunu vurgulamışlardır. Farklı bir çalışmada ise, üç farklı kompozit rezin (Admira, Z250, Tetric Ceram) ve bunların akışkan tiplerinden (Admira Flow, Tetric Flow, Filtek Flow) salınan monomer miktarını HPLC ile analiz etmişlerdir. Bu analiz sonucunda; tüm ekstraktlarda Bis-GMA ve TEGDMA, Filtek Flow dışındaki materyal ekstraktlarında ise UDMA tesbit etmişlerdir (253).

Kompozit rezinlerin BPA'dan geliştirilen Bis-DMA ve Bis-GMA içerdiklerinin bilinmesi ile birlikte BPA bu materyallerde kullanılmamaktadır. Kompozit rezinlerden salınan bu monomerlerin salımı sonrasında farklı koşullarda BPA'ya hidrolize olup olmadıkları araştırılmıştır. Bis-GMA'nın birçok hidrolitik koşulda stabil kaldığının belirtilmesi (411) ile birlikte iki çalışmada Bis-DMA'nın BPA'ya hidrolize olduğu ve test edilen ekstraktlarda tesbit edildiği vurgulanmıştır (411,412). Çeşitli miktarlarda BPA, Bis-DMA ve TEGDMA'nın bu materyallerin tükürük içerisindeki stabilitelerinin değerlendirildiği farklı bir çalışmada ise Bis-DMA'nın hızlıca BPA'ya dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum fissür örtücü uygulamalarından sonra klinik olarak tesbit edilen BPA'ya açıklama olarak örneklenmiş ve düşen tükürük pH'sının ve ısının BPA'ya olan dönüşümü yavaşlattığı belirtilmiştir (412).

Ortengren ve diğ. (13) ve bir grup araştırmacı, Bis-GMA varlığını bildirmelerine rağmen bozunma ürünü olduğu düşünülen BPA'ya rastlamamışlardır. Olea ve diğ.'nin (238,409) belirgin bir BPA salımını bildirdikleri

araştırma bulgularının, şüphe götürür olduğu belirtilmiş ve Olea'nın bu araştırma ile ilgili yapılan yoruma (413) verdiği cevap tatmin edici bulunmamıştır. Bu araştırmacıların, HPLC sırasında BPA'ya ait pik ile, Bis-GMA'nın üç ana komponentinden biri olarak gösterilen Bis-GMA-H'ye ait piki ayırt etmede yanıldıkları düşünülmektedir. HPLC koşullarında, bu monomerin BPA'ya benzer ayrılma zamanına sahip olduğu bilinmektedir (414). Bu tez çalışmasında da diyot dizi dedektör ile yapılan saptamada; Silorane Primer'de BPA ile benzer alıkonma süresine sahip bir materyal tesbit edilmiştir. Fakat bu materyalin, BPA ya da Bis-GMA-H'ye ait olup olmadığına ait kesin bir sonuç elde edilebilmesi için daha ayrıntılı bir kromatografik değerlendirme yapılması gerekmektedir. Ketac N 100'e ait kromatogramda ise benzer alıkonma sürelerine sahip (BPA ve TEGDMA) iki monomeri bulunduran bu materyal içinde; diyot array dedektör, pikin dalga boyunun 206 nm olduğu belirlenmiştir. Monomerlerin pik oluşturdıkları dalga boylarının TEGDMA için 206, BPA için 202 nm olduğunun belirlenmesi sonucunda ise Silorane Primer'de 206 nm'de gözlenen pikin TEGDMA'ya ait olduğu saptanmıştır.

Adeziv restoratif materyallerden elde edilen ekstraktlarda, salımı gözlenen tek grup, monomerler değildir. Bir araştırmada, dört farklı rezin esaslı kompozit restoratiftan 34 farklı bileşenin salındığı tesbit edilmiştir. Polimerize edilmiş veya edilmemiş restoratif materyallerden salınan bileşenlerden bazıları; Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA, TEGDMA, EGDMA, ve MMA olarak saptanmıştır (179). TEGDMA ise en fazla salımı gözlenen monomerdir (240). Bu restoratif materyallerden salımı gözlenen doldurucu partiküller ise doldurucu tipine göre silikon, boron, sodyum ve baryum olarak saptanmıştır (415).

5.2. Hücre Kültürü Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

In vitro biyouyumluluk testlerinin amacı, materyallerin canlı dokular üzerindeki biyolojik etkilerinin laboratuvar ortamında belirlenmesidir (15). *In vitro* koşullarda çalışmanın, deneye etki eden faktörleri daha kolay kontrol edebilme gibi büyük bir avantajı bulunmaktadır (416). Son yıllarda yapılan *in vitro*

sitotoksisite testlerinde, biyouyumluluğun hücre kültürü ile değerlendirilmesi nedeni ile (330,417,418); bu tez çalışmasında, direkt uygulanan güncel adeziv restoratif sistemlerin temsilcisi olan dört sistemin toksik etkilerinin *in vitro* yöntemlerle saptanması planlanmıştır. Bu materyaller sırası ile; etch&rinse adeziv sistem XP Bond ile uygulanan metakrilat esaslı hibrit posterior kompozit Quixfill, self-etch adeziv sisteme sahip siloksan oksiran esaslı kompozit Silorane, yüzey örtücüsü G Coat Plus ile uygulanan güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer restoratif Fuji IX GP Extra (Equia) ve öncesinde primer uygulaması içeren rezin modifiye cam iyonomer restoratif dual sertleşen nanoiyonomer Ketac N 100'dür.

Günümüze kadar, biyomateryallerin sitotoksik özelliklerinin incelenmesi için çeşitli sayıda test yöntemi geliştirilmiştir. Materyalin, bariyer olmadan direkt, hücrelerle temas edebileceği direkt kontakt testleri (417,419), materyal ve hücreler arasında agar tabakası, milipor filtre veya diş dokusu gibi bir bariyerin bulunduğu indirekt kontakt testleri (420) ve kompozit materyalden salınan bileşenlerin hücrelerle ekspozite edildiği ekstrakt testleri (420-422) bu testlerden bazılarıdır. Bu tez çalışmasında, dört adeziv restoratif sistemi oluşturan toplam dokuz adeziv materyalden farklı sürelerde elde edilen test ekstraktlarının oluşturduğu toksik etkiler değerlendirilmiştir.

Adeziv restoratif sistemlerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde, çok farklı yöntemler kullanılmıştır. Restoratif materyallerin hücre kültürü üzerinde oluşturduğu toksik etkinin saptanmasında; *lactate dehydrogenase* (LDH) (423), nötral kırmızı alım testi (NRU) (424), 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonate (WST-1) (425), *bromodeoxyuridine* (BrdU) (423), ve floresans mikroskopi (252) testleri ile birlikte toksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan testlerden biri olan MTT testi, (6) bu çalışmada tercih edilen yöntemdir. Sıklıkla kullanılan sitotoksisite testlerinde, hücre ölümü en önemli değerlendirme kriteri olarak görülür. Yapılmış çalışmaların büyük kısmında sitotoksisite, süksinik dehidrogenaz (SDH) isimli mitokondriyal enzimin aktivitesinin, MTT testi ile ölçülmesi sonucunda değerlendirilmiştir (418,426,427).

Issa ve diğ. de MTT testinin LDH'ye göre daha hassas bir yöntem olduğunu saptamışlardır (341).

İn vitro çalışmalarla materyallerin biyouyumluluğu belirlenirken kullanılan test yöntemlerinin yanısıra, materyalin etkisinin inceleneyeceği hücre türü de önem taşımaktadır. Literatürde, rezinlerin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda; L929, pulpa fibroblastları, 3T3, gingival fibroblastlar, sığır dental papillasından elde edilen immortalize hücreleri, fareden elde edilen odontoblast benzeri hücreleri (MDPC-23) kullanılmaktadır (9,18,31,341,426,428). *İn vitro* toksisite testlerinin, ilgili insan dokuları ile homolog hücrelerde gerçekleştirildiğinde daha tatmin edici olduğu belirtilmiştir. Restoratif materyallerin pulpa üzerinde toksik etki gösterebileceği düşüncesi ile pulpa hücre kültürleri, toksisite değerlendirmelerinde tercih edilir olmuştur. Pulpa hücrelerinin kabul edilebilir bir model olması ile birlikte; bu kültürlerin üretilabilir, verdikleri cevabın ise tekrarlanabilir olması gereklidir (429). Bu hücrelerin dezavantajı hücre hattı olarak standardize edilmelerinde yaşanan zorluklardır. Farklı bireylerden alınan hücreler aynı tip ve aynı anatomik bölgeden olmalarına rağmen kültür içinde farklılık göstermişlerdir. Bu durum, pulpa fibroblast kültürlerinde gösterilmiş; hücrelerin, bireyin yaşına, pasaj numarasına ve alınan bölgeye bağlı olmadan proliferaktif aktivite açısından farklılık gösterdiği belirtilmiştir (430). İnsan pulpa hücrelerinin pasajlama süresince canlılıklarını sürdürebilme ve üremelerinin zayıf olduğu da bildirilmiştir (429,430). Pulpa fibroblastlarının toksik etkenlere hassas olması dolayısı ile restoratif materyallerin olası toksik etkilerinin belirlenmesinde hassas bir gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (429,431). Araştırmanın *in vitro* basamağında kullanılan L929 hücre hatları, homojen morfolojileri ve büyüme karakterlerinin yanısıra hücrelerin kolay bulunabilmesi ve *in vitro* hücre kültürü koşullarında güçlü üreme karakterleri nedeni ile ISO standartları (16,22,417) tarafından kullanılması önerilen hücrelerdendir.

Literatürde rezin esaslı kompozitler, komonomerler ve katalizör sistemlerin biyouyumluluklarının hücre kültüründe test edildiği pek çok çalışma bulunmaktadır (31,70,432,433). Bu adeziv restoratif materyallerin sitotoksik

etkilerinin, zamana bağlı değişim gösterdiği bilinmektedir. Polimerizasyonun ışıkla irradiasyondan sonra da devam ettiği ve *post-cure* polimerizasyon olarak adlandırıldığı bildirilmiş ve bu polimerizasyonun, ışıkla aktivasyondan sonra kalan serbest radikallere bağlı olduğu vurgulanmıştır. Başlangıçta çok reaktif olan bu radikaller, 1-2 gün içinde polimerlere dönüşmektedir (434). Polimerizasyondan sonra kalan serbest monomerler ise tükürük içine salınmakta (435) ve/veya dentin tübülleri boyunca pulpaya diffüze olarak (263) inflamasyon ya da nekroz oluşturabilmektedirler (19). Rezin esaslı restoratif materyaller, polimerizasyonlarının hemen ardından ve tam bir polimerizasyonun gerçekleşmesi sonrasında test edilmelidir. Bu materyaller; uygulanmalarının hemen ardından tamamlanmamış polimerizasyona bağlı olarak salınan, polimerize olmamış ya da kısmen polimerize olmuş monomerleri ile, lokal pulpal cevap oluşturabilirler (436).

Bu çalışmada kullanılan ekstraktlar; adeziv restoratif materyallerin üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmalarının hemen ardından kültür ortamına aktarılıp, 1, 2 ve 7 gün bekletilmeleri ile elde edilmişlerdir. Bununla birlikte Schedle ve diğ. (417) direkt kontakt yöntemini kullandıkları araştırmalarında; test edilen adeziv restoratif materyallerin hazırlanmalarının hemen ardından hücre kültüründe toksik etkiler gösterdiklerini, 1,2,7 gün ve 6 hafta yaşlandırıldıktan sonra hücre kültürüne uygulandıklarında ise toksik etkinin azaldığını belirtmişlerdir. Test edilen materyaller, 7 gün sonunda toksik özelliklerini korurken; 6 hafta sonrasında sitotoksik etki göstermemişlerdir. Benzer şekilde Franz ve diğ. de (437), materyallerin yaşlandırma sonrasında daha düşük toksik etkiye neden olduklarını gözlemlemişlerdir. Bazı çalışmalarda monomer elüsyonunun 1 ile 7 gün arasında tamamlandığı, bazılarında ise daha uzun sürede gerçekleştiği belirtilmektedir (309,382,386). Materyallerden salınan monomer miktarının zamanla azaldığı düşünüldüğünde; yaşlandırma sonrasında direkt kontak yöntemi ile hücre kültürüne uygulanan adeziv restoratif materyallerin düşük monomer salımına bağlı olarak daha düşük toksik etki göstermesi kaçınılmazdır. Adeziv restoratif materyallerin ağız ortamına

uygulanmaları ve polimerize edilmelerinin ardından monomer salımı yapmaya başladıkları ve sonrasında da devam eden salım ile pulpaya ulaşan monomer miktarının kümülatif olarak artacağı düşünüldüğü için bu tez çalışmasında ekstraktlar; materyallerin hazırlanmalarının hemen ardından çözücüye yerleştirilmeleri ve bu ekstrakt ortamının yenilenmeden, amaçlanan süre sonuna kadar bekletilmeleri sonrasında elde edilmiştir.

Sertleşme veya polimerizasyon sonrasında toksik monomer salımının devam ettiği bilgisi sonucu ortaya atılan, farklı ekstrakt sürelerinin materyallerin toksisiteleri üzerinde etkisi olduğu görüşünü (436) desteklememekle birlikte; test edilen toplam 9 adet adeziv restoratif materyalden sadece ikisine ait ekstrakt süresinin, istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturduğu belirlenmiştir. 24 ve 72 saat sonunda uygulanan MTT testinde Silorane Restoratif ve G Coat Plus'a; 48 saat sonunda ise sadece Silorane'a ait 1, 2 ve 7 günlük ekstraktların farklı toksik etkilere neden olduğu gözlenmiştir. 24 saat sonrasında Silorane Restoratif'e ait 1 günlük ekstraktların uygulandığı hücre kültüründe 7 günlük ekstraktlara göre izlenen hücre canlılığı yüzdesi daha düşük bulunmuş; 48 ve 72 saat sonrasında ise 1 ve 2 günlük ekstraktlar toksik etki göstermezken, 7 günlük ekstrakt grubunda toksisite izlenmiştir. 24 saat sonrasında, G Coat Plus'a ait 1 günlük ekstraktların uygulandığı hücre kültüründe 7 günlük ekstraktlara göre izlenen canlı hücre miktarının daha düşük olduğu gözlenirken; 72 saat sonra tam tersi bir durum izlenmiştir. HPLC analizi sonrasında, Silorane Restoratif'e ait monomer salımı değerlendirildiğinde tesbit edilen tek monomerin ekstrakt süresinin artması ile yüksek salım gözlenmesi ve başlatıcılar gibi farklı bileşenlerin de biyouyumluluk üzerinde etkili olabildikleri düşüncesi (375), Silorane Restoratif'in 7 günlük ekstraktlarının 48 ve 72 saat sonunda toksik etki göstermesi ile ilişkilendirilebilir. G Coat'a ait 7 günlük ekstraktlarda ise MMA'nın çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, Porto ve diğ.'nin (434) Adper Single Bond'un toksik etkilerini MTT testi ile değerlendirdikleri çalışmalarına paralellik göstermektedir. Adper Single Bond'un polimerizasyonun hemen ardından ve 24

saat sonrasında ekstrakt solüsyonunda 24 ile 72 saat inkübe edilmesi sonucunda oluşturulan dört farklı grubun karşılaştırıldığı bu çalışmada, ekstraksiyon sürelerinin toksisite üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı vurgulanmış; 24 saat yaşlandırdıktan sonra inkübasyon ile elde edilen ekstraktların da sitotoksik oldukları ve bu etkilerinin polimerizasyonun hemen ardından inkübe edilerek hazırlanan ekstraktların toksik etkilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı saptanmıştır.

Çeşitli adeziv restoratif materyallerin yapay tükürük içinde farklı sürelerde (0, 1, 3, 5 ve 8 hafta) yaşlandırılmalarının ardından, toksik etkilerinin direkt kontak yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışmada; bu materyallerden siloran Restoratif'in (Hermes "3M ESPE") sitotoksik etkisinin zaman içinde azaldığı, uzun dönemde ise (5 ve 8 hafta) kontrol grubuna yakın sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (438). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgularda ise hücre kültüründe 72 saat sonrasında yapılan değerlendirmelerde, Silorane Restoratif'in 1 ve 2 günlük ekstraktların toksik olmamasına rağmen, 7 günlük ekstraktlarının sitotoksik etkisi gözlenmiştir.

Klinik koşullarda; monomerlerin pulpa toksisitesi üzerinde, dentin dokusunun bariyer etkisi de göz ardı edilmemelidir. Bouillaguet ve diğ. (74) dentin geçirgenliğinin farklı adeziv sistemlerin sitotoksiteleri üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, yüksek geçirgenliğe sahip dentin dokusunda daha fazla difüzyon gözlemlenmeleri ile birlikte bu difüzyonun daha çok materyale bağlı olduğunu savunmuşlardır. Test ettikleri adezivlerin sitotoksik etkileri ise zamanla düşüş göstermiş ve 24-48 saat sonunda alınan ekstraktlar 96-120 ve 120-144 saat sonrasındakilere göre daha yüksek sitotoksik etki göstermişlerdir.

Literatürde, sitotoksik değerlendirmelerin test ekstraktlarının ya da materyallerinin hücre kültürü ile farklı sürelerde inkübe edilmesinin ardından yapıldığı çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu inkübasyon süreleri genellikle 24 saat (418), 48 saat (439) ve 72 saattir (253). Ergün ve diğ. (440), test ettikleri farklı adezivlerin 1 günlük ekstraktlarını L 929 hücreleri ile 24 ve 72 saat inkübe

etmelerinin ardından, bu süreler sonrasında uygulanan MTT testi sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gözlemlemişlerdir. Chen ve diğ. de (433) üç farklı süre sonunda uyguladıkları MTT testi bulgularına dayanarak, her üç test sonucunda da benzer toksik etki elde etmişlerdir. Literatürde bulunan bu çalışmalara benzer olarak tez çalışmamızda, farklı sürelerde (1, 2 ve 7 gün) ekstraktları alınmış materyallerin toksik etkileri, 24, 48 ve 72 saat sonunda uygulanan MTT testi ile değerlendirilmiştir. Ergün ve diğ.’nin bulgularını destekler biçimde, toksik etki gözlenen Silorane Primer, XP Bond, Ketac N 100 Restoratif ve Ketac N 100 Primer için farklı sürelerde uygulanan MTT testi sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte materyaller dikkate alınmadan yapılan istatistiksel analize göre bu üç süre sonunda uygulanan test sonuçları, istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuş ve 72 saat sonunda sitotoksik etki daha yüksek gözlenmiştir. Materyallerin toksik etkileri ekstrakt süreleri gözönünde bulundurulmayarak değerlendirildiğinde, 24 saat sonunda yapılan ölçümlerde toksik etki göstermeyen dört materyal Quixfill, Silorane, Silorane Bond ve G Coat Plus’tır. 48 saat sonrasında, sadece Quixfill ve Silorane olmak üzere iki materyalin toksik etkiye sahip olmadığı gözlenirken 72 saat sonunda toksik etki göstermeyen tek materyal Silorane’dır. Fuji IX GP Extra ve G Coat Plus ise en düşük sitotoksik etkiyi 24 saat sonunda göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar test materyalleri ile hücre kültürü temas süresinin adezivlerin toksik etkisi üzerinde önemli etkisi olduğunu vurgulayan ve 72 saatlik inkübasyondan sonra gözlenen toksik etkinin 24 saat sonrasına göre anlamlı derecede yüksek gözlendiği başka bir çalışma (441) ile paralellik göstermektedir.

Bu tez çalışmasında test edilen metakrilat esaslı kompozit restoratif sistem, TEGDMA, UDMA ve HEMA içeren etch&rinse bir adeziv sistemle uygulanan ve monomer içerik olarak UDMA ve TEGDMA bulunduran hibrit kompozit Quixfill’dir. MTT testi sonucunda, XP Bond’a ait tüm ekstraktlar her üç değerlendirmede de toksik etki göstermişlerdir. XP Bond’un pulpa hücreleri üzerindeki toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada (442); hücrelerin materyal

ekstraktı ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında toksik olduğu bildirilmiştir. XP Bond ve farklı iki adeziv (Clearfi Tri-S, AdheSe) ekstraktlarının L929 ve RPC-C2A hücre kültürlerinde oluşturdukları etkilerin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise; araştırmacılar, XP Bond'un diğer iki adeziv sisteme oranla daha toksik olduğunu vurgulamışlardır (443). XP Bond'un pulpal ve gingival fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkisi olduğu farklı bir araştırmada da belirtilmiştir (444). Bu sonuçlar literatürde bazı adeziv sistemler ile HEMA, TEGDMA, Bis-GMA ve UDMA gibi monomerlerin toksik etki gösterdiklerini bildiren farklı araştırmalarla da uyum göstermektedir (273,291,445) . Deney ortamında adeziv sistemlere ait örneklerin hazırlanması sırasında; materyallerin daha ince bir tabaka olarak uygulanıp, kompozit restorasyonun uygulanması sırasında da ek bir polimerizasyona maruz kaldığı klinik ortama kıyasla, daha fazla miktarda materyal kullanıldığı mutlaka öngörülmelidir. Bu nedenle *in vitro* test ortamında biyouyumlu olduğu saptanan materyaller, klinik kullanıma uygun olarak kabul edilirken; salınan artık bileşenlerinin hücre hasarı oluşturduğu materyallerin klinik kullanımında, bu noktanın dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (434,446).

Rezin esaslı adeziv restoratif materyallerin toksik etkilerinin, rezin matriks kimyası ile ilişkilendirildiği gibi doldurucu içeriğine de bağlı olduğu ve akışkan kompozitlerin, uzun dönemde daha yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (422). Al-Hiyasat ve diğ. (253), 3 farklı kompozit rezinin (Admira, Z250, Tetric Ceram) ve bunların akışkan tiplerinin (Admira Flow, Tetric Flow, Feltik Flow) toksik etkilerini ve bu materyallerden salınan monomer miktarını değerlendirdikleri bir çalışmalarında; akışkan tipleri ile karşılaştırıldıklarında Z250 ve Tetric Ceram'ın daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduklarını, Admira'nın ise Admira Flow'dan daha sitotoksik olduğunu gözlemlerinin yanısıra Tetric Ceram'ın en düşük sitotoksik etkiye sahip iken akışkan kompozitlerin karşılaştırılması ile Tetric Flow'un en sitotoksik kompozit olduğunu göstermişlerdir.

Brackett ve diğ.'nin (438), farklı adeziv restoratif materyallerin toksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında ilk olarak; bu materyallerden Quixfill'in

gözlenen düşük sitotoksik etkisini yüksek doldurucu içeriği (%87) ile ilişkilendirmişlerdir. Bununla birlikte, yüksek sitotoksik etki gösteren farklı bir restoratif materyalin de yüksek doldurucu içeriğe (%84) sahip olması sonucu bu durumu Quixfill'den salınan bileşenlerin daha az toksik olması ile açıklamışlardır. Bu tez çalışmasında, yüksek doldurucu içeriğine sahip hibrit kompozit Quixfill'in 1, 2 ve 7 günlük ekstraktları 24 ve 48 saat sonunda toksik etki göstermemiş fakat 72 saat sonra yapılan spektrofotometrik ölçümlerde 7 günlük ekstraktın toksik olduğu izlenmiştir. Franz ve diğ.'nin çeşitli restoratif materyallerin sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında ise Quixfill'in düşük toksik etkiye sahip olması, materyalin yüksek translusensisi dolayısı ile daha hızlı polimerize olabilmesi ve yüksek konversiyon derecesi ile açıklanmıştır (447). Bu çalışmada HPLC bulgularına göre UDMA ve MMA içeren Quixfill'den salınan monomer miktarı diğer adeziv restoratif materyallerle karşılaştırıldığında daha düşük gözlenmiştir. Bu bulgular, materyalin translusensisi dolayısı ile daha iyi polimerize olması sonucunda daha düşük monomer salımı göstermesi ve daha düşük toksik etki oluşturması ile sonuçlanmış olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Tüm bunlara ek olarak Wisniewska-Jarosinska ve diğ.'nin (448) UDMA ve TEGDMA'nın birlikte ve/veya tek başlarına oluşturdukları etkileri değerlendirdikleri araştırmalarından elde ettikleri sonuç da Quixfill'in toksik etkiye neden olmamasını açıklamaktadır. Bu araştırmada UDMA ve TEGDMA arasındaki kimyasal etkileşimin, bu monomerlerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini azalttığı bildirilmiştir.

Radikal zincir reaksiyonu yerine halka açılması polimerizasyonunun gerçekleştirildiği Silorane'nın birlikte uygulandığı HEMA ve Bis-GMA içeren bir primer ve TEGDMA bulunduran bonddan oluşan self-etch adeziv sisteminin ilk basamağı Silorane Primer'e ait tüm ekstraktlar her üç spektrofotometrik ölçüm sonucunda da yüksek toksisite göstermişlerdir. Bu durum, primer içinde bulunan HEMA ve Bis-GMA ile ilişkilendirilebilir. Literatürde diğer monomerlerden daha düşük toksik etkiye neden olduğu bilinen HEMA'nın daha yüksek çözünürlüğü olduğu da bildirilmiştir. Monomerler içinde en yüksek toksik etkiye sahip Bis-GMA

bulundurması ve HEMA'nın, TEGDMA, Bis-GMA, UDMA gibi monomerlerle birlikte kullanıldığı durumlarda, bütün karışım için yeterli hidrofilik özelliği sağlayarak moleküllerin difüzyonunu arttırması (264) bu materyalin yüksek toksik etkisinin nedeni olarak gösterilebilir. Rezin monomerlerin sitotoksik etkilerinin, birlikte kullanıldıklarında daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Oluşan sitotoksitenin derecesi, rezin materyalin konsantrasyonu ve monomerlerin olası sinerjistik ya da antagonistik etkileri ile değişkenlik gösterir. Düşük konsantrasyonlarda Bis-GMA'nın, HEMA ve TEGDMA ile antagonist etki oluştururken, yüksek konsantrasyonlarda sinerjistik etki gösterdiği belirtilmiştir (31).

TEGDMA içeren Silorane Bond, 24 saat sonunda toksik etki göstermezken, 48 ve 72 saat sonrasında Silorane Primer'den çok daha düşük toksisite göstermiştir. Bu materyalin HEMA ve MMA'dan sonra en düşük toksik etki oluşturan TEGDMA içeriği, daha düşük gözlenen toksik etkisi ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte rezin materyaller içinde en yüksek salımın TEGDMA için gözlemlendiği de bilinmektedir (278). LC/MS sonrasında bu materyalden salımı gözlenen TEGDMA monomerinin çok yüksek düzeyde gözlenmemesi, Silorane Primer'den çok daha düşük olan toksik etkisinin nedenlerinden biri olarak kabul edilebilir.

Silorane Restoratif'e ait hiçbir ekstrakt, 24 ve 48 saat sonrasında toksik etki göstermezken, 72 saat sonunda bu materyalin 7 günlük ekstraktının toksisiteye neden olduğu saptanmıştır. HPLC analizinde; Silorane Restoratif içeriğinde daha önceki bir araştırmada varlığı bildirilen sadece tek bir monomer varlığı ekstrakt süresi ile doğru orantılı olarak saptanmıştır. Silorane Restoratif'in 7 günlük ekstraktının 72 saat sonunda toksik etki göstermesi, içinde bulunan başlatıcılar gibi diğer materyallerle de ilişkilendirilebilir. Bir çok araştırmada; bir başlatıcı olan kamforokinonun toksik etkisine değinilmiştir (449-451). Literatürde toksik etkinin adeziv restoratif materyallerin doldurucu içeriğine bağlı olduğu ve ormoser ve siloksan esaslı kompozitlerin, metakrilat esaslı restoratif materyallerden daha düşük sitotoksik etki gösterdikleri belirtilmiştir (111,452). Brackett ve diğ. (438), farklı adeziv restoratif materyallerin toksik etkilerini

değerlendirdikleri çalışmalarında bu materyallerden siloran esaslı restoratif materyalin (Hermes “3M ESPE”) sitotoksik etkisinin zaman içinde azaldığını, uzun dönemde ise kontrol grubuna yakın sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu araştırmada gözlenen toksik etkideki zamana bağlı düşüş, ekstraktların yaşlandırma sonrasında elde edilmesi ile ilişkilendirilebilir. Tez çalışmamızda ise, polimerizasyonun ardından kültür ortamında ekstraktı alınan materyalin, zamana bağlı olarak düşük toksik etki göstermesi beklenmemiştir; HPLC ile, 1, 2 ve 7 günlük ekstraktlarda benzer oranda monomer varlığı saptanmıştır.

Literatürde, cam iyonomerlerin sistemik toksisitesi ya da allerjik etkisi (Mjör’ün (453) bildirdiği bir generalize ürtiker vakası dışında) ile ilgili bir yayın bulunmamaktadır. Cam iyonomerlerin lokal toksik etkileri ise farklı hücre türlerinde yapılan bir çok çalışmada değerlendirilmiştir (299,454,455) . Diğerlerine benzer olarak bu materyaller, sertleşme durumlarına göre sitotoksik etki gösterirler. Sertleşme reaksiyonu gerçekleşmeyen materyaller sitotoksik iken sertleşmiş materyaller ya toksik etki göstermezler ya da düşük toksisiteye sahiptirler (111). Genel olarak, henüz karıştırılmış cam iyonomerlerin toksik etkileri, asiditeleri ve florür salımlarının yanısıra alüminyum gibi iyonların salımı (456), egzotermik sertleşme reaksiyonu ve rezin modifiye cam iyonomerlerde ise HEMA salımı ile de açıklanabilmektedir (457). HEMA’nın aminoasit akrilatları gibi bileşenlerle değiştirildiği yaklaşımlarla, bu materyallerin mekanik özelliklerinin geliştirilmesine ve sitotoksik etkilerinin önüne geçilmesine çalışılmaktadır (458,459).

Geleneksel cam iyonomer restoratif sistemlere örnek olarak çalışmaya dahil edilen Equia, içindeki cam partiküllerinin küçültülerek daha hızlı hale gelen cam ve poliakrilik asit reaksiyonu sonucu artmış fiziksel özelliklere sahip, güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer Fuji IX GP Extra ve üzerine uygulanan, içeriğinde UDMA ve MMA bulunan yüzey örtücüsü G Coat Plus’ı kapsayan bir restoratif sistemdir. Fuji IX GP Extra, 24 saat sonrasında uygulanan MTT testi sonucunda; rezin modifiye cam iyonomer Ketac N 100 Restoratif’ten daha düşük

toksik etkiye sahip olarak gözlenmiştir ve bu bulgu, geleneksel cam iyonomerlerin düşük organik bileşen salımına bağlı olarak genellikle hafif sitotoksik etki gösterdikleri fikri (460) ile desteklenebilir.

Fuji IX GP Extra'nın 1, 2 ve 7 günlük ekstraktları, 48 ve 72 saat sonrasında Ketac N100'e benzer toksisite göstermiştir. Literatürde; cam iyonomerler, çinkofosfat siman ve karboksilat simanların gözlenen sitotoksik etkilerinin; bu materyallerden çinko ve florür gibi salınan iyonlar ve asiditeleri ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (461). Yüksek konsantrasyonda florür varlığının; pulpa hücrelerindeki hücre büyümesi, çoğalması, mitokondrial aktivite ve protein sentezini engellediği (462), fare kemik iliği hücrelerinde ise hücre bölünmesini engellediği ve hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmiştir (463). Chang ve Chou (462), nemli ortamda cam iyonomerlerden salınan yüksek konsantrasyonlarda florür iyonlarının hücre metabolizmasında değişikliğe neden olduğunu veya DNA sentezi üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Florür salımının ilk 24 saatte daha yüksek olduğu sonraki süreçlerde ise devam ederek aylarca izlenebildiği bilgisi (464) ve materyalin sertleşme sürecinin hemen ardından çözücü içerisinde aktarılması ile oluşabilecek florür salımı; gözlenen sitotoksik etkinin 2 ve 7 günlük ekstraktlardan daha yüksek olması beklentisini doğurur. Fakat Fuji IX GP Extra'nın farklı günlerde alınan ekstraktları benzer toksik etkiler göstermişlerdir.

Salınan florür iyonları ile sitotoksik etki ilişkisinin değerlendirildiği bir araştırmada; sitotoksitenin tek başına florür salımı ile açıklanamayacağı bildirilmiş; bu bulgular ise Müller ve diğ.'nin (454) sitotoksik etkiyi florür iyonlarının yanı sıra ortama salınan farklı iyonlar gibi bileşenler ile ilişkilendirdikleri çalışmaları ile desteklenmiştir (465). Stanislawski ve diğ. (404), cam iyonomerlerden düşük konsantrasyonlarda salınan Al_3^+ (Alüminyum), Sr_2^+ (Stronsiyum), Zn^{2+} (Çinko), Ag^+ (Gümüş) ve Fe^+ (Demir) varlığını saptamışlardır. Bunun dışında bu tip restoratif materyallerin arsenik ile birlikte kurşun içerdiği de belirtilmiştir (466). Bu elementlerden alüminyum ve florür iyonlarının 1 mM'a kadarki konsantrasyonlarda toksik etki göstermedikleri, çinkonun konsantrasyonu 0.1 mM olduğunda bile yüksek toksisite göstermesine rağmen,

stronsiyumun test edilen konsantrasyonlarda yüksek toksik etkiye neden olmadığı izlenmiştir. Cam iyonomer restoratifler, erken nem teması sonrasında alüminyum salımı gerçekleştirirler ve bu salım özellikle geleneksel cam iyonomerler için daha yüksek izlenir (467). Alüminyum iyonlarının, spesifik membran lipidleri ile ilişkili olarak sitotoksik etki gösterdikleri bildirilmiştir (466).

Cam iyonomerlerin toksik etkilerine bir başka sebep olarak asiditeleri verilebilir. Smith ve Ruse (468); cam iyonomerlerin diğer simanlarla karşılaştırıldıklarında ortamın pH'sını daha uzun süreler boyunca düşürdüğünü gözlemlemişler ve bu durumu, sonrasında pulpada hasar oluşturabilecek poliakrilik asit varlığına bağlamışlardır. Hücre içi ve dışı pH'nın düzenlenmesi hücre kültürleri için önemlidir. pH, iyon dengesi için önemli olmasının yanı sıra, hücresel enzimlerin optimal fonksiyonlarını koruyabilmeleri ile hormon ve büyüme faktörlerinin hücresel reseptörlere bağlanabilmelerinde etkilidir. pH değişiklikleri ise hücre metabolizmasında farklılaşmalar ve apoptotik hücre ölümüne neden olan ısı-şoku proteinlerinin üretiminin artması ile sonuçlanır. Dokunun farklı bölgelerinde hücreler farklı pH'lara sahiptirler; fakat uygun çevresel koşulların varlığında hücre uygun pH'sını korur. Bu durum sadece çevresel pH'nın korunması değil, hücre içi pH'nın stabilitesini sağlayan uygun membran bileşenleri, iyonları ve iyon oranları ile ilişkilidir. Çoğu hücreler, 6.5-7.8 arasındaki pH'yı tolere edebilirken, bu sınırlamalar dışındaki pH değerleri ölümcül olabilir (327). Czarnecka ve diğ. (469) ise Fuji IX'in pH'yı 7'den 6 ya düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu bilgilerin ışığı altında; Fuji IX GP Extra'dan farklı günlerde elde edilen ekstraktların hücre kültürü ile inkübasyonu sonucunda ortamın pH'sında etkili olarak toksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Bir çok kültür ortamının pH indikatörü olan fenol-kırmızısı içerdiği; ortamın uygun pH'da olması ile renginin turuncu/kırmızı renkte olduğu asidikleşmeye başladığında ise rengin sarıya döndüğü bilinmektedir (470). Materyalin DMEM içinde 1,2 ve 7 günlük bekletildiği süreç içinde kültür ortamının asiditeye bağlı olarak sarıl renk olduğu izlenmiştir.

Fuji IX GP Extra'nın sitotoksik etkisinin rezin modifiye ve geleneksel cam iyonomerlerle karşılaştırıldığı bir araştırmada, tüm materyallerin sitotoksik etkiye sahip olduklarının belirtilmesinin yanısıra Fuji IX GP Extra direkt kontakt yönteminin uygulandığı 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, test edildiği diğer geleneksel cam iyonomerle birlikte rezin modifiye cam iyonomerlerden daha düşük toksik etkiye neden olmuştur (471).

Equia restoratif sistemi, Fuji IX GP Extra ile tamamlayan ve içeriğinde MMA ve UDMA bulunduran G Coat Plus'a ait 1, 2 ve 7 günlük ekstraktlar, 24 saat sonrasında toksik etki göstermezken; 48 saat sonunda sadece 2 günlük ekstraktta, 72 saat sonunda ise sadece 1 günlük ekstraktta toksik etki izlenmemiştir. Bu bulgular HPLC sonrasında izlenen monomer salımı ile ilişkilendirilememiş ve monomer dışında başlatıcılar gibi bileşenlerin de biyoyumluluk üzerinde etkisi olduğu düşüncesi (375,449-451) ile uyumlu bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında Ketac N100 Restoratif ve Ketac N100 Primer'den elde edilen tüm ekstraktlar üç farklı süre sonunda uygulanan MTT testlerinde sitotoksik etki göstermişlerdir. Ketac N 100 Primer'in toksik etkisi, HPLC bulguları ile desteklenen yüksek HEMA salımı ile açıklanabilir. Ketac N 100 Restoratif'in gösterdiği toksik etki ise 24 saat dışında Fuji IX GP Extra ile benzerlik göstermiştir. Ketac N 100 Restoratif, nanoteknolojinin diş hekimliği alanında kullanılması ilk nanoiyonomer olarak kullanıma sunulmuş, HEMA içeren primeri ile birlikte uygulanan bir adeziv restoratif materyaldir. Filtek Supreme Universal ve floroalimünosilikat teknolojisinin birleştirildiği bu restoratif içeriğinde monomer olarak, HEMA, Bis-GMA, PEGDMA ve TEGDMA içerir. Düşük monomer salımın gözlenmesine rağmen toksik etkiye sahip Ketac N100 Restoratif'in bu etkisi içeriğinde bulunan çeşitli iyonların salımı ve materyalin kompozit restoratiflerden daha fazla çözünmesi ile ilişkilendirilebilir.

Rezin modifiye cam iyonomerlerin, geleneksel cam iyonomerlerle karşılaştırıldığında daha yüksek sitotoksik etki göstermeleri içeriklerinde bulunan HEMA'ya bağlanmıştır (472). Geleneksel cam iyonomerlerin daha düşük sitotoksik

etkileri ise düşük egzotermik etki ile yavaş sertleşmeleri, hızlı nötralizasyonları ve sertleşmiş materyallerden salınan toksik etkisi olmayan iyonlarla açıklanmıştır (208). Bu tez çalışmasında geleneksel cam iyonomer Fuji IX GP Extra'nın, 48 ve 72 saat sonrasında rezin modifiye cam iyonomer Ketac N100 Restoratif'e benzer etki göstermesi ise; Leyhausen ve diğ.'nin (473), geleneksel cam iyonomerlerin ekstrakt ve direkt kontakt testlerde farklı sonuçlar verdiğini belirttikleri çalışmalarına benzer şekilde, geleneksel cam iyonomerlerin, rezin modifiye cam iyonomerlere göre çözünür olmaları sonucu, suda çözünen moleküllerin ve küçük katı partiküllerin salımı ile açıklanabilir. Lan ve diğ. (474), farklı cam iyonomerlerin sitotoksitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, geleneksel cam iyonomerlerin hücre büyümesini baskıladıklarını tesbit etmişler ve bu durumun sertleşme ortamı ve partikül büyüklüğüne bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Tüm bunlara ek olarak; Fuji IX GP Extra'nın klinik uygulamalarda yüzey örtücüsü G Goat Plus ile kombine uygulanması (Equia) nedeni ile ağız sıvılarında daha az çözüldüğünün göz önünde bulundurulması, Fuji IX GP Extra üzerine G Goat Plus uygulanmış örneklerin *in vitro* koşullarda hücre kültürü üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirildiği farklı araştırmalara gereksinim doğurmaktadır. Bu materyalin 24 saat sonunda yapılan değerlendirmede toksik etkiye sahip olmaması ise yüzey örtücüsü ile kombine uygulandığında toksik etki göstermeyebileceği düşüncesini ortaya koymaktadır.

Adezivler içinde bulunan monomerlerin sitotoksik etkilerini, 24-72 saat sonrasında yüksekten düşüğe doğru Bis-GMA, UDMA, TEGDMA ve HEMA olarak sıralayan Ratanasathien ve diğ. (31), HEMA'nın TC_{50} değerinin (hücre metabolizmayı %50 inhibe eden miktar) fibroblastlarla 24 saatlik kontakt sonrasında 3,6 mmol/l (468 µg/ml), 72 saat sonrasında ise 1,0 mmol/l (130 µg/ml) olduğunu gözlemlemişlerdir. Schmalz (111) ise TC_{50} değerlerinin HEMA için Ratanasathien ve diğ.'nin bulgularına benzer şekilde 3600 µM (468 µg/ml), Bis-GMA için 9,35 µM (4,7 µg/ml), UDMA için 17,4 µM (8,17 µg/ml) ve TEGDMA için ise 124,5 µM (35,6 µg/ml) olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında saptanan monomer miktarları Tc_{50} değerleri ile karşılaştırıldığında daha düşük

gözlenmiştir. Test edilen adeziv restoratif materyallerin hücre kültüründe gösterdikleri toksik etkiler, içeriklerinde bulundurdıkları monomerlerin sinerjistik etkilerinin yanısıra, bu restoratif materyallerin farklı toksik bileşenleri ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte MTT testinde ve HPLC analizinde test edilen ekstraktların farklı çözücülerde hazırlanmasının bu monomerlerin elüsyonunda farklılıklara neden olduğu da göz ardı edilmemelidir.

Materyallerden gözlenen salım ile yüzde hücre canlılığı arasındaki etkileşimin Spearman'ın rho katsayısı ile analiz edilmesi sonrasında daha yüksek monomer salımı ile materyallerin daha yüksek toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu etkileşim her üç süreç sonundaki değerlendirmelerde aynı yönde olmakla birlikte sadece 48 saat sonrasında uygulanan MTT testi bulguları ile olan etkileşim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Monomer salımı ile toksisite arasında 48 saat sonrasında anlamlı bir etkileşim olmasının yanısıra adeziv restoratif materyallerden elde edilen ekstraktlarda, salımı gözlenen tek grubun monomerler olmadığı da göz önünde bulundurulmalıdır (179). Bu restoratif materyallerden silikon, boron, sodyum ve baryum doldurucu partiküller salınabildiği belirtilmiştir (415). Bu bileşenlerin dışında başlatıcılar gibi farklı bileşenlerin de biyoyumluluk üzerinde etkili olabildikleri düşüncesi (375) ile birlikte cam iyonomerlerin sitotoksik etkilerinin; bu materyallerden çinko ve florür gibi salınan iyonlar ve asiteleri ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (461). Farklı bileşenlerin materyal toksisitesi üzerindeki etkilerinin yanısıra, salımı gözlenen monomerlerin sinerjistik ya da antagonistik etki göstererek gözlenen sitotoksitenin derecesi değiştirebileceği de (31) göz ardı edilmemelidir.

5.3. Ames Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Özellikle uzun dönem salındıkları dikkate alındığında, adeziv restoratif sistemlerden salınan monomerlerin genotoksik özellikleri; hücre ölümü, mutasyon ve kanser gibi oluşturabilecekleri olası etkileri ile birlikte önem taşımaktadır. Bu monomerlerin, hangi konsantrasyonlarda salındıkları ve pulpaya

ulaştıklarının yanısıra hangi konsantrasyonlarda etki oluşturabildikleri de diş hekimlerinin önem vermesi gereken bir konudur. Bu amaçla tez çalışmasında; test edilen adeziv restoratif materyallerin 1 gün ve 1 hafta sonra olmak üzere elde edilen ekstraktlarının mutajenik etkilerinin, Ames testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ames test sistemi, materyallerin mutajenik potansiyellerinin taranmasında yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden biridir. Bu testin yaygın olarak kullanılma nedenleri arasında, bu sistemde belirlenen bir etkinin, kemirgen karsinojenitesi hakkında bilgi veriyor olması sayılabilir (355,356). Adeziv restoratif materyallerin mutajenik etkileri, tek bir deneye bağlı kalınmamasının hedeflenmesi sonucunda iki farklı suş kullanılması yolu ile değerlendirilmiştir;. Bu nedenle genellikle bir deneyin aynı koşullar ve/veya değişen koşullar altında tekrarlanması, böylelikle önceki sonuçlarla uyumluluğun kontrol edilmesi ve genotoksisitenin belli koşullar altında ifade edilip edilmediği hakkında bilgi sahibi olunması amacı ile TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA98, TA 100 kombinasyonunun genel olarak kabul görmüş test suşları olduğu da bilinmektedir (365). Bu anlamda Ames test sistemi, kendi içinde çoklu bir deney sistemi sayılabilir (475).

Test sistemi sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel analizinde; toksisitenin varlığı ya da hayatta kalan bakteri sayısının azalıp azalmadığı, negatif kontrol plaklarından gözlenen bakteri koloni miktarının homojen dağılıp dağılmadığı, literatürdeki negatif ve pozitif kontrol plaklarından elde edilen sonuçlarla uyumlu bulgular elde edilip edilmediği, test edilen grupların kontrol gruplarından daha yüksek değerlerde sonuç verip vermediği, deney gruplarının doz-cevap ilişkisi ve inkübasyon süresinin mutajenite üzerinde etki gösterip göstermediği değerlendirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, sitotoksik etki değerlendirmesi, mutajenite deneyleri öncesinde yapılmıştır. Test edilen tüm adeziv restoratif materyaller için incelenen en yüksek doz, 100 µL/plak olarak belirlenmiştir. Mutajenite testi sonrasında, negatif kontrollerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda,

değerlerin homojen dağılım gösterdiği belirlenmiş ve geriye dönme frakansları TA 98 suşu için $31,87 \pm 11,07$, TA 100 suşu için ise $183,22 \pm 38,89$ olmak üzere literatürde TA 98 için 20-30, TA 100 için 75-200 (355) olarak belirtilen miktara uyumlu bulunmuştur. Pozitif kontrol plakları için TA 98 suşunda 6 µg/plak danomisin, TA 100 suşunda 1,5 µg/plak sodyum azid kullanılması önerilmektedir. Bu öneri dikkate alınarak hazırlanmış kontrol plaklarında gözlenen koloni miktarı ortalamaları alındığında TA 98 için $276,537 \pm 126,3745$, TA 100 $1739,63 \pm 814,3732$ koloni gözlenmiştir. Bu değerlerin negatif kontrol plakları ile karşılaştırıldığında literatürdeki veriyi doğruladığı gözlenmiştir.

Elde edilen bulgular SPSS 16.0 paket programı kullanılarak iki yönlü varyans analizi ile çözümlendiğinde; test edilen adeziv restoratif materyallerin iki farklı süre sonunda elde edilen tüm ekstraktları, Ames test sisteminde metabolik aktivasyon yokluğunda negatif sonuç vermişlerdir. Test edilen adeziv restoratif materyallerden, iki farklı sürede elde edilen ekstraktların farklı dozlarının eklendiği plaklardaki bakteri kolonizasyonlarının karşılaştırılması sonucunda; XP Bond, Silorane Bond ve G Coat Plus gruplarında her iki suş için de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. TA 98 suşunda; Quixfill, Fuji IX GP Extra, ve Ketac N 100 Primer'in 1 haftalık ekstraktları, Silorane ve Ketac N 100'ün ise 1 günlük ekstraktlarının eklendiği plaklarda dozlar gözönünde bulundurulmaksızın daha yüksek bakteri kolonizasyonu izlenmiştir. TA 100 suşu için ise sadece Ketac N 100 Primer'in 1 günlük ekstraktın eklendiği plaklarda daha fazla bakteri kolonizasyonu saptanmıştır. Ekstrakt süreleri gözönünde bulundurulmadığında sadece Ketac N 100 Primer'de TA 98 suşunda, dozlar arasında (25 ve 100 µL/plak) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tesbit edilmiştir. Doz ekstrakt süresi etkileşiminde ise Silorane Primer (25 µL/plak) ve Ketac N 100'e (25 ve 100 µL/plak) ait dozlarda 1 günlük ve 1 haftalık ekstraktlar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Ames test sisteminde kullanılması öngörülen bakteri miktarının $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml olduğu dikkate alınarak uygulanan bu çalışmada gözlenen farklılıkların, plak inkorporasyon testi sırasında üst agara eşit miktarda bakteri eklenememesi

sonucunda ortaya çıkması ile ilişkilendirilebilir. Ames testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan bu farklılıklar, mutajenik etkinin koloni sayısının negatif kontrol plaklarında gözlenen sayının en az iki katından fazla ve doza bağlı artış olması gerekliliği nedeni ile önemsiz olarak kabul edilmiştir.

Literatürde, bu tez çalışmasında test edilmiş adeziv restoratif materyallerin mutajenik etkilerinin değerlendirildiği bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmada Quixfill ile uygulanan XP Bond, içeriğinde TEGDMA ve HEMA bulundurmaktadır. Restoratif materyallerin mutajenik etkilerinin monomer salımına bağlı olarak gerçekleştirildiği bilgisi ile, monomerlerin olası mutajenik etkilerinin test edildiği araştırmalarda, çok çeşitli sonuçlar elde edilmektedir. Adezivler içindeki bir çok bileşene rağmen, sadece birkaçının genotoksik ve mutajenik etkisinin tesbit edildiği bildirilmiş ve en etkili monomerlerin ise TEGDMA ve HEMA olduğu saptanmıştır. TEGDMA'nın, memeli hücresi geni mutasyon testlerinde mikronükleus oluşumuna neden olduğu ve doza bağlı mutasyonlar gösterdiği (226,258); ayrıca V79 in hamster fibroblastlarında delesyonlara sebep olduğu bilinmektedir (257). Bu tez çalışmasında; TEGDMA , HEMA ve UDMA içeren XP Bond'un 1 günlük ve 1 haftalık ekstraktları test edildikleri hiçbir dozda mutajenik etki göstermemişlerdir.

Bu araştırmada test edilen Quixfill, Silorane Bond ve Ketac N100 Restoratif, içeriklerinde TEGDMA bulundurmalarına rağmen, herhangi bir mutajenik etki göstermemişlerdir. Quixfill, TEGDMA dışında UDMA içerirken, Ketac N100 Restoratif içinde, HEMA, EGDMA ve Bis-GMA vardır. Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, GMA ve HEMA'nın Ames testinde mutasyon oluşturmadıkları belirtilmiştir. TEGDMA'nın klastojenik olduğunun saptanmasının yanısıra BisGMA'nın bozunma ürünleri BPA ve GMA'nın V79 hücre kültüründe mikronükleus oluşumunu arttırmasına rağmen, kromozom mutasyonlarında anlamlı derecede etkili olmadığı bildirilmiştir (20,226,258). Bu bulgularla birlikte, monomerlerin genotoksik etkileri tam olarak açıklanamamaktadır. Nükleotidlerle direkt etkileşim, DNA hasarı oluşturan araçlar veya DNA tamir mekanizmasının inhibisyonu, resin monomerlerin mutajenik etkilerinden sorumlu olarak kabul

edilmektedir (25). Bis-GMA ve UDMA'nın *in vitro* olarak bakteri kültürlerinde ve ökaryotik hücrelerde mutajenik etki göstermediği bildirilmiş, bununla birlikte kolesterol esterase varlığında Bis-GMA'nın bozunma ürününün ortaya çıktığı (BADPE-4OH) ve insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumuna neden olduğu (476) belirtilmiştir. Poplawski ve diğ. (477) çok sıklıkla olmamakla birlikte, adeziv sistemlerde fizikokimyasal dayanıklılığı ve hidrofobikliği arttırmak üzere poli(metil metakrilat) (PMAA) modifikasyonu olarak kullanılan GMA'nın genotoksik etkisini bildirmişlerdir. UDMA içeren G Coat Plus, HEMA içeren Ketac N100 Primer, HEMA ve Bis-GMA içeren Silorane Primer de içerdikleri monomerlerin olası mutajenik etkilerine rağmen Ames testinde negatif sonuç vermişlerdir. Bu durum, salınan monomer miktarının etki oluşturacak konsantrasyona ulaşmaması ile açıklanabilir. HEMA ve Bis-GMA içeren beş farklı adezivden 1, 24 saat ve 5 gün sonunda elde edilen ekstraktların farklı dilüsyonlarının değişen genotoksik etki gösterdiği de bildirilmiştir (385). Gözlenen negatif sonuçların diğer bir nedeni ise metabolik aktivasyon sisteminin kullanılmaması olabilir. Bu sistem, kısa zamanlı bakteriyel test sistemi olan Ames testinin memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının deney ortamında taklit edilmesi amacı ile ortama eklenen bir metabolik aktivasyon sistemidir (355). Test edilen adeziv restoratif materyallerin metabolitlerinin mutajenik potansiyelleri hakkında bilgi sahibi olabilmek amacı ile, bu aktivasyon sistemi varlığında farklı sonuçlar elde edilebileceği, göz önünde bulundurulmalıdır.

Bir çalışmada, dokuz farklı kompozit rezinden elde edilen ekstraktların ve dört farklı monomerin (TEGDMA, HEMA, UDMA ve Bis-GMA); somatik *Drosophila Melanogaster* hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi "SMART" ile değerlendirilmesi sonucunda; sadece daha yüksek organik içeriğe sahip ve TEGDMA içeren bir akışkan kompozitin mutajen olduğu, test edilen diğer kompozitlerin ise düşük organik içeriğe sahip orta yoğunlukta kompozit rezin grubunda olup daha düşük artık monomer salımına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermedikleri saptanmıştır (24). Aynı grup araştırmacıların farklı bir çalışmalarında ise, UDMA'nın TEGDMA'dan 1,6

kez daha fazla aktif olduğu, Bis-GMA ve HEMA'nın ise anlamlı etki göstermedikleri belirtilmiştir (25).

Kompozit rezinleri de içeren bazı materyaller ile ilgili olarak şikayetleri bulunan hastalar, çeşitli durumlarda hasta haklarının korunmasını sağlayan bir organizasyon kurmuşlardır. Günümüzde ise “Yeşil Tüketici Ansiklopedisi” adlı bir yayın, Danimarka’da yayınlanmıştır. Bu yayında arka grup dişlerin restorasyonu için, kompozit rezinlerin östrojenik etkileri sebebi ile amalgam restorasyonlar önerilmektedir (478). Bununla birlikte Di Pietro ve diğ. (479) dental restoratif materyallerin genotoksik etkilerinin değerlendirildiği *in vivo* çalışmalarında, metakrilat esaslı kompozitlerin oluşturdukları genotoksik etkileri amalgama benzer olarak gözlemlemişlerdir. Gözledikleri etkiyi ise, DNA hasarına yol açan, serbest oksijen radikallerine bağlamışlardır.

Siloksan ve oksiranların mutajenik etkilerinin Ames testi ile değerlendirildiği bir çalışmada, 1,4-bis(2,3-Epoxypropyloxypropyl-dimethylsilyl)-Benzene dışında tüm siloranlar negatif sonuç vermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca siloranların oksiranlardan daha düşük mutajenik etki gösterdiklerini saptamışlardır (480). Siloranların bildirilmiş düşük mutajenik etkilerinin yanısıra, biyolojik sıvıların simüle edildiği solüsyonlarda çözünmeden stabil kalmaları, adeziv restoratif materyallerde kullanımlarının daha başarılı sonuçlar ortaya koyabileceği fikrini doğrulamaktadır (481). Bu çalışmada test edilen siloksan esaslı Silorane Restoratif’e ait herhangi bir mutajenik etki saptanmamıştır.

Cam iyonomerlerin biyouyumluluklarını *in vivo* ve *in vitro* koşullarda inceleyen bir çok araştırma vardır (208,461,472,482); fakat bu materyallerin genotoksisite ve mutajeniteleri ile ilgili literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Çalışmada değerlendirilen güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer Fuji IX GP Extra’nın mutajenik etki göstermemesi, geleneksel cam iyonomerlerin Ames testi sonucunda mutajenik etkiye sahip olmadıklarının belirtildiği araştırmalarla (211) uyumluluk göstermektedir. Bir rezin modifiye cam iyonomer (Vitrebond) ise birçok *in vitro* test ve bir *in vivo* çalışmada sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olarak gözlenmiştir (245,483).

5.4. İn Vivo Bulguların Değerlendirilmesi

Restoratif materyallerin değerlendirildiği “kullanım testleri”, bireylerin ya da deney hayvanlarının çürüksüz dişlerinde, hasarsız preparasyon ile tek yüzlü bir kavite oluşturulmasının ardından, üretici firmaların önerileri doğrultusunda restorasyon uygulama standartlarını içeren test yöntemidir (484). Deney hayvanlarına uygulanan restoratif materyallerin pulpa dokusunda oluşturdukları etkilerin değerlendirilmesi, Stanley (485) tarafından 1985’te klinik öncesi kullanım testleri olarak tanımlanmıştır. Bu testlerde; pulpal hasara neden olan etkenler arasında sayılan restoratif materyallerden salınan toksik ürünler, kavite ve restorasyon arasındaki bakteriler ve toksinlerin (90,91) yanısıra, restoratif işlemlerin etkileri de değerlendirilmektedir. Hörsted (486) 1987’de, adeziv rezinin bakteri olmaksızın gözlenen toksik etkisini rapor etmiş, Qvist (487) ise yine bakteri bulunmadığı durumda, bu materyallerin insan dişlerinde prepare edilen derin kavitelerde asit uygulaması sonucu, pulpal hasara neden olduğunu bildirmiştir. Kalan dentin dokusunun ince olduğu durumlarda, dentin dokusunun geçirgenliğinin yanısıra, adeziv materyallerden salımı gözlenen TEGDMA ve HEMA gibi monomerler de pulpal inflamasyondan sorumlu olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte 2 mm kalınlığında dentin dokusu varlığının, monomer difüzyonunu azalttığı da bilinmektedir (368).

Hayvan dişleri ve ortodontik amaçla çekimi planlanan insan dişleri üzerinde yapılan bir çok çalışma (488-490) ile, adeziv restoratif sistemlerin pulpa dokusuna etkileri değerlendirilmiştir. Yapılmış olan bu çalışmalarda; kalan dentin dokusunun kalın olduğu orta derinlikte veya sığ kavitelerde, bakteri penetrasyonunun önlendiği durumlarda pulpa reaksiyonu gözlenmemiştir. Elde edilen bu bulgular, orta derinlikte ya da sığ kavitelerde toksik bileşenlerin pulpaya geçişinin düşük bulunduğu *in vitro* çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Pulpa ve preparasyon arasındaki mesafe olarak bilinen kalan dentin kalınlığının (484) yüksek olmasının, pulpaya diffüze olan toksik materyal miktarında azalmaya neden olduğu; 0,5 mm kalınlığında dentin dokusunun, materyallerin toksik etkisini %75 oranında düşürürken, bu etkinin 1 mm kalınlığında dentin dokusu varlığında %90 olarak

saptandığı bildirilmiştir (491). Bu tez çalışmasında; kalan dentin dokusunun ortalama $1,35 \pm 0,29$ mm olduğu orta derinlikte kavitelere uygulanan dört farklı adeziv restoratif sistemin, pulpa üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Literatür bilgilerini destekler biçimde hiçbir restoratif sistemin pulpada inflamasyon oluşturmadığı tesbit edilmiş ve bakteri varlığına rastlanmamıştır. Bununla birlikte Wiegand ve diğ. *in vitro* çalışmalarında; self-etch adezivlerin 1,5 mm kalınlığında dentin dokusu varlığında sitotoksik etki gösterebileceğini de belirtmişlerdir (492).

Bu çalışmada test edilen self-etch adeziv; Silorane Restoratif öncesinde uygulanan, primerinde HEMA ve Bis-GMA, bondunda ise TEGDMA içeren bir sistemdir. Çalışmanın *in vitro* kısmından elde edilen sonuçlara göre ekstrakt yöntemi kullanılması sonucunda sitotoksik etki göstermeyen Silorane Restoratif ile birlikte uygulanan Silorane Primer ve Silorane Bond'un toksik olduğu gözlenmiştir. Dentin yüzeyi ile direkt temasta olan Silorane Primer'in, *in vitro* koşullarda gözlenen yüksek toksik etkisine rağmen bu adeziv restoratif sistemin uygulandığı dişlerde herhangi bir pulpal inflamasyon gözlenmemesi, ekstrakt yönteminin uygulandığı *in vitro* test koşullarında dentin dokusunun varlığının göz ardı edilmesi ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, özellikle adeziv sistemlerin klinik koşullarda daha az miktarda uygulandıkları ve restoratif işlemler sırasında kompozit restorasyonların polimerizasyonu ile ek bir polimerizasyona maruz kaldıkları da öngörülmesi gereken bir noktadır (434). Laboratuvar koşullarında toksik etki gösteren materyallerin, klinik olarak aynı bulguları ortaya çıkarmadığı da belirtilmiştir (291). *In vitro* ve *in vivo* bulgular arasındaki farklılıklar Wenneberg ve diğ. (493) tarafından bildirilmiş; hayvanlarda uygulanan kullanım testlerinin ise klinik koşullara, *in vitro* testlerden daha uygulanabilir olduğu vurgulanmıştır.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçları doğrular biçimde, rezin esaslı materyallerin derin kavitelere uygulandıklarında pulpa-dentin kompleksine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada (494); 7 gün sonunda bir çok örnekte inflamasyon gözlenmemiş ya da hafif inflamasyon belirlenmiştir. Orta şiddette inflamatuvar cevap ise sadece rezin bileşenlerinin difüzyonunun gözlemlendiği ve kalan dentin kalınlığının $0,262$ mm olduğu bir dişte saptanmıştır. Kalan dentin

kalınlığının en düşük 0,6 mm olduğu ve bu dişte herhangi bir semptomun gözlenmediği bu tez çalışmasında; hiçbir grupta pulpal inflamasyon görülmemesi, olası bir durum olarak kabul edilebilir.

Etch&rinse ve self-etch adeziv sistemlerin oluşturduğu pulpal cevabın karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, 7 gün sonunda birkaç dişte orta şiddetliden şiddetliye doğru reaksiyon gözlenmiş, 30 gün sonunda ise minimal cevap tesbit edilmiştir. Kalan dentin kalınlığı ve bakteri varlığının, pulpal inflamasyonla ilişkisinin vurgulanmasının yanısıra; self-etch adeziv uygulanması sonrasında daha az pulpal inflamasyon oluştuğu bildirilmiştir (495). Bu tez çalışmasında karşılaştırılan self-etch adeziv sistem Silorane'a ait primer ve bondu içeren iki basamaktan oluşan bir sistemdir. Etch&rinse sistem ise çözücü olarak tersiyer bütanol içeren ve metakrilat esaslı hibrit kompozit ile uygulanmış iki aşamalı bir sistemdir. Test edilen bu iki adeziv restoratif sistemin uygulanması sonucu; 1 hafta sonrasında yapılan histopatolojik değerlendirmelerde, her iki adeziv sistem için ikişer adet dişte kavite alanı ile sınırlı dokuda yapısal bozulma gözlenirken, 1 ay sonunda sadece etch&rinse adeziv sistemin uygulandığı 1 dişte organizasyon bozukluğu gözlenmiştir.

Bazı çalışmalarda kompozit rezinlerin ve adeziv sistemlerin derin kavitelere pulpa üzerinde etkili olduğu belirtilmekle birlikte, farklı sonuçları gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Primatlarda yapılan bir çalışmada, pulpal hasara rastlanmamıştır (496). İnsan dişlerinde ise derin kavitelere uygulanan restorasyonlar sonrasında yapılan histolojik değerlendirmelerde, pulpal inflamasyon tesbit edilmiştir (32,497). Dentin tübülleri içinde ve pulpa dokusunda, adeziv sistemlerden salınan partiküller ve inflamatuvar reaksiyonla karakterize olarak bu partiküller etrafında makrofajlar gözlenmiştir (21,32). Primatlarda yapılan farklı çalışmalar, benzer sonuçlar gösterirken; köpek, koyun ve fareler üzerinde uygulanan araştırmalarda, hafiften orta şiddetliye değışkenlik gösteren reaksiyonlar izlenmiştir (498). Bununla birlikte deney hayvanlarının, özellikle maymun pulpasının, kimyasallara daha dayanıklı fakat bakterilere ve bakteri toksinlerine daha az dirençli olduğu dikkate alınmalıdır. Direkt pulpa

kaplamalarının uygulandığı çalışmalar sonrasında insanlarda pulpa nekrozu, deney hayvanlarında ise düşük reaksiyon gözleendiği ya da inflamatuvar reaksiyon izlenmediği de gözönünde bulundurulmalıdır (111,484).

Bazı araştırmacılar, adeziv sistemleri ve kompozit rezinleri direkt pulpa kaplamalarında uygulamışlardır. Cox ve diğ. primatlarda pulpa ekspozu sonrasında kanama kontrolü ve %2,5'lik NaOCl uygulaması ardından farklı kompozit rezinleri kullandıkları çalışmalarında çok hafif bir pulpal reaksiyon gözlemlemişler ya da reaksiyon oluşmadığını vurgulamışlardır. Bakteri bulunmadığı durumlarda, tamamlanmış dentin köprüsü oluşumunu da bildirmişleridir (499,500). Inoue ve diğ. (501); doku adeziv birleşimini, polimerize olmuş rezinin dokuya infiltre olduğu (yumuşak doku hibrit tabaka), rezin partiküllerinin izlendiği ve polimerize olmamış monomerleri içeren üç alanda tanımlamışlardır. Klinik koşullara benzer olarak, ekspoz olan pulpa dokusunun tükürükle kontamine edilmesi ve %2'lik klorheksidinle silinmesi sonrasında kompozit rezin uygulandığı durumlarda %45 oranında pulpa dokusunun canlılığını yitirdiği, %25 oranında ise tersiyer dentin oluşumu gözlenmiş; ekspoz pulpanın üzerine kalsiyum hidroksit uygulanması sonucunda ise %82 oranında reaktif dentin oluşumu ile birlikte %7 oranında nekroz izlenmiştir (502). İnsan dişlerinde yapılan benzer çalışmalarda; genellikle gecikmiş yara iyileşmesi, daha az dentin köprüsü oluşumu ve yabancı cisim reaksiyonu gözlenmiştir (19,21,503). Yabancı cisim reaksiyonunun ise adeziv restoratif sistemlerin uygulanması sonrasında izlenebilen rezin partiküllerine karşı oluştuğu düşünülmektedir (504). Adeziv sistemlerin zamanla bozunmaya uğradıklarının dikkate alınması gerekliliği ile birlikte (505), direkt pulpa kaplamalarında uygulandıkları çok fazla uzun dönem klinik çalışma bulunmamaktadır.

Ekspoz olan pulpa dokusu üzerine direkt uygulanan kompozit rezin restorasyonların dışında, biyolojik olarak pulpa kök hücrelerinin uyarılması ile karakterize tedavi alternatifleri üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmaların amacı, pulpa kök hücrelerinin odontoblast benzeri hücrelere dönüşümünün uygun dentin dokusu oluşumu ile gözlenmesidir (99,506).

Literatürde; kompozit rezinlerin klinik olarak direkt pulpa kaplamalarında uygulandıklarında pulpal inflamasyon ve nekroza yol açmaları nedeni (19) ile tercih edilmemelerinin gerektiği bildirilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, iyi bağlanma gösteren restorasyonların bakteriyel penetrasyonu engellediğini ve daha iyi bir pulpa tamiri gerçekleştiğini savunmaktadırlar (507). Bu durum, klinik tecrübe ve kavitenin bakteriyel penetrasyona izin vermeyecek şekilde restorasyonu ile ilişkilidir. Brännström ve Nyborg'un (508) diş restorasyon arayüzündeki bakterilerin etkilerini tesbit etmelerinin ardından, bakteriyel kontaminasyonun pulpal inflamasyonda asıl etken olduğu görüşü doğmuştur (509). Bu görüşe zıt olarak, bazı çalışmalarda bakteri varlığı ve pulpal reaksiyon arasında ilişki gözlenmediği de belirtilmiştir (33,510).

Adeziv restoratif sistemlerin altında bulunan bakteri kolonizasyonu, adeziv sistemlerden veya kompozit rezinlerden salınan materyallerin direkt kimyasal etkisinin beklenmediği sıg ya da orta derinlikteki restorasyonlarda, pulpal reaksiyon oluşturabilir. Bu farklılıklar restoratif sistemlerden salınan bileşen miktarının zamana bağlı olarak azalması ve restorasyon altında bulunan dentin bariyer etkinliğinin zamana bağlı olarak artış göstermesi ile açıklanabilir. Bununla birlikte bakteri popülasyonunda zamanla gözlenen büyüme, bakteri toksinlerinde de artışa neden olur. Sonuç olarak pulpayı koruyan dentin bariyer etkinliğini kaybeder. Dentin tübüllerine iyi diffüze olmuş bir adeziv sistemin, kenar aralanması izlenen kompozit rezin restorasyonlarda tübül içinde bakteri varlığını engelleyebileceği ise bilinmektedir (111). Bu tez çalışmasında farklı adeziv restoratif sistemlerin uygulandığı hiçbir dişte bakteri gözlenmediği gibi herhangi bir pulpal inflamasyon varlığı da tesbit edilmemiştir. Dört farklı adeziv restoratif sistemle restore edilmiş bu 48 dişte bakteri penetrasyonunun izlenmemesi, *Brown and Brenn* teknik ile iyi boyanamamalarının (19) yanısıra, bakterilerin fiksasyon ve dekalsifikasyon ile karakterize histopatolojik işlemlerde kaybedilmesi ya da boyanma yeteneğini yitirmesi (511) ile birlikte bu işlemler sırasında diştan ayrılan restorasyona yapışarak uzaklaşması (512) gibi faktörlerle ilişkilendirilebilir. Ersin ve diğ.'nin (510) bazı test ve kontrol gruplarında bakteri varlığını

belirlemeleri ile birlikte, bakteri varlığı ve pulpal inflamasyon arasında anlamlı bir ilişki gözlemedikleri çalışmalarına paralel olarak; bu tez çalışmasında, bakteri saptanmamış toplam 48 adet dişin 6 tanesinde dokuda lokalize düzensizlikler izlenirken, 3 tanesinde dokuda daha yaygın yapısal bozulma gözlenmiştir.

Bakteri varlığının pulpal inflamasyonda önemli bir neden olmasının yanısıra, preparasyonun oluşturduğu travma (513), restoratif materyallerin kimyasal etkileri (33) ve asit uygulama aşaması (514) gibi restoratif işlemler ile hastaya bağlı faktörlerin de pulpal inflamasyonla ilişkili olabileceği düşüncesi dikkate alınmalıdır (55). Fare dişlerinde *ex vivo* koşullarda gerçekleştirilen bir çalışmada; preparasyon sonucunda hasar gören pulpa dokusunda, en çok hasarı gösteren etkenden en aza doğru sıralama, kalan dentin dokusu kalınlığı, kavite preparasyonu sırasında yeterli su soğutması sağlanamaması, aeratör hızı, yüzey koşullarının değiştirilmesi sırasındaki uygulamalar ve restoratif materyaller olarak sıralanmıştır (515). Ekspoz edilmemiş kavitelerin, kalsiyum hidroksit/amalgam, rezin modifiye cam iyonomer, çinko oksit ojenol, rezin kompozit gibi materyallerle restore edilmesinin ardından pulpal değerlendirmelerin yapıldığı farklı bir çalışmada da kalan dentin dokusunun önemli etkiye sahip olduğu, restoratif materyallerin pulpal cevap oluşumunda fazla etkili olmadıkları vurgulanmıştır (516).

Adeziv restoratif materyallerin ışıkla polimerizasyonlarının ışık kaynağı ve egzotermik polimerizasyon reaksiyonlarının sinerjistik etkisi nedeni ile canlı pulpada hasar oluşturabileceği bilinmektedir (517). Yakın geçmişte birçok üretici, klinik çalışma süresini azaltmanın yanısıra polimerizasyon derinliğini arttırabilmek amacı ile 1000 mW/cm^2 gücünde ışık cihazlarını diş hekimlerinin kullanımına sunmuştur. İlk çalışmaların, LED ışık cihazlarının pulpaya daha az toksik olduğunun belirtilmesinin yanısıra bu sonucun, ilk cihazların genellikle 400 mW/cm^2 aralığında kullanılmaları ile yorumlanabileceğini bildirildikleri çalışmalarında Santini ve diğ. (518); 1100 mW/cm^2 gücünde LED ışık cihazlarının 500 mW/cm^2 gücündeki halojen ışık kaynağına göre pulpada daha çok sıcaklık artışı oluşturduklarını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte bu iki cihazı kullanımı

sonucunda gözlenen sıcaklık artışının pulpal hasara neden olacak limite ulaşmadığını bildirmişler; en yüksek artışın ise tek başına adeziv sistemin polimerizasyonu sırasında ortaya çıktığını belirterek özellikle derin kavitelerde pulpa koruyucu uygulanması gerekliliğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada farklı restoratif sistemlerin uygulanmasında kullanılması ile birlikte, 1007 mW/cm² gücünde LED ışık cihazının orta derinlikte restorasyonlarda pulpal reaksiyona neden olmadığı gözlenmiştir.

Yaşlanma sırasında, pulpa dokusunda pek çok değişiklikler izlenir. Bu değişikliklere örnek olarak, odontoblast ve fibroblast sayısında azalma, kollajen miktarında artış, sekonder ve reparatif dentin yapımına bağlı olarak pulpa dokusunda izlenen küçülme ve damarlanmada gözlenen düşüş kabul edilebilir (519) . Bir dişin pulpal cevabı, yaşa bağlı pulpanın olgunlaşması ile ilişkili olarak farklılık ve (520) dentin oluşumundaki azalma sonucunda düşüş gösterebilir (521). Bununla birlikte yaş faktörü; reaksiyoner, fizyolojik ve sklerotik dentin yapımındaki farklılıklardan sorumludur (51). Odontoblast aktivitesindeki farklılıklar, odontoblastlarda moleküler seviyede değişikliklere neden olur (522). Yaşla ve dış uyaranlarla birlikte dentin dokusunda izlenen farklılıklar, pulpal dokuda da anlamlı değişikliklerle sonuçlanır (40). Murray ve diğ. (55) restorasyon başarısını etkileyen faktörleri değerlendirdikleri araştırmalarında; hastanın yaşının dentin tamir kapasitesini etkilediğini ve tedavi planlanmasında dikkate alınması gereken bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, adeziv restoratif materyallere karşı inflamatuvar bir yanıt gözlenmemesi ile birlikte farklı adeziv restoratif materyallerin oluşturdukları cevabın yaşla ilişkili olarak farklılık göstermediği saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında test edilen toplam 48 adet dişin hiçbirinde reparatif dentin oluşumu gözlenmemiştir. Literatürde adeziv restorasyon uygulamalarından sonra, %50 oranında reparatif dentini oluşumu bildirilmektedir (50,55); bununla birlikte 30 gün sonunda restorasyonların %30'unda hafif reparatif dentininin gözlendiği bir çalışmada (495) bu sonuç, çalışma süresinin kısa olmasından dolayı tamamı ile dentin dokusu tamirinin izlenememesine, bireyler

arasındaki farklılıklara, ve yaş gibi farklı faktörlere bağlanmıştır (495,523). Bu çalışmanın bulguları, değerlendirme süresinin kısa olması ile ilişkilendirilebilir.

Değerlendirilen adeziv restoratif sistemlerden ilki, asit uygulamasını takiben etch&rinse adeziv sistem XP Bond ile kombine olarak restorasyonun tamamlandığı metakrilat esaslı kompozit rezin Quixfill'dir. Dentin dokusu ile asit uygulaması sonucunda direkt temas halinde bulunan bu adeziv sistem içinde, HEMA, TEGDMA ve UDMA bulundurmaktadır. Adezivlerin pulpa kaplamalarında kullanılması durumunda, uzun dönemde daha fazla pulpal hasar oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (21). Primat dişlerinde yapılan çalışmalarda ise sağlıklı pulpa üzerine direkt olarak uygulanan adezivlerin normal pulpa iyileşmesi ve dentin köprüsü oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (509,524). Bu tez çalışmasında ise Quixfill ile birlikte kullanılmış XP Bond öncesinde, asit uygulanmıştır. Hipertonik asit uygulaması sonucunda dentin sıvısının pulpadan dışarı doğru hareketinin gözlemlendiği, pulpal değişikliklerin gerçekleştiği ve odontoblastların yer değiştirdiği belirtilmiştir. Restoratif materyal ve pulpa dokusu arasında bulunan dentin dokusunun, asit için tampon ya da florürün emildiği bir sünger gibi davranarak, cam iyonomer restoratiflerin toksik etkisini anlamlı derecede azalttığı da bildirilmiştir (111). Tampon görevini üstlenen yeterli miktarda kalan dentin dokusunun izlendiği bu çalışmada, asitin ve HEMA, TEGDMA ve UDMA içeren adeziv sistem XP Bond'un pulpal inflamasyona neden olmadığı sonucuna varılabilir.

Test edilen materyallerden ikincisi self-etch adeziv sistemi ile uygulanan Silorane'dır. Öncelikle HEMA ve Bis-GMA içeren primerin dentin dokusu ile direkt temasta bulunduğu ve sonrasında ise TEGDMA içeren bondun uygulandığı adeziv sistem ve ardından siloksan esaslı materyalle restore edilen dişlerde pulpal inflamasyon gözlenmemiştir. Literatürde Silorane'nın pulpa üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Siloksan esaslı kompozitin toksik etkisinin, *in vitro* koşullarda değerlendirildiği bir çalışmada, uzun dönemde kontrol grubuna yakın bulgular ortaya koyduğu bildirilmiştir (438). Bu çalışmada; 1 hafta sonrasında değerlendirilen 2 dişte doku

organizasyonunda lokalize düzensizlikler izlenirken 1 ay sonra çekilen dişlerde herhangi bir belirtiye rastlanmamıştır. Silorane’da gözlenen katyonik halka açılması reaksiyonunun kamforokinonun ışık enerjisi ile aktivite kazanması sonucunda iyot tuzları etkileşime girerek katyon oluşturduğu fotokimyasal bir olayla başladığı bilinmektedir. Oksiranların bu halka açılması reaksiyonlarının oldukça egzotermik olduğunun da bildirildiği bir araştırmada (525); bu restoratif materyal, metakrilat esaslı 2 farklı kompozit ile karşılaştırılmıştır. Işık kaynağı ve gerçekleşen egzotermik reaksiyonun kombinasyonu olarak polimerizasyon sonucu ortaya çıkan bu ısının pulpada hasar oluşturabileceği de düşünülmektedir. Bu restoratif materyallerin polimerizasyonları sırasında gösterdikleri ve restorasyona komşu alandaki pulpa boşluğunda oluşturdukları sıcaklık artışı değerlendirilmiş; siloksan esaslı kompozitin (Filtek LS) polimerizasyonda daha çok sıcaklık artışı gösterdiği, fakat 1 mm kalan dentin dokusu varlığında pulpa odasında oluşan sıcaklık artışının materyaller için farklılık oluşturmadığı saptanmıştır. Bu tez çalışmasında Silorane sistemin uygulandığı orta derinlikte restorasyonlar sonrasında pulpal hasara rastlanmaması, bahsedilen araştırmanın bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

Üçüncü grupta değerlendirilen restoratif sistem ise güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer Fuji IX GP Extra ve G Coat Plus’tan oluşan restoratif sistem Equia’dır. Fare dişlerinde beşinci sınıf restorasyonların uygulandığı *in vivo* bir çalışmada, Fuji IX GP Extra’nın odontoblast tabakada bozulmanın yanı sıra, kan damarlarında dilatasyona ve sekiz gün sonrasında ise geçici inflamatuvar reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir. 30 günün sonunda ise pulpa dokusu normal görünümüne kavuşmuştur (526). Fuji IX GP Extra’nın insan pulpası üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bu tez çalışmasında, sadece 1 hafta sonra çekilerek incelenen 1 dişte restorasyonla sınırlı olmak üzere odontoblast tabakasında hafif düzensizlikler gözlenmiştir.

Farklı deney hayvanları üzerinde uygulanan pulpa çalışmaları, erken dönemde geliştirilen cam iyonomerlerin orta şiddette pulpal inflamasyona neden olduklarını göstermiştir (527). Bakteri kolonizasyonunun önlendiği ve pulpanın

tamamı ile dentin dokusu ile örtülü olduğu durumlarda yeni geliştirilen cam iyonomerlerin herhangi bir pulpal reaksiyona neden olmadığının (526) belirtilmesinin yanısıra, bakteri varlığında yoğun pulpal reaksiyon gözleendiği de bildirilmiştir (528). Ekspoz pulpa üzerine geleneksel cam iyonomer uygulamalarının ise farklı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda abse oluşumuna kadar çeşitli pulpal reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (528,529). Bu durum pulpa yüzeyindeki nemliliğe bağlı olarak cam iyonomerin sertleşme reaksiyonunun etkilenmesi ve çözünürlüğünün artması ile açıklanmış (467); florürü de içeren çeşitli iyonların salımının gerçekleştiği de belirtilmiştir. Daha önce geliştirilen cam iyonomerlerin pulpal reaksiyona neden olabildiği bildirilirken (527) yeni geliştirilen materyallerde pulpa tamamı ile dentin dokusu ile örtülü olduğu durumlarda hasar gözlenmediği belirtilmiştir (111,528).

Farklı restoratif sistemlerin değerlendirildiği *in vivo* bir çalışma; bakteriyel mikrosızıntının engellenmesindeki en iyi materyalin rezin modifiye cam iyonomer, en kötü materyalin ise rezin esaslı kompozitler olduğunu göstermiştir. Pulpal inflamasyon aktivitesi açısından değerlendirildiğinde, rezin esaslı kompozitlerle en kötü sonuçlar elde edilirken en uygun materyal çinkooksit ojenol olarak gözlenmiştir. Derin kavite preparasyonlarında ise odontoblast canlılığı göz önünde bulundurulduğunda en iyi sonuç kalsiyum hidroksit, en kötü sonuç ise rezin modifiye cam iyonomerlerle elde edilmiştir (530).

Bu çalışmada hiçbir dişte bakteri varlığı tesbit edilmemiştir. Orta derinlikte kavitelere hiçbir restoratif materyalin pulpal inflamasyona neden olmamasının yanısıra; doku düzensizliği kriteri açısından değerlendirildiğine en kötü sonuç, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte nanoiyonomer restoratif Ketac N 100 grubu için gözlenmiştir. Bu materyale ait 1 hafta sonra değerlendirilen dişlerde 2, 1 ay sonra değerlendirilen dişlerden 1 tanesinde genel olarak odontoblast tabakada bozulma, damarlarda ise hafif genişlemeler gözlenmiştir. Bu durum, materyal ile kombine uygulanan Ketac N 100 Primer'in içerdiği HEMA ve akrilik/itakonik asit ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte; içeriğinde HEMA, UDMA ve TEGDMA bulunan XP Bond'un uygulandığı dişlerden 1 hafta sonra

değerlendirilen 2, 1 ay sonra değerlendirilen 1 dişte, HEMA ve Bis-GMA içeren Silorane Primer uygulandıktan 1 hafta sonra çekilerek değerlendirilen 2 dişte ve içeriğinde poliakrilik asit bulunan Fuji IX GP Extra uygulandıktan 1 hafta sonra değerlendirilen 1 dişte odontoblast tabaka restorasyon alanı ile sınırlı olmakla birlikte düzensizlikler gözlenmesi bu ilişkiyi tam olarak doğrulamamaktadır. HPLC analizi bulguları Ketac N 100 Primer'den salınan HEMA miktarının yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ketac N 100 uygulanan dört dişte gözlenen düzensizlik, Ketac N100 Primer'den salınan HEMA ile ilişkilendirilebilir. Pulpal inflamasyon etkenlerinin çok çeşitli olması ile birlikte, hiçbir kesitte bakteri gözlenmemesi ise restoratif işlemlerin de pulpal cevapta etkili olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Rezin modifiye cam iyonomerlerin derin kavitelere pulpal cevaplarının değerlendirildiği bir randomize, beş randomize olmayan kontrol çalışmalarının özetlendiği bir araştırmada, bu materyaller kontrol grubu olarak tercih edilen kalsiyum hidroksitle karşılaştırıldığında, 30 günün sonunda inflamatuvar hücre cevabı açısından farklılık göstermemiştir. 60 gün sonunda ise kalsiyum hidroksitin uygulandığı gruplarda %38 oranında daha fazla sağlıklı odontoblast gözlenmiştir. 2 yıl sonunda ise restorasyonların pulpal cevapları arasında farklılık tesbit edilmediği belirtilmiştir (531).

Geleneksel cam iyonomer restorasyonların klinik başarısını arttırabilmek için öncesinde mine ve dentine poliakrilik asit uygulaması önerilmektedir. Bu uygulamanın da dentin geçirgenliğinde artışa neden olduğu bilinmektedir. *In vitro* olarak daha fazla hücre reaksiyonuna neden olmasının yanısıra bu uygulamanın, pulpada hasar oluşturduğunu gösteren herhangi bir klinik araştırma bulunmamaktadır (111). Bu çalışmada güçlendirilmiş cam iyonomer restoratif Fuji IX GP Extra öncesinde poliakrilik asit uygulanmamıştır.

Bu *in vivo* değerlendirmede sağlıklı dişlerin kullanılması nedeni ile çürük dentinin altında skleroze dentinle karakterize klinik durum taklit edilememiştir. Hasar görmüş bir diş pulpasının; sağlam bir dişteki pulpaya göre daha iyi bir savunma mekanizmasına sahip olduğu da bilinmektedir (111). Adeziv restoratif

sistemlerin pulpanın immünolojik durumu üzerindeki etkisi ve tamir kapasitesi ile ilgili de çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Monomerlerin immün sistemden sorumlu hücreleri baskıladıkları ve (21,532) pulpanın bakteriyel toksinlere duyarlılığını arttırdıklarının (533) gözlenmesi nedeni ile bu konuda daha çok araştırma yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, herbiri kendi içinde bir takım uygulama basamaklarını içeren materyallerden; adeziv sistemlerle birlikte uygulanan iki farklı tip kompozit rezin ve primer ve/veya yüzey örtücüleri ile uygulanan cam iyonomer restoratiflerden oluşan güncel adeziv restoratif sistemlerin biyouyumluluklarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu materyallerin içerdikleri monomerlerle ilişkili olarak canlı dokularda toksik ve/veya mutajenik etkiler oluşturduğu varsayımı ile ilk olarak, test materyallerinden salınan artık bileşenler HPLC (LC/MS) ile tesbit edilmiştir. Hücre kültürü üzerinde, ekstrakt yöntemi ve MTT testinin uygulanması ile yapılan toksisite değerlendirmelerinin ardından; materyallerin DNA üzerinde mutasyon oluşturma potansiyelleri, Ames test sistemi ile incelenmiştir. *In vitro* değerlendirmeleri takiben, dokuz materyalden oluşan dört restoratif sistemin pulpa dokusu üzerinde oluşturdukları etkiler histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sınırlamaları dahilinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Çalışmamızda test edilen materyallerden çeşitli miktarlarda monomer salımı gözlenmiştir. Ekstrakt süresinin uzaması ile daha yüksek monomer salımı saptanmıştır. Test edilen materyallerde en yüksek monomer salımı Ketac N 100 Primer’de, en düşük monomer salımı ise metakrilat esaslı posterior hibrit kompozit Quixfill’de gözlenmiştir. Bis-GMA’nın bozunma ürünü olarak ortaya çıkabileceği varsayılan ve östrojenik etkiye sahip BPA salımı ise saptanmamıştır. Siloksan esaslı restoratif materyal Silorane Restoratif’ten salımı gözlenen tek monomerin miktarı kantitatif olarak saptanmamış, fakat ekstrakt süresi ile artış gösterdiği izlenmiştir. Silorane Restoratif içinde bulunan siklik siloran monomerler’in kimyasal yapısına benzeyen ve karsinojenik etkisi bildirilen dekametilsiklopentasiloksan’ın ise (D5) bu materyalden salımı izlenmemiştir. Gözlenen monomer salımının, bu monomerlerin Tc 50 değerlerinden daha düşük olmasına rağmen; bu

monomerleri içeriğinde bulunduran adeziv restoratif materyallerin hücre kültüründe toksik etki göstermesi, monomerlerin olası sinerjistik etkilerinin veya materyallerin diğer bileşenlerinin de toksik etki oluşturabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

2. Test edilen materyallerden Quixfill, Silorane Restoratif, Silorane Bond ve yüzey örtücüsü G Coat Plus'a ait hiçbir ekstrakt 24 saat sonunda toksik etki göstermemiştir. 1 günlük ekstraktlarda en yüksek toksik etki ise Ketac N 100 Primer için; 2 ve 7 günlük ekstraktlarda ise en yüksek toksik etki güçlendirilmiş geleneksel cam iyonomer Fuji IX GP Extra için gözlenmiştir. 48 saat sonrasında Silorane Restoratif ve Quixfill dışında tüm materyaller toksik etki göstermişlerdir. En yüksek toksik etki ise kültür ortamı içinde çözünerek ortam pH'sını asidik hale getirmesi sonucunda hücrelerin ölümüne neden olan Fuji IX GP Extra'da gözlenmiştir. 72 saat sonrasında toksik etki göstermeyen ekstraktlar, Silorane Restoratif ve Quixfill'in 1 ve 2 günlük ekstraktları ile G Coat Plus'ın 1 günlük ekstraktıdır. Toksik etki gösteren cam iyonomer restoratif sistemlerin, yüksek çözünürlüklerinin önüne geçebilmek amacı ile klinik uygulamada yüzey örtücüsü ile birlikte uygulanmasının daha başarılı restorasyonlarla sonuçlanabileceği öngörülebilir.
3. Monomer salımı ile hücre canlılığı arasında sadece 48 saat sonrasında anlamlı olmak üzere bir etkileşim olduğu saptanmıştır. Bu durum artan monomer salımı ile daha yüksek toksik etki gözlemlendiğini ortaya koymaktadır
4. *Salmonella typhimurium* üzerinde toksik olmayan dozların mutajenik etkilerinin değerlendirilmesi sonrasında, test edilen materyallerin TA 98 ve TA 100 suşlarında hiçbir doz için mutajenik etki göstermedikleri saptanmıştır. Bu durumun, memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının deney ortamında taklit edilmesi amacı ile ortama eklenen metabolik aktivasyon sisteminin kullanılmaması ile açıklanabileceği ve

S9 varlığında materyallerin mutajenik etkilerinin değerlendirildiği farklı çalışmalara gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

5. Dört farklı restoratif sistemin ortodontik amaçla çekimi planlanan premolar dişlerde oluşturulan orta derinlikteki kavitelere uygulanmasının ardından, 2 farklı zamanda histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda hiçbir dişte pulpal inflamasyon, tersiyer dentin oluşumu ve bakteri mevcudiyeti gözlenmemiştir. Etch&rinse adeziv sistem ve posterior hibrit kompozit restorasyonlar, Silorane sistem ve Equia'nın uygulandığı bazı dişlerde restorasyon alanı ile sınırlı organizasyon bozukluğu izlenirken, bu durum yüksek HEMA salımının gözleendiği Ketac N 100 Primer ile birlikte kullanılan Ketac N 100 Restoratif'in uygulandığı 3 dişte daha yaygın olarak gözlenmiştir. Yüksek monomer salımının gözleendiği ve hücre kültüründe toksik etkiye sahip adeziv sistemlerin ise, daha iyi polimerizasyonun sağlanabilmesi ve monomer salımının en az seviyede tutulabilmesi için klinik kullanımda daha az miktarlarda ve ince bir tabaka olarak uygulanmasının, daha doğru olduğu sonucuna varılmıştır. Bu materyallerin diş yüzeyine uygulandıktan sonra hava ile yayılmalarının oksijen inhibisyon alanı oluşturarak polimerizasyonu güçleştireceği ve daha fazla monomer salımının gerçekleşeceği düşüncesi ile, pulpaya olan toksik etkilerinin önlenmesinde; kalan dentin dokusu kalınlığının 0,5 mm veya daha düşük olması durumunda pulpa koruyucusu uygulaması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Derin kavitelere özellikle adeziv polimerizasyonu sırasında pulpada gözlenen sıcaklık artışı da pulpa koruyucusu kullanımının önemini ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, günümüz diş hekimliğinde restorasyon gereksinimi olan bireylerde başarılı bir tedavi uygulayabilmek amacı ile kullanılan adeziv restoratif sistemlerin biyouyumluluk özellikleri gözönünde bulundurularak, aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Termal veya mekanik hasar oluşturmayacak bir kavite preparasyonu

sonrasında; ekspoz olmuş pulpa dokusu varlığında veya kalan dentin kalınlığının 0.5 mm ve daha az olduğu derin kavitelere, öncelikle pulpal canlılığın korunması amacı ile pulpa koruyucusu uygulanması önerilmelidir. Bu uygulama adeziv restoratif materyallerden gözlenebilen monomer, iyon ya da farklı toksik bileşenlerin pulpa dokusu üzerindeki etkilerinin önüne geçebilmek için önem taşımaktadır. Bu çalışmada orta derinlikte kavitelere yeterli kalan dentin dokusu varlığında adeziv restoratif sistemlerin direkt olarak uygulanabileceği sonucuna da ulaşılmıştır. Yüksek monomer salımının gözlendiği adeziv sistemlerin, mümkün olduğunca az miktarda ve çevre dokulara çok fazla yayılmadan uygulanması ile birlikte, üretici firmaların önerileri doğrultusunda iyi polimerize edilmesi gerekmektedir. Rezin esaslı adeziv restoratif sistemlerin uygulanması sırasında, mikrosızıntı ve dolayısı ile pulpal reaksiyona neden olabilecek bakteri penetrasyonuna engel olabilmek, bunun yanı sıra monomer salımının en düşük seviyede gerçekleşmesini sağlayabilmek amacı ile tabakalı uygulama prensibi ile birlikte polimerizasyon, uygun bir ışık kaynağı ile dikkatli bir biçimde gerçekleştirilmelidir. Restoratif materyal uygulandıktan sonra gerçekleştirilen polisaj işlemlerinde ise yine pulpa ya da çevre dokularda gerçekleştirilebilecek hasarlardan kaçınılmalıdır. Cam iyonomer restorasyonlar ise materyalin yüksek nem hassasiyetine karşı bütünlüğünü koruyabilmesi için bir yüzey örtücü ile birlikte uygulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P. Ve diğ erleri. (2003) Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent*, 28 (3), 215-235.
2. Rueggeberg, F.A. (2002) From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent*, 87 (4), 364-379.
3. Weinmann, W., Thalacker, C., Guggenberger, R. (2005) Siloranes in dental composites. *Dent Mater*, 21 (1), 68-74.
4. Wilson, A.D., Kent, B.E. (1972) A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Br Dent J*, 132 (4), 133-135.
5. Croll, T.P., Nicholson, J.W. (2002) Glass ionomer cements in pediatric dentistry: review of the literature. *Pediatr Dent*, 24 (5), 423-429.
6. Schwengberg, S., Bohlen, H., Kleinsasser, N., Kehe, K., Seiss, M., Walther, U.I. ve diğ erleri. (2005) In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J Dent*, 33 (1), 49-55.
7. Silikas, N., Eliades, G., Watts, D.C. (2000) Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater*, 16 (4), 292-296.
8. Ak, A.T., Alpoz, A.R., Bayraktar, O., Ertugrul, F. (2010) Monomer release from resin based dental materials cured with led and halogen lights. *Eur J Dent*, 4 (1), 34-40.
9. Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., Leyhausen, G. (1998) Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, 41 (3), 474-480.
10. Sideridou, I.D., Achilias, D.S. (2005) Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 74 (1), 617-626.

11. Moharamzadeh, K., van Noort, R., Brook, I.M., Scutt, A.M. (2007) HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med*, 18 (1), 133-137.
12. Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., Elbetieha, A.M. (2004) Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci*, 112 (3), 267-272.
13. Ortengren, U., Wellendorf, H., Karlsson, S., Ruyter, I.E. (2001) Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *J Oral Rehabil*, 28 (12), 1106-1115.
14. Saw, T.Y., Cao, T., Yap, A.U., Lee Ng, M.M. (2005) Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro*, 19 (1), 145-154.
15. Hanks, C.T., Wataha, J.C., Sun, Z. (1996) In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, 12 (3), 186-193.
16. Cao, T., Saw, T.Y., Heng, B.C., Liu, H., Yap, A.U., Ng, M.L. (2005) Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol*, 25 (2), 101-108.
17. Wataha, J.C. (2001) Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*, 86 (2), 203-209.
18. Huang, F.M., Tai, K.W., Chou, M.Y., Chang, Y.C. (2002) Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J*, 35 (2), 153-158.
19. Accorinte Mde, L., Loguercio, A.D., Reis, A., Muench, A., de Araujo, V.C. (2005) Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater*, 21 (7), 599-607.

20. Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Harreus, U.A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R. ve diğeri. (2004) Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent*, 32 (3), 229-234.
21. Costa, C.A., Hebling, J., Hanks, C.T. (2000) Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater*, 16 (3), 188-197.
22. International Organization for Standardization (1999) ISO 10993 Part 5 Biological evaluation of medical devices Tests for cytotoxicity: In-vitro methods Geneva, Switzerland.
23. Arossi, G.A., Dihl, R.R., Lehmann, M., Cunha, K.S., Reguly, M.L., de Andrade, H.H. (2009) In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis*, 24 (2), 169-172.
24. Arossi, G.A., Dihl, R.R., Lehmann, M., Reguly, M.L., de Andrade, H.H. (2010) Genetic toxicology of dental composite resin extracts in somatic cells in vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 107 (1), 625-629.
25. Arossi, G.A., Lehmann, M., Dihl, R.R., Reguly, M.L., de Andrade, H.H. (2010) Induced DNA damage by dental resin monomers in somatic cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 106 (2), 124-129.
26. Hashimoto, Y., Nakamura, M. (2000) Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related chemicals in vitro. *Dent Mater J*, 19 (3), 245-262.
27. Leyhausen, G., Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Geurtsen, W. (1999) Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod*, 25 (2), 109-113.
28. Li, Y., Noblitt, T.W., Dunipace, A.J., Stookey, G.K. (1990) Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames Salmonella/microsome test. *J Dent Res*, 69 (5), 1188-1192.
29. Schweikl, H., Spagnuolo, G., Schmalz, G. (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*, 85 (10), 870-877.

30. Geurtsen, W. (2000) Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11 (3), 333-355.
31. Ratanasathien, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T., Dennison, J.B. (1995) Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*, 74 (9), 1602-1606.
32. Gwinnett, A.J., Tay, F. (1998) Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent*, 11 Spec No, S35-44.
33. de Souza Costa, C.A., do Nascimento, A.B., Teixeira, H.M. (2002) Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater*, 18 (7), 543-551.
34. Buonocore, M.G. (1955) A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*, 34 (6), 849-853.
35. Geissberger, M. (2010). *Esthetic dentistry in clinical practice* (1st bs.). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
36. Kinney, J.H., Marshall, S.J., Marshall, G.W. (2003) The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14 (1), 13-29.
37. Roberson, T. M., Heymann, H., Swift, E.J., Sturdevant, C. M. (2006). *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry*. St. Louis: Mosby Elseiver
38. Hargreaves KM, G.H. (2002). *Seltzer and Benders's Dental Pulp*. Chicago: Quintessence Publishing.
39. Mjor, I.A., Sveen, O.B., Heyeraas, K.J. (2001) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int*, 32 (6), 427-446.
40. Marshall, G.W., Jr., Marshall, S.J., Kinney, J.H., Balooch, M. (1997) The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*, 25 (6), 441-458.

41. Perdigao, J. (2010) Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*, 26 (2), e24-37.
42. Mjör, I.A. (2002). Pulp- Dentin Biology in Restorative Dentistry. O. B. S. Ivar A. Mjör, Karin J. Heyeraas (Ed.). Normal Structure and Physiology. IL: Quintessence.
43. Pashley, D.H. (1996) Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7 (2), 104-133.
44. Summit, J. B., Schwartz, R. S., Hilton, T. J., Santos, J.D. (2006). Biologic considerations N. JW (Ed.). Fundamentals of Operative Dentistry. 3 trd edition. USA:Quintessence Publishing Co, Inc.
45. K.Avery, J. (2000). Dentin. P. F. Steeele (Ed.). Essentials of Oral Histology and Embryology A Clinical Approach. Michigan: Mosby.
46. Armigate, G.C., Avery, J.K., Bhaskar, S.N., Bhussry, B.R., Hand, A.R., Johnston, M.C. ve diğerleri. (1991). Dentin S. N. Bhaskar (Ed.). Orban's Oral Histology and Embiryology. California: Mosby.
47. Cohen, S., Hargreaves KM. (2006). Pathways of the Pulp. S. Cohen, Hargreaves KM & K. Keiser (Ed.). (ninth bs.). St. Louis: Mosby.
48. Nanci, A. (2003). Dentin-Pulp complex. P. Rudolph (Ed.). Ten Cate's Oral Histology (6 bs.). Montreal Canada: Mosby.
49. Farges, J.C., Keller, J.F., Carrouel, F., Durand, S.H., Romeas, A., Bleicher, F. ve diğerleri. (2009) Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312B (5), 425-436.
50. Murray, P.E., About, I., Lumley, P.J., Franquin, J.C., Remusat, M., Smith, A.J. (2000) Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent*, 28 (4), 277-285.

51. Stanley, H.R., Pereira, J.C., Spiegel, E., Broom, C., Schultz, M. (1983) The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol*, 12 (4), 257-289.
52. Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R., Moxham, B.J. (2002). Oral anatomy, embryology and histology (3rd bs.). Edinburgh ; New York: Mosby.
53. Linde, A., Goldberg, M. (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4 (5), 679-728.
54. Smith, A.J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J.V., Lesot, H. (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39 (1), 273-280.
55. Murray, P.E., About, I., Lumley, P.J., Smith, G., Franquin, J.C., Smith, A.J. (2000) Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc*, 131 (3), 321-329.
56. Murray, P.E., Hafez, A.A., Windsor, L.J., Smith, A.J., Cox, C.F. (2002) Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *J Dent*, 30 (5-6), 213-222.
57. Çetingüç, A. (2005). Üç dentin bağlayıcı sistem uygulaması ile yaşlı ve genç süt dişi dentininde geçen HEMA miktarının belirlenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
58. Mjor, I.A. (2009) Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J*, 20 (1), 3-16.
59. Fogel, H.M., Marshall, F.J., Pashley, D.H. (1988) Effects of distance from the pulp and thickness on the hydraulic conductance of human radicular dentin. *J Dent Res*, 67 (11), 1381-1385.
60. Koutsis, V., Noonan, R.G., Horner, J.A., Simpson, M.D., Matthews, W.G., Pashley, D.H. (1994) The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent*, 16 (1), 29-35.

61. Orchardson, R., Cadden, S.W. (2001) An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update*, 28 (4), 200-206, 208-209.
62. Stead, W.J., Orchardson, R., Warren, P.B. (1996) A mathematical model of potassium ion diffusion in dentinal tubules. *Arch Oral Biol*, 41 (7), 679-687.
63. Puapichartdumrong, P., Ikeda, H., Suda, H. (2005) Influence of the pulpal components on human dentine permeability in vitro. *Int Endod J*, 38 (3), 152-159.
64. Maroli, S., Khera, S.C., Krell, K.V. (1992) Regional variation in permeability of young dentin. *Oper Dent*, 17 (3), 93-100.
65. Murray, P.E., Lumley, P.J., Smith, A.J. (2002) Preserving the vital pulp in operative dentistry: 3. Thickness of remaining cavity dentine as a key mediator of pulpal injury and repair responses. *Dent Update*, 29 (4), 172-178.
66. Hamid, A., Hume, W.R. (1997) The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil*, 24 (1), 20-25.
67. Reeder, O.W., Jr., Walton, R.E., Livingston, M.J., Pashley, D.H. (1978) Dentin permeability: determinants of hydraulic conductance. *J Dent Res*, 57 (2), 187-193.
68. Hanks, C.T., Wataha, J.C., Parsell, R.R., Strawn, S.E., Fat, J.C. (1994) Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil*, 21 (4), 475-487.
69. Camps, J., Dejou, J., Remusat, M., About, I. (2000) Factors influencing pulpal response to cavity restorations. *Dent Mater*, 16 (6), 432-440.
70. Bouillaguet, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T., Ciucchi, B., Holz, J. (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*, 22 (5), 244-248.
71. Tagami, J., Hosoda, H., Burrow, M.F., Nakajima, M. (1992) Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 149-154.

72. Violich, D.R., Chandler, N.P. (2010) The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J*, 43 (1), 2-15.
73. Eick, J.D., Wilko, R.A., Anderson, C.H., Sorensen, S.E. (1970) Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res*, 49 (6), Suppl:1359-1368.
74. Bouillaguet, S., Virgillito, M., Wataha, J., Ciucchi, B., Holz, J. (1998) The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil*, 25 (1), 45-51.
75. Mjor, I.A., Odont, D. (2001) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 2: initial reactions to preparation of teeth for restorative procedures. *Quintessence Int*, 32 (7), 537-551.
76. Pashley, D.H., Ciucchi, B., Sano, H., Horner, J.A. (1993) Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*, 24 (9), 618-631.
77. Hashimoto, M., Ito, S., Tay, F.R., Svizero, N.R., Sano, H., Kaga, M. ve diğeri. (2004) Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res*, 83 (11), 843-848.
78. Sidhu, S.K., Agee, K.A., Waller, J.L., Pashley, D.H. (2004) In vitro evaporative vs. convective water flux across human dentin before and after conditioning and placement of glass-ionomer cements. *Am J Dent*, 17 (3), 211-215.
79. Turner, D.F., Marfurt, C.F., Sattelberg, C. (1989) Demonstration of physiological barrier between pulpal odontoblasts and its perturbation following routine restorative procedures: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *J Dent Res*, 68 (8), 1262-1268.
80. Pashley, D.H., Livingston, M.J., Greenhill, J.D. (1978) Regional resistances to fluid flow in human dentine in vitro. *Arch Oral Biol*, 23 (9), 807-810.
81. Pashley, D.H., Kehl, T., Pashley, E., Palmer, P. (1981) Comparison of in vitro and in vivo dog dentin permeability. *J Dent Res*, 60 (3), 763-768.

82. Pashley, D.H., Carvalho, R.M. (1997) Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*, 25 (5), 355-372.
83. Goldberg, M., Smith, A.J. (2004) Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15 (1), 13-27.
84. Gündüz, B. (1991). Pulpa Patolojisi ve Tedavileri İstanbul: İstanbul Üniversitesi ve Film Merkezi.
85. Fitzgerald, M., Chiego, D.J., Jr., Heys, D.R. (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*, 35 (9), 707-715.
86. Mount G.j., Hume, W.R. (1998). Preservation and restoration of tooth structure London: Mosby International Ltd.
87. Smith, A.J., Lumley, P.J., Tomson, P.L., Cooper, P.R. (2008) Dental regeneration and materials: a partnership. *Clin Oral Investig*, 12 (2), 103-108.
88. Kitamura, C., Ogawa, Y., Nishihara, T., Morotomi, T., Terashita, M. (2003) Transient co-localization of c-Jun N-terminal kinase and c-Jun with heat shock protein 70 in pulp cells during apoptosis. *J Dent Res*, 82 (2), 91-95.
89. He, W.X., Niu, Z.Y., Zhao, S.L., Smith, A.J. (2005) Smad protein mediated transforming growth factor beta1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line. *Arch Oral Biol*, 50 (11), 929-936.
90. Pashley, D.H. (1984) Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl*, 3, 13-29.
91. Schmalz, G., Hiller, K.A., Nunez, L.J., Stoll, J., Weis, K. (2001) Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod*, 27 (1), 23-30.
92. Pashley, D.H., Derkson, G.D., Tao, L., Derkson, M., Kalathoor, S. (1988) The effects of a multi-step dentin bonding system on dentin permeability. *Dent Mater*, 4 (2), 60-63.

93. Dumsha, T.C., Sydiskis, R.J. (1985) Cytotoxicity testing of a dentin bonding system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 59 (6), 637-641.
94. Meryon, S.D., Tobias, R.S., Johnson, S.G. (1988) Penetration of dentin by different conditioners in vitro: a quantitative study. *Endod Dent Traumatol*, 4 (3), 118-121.
95. Murray, P.E., About, I., Lumley, P.J., Franquin, J.C., Remusat, M., Smith, A.J. (2002) Cavity remaining dentin thickness and pulpal activity. *Am J Dent*, 15 (1), 41-46.
96. Hamid, A., Hume, W.R. (1997) Diffusion of resin monomers through human carious dentin in vitro. *Endod Dent Traumatol*, 13 (1), 1-5.
97. Brannstrom, M., Mattsson, B., Torstenson, B. (1991) Materials techniques for lining composite resin restorations: a critical approach. *J Dent*, 19 (2), 71-79.
98. Magloire, H., Joffre, A., Bleicher, F. (1996) An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res*, 75 (12), 1971-1978.
99. Tziafas, D., Smith, A.J., Lesot, H. (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*, 28 (2), 77-92.
100. Love, R.M., Jenkinson, H.F. (2002) Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13 (2), 171-183.
101. Lundy, F.T., Linden, G.J. (2004) Neuropeptides and Neurogenic Mechanisms in Oral and Periodontal Inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15 (2), 82-98.
102. Heyeraas, K.J., Sveen, O.B., Mjor, I.A. (2001) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae. *Quintessence Int*, 32 (8), 611-625.
103. Baier, R.E. (1992) Principles of adhesion. *Oper Dent*, Suppl 5, 1-9.
104. Dayangaç, B. (2000). Kompozit Rezin Restorasyonlar. Ankara: Günes Kitapevi Ltd Sti.

105. Perdigao, J. (2007) New developments in dental adhesion. *Dent Clin North Am*, 51 (2), 333-357, viii.
106. Marshall, S.J., Bayne, S.C., Baier, R., Tomsia, A.P., Marshall, G.W. (2010) A review of adhesion science. *Dent Mater*, 26 (2), e11-16.
107. Eick, J.D., Gwinnett, A.J., Pashley, D.H., Robinson, S.J. (1997) Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8 (3), 306-335.
108. Pashley, D.H. (1992) The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent*, 17 (6), 229-242.
109. Asmussen, E., Uno, S. (1992) Adhesion of restorative resins to dentin: chemical and physicochemical aspects. *Oper Dent*, Suppl 5, 68-74.
110. Swift, E.J., Jr. (2002) Dentin/enamel adhesives: review of the literature. *Pediatr Dent*, 24 (5), 456-461.
111. Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D. (2009). Biocompatibility of Dental Materials; (c. 1, s. 99-137). Berlin-Heidelberg Germany: Springer.
112. Nakabayashi, N., Kojima, K., Masuhara, E. (1982) The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*, 16 (3), 265-273.
113. Nakabayashi, N., Nakamura, M., Yasuda, N. (1991) Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent*, 3 (4), 133-138.
114. Kanca, J., 3rd. (1992) Improving bond strength through acid etching of dentin and bonding to wet dentin surfaces. *J Am Dent Assoc*, 123 (9), 35-43.
115. Perdigao, J., Lopes, M. (1999) Dentin bonding--state of the art 1999. *Compend Contin Educ Dent*, 20 (12), 1151-1158, 1160-1152; quiz 1164.
116. Civelek, A., Ersoy, M., L'Hotelier, E., Soyman, M., Say, E.C. (2003) Polymerization shrinkage and microleakage in Class II cavities of various resin composites. *Oper Dent*, 28 (5), 635-641.

- 117.Kanca, J., 3rd. (1992) Resin bonding to wet substrate. 1. Bonding to dentin. *Quintessence Int*, 23 (1), 39-41.
- 118.Tay, F.R., Gwinnett, A.J., Wei, S.H. (1996) The overwet phenomenon: a scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent*, 9 (3), 109-114.
- 119.Erickson, R.L. (1992) Surface interactions of dentin adhesive materials. *Oper Dent*, Suppl 5, 81-94.
- 120.Frankenberger, R., Tay, F.R. (2005) Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent Mater*, 21 (5), 397-412.
- 121.van Meerbeek, B., Perdigao, J., Lambrechts, P., Vanherle, G. (1998) The clinical performance of adhesives. *J Dent*, 26 (1), 1-20.
- 122.Fukushima, T., Inoue, Y., Miyazaki, K., Itoh, T. (2001) Effect of primers containing N-methylolacrylamide or N-methylolmethacrylamide on dentin bond durability of a resin composite after 5 years. *J Dent*, 29 (3), 227-234.
- 123.Swift, E.J., Jr., Perdigao, J., Heymann, H.O. (1995) Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int*, 26 (2), 95-110.
- 124.Peutzfeldt, A. (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 105 (2), 97-116.
- 125.Kugel, G., Ferrari, M. (2000) The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc*, 131 Suppl, 20S-25S.
- 126.Eick, J.D., Robinson, S.J., Chappell, R.P., Cobb, C.M., Spencer, P. (1993) The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part III. *Quintessence Int*, 24 (8), 571-582.
- 127.Eick, J.D., Cobb, C.M., Chappell, R.P., Spencer, P., Robinson, S.J. (1991) The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part I. *Quintessence Int*, 22 (12), 967-977.

- 128.Eick, J.D., Robinson, S.J., Cobb, C.M., Chappell, R.P., Spencer, P. (1992) The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. 2. *Quintessence Int*, 23 (1), 43-51.
- 129.van Meerbeek, B., Inokoshi, S., Braem, M., Lambrechts, P., Vanherle, G. (1992) Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res*, 71 (8), 1530-1540.
- 130.De Munck, J., van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M. ve diğerleri. (2005) A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*, 84 (2), 118-132.
- 131.Stangel, I., Ellis, T.H., Sacher, E. (2007) Adhesion to tooth structure mediated by contemporary bonding systems. *Dent Clin North Am*, 51 (3), 677-694, vii.
- 132.Tay, F.R., Gwinnett, J.A., Wei, S.H. (1996) Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater*, 12 (4), 236-244.
- 133.Tay, F.R., Gwinnett, A.J., Pang, K.M., Wei, S.H. (1994) Structural evidence of a sealed tissue interface with a total-etch wet-bonding technique in vivo. *J Dent Res*, 73 (3), 629-636.
- 134.Tay, F.R., Gwinnett, J.A., Wei, S.H. (1998) Relation between water content in acetone/alcohol-based primer and interfacial ultrastructure. *J Dent*, 26 (2), 147-156.
- 135.Wakefield, C.W., Kofford, K.R. (2001) Advances in restorative materials. *Dent Clin North Am*, 45 (1), 7-29.
- 136.Tyas, M.J., Burrow, M.F. (2004) Adhesive restorative materials: a review. *Aust Dent J*, 49 (3), 112-121; quiz 154.
- 137.Sano, H., Shono, T., Takatsu, T., Hosoda, H. (1994) Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*, 19 (2), 59-64.

- 138.Spencer, P., Wang, Y., Walker, M.P., Wieliczka, D.M., Swafford, J.R. (2000) Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res*, 79 (7), 1458-1463.
- 139.Miyazaki, M., Onose, H., Moore, B.K. (2002) Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater*, 18 (8), 576-580.
- 140.Miyazaki, M., Onose, H., Moore, B.K. (2000) Effect of operator variability on dentin bond strength of two-step bonding systems. *Am J Dent*, 13 (2), 101-104.
- 141.Manhart, J., Trumm, C. (2010) Marginal adaptation of an etch-and-rinse adhesive with a new type of solvent in class II cavities after artificial aging. *Clin Oral Investig*, 14 (6), 699-705.
- 142.Nakabayashi, N., Saimi, Y. (1996) Bonding to intact dentin. *J Dent Res*, 75 (9), 1706-1715.
- 143.Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., de Stefano Dorigo, E. (2008) Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*, 24 (1), 90-101.
- 144.Kiremitci , A., Altıncı P (2008) Self-etch adeziv sistemlerde güncel gelişmeler bölüm I:farklı özelliklerde diş sert dokularına bağlanma etkinliği. *Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 32 (4), 33-49.
- 145.Prati, C., Ferrieri, P., Galloni, C., Mongiorgi, R., Davidson, C.L. (1995) Dentine permeability and bond quality as affected by new bonding systems. *J Dent*, 23 (4), 217-226.
- 146.Jacques, P., Hebling, J. (2005) Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and a self-etching primer adhesive system. *Dent Mater*, 21 (2), 103-109.
- 147.Hayakawa, T., Kikutake, K., Nemoto, K. (1998) Influence of self-etching primer treatment on the adhesion of resin composite to polished dentin and enamel. *Dent Mater*, 14 (2), 99-105.

- 148.Tay, F.R., Pashley, D.H. (2001) Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*, 17 (4), 296-308.
- 149.Freedman, G., Leinfelder, K. (2002) Seventh-generation adhesive systems. *Dent Today*, 21 (11), 106-111.
- 150.Perdigao, J., Geraldeli, S., Hodges, J.S. (2003) Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. *J Am Dent Assoc*, 134 (12), 1621-1629.
- 151.Tay, F., Carvalho, R., Pashley, D. (2004) Water movement across bonded dentin- too much of a good thing *J Appl Oral Sci*, 12 (special), 12-25.
- 152.Yoshioka, M., Yoshida, Y., Inoue, S., Lambrechts, P., Vanherle, G., Nomura, Y. ve diğ erleri. (2002) Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. *J Biomed Mater Res*, 59 (1), 56-62.
- 153.Fu, B., Sun, X., Qian, W., Shen, Y., Chen, R., Hannig, M. (2005) Evidence of chemical bonding to hydroxyapatite by phosphoric acid esters. *Biomaterials*, 26 (25), 5104-5110.
- 154.Yoshida, Y., van Meerbeek, B., Nakayama, Y., Yoshioka, M., Snauwaert, J., Abe, Y. ve diğ erleri. (2001) Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res*, 80 (6), 1565-1569.
- 155.Nunes, T.G., Polido, M., Amorim, A., Nunes, S.G., Toledano, M. (2007) Multinuclear magnetic resonance studies on the chemical interaction of a self-etching adhesive with radicular and coronal human dentin. *J Mater Sci Mater Med*, 18 (10), 2093-2099.
- 156.Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H. ve diğ erleri. (2004) Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*, 83 (6), 454-458.

- 157.Erickson, R.L., Barkmeier, W.W., Latta, M.A. (2009) The role of etching in bonding to enamel: a comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems. *Dent Mater*, 25 (11), 1459-1467.
- 158.van Meerbeek, B., van Landuyt, K., De Munck, J., Hashimoto, M., Peumans, M., Lambrechts, P. ve diğerleri. (2005) Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J*, 24 (1), 1-13.
- 159.Cardoso, P.E., Braga, R.R., Carrilho, M.R. (1998) Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. *Dent Mater*, 14 (6), 394-398.
- 160.Perdigao, J. (2002) Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin North Am*, 46 (2), 277-301, vi.
- 161.Tao, L., Pashely, D.H., Boyd, L. (1988) Effect of different types of smear layers on dentin and enamel shear bond strengths. *Dent Mater*, 4 (4), 208-216.
- 162.Eliades, G., Watts, D., Eliades, T. (2005). Dental hard tissues and bonding: interfacial phenomena and related properties (1st. bs.). New York, NY: Springer.
- 163.Gwinnett, A.J., Matsui, A. (1967) A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Arch Oral Biol*, 12 (12), 1615-1620.
- 164.Hannig, M., Reinhardt, K.J., Bott, B. (1999) Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to-enamel bonding. *Oper Dent*, 24 (3), 172-180.
- 165.Vaidyanathan, T.K., Vaidyanathan, J. (2009) Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 88 (2), 558-578.
- 166.Nakabayashi, N., Takeyama, M., Kojima, K., Masuhara, E. (1982) [Studies on dental self-curing resins (20) - adhesion mechanism of 4-META/MMA-TBB resin to dentine (author's transl)]. *Shika Rikogaku Zasshi*, 23 (61), 34-39.

167. Bertolotti, R.L. (1991) Total etch--the rational dentin bonding protocol. *J Esthet Dent*, 3 (1), 1-6.
168. Pashley, D.H., Tay, F.R. (2001) Aggressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater*, 17 (5), 430-444.
169. Fusayama, T. (1988) The problems preventing progress in adhesive restorative dentistry. *Adv Dent Res*, 2 (1), 158-161; discussion 161-153.
170. McCabe, J.F., Walls, A. (2008). *Applied dental materials* (9th bs.). Oxford, UK ; Ames, Iowa: Blackwell Pub.
171. van Meerbeek, B., Inoue, S., Perdigao, J., Lambrechts, P., Vanherle, G. (2001). enamel and dentin adhesion E. Solaro (Ed.). *Fundamentals of Operative dentistry* (s. 141-186). Illinois, USA: Quintessence Pub Co Inc
172. Willems, G., Lambrechts, P., Braem, M., Vanherle, G. (1993) Composite resins in the 21st century. *Quintessence Int*, 24 (9), 641-658.
173. Bowen, R.L. (1956) Use of epoxy resins in restorative materials. *J Dent Res*, 35 (3), 360-369.
174. Soderholm, K.J., Mariotti, A. (1999) BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc*, 130 (2), 201-209.
175. McLean, J.W. (1996) Dentinal bonding agents versus glass-ionomer cements. *Quintessence Int*, 27 (10), 659-667.
176. Craig, R.G. (1981) Chemistry, composition, and properties of composite resins. *Dent Clin North Am*, 25 (2), 219-239.
177. Wilson, K.S., Zhang, K., Antonucci, J.M. (2005) Systematic variation of interfacial phase reactivity in dental nanocomposites. *Biomaterials*, 26 (25), 5095-5103.
178. Yap, A.U., Tan, C.H., Chung, S.M. (2004) Wear behavior of new composite restoratives. *Oper Dent*, 29 (3), 269-274.

- 179.Spahl, W., Budzikiewicz, H., Geurtsen, W. (1998) Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent*, 26 (2), 137-145.
- 180.Oberholzer, T.G., Du Preez, I.C., Kidd, M. (2005) Effect of LED curing on the microleakage, shear bond strength and surface hardness of a resin-based composite restoration. *Biomaterials*, 26 (18), 3981-3986.
- 181.Jackson, R.D., Morgan, M. (2000) The new posterior resins and a simplified placement technique. *J Am Dent Assoc*, 131 (3), 375-383.
- 182.Lutz, F., Phillips, R.W. (1983) A classification and evaluation of composite resin systems. *J Prosthet Dent*, 50 (4), 480-488.
- 183.Manhart, J., Chen, H.Y., Hickel, R. (2009) Three-year results of a randomized controlled clinical trial of the posterior composite QuiXfil in class I and II cavities. *Clin Oral Investig*, 13 (3), 301-307.
- 184.Manhart, J., Kunzelmann, K.H., Chen, H.Y., Hickel, R. (2000) Mechanical properties of new composite restorative materials. *J Biomed Mater Res*, 53 (4), 353-361.
- 185.Brackett, W.W., Covey, D.A. (2000) Resistance to condensation of 'condensable' resin composites as evaluated by a mechanical test. *Oper Dent*, 25 (5), 424-426.
- 186.Loguercio, A.D., Reis, A., Rodrigues Filho, L.E., Busato, A.L. (2001) One-year clinical evaluation of posterior packable resin composite restorations. *Oper Dent*, 26 (5), 427-434.
- 187.Labella, R., Lambrechts, P., van Meerbeek, B., Vanherle, G. (1999) Polymerization shrinkage and elasticity of flowable composites and filled adhesives. *Dent Mater*, 15 (2), 128-137.
- 188.Bayne, S.C., Thompson, J.Y., Swift, E.J., Jr., Stamatiades, P., Wilkerson, M. (1998) A characterization of first-generation flowable composites. *J Am Dent Assoc*, 129 (5), 567-577.

189. Chuang, S.F., Jin, Y.T., Liu, J.K., Chang, C.H., Shieh, D.B. (2004) Influence of flowable composite lining thickness on Class II composite restorations. *Oper Dent*, 29 (3), 301-308.
190. Mitra, S.B., Wu, D., Holmes, B.N. (2003) An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc*, 134 (10), 1382-1390.
191. Saunders, S.A. (2009) Current practicality of nanotechnology in dentistry. Part 1: Focus on nanocomposite restoratives and biomimetics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 1, 47-61.
192. Ure, D., Harris, J. (2003) Nanotechnology in dentistry: reduction to practice. *Dent Update*, 30 (1), 10-15.
193. Jung, M., Eichelberger, K., Klimek, J. (2007) Surface geometry of four nanofiller and one hybrid composite after one-step and multiple-step polishing. *Oper Dent*, 32 (4), 347-355.
194. Davis, N. (2003) A nanotechnology composite. *Compend Contin Educ Dent*, 24 (9), 662, 665-667, 669-670.
195. Schedle, A., Ortengren, U., Eidler, N., Gabauer, M., Hensten, A. (2007) Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clin Oral Implants Res*, 18 Suppl 3, 232-256.
196. Lutz, F., Krejci, I. (2000) Amalgam substitutes: a critical analysis. *J Esthet Dent*, 12 (3), 146-159.
197. Davidson, C.L., Feilzer, A.J. (1997) Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent*, 25 (6), 435-440.
198. Palin, W.M., Fleming, G.J., Burke, F.J., Marquis, P.M., Randall, R.C. (2005) The influence of short and medium-term water immersion on the hydrolytic stability of novel low-shrink dental composites. *Dent Mater*, 21 (9), 852-863.

- 199.Ilie, N., Hickel, R. (2009) Macro-, micro- and nano-mechanical investigations on silorane and methacrylate-based composites. *Dent Mater*, 25 (6), 810-819.
- 200.Schweikl, H., Schmalz, G., Weinmann, W. (2004) The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J Dent Res*, 83 (1), 17-21.
- 201.Lien, W., Vandewalle, K.S. (2010) Physical properties of a new silorane-based restorative system. *Dent Mater*, 26 (4), 337-344.
- 202.Palin, W.M., Fleming, G.J., Nathwani, H., Burke, F.J., Randall, R.C. (2005) In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites. *Dent Mater*, 21 (4), 324-335.
- 203.Eick, J.D., Kotha, S.P., Chappelow, C.C., Kilway, K.V., Giese, G.J., Glaros, A.G. ve diğ erleri. (2007) Properties of silorane-based dental resins and composites containing a stress-reducing monomer. *Dent Mater*, 23 (8), 1011-1017.
- 204.Ferracane, J.L. (2005) Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization. *Dent Mater*, 21 (1), 36-42.
- 205.Mine, A., De Munck, J., van Ende, A., Cardoso, M.V., Kuboki, T., Yoshida, Y. ve diğ erleri. (2010) TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dent Mater*, 26 (6), 524-532.
- 206.Kovarik, R.E., Haubenreich, J.E., Gore, D. (2005) Glass ionomer cements: a review of composition, chemistry, and biocompatibility as a dental and medical implant material. *J Long Term Eff Med Implants*, 15 (6), 655-671.
- 207.Yap, A.U., Sau, C.W., Lye, K.W. (1998) Effects of finishing/polishing time on surface characteristics of tooth-coloured restoratives. *J Oral Rehabil*, 25 (6), 456-461.
- 208.Nicholson, J.W., Czarnecka, B. (2008) The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater*, 24 (12), 1702-1708.

209. Francisconi, L.F., Scaffa, P.M., de Barros, V.R., Coutinho, M., Francisconi, P.A. (2009) Glass ionomer cements and their role in the restoration of non-carious cervical lesions. *J Appl Oral Sci*, 17 (5), 364-369.
210. McLean, J.W., Nicholson, J.W., Wilson, A.D. (1994) Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int*, 25 (9), 587-589.
211. Stea, S., Cervellati, M., Cavedagna, D., Savarino, L., Cenni, E., Pizzoferrato, A. (1998) Detection of mutagenic potential of some glass-ionomer cements through Ames testing. *J Mater Sci Mater Med*, 9 (3), 141-146.
212. Lin, A., McIntyre, N.S., Davidson, R.D. (1992) Studies on the adhesion of glass-ionomer cements to dentin. *J Dent Res*, 71 (11), 1836-1841.
213. Kent, B.E., Lewis, B.G., Wilson, A.D. (1973) The properties of a glass ionomer cement. *Br Dent J*, 135 (7), 322-326.
214. Dentsply De Trey GmbH Professional Research (1998) Chemfle technical manual. Dentsply De Trey Almanyá
215. Guggenberger, R., May, R., Stefan, K.P. (1998) New trends in glass-ionomer chemistry. *Biomaterials*, 19 (6), 479-483.
216. Cattani-Lorente, M.A., Dupuis, V., Payan, J., Moya, F., Meyer, J.M. (1999) Effect of water on the physical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Dent Mater*, 15 (1), 71-78.
217. Nicholson, J.W., Croll, T.P. (1997) Glass-ionomer cements in restorative dentistry. *Quintessence Int*, 28 (11), 705-714.
218. Molar, w.M.K. Quick Product Brochure. , Ağ Sitesi:
www.gceurope.com/pid/127/leaflet/en_Leaflet.pdf
219. Restorative, K.N.L.C.N.-I. Ağ Sitesi:
http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UuZjcFSLXTt mxT_nxMVEVuQEcuZgVs6EVs6E666666--

220. Ağ Sitesi: <http://dental-materials.blogspot.com/2009/11/nano-filled-resin-modified-glass.html>
- 221.Komurcuoglu, E., Olmez, S., Vural, N. (2005) Evaluation of residual monomer elimination methods in three different fissure sealants in vitro. *J Oral Rehabil*, 32 (2), 116-121.
- 222.Alanko, K., Susitaival, P., Jolanki, R., Kanerva, L. (2004) Occupational skin diseases among dental nurses. *Contact Dermatitis*, 50 (2), 77-82.
- 223.Kanerva, L. (2001) Cross-reactions of multifunctional methacrylates and acrylates. *Acta Odontol Scand*, 59 (5), 320-329.
224. Kayser, D., Schlede, E. (eds) (2001) *Chemikalien und Kontaktallergien. [Chemicals and contact allergies]* Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Urban & Vogel, München .
- 225.Schmalz, G. (1998) The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 106 (2 Pt 2), 696-706.
- 226.Schweikl, H., Schmalz, G., Rackebrandt, K. (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res*, 415 (1-2), 119-130.
- 227.Schweikl, H., Hartmann, A., Hiller, K.A., Spagnuolo, G., Bolay, C., Brockhoff, G. ve diğerleri. (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater*, 23 (6), 688-695.
- 228.Powers, J.M., Sakaguchi, R.L. (2006). *Biocompatibility of Dental Materials. Craig's Restorative Dental Materials*, 12th Edition (12 bs.): Mosby
- 229.Polydorou, O., Trittler, R., Hellwig, E., Kummerer, K. (2007) Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater*, 23 (12), 1535-1541.

230. Polydorou, O., Hammad, M., Konig, A., Hellwig, E., Kummerer, K. (2009) Release of monomers from different core build-up materials. *Dent Mater*, 25 (9), 1090-1095.
231. O'Brien, W. (2002). *Dental Materials and their Selection*. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc
232. Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U.E., Geurtsen, W. (1998) Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J Dent Res*, 77 (1), 60-67.
233. Bowen, R.L. (1982) Composite and sealant resins--past, present, and future. *Pediatr Dent*, 4 (1), 10-15.
234. Elliott, J.E., Lovell, L.G., Bowman, C.N. (2001) Primary cyclization in the polymerization of bis-GMA and TEGDMA: a modeling approach to understanding the cure of dental resins. *Dent Mater*, 17 (3), 221-229.
235. Tanumiharja, M., Burrow, M.F., Tyas, M.J. (2000) Microtensile bond strengths of seven dentin adhesive systems. *Dent Mater*, 16 (3), 180-187.
236. Azarpazhooh, A., Main, P.A. (2008) Is there a risk of harm or toxicity in the placement of pit and fissure sealant materials? A systematic review. *J Can Dent Assoc*, 74 (2), 179-183.
237. Fleisch, A.F., Sheffield, P.E., Chinn, C., Edelstein, B.L., Landrigan, P.J. (2010) Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, 126 (4), 760-768.
238. Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A. ve diğ erleri. (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104 (3), 298-305.
239. Nathanson, D., Lertpitayakun, P., Lamkin, M.S., Edalatpour, M., Chou, L.L. (1997) In vitro elution of leachable components from dental sealants. *J Am Dent Assoc*, 128 (11), 1517-1523.

- 240.Hamid, A., Hume, W.R. (1997) A study of component release from resin pit and fissure sealants in vitro. *Dent Mater*, 13 (2), 98-102.
- 241.Wada, H., Tarumi, H., Imazato, S., Narimatsu, M., Ebisu, S. (2004) In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res*, 83 (3), 222-226.
- 242.Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K. ve diğerleri. (2005) Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med*, 16 (4), 297-300.
- 243.Schafer, T.E., Lapp, C.A., Hanes, C.M., Lewis, J.B. (2000) What parents should know about estrogen-like compounds in dental materials. *Pediatr Dent*, 22 (1), 75-76.
- 244.Kostoryz, E.L., Eick, J.D., Glaros, A.G., Judy, B.M., Welshons, W.V., Burmaster, S. ve diğerleri. (2003) Biocompatibility of hydroxylated metabolites of BISGMA and BFDGE. *J Dent Res*, 82 (5), 367-371.
- 245.Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Leyhausen, G., Geurtsen, W. (1996) Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res*, 368 (3-4), 181-194.
- 246.Engelmann, J., Janke, V., Volk, J., Leyhausen, G., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B. ve diğerleri. (2004) Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25 (19), 4573-4580.
- 247.Polydorou, O., Konig, A., Hellwig, E., Kummerer, K. (2009) Urethane dimethacrylate: a molecule that may cause confusion in dental research. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91 (1), 1-4.
- 248.Chang, H.H., Chang, M.C., Lin, L.D., Lee, J.J., Wang, T.M., Huang, C.H. ve diğerleri. (2010) The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials*, 31 (27), 6917-6925.
- 249.Poplawski, T., Loba, K., Pawlowska, E., Szczepanska, J., Blasiak, J. (2010) Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol In Vitro*, 24 (3), 854-862.

- 250.About, I., Camps, J., Mitsiadis, T.A., Bottero, M.J., Butler, W., Franquin, J.C. (2002) Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res*, 63 (4), 418-423.
- 251.Rakich, D.R., Wataha, J.C., Lefebvre, C.A., Weller, R.N. (1999) Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod*, 25 (2), 114-117.
- 252.Reichl, F.X., Esters, M., Simon, S., Seiss, M., Kehe, K., Kleinsasser, N. ve diğeri. (2006) Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*, 80 (6), 370-377.
- 253.Al-Hiyasat, A.S., Darmani, H., Milhem, M.M. (2005) Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig*, 9 (1), 21-25.
- 254.Mohsen, N.M., Craig, R.G., Hanks, C.T. (1998) Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching. *J Biomed Mater Res*, 39 (2), 252-260.
- 255.Stanislawski, L., Lefebvre, M., Bourd, K., Soheili-Majd, E., Goldberg, M., Perianin, A. (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*, 66 (3), 476-482.
- 256.Inoue, K., Hayashi, I. (1982) Residual monomer (Bis-GMA) of composite resins. *J Oral Rehabil*, 9 (6), 493-497.
- 257.Schweikl, H., Schmalz, G. (1999) Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res*, 438 (1), 71-78.
- 258.Schweikl, H., Schmalz, G., Spruss, T. (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res*, 80 (7), 1615-1620.

- 259.Gerzina, T.M., Hume, W.R. (1996) Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent*, 24 (1-2), 125-128.
- 260.van Landuyt, K.L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A. ve diğeri. (2007) Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28 (26), 3757-3785.
- 261.Nakabayashi, N., Takarada, K. (1992) Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater*, 8 (2), 125-130.
- 262.Hamid, A., Sutton, W., Hume, W.R. (1996) Variation in phosphoric acid concentration and treatment time and HEMA diffusion through dentin. *Am J Dent*, 9 (5), 211-214.
- 263.Cetinguc, A., Olmez, S., Vural, N. (2007) HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater*, 23 (3), 302-307.
- 264.Kaga, M., Noda, M., Ferracane, J.L., Nakamura, W., Oguchi, H., Sano, H. (2001) The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater*, 17 (4), 333-339.
- 265.Huang, F.M., Chou, M.Y., Chang, Y.C. (2003) Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 24 (1), 157-163.
- 266.Paranjpe, A., Bordador, L.C., Wang, M.Y., Hume, W.R., Jewett, A. (2005) Resin monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *J Dent Res*, 84 (2), 172-177.
- 267.Rakich, D.R., Wataha, J.C., Lefebvre, C.A., Weller, R.N. (1998) Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod*, 24 (8), 528-533.

- 268.Costa, C.A., Vaerten, M.A., Edwards, C.A., Hanks, C.T. (1999) Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*, 15 (6), 434-441.
- 269.Bouillaguet, S., Wataha, J.C., Virgillito, M., Gonzalez, L., Rakich, D.R., Meyer, J.M. (2000) Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater*, 16 (3), 213-217.
- 270.Schuster, G.S., Caughman, G.B., Rueggeberg, F.A. (2000) Changes in cell phospholipid metabolism in vitro in the presence of HEMA and its degradation products. *Dent Mater*, 16 (4), 297-302.
- 271.Hamid, A., Okamoto, A., Iwaku, M., Hume, W.R. (1998) Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements. *J Oral Rehabil*, 25 (2), 94-99.
- 272.Spagnuolo, G., Mauro, C., Leonardi, A., Santillo, M., Paterno, R., Schweikl, H. ve diğerleri. (2004) NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res*, 83 (11), 837-842.
- 273.Falconi, M., Teti, G., Zago, M., Pelotti, S., Breschi, L., Mazzotti, G. (2007) Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol*, 23 (5), 313-322.
- 274.Bjorkner, B., Niklasson, B., Persson, K. (1984) The sensitizing potential of di-(meth)acrylates based on bisphenol A or epoxy resin in the guinea pig. *Contact Dermatitis*, 10 (5), 286-304.
- 275.Katsuno, K., Manabe, A., Itoh, K., Hisamitsu, H., Wakumoto, S., Nakayama, S. ve diğerleri. (1995) A delayed hypersensitivity reaction to dentine primer in the guinea-pig. *J Dent*, 23 (5), 295-299.
- 276.Basker, R.M., Hunter, A.M., Highet, A.S. (1990) A severe asthmatic reaction to poly(methyl methacrylate) denture base resin. *Br Dent J*, 169 (8), 250-251.

277. Rickles, N.H. (1972) Allergy in surface lesions of the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 33 (5), 744-754.
278. Lee, D.H., Lim, B.S., Lee, Y.K., Ahn, S.J., Yang, H.C. (2006) Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*, 22 (12), 1086-1092.
279. Tuna, E., Gençay, K. (2006) Kompozit materyallerden artık monomerlerin salınımını etkileyen faktörler. *Türk Diş hekimliği Dergisi*, 66, 226-228.
280. Stansbury, J.W., Dickens, S.H. (2001) Determination of double bond conversion in dental resins by near infrared spectroscopy. *Dent Mater*, 17 (1), 71-79.
281. Cadenaro, M., Antonioli, F., Sauro, S., Tay, F.R., Di Lenarda, R., Prati, C. ve diğerleri. (2005) Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci*, 113 (6), 525-530.
282. Yap, A.U., Soh, M.S., Han, T.T., Siow, K.S. (2004) Influence of curing lights and modes on cross-link density of dental composites. *Oper Dent*, 29 (4), 410-415.
283. Miletic, V., Santini, A., Trkulja, I. (2009) Quantification of monomer elution and carbon-carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy. *J Dent*, 37 (3), 177-184.
284. Dewaele, M., Truffier-Boutry, D., Devaux, J., Leloup, G. (2006) Volume contraction in photocured dental resins: the shrinkage-conversion relationship revisited. *Dent Mater*, 22 (4), 359-365.
285. Muller, H., Olsson, S., Soderholm, K.J. (1997) The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites. *Eur J Oral Sci*, 105 (4), 362-368.
286. Lygre, H., Hol, P.J., Solheim, E., Moe, G. (1999) Organic leachables from polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 107 (5), 378-383.

- 287.Rueggeberg, F.A., Margeson, D.H. (1990) The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res*, 69 (10), 1652-1658.
- 288.Ferracane, J.L. (1994) Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, 21 (4), 441-452.
- 289.Hanks, C.T., Wataha, J.C., Parsell, R.R., Strawn, S.E. (1992) Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod*, 18 (12), 589-596.
- 290.Beriat, N.C., Ertan, A.A., Canay, S., Gurpinar, A., Onur, M.A. (2010) Effect of different polymerization methods on the cytotoxicity of dental composites. *Eur J Dent*, 4 (3), 287-292.
- 291.Goldberg, M. (2008) In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*, 12 (1), 1-8.
- 292.Vajrabhaya, L.O., Korsuwannawong, S., Bosl, C., Schmalz, G. (2009) The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107 (3), e86-90.
- 293.Santerre, J.P., Shajii, L., Tsang, H. (1999) Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J Dent Res*, 78 (8), 1459-1468.
- 294.Shajii, L., Santerre, J.P. (1999) Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials*, 20 (20), 1897-1908.
- 295.Yourtee, D.M., Smith, R.E., Russo, K.A., Burmaster, S., Cannon, J.M., Eick, J.D. ve diğ erleri. (2001) The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic and systematic evaluations. *J Biomed Mater Res*, 57 (4), 522-531.
- 296.Finer, Y., Santerre, J.P. (2003) Biodegradation of a dental composite by esterases: dependence on enzyme concentration and specificity. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14 (8), 837-849.

- 297.Santerre, J.P., Shajii, L., Leung, B.W. (2001) Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12 (2), 136-151.
- 298.Nishiyama, N., Suzuki, K., Yoshida, H., Teshima, H., Nemoto, K. (2004) Hydrolytic stability of methacrylamide in acidic aqueous solution. *Biomaterials*, 25 (6), 965-969.
- 299.Geurtsen, W., Spahl, W., Leyhausen, G. (1998) Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res*, 77 (12), 2012-2019.
- 300.Kadoma, Y. (2010) Kinetic polymerization behavior of fluorinated monomers for dental use. *Dent Mater J*.
- 301.He, J., Luo, Y., Liu, F., Jia, D. (2010) Synthesis, characterization and photopolymerization of a new dimethacrylate monomer based on (alpha-methyl-benzylidene)bisphenol used as root canal sealer. *J Biomater Sci Polym Ed*, 21 (8-9), 1191-1205.
- 302.Morgan, D.R., Kalachandra, S., Shobha, H.K., Gunduz, N., Stejskal, E.O. (2000) Analysis of a dimethacrylate copolymer (bis-GMA and TEGDMA) network by DSC and ¹³C solution and solid-state NMR spectroscopy. *Biomaterials*, 21 (18), 1897-1903.
- 303.Mazzaoui, S.A., Burrow, M.F., Tyas, M.J., Rooney, F.R., Capon, R.J. (2002) Long-term quantification of the release of monomers from dental resin composites and a resin-modified glass ionomer cement. *J Biomed Mater Res*, 63 (3), 299-305.
- 304.Miller, J.M. (2005). *Chromatography: Concepts and Contrasts* (2nd bs.). Hoboken, N.J.: Wiley.
- 305.Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd bs.). Hoboken, N.J.: Wiley.

- 306.Gündüz, T. (2004). İnrümental Analiz, Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş (7. bs.). Ankara: Gazi kitabevi.
- 307.Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S. (1997). Kromatografik Yöntemler Enstrümental Analiz Yöntemleri (c. 2. baskı). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- 308.corporation, W. (2006). Ağ Sitesi:
<http://www.waters.com/watersdivision/Contentd.asp?ref=CEAN>
- 309.Ferracane, J.L., Condon, J.R. (1990) Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*, 6 (4), 282-287.
- 310.Michelsen, V.B., Lygre, H., Skalevik, R., Tveit, A.B., Solheim, E. (2003) Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 111 (3), 263-271.
- 311.Uzunova, Y., Lukanov, L., Filipov, I., Vladimirov, S. (2008) High-performance liquid chromatographic determination of unreacted monomers and other residues contained in dental composites. *J Biochem Biophys Methods*, 70 (6), 883-888.
- 312.Zhang, Y., Xu, J. (2008) Effect of immersion in various media on the sorption, solubility, elution of unreacted monomers, and flexural properties of two model dental composite compositions. *J Mater Sci Mater Med*, 19 (6), 2477-2483.
- 313.Eliades, T., Hiskia, A., Eliades, G., Athanasiou, A.E. (2007) Assessment of bisphenol-A release from orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 131 (1), 72-75.
- 314.Kucharska, M., Grabka, J. (2010) A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, 80 (3), 1045-1051.
- 315.Tak, Ö. (2008). İki farklı polimerizasyon mekanizmasına sahip rezin simanların pulpa odasına diffüze olan HEMA miktarının incelenmesi. Doktora Tezi,Selçuk Üniversitesi, Konya.

- 316.Kılınç, M. (2006). Kromatografik yöntemler ve HPLC yöntemi, Ağ Sitesi: http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/hplc.htm
- 317.Wataha, J.C., Craig, R.G., Hanks, C.T. (1992) Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater*, 8 (1), 65-70.
- 318.Schmalz, G. (1997) Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 1 (4), 154-162.
- 319.Kong, N., Jiang, T., Zhou, Z., Fu, J. (2009) Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dent Mater*, 25 (11), 1371-1375.
320. International Organization for Standardization (2008) ISO 7405 Dentistry-preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry test methods for dental materials Geneva, Switzerland.
- 321.Geurtsen, W., Leinenbach, F., Krage, T., Leyhausen, G. (1998) Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85 (5), 592-597.
- 322.Ho, Y.C., Huang, F.M., Chang, Y.C. (2006) Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*, 39 (5), 389-393.
- 323.Schweikl, H., Schmalz, G. (2000) The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH plus. *Biomaterials*, 21 (9), 939-944.
- 324.Kawahara, H., Yamagami, A., Nakamura, M., Jr. (1968) Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J*, 18 (2), 443-467.
- 325.Edgerton, M., Levine, M.J. (1993) Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent*, 69 (4), 406-415.
- 326.Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C.R., Granchi, D. ve diğ erleri. (1994) Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*, 15 (3), 173-190.

- 327.Mather, J.P., Roberts, P.E. (1998). Introduction to cell and tissue culture : theory and technique. New York: Plenum Press.
- 328.De Bruyne, M.A., De Moor, R.J., Raes, F.M. (2000) Necrosis of the gingiva caused by calcium hydroxide: a case report. *Int Endod J*, 33 (1), 67-71.
- 329.Taira, M., Nakao, H., Matsumoto, T., Takahashi, J. (2000) Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont*, 13 (4), 311-315.
- 330.Schuster, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N., Metzl, C. (2001) Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod*, 27 (4), 259-265.
- 331.Tissue Culture Methods, (2004) Ağ Sitesi:
<http://www.research.umcb.edu/jwolf/method5.htm>
- 332.Harrison, M.A., Rae, I.F. (1997). General techniques of cell culture. Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- 333.Zhang, W., Torabinejad, M., Li, Y. (2003) Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod*, 29 (10), 654-657.
- 334.Malheiros, C.F., Marques, M.M., Gavini, G. (2005) In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*, 31 (10), 746-748.
- 335.Geurtsen, W. (1998) Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci*, 106 (2 Pt 2), 687-695.
- 336.Koulaouzidou, E.A., Margelos, J., Beltes, P., Kortsaris, A.H. (1999) Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod*, 25 (1), 21-23.
- 337.Miletic, I., Jukic, S., Anic, I., Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., Osmak, M. (2003) Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int Endod J*, 36 (5), 330-335.

338. Buckberry, L.D. (1999). Animal cell biotechnology methods and protocols. Jenkins, N. (Ed.). Cytotoxicity testing using cell line. Totowa New Jersey: Humana Pres Inc.
339. Schwarze, T., Fiedler, I., Leyhausen, G., Geurtsen, W. (2002) The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod*, 28 (11), 784-786.
340. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2), 55-63.
341. Issa, Y., Watts, D.C., Brunton, P.A., Waters, C.M., Duxbury, A.J. (2004) Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater*, 20 (1), 12-20.
342. Keiser, K., Johnson, C.C., Tipton, D.A. (2000) Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*, 26 (5), 288-291.
343. Bouillaguet, S., Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Galgano, C., Golay, A., Krejci, I. (2004) Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*, 112 (2), 182-187.
344. Klug, W.S., Cummings, M.R. (2006). Concepts of genetics (8th bs.). Upper Saddle River, NJ: Pearson Education.
345. Lee, S., Pagoria, D., Raigrodski, A., Geurtsen, W. (2007) Effects of combinations of ROS scavengers on oxidative DNA damage caused by visible-light-activated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83 (2), 391-399.
346. Lefeuvre, M., Amjaad, W., Goldberg, M., Stanislawski, L. (2005) TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 26 (25), 5130-5137.

347. Caughman, G.B., Schuster, G.S., Rueggeberg, F.A. (1999) Cell lipid alterations resulting from prolonged exposure to dimethylaminoethylmethacrylate. *Clin Oral Investig*, 3 (4), 181-187.
348. Majno, G., Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146 (1), 3-15.
349. Cummings, M.R., Klug, W. S., (2003). Oner, C. (Ed.). Genetik, Ankara: Palme Yayıncılık.
350. Quillardet, P., Hofnung, M. (1988) The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests. *Mutat Res*, 205 (1-4), 107-118.
351. Mitchell, D.F., Shankwalker, G.B., Shazer, S. (1960) Determining the tumorigenicity of dental materials. *J Dent Res*, 39, 1023-1028.
352. Schweikl, H., Schmalz, G., Federlin, M. (1998) Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig*, 2 (3), 125-129.
353. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (12), 5135-5139.
354. Ashby, J., Tennant, R.W. (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat Res*, 257 (3), 229-306.
355. Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455 (1-2), 29-60.
356. Maron, D.M., Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 113 (3-4), 173-215.
357. van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, B., Provoost, A., Verschaeve, L. (1997) The VITOTOX test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat Res*, 389 (2-3), 279-290.

- 358.Hofnung, M., Quillardet, P. (1986) Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*, 1 (5), 319-330.
- 359.Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204 (4393), 587-593.
- 360.Ames, B.N., McCann, J. (1981) Validation of the Salmonella test: a reply to Rinkus and Legator. *Cancer Res*, 41 (10), 4192-4203.
- 361.Jorgensen, K.V., Clayton, J.W., Price, R.L. (1987) Evaluation of aflatoxin B1 mutagenesis: addition of glutathione and glutathione-S-transferase to the Salmonella mutagenicity assay. *Environ Mutagen*, 9 (4), 411-419.
- 362.Shamberger, R.J., Corlett, C.L., Beaman, K.D., Kasten, B.L. (1979) Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. Part IX. Antioxidants and cancer. *Mutat Res*, 66 (4), 349-355.
- 363.Rosin, M.P., Stich, H.F. (1979) Assessment of the use of the Salmonella mutagenesis assay to determine the influence of antioxidants on carcinogen-induced mutagenesis. *Int J Cancer*, 23 (5), 722-727.
- 364.Victorin, K., Busk, L., Ahlborg, U.G. (1987) Retinol (vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test. *Mutat Res*, 179 (1), 41-48.
- 365.Levin, D.E., Ames, B.N. (1986) Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions: a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay. *Environ Mutagen*, 8 (1), 9-28.
- 366.Isono, K., Yourno, J. (1974) Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (5), 1612-1617.
- 367.Hakura, A., Suzuki, S., Satoh, T. (1999) Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat Res*, 438 (1), 29-36.

- 368.Hume, W.R., Gerzina, T.M. (1996) Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7 (2), 172-179.
369. International Organization for Standardization (1992) ISO 10993 Part 3 Biological evaluation of medical devices. Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. Geneva, Switzerland.
- 370.Cox, C.F., Subay, R.K., Suzuki, S., Suzuki, S.H., Ostro, E. (1996) Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 16 (3), 240-251.
- 371.Baratieri, L.N., Monteiro Junior, S., Correa, M., Ritter, A.V. (1996) Posterior resin composite restorations: a new technique. *Quintessence Int*, 27 (11), 733-738.
- 372.Murray, P.E., Smith, A.J. (2002) Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care*, 9 (1), 21-26.
- 373.Sideridou, I., Tserki, V., Papanastasiou, G. (2002) Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 23 (8), 1819-1829.
- 374.Ferracane, J.L., Mitchem, J.C., Condon, J.R., Todd, R. (1997) Wear and marginal breakdown of composites with various degrees of cure. *J Dent Res*, 76 (8), 1508-1516.
- 375.Floyd, C.J., Dickens, S.H. (2006) Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater*, 22 (12), 1143-1149.
- 376.Moin Jan, C., Nomura, Y., Urabe, H., Okazaki, M., Shintani, H. (2001) The relationship between leachability of polymerization initiator and degree of conversion of visible light-cured resin. *J Biomed Mater Res*, 58 (1), 42-46.
- 377.Tanaka, K., Taira, M., Shintani, H., Wakasa, K., Yamaki, M. (1991) Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil*, 18 (4), 353-362.

- 378.Schedle, A., Ivanova, M., Kenndler, E. (2003) Determination of ethoxylated bisphenol A dimethacrylate monomers in dental composites by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 990 (1-2), 231-237.
- 379.Rueggeberg, F.A., Craig, R.G. (1988) Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *J Dent Res*, 67 (6), 932-937.
- 380.Lee, S.Y., Huang, H.M., Lin, C.Y., Shih, Y.H. (1998) Leached components from dental composites in oral simulating fluids and the resultant composite strengths. *J Oral Rehabil*, 25 (8), 575-588.
- 381.Munksgaard, E.C., Peutzfeldt, A., Asmussen, E. (2000) Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. *Eur J Oral Sci*, 108 (4), 341-345.
- 382.Altintas, S.H., Usumez, A. (2009) HPLC analysis of HEMA released from two different adhesive systems. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91 (2), 924-929.
- 383.Yap, A.U., Han, V.T., Soh, M.S., Siow, K.S. (2004) Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. *Oper Dent*, 29 (4), 448-453.
- 384.Kim, J.G., Chung, C.M. (2005) Elution from light-cured dental composites: comparison of trimethacrylate and dimethacrylate as base monomers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 72 (2), 328-333.
- 385.Prica, D., Galic, N., Zeljezic, D., Prica, A. (2006) Genotoxicity evaluation of five different dentin bonding agents by chromosomal aberration analysis. *J Oral Rehabil*, 33 (6), 462-471.
- 386.Bagis, Y.H., Rueggeberg, F.A. (2000) The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dent Mater*, 16 (4), 244-247.

- 387.Nalcaci, A., Ulusoy, N., Atakol, O. (2006) Time-based elution of TEGDMA and BisGMA from resin composite cured with LED, QTH and high-intensity QTH lights. *Oper Dent*, 31 (2), 197-203.
- 388.Polydorou, O., Konig, A., Hellwig, E., Kummerer, K. (2009) Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci*, 117 (1), 68-75.
- 389.Manojlovic, D., Radisic, M., Vasiljevic, T., Zivkovic, S., Lausevic, M., Miletic, V. (2010) Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dent Mater*.
- 390.Lee, S.Y., Greener, E.H., Menis, D.L. (1995) Detection of leached moieties from dental composites in fluids simulating food and saliva. *Dent Mater*, 11 (6), 348-353.
- 391.Zhou, M., Wu, C., Edirisinghe, P.D., Drummond, J.L., Hanley, L. (2006) Organic overlayer model of a dental composite analyzed by laser desorption postionization mass spectrometry and photoemission. *J Biomed Mater Res A*, 77 (1), 1-10.
- 392.Koin, P.J., Kilislioglu, A., Zhou, M., Drummond, J.L., Hanley, L. (2008) Analysis of the degradation of a model dental composite. *J Dent Res*, 87 (7), 661-665.
- 393.Hsu, C.Y., Donly, K.J., Drake, D.R., Wefel, J.S. (1998) Effects of aged fluoride-containing restorative materials on recurrent root caries. *J Dent Res*, 77 (2), 418-425.
- 394.Hebling, J., Pashley, D.H., Tjaderhane, L., Tay, F.R. (2005) Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*, 84 (8), 741-746.
- 395.Moreira Fdo, C., Antoniosi Filho, N.R., Souza, J.B., Lopes, L.G. (2010) Sorption, solubility and residual monomers of a dental adhesive cured by different light-curing units. *Braz Dent J*, 21 (5), 432-438.

- 396.Santini, A., Miletic, V. (2008) Comparison of the hybrid layer formed by Silorane adhesive, one-step self-etch and etch and rinse systems using confocal micro-Raman spectroscopy and SEM. *J Dent*, 36 (9), 683-691.
- 397.Kopperud, H.M., Schmidt, M., Kleven, I.S. (2010) Elution of substances from a silorane-based dental composite. *Eur J Oral Sci*, 118 (1), 100-102.
- 398.Horii, Y., Kannan, K. (2008) Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Arch Environ Contam Toxicol*, 55 (4), 701-710.
- 399.Wania, F. (2006) Potential of degradable organic chemicals for absolute and relative enrichment in the Arctic. *Environ Sci Technol*, 40 (2), 569-577.
- 400.Whelan, M.J., van Egmond, R., Gore, D., Sanders, D. (2010) Dynamic multi-phase partitioning of decamethylcyclopentasiloxane (D5) in river water. *Water Res*, 44 (12), 3679-3686.
- 401.Wang, R., Moody, R.P., Koniecki, D., Zhu, J. (2009) Low molecular weight cyclic volatile methylsiloxanes in cosmetic products sold in Canada: implication for dermal exposure. *Environ Int*, 35 (6), 900-904.
- 402.Sideridou, I., Achilias, D.S., Spyroudi, C., Karabela, M. (2004) Water sorption characteristics of light-cured dental resins and composites based on Bis-EMA/PCDMA. *Biomaterials*, 25 (2), 367-376.
- 403.Palmer, G., Anstice, H.M., Pearson, G.J. (1999) The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent*, 27 (4), 303-311.
- 404.Stanislawski, L., Daniau, X., Lauti, A., Goldberg, M. (1999) Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*, 48 (3), 277-288.
- 405.Kawai, K., Takaoka, T. (2002) Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent*, 15 (3), 149-152.

- 406.Rogalewicz, R., Batko, K., Voelkel, A. (2006) Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *J Environ Monit*, 8 (7), 750-758.
- 407.Erler, C., Novak, J. (2010) Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *J Pediatr Nurs*, 25 (5), 400-407.
- 408.Lewis, J.B., Rueggeberg, F.A., Lapp, C.A., Ergle, J.W., Schuster, G.S. (1999) Identification and characterization of estrogen-like components in commercial resin-based dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 3 (3), 107-113.
- 409.Pulgar, R., Olea-Serrano, M.F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V. ve diğerleri. (2000) Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect*, 108 (1), 21-27.
- 410.Darmani, H., Al-Hiyasat, A.S., Milhem, M.M. (2007) Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int*, 38 (9), 789-795.
- 411.Schmalz, G., Preiss, A., Arenholt-Bindslev, D. (1999) Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig*, 3 (3), 114-119.
- 412.Atkinson, J.C., Diamond, F., Eichmiller, F., Selwitz, R., Jones, G. (2002) Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent Mater*, 18 (2), 128-135.
- 413.Imai, Y. (1999) Comments on "Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry". *Environ Health Perspect*, 107 (6), A290-292.
- 414.Ohsaki, A., Imai, Y. (1999) Analysis of major components contained in Bis-GMA monomer. *Dent Mater J*, 18 (4), 425-429.
- 415.Oysaed, H., Ruyter, I.E. (1986) Water sorption and filler characteristics of composites for use in posterior teeth. *J Dent Res*, 65 (11), 1315-1318.

- 416.Mjor, I.A. (1978) Biologic assessment of restorative dental materials: interrelationship of biologic and technologic properties. *Oper Dent*, 3 (1), 9-13.
- 417.Schedle, A., Franz, A., Rausch-Fan, X., Spittler, A., Lucas, T., Samorapoompichit, P. ve diğeri. (1998) Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater*, 14 (6), 429-440.
- 418.Schmalz, G., Schuster, U., Koch, A., Schweikl, H. (2002) Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod*, 28 (3), 188-192.
- 419.Abdullah, D., Ford, T.R., Papaioannou, S., Nicholson, J., McDonald, F. (2002) An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*, 23 (19), 4001-4010.
- 420.Sjogren, G., Sletten, G., Dahl, J.E. (2000) Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent*, 84 (2), 229-236.
- 421.Sletten, G.B., Dahl, J.E. (1999) Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*, 57 (6), 316-322.
- 422.Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Bouillaguet, S., Noda, M. (2003) In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater*, 19 (1), 25-31.
- 423.Reichl, F.X., Simon, S., Esters, M., Seiss, M., Kehe, K., Kleinsasser, N. ve diğeri. (2006) Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*, 80 (8), 465-472.
- 424.Sigusch, B.W., Pflaum, T., Volpel, A., Schinkel, M., Jandt, K.D. (2009) The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater*, 25 (11), 1446-1452.

- 425.Boland, E.J., MacDougall, M., Carnes, D.L., Dickens, S.H. (2006) In vitro cytotoxicity of a remineralizing resin-based calcium phosphate cement. *Dent Mater*, 22 (4), 338-345.
- 426.Vajrabhaya, L.O., Pasasuk, A., Harnirattisai, C. (2003) Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent*, 28 (4), 440-444.
- 427.Becher, R., Kopperud, H.M., Al, R.H., Samuelsen, J.T., Morisbak, E., Dahlman, H.J. ve diğerleri. (2006) Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater*, 22 (7), 630-640.
- 428.Camps, J., Tardieu, C., Dejou, J., Franquin, J.C., Ladaique, P., Rieu, R. (1997) In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent Mater*, 13 (1), 34-42.
- 429.van Wyk, C.W., Olivier, A., Maritz, J.S. (2001) Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med*, 30 (3), 168-177.
- 430.Moule, A.J., Li, H., Bartold, P.M. (1995) Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J*, 40 (2), 110-114.
- 431.Feigal, R.J., Yesilsoy, C., Messer, H.H., Nelson, J. (1985) Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol*, 30 (8), 609-613.
- 432.Hanks, C.T., Strawn, S.E., Wataha, J.C., Craig, R.G. (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 70 (11), 1450-1455.
- 433.Chen, R.S., Liu, C.C., Tseng, W.Y., Jeng, J.H., Lin, C.P. (2003) Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent*, 31 (3), 223-229.

- 434.Porto, I.C., Andrade, A.K., Guenes, G.M., Ribeiro, A.I., Braz, R., Castro, C.M. (2009) In vitro potential cytotoxicity of an adhesive system to alveolar macrophages. *Braz Dent J*, 20 (3), 195-200.
- 435.Nocca, G., De Palma, F., Minucci, A., De Sole, P., Martorana, G.E., Calla, C. ve diğerleri. (2007) Alterations of energy metabolism and glutathione levels of HL-60 cells induced by methacrylates present in composite resins. *J Dent*, 35 (3), 187-194.
- 436.Huang, F.M., Chang, Y.C. (2002) Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 94 (3), 361-365.
- 437.Franz, A., Konig, F., Anglmayer, M., Rausch-Fan, X., Gille, G., Rausch, W.D. ve diğerleri. (2003) Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater*, 19 (5), 382-392.
- 438.Brackett, M.G., Bouillaguet, S., Lockwood, P.E., Rotenberg, S., Lewis, J.B., Messer, R.L. ve diğerleri. (2007) In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 81 (2), 397-402.
- 439.Galler, K., Hiller, K.A., Ettl, T., Schmalz, G. (2005) Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod*, 31 (5), 396-399.
- 440.Ergun, G., Egilmez, F., Uctasli, M.B., Yilmaz, S. (2007) Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *Int Endod J*, 40 (3), 216-223.
- 441.Koliniotou-Koubia, E., Dionysopoulos, P., Koulaouzidou, E.A., Kortsaris, A.H., Papadogiannis, Y. (2001) In vitro cytotoxicity of six dentin bonding agents. *J Oral Rehabil*, 28 (10), 971-975.
- 442.Trubiani, O., Caputi, S., Di Iorio, D., D'Amario, M., Paludi, M., Giancola, R. ve diğerleri. (2010) The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. *Int Endod J*, 43 (8), 646-653.

- 443.Koulaouzidou, E.A., Papazisis, K.T., Yiannaki, E., Palaghias, G., Helvatjoglu-Antoniades, M. (2009) Effects of dentin bonding agents on the cell cycle of fibroblasts. *J Endod*, 35 (2), 275-279.
- 444.Gürpınar, Ö.A., Sevim, H., Onur, M.A., Dağlı, F., Çehreli, Z.C. (2009) Biocompatibility of a Fifth-Generation Adhesive System on Pulpal and Gingival Fibroblasts. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 37 (3), 189-195.
- 445.Mantellini, M.G., Botero, T., Yaman, P., Dennison, J.B., Hanks, C.T., Nor, J.E. (2006) Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater*, 22 (5), 434-440.
- 446.Kostoryz, E.L., Eick, J.D., Chappelow, C.C., Glaros, A.G., Wetmore, L., Yourtee, D.M. (2003) In vitro effect of light-cure dental adhesive on IL-6 release from LPS-stimulated and unstimulated macrophages. *J Biomed Mater Res A*, 65 (1), 89-94.
- 447.Franz, A., Konradsson, K., König, F., van Dijken, J.W., Schedle, A. (2006) Cytotoxicity of a calcium aluminate cement in comparison with other dental cements and resin-based materials. *Acta Odontol Scand*, 64 (1), 1-8.
- 448.Wisniewska-Jarosinska, M., Poplawski, T., Chojnacki, C.J., Pawlowska, E., Krupa, R., Szczepanska, J. ve diğ erleri. (2010) Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep*.
- 449.Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., Tonosaki, K., Fujisawa, S. (2004) Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. *J Oral Rehabil*, 31 (12), 1155-1164.

- 450.Li, Y.C., Huang, F.M., Lee, S.S., Lin, R.H., Chang, Y.C. (2007) Protective effects of antioxidants on micronuclei induced by camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine employing in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 82 (1), 23-28.
- 451.Noda, M., Wataha, J.C., Lewis, J.B., Kaga, M., Lockwood, P.E., Messer, R.L. ve diğerleri. (2005) Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 73 (2), 308-314.
- 452.Wataha, J.C., Rueggeberg, F.A., Lapp, C.A., Lewis, J.B., Lockwood, P.E., Ergle, J.W. ve diğerleri. (1999) In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investig*, 3 (3), 144-149.
- 453.Mjor, I.A. (1992) Problems and benefits associated with restorative materials: side-effects and long-term cost. *Adv Dent Res*, 6, 7-16.
- 454.Muller, J., Bruckner, G., Kraft, E., Horz, W. (1990) Reaction of cultured pulp cells to eight different cements based on glass ionomers. *Dent Mater*, 6 (3), 172-177.
- 455.van Dijken, J.W., Sjostrom, S. (1991) The effect of glass ionomer cement and composite resin fillings on marginal gingiva. *J Clin Periodontol*, 18 (3), 200-203.
- 456.Muller, J., Horz, W., Bruckner, G., Kraft, E. (1990) Experimental study on the biocompatibility of lining cements based on glass ionomer as compared with calcium hydroxide. *Dent Mater*, 6 (1), 35-40.
- 457.Kanchanasavita, W., Pearson, G.J., Anstice, H.M. (1995) Temperature rise in ion-leachable cements during setting reaction. *Biomaterials*, 16 (16), 1261-1265.
- 458.Xie, D., Chung, I.D., Wu, W., Mays, J. (2004) Synthesis and evaluation of HEMA-free glass-ionomer cements for dental applications. *Dent Mater*, 20 (5), 470-478.

- 459.Xie, D., Yang, Y., Zhao, J., Park, J.G., Zhang, J.T. (2007) A novel comonomer-free light-cured glass-ionomer cement for reduced cytotoxicity and enhanced mechanical strength. *Dent Mater*, 23 (8), 994-1003.
- 460.Sidhu, S.K., Schmalz, G. (2001) The biocompatibility of glass-ionomer cement materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*, 14 (6), 387-396.
- 461.Schmid-Schwap, M., Franz, A., Konig, F., Bristela, M., Lucas, T., Piehslinger, E. ve diğ erleri. (2009) Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater*, 25 (3), 360-368.
- 462.Chang, Y.C., Chou, M.Y. (2001) Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91 (2), 230-234.
- 463.Khalil, A.M., Da'dara, A.A. (1994) The genotoxic and cytotoxic activities of inorganic fluoride in cultured rat bone marrow cells. *Arch Environ Contam Toxicol*, 26 (1), 60-63.
- 464.Fischman, S.A., Tinanoff, N. (1994) The effect of acid and fluoride release on the antimicrobial properties of four glass ionomer cements. *Pediatr Dent*, 16 (5), 368-370.
- 465.Kan, K.C., Messer, L.B., Messer, H.H. (1997) Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res*, 76 (8), 1502-1507.
- 466.Lonnroth, E.C., Dahl, J.E. (2001) Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand*, 59 (1), 34-39.
- 467.Andersson, O.H., Dahl, J.E. (1994) Aluminium release from glass ionomer cements during early water exposure in vitro. *Biomaterials*, 15 (11), 882-888.
- 468.Smith, D.C., Ruse, N.D. (1986) Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. *J Am Dent Assoc*, 112 (5), 654-657.

- 469.Czarnecka, B., Limanowska-Shaw, H., Hatton, R., Nicholson, J.W. (2007) Ion release by endodontic grade glass-ionomer cement. *J Mater Sci Mater Med*, 18 (4), 649-652.
- 470.Pollard, J.W., Walker, J.M. (1997). Basic cell culture protocols (2nd bs.). Totowa, N.J.: Humana Press.
- 471.de Souza Costa, C.A., Hebling, J., Garcia-Godoy, F., Hanks, C.T. (2003) In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, 24 (21), 3853-3858.
- 472.Souza, P.P., Aranha, A.M., Hebling, J., Giro, E.M., Costa, C.A. (2006) In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*, 22 (9), 838-844.
- 473.Leyhausen, G., Abtahi, M., Karbakhsch, M., Sapotnick, A., Geurtsen, W. (1998) Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials*, 19 (6), 559-564.
- 474.Lan, W.H., Lan, W.C., Wang, T.M., Lee, Y.L., Tseng, W.Y., Lin, C.P. ve diğerleri. (2003) Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent*, 28 (3), 251-259.
- 475.Soyсал, Z. (2009). Bazı benzoksanol türevi bileşiklerin Ames test sistemi ile mutajenik potansiyellerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- 476.Suarez, S., Sueiro, R.A., Garrido, J. (2000) Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutat Res*, 470 (2), 221-228.
- 477.Poplawski, T., Pawlowska, E., Wisniewska-Jarosinska, M., Ksiazek, D., Wozniak, K., Szczepanska, J. ve diğerleri. (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. *Chem Biol Interact*, 180 (1), 69-78.
- 478.Hansen, B.K. (1999) Gyldendals Grønne Forbrugerleksikon. (The Green Consumer's Encyclopedia) Glydendal, Copenhagen.

- 479.Di Pietro, A., Visalli, G., La Maestra, S., Micale, R., Baluce, B., Matarese, G. ve diğçerleri. (2008) Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat Res*, 650 (2), 115-122.
- 480.Schweikl, H., Schmalz, G., Weinmann, W. (2002) Mutagenic activity of structurally related oxiranes and siloranes in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, 521 (1-2), 19-27.
- 481.Ilie, N., Hickel, R. (2006) Silorane-based dental composite: behavior and abilities. *Dent Mater J*, 25 (3), 445-454.
- 482.Ribeiro, D.A., Marques, M.E., Salvadori, D.M. (2006) Biocompatibility of glass-ionomer cements using mouse lymphoma cells in vitro. *J Oral Rehabil*, 33 (12), 912-917.
- 483.Ribeiro, D.A., Marques, M.E., Salvadori, D.M. (2006) Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Mater Sci Mater Med*, 17 (6), 495-500.
- 484.Mjor, I.A., Ferrari, M. (2002) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int*, 33 (1), 35-63.
- 485.Stanley, H.R. (1985). Toxicity testing of dental materials. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- 486.Horsted, P.B., Simonsen, A.M., Larsen, M.J. (1986) Monkey pulp reactions to restorative materials. *Scand J Dent Res*, 94 (2), 154-163.
- 487.Qvist, V., Stoltze, K., Qvist, J. (1989) Human pulp reactions to resin restorations performed with different acid-etch restorative procedures. *Acta Odontol Scand*, 47 (5), 253-263.
- 488.Fuks, A.B., Funnell, B., Cleaton-Jones, P. (1990) Pulp response to a composite resin inserted in deep cavities with and without a surface seal. *J Prosthet Dent*, 63 (2), 129-134.

- 489.Grieve, A.R., Alani, A., Saunders, W.P. (1991) The effects on the dental pulp of a composite resin and two dentine bonding agents and associated bacterial microleakage. *Int Endod J*, 24 (3), 108-118.
- 490.Inokoshi, S., Shimada, Y., Fujitani, M., Otsuki, M., Shono, T., Onoe, N. ve diğ erleri. (1995) Monkey pulpal response to adhesively luted indirect resin composite inlays. *Oper Dent*, 20 (3), 111-118.
- 491.Meryon, S., Jakeman, J. (1987) Aluminium and dental materials--a study in vitro of its potential release and toxicity. *Int Endod J*, 20 (1), 16-19.
- 492.Wiegand, A., Caspar, C., Becker, K., Werner, C., Attin, T. (2006) In vitro cytotoxicity of different self-etching dental adhesive systems. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 116 (6), 614-621.
- 493.Wennberg, A., Mjor, I.A., Hensten-Pettersen, A. (1983) Biological evaluation of dental restorative materials--a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res*, 17 (1), 23-36.
- 494.de Souza Costa, C.A., Teixeira, H.M., Lopes do Nascimento, A.B., Hebling, J. (2007) Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 81 (1), 175-184.
- 495.Nayyar, S., Tewari, S., Arora, B. (2007) Comparison of human pulp response to total-etch and self-etch bonding agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104 (2), e45-52.
- 496.Torstenson, B. (1995) Pulpal reaction to a dental adhesive in deep human cavities. *Endod Dent Traumatol*, 11 (4), 172-176.
- 497.Hebling, J., Giro, E.M., Costa, C.A. (1999) Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent*, 27 (8), 557-564.
- 498.Koliniotou-Koumpia, E., Tziafas, D. (2005) Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent*, 33 (8), 639-647.

- 499.Murray, P.E., Hafez, A.A., Smith, A.J., Cox, C.F. (2003) Identification of hierarchical factors to guide clinical decision making for successful long-term pulp capping. *Quintessence Int*, 34 (1), 61-70.
- 500.Cox, C.F., Hafez, A.A., Akimoto, N., Otsuki, M., Suzuki, S., Tarim, B. (1998) Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent*, 11 Spec No, S55-63.
- 501.Inoue, T., Miyakoshi, S., Shimono, M. (2001) The in vitro and in vivo influence of 4-META/MMA-TBB resin components on dental pulp tissues. *Adv Dent Res*, 15, 101-104.
- 502.Pameijer, C.H., Stanley, H.R. (1998) The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent*, 11 Spec No, S45-54.
- 503.Hebling, J., Giro, E.M., Costa, C.A. (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*, 25 (10), 676-682.
- 504.de Souza Costa, C.A., Lopes do Nascimento, A.B., Teixeira, H.M., Fontana, U.F. (2001) Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater*, 17 (3), 230-240.
- 505.Hashimoto, M., Ohno, H., Kaga, M., Endo, K., Sano, H., Oguchi, H. (2000) In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*, 79 (6), 1385-1391.
- 506.Decup, F., Six, N., Palmier, B., Buch, D., Lasfargues, J.J., Salih, E. ve diğerleri. (2000) Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig*, 4 (2), 110-119.
- 507.Bergenholtz, G. (2000) Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11 (4), 467-480.

- 508.Brannstrom, M., Nyborg, H. (1973) Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution: growth of bacteria and effect on the pulp. *J Prosthet Dent*, 30 (3), 303-310.
- 509.Akimoto, N., Momoi, Y., Kohno, A., Suzuki, S., Otsuki, M., Cox, C.F. (1998) Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int*, 29 (3), 177-188.
- 510.Ersin, N.K., Eronat, N. (2005) The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. *Quintessence Int*, 36 (4), 271-280.
- 511.Wijnbergen, M., van Mullem, P.J. (1991) The cumulative effect of disinfection, storage, histological fixation and demineralization on number and staining ability of gram-positive bacteria. *Int Endod J*, 24 (5), 243-248.
- 512.Brannstrom, M., Noredenvall, K.J. (1977) The effect of acid etching on enamel, dentin, and the inner surface of the resin restoration: a scanning electron microscopic investigation. *J Dent Res*, 56 (8), 917-923.
- 513.Murray, P.E., Windsor, L.J., Smyth, T.W., Hafez, A.A., Cox, C.F. (2002) Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13 (6), 509-520.
- 514.Macko, D.J., Rutberg, M., Langeland, K. (1978) Pulpal response to the application of phosphoric acid to dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 45 (6), 930-946.
- 515.Murray, P.E., Smith, A.J., Garcia-Godoy, F., Lumley, P.J. (2008) Comparison of operative procedure variables on pulpal viability in an ex vivo model. *Int Endod J*, 41 (5), 389-400.
- 516.Wisithphrom, K., Murray, P.E., About, I., Windsor, L.J. (2006) Interactions between cavity preparation and restoration events and their effects on pulp vitality. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 26 (6), 596-605.

- 517.Ratih, D.N., Palamara, J.E., Messer, H.H. (2007) Temperature change, dentinal fluid flow and cuspal displacement during resin composite restoration. *J Oral Rehabil*, 34 (9), 693-701.
- 518.Santini, A., Watterson, C., Miletic, V. (2008) Temperature rise within the pulp chamber during composite resin polymerisation using three different light sources. *Open Dent J*, 2, 137-141.
- 519.Swift, M.L., Byers, M.R. (1992) Effect of ageing on responses of nerve fibres to pulpal inflammation in rat molars analysed by quantitative immunocytochemistry. *Arch Oral Biol*, 37 (11), 901-912.
- 520.Romagnoli, P., Mancini, G., Galeotti, F., Francini, E., Pierleoni, P. (1990) The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption. *J Dent Res*, 69 (12), 1857-1862.
- 521.Morse, D.R. (1991) Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 72 (6), 721-745.
- 522.Moxham, B.J., Webb, P.P., Benjamin, M., Ralphs, J.R. (1998) Changes in the cytoskeleton of cells within the periodontal ligament and dental pulp of the rat first molar tooth during ageing. *Eur J Oral Sci*, 106 Suppl 1, 376-383.
- 523.Murray, P.E., Smith, A.J., Windsor, L.J., Mjor, I.A. (2003) Remaining dentine thickness and human pulp responses. *Int Endod J*, 36 (1), 33-43.
- 524.Kitasako, Y., Inokoshi, S., Tagami, J. (1999) Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent*, 27 (4), 257-263.
- 525.Miletic, V., Ivanovic, V., Dzeletovic, B., Lezaja, M. (2009) Temperature changes in silorane-, ormocer-, and dimethacrylate-based composites and pulp chamber roof during light-curing. *J Esthet Restor Dent*, 21 (2), 122-131.
- 526.Six, N., Lasfargues, J.J., Goldberg, M. (2000) In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *J Dent*, 28 (6), 413-422.

- 527.Cooper, I.R. (1980) The response of the human dental pulp to glass ionomer cements. *Int Endod J*, 13 (2), 76-88.
- 528.Schmalz, G., Thonemann, B., Riedel, M., Elderton, R.J. (1994) Biological and clinical investigations of a glass ionomer base material. *Dent Mater*, 10 (5), 304-313.
- 529.Paterson, R.C., Watts, A. (1981) The response of the rat molar pulp to a glass ionomer cement. *Br Dent J*, 151 (7), 228-230.
- 530.Murray, P.E., About, I., Franquin, J.C., Remusat, M., Smith, A.J. (2001) Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc*, 132 (4), 482-491.
- 531.Mickenautsch, S., Yengopal, V., Banerjee, A. (2010) Pulp response to resin-modified glass ionomer and calcium hydroxide cements in deep cavities: A quantitative systematic review. *Dent Mater*, 26 (8), 761-770.
- 532.Jontell, M., Hanks, C.T., Bratel, J., Bergenholtz, G. (1995) Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res*, 74 (5), 1162-1167.
- 533.Cavalcanti, B.N., Rode, S.M., Marques, M.M. (2005) Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*, 38 (8), 505-509.

EK 1



T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/ 1780
Konu :

08 Ağustos 2008

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 03 TEMMUZ 2008 PERŞEMBE günü
Toplantı No : 2008/8
Proje No : HEK 08/136(Değerlendirme Tarihi: 03.07.2008)
Karar No : HEK 08/136- 26

Üniversitemiz Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Arlin Kiremitçi'nin sorumlu araştırmacısı olduğu, Dt. Tuğba Alpaslan ile birlikte çalışacakları HEK 08/136 kayıt numaralı ve "*Güncel Adeziv Reztoratif Materyallerin Dentin ve Pulpa Dokusu Üzerindeki Etkilerinin İn Vivo Koşullarda İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, Tıbbi Etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur (Başkan)
2. Prof.Dr. Murat Yurdakök (Üye)
3. Prof.Dr. Osman Abbasoğlu (Üye)
4. Prof.Dr. Mithat Haliloğlu (Üye)
5. Prof.Dr. Türkan Eldem (Üye) KATILMADI
6. Prof.Dr. Pınar Fırat (Üye) KATILMADI
7. Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye)
8. Prof.Dr. Asuman Özkara (Üye)
9. Prof.Dr. Tanju Besler (Üye)
10. Prof.Dr. Haydar A. Demirel (Üye)
11. Prof.Dr. Bülent Sivri (Üye)
12. Doç.Dr. Bilgehan Yalçın (Üye)
13. Doç.Dr. Ümit Yaşar (Üye) KATILMADI
14. Doç.Dr. Zafer Çehreli (Üye) KATILMADI
15. Doç.Dr. Mutlu Hayran (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu 60100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: (0312) 305 10 82 Faks: (0312) 310 05 80 E-posta: hums@hacettepe.edu.tr

EK 2

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ, CERRAHİ ve İLAÇ
ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KLİNİK TAKİP AMAÇLI BİR ÇALIŞMA İÇİN
AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU**

Hekimin Açıklaması

Restoratif diş hekimliğinde amaç, doğru tanı ve eksiksiz bir tedavi sonucunda doğal diş görünümünün ve fonksiyonunun yeniden kazandırılmasıdır. Bu amaçla estetik restoratif materyaller geliştirilmiştir. Araştırmacılar restoratif materyallerin fiziksel, mekanik, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin geliştirilmesi için çalışırken bu restoratif materyallerin diş sert dokularına adezyonla bağlanmasına ağırlık vermişlerdir. Günümüzde diş renginde restorasyonlara olan talep giderek artmaktadır. Bu talebin nedeni estetik gereksinimler, amalgamın olası toksik etkisi ve adeziv sistemlerin daha konservatif preparasyona izin vererek diş dokusunun mümkün olduğunca korunmasına olanak vermesidir. Araştırmacıların materyal özelliklerini geliştirebilmek için yaptıkları çalışmalar sonucunda; çok sayıda ürün, kullanıma sunulmaktadır. Herhangi bir dental materyalin geliştirilmesinde bu materyalin biyoyumluluğu estetik, dayanıklılık, klinik uygulama gibi özellikleri ile birlikte değerlendirilmelidir. Dental materyallerin sitotoksikite ve biyoyumluluk dereceleri diş hekimlerinin en önemli amacı olan pulpal canlılığın devam ettirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle diş hekimliğinde kullanılan materyallerin, dentin ve pulpa hücrelerine olası toksik etkileri, restoratif materyallerin biyoyumluluk çalışmalarının önemini arttırmaktadır.

Bu in vivo çalışmada; kliniğimizde rutin olarak uygulanan ve dünya genelinde tanınan önde gelen dental firmaların ürünleri olan güncel adeziv restoratif materyallerin [Silorane (3M ESPE), XP Bond (Dentsply), Quixfill (Dentsply), Fuji 9 Equia (GC Dental), N-100 (3M ESPE)] pulpa üzerindeki etkileri

ortodontik amaçla çekimi planlanan insan dişlerinde histopatolojik olarak incelenecektir (Doç. Dr. Alp Usubütün).

Araştırmanın ismi “Güncel adeziv restoratif materyallerin dentin ve pulpa dokusu üzerindeki etkilerinin in vivo koşullarda incelenmesi” dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni ağzınızda ortodontik amaçla çekimi planlanan çürüksüz premolar (küçükazı) dişlerinizin bulunmasıdır. Hacettepe Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı’nda yapılan klinik muayeneler sonucunda yordarlığı nedeniyle çekim endikasyonu konulmuş olan dişinizin hemen değil, uygun dolgu materyali ile tedavi edilmesinden sonra çekilmesi istenmektedir. Çekimine karar verilmiş küçük azı dişlerinizde kaviteler (dişlerin ön yüzlerinde 2mm derinliğinde, (servikookluzal olarak) 1.5 mm yüksekliğinde ve (meziodistal olarak) 3 mm genişliğinde (dikdörtgen şeklinde) açılan oyuk veya boşluk) hazırlanacaktır. Açılan bu boşluklara farklı dolgu materyalleri uygulanacak ve 7 veya 30 gün sonra dişinizin çekimini takiben histopatolojik olarak incelenecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz araştırma görevlisi Tuğba Alpaslan tarafından diş dolgularınız yapılacak ve kaydedilecektir. Yine izniniz doğrultusunda çekim endikasyonu olan dişiniz Tuğba Alpaslan gözetiminde çekilecek ve histolojik incelemelerin yapılabilmesi için alınacaktır. Sonuçlar kimliğiniz belirtilmeden diş hekimliği öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmek için dolgular yapıldıktan 1 hafta veya 1 ay sonra belirlenen sürelerde gelmesi gerekmektedir. Bu çalışmaya katılmanız için

sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Kaviteletin oluşturulması sırasında oluşabilecek riskler:

Dişlerinizin preparasyonu sırasında geçici hassasiyet oluşabilir. Bu nedenle isteğinize bağlı olarak ve gerekli durumlarda preparasyonlar lokal anestezi altında uygulanacaktır.

Dolguların yapılması sırasında oluşabilecek riskler:

Bu işlemler esnasında oluşabilecek herhangi bir risk bulunmamakla birlikte dolgularınız yapıldıktan sonraki dönemde az da olsa dişlerinizde geçici hassasiyet oluşabilir.

Bu durumla karşılaştığınızda çalışmanın herhangi bir zamanında size verilen telefon numaralarından bize ulaşırsanız yardım almanız sağlanacaktır.

Şu anda sizin katılımınızla yapılan çalışmadan elde edilen bilgiler, diş hekimliği pratiğinde kullanılan restoratif materyallerin pulpaya etkisi konusunda bizlere ışık tutacak, hergün piyasaya sürülen birçok materyalle karşı karşıya kalan hekimlerin kullanacakları güncel adeziv materyalleri seçebilmeleri için bir kaynak oluşturulacaktır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın, Doç. Dr. Arlin Kiremitçi, Dt. Tuğba Alpaslan tarafından Hacettepe Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında dolgularım ile ilgili bir problemle karşılaştığımda; Doç. Dr. Arlin Kiremitçi'yi, Dt. Tuğba Alpaslan'ı, Hacettepe Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda bulabileceğimi ve 305 22 70, 305 23 36 numaralı telefonlardan arayabileceğimi ve herhangi bir şikayetimin olduğunda 24 saat 05056163689 numaralı cep telefonundan Dt. Tuğba Alpaslan'ı arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

ÖZGEÇMİŞ

İLETİŞİM VE KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı: Tuğba Toz

Uyruğu:T.C.

Doğum Tarihi: 02.07.1980

Doğum Yeri: Muğla

EĞİTİM:

2005- Bugün : Doktora	Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı
2008-2010 : Önlisans	Gazi Üniversitesi Uzaktan Eğitim Meslek Yüksek Okulu Bilgisayar Programcılığı Bölümü
1998-2003: Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
1997-1998:	Muğla Turgut Reis Lisesi
1995-1997:	Bursa Ali Osman Sönmez Fen Lisesi
1992-1995:	Akhisar Anadolu Lisesi
1987-1992 :	Soma Madenciler İlkokulu

ÇALIŞMA ALANLARI:

- Bleaching (Ağartma Tedavileri)
- Dental Materyaller
- Restoratif Dişhekimliğinde Lazerler
- Dental materyallerin biyouyumlulukları

KURSLAR:

- “SPSS ile İstatistiksel Analizler Eğitimi” SPSS Türkiye, 09-11 Haziran 2009, Ankara

KONGRELER:

- 1) Gürgen S, Kiremitçi A, Yalçın F, **Toz T**, Fırat E. “Effect of Carbamide Peroxide on Metal-Ion Release of Amalgams.” IADR PEF (Pan European Federation) 13-16 Eylül 2006 Dublin İrlanda (poster sunumu)
- 2) **Toz T**, Kiremitçi A, Gökalp S. “Effect of Resin Surface Sealent on Stain Resistance of Composites.” IADR PEF (Pan European Federation) 13-16 Eylül 2006 Dublin, İrlanda (poster sunumu)
- 3) Kiremitçi A, Yalçın F, **Toz T**, Fırat E, Gürgen S. “Fracture Resistance of Composite Restorations Placed with Contact Forming Instrument.” IADR PEF (Pan European Federation) 13-16 Eylül 2006 Dublin, İrlanda (poster sunumu)
- 4) Kiremitçi A, **Alpaslan T**, Gurgan S.”Six-Year Clinical Evaluation of Packable Composite Restorations” 85th General Session & Exhibition of The IADR 21-24 Mart 2007 New Orleans, USA (poster sunumu)
- 5) Gurgan S, Kiremitci A, Gorucu J, Yalcin F, **Alpaslan T**, Gutknecht N. “Shear Bond Strength of composite Bonded to Er:YAG Laser Prepared Dentin” 85th General Session & Exhibition of the IADR 21-24 Mart 2007 New Orleans, USA (poster sunumu)
- 6) Gurgan S, Kiremitci A, Gorucu J, Yalcin F, **Alpaslan T**, Yazici E, Gutknecht N. “Shear Bond Strendht of Composite Bonded To Er-YAG Laser Laser Prepared Dentin.” World Federation For Laser Dentistry . European Division 27-28 Nisan 2007 Nice, Fransa (sözlü sunum)
- 7) Gürgen S, Kiremitçi A, Görücü J, Yalçın Çakır F, **Alpaslan T** “ Er,Cr:YSGG Lazerle Prepare Edilmiş Dentine Kompozitin Bağlanma Dayanıklılığı “ 1.

Türk Dişhekimliğinde Lazer Derneği Kongresi 15-19 Ekim 2007 Antalya, Türkiye (sözlü sunum)

- 8) **Alpaslan T**, Gürkan S, Kiremitçi A, Yalçın Çakır F, Yazıcı E “Shear Bond Strength of Nano Composite to Bleached Enamel” Pan European Federation of the International Association for Dental Research (PEF/IADR) 10-12 Eylül 2008 Londra, İngiltere (sözlü sunum)
- 9) Kiremitçi A, **Alpaslan T** “Effect of Dental Unit Waterline Treatment on Bond Strength of Adhesives” Academy Of Dental Materials Annual Meeting 2-4 Ekim 2008 Würzburg, Almanya (poster sunumu)
- 10) Kiremitçi A, Gürkan S, **Toz T**, Yazıcı E “Effect of Er, Cr:YSGG Laser on Shear Bond Strenght of a Glass Ionomer Restorative and a Resin Composite” WFLD ED 14-17 Mayıs 2009 İstanbul, Türkiye (sözlü sunum)
- 11) **Toz T**, Soysal Z, Kiremitçi A, Diril N “ Self-adeziv Yapıştırıcı Simanların Mutajenik Potansiyellerinin Salmonella/Mikrozom Testi ile Değerlendirilmesi” 13. Ege Bölgesi Dişhekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi 30 Nisan-2 Mayıs 2010 Antalya, Türkiye (poster sunumu)

YAYINLAR:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- 1) Gurgan S, Kiremitçi A, Yalcin F, **Alpaslan T**, Yazıcı E, “Effect Of Carbamide Peroxide Treatments On The Metal-Ion Release And Microstructure Of Different Dental Amalgams.” Operative Dentistry, 2007,32-5,476-481.
- 2) Gurgan S, Kiremitçi A, Görücü J, Çakır F, **Alpaslan T**, Gutknecht N, Yazıcı E. “Shear bond strength of composite bonded to Er,Cr:YSGG laser prepared dentin” Photomed Laser Surg. 2008 Oct;26(5):495-500.
- 3) Kiremitçi A, Gurgan S, **Alpaslan T** “Six year clinical evaluation of packable composite restorations” Oper Dent. 2009 Jan-Feb;34(1):11-7.

- 4) Gurgan S, **Alpaslan T**, Kiremitci A, Cakir FY, Yazici E, Gorucu J. Effect of different adhesive systems and laser treatment on the shear bond strength of bleached enamel. J Dent. 2009 Jul;37(7):527-34. Epub 2009 Apr 28.

Uluslararası dergilerde yayımlanan makaleler :

- 1) **Alpaslan T**. “ Shear Bond Strength of Bleached Enamel Tested Under Various Conditions” Apex August 09 Digital edition page:12-14, 2009

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

- 1) Gürkan S, Kiremitçi A, Yalçın F, **Toz T**, Fırat E. “Effect Of Carbamide Peroxide On Metal-Ion Release Of Amalgams.” Journal of Dental Research, volume 85 (Special Issue C), Abstr No. 0286,2006.
- 2) **Toz T**, Kiremitçi A, Gökalp S. “Effect Of Resin Surface Sealent On Stain Resistance Of Composites.” Journal of Dental Research, volume 85 (Special Issue C), Abstr No. 0321,2006.
- 3) Kiremitçi A, Yalçın F, **Toz T**, Fırat E, Gürkan S. “Fracture Resistance of Composite Restorations Placed with Contact Forming Instrument” Journal of Dental Research, volume 85 (Special Issue C), Abstr No. 0331,2006.
- 4) Kiremitçi A, **Alpaslan T**, Gurgan S.”Six-Year Clinical Evaluation Of Packable Composite Restorations” Journal of Dental Research, volume 86 (Special Issue A), Abstr No. 1578,2007.
- 5) Gurgan S, Kiremitci A, Gorucu J, Yalcin F, **Alpaslan T**, Gutknecht N. “Shear Bond Strength Of composite Bonded To Ercrysgg Laser Prepared Dentin”

Journal of Dental Research, volume 86 (Special Issue A), Abstr No. 0576, 2007.

- 6) Gurgan S, Kiremitci A, Gorucu J, Yalcin F, **Alpaslan T**, Yazici E, Gutknecht N. "Shear Bond Strength Of Composite Bonded To Er-YAG Laser Laser Prepared Dentin." Journal of Dental Research, volume 86 (Special Issue B), Abstr No. 1985, 2007.
- 7) **Alpaslan T**, Gurgan S, Kiremitçi A, Yalçın Çakır F, Yazıcı E "Shear bond strength of nano composite to bleached enamel" Journal of Dental Research, volume 87 (Special Issue C), Abstr No. 0565, 2008.
- 8) Kiremitci A, **Toz T**, Gökalp S, Yenen Z, "Effect of Oxalate Desensitiser on Longterm Bond Strength to Dentin" Journal of Dental Research, volume 88 (Special Issue B), Abstr No. 0135, 2008.

ÖDÜLLER:

- 1) Kiremitçi A, Gurgan S, **Toz T**, Yazıcı E "Effect of Er, Cr:YSGG Laser on Shear Bond Strenght of a Glass Ionomer Restorative and a Resin Composite" WFLD ED 14-17 Mayıs 2009 İstanbul Türkiye "**en iyi sözlü sunum ödülü**"