

**ÇOCUKLARDA KULLANILAN REZİN İÇERİKLİ
RESTORATİF MATERYALLERİN İNSAN FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU SİTOTOKSİK ETKİ
VE OKSİDATİF STRES SEVİYESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Tefik DEMİRCİ

Pedodonti Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Taşkın GÜRBÜZ

Doktora Tezi - 2013

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

**ÇOCUKLARDA KULLANILAN REZİN İÇERİKLİ
RESTORATİF MATERYALLERİN İNSAN FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU SİTOTOKSİK ETKİ
VE OKSİDATİF STRES SEVİYESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Tefik DEMİRCİ

**Pedodonti Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Taşkın GÜRBÜZ**

**ERZURUM
2013**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLARDA KULLANILAN REZİN İÇERİKLİ
RESTORATİF MATERYALLERİN İNSAN FİBROBLAST
HÜCRELERİNDE OLUŞTURDUĞU SİTOTOKSİK ETKİ
VE OKSİDATİF STRES SEVİYESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Tefik DEMİRCİ

Tez Savunma Tarihi : 27.05.2013
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Taşkın GÜRBÜZ (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nilgün SEVEN (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel YILMAZ (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ceyhan ALTUN (GATA)
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sera DERELİOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diş dokuları.....	4
2.2. Pulpa Dentin Kompleksi.....	4
2.2.1. Dentin Tipleri.....	5
2.2.1.1. Dentin Tübülleri.....	6
2.2.1.2. Peritübüler dentin.....	7
2.2.1.3. İntertübüler dentin.....	8
2.2.1.4. İnterglobüler dentin.....	8
2.2.2. Dentin dokusunun geçirgenliği.....	8
2.2.3. Pulpa Hücreleri	9
2.2.4. Dentin Pulpa Kompleksindeki Büyüme Faktörleri.....	11
2.3. Materyallerin Biyolojik Özellikleri ve Biyouyumluluk.....	13
2.3.1. Sitotoksosite.....	15
2.3.1.1. Sitotoksosite testleri.....	16
2.3.2. Dental Materyaller İçin Biyolojik Uyum Testleri.....	17
2.3.2.1. Başlangıç Testleri	17
2.3.2.2. İn vitro Sitotoksosite Test Yöntemleri.....	17

2.3.2.3. İkincil Testler	21
2.3.2.4. Kullanım Testleri	22
2.4. Hücre Kültürü	23
2.4.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları.....	24
2.4.2. Hücre Kültürü Teknikleri.....	25
2.4.2.1. Primer Hücre Kültürleri	25
2.4.2.2. Diploid Hücre Kültürleri.....	26
2.4.2.3. Devamlı Hücre Kültürleri	26
2.5. Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	27
2.5.1. Oksidatif Stres.....	30
2.5.1.1. Serbest Radikaller	31
2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	31
2.5.2.1. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK).....	32
2.5.2.2. Total Oksidan Durumu (TOD)	33
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Örneklerin Hazırlanması.....	35
3.2. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	36
3.3. Well Platelerin Hazırlanması	38
3.4. MTT Testi.....	41
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	42
3.5.1. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK).....	42
3.5.2. Toplam Oksidan Durum (TOD).....	43
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. MTT Testi Bulguları.....	45
4.2. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) Bulguları.....	51

4.3. Toplam oksidan Durumu (TOD) Bulguları	56
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	79
EKLER	105
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	105
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	106

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Taşkın GÜRBÜZ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimimde büyük emeği geçen, klinik tecrübelerinden çokça istifade ettiğim, Pedodonti A.D. başkanı, hocam Sayın Prof. Dr. Yücel YILMAZ'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), tezimin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Abdulgani TATAR'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi, Erzurum) ve Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), tezimin istatistik kısmındaki desteklerinden ötürü Sayın Doç. Dr. Hamit ACEMOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), Sayın Prof. Dr. Yusuf Ziya BAYINDIR (Atatürk Üniversitesi, Erzurum) ve Sayın Prof. Dr. Funda BAYINDIR'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), doktora eğitimimin her aşamasında bana destek veren Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih ŞENGÜL'e (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), Sayın Yrd. Doç. Dr. Sera DERELİOĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), **2011/34 BAP** proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, Pedodonti Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve sağlık personeline, desteklerini her zaman hissettiğim ve bundan sonra da hep hissedeceğim canımdan çok sevdiğim aileme ve eşime teşekkür ederim.

Dt. Tefvik DEMİRCİ

ÖZET

Çocuklarda Kullanılan Rezin İçerikli Restoratif Materyallerin İnsan Fibroblast Hücrelerinde Oluşturduğu Sitotoksik Etki ve Oksidatif Stres Seviyesinin Değerlendirilmesi

Amaç. Diş hekimliği uygulamalarının çeşitli alanlarında önleyici, koruyucu, restoratif ve endodontik amaçlar başta olmak üzere farklı amaçlarla çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Kullanılan materyallerin çoğu, dokularla doğrudan veya dolaylı olarak temas halinde olduğu için, bu materyallerin biyouyumlu olması gerekmektedir. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin mekanik özellikleri ile ilişkili oldukça fazla literatür bilgisi bulunduğu halde, çocuk diş hekimliğinde çeşitli amaçlarla kullanılan materyallerin sitotoksik özellikleri ile ilgili olarak ulaşılabilen veriler yeterli değildir. Bu nedenle çalışmamızda çocukların dental tedavilerinde kullanılan yedi farklı restoratif materyalin (Clearfil Majesty Esthetic[®], Filtek[™] Silorane[®], Fuji II LC[®], Grandio Flow[®], Admira[®], Glasiosite[®], Twinky Star[®]) insan fibroblast hücreleri üzerinde zamanla meydana getirdikleri sitotoksik etkileri, in vitro olarak direk temas yöntemiyle ve MTT testi, TAK ve TOD değerleri incelenerek ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot. Çalışmamızda insan amniyon hücresinden alınan fibroblastlar kullanıldı. Hücreler 48 gözlü plakelere aktarılarak 8 mm çapında 2 mm yüksekliğinde hazırlanan materyaller yerleştirildi. 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda; MTT testi ile hücre canlılığına bakıldı ve TAK ve TOD değerleri ölçüldü (n=6).

Bulgular. MTT Testi sonuçlarına göre kullanılan materyallerin 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. TAK ve TOD değerlerine göre 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda bütün materyaller toksik bulunmuştur.

Sonuç. Elde edilen MTT, TAK ve TOD değerleri ne göre bütün materyallerin sitotoksik etkisinin bulunduğunu desteklemiştir. En sitotoksik materyal olarak Fuji II LC tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler. Hücre Kültürü, MTT, Oksidatif Stres, Rezin Monomerler, Sitotoksisite

ABSTRACT

Evaluation of the Oxidative Stress Level and Cytotoxic Effect Caused by Resin Containing Restorative Materials Used for Children on Human Fibroblast Cells

Aim. Several materials have been used in dental practice for different indications including; interceptive, preventive, restorative and endodontic treatments. Most of these materials are in, direct or indirect contact with tissues. Therefore these materials must be biocompatible. There is a number of literature concerning with mechanical properties of these materials whereas the data available about the cytotoxic properties of these materials is insufficient. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic effects of 7 different materials (Clearfil Majesty Esthetic[®], Filtek[™] Silorane[®], Fuji II LC[®], Grandio Flow[®], Admira[®], Glasiosite[®], Twinky Star[®]) used for dental treatments of children via MTT, TAS and TOS parameters.

Material and Method. The cells used in this study are derived from human amniotic fluid. The cells were transferred to 48-well plates. The samples in 2 mm height and 8 mm diameter were placed into each of the wells. The vitality rate of the cells evaluated at the end of 24 hours, 72 hours and 7 days by means of MTT. TAS and TOS levels were recorded (n=6).

Results. According to MTT findings the decrease of the number of the cells was statistically significant. According to TAS and TOS levels all the materials used found to be cytotoxic after 24 hours 72 hours and 7 days.

Conclusion. All of the materials used in this study showed cytotoxic effects on human fibroblast cells. Fuji II LC[®] was found to be the most toxic material.

Key Words. Cell Culture, Cytotoxicity, MTT, Oxidative Stress, Resin Monomers

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bis-GMA	: Bisfenol Glisidil Metakrilat
BF	: Büyüme Faktörü
BHT	:Butil Hidroksi Toluen
BMP	: Kemik Morfojenetik Proteini
Ca	: Kalsiyum
CİS	: Cam İyonomer Siman
CO₂	: Karbondioksit
Cr	: Krom
DEGDMA	:Dietilenglikol Dimetakrilat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPICl	: Difeniliyodinyumklotid
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EGDMA	:Etilenglikol Dimetakrilat
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EquiV./L	: Equivalent/ Litre
FBS	: Fetal Sığır Serumu
GDMA	: Gilikol Dimetakrilat
GMA	:Glisidil Metakrilat
GSH	:Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorür

HEMA	: Hidroksi Etil Metakrilat
H-TDR	: H- thymidine
Ig	: İmmünoglobulin
ISO	: Uluslararası Standart Organizasyonu
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LED	: Light Emitted Diode
MMA	:Metimetakrilat
MDPC	: Mouse Dental Papilla Hücreleri
Mg	: Magnezyum
mmol	: Milimol
MTA	: Mineral Trioxide Aggregate
MTT	: [3-(4,5DimetilTiazol-2)-2,5 DifenilTetrazolyum Bromit]
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Buffer Salin
PDLC	: Periodontal Ligament Progenitor Hücresi
pH	: Hidrojen Gücü
RMCİS	: Rezin Modifiye Cam İyonomer Siman
ROM	: Reaktif Oksijen Metaboliti
SDS	: Sodyum Lauryl Sulfat
TAK	: Total Antioksidan Kapasitesi
TEGDMA	: Trietilen Glikol Dimetakrilat
TEGMA	: Trietilen Glikol Metakrilat
TGF-β	: Transforming Growth Faktör- β
TOD	: Total Oksidan Durumu
UDMA	: Üretan Dimetakrilat

μm : Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Split Chamber Cihazı	20
Şekil 3.2. Hücre kültürlerinin üretim kabı (Flask).....	37
Şekil 3.3. İverted Mikroskop	37
Şekil 3.4. CO ₂ 'li Etüv (İnkübatör).....	38
Şekil 3.5. Otoklav (Sterilizatör).....	39
Şekil 3.6. Steril Kabin.....	40
Şekil. 3.7. Materyallerin yerleştirildiği 48 gözlü plate	40
Şekil 3.8. Bilgisayar destekli Spektrofotometre	42
Şekil 4.1. Grupların 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki MTT test değerlerinin ortalama ve standart sapmaları	46
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin zamanla değişimleri	46
Şekil 4.3. Kontrol grubu ile Fuji II LC ve Grandio Flow materyallerinin MTT grafikleri arasında kalan alanlar.....	51
Şekil 4.4. Grupların 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TAK değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.	52
Şekil 4.5. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin TAK değerlerinin zamanla değişimi ...	53
Şekil 4.6. Grupların 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TOD değerlerinin ortalama ve standart sapmaları	58
Şekil 4.7. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin TOD değerlerinin zamanla değişimi ...	58

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Kural dentinde mm ² deki ortalama tübül dağılımları	8
Tablo 2.2. Hücre kültürleri ile değerlendirilen hüresel fonksiyonlar ve test yöntemleri	28
Tablo 2.3. Sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılan bazı boyalar ve kriterler	30
Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firmalar	35
Tablo 4.1. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki MTT test değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	45
Tablo 4.2. MTT testinin 24 saatlik grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.....	47
Tablo 4. 3. MTT testinin 72 saatlik grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.4. MTT testinin 7 gün grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.5. Grupların zamana bağlı olarak ve zaman-grup etkileşimleri.....	49
Tablo 4.6. Grup içi, zamana bağlı ve grup – zaman etkileşimleri ve gruplar arası değerimlerin istatistiksel önem değerleri	50
Tablo 4.7. Kontrol grubu ile çalışma gruplarının MTT grafikleri arasında kalan alan..	50
Tablo 4.8. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TAK değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	52
Tablo 4.9. 24 saat grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	54

Tablo 4.10. 72 saat grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.11. 7 gün grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.12. Grupların zamana bağlı olarak ve zaman-grup etkileşimleri.....	56
Tablo 4.13. Grup içi, zamana bağlı ve grup – zaman etkileşimleri ve gruplar arası değişimlerin istatistiksel önem değerleri	56
Tablo 4.14. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TOD değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.....	57
Tablo 4.15. 24 saat grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.16. 72 saat grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	60
Tablo 4.17. 7 gün grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.....	61
Tablo 4.18. Grupların zamana bağlı olarak ve zaman-grup etkileşimleri.....	61
Tablo 4.19. Grup içi, zamana bağlı ve grup – zaman etkileşimleri ve gruplar arası değişimlerin istatistiksel önem değerleri	62

1. GİRİŞ

Diş hekimliği uygulamalarının çeşitli alanlarında her geçen gün farklı özelliklere sahip birçok yeni materyal kullanıma girmektedir. Teknolojideki bütün gelişmelere rağmen biyouyumluluğu yüksek antimikrobiyal etkilere sahip ve mekanik özellikleri yeterli olan biyomateryal gereksinimi devam etmektedir.¹ Restoratif materyaller diş dokusuna uygulandığında, pulpanın canlılığını devam ettirebilmesi için uygulanan materyalin toksik olmaması ve bakteri penetrasyonunu engelleyecek şekilde diş dokusuna uzun süreli hermetik bir bağlanma sağlaması gerekmektedir.²⁻⁴ Adeziv diş hekimliği, restorasyonlarda materyalin dişe daha iyi bağlanabilmesi nedeniyle konservatif yaklaşım sağladığı ve bu yöntemde kullanılan materyallerin diş rengine benzer renklerde olduğu için daha fazla tercih edilmektedir.⁵ Bununla birlikte Rezin esaslı restoratif materyallerin büyük ölçüde toksik etkileri bulunan maddeleri saldıklarını bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır.⁶⁻⁹

Çocuklarda oluşan dental ve orofasiyal problemlerle mücadele etmek amacıyla ortaya çıkmış olan¹⁰ çocuk diş hekimliğinde de; önleyici, koruyucu, restoratif ve endodontik amaçlar başta olmak üzere farklı amaçlarla, rezin içerikli çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Bu materyallerin çoğu, dokularla doğrudan veya dolaylı olarak temas halinde olduğu için, bu materyallerin biyouyumlu olması gerekmektedir.

Restoratif materyallerin biyouyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda çeşitli test yöntemleri kullanılmakla birlikte yaygın olarak hayvan deneyleri ve hücre kültür testleri kullanılmaktadır.¹¹ Hücre kültür test yöntemleri daha iyi standardize edilebilir ve tekrarlanabilir özellikte olmakla birlikte hayvan deneylerine kıyasla, uygulaması kolay, daha az zaman alan ve ekonomik testler oldukları için hayvan deneylerine tercih edilmektedirler.¹²

Uluslar arası Standart Organizasyonu, [International Organization for Standardization (ISO)] in vitro sitotoksisite testlerinin; direkt, indirekt ve özüt testleri olmak üzere üç farklı materyal-hücre temas yöntemiyle yapılabileceğini bildirmiştir.¹³ Diş hekimliği materyallerinin her üç temas yöntemiyle de yürütülmüş toksisite çalışmaları bulunmaktadır.¹⁴⁻¹⁷ Farklı temas şekillerinin sitotoksisite sonuçları üzerine etkilerini araştırıldığı bir çalışmaya göre direkt ve indirekt testler arasında iyi bir ilişki bulunmuş, en az hassasiyeti ise özüt testi göstermiştir.¹⁵

Fotakis ve Timbrell,¹⁸ iki farklı hücre hattı kullanarak dört farklı sitotoksisite değerlendirme yönteminin etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, nötral kırmızı ile MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazilyum Bromid] testlerinin sonuçlarının, laktat dehidrogenaz enzim aktivite testinden ve bir protein değerlendirme yönteminden¹⁹ daha hassas olduğunu ve farklı toksisite testlerinin birlikte uygulanmasının bir materyalin toksik özellikleri değerlendirilirken daha güvenilir sonuçlar vereceğini ifade etmişlerdir.

Aerobik organizmaların oksijen kullanımından sonra yaklaşık %1-2 oranında, serbest radikaller şeklinde reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir.²⁰ Serbest radikal üretimi bir takım antioksidan savunma mekanizması üyelerince baskılanmaktadır; aksi halde, meydana gelen oksidatif stres biyomoleküllere çeşitli mekanizmalar yoluyla hasar vermektedir.^{21, 22} Oksidatif stres, son yıllarda toksisitenin olası bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.²³

Biyolojik sıvılardaki toplam antioksidan kapasitesi (TAK) değerlerinin ölçülmesinin kolay, hızlı uygulanan ve çok sayıdaki örneklerin değerlerinin birlikte analiz edilmesine imkân sağladığı belirtilmiştir.²⁴

Çocuk diş hekimliğinde çeşitli amaçlarla kullanılan materyallerin sitotoksik özellikleri ile ilgili olarak ulaşılabilen veriler yeterli değildir. Bu nedenle, çalışmamızda

çocukların dental tedavilerinde yaygın olarak kullanılmakta olan veya kullanıma yeni girmiş olan, ışıkla sertleşen çeşitli rezin restoratif materyallerin (Clearfil Majesty Esthetic[®], FiltekTM Silorane[®], Fuji II LC[®], Grandio Flow[®], Admira[®], Glasiosite[®], Twinky Star[®]) insan fibroblast hücreleri üzerinde zamanla meydana getirdikleri sitotoksik etkileri, in vitro olarak direk temas yöntemiyle ve MTT [3-(4,5DimetilTiazol-2)-2,5 DifenilTetrazolyum Bromit] testi, toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidan durumu (TOD) değerleri incelenerek ortaya koyulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş dokuları

Diş kuron ve kök olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Vücutta en mineralize doku olan mine hücresiz bir yapıdır ve dişin gördüğümüz kısmı olan kuronu örtmektedir. Mine, ameloblast hücrelerinin organik matriks salgılaması ve bu matriksin kalsifiye olması sonucu üretilmektedir.^{25, 26} Dentin dokusu ise odontoblastların salgıları ile oluşmaktadır. Dentin dokusu diş yapısının sert dokularının hacimce en büyük kısmını oluşturmaktadır ve hem kuronda hem de kökte bulunmaktadır. Dentin pulpa için koruyucu, mine için ise destek görevi görmektedir. Sement, diş dokusunun diğer kalsifiye dokusudur ve kök kısmını kaplamaktadır. Sement de dentin gibi ektomezenkim kaynaklı olup mine ve dentinden daha az mineral içermektedir. Ektomezenkim hücreleri veya nöral krest hücreleri tarafından üretilen pulpa ise gevşek bir bağ dokusudur. Dentini yapan odontoblast hücrelerinin gövdeleri pulpa içerisinde yer alır ancak bu hücrelerin sitoplazmik uzantıları dentin tübülleri içine uzanmaktadır. Bu nedenle pulpa genellikle dentinle birlikte düşünülmektedir ve pulpa dentin kompleksi olarak adlandırılmaktadır.²⁶

2.2. Pulpa Dentin Kompleksi

Diş dokusunun dental papillasından oluşan dentin ve pulpa dokuları mezoderm kaynaklı özelleşmiş bağ dokularıdır.²⁷ Dentin, pulpa dentin kompleksinin sert doku bölümünü oluşturmaktadır. Pulpa ise dentinin canlılığını devam ettiren yumuşak bağ dokusu kısmı olarak belirtilmektedir.²⁸ Pulpa dentin kompleksinde en önemli hücreler odontoblastlardır. Odontoblastların gövdeleri pulpa içerisindeyken uzantıları dentin bünyesinde yer alır. Dentin ile pulpa arasında;

1. Pulpanın fizyolojik olarak ve dış kaynaklı uyarılara cevap olarak dentin üreterek dentinin genişlemesini sağlaması,
2. Pulpanın sınırları dentine taşıyarak bu dokunun duyarlılığını sağlaması,
3. Doğrudan bir uyarı bulunmadığı zamanlarda da pulpa bağ dokusunun dentin yaralanmalarına cevap verebilme potansiyeline sahip olması ve
4. Dentinin pulpayı çevreleyerek onu dış etkilerden koruma görevini yerine getirmesi gibi nedenlerle, fonksiyonel bir birliktelik olduğu kabul edilmektedir.^{26, 29}

Dentinin oluşma sürecinde önce odontoblast hücreleri kollajenden zengin bir organik matriks salgılar. Daha sonra, bu matriks kalsifiye olur. Dentin dokusunda odontoblast uzantıları ve sinir hücreleri bulunması nedeniyle dentin, canlı bir doku olarak kabul edilir. Genç bireylerde dentin açık sarı renktedir. Mineralizasyonunun mine dokusundan daha az olması nedeniyle dentin daha opak görünür.^{30, 31} Dentinin içeriğinin ağırlık olarak yaklaşık %70'ini hidroksiapatit, %18'ini kollajen esaslı organik madde ve %12'sini ise su oluşturmaktadır. Dentin dokusunun inorganik içeriği mineden daha az ve hidroksiapatit kristallerinin boyutları daha küçüktür. Bu yüzden dentin mineden daha elastik bir yapıya sahiptir.³² Dentinin organik yapısının yaklaşık %90'ı tip I kollajenden oluşur. Dentin yapısında fonksiyonları tam olarak bilinmeyen proteinler ve organik bileşenler de az miktarda bulunmaktadır.³⁰

2.2.1. Dentin Tipleri

Gelişim şekillerine bağlı olarak farklı dentin tipleri tanımlanmıştır. Primer dentin diş oluşumu esnasında nispeten daha çok olmak üzere oluşur ve dişin büyük bir kısmını oluşturarak ilk şeklini meydana getirir. Primer dentinin, minenin altında bulunan ve dentin oluşumu esnasında ilk olarak salgılanan kısmını manto dentini olarak isimlendirilir ve altında bulunan primer dentin yapısından farklıdır. Kök oluşumu

tamamlandıktan sonra, odontoblastlar primer dentinin pulpal tarafında daha yavaş bir hızda dişin fonksiyonel olmasını sağlamak amacıyla dentin üretimine devam eder. Bu dentine sekonder dentin denir ve yapısı primer dentine göre daha düzensizdir. Ancak, primer odontoblastlar tarafından yapıldığı için, primer dentin kadar olmasa da tübülleri kısmen düzenlidir. Kimyasal iritanlar, çürükler, restoratif işlemler, atrizyon veya daha başka uyaranlara bir cevap olarak dişin daha sonraki yaşam evrelerinde oluşan dentin tipine ise tersiyer dentin denir. Primer ve sekonder dentinden farklı olarak tersiyer dentin sadece dış uyaranlardan etkilenen bölgelere yakın pulpal yüzeylerde sekonder odontoblastlar yani odontoblast benzeri hücreler tarafından üretilir. Bu dentinin özellikleri ve miktarı meydana gelen odontoblast cevabı ile paraleldir. Bu cevabı uyaranın yoğunluğu, şiddeti ve süresi belirler. Tersiyer dentin pulpayı koruma amaçlıdır. Düzensiz ve az sayıda dentin kanallarına sahiptir. Dentinin pulpa tarafında, gevşek bağ dokusuyla mineralize doku arasında yer alan tabakası pre-dentin olarak isimlendirilmektedir. Bu tabaka mineralize olmamış dentin matriksinden ve esas olarak kollajenden meydana gelmektedir. Glikoprotein ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Pre-dentin dentinogenezis esnasında mevcuttur ve dişin tüm ömrü boyunca da varlığını devam ettirir. Dentinin kalan kısımları sirkumpulpal dentin olarak isimlendirilmektedir ve intertübuler dentin ve peritübuler dentin olarak ikiye ayrılmaktadır.^{28, 33}

2.2.1.1. Dentin Tübülleri

Dentin mikrobiyal moleküler ürünlere olduğu gibi diğer moleküler akışkan materyallere ve sıvılara karşı da yüksek geçirgenliğe sahip bir yapıdadır. Bunun sebebi ise bütün dentin bünyesinde bulunan çok sayıdaki dentin tübülleridir. Tübüler bir yapıda olması dentinin önemli bir özelliğidir. Odontoblast hücreleri mine sınırından merkeze doğru organik matriks sentezleyerek geri çekilirler ve protoplazmik uzantıları mineralize olan matriks içerisinde kalmaktadır. Bunun sonucunda, dentin tübüleri bir

yapı kazanmaktadır. Dentinin önemli bir kısmı bu tübüller nedeniyle boşluklu bir yapıdadır. Dış dentin, merkezi dentin ve pulpal dentinde mm²'de sırasıyla 15000, 25000 ve 55000 tübül bulunmaktadır. Dentin tübüllerinin her birinin içinde bir odontoblast uzantısı ve dentin lenfi adı verilen sıvı bulunmaktadır. Dentin lenfi albumin, immunglobulin G (IgG), transferin, tenascin ve proteoglikan gibi kompleks protein karışımlarını içermektedir.^{28, 31, 34} Dentin tübüllerinde yukarıdaki yapılarla birlikte; ayrıca, sinir lifleri ve mineralize olmamış kollajen lifler de bulunabilmektedir.³⁵ Konik bir görünüme sahip olan dentin tübüllerinin çapı; mine dentin sınırında 0,6-0,8 µm, dentinin orta bölgesinde 1,2 µm ve pulpal kısımda ise yaklaşık 2,5 µm'dir.³¹ Kuralal dentinin değişik bölgelerinde mm başına düşen tübül sayısı farklılık göstermektedir (Tablo 2.1).³⁶

Tablo 2.1. Kuralal dentinde mm²'deki ortalama tübül dağılımı³⁶

Konum	Okluzal	Tüberkül	Kuron	Mine-sement sınırı
Dış	8000	20000	10000	10000
Orta	32000	36000	32000	29000
Pulpal	58000	58000	48000	48000

2.2.1.2. Peritübüler Dentin

Dentin tübüllerini çevreleyen ve nispeten daha hipermineralize olan dentine peritübüler veya intratübüler dentin denir. Peritübüler dentin intertübüler dentine göre daha az miktarda kollajen bulundururken, mineral bakımından daha zengindir. Mineral yapıdaki kristalizasyon oranı yüksek hidroksiapatit kristalleri nedeniyle intertübüler dentine göre 5 kat daha sert bir yapıya sahiptir.³⁷ Dentin tübüllerinin yoğunluğu pulpaya doğru artar; bu nedenle, peritübüler dentinin kapladığı alan predentin bölgesinde dentin alanının yaklaşık %60'ını; mine dentin sınırında ise, %3'ünü oluşturmaktadır.³⁸

2.2.1.3. İntertübüler Dentin

Dentin tübülleri arasında kalan dentindir. Odontoblastlar tarafından ilk salgılanan dentindir. Yapısında; fosfoprotein, proteoglikan, γ -karboksiglutamat içeren proteinler, glikoproteinler ve bazı plazma proteinleri bulunmaktadır.³¹ İntertübüler dentin pre-dentin bölgesinde dentin alanının yaklaşık %12'sini, mine-dentin sınırında ise %96'sını kaplamaktadır. Dentinde birim hacme düşen kollajen miktarı mine dentin sınırından pulpaya doğru azalmaktadır.³⁹

2.2.1.4. İnterglobüler Dentin

Mineralize olmamış veya daha az mineralize dentin alanları interglobüler dentin alanlarıdır. Hipomineralizasyonun nedeni mineralizasyon esnasında kalsifiye olmuş küresel alanların olgun dentin içinde tam olarak birleşmemesidir. Primer dentinin manto dentine yakın bölgelerinde bulunur ve dentin oluşumu sırasında, vitamin D eksikliğine bağlı olarak veya florür iyonunun fazla alınması nedeniyle dişlerde bu alanların daha sık görüldüğü ifade edilmiştir.³¹

2.2.2. Dentin Dokusunun Geçirgenliği

Dentin geçirgenliği konusunun, materyallerin dentine bağlanmasını ve pulpa üzerindeki biyolojik etkilerini ilgilendirdiği için önemli olduğu ifade edilmiştir.⁴⁰ Sıvının, birim yüzey alandan, birim basınç altında belli bir zamanda geçmesi o yüzeyin geçirgenliğini ifade eder. Geçirgenliği, cisim veya dokunun yüzey alanı, yapısı, kalınlığı gibi çeşitli faktörler etkilemektedir.⁴¹ Dentin geçirgenliği de bir maddenin dentin içerisine veya dentinden pulpaya geçmesi olarak tarif edilmektedir. Dentin dokusu, bir difüzyon ve adsorpsiyon bariyeri olarak görev yaparak pulpa reaksiyonlarına neden olabilen maddelerin, tübüllerden geçen konsantrasyonlarını azaltmaktadır.⁴²⁻⁴⁴

Bağlayıcı rezin monomerlerinin dentin kanalları içine penetrasyonu intratübüler dentin geçirgenliğidir. İntertübüler dentin geçirgenliği rezin monomerlerin demineralize

intertübüler dentine penetrasyonunu ifade etmektedir. Dentinin kanallı yapıda olmasının, zararlı maddelerin pulpaya geçişini kolaylaştırdığı ifade edilmektedir.⁴⁵ Dentin geçirgenliğini; tübüllerin çapı, genişliği ve uzunluğu, dentinal sıvının yoğunluğu ve içindeki bileşenlerin molekül boyutları, basınç değişimi, yüzey alanı gibi değişik faktörler etkilemektedir. Dentin kanallarının uzun olması, pulpaya ulaşan toksik maddelerin konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca dentin kalınlığının azalmasının geçirgenliğinin artmasına yol açtığı belirtilmiştir.^{46, 47} Dentin tübüllerinin mm² deki sayısının bölgelere göre farklılık göstermesi nedeniyle dentin geçirgenliği de dentinin değişik bölgelerinde farklılık göstermektedir.⁴⁵

Kavite preparasyonu sırasında döner aletler ve el aletleri ile uzaklaştırılan debrisin dentin yüzeyinde birikmesi ile oluşan smear tabakasının da dentin geçirgenliğinde önemli bir etken olduğu belirtilmiştir. Smear tabakası, preparasyon sırasında açığa çıkmış dentin kanallarını tıkadığı vurgulanmıştır.^{48, 49}

Kesik dentin tübüllerinin ağızlarında, dentin debristen oluşan tıkaçlara smear tıkaçı adı verilmektedir. Smear tıkaçları dentin tübülleri içinde yaklaşık 40 µm derinliğe kadar uzanabilmektedir. Smear tabakası, koruyucu bir difüzyon bariyeri gibi davranmakta ve dentinin geçirgenliğini %86 oranında azaltmaktadır.^{50, 51} Diğer taraftan bu tabakanın; bakteri gelişimi açısından uygun bir ortam ve besiyeri gibi davranması ve restoratif materyallerin dentine bağlanmasını azaltması gibi nedenlerle bu tabakanın kaldırılması önerilmektedir.⁴⁵

2.2.3. Pulpa Hücreleri

Pulpa; esas madde, hücreler, lifler, kan damarları ve sinir liflerinden oluşan ve kalsifiye olmayan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Pulpa dıştan içe doğru sırasıyla; odontoblast tabakası, hücreden fakir tabaka (weil tabakası) ve hücreden zengin tabakadan oluşmaktadır. Merkezde ise, kan damarları ve sinirler yoğun olarak

bulunmaktadır. Odontoblast tabakasını oluşturan hücrelerin uzantıları dentinin içindedir. Hücreden fakir tabakada yaygın olarak kapiller kan damarları ve miyelinsiz sinir lifleri bulunmaktadır. Hücreden zengin tabakada ise, başta farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve fibroblastlar olmak üzere makrofajlar ve lenfositler yer almaktadır. Hücreden zengin tabakanın, zarar görmüş odontoblast hücrelerinin yerlerine yenilerinin yapımından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Pulpa esas maddesi; glikoprotein, protein ve mukopolisakkaridlerden oluşmaktadır.^{52, 53} Pulpa-dentin kompleksinin en önemli hücrelerinden olan odontoblastların, diş gelişimi sırasında primer dentin ve daha sonra ise sekonder ve tersiyer dentin yapımından sorumlu oldukları ifade edilmiştir. Odontoblastların morfolojik yapısı dişin çeşitli kısımlarında farklılık göstermektedir. Kronun yapısında daha uzun ve silindirik yapıda olan odontoblastlar, kökün uç kısmında kısa ve kübik bir form almaktadırlar.⁵⁴

Diş pulpasında sayıca en çok, kollajen liflerin yapımından sorumlu olan fibroblastlar bulunmaktadır. Fibroblastların sayısı ve aktivitesi zamanla ve diş etkenlere bağlı olarak değişmektedir. Yaş, çürük, atrizyon, erozyon veya abrazyonla birlikte fibroblastların sayısında ve boyutlarında bir azalma, lif içeriğinde ise artış meydana gelmektedir.⁵⁵ Pulpadaki hücreden zengin tabakada bulunan bir diğer hücre türü farklılaşmamış mezenkim hücreleridir. Bu mezenkim hücreleri yaralanma ve enflamatuar olay sırasında makrofaj veya odontoklastlara ve odontoblastların harap olduğu durumlarda tamir dentinini meydana getirecek olan odontoblast benzeri hücrelere dönüşmektedirler. Pulpada bulunan, klinik öneme sahip diğer hücreler ise makrofajlardır. Makrofajlar normal pulpa dokusunda görülmekte ve sayıları pulpa yaralanmalarında artmaktadır. Bununla birlikte, normal pulpa dokusunda nadiren polimorf çekirdekli lokositler de bulunabilmektedir. Pulpadaki iltihabi olaylar esnasında

pulpada çok miktarda bulunan mast hücrelerinin normal pulpa dokusunda tipik olarak görülen hücreler olmadığı belirtilmiştir.^{56, 57}

2.2.4. Dentin Pulpa Kompleksindeki Büyüme Faktörleri

Bir takım sitokinlerin, çürükle ilişkili pulpal yanıtta fonksiyonları iyi bilinirken, büyüme faktörlerinin (BF) diş gelişimi ve rejenerasyonu sürecindeki rolleri de tespit edilmiştir.⁵⁸⁻⁶⁰ BF'lerin; diş şeklinin oluşmasında, farklılaşmasında ve dental yaralanmalar sonrasında meydana gelen doku rejenerasyonundaki birçok anahtar sinyallerin oluşmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir.⁶¹

Diş gelişimi esnasında epitelyal-mezenşimal etkileşimlerin, dişin ilk oluşum aşamasında başlayan ve mine ve dentin oluşumundan sırasıyla sorumlu olan ameloblast ve odontoblastların farklılaşmalarından sorumlu oldukları belirtilmiştir. Bu karşılıklı etkileşimlerin, odontoblast ve ameloblast farklılaşmaları gibi geç dönem olaylarını olduğu gibi, diş gelişiminin erken morfogenetik olaylarını da belirlediği ifade edilmiştir.⁶²⁻⁶⁴

Diş gelişiminin çan safhasında iç mine epiteli ve basal membran, dental papillanın perifer hücrelerini odontoblastlara dönüşmek üzere uyarmaktadırlar. Bu uyarılarda büyüme faktörleri, özellikle de TGF- β (Transforming Growth Factor) ailesinin bu farklılaşmada etkili moleküller olduğu düşünülmektedir.^{63, 65, 66}

Daimi dişlerde dentin köprüsü oluşumunu sağlamak üzere odontoblast benzeri hücrelerin oluşması için de benzer bir süreç gerekmektedir.⁶¹ Dentinde anahtar BF'lerden birisi TGF- β ailesidir. Diş gelişimi sırasında odontoblast farklılaşmasının uyarılmasında bu BF ailesinin etkileri ispatlanmıştır. Bu nedenle, tamir esnasında da önemli uyaran moleküller olabilecekleri ifade edilmiştir.⁶⁵⁻⁶⁹

Dentin matriksindeki BF'lerin orijinlerinin büyük olasılıkla odontoblast hücreleri olduğu düşünülmektedir. Sekresyondan sonra ekstrasellüler matriks veya dentinin mineral komponentleri ile etkileşmektedirler.⁷⁰⁻⁷²

Odontoblastlardan, TGF'lerin üç formu da salgılanmaktadır. Ayrıca, BF'lerden sadece TGF 1 β dentin matriksinde bulunmaktadır. Sadece TGF 1'in dentin matriksinin proteoglikanlarıyla, decorin ve biglikanla etkileşebildiği diğer izoformların ise daha az etkileşebildikleri tahmin edilmektedir.⁶⁸

Dentin matriksinde bulunan BF'lerin fonksiyonel aktiviteleri oldukça fazla olabilir. Daha önce de bahsedildiği gibi odontoblast benzeri hücrelerin farklılaşmasının yanı sıra bu moleküller migrasyon ve hücre proliferasyonunu da uyarabilmektedirler. Dentin matriksinde kan damarları ile ilişkili BF'lerin varlığının tamir bölgelerinde yeni kapillerlerin oluşumu için önemli olabileceği tahmin edilmektedir. TGF- β 'lar ise, pulpadaki enflamatuar yanıtı azaltabilmektedirler.⁶⁹

BF'lerin dentin matriksinden dokuların hasarı veya klinik restoratif işlemlerin sonucu olarak salındığı ifade edilmiştir. TGF-1 büyüme faktörü, kalsiyum hidroksit pulpa kapaklamasını takiben dentin matriksinden salınan bir materyaldir ve dentin köprüsü yapılmasının başlamasına katkı sağladığı düşünülmektedir. Dental hasar bölgelerinde reaksiyoner ve reperatif dentinogenez yapım sürecinde dentin köprüsü oluşumunu sağlamak üzere tersiyer dentin matriksi sekresyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu süreçlerdeki biyolojik olayların uyarılarını sağlayan anahtar yapılar olarak BF'ler düşünülmektedir.⁶¹

Bazı in vivo ve in vitro çalışmalar, bazı BF'lerin özellikle de TGF- β ve kemik morfojenik proteinlerin (BMP) dentinojenik reperatif olayların uyarılmasındaki potansiyel etkilerini göstermiştir. Ekspozе olmamış pulpaya, TGF-1 ve BMP-7 moleküllerinin doğrudan veya dentin bariyerinden uygulanmasının kültür ortamındaki

diş kesitlerinde bu moleküllerin reaksiyoner dentin yapımını uyarıcı özelliklerini ortaya koymuştur. Çalışmalarda, TGF, BMP ve İnsülin BF moleküllerinin odontoblast benzeri hücre farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir.⁷³⁻⁷⁵

Diş germelerinden izole edilen dental papillada sadece TGF'ler, doku morfolojilerinin ve odontoblast farklılaşmasını normale yakın olarak indüklemiştir.^{65, 66}

Hücre farklılaşmasından sonra reperatif dentin matriksi birikimi ve dentin köprüsü oluşması için odontoblast benzeri hücrelerin salgı aktivitelerinin uyarılması veya düzenlenmesi gerekmektedir. Bu uyarılma sürecinin anahtar faktörlerin ise, BF'ler TGF ve BMP olabileceği tahmin edilmektedir.^{73, 75}

BF'lerin odontoblastların hayat döngüsünün salgı aktivitesini otokrin kontrolü ile düzenliyor olabileceği belirtilmiştir. Bu moleküler kontrol mekanizmasının aydınlatılmasının, tedavi edici amaçlarla dentin salgısının miktarının ayarlanması konusunda değerli veriler sağlayabileceği belirtilmiştir.⁶¹

2.3. Materyallerin Biyolojik Özellikleri ve Biyouyumluluk

Dental materyallerin tatbik edildikleri canlı dokularda lokal ve sistemik olarak meydana getirdiği alerjik, mutajenik, toksik veya karsinojenik etki ve duyarlılık (sensitivite) materyallerin biyolojik özelliklerini oluşturmaktadır.⁷⁶

Restoratif amaçlarla kullanılan dental materyaller çeşitli dokular ile (mine, dentin/pulpa, periodonsiyum, yanak, dil, dudak) lokal olarak karşı karşıya gelmekte ve bu dokularda farklı reaksiyonlara neden olabilmektedirler. Canlı dokularla temas halinde bulunan herhangi bir malzemenin sistemik ve lokal toksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki ve vücudun yumuşak veya sert dokularında doku reaksiyonu oluşturmamasına biyouyumluluk veya biyolojik uyum denilmektedir. Canlı dokuların içerisine kısmen veya tamamen yerleştirildiğinde bu dokularla etkileşim göstermesi beklenen cansız materyallere ise biyomateryal adı verilmektedir. Bu nedenle, dental

materyaller de bu kapsamda biyomateryallerdir; ancak, her biyomateryalin tamamen inert olamayabileceği belirtilmiştir.⁷⁶

Biyouyumluluk çeşitli etkenlere bağlı olmakla birlikte; zamana ve şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Zamanla şartların değişmesiyle ilk uygulandığında biyoyumlu olan bir materyal, uyumsuz hale geçebilmektedir.⁷⁷

Bir restorasyonun başarılı olabilmesi için gereken önemli özelliklerden birisi, restorasyon öncesi sürecin ve kullanılan materyallerin pulpanın canlılığını tehlikeye atmamasıdır. Bu nedenle, restorasyonun pulpada oluşturduğu irritasyon kritik öneme sahiptir. Tedavi öncesi restoratif işlem prosedürlerinin pulpada oluşturduğu inflamasyonun derecesi kesin olarak bilinmemektedir. Aşırı bir irritasyon pulpanın iltihabi durumunu geri dönüşümsüz hale getirebileceği için bunu en aza indirmeye çalışılmasının gerekliliği ifade edilmiştir.⁷⁸ Bunun yanı sıra, restoratif materyalin pulpaya etkisinin de önemli olduğu bilinmektedir. Bir materyalin biyoyumluluğunu, bu materyalden salınan bileşenlerin özellikleri belirlemektedir. Bu bileşenler hücrelerde; interlökin salgılanması, iltihabi cevap ve hücre ölümü gibi çeşitli cevaplara sebep olabilmektedir.⁷⁶

Restoratif materyallerin pulpaya olan etkisinin restorasyonun altındaki dentinin geçirgenliği ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir.^{40,79} Restoratif materyaller, ani veya uzun süreçte sitotoksik etki göstererek veya hipersensitivite reaksiyonlarını uyararak pulpaya zarar verebilirler. Polimerize olabilen organik matriks, doldurucular, doldurucuları ve organik matriksi birleştiren silan bağlantı ajanları, polimerizasyon reaksiyonlarını başlatan ve modifiye eden moleküller ve doldurucuları güçlendiren seramik partiküllerden oluşan kompozitler başta olmak üzere rezin içerikli restoratif materyallerin bazı bileşenlerinin, polimerizasyon tamamlandıktan sonra da sitotoksik

etki gösterdiği ve pulpada uzun süreli stimülasyonla inflamatuvar cevaba yol açabildiği bildirilmiştir.⁸⁰

Rezin materyallerin organik matriks kısmı, bisfenol-glisidilmetakrilat (Bis-GMA) ve üretan dimetakrilat (UDMA) monomerleri ve bu monomerlerle birlikte kullanılan daha az visköz olan trietilenglikol dimetakrilat (TEGDMA), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) veya dietilenglikol dimetakrilat (DEGDMA) gibi ko-monomerlerden oluşmaktadır.⁸¹⁻⁸³ Rezin bazlı bir restoratif materyalin biyoyumluluğunun saldığı organik maddelerin miktarı ve yapısıyla ilişkili olduğu⁸⁴ ve zamanla, yetersiz polimerizasyon veya çözünmelere bağlı olarak rezin matriksten salınan bu maddelerin sitotoksik sonuçlar oluşturabileceği bildirilmiştir.^{84, 85} HEMA ve TEGDMA gibi monomerlerin, pulpal yapı ve hücreleri etkilediği bildirilmiştir.^{86, 87}

Bir restoratif materyal geliştirilirken, kimyasal ve mekanik özelliklerin yanında biyoyumluluğu da göz önünde bulundurulmaktadır.⁸⁸

İn vivo olarak kullanılması düşünülen materyallerin dokular üzerindeki toksik etkilerinin ve oluşabilecek istenmeyen doku cevaplarının değerlendirilmesi amacıyla in vitro biyoyumluluk testleri geliştirilmiştir.^{88, 89}

2.3.1. Sitotoksiste

Moleküler düzeyde meydana gelen bazı olaylar sonucunda hücrelerde çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin yapı ve fonksiyonlarında belirgin hasarlar meydana gelmesi sitotoksiste olarak tanımlanmaktadır.¹¹ Herhangi bir materyalin klinik kullanıma sunulmadan önce, sitotoksitesini belirlemek amacıyla üretim aşamasında bazı testlerden geçmesi gerektiği belirtilmiştir.⁹⁰ Sitotoksiste testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in-vitro olarak değerlendirilmektedir

2.3.1.1. Sitotoksisite testleri

- ✓ Hücre canlılığı ve ölümü,
- ✓ Hücre membranı,
- ✓ Hücre organelleri,
- ✓ Protein veya DNA sentezi ve
- ✓ Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler vermektedir.⁹¹

Hücresel yıkımın tetiklenmesi oldukça fazla sayıda yol ile olduğundan sitotoksisitenin belirlenebilmesi çok zordur.⁹²

Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile doğrudan veya dolaylı olarak temas etmesinin büyük önem taşıdığı vurgulanmıştır. Araştırmacılar sitotoksisite testlerinde farklı hücre-materyal temas metodları kullanmışlardır.^{14, 15, 93, 94}

Biyomateryallerin, uygulandıkları bölgedeki hücreler üzerine meydana getirebilecekleri etkiler aşağıda ifade edilmiştir.^{17, 95}

1. Hücrelerin membran yapısında oluşturdukları bozukluklar (geçirgenliğin artması)
2. Hücrelerin kromozom yapısında oluşturdukları etkiler (mutajenite, sitotoksisite, östrogenesite, nörotoksisite)
3. Hücrelerin metabolik faaliyetlerinde meydana getirdikleri bozukluklardır.

Bu etkilerin incelenmesinde kullanılan test yöntemleri iki grupta toplanmıştır.^{96, 97}

1. Statik inceleme yöntemleri;
 - hücre sayısının tespiti
 - hücre ölümü
 - hücre tutunmasının inhibisyonu
 - koloni oluşumu
 - hücre canlılık oranlarının belirlenmesi ile yapılı

2. Dinamik inceleme yöntemleri;

- H-Timidin ile otoradyografi yöntemi
- Cr salınım yöntemi
- H-Lösin ile işaretleme yöntemi
- sitometrik analiz yöntemi
- MTT test yöntemi

2.3.2. Dental Materyaller İçin Biyolojik Uyum Testleri

Başta restoratif materyaller olmak üzere birçok materyal; dişteki ve ağız içindeki dokularla uzun süre temas etmektedir. Bu nedenle klinik kullanıma geçmeden önce bu materyallerin veya zamanla çözünerek veya kırılma veya aşınma sonucu mekanik olarak bu maddelerden ayrılacak olan bileşenlerinin bu dokular üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir.^{11, 15, 98} Biyouyumluluk üç tip biyolojik test ile ölçülebilmektedir.^{14, 17, 77, 88}

1. Başlangıç testleri
2. İkincil testler
3. Kullanım testleri

2.3.2.1. Başlangıç Testleri

Başlangıç testlerinin çoğu ilaçları değerlendirmek için kullanılan testlerden seçilmiştir. Dental materyallerin test edilmesinde en çok hücre kültürü test yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler sitotoksosite, hemoliz, sistemik toksisite ve karsinojeniteyi belirlemede kullanılmaktadır.^{99, 100}

2.3.2.2. İn vitro Sitotoksosite Test Yöntemleri

İn vitro sitotoksosite testleri, materyalin vücut dokuları üzerine veya içine uygulandığında, dokunun gösterdiği reaksiyonların, laboratuvar ortamında ortaya

çıkarılarak belirlenmesini hedeflemiştir ve yeni bir materyalin, negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak; hücre seviyesinde büyüme oranları ve hücre morfolojisi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilmiştir.¹⁰¹

Organizmanın dışında yapılan in vitro testler; test tüpleri, hücre kültür kapları, flask veya diğer taşıyıcı kaplarda yapılabilmektedir. Memeli hücreleri, organeller, dokular, bakteri ve bazı enzim türleri biyolojik sistem olarak kullanılabilir. Test edilmesi düşünülen materyal veya etkisi araştırılacak olan bileşen biyolojik sistemle doğrudan veya dolaylı olarak temas edecek şekilde test kabına yerleştirilmektedir. Doğrudan temasta biyolojik sistem, materyal veya bileşeni ile doğrudan temas halinde iken dolaylı temasta biyolojik sistem ile materyal veya bileşen arasındaki etkileşim; agar, filtre membranlar veya dentin bariyeri gibi bir sistem ile perdelendikten sonra olmaktadır.^{15, 77, 102, 103}

İn vitro biyoyumluluk testlerinin amacı; vücut dokuları üzerine veya içine yerleştirildiklerinde, malzemelere karşı oluşabilecek biyolojik reaksiyonu test ortamında belirlemek ve bu konuda ön bilgi sağlamaktır. Hayvan testlerinin, gerçekleştirilmesi çok zaman alıcı ve masraflı olduğu belirtilmiştir.^{102, 104}

Yapılan deneysel çalışmalar, in vitro test sisteminin materyal seçimi için faydalı olduğunu göstermiştir.¹⁶ Sitotoksikite testleri materyallerin biyoyumluluklarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. ISO standartlarına göre kullanılması önerilen in vitro sitotoksikite testleri; agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, direkt kontak testi ve dentin bariyer testidir.^{79, 105}

Agar Difüzyon Testi

Bu test yönteminde, hücre kültürü ortamında üretilen hücrelerin bulunduğu ortam agar ile kaplanmakta ve etkisi incelenecek olan materyal, agarın üzerine yerleştirilmektedir. Agardan diffüze olan materyalin sitotoksik etkisi, ortama verilen

nötral kırmızı boyanın, hücre membranındaki geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikmesine göre hücre aktivitesi değerlendirilerek tespit edilmektedir. Bu test yönteminin, agardan geçemeyen materyaller veya komponentleri için uygun olmadığı belirtilmiştir. Testte, fibroblast veya epitelyal hücre dizisi kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Test en az dört kez tekrarlanmaktadır. Hücrelerdeki boyanma ve liziz değerlendirilerek materyallerin sitotoksisiteleri değerlendirilmektedir.^{105, 106}

Milipore Filtre Testi

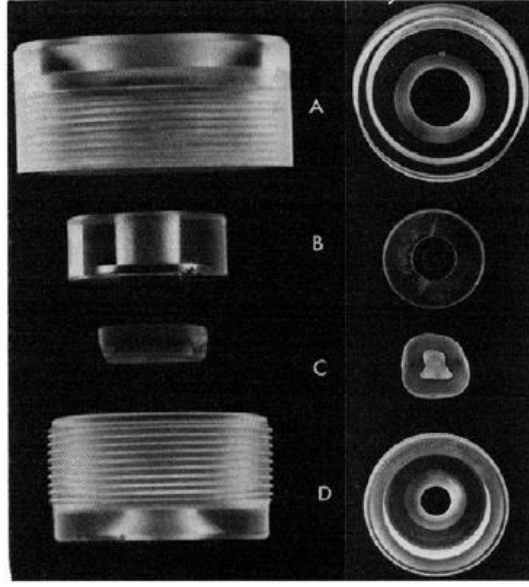
Milipore filtre difüzyon testi metodunda, selüloz asetat filtreden diffüze olan materyallerin veya bileşenin sitotoksitesi; süksinat dehidrogenaz veya spesifik olmayan hidrolaz boyanmasına göre fibroblast veya epitel hücrelerinde meydana getirdiği boyanma alanı veya boyanma yoğunluğuna göre belirlenmektedir.¹⁰⁵

Doğrudan Temas veya Özüt ile Hücre Kültür Testleri

Bu yöntemde test edilen materyal ile hücreler doğrudan temas halinde olup örneklerin şekline ve hidrofobik özelliklerine bağlı olarak hatalı sonuçlar elde edilebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, diğer testlerle kombine olarak kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu testlerin kolay uygulanan ve ucuz testler olduğu ifade edilmiştir.^{79, 105}

Dentin Bariyer Testi

1974 yılında split-chamber adını verdikleri ve iç içe geçen iki rezervuar, silikon bir halka ve plastik bir yıkayıcıdan oluşan sistemi geliştiren Outhwaite ve ark.¹⁰⁷ dentinin geçirgenlik özelliğinden materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde faydalanma fikrini ilk kez ortaya atmışlardır. Tyas¹⁰⁸ ve Hume¹⁰⁹ de cihazın farklı modifikasyonları ile çalışmalar yapmışlardır.



Şekil 2.1. Split Chamber Cihazı **A)** Üst rezervuar (odanın üst kısmı) **B)** Plastik halka **C)** Dentinin yerleştiği kısım **D)** Alt kısmı

Schmalz ve ark.^{110, 111} cihazın yapımında kullanılan malzemelerde ve cihazın boyutlarında bir takım standartlar ortaya koymak için çeşitli modifikasyonlar yapmış ve sitotoksisite çalışmalarında kullanmışlardır.^{110, 111}

Dentin bariyer testinde, özel deney düzeneklerinde test materyali ile hücreler arasına bir bariyer olarak sığır dentini yerleştirilmektedir.^{17, 111}

Dentin bariyer testlerinin; modeller arasındaki çeşitliliği, dentin diskinin pulpal yüzeyinde diffüze olan materyalin hacminin azalması ve pulpadaki çok sayıda farklı hücrenin çeşitli biyolojik cevaplar üretmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.^{88, 112}

Dentin diski bölümlü odaya bir paslanmaz çelik bir tutucu ile yerleştirilmekte ve bu oda dentin diski ile iki bölüme ayrılmaktadır. Dentin diskinin bir tarafında hücreler üretilmekte ve bu kısım pulpa tarafı (alt oda) olarak tanımlanmaktadır. Uygulanacak olan test materyali silikon bir tüp içinde dentin diskinin diğer kısmına uygulanmaktadır. Materyalin uygulandığı bu kısım ise kavite bölümü olarak tanımlanmaktadır.¹¹¹

İn Vitro Sitotoksisite Testlerinin Avantajları

İn vitro sitotoksisite testlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir:^{16, 17, 98, 99, 113}

1. Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
5. Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,
6. Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkân tanınmaları,
7. Hayvan ve kullanım testlerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmalarıdır.

İn Vitro Sitotoksisite Testlerinin Dezavantajları

İn vitro testlerin dezavantajları şunlardır: ^{17, 77, 98, 113-115}

1. Her test için tek tip hücre kullanılması,
2. Kültür ortamındaki hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. İn vitro ortamında kullanılan sistemlerde, organizmalardaki immün sistem, inflamatuvar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık mekanizmaların bulunmaması.

İn vitro sistemlerin çoğunda tek tür hücre kullanılması, in vitro test sonuçları ile in vivo koşulların uyumluluğunu tartışmalı hale getirmektedir.¹¹³

2.3.2.3. İkincil Testler

Test; ilgili materyalin, fare, rat, koyun, kedi, köpek ve domuz gibi bazı deney hayvanlarına implante edilmesi ile yapılmaktadır.^{77, 114} Böylelikle, test edilen materyal ile biyolojik çevre arasında meydana gelebilecek etkileşimlerin gözlemlenmesi hedeflenmektedir. Test materyali klinik kullanıma benzer bir şekilde deney hayvanına

implante edilmektedir. Kısa (7 ± 2 gün) veya uzun (70 ± 5 gün) takip süreleri sonundaki biyolojik cevaplar kaydedilmektedir. Elde edilen verilerin in vitro testlere oranla daha kapsamlı ve çok yönlü olduğu belirtilmiştir. Bu testlerde değişkenlerin kontrolünün daha zor olduğu ifade edilmiştir. Etik ilkeler ve hayvan hakları gibi etkenler nedeniyle testlerin uygulanması giderek azaltılmıştır. Ayrıca, bu testler zaman alıcı, pahalı ve hayvan türleri insanlardaki cevabı aynı şekilde vermeyebilmektedir.^{11, 17, 77} Bu testler arasında kemik içi veya deri altı implantasyon testleri, oral mukoz membran iritasyon testleri ve alerji testleri bulunmaktadır.^{99, 100}

2.3.2.4. Kullanım Testleri

Kullanım testleri ile materyalin klinik uygulamalarının sonucunda ortaya çıkabilecek durumu tanımlamak hedeflenmiştir. İkincil testler içerisinde yer alan kemik içi implantasyon testleri de bu gruba dâhil edilebilmektedir. Kullanım testlerinin çoğunluğu operatif diş hekimliği ile ilgilidir.^{99, 100}

Kullanım testleri, hem hayvanlar hem de insanlar üzerinde yapılabilmektedir. İnsanlar üzerinde yapıldığında “klinik deneme” adını almaktadırlar. Klinik uygulamaya geçebilecek seviyeye gelmemiş olan materyaller kullanım testlerinde değerlendirilememektedir. Kullanım testlerinin altın standardını klinik denemeler belirlemektedir. Materyalin kullanıma hazır hali gönüllü bir insana yerleştirilmektedir.^{11, 77} Kullanım testlerinin bazı dezavantajları olduğu belirtilmiştir. Bunlar; bu testlerin oldukça karmaşık olması ve deneylerin kontrolünde ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yaşanan güçlükler olarak ortaya koyulmuştur. Diğer biyoyumluluk testlerinden daha pahalıdırlar. Materyalin uzun dönem etkilerinin sonuçlarını almak aylar veya yıllar sürebilmektedir. İnsanlar üzerinde klinik denemelerin yapılabilmesi için, resmi kurumların onayı ve hasta aydınlanmış onamı

gerekmektedir. Bu denemelerin yapılabilmesi için in vitro testlerde ve hayvan deneylerinde gerekli olmayan birçok yasal sorumluluk önemlidir.⁷⁷

2.4. Hücre Kültürü

Hücrelerin, önce mekanik yollarla dokudan; daha sonra ise, proteolitik enzimler uygulanarak birbirlerinden ayrılarak kültür ortamında herhangi bir doku bağlantısı olmaksızın in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir.¹¹⁶ Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır.⁵⁷ Kültür ortamındaki hücreler, vücut ısısında ve vücudun fizyolojik özelliklerini taklit eden, plazma ve serum aminoasit ve mineralleri, şeker ve tuzları, vitamin ve antibiyotikleri ve hayvan embriyo ekstratlarını içeren besi yerlerinde üretilmektedirler.¹¹⁷

Hücre Kültürlerinin Kullanılmasının Avantajları⁹⁷

1. Fizikokimyasal ortamın (pH, ısı, osmotik basınç, O₂ ve kısmi CO₂ basıncı) ve fizyolojik şartların (medyum içerisindeki bileşiklerin) kontrol altında tutulması
2. Bir veya iki pasajdan sonra kültür edilmiş hücrelerde homojenlik sağlanması.
3. Sitotoksik reaksiyonu saptayan kimyasalların az miktarda kullanılmasını ve hücreler ile direkt temas ederek uygulanmasına olanak sağlar,
4. Düşük maliyetli olması,
5. Tekrarlanabilir olması,
6. Sitotoksiteyi etkileyen çeşitli etkenlerin değerlendirmesine olanak sağlaması, deneylerin tekrarlarının daha ucuz ve legal olması ile hayvan deneylerinde olduğu gibi etik kurul kararının gerekmemesi,

7. İn vivo koşulları in vitro olarak taklit edilmesine olanak sağlaması (perfüzyon cihazları).

Dezavantajları

1. İn vivo koşullarda uygulanan materyallerin hücreler farklı hücrelerle etkileşim içinde olmasına karşın in vitro koşullarda tek tip hücre kullanılarak test yapılması,
2. Steril koşulların sağlanma zorluğu, bakteriyel ve kimyasal kontaminasyondan korunmak için dikkatli çalışma gerektirmesi,
3. Çok sayıda hücre üretmenin zaman alması,
4. Kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik incelemenin uzmanlık gerektirmektedir.

2.4.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

Hücre kültürlerinin günümüzdeki yaygın kullanım alanları şu şekilde özetlenmiştir:^{118, 119}

1. Viral aşı üretimi ve viral teşhis amaçlı
2. Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi
3. İnterferon üretimi
4. Enzim üretimi
5. İnsekt aşı üretimi
6. İnterlökin üretimi
7. Hormon üretimi (İnsülin)
8. Büyüme faktörlerinin üretimi

Hücre kültürlerinin yeni kullanım alanları ise şöyle sıralanabilir:

1. Somatik gen tedavisi

2. Tümör aşılıarı
3. Canlı hücrelerin greft amaçlı kullanılması
 - a. Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
 - b. Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
 - c. Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
 - d. Organizma dışında hücre modifikasyonu
4. Kompleks üç boyutlu dokular
 - a. Yapay deri
 - b. Yapay kıkırdak
 - c. Yapay karaciğer
 - d. Yapay pankreas

2.4.2. Hücre Kültürü Teknikleri

Farklı dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç grupta toplanmıştır.¹¹⁵

1. Primer hücre kültürleri,
2. Diploid hücre kültürleri
3. Devamlı hücre kültürleri

2.4.2.1. Primer Hücre Kültürleri

Orijinal dokudan yeni izole edilen kültürler, ilk pasajlamaya kadar primer kültür olarak belirtilmektedir. Orijin olan dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipinin, orijinal doku hücresi ile aynı olduğu ifade edilmiştir.^{118, 120} Primer hücre kültürlerinin ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınması işlemine ‘alt kültür’ adı verilmektedir. Primer kültürlerin, toksik maddeye karşı daha hassas oldukları belirtilmiştir. Kültür şartlarında orijinalliklerini kaybettikleri ve homojen olmadıkları vurgulanmıştır. Bu özellikleri en önemli dezavantajları olarak kabul edilmektedir.^{115, 121}

Odontoblast ve pulpal fibroblast hücrelerinin primer kültürlerinin, sitotoksosite testlerinde daha iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Ancak, bu hücreler dış dokusundan izole edilir edilmez kültüre edilmeye hazır olmamaktadır. Devamlı hücre hatlarına dönüştürülmek için pasajlandıklarında ise, dokudan bağımsız gelişen mitotik aktiviteleri nedeniyle orijinal hücre fenotipinden farklı bir yapı oluşmaktadır.^{11, 17, 121}

2.4.2.2. Diploid Hücre Kültürleri

Primer kültürden sonraki aşama, pasajlama ile alt kültür elde edilmesidir. İlk pasajdan sonra, devam eden kültürler *cell line* adı verilmiştir. Her alt kültür elde edilmesi sırasında pasajlama yapılmaktadır. Pasajlama sonrasında hücre yoğunluğu artmaktadır. Bu yoğunluk artınca ortam pH' si düşmekte, besin maddeleri azalmakta ve artık ürün miktarı artmaktadır. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak için hücreler daha büyük bir hacime alınarak yoğunlukları azaltılmaktadır^{122, 123}.

Diploid hücre kültürleri primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilen hücre kültürleri olarak ifade edilmiştir. Bu kültürlerdeki bütün hücrelerin, alındıkları dokunun karyotipinin en az %75'ini koruması gerektiği belirtilmiştir. Primer kültürler göre daha homojen, standardize edilebilir ve tekrarlanabilir olmaları yönüyle daha avantajlı olacakları vurgulanmıştır.^{115, 118}

2.4.2.3. Devamlı Hücre Kültürleri

Alt kültürleri sonsuz yapılabilen ve karyotipleri, alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürler olarak belirtilmiştir. Herhangi bir kültürün, devamlı hücre kültürü olabilmesi için en az 70 defa alt kültürünün yapılması gerekmektedir. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücreler olduğu ortaya koyulmuştur. Devamlı hücrelerin meydana gelen bu transformasyondan dolayı, *in vivo* özelliklerinin tümünü koruyamadıkları belirtilmiştir. Devamlı hücre hatlarının çoğaltılabilmesinin kolay olduğu ifade edilmiştir. Fare

fibroblastlarının (L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücrelerinin (HeLa) çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları oldukları belirtilmiştir.^{76, 124}

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde primer hücre kültürlerinin devamlı hücre kültürlerine oranla daha etkili oldukları bilinmektedir.^{16, 115} Primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddelere verdikleri metabolik cevaplar farklı olabilmektedir. Devamlı hücre kültürleri, genetik ve metabolik olarak daha stabil olarak belirtilmiştir. Bu nedenle, devamlı hücre kültürleriyle yapılan test sonuçlarının standardizasyonunun daha kolay olacağı ifade edilmiştir.^{115, 121}

Dental materyallerin toksisitelerinin değerlendirilmesinde primer, sekonder ve devamlı hücre kültürleri kullanılmaktadır.^{99, 125-128}

2.5. Sitotoksite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığı ve büyümesiyle ilgili yöntemlerde çok gözlü plateelerin kullanılmaya başlanması neticesinde birçok örneğin; kısa sürede, aynı anda ve aynı şartlar altında güvenilir bir şekilde değerlendirilebilmesine imkân sağlandığı belirtilmiştir. Kolorimetri ve fluoresan esasına dayanan; ELISA veya mikrotiterplate okuyucu sistemler sayesinde örneklerin çok gözlü hücre kültür kaplarından doğrudan okunmasına izin verdiği ifade edilmiştir.^{129, 130}

Hücre fonksiyonlarda, kullanılan materyallerin neden olduğu bazı değişimlerin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarının toksisite tespit aşamasında hücre tiplerinde ortak olarak değerlendirilen fonksiyonlar ve değerlendirme yöntemleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir.^{11, 16, 99, 106, 130-132}

Tablo 2.2. Hücre kültürleri ile değerlendirilen hücresel fonksiyonlar ve test yöntemleri

Fonksiyon	Test
Enzim aktivitesi	MTT testi Alamar mavisi
Hücre canlılığı	Nötral kırmızı testi Propidium iodide boyaması
Hücre büyümesi	Hücre sayımı, kristal violet veya amidoblack boyaması Total protein değerlendirmesi DNA değerlendirmesi H-TDR uptake

Hücrelerde toksisite; mitokondrilerin, lizozomal fonksiyonların veya hücre zarı fonksiyonlarının etkilenmesiyle meydana gelmektedir. Bu şekilde oluşan sitotoksikite sonuçları sırasıyla; MTT testi, Nötral kırmızı testi ve Agar difüzyon testi ile değerlendirilmektedir ¹³³

MTT testi, kolorimetrik MTT testi dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde çok sık kullanılır. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Formazan oluşumu ise, spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesi veya test örneğinin çevresindeki formazan ışığın elektron mikroskobuyla belirlenmesi yöntemleriyle saptanmaktadır. ^{97, 134}

MTT testinde, canlı hücreleri belirlemek için tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenme özelliğinden yararlanır. Ölü hücrelerin bu boyayı indirgeme özelliğini yitirmesi optik yoğunluk ölçümlerinde yardımcı olan faktördür. Sağlam kalan

hücrelerdeki mitokondri, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilir. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu, soluk sarı renkli MTT boyası koyu, mavimor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.⁵⁷

Vital bir boya olan Nötral kırmızı, canlı hücre içerisinde birikmekte ve membranın hasar gördüğü durumlarda hücre dışına çıkmaktadır. Böylelikle membran geçirgenliği ve değişiklikleri Nötral kırmızı boyasıyla belirlenebilmektedir. Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu hemositometre adı verilen bölümlenmiş cam üzerine yerleştirilir ve optik mikroskop altında hemositometredeki canlı hücrelerin yüzde oranı tespit edilmektedir.^{135, 136}

Sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılan bazı boyalar ve değerlendirme kriterleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir.^{130, 137, 138}

Tablo 2.3. Sitotoksosite değerlendirmesinde kullanılan bazı boyalar ve kriterler

Değerlendirme	Ölçüm kriteri	Toksisite tipi değerlendirmesi
Nötral Red	Aktif endositoz, canlı lizozomdaki emilen boyayı ölçer	Hücre sayısı ve canlılığı değerlendirilir
MTT	Mitokondrial dehidrogenaz aktivitesini ölçer	Hücre sayısı ve canlılığı değerlendirilir
XTT	Mitokondrial dehidrogenaz aktivitesini ölçerek canlılığı değerlendirir	Hücre sayısı ve canlılığını değerlendirilir
Kenasid mavisi	Boya emilimini ölçerek hücredeki total proteini tespit eder	Hücrelerin emdiği boya miktarındaki değişime göre toplam hücre sayısı değerlendirilir
Asit fosfataz	Hücre-zar asit fosfataz aktivitesiyle hücre kitesini ölçer	Direkt hücre hasarı ölçülür
LDH	Hücre zarı geçirgenliğini ölçer	Hücre plazma zarı hasarı ölçülür

2.5.1. Oksidatif Stres

Aerobik organizmaların oksijen kullanımından sonra yaklaşık %1-2 oranında reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. ROM'un; mitokondriyal elektron transportu, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve çözünme reaksiyonlarında oluştuğu bildirilmiştir.²⁰ Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda vücudun; antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak ifade edilmekte olan oksidatif stresin gelişmekte olduğu ve biyomoleküllere çeşitli mekanizmalar yoluyla hasar verdiği belirtilmiştir.^{21, 22} Oksidatif stres, son yıllarda toksisitenin olası bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.²³

2.5.1.1. Serbest Radikaller

Serbest radikallerin, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diyabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiştir. Serbest radikallerde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunmaktadır. Bu nedenle diğer moleküllerle hızla reaksiyona girebilmekte ve bu moleküllerin de reaktif hale gelmelerine neden olmaktadır. Bu süreç araya bir antioksidan sistem girene kadar, zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir.^{139, 140}

Serbest radikallerin oluşması, savunma mekanizmalarının cevap veremeyeceği seviyelerde olduğu zaman oluşan serbest radikaller organizmada farklı hasarlara yol açabilmektedirler. Bu radikaller en fazla lipidler olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve enzimler gibi biyomoleküllerin hemen hepsini etkilemektedirler. Bu etkileşimler sonucunda meydana gelebilecek olan mutasyonlar neticesinde, oksidatif DNA hasarı kanser etkeni de olabilmektedir. Kanser kabaca, başlama, ilerleme ve tümör dönüşümü (progresyon) olmak üzere üç safhadan oluşan kompleks bir süreç olarak ifade edilmektedir. Bu süreçte, DNA mutasyonları, proto-onkojen aktivasyonları ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonlarının yanı sıra, oksidatif mekanizmaların da her aşamada etkin rol oynadığı belirtilmiştir.¹⁴¹

2.5.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin oluşumunu engellemek ve bunların meydana getirdiği hasarları sınırlandırmak için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştiği bildirilmiştir.¹⁴² Antioksidanlar, canlı hücrelerdeki protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyebilen veya geciktirebilen maddeler olarak tanımlanmakta, bu maddelerin işlevine ise antioksidan savunma adı verilmektedir.¹⁴³

Antioksidan savunmanın değişik Őekillerde olabildiği belirtilmiştir. Mevcut serbest radikalleri tutma veya çok daha zayıf olan yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki”; serbest radikallere bir H⁺ aktararak etkilerini azaltma veya etkisizleŐtirme işlemine “baskılayıcı etki”; serbest radikalleri kendilerine bağlamak suretiyle, serbest radikallerin diğer moleküllerle etkileŐerek onları reaktif hale getirdikleri reaksiyonları kesen etkiye “zincir kırıcı etki”; tamir işlemine de “onarıcı etki” denilmektedir.^{139, 142} Antioksidanlar endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olanlar Şeklinde iki grupta toplanmaktadır.¹⁴⁴⁻¹⁵⁰

2.5.2.1. Total Antioksidan Kapasitesi (TAK)

Vücutta metabolik ve fizyolojik süreçlerde oluşan ROM’yi uzaklaŐtırmak için enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalarla vücut için zararlı olabilecek birtakım oksidatif reaksiyonlar meydana gelmektedir. Nöropsikiyatrik bozuklukları da içeren yaklaşık yüzden fazla bozuklukta oksidanların uzaklaştırılması ve antioksidanların azalmasının engellendiği bildirilmiştir.¹⁴⁴ Antioksidan moleküllerinin zararlı olan bu oksidatif reaksiyonları engellendiği bildirilmiştir.¹⁵¹

Farklı antioksidanların plazma konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir; ancak, bu ölçümleri yapabilmek için kullanılacak olan tekniklerin; karmaşık, pahalı, zaman alıcı ve laboratuvar aşamalarının çok yoğun olması gibi dezavantajları nedeniyle örneklerin antioksidan kapasiteleri toplam olarak ölçülmektedir. Bu kapasiteye ise; total antioksidan kapasitesi (TAK), total antioksidan aktivitesi (TAA), total antioksidan status (TAS) ve total antioksidan yanıtı gibi isimler verilmektedir.^{152, 153}

TAK in vitro veya in vivo Şartlarda oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılmakta olup oksidanların kan veya diğer dokular üzerine olan direncini ortaya koymaktadır.¹⁵⁴ Son zamanlarda, in vitro Şartlarda yapılan bazı araştırmalarda oksidatif

strese karşı antioksidan sistemlerin oluşturduğu toplam cevabı belirlemek için çeşitli TAK tespit yöntemlerinin kullanıldığı belirtilmiştir.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

2.5.2.2. Total Oksidan Durumu (TOD)

Farklı oksidanların plazma konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir; ancak, bu ölçümleri yapabilmek için kullanılacak olan tekniklerin; karmaşık, pahalı, zaman alıcı ve laboratuvar aşamalarının çok yoğun olması gibi dezavantajları nedeniyle örneklerin oksidan kapasiteleri toplam olarak ölçülmektedir. Bu kapasiteye ise; total oksidan durumu (TOD), total oksidan status (TOS), total peroksit (TP), serum oksidasyon aktivitesi (SOA) ve reaktif oksijen metabolitleri gibi isimler verilmektedir.^{144, 158-163}

TOD değerlendirme yönteminin tam otomatik kolorimetrik bir yöntem olduğu belirtilmiştir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar, ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferrik iyona oksitlemekte ve ortamda gliserol bulunması bu reaksiyonu hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar *xylenol orange* ile renkli bir kompleks meydana getirmektedirler. Numunede bulunan oksidanların miktarının spektrofotometrik olarak ölçülebilen rengin yoğunluğu ile doğrudan ilişkili olduğu ifade edilmiştir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

Rezin restoratif materyallerden salınan monomerler veya iyonize radyasyon, ultraviyole ışınlar veya birtakım kimyasallar gibi diğer uyarıların, hücrelerde redoks düzenleme kapasitesinin üzerinde ROM oluşturmasının oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Hücrede redoks homeostazının bozulmasının, kısmen veya tamamen hücre içi antioksidan sisteminin azalmasına bağlı olduğu bildirilmiştir.^{167, 168}

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından (2011/34) desteklenmiş ve Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurul Başkanlığı'nın (30.06.2011 tarih ve 2011.3.1/1 sayılı) izni ile Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmada çocukların diş tedavilerinde yaygın olarak kullanılan 7 farklı, rezin içerikli materyalin hücre kültürü üzerine zamana bağlı sitotoksik etkileri araştırıldı (Tablo 3.1). Bu amaç için in vitro sitotoksikite testlerinden direkt temas test yöntemi ve hücre canlılığını belirleyen MTT testi kullanıldı. Kullanılan materyaller ve içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan materyaller, içerikleri ve üretici firmalar

Materyal	Firma	İçerik
Admira	VOCO	Bis-GMA, TEGDMA, BHT(Butil Hidroxi Toluen), Diüretandimetakrilat
Clearfil Majesty Esthetic	Kuraray Europe	Bis-GMA, Hydrophobic aromatic dimethacrylate Hydrophobic aliphatic methacrylate, Silanated barium glass filler Pre-polymerized organic filler dl-Camphorquinone, Initiators, Accelerators, Pigment
Filtek™ Silorane	3M ESPE, St. Paul, Minn, USA	Silorane (3,4 epoxycyclohexylethylcyclo-polymethylsiloxane, bis-3,4-epoxycyclohexylethyl-phenylmethylsilane), Silicon dioxide, ytterbium trifluoride (76%)
Fuji II LC	GC Corporation	Powder: luoroaluminosilicate glass, polyacrylic acid Liquid: water, polyacrylic acid, HEMA
Glasiosite	VOCO	Bis-GMA, TEGDMA, BHT, Diüretandimetakrilat
Grandio Flow	VOCO	(poly)methylene dimethacrylate (HEDMA), Bis-GMA, TEGDMA, BHT
Twinky Star	VOCO	Bis-GMA, TEGDMA, BHT, Diüretandimetakrilat

3.1. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan bütün materyaller görülebilir mavi ışıkla sertleşebilen materyallerden oluşmaktadır. Polimerize edilmemiş test materyalleri, özel olarak hazırlanmış olan teflon bir kalıp (8 mm çapında ve 2 mm kalınlığında) içerisine yerleştirilmiş ve oksijen inhibisyonunu engelleyecek şekilde her iki yüzeyden de şeffaf bantlarla ve düzgün yüzeyli camlarla baskılanmıştır. Üretici firmaların önerilerine göre 450 nm dalga boyunda görülebilir mavi LED ışık ile (Elipar™ S10 FreeLight 2 LED Curing Light, 3M ESPE), tek bir ışık kaynağıyla tek yüzeyden ve 2 mm mesafeden 40 s polimerize edilmiştir. Örneklerin yüzey alanının solüsyon hacmine oranı, ISO

standartlarının önerdiği 0.5-6.0 cm²/ml aralığına uygun bir biçimde yaklaşık 3.17 cm²/ml olarak ayarlanmıştır. Işık kaynağının ışın yoğunluğu 1200 mW/cm², ışık ucunun başlangıç çapı 10 mm ve son çapı 8 mm'dir. Hazırlanan materyaller 48 gözlü platalere yerleştirilmeden önce; otoklavda, 121°C'de, 1 atmosfer basınçta ve 15 dakika basınçlı buhar ile sterilize edilmiştir.

3. 2. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada, rutin genetik kontroller için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran bireylerden, ebeveyn oluruyla elde edilen amniyon sıvısının ihtiyaten bekletilen kısımları, ön incelemelerde sonuç alındıktan ve genetik olarak bireyin normal olduğu belirlendikten sonra, atılacak olan amniyon sıvısından hazırlanan insan fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Çözünmüş stok halindeki hücreler 5 dk. süreyle 800 devirde santrifüj (Herause,Germany) edilmiştir. Santrifüj sonrası, yüzeydeki süpernatant kısım atılarak pellet içerisindeki hücreler, içinde %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom AG, Germany, SO113) ve %1 gentamisin içeren Dulbecco Modified Eagle's Medium- DMEM (Hyclone, England, AQF24057) besi ortamı ile 25 cm² hücre kültürü üretme kabına (flask) (Şekil 3.2) alınmıştır. Bir hafta sonunda inverted mikroskop (Olympus CK 40, Japan) (Şekil 3.3) ile hücrelerin flask tabanını kaplayıp kaplamadıkları ve sağlıklı bir şekilde üreyip üremedikleri kontrol edilmiştir. Hücreler flask tabanını tamamen kapladıklarında kültür kabındaki besi yeri (medyum) aspire edilmiştir. Divalent katyonları (Ca⁺⁺; Mg⁺⁺) içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzeyi yıkanarak kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylelikle serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisini inhibe etmesi önlenmiştir. Kültür daha sonra tripsin / etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (%0.05 %0.02, Biochrom AG, Germany) solüsyonu ile yıkandı ve 37 °C ve %5 kısmi CO₂ basıncındaki inkübatörde (NuAire,

Inc. Plymouth, U.S.A.) (Şekil 3.4) yaklaşık olarak 5-10 dk inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin flask tabanından ayrıldıkları görülmüştür. Yüzeiden ayrılan hücrelere %10 serum içeren yeni medyum ilave edilmiş ve hücreler pipetajla karıştırıldıktan sonra 5 dk. süreyle santrifüj işlemine tutulmuşlardır. (800-1000 rpm) Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet içerisindeki hücreler tekrar, 37 °C sıcaklıkta %10 serum ve %1 antibiyotikli DMEM medyum ile homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonu 48 gözlü well plakelere bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlanmıştır.



Şekil 3.2. Hücre kültürlerinin üretim kabı (Flask)



Şekil 3.3 İverted mikroskop



Şekil 3.4. CO₂'li etüv (İnkübatör)

3. 3. Well Platelerin Hazırlanması

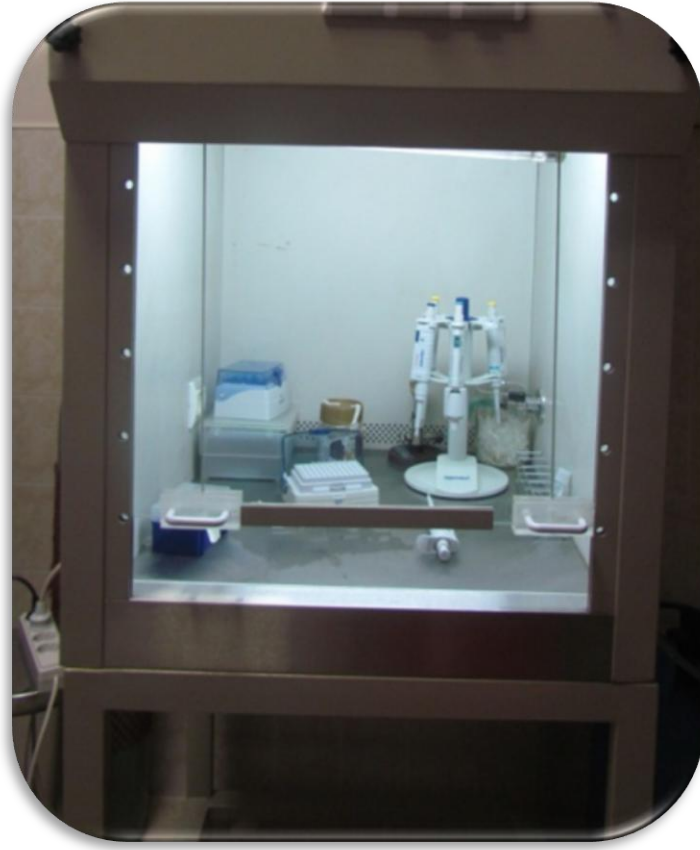
Logaritmik üreme tarzında olan, aktif ve yüzeyi %90-95 oranında kaplamış hücreler, pasajlama işleminde olduğu gibi flask tabanından ayrılmış ve taze medyum ile hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. 48 gözlü well-plate'lerin materyallerin yerleştirileceği her bölmesine hazırlanan 200 ml hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. Aynı yöntemle 3 adet 48 gözlü well-plate'de hazırlanmıştır. 5. günde kültür ortamındaki DMEM medyum aspire edilerek uzaklaştırılmış ve yerine taze medyum ilave edildikten sonra tekrar 37 °C'deki %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. %5 CO₂'li ve 37 °C de nemli ısıdaki 7 günlük inkübasyon süresi sonunda hazırlanan well-plate'te hücrelerin tüm gözlerinin tabanını tamamen doldurup doldurmadığı inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Deney öncesinde hücrelerin gözleri tamamen doldurduğu ve fibroblast hücrelerinin karakteristik iğsi yapısı ışık mikroskopunda incelenmiştir.

Otoklavda (Lisa 300, W&H) (Şekil 3.5) sterilize edilen örnekler; daha sonra, steril bir presel yardımıyla, steril kabin içerisinde (Şekil 3.6) teker teker ve hücrelerle doğrudan temas edecek şekilde 48 gözlü well-plate'lere taşınmıştır. (Şekil 3.7)

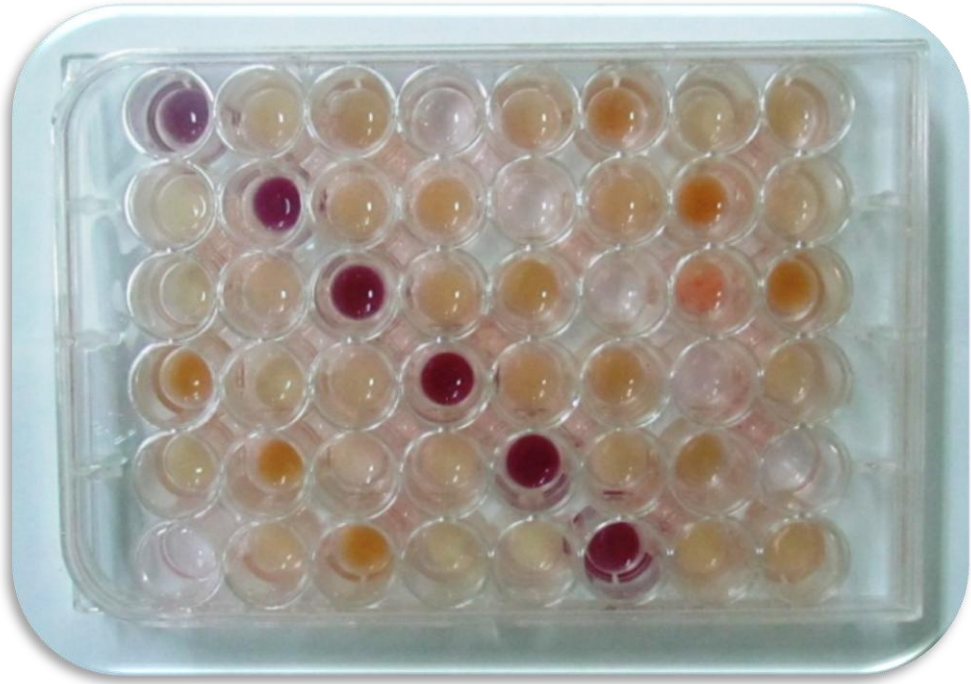
37 °C'deki %5 CO₂'li inkübatörde 24saat, 72saat ve 7 günlük inkübasyon süresi sonunda MTT testi ile hücre canlılıkları, toplam antioksidan kapasiteleri (TAK) ve toplam oksidan durumları (TOD) değerlendirilmiştir. Bu işlemlerin tamamı 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki her bir test için ayrı ayrı uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Otoklav(Sterilizatör)



Şekil 3.6. Steril kabin



Şekil 3.7. Materyallerin yerleştirildiği 48 gözlü plate

3. 4. MTT Testi

Materyallerin sitotoksitelerinin belirlenmesi için, ‘direkt temas test metodu’ uygulanarak, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltatrazilyum bromid içeren MTT maddesi ile (Sigma Aldrich inc, St. Louis, USA) değerlendirme yapılmıştır. MTT testi ile sitotoksiteyi belirlemek için 1 ml PBS içinde 5 mg MTT tozu olacak şekilde hazırlanan karışım, 0.20 µm’lik steril filtreden (Corning, Wiessbaden, Almanya) geçirilerek dış yüzeyi aliminyum folyo ile kaplandıktan sonra +4 °C’de kullanılacağı zamana kadar bekletilmiştir. İnkübe edilen hücrelerin ortam sıvıları çekildikten sonra, daha önceden hazırlanmış olan örnekler her kuyucuğa yerleştirilerek 24 saat, 72 saat ve 7 gün süreyle 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Böylece, kullanılan materyallerin 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

İnkübasyon periyodundan sonra, toksisite testine geçilmiştir. Fibroblastlarda hücre canlılık oranları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu test sisteminde canlı hücreler belirlenmiştir. İlk olarak, 48 gözlü well plateler ters çevrilerek materyaller ve medyum kültüründen uzaklaştırılmış ve 500 µl PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 50 µl / kuyucuk MTT sıvısı + 500 µl / kuyucuk DMEM ilave edilerek 4 saat süreyle 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

MTT maddesinin uygulanması sonucu oluşan formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için 99.4 ml dimetilsülfoksit (DMSO), 0.6 ml (HCl) ve 10 g sodyumlaurilsülfat (SDS) içeren karışımdan 500 µl / kuyucuk olacak şekilde ilave edilerek 8 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Üstte kalan sıvı alındıktan sonra her göz, önce 300 µl %1’lik formik asitle (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) sonra da 300 µl %1’lik asetik asitle (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) yıkanmıştır. Bu yıkama işleminin ardından absorbans, (optik yoğunluk) spektrofometrede (µQuant, Bad

Friedrichshall, Biotek) 550 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 3. 8). Fibroblast hücre kültür kaplarında spektrofotometrik olarak ölçülen ve bire bir ortamdaki canlı hücre sayısı tespit edilmiştir. Bu işlemler 72 saat ve 7 gün sonunda da aynen tekrarlanmıştır.



Şekil 3. 8. Bilgisayar destekli spektrofotometre

3. 5. Biyokimyasal Analizler

Kullanılan materyallerin zamana bağlı olarak fibroblast kültürleri üzerine biyokimyasal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) ölçülmüştür.

3. 5. 1. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK)

TAK düzeyi tespitinde, ilk olarak Tomasch ve ark.¹⁶⁹ tarafından uygulanan fotomerik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics[®] (Gaziantep, Turkey) firması tarafından üretilen TAK ticari kitleri kullanılmıştır.¹⁵²

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml

- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm’de ilk absorbans okunmuştur. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. Bekleme sonunda 660 nm’de ikinci kez absorbans okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir.

$$\text{TAK} \left(\text{mmol Trolox Equiv./L} \right) = \frac{(\Delta \text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta \text{Örneğin değeri})}{(\Delta \text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta \text{Standart 2'nin absorbansı})} \times 20$$

3. 5. 2. Toplam Oksidan Durum (TOD)

TOD tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-o-dianisidin yapısını ferrik iyonla oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar *xylenol orange* ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOD ticari kitleri kullanılmıştır.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm’de ilk absorbansı okunmuştur. Daha sonra aynı

küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiş ve 530 nm'de ikinci kez absorbansı okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir. Bu işlemler 72 saat ve 7 gün sonra da aynen tekrarlanmıştır.

$$\text{TOD} \left(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv.}/L \right) = \frac{(\Delta \text{Örneğin değeri})}{(\Delta \text{Standart 2'nin değeri})} \times \text{Standart 2 değeri}$$

3. 6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen değerler, ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. Verilerin analizi için SPSS 20.0 programı kullanılmıştır. Tespit edilen MTT, TAK ve TOD değerlerinin gruplar arası zamanla değişimi için tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi, gruplar arası farkların analizi için ise, Post-hoc LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Bütün analizlerde $p < 0.05$ anlam düzeyi dikkate alınmıştır

4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Bulguları

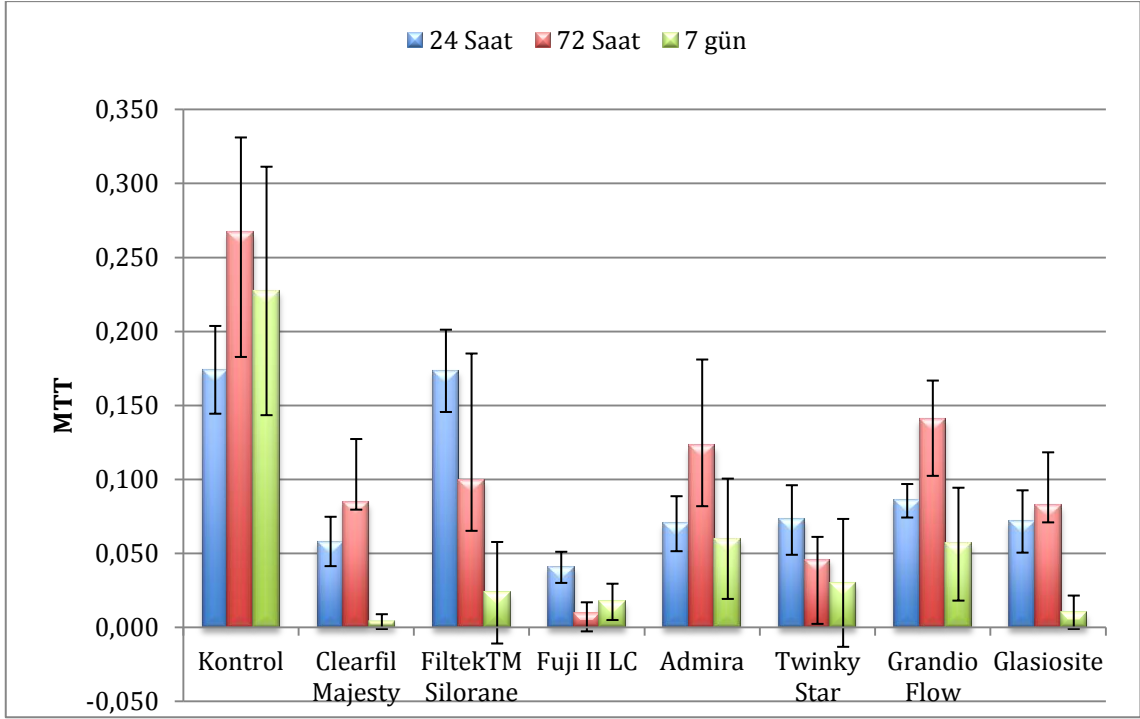
İnsan fibroblast hücrelerine doğrudan temas yöntemiyle uygulanan, görülebilir mavi ışıkla sertleşebilen 7 farklı materyalin ve herhangi bir materyal uygulanmamış olan kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7gün sonunda gözlemlenen MTT testi sonuçları grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.1’de verilmiştir (Şekil 4.1).

24 saat sonraki değerlerde Filtek™ Silorane grubunun ortalama değerleri kontrol grubuna benzer iken, diğer bütün gruplarda hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. MTT değerlerine göre 72 saat ve 7 gün sonra grupların tamamında toksik etki tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

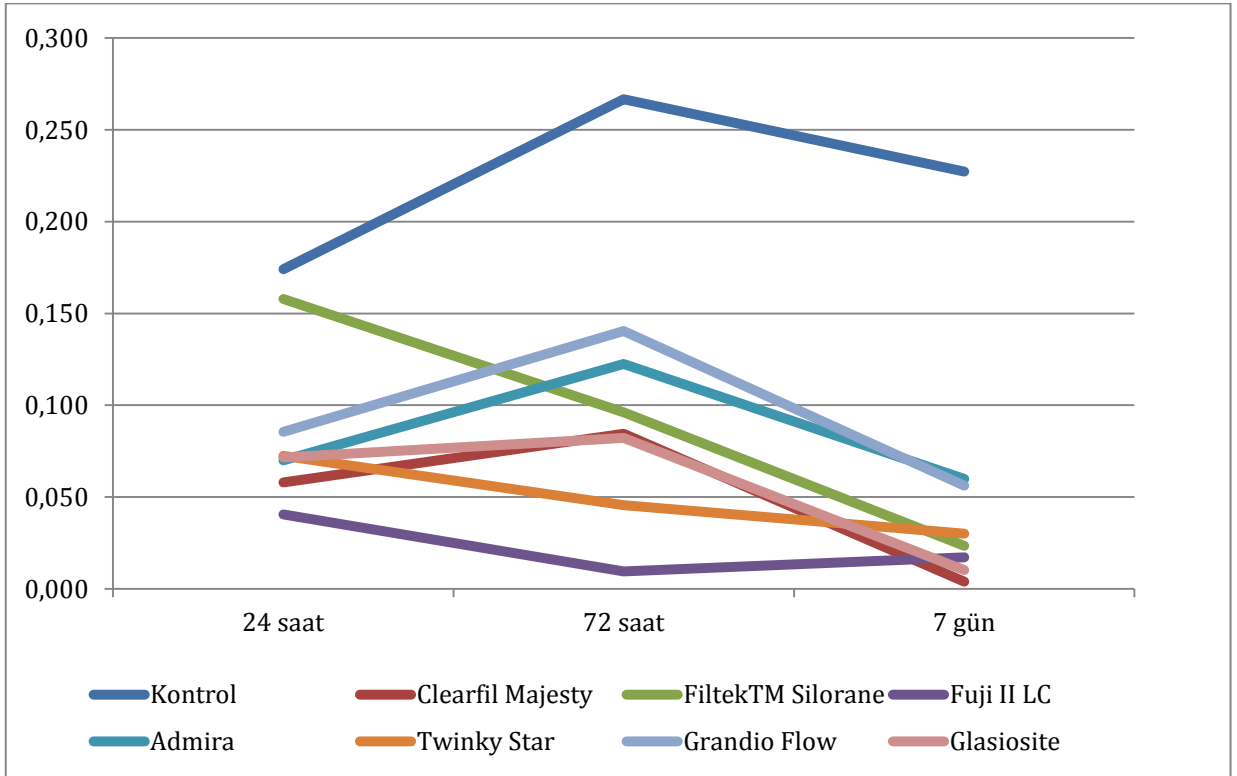
Tablo 4.1. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki MTT test değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

Grup	24 Saat	72 Saat	7gün
	Ortalama±SS	Ortalama ±SS	Ortalama ±SS
Kontrol	0.174±0.03	0.267±0.06	0.227±0.08
Clearfil Majesty	0.058±0.02*	0.085±0.04*	0.004±0.01*
Filtek™ Silorane	0.173±0.03	0.100±0.09*	0.023±0.03*
Fuji II LC	0.041±0.01*	0.010±0.01*	0.017±0.01*
Admira	0.070±0.02*	0.123±0.06*	0.060±0.04*
Twinky Star	0.073±0.02*	0.046±0.02*	0.030±0.04*
Grandio Flow	0.086±0.01*	0.141±0.03*	0.056±0.04*
Glasiosite	0.072±0.02*	0.082±0.04*	0.010±0.01*
Toplam	0.093±0.05	0.106±0.09	0.053±0.08

* Kontrol grubundan farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05). SS: Standart Sapma



Şekil 4.1. Grupların 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki MTT test değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.



Şekil 4.2. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin zamanla değişimleri

24 saat sonunda MTT testi sonuçlarına göre; bütün gruplar hücre canlılığını azaltırken, en toksik etkiyi Fuji II LC göstermiştir. Filtek™ Silorane grubundaki azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0.96). Diğer gruplardaki değişiklikler, Kontrol (p<0.001), Filtek™ Silorane (p<0.001) ve Fuji II LC gruplarıyla (p<0.05) ve Clearfil Majesty grubu ile Grandio Flow grubu ikili olarak karşılaştırıldığında (p=0.03), istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterirken kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. MTT testinin 24 saatlik grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.

24 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.000*	X						
Filtek™ Silorane	0.956	0.000*	X					
Fuji II LC	0.000*	0.156	0.000*	X				
Admira	0.000*	0.327	0.000*	0.019*	X			
Twinky Star	0.000*	0.238	0.000*	0.012*	0.837	X		
Grandio Flow	0.000*	0.028*	0.000*	0.001*	0.208	0.289	X	
Glasiosite	0.000*	0.271	0.000*	0.014*	0.902	0.935	0.254	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05).

72 saat sonunda MTT testi sonuçlarına göre; Filtek™ Silorane, Fuji II LC, Twinky Star ve Glasiosite grupları hücre canlılığını azaltırken, en toksik etkiyi Fuji II LC, Twinky Star ve Filtek™ Silorane göstermiştir. Filtek™ Silorane grubundaki canlılık oranı kontrol grubuna oranla, %91'den %36'ya gerilemiştir. Kontrol grubu ile diğer bütün gruplar arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.001). Fuji II LC uygulanan grup ve Twinky Star uygulanan grup (p=0.21) dışındaki bütün gruplarla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (p<0.05). Grandio Flow

grubu, Twinky Star ve Glasiosite gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Twinky Star ve Admira grupları ikili olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p=0.009$). Diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. MTT testinin 72 saatlik grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.

72 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.000*	X						
Filtek™ Silorane	0.000*	0.597	X					
Fuji II LC	0.000*	0.011*	0.003*	X				
Admira	0.000*	0.184	0.419	0.000*	X			
Twinky Star	0.000*	0.173	0.062	0.208	0.009*	X		
Grandio Flow	0.000*	0.053	0.153	0.000*	0.526	0.002*	X	
Glasiosite	0.000*	0.934	0.541	0.014*	0.160	0.200	0.041*	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($n=6$, $p<0.05$).

7 gün sonunda MTT testi sonuçlarına göre; Fuji II LC dışındaki bütün gruplar hücre canlılığını azaltırken, en toksik etkiyi, Filtek™ Silorane, Glasiosite, Grandio Flow ve Clearfil Majesty grupları göstermiştir. Kontrol grubu ile diğer bütün gruplar arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Clearfil Majesty grubu Admira ve Grandio Flow gruplarıyla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Glasiosite ve Admira grupları ikili olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiştir ($p=0.04$). Diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. MTT testinin 7 gün grubunda materyallerin ikili olarak karşılaştırılması.

7 gün	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.000*	X						
Filtek™ Silorane	0.000*	0.416	X					
Fuji II LC	0.000*	0.577	0.796	X				
Admira	0.000*	0.023*	0.132	0.080	X			
Twinky Star	0.000*	0.277	0.780	0.592	0.216	X		
Grandio Flow	0.000*	0.033*	0.174	0.108	0.878	0.277	X	
Glasiosite	0.000*	0.791	0.582	0.769	0.043*	0.408	0.060	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05).

Grupların, grup içi zamana bağlı ve grup-zaman etkileşimleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Grup içi karşılaştırmalarda bütün grupların MTT değerleri 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (p<0.001).

Tablo 4.5. Grupların zamana bağlı olarak ve grup-zaman etkileşimleri.

Etkileşim	Değer	p değeri
Zaman	0.637	0.000
Zaman * Grup	1.001	0.000

Grup içi karşılaştırmalar ve grup- zaman etkileşimi için p <0.001

24 ve 72 saat sonra değerler arasında grup-zaman etkileşimi içi değişimler istatistiksel olarak anlamlı değilken (p=0.084), 72 saat ve 7 gün sonundaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001) (Tablo 4.6). Ayrıca 24 saat 72 saat ve 7 gün sonundaki grup-zaman etkileşim değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p=0.035) (Tablo 4.6).

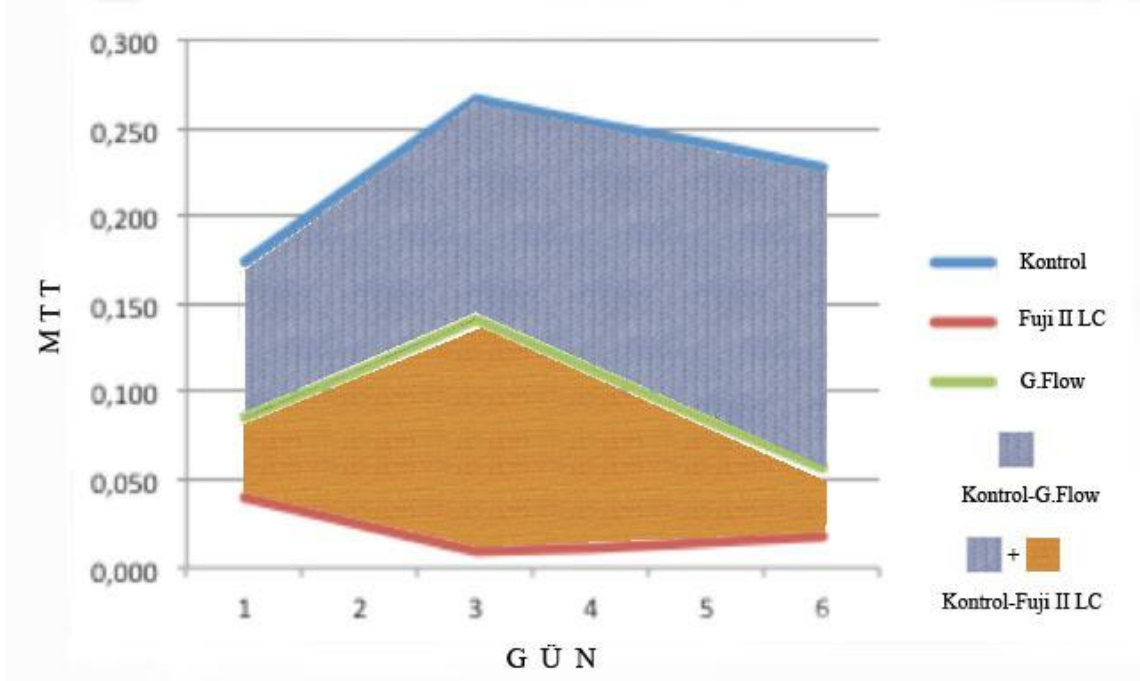
Tablo 4.6. Grup içi, zamana bağlı ve grup–zaman etkileşimleri ve gruplar arası değişimlerin istatistiksel önem değerleri.

Kaynak	Zaman	P değeri
Zaman	24 ve 72 saat	0.084
	72 saat - 7 gün	0.000
Zaman * Grup	24 ve 72 saat	0.000
	72 saat - 7 gün	0.035
Grup		0.000

Şekil 4.2’de kontrol grubu ile çalışma gruplarının MTT grafikleri arasında kalan alanlar Tablo 4.8’de verilmiştir. Tablo 4.7’ye göre restoratif materyallerin toksisite sıralaması şu şekildedir: Fuji II LC > Twinky Star > Clearfil Majesty > Glasiosite > Filtek™ Silorane > Admira > Grandio Flow.

Tablo 4.7. Kontrol grubu ile çalışma gruplarının MTT grafikleri arasında kalan alan.

Grup	Kontrol grubu ile arada kalan alan
Kontrol	0
Fuji II LC	1.09
Twinky Star	0.95
Clearfil Majesty	0.91
Glasiosite	0.89
Filtek™ Silorane	0.75
Admira	0.72
Grandio Flow	0.66



Şekil 4.3. Kontrol grubu ile Fuji II LC ve Grandio Flow materyallerinin MTT grafikleri arasında kalan alanlar.

4.2. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK) Bulguları

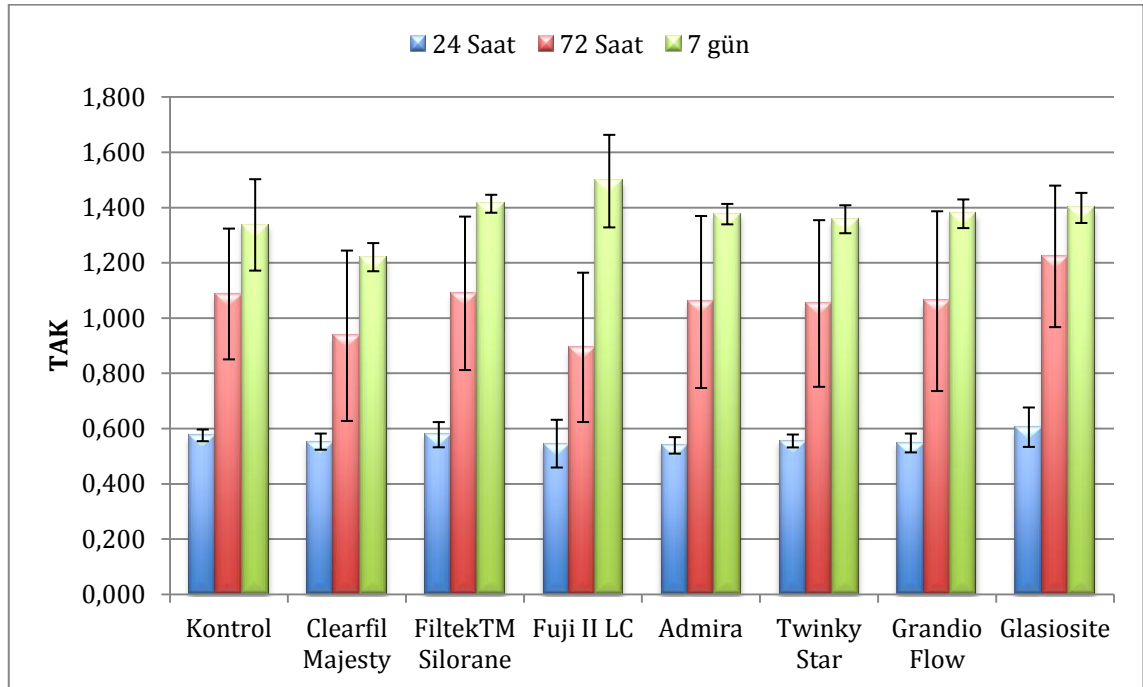
İnsan fibroblast hücrelerine doğrudan temas yöntemiyle uygulanan, görülebilir mavi ışıkla sertleşebilen 7 farklı materyalin ve herhangi bir materyal uygulanmamış olan kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda gözlenen TAK bulgularının grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.8’de gösterilmiştir (Şekil 4.4). Başlangıçtan 7 günün sonuna kadar bütün TAK değerleri belirgin bir şekilde artış göstermiştir. 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda grupların tamamında TAK değerleri birbirine çok yakın bir değişim sergilemiştir ve diğer gruplar arasında 24 ve 72 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Fuji II LC grubunun TAK değerleri 7 gün sonunda diğer gruplardan ve kontrol grubundan daha fazla artış gösterirken, Clearfil Majesty grubunun TAK değerleri diğer gruplara ve kontrol grubuna oranla daha az artış göstermiştir. Fuji II LC ve Clearfil Majesty grupları

ile kontrol grubunun TAK değerleri 7 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$) (şekil 4.5).

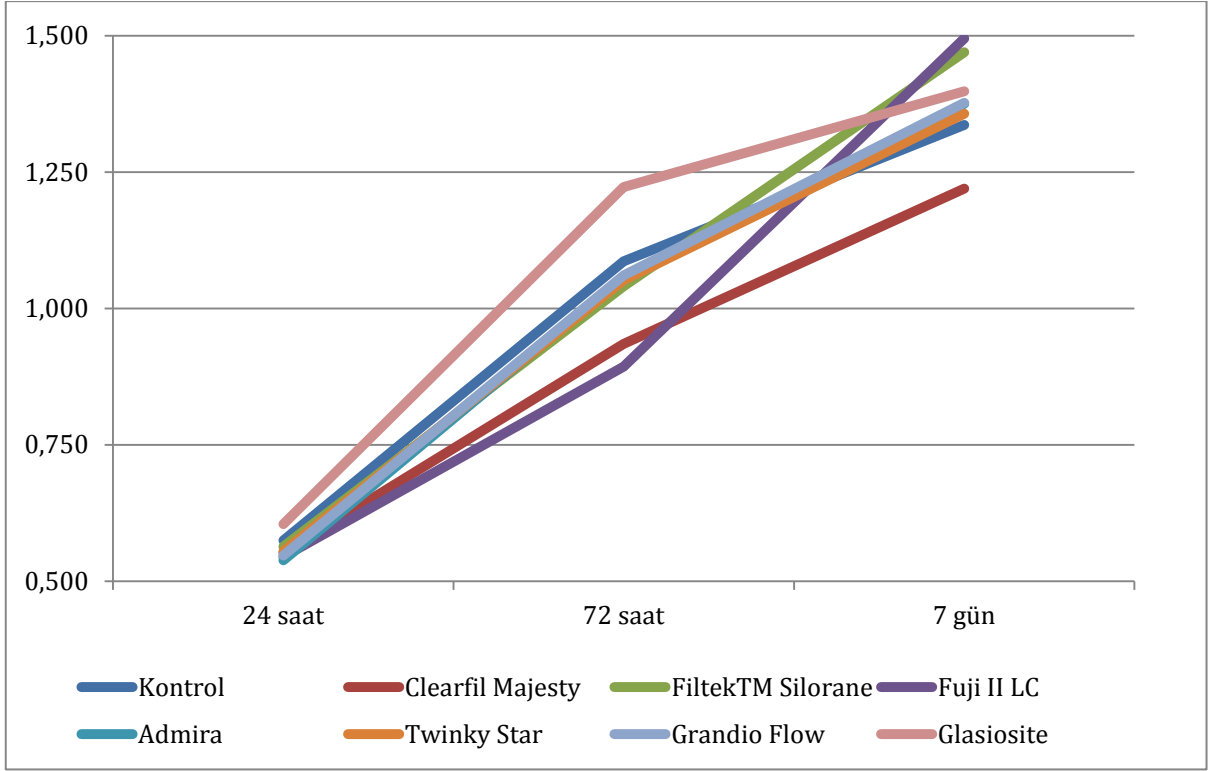
Tablo 4.8. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TAK değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	24 Saat	72 Saat	7 Gün
	Ortalama±S.S	Ortalama±S.S	Ortalama±S.S
Kontrol	0.575±0.02	1.087±0.24	1.337±0.17
Fuji II LC	0.552±0.03	0.936±0.31	1.220±0.05*
Twinky Star	0.578±0.05	1.089±0.28	1.413±0.03
Clearfil Majesty	0.545±0.09	0.894±0.27	1.495±0.17*
Glasiosite	0.539±0.03	1.058±0.31	1.376±0.04
Filtek™ Silorane	0.555±0.02	1.052±0.30	1.357±0.05
Admira	0.547±0.03	1.061±0.33	1.377±0.05
Grandio Flow	0.605±0.07	1.223±0.26	1.398±0.05
Toplam	0.562±0.05	1.050±0.28	1.372±0.11

* Kontrol grubundan farklılığı göstermektedir (n=6, $p<0.05$). S.S: Standart Sapma



şekil 4.4. Grupların 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TAK değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.



Şekil 4.5. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin TAK değerlerinin zamanla değişimi

Şekil 4.5'te 24. saat sonundan 72. saat sonuna kadar bütün grupların düzenli bir şekilde artış gösterdikleri görülmektedir. Fuji II LC grubunda 72 saat ve 7 gün arasında grafik eğimi artarken, diğer gruplarda eğim azalmıştır. Bununla beraber hızı azalmasına rağmen TAK değerleri artmaya devam etmiştir. Fuji II LC grubunda 7gün sonunda en yüksek TAK değeri bulunurken en düşük TAK değeri Clearfil Majesty grubunda elde edilmiştir.

24 saat sonunda elde edilen TAK bulgularına göre, Glasiosite grubunun değerleri ile, Fuji II LC, Admira ve Grandio Flow grubu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamı tespit edilmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. 24 saat grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

24 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.417	X						
Filtek™ Silorane	0.931	0.370	X					
Fuji II LC	0.286	0.795	0.250	X				
Admira	0.198	0.628	0.171	0.822	X			
Twinky Star	0.468	0.931	0.417	0.729	0.568	X		
Grandio Flow	0.326	0.862	0.286	0.931	0.755	0.795	X	
Glasiosite	0.294	0.067	0.335	0.038*	0.023*	0.080	0.046*	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05).

72 saat sonunda elde edilen TAK bulgularına göre, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. 72 saat grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

72 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.368	X						
Filtek™ Silorane	0.989	0.360	X					
Fuji II LC	0.251	0.801	0.245	X				
Admira	0.862	0.466	0.851	0.328	X			
Twinky Star	0.837	0.486	0.825	0.344	0.974	X		
Grandio Flow	0.876	0.455	0.865	0.320	0.986	0.960	X	
Glasiosite	0.417	0.091	0.425	0.054	0.326	0.310	0.334	X

7 gün sonunda elde edilen TAK bulgularına göre, Clearfil Majesty grubu ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiştir ($p<0.05$). Fuji II LC grubunun TAK değerleri, Filtek Silorane ve Glasiosite grupları ($p>0.05$) dışındaki bütün grupların TAK değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Diğer grupların 7 gün sonundaki TAK değerleri birbirleriyle ikili olarak karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. 7 gün grubunda materyallerin TAK değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

7 gün	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.035*	X						
Filtek™ Silorane	0.160	0.001*	X					
Fuji II LC	0.005*	0.000*	0.133	X				
Admira	0.471	0.006*	0.487	0.031*	X			
Twinky Star	0.704	0.014*	0.301	0.014*	0.732	X		
Grandio Flow	0.456	0.005*	0.502	0.033*	0.980	0.713	X	
Glasiosite	0.257	0.002*	0.780	0.077	0.676	0.448	0.694	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($n=6$, $p<0.05$).

Grupların, grup içi zamana bağlı ve grup-zaman etkileşimleri Tablo 4.12’de gösterilmiştir. Grup içi karşıştırmalarda bütün grupların TAK değerleri 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.001$). Bütün gruplarda, grup- zaman etkileşimi bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 4.12. Grupların zamana bağlı olarak ve grup-zaman etkileşimleri.

Etkileşim	Değer	p değeri
Zaman	0.671	0.000
Zaman * Grup	0.780	0.000

Grup içi karşılaştırmalar ve grup- zaman etkileşimi için $p < 0.001$

24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo 4.13). TAK değerlerinin değişimi 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda, zamanla farklılık göstermiştir, yani grup - zaman etkileşimi gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). TAK değerlerinin değişimi 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda, gruplara göre farklılık göstermiştir ($p < 0.001$).

Tablo 4.13. Grup içi, zamana bağlı ve grup-zaman etkileşimleri ve gruplar arası değişimlerin istatistiksel önem değerleri.

Kaynak	Zaman	p değeri
Zaman	24 ve 72 saat	0.000
	72 saat ve 7 gün	0.000
Zaman * Grup	24 ve 72 saat	0.000
	72 saat ve 7 gün	0.000
Grup		0.000

4.3. Toplam Oksidan Durumu (TOD) Bulguları

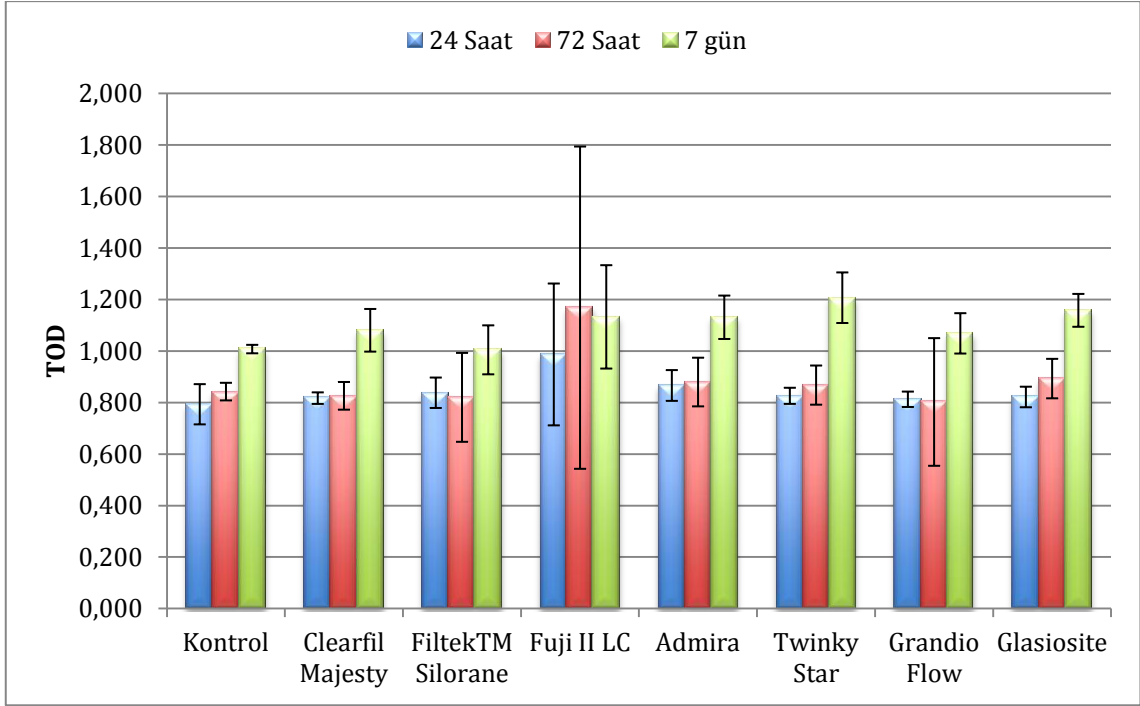
İnsan fibroblast hücrelerine doğrudan temas yöntemiyle uygulanan, görülebilir mavi ışıkla sertleşebilen 7 farklı materyalin ve herhangi bir materyal uygulanmamış olan kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda gözlenen TOD bulgularının grup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.14'te verilmiştir (Şekil 4.6). Başlangıçtan 72 saatin sonuna kadar Fuji II LC grubunun TOD değerleri diğer gruplardan belirgin bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. 24 saat sonunda Fuji II LC

grubunun TOD değerleriyle, kontrol grubu ve diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). TOD değerleri 72 saat sonunda Fuji II LC grubunun Admira grubu dışındaki bütün grupların TOD değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Fuji II LC, Admira, Twinky Star ve Glasiosite gruplarının TOD değerleri 7 gün sonunda kontrol grubunun TOD değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.7).

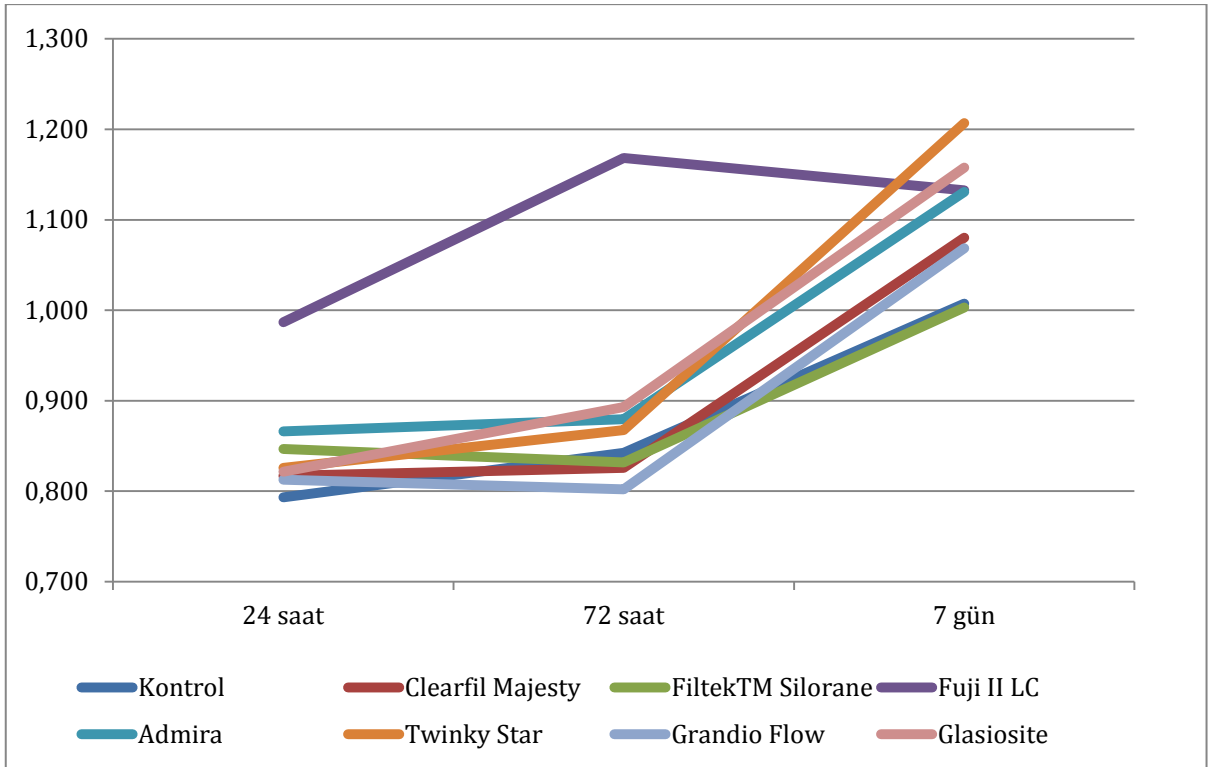
Tablo 4.14. Kullanılan 7 farklı materyalin ve kontrol grubunun 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TOD değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	24 Saat	72 Saat	7 gün
	Ortalama±S.S	Ortalama±S.S	Ortalama±S.S
Kontrol	0.793±0.08	0.842±0.03	1.007±0.02
Clearfil Majesty	0.817±0.02	0.826±0.05	1.080±0.08
Filtek™ Silorane	0.838±0.06	0.820±0.17	1.004±0.10
Fuji II LC	0.987±0.28*	1.168±0.63*	1.132±0.20*
Admira	0.866±0.06	0.879±0.09	1.131±0.08*
Twinky Star	0.826±0.03	0.868±0.08	1.207±0.10*
Grandio Flow	0.813±0.03	0.802±0.25	1.068±0.08
Glasiosite	0.821±0.04	0.893±0.08	1.158±0.06*
Toplam	0.845±0.11	0.887±0.26	1.099±0.12

* Kontrol grubundan farklılığı göstermektedir (n=6, $p<0.05$). S.S: Standart Sapma



Şekil 4.6. Grupların 24saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki TOD değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve 7 farklı materyalin TOD değerlerinin zamanla değişimi

24 saat sonunda elde edilen TOD bulgularına göre, Fuji II LC grubunun değerleri Admira grubu ($p=0.06$) dışındaki grupların TOD değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p<0.05$). Diğer grupların 24 saat sonundaki TOD değerleri birbirleriyle ikili olarak karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. 24 saat grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

24 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.704	X						
Filtek™ Silorane	0.477	0.740	X					
Fuji II LC	0.003*	0.009*	0.022*	X				
Admira	0.248	0.435	0.652	0.060	X			
Twinky Star	0.602	0.887	0.849	0.014*	0.522	X		
Grandio Flow	0.758	0.943	0.687	0.008*	0.395	0.831	X	
Glasiosite	0.652	0.943	0.794	0.011*	0.477	0.943	0.887	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($n=6$, $p<0.05$).

72 saat sonunda elde edilen TOD bulgularına göre, Fuji II LC grubunun değerleri Admira ve Glasiosite grupları ($p>0.05$) dışındaki grupların değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p<0.05$). Diğer grupların 72 saat sonundaki TOD değerleri birbirleriyle ikili olarak karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. 72 saat grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

72 Saat	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.911	X						
Filtek™ Silorane	0.879	0.968	X					
Fuji II LC	0.031*	0.024*	0.021*	X				
Admira	0.799	0.714	0.684	0.054	X			
Twinky Star	0.863	0.776	0.745	0.045*	0.935	X		
Grandio Flow	0.784	0.871	0.903	0.016*	0.598	0.655	X	
Glasiosite	0.730	0.648	0.619	0.066	0.927	0.863	0.536	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05).

7 gün sonunda elde edilen TOD bulgularına göre, Filtek silorane ve kontrol gruplarının değerleri; Fuji II LC, Admira, Twinky Star ve Glasiosite gruplarının değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (p<0.05). Twinky Star grubunun 7 gün sonundaki TOD değerleri Grandio Flow ve Clearfil Majesty gruplarının değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir (p<0.05). Diğer grupların 7 gün sonundaki TOD değerleri birbirleriyle ikili olarak karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (p>0.05) (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. 7 gün grubunda materyallerin TOD değerlerinin ikili olarak karşılaştırılması.

7 gün	Kontrol	Clearfil Majesty	Filtek™ Silorane	Fuji II LC	Admira	Twinky Star	Grandio Flow	Glasiosite
Kontrol	X							
Clearfil Majesty	0.223	X						
Filtek™ Silorane	0.960	0.205	X					
Fuji II LC	0.040*	0.382	0.036*	X				
Admira	0.043*	0.396	0.038*	0.980	X			
Twinky Star	0.002*	0.038*	0.001*	0.214	0.205	X		
Grandio Flow	0.307	0.481	0.284	0.284	0.295	0.024*	X	
Glasiosite	0.015*	0.197	0.013*	0.670	0.652	0.410	0.138	X

* İstatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir (n=6, p<0.05).

Grupların, grup içi zamana bağlı ve grup-zaman etkileşimleri Tablo 4.18'de gösterilmiştir. Grup içi karşılaştırmalarda bütün grupların TOD değerleri 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiştir (p<0.001). Bütün gruplarda, grup- zaman etkileşimi bulunmuştur (p<0.001).

Tablo 4.18. Grupların zamana bağlı olarak ve grup-zaman etkileşimleri.

Etkileşim	Değer	p değeri
Zaman	0.903	0.000
Zaman * grup	0.506	0.034

Grup içi karşılaştırmalar ve grup-zaman etkileşimi için p <0.05

24 ve 72 saat sonundaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0.319). 72 saat ve 7 gün sonundaki değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0.001) (Tablo 4.19). 24 saat, 72 saat ve

7 gün sonunda, gruplardaki TOD değerlerinin değişimi zamanla farklılık göstermemiştir, yani grup-zaman etkileşimi bulunmamış ve TOD değerleri açısından gruplar birbirlerine benzer şekilde davranmıştır ($p>0.05$). TOD değerlerinin değişimi 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.19. Grup içi, zamana bağlı ve grup–zaman etkileşimleri ve gruplar arası değişimlerin istatistiksel önem değerleri.

Kaynak	Zaman	p değeri
Zaman	24 ve 72 saat	0.319
	72 saat ve 7 gün	0.000
Zaman * Grup	24 ve 72 saat	0.953
	72 saat ve 7 gün	0.445
Grup		0.000

5. TARTIŞMA

Diş hekimliği uygulamalarının çeşitli alanlarında birbirine benzeyen veya tamamen farklı özelliklere sahip birçok materyal kullanılmaktadır. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin mekanik özellikleri ile ilişkili oldukça fazla literatür bilgisi bulunduğu halde bu materyallerin biyolojik etkileri ile ilgili veriler gelişen teknoloji ve teknikler sayesinde artmaya devam etmektedir. Çocuklarda oluşan dental ve orofasiyal problemlerle mücadele etmek amacıyla ortaya çıkmış olan çocuk diş hekimliğinde de; önleyici, koruyucu, restoratif ve endodontik amaçlar başta olmak üzere farklı amaçlarla çeşitli materyaller kullanılmaktadır.¹⁰ Çocuk diş hekimliğinde farklı amaçlarla kullanılan materyallerin çoğu, dokularla doğrudan veya dolaylı olarak temas halinde olduğu için, bu materyallerin biyoyumlu olması gerekmektedir. Literatür taramamızda bu materyallerin sitotoksik özellikleri ile ilgili olarak ulaşılabilen verilerin yeterli olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda çocukların dental tedavilerinde yaygın olarak kullanılan bazı materyallerin (Clearfil Majesty Esthetic[®], Filtek[™] Silorane[®], Fuji II LC[®], Grandio Flow[®], Admira[®], Glasiosite[®], Twinky Star[®]) insan fibroblast hücreleri üzerinde zamanla meydana getirdikleri sitotoksik etkileri, in vitro olarak direk temas yöntemiyle ve MTT testi, TAK ve TOD değerleri incelenerek ortaya koyulmuştur.

Diş dokusunun; çürük, atrizyon, restoratif işlemler, travma veya kimyasal maddeler gibi dış uyaranlara cevabının, hasar, savunma ve rejeneratif sürecin karşılıklı etkileşiminin neticesi olduğu ve bu süreçlerden her birinin tek başına dokunun vitalitesinin ve dışın hayatta kalmasının kritik bir yanını oluşturduğu belirtilmiştir.⁶¹ Bununla birlikte herhangi bir dış uyaranın pulpal hasara yol açabilmesi için öncelikle önemli miktarda mine ve dentin koruma duvarını aşmış olması gerekmektedir. Ancak dentinin tübüler yapıda olması, bu dokuya önemli bir geçirgenlik özelliği verdiği için

hem çürük sürecinin bakteriyel içeriği hem de dentin dokusunun bozulmasıyla oluşan çözünme ürünleri dentin tübüllerinden difüze olarak çeşitli hücresel biyolojik cavaplara neden olabilmektedir.^{45, 170} Hafif düzeydeki hasarlarda hücre nekrozuna çok rastlanılmasa da pulpal cevap neticesinde bir takım moleküler olaylar başlamaktadır. Hasar arttıkça, nekroza doğru gidiş ve pulpanın enfekte olma süreci hızlanacaktır. Ancak hasar ve savunma mekanizmasının dengeli olarak ilerlemesi durumunda pulpada rejeneratif bir sürecin gelişebileceği ifade edilmiştir.⁶¹

Dokulardaki lokal ve sistemik savunma mekanizmaları, immün savunma reaksiyonlarını aktive ederek veya lokal inflamasyon oluşturarak, dış uyarıların meydana getirebileceği hasarın etkilerini azaltmaktadır.⁵⁸ Pulpal enfeksiyonlarda, bakterilerin rolü ve inflamatuvar süreçteki dokunun özellikleri iyi bilinmektedir.

Rezin matriksin polimerizasyonu, içinde restoratif materyalin visköz-plastik yapıdan rijit-elastik yapıya dönüştüğü bir jelasyon oluşturmaktadır.¹⁷¹ Prejel safhasında rezin materyal kaviteye yayılabilmekte ve rezin matriks içerisinde oluşan stresler kompanse edilebilmektedir. Jelasyon sonrasında, hareket durmakta ve büzülme stresi kompanse edilememektedir.¹⁷² Jel noktası, materyalin polimerizasyon büzülmesine uyum sağlayabilmek için daha fazla visköz akış sergileyemediği zaman olarak tanımlanmaktadır.^{171, 173-175} Kavite duvarı ile rezin arasındaki bağlanma kuvveti postjel sonrası meydana gelen polimerizasyon büzülmesinin, serbest olarak gelişmesini engellemekte ve içsel streslerin oluşmasına neden olmaktadır.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Adezyon kuvvetlerinin büzülme streslerine karşı koymasıyla oluşan stres birikimi, rezinin elastik limitini aşarsa kompozit diş bağlantısında defektlerin oluşmasına ve bağlanmadaki başarısızlığa bağlı olarak kenar sızıntısı, post-operatif hassasiyet, renklenme ve rekürrent çürük gelişimi gibi bir takım sorunlar ortaya çıkabilmektedir.^{172, 175} Bazı bakterilerin, restoratif uygulamalar sonunda, dolgu materyali ile diş arasındaki mikro

veya nanometre boyutundaki boşluklardan *mikrosızıntı* veya *nanosızıntı* olarak ifade edilen olaylarla geçerek enfeksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Ancak, immün savunma reaksiyonlarının kapsamı ve bakteri kaynaklı olmayan pulpal hasarın meydana gelme süreci tam olarak anlaşılabilmiş değildir.^{61, 176, 177}

Restoratif amaçlarla kullanılan dental materyallerin çeşitli dokular ile (mine, dentin/pulpa, periodonsiyum, yanak, dil, dudak) lokal olarak karşı karşıya gelmekte oldukları ve bu dokularda farklı reaksiyonlara neden olabildikleri bilinmektedir. Canlı dokularla temas halinde bulunan herhangi bir malzemenin sistemik ve lokal toksik, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki ve vücudun yumuşak veya sert dokularında doku reaksiyonu oluşturmamasına biyouyumluluk veya biyolojik uyum denilmektedir.¹⁷⁸ Wataha ve ark.⁷⁷ biyouyumluluğun çeşitli etkenlere bağlı olmakla birlikte zamana ve şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebildiğini ve zamanla ve şartların değişmesiyle, ilk uygulandığında biyouyumlu olan bir materyalin, uyumsuz hale geçebileceğini açıklamıştır. Schmalz ve ark.¹⁷⁸ bir materyalin biyouyumluluğunu, bu materyalden salınan bileşenlerin özelliklerinin belirlediğini ve bu bileşenlerin hücrelerde interlökin salgılanması, iltihabi cevap ve hücre ölümü gibi çeşitli cevaplara sebep olabileceğini bildirmiştir.

Primer dentinogenez ve diş oluşumu tamamlandıktan sonra odontoblast aktivitesi pasif hale geçse de diş sert dokularında meydana gelen hasarın neticesinde tersiyer dentinogenez şeklinde bir rejenerasyon veya iyileşme ve bu sürecin sonunda da pulpanın ilgili bölgelerinde dentin köprüsü oluşumu gerçekleşmektedir.^{28, 61}

Pulpa-dentin kompleksi odontoblastlar, odontoblast benzeri hücreler ve pulpa kök hücreleri gibi farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre popülasyonundan oluşmaktadır.^{179, 180} Odontoblast hücreleri primer dentin yapımından sorumlu, proliferasyon yeteneği olmayan,¹⁸¹ pulpanın periferinde bulunan, çeşitli kollajen tipleri,

fibronektin ve proteoglikanların bulunduğu dentin matriksinin salgılanmasından sorumlu,¹⁸² tek tabakalı post-mitotik hücrelerdir.¹⁷⁹

Atrizyon, erozyon, çürükler veya restoratif işlemler gibi dış uyaranların odontoblast fonksiyonunu stimüle etmesi sonucunda, rejeneratif dentin veya tamir dentini yapımı gerçekleşmektedir.¹⁸² Doku hasarının başladığı bölgelerde ise odontoblastların ekstraselüler matriks molekülleri salgılamakta ve devamında da tersiyer dentin yapımı gerçekleşmektedir. Bu bölgelerde meydana gelen şiddetli hücre hasarı nedeniyle hasar gören odontoblastların yerini alacak olan, odontoblast benzeri hücrelerin varlığına, tamir dentininin devam edebilmesi için ihtiyaç duyulmaktadır.¹⁷⁹ Pulpadaki kök hücrelerin veya progenitör hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere dönüşmesi, sitodiferansiyasyon ve daha sonrasında ise, reperatif dentinogenez olarak adlandırılan, hücrelerin salgısal aktivitesinin başlatılmasını veya düzenlenmesini içermektedir.^{182, 183} Pulpanın ekspozite olduğu durumlarda, bakteriyel irritasyonların ve pulpanın inflamatuvar cevap reaksiyonlarının, reperatif dentinogenez sürecini ve dentin köprüsü yapımını olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir.^{184, 185} Bu noktadan hareketle, birçok in vitro çalışmada¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ genotoksik, mutajenik veya östrojenik etkileri ortaya koyulmuş olan rezin kompozitlerin, ışıkla sertleşen cam iyonmer restoratif materyallerin, dentin bağlayıcı ajanların ve çeşitli kompozit bileşenlerinin de aynı etkiyi oluşturabileceği söylenebilir.

Son yıllarda oksidatif stres de bir toksisite mekanizması olarak önerilmektedir.²³ Hücre ve dokulara zarar verme potansiyeli bulunan ROM'ların, normal aerobik metabolizma reaksiyonları neticesinde oluşabileceği bildirilmiştir.²⁰ Bu serbest radikallerin genellikle antioksidanlar tarafından uzaklaştırıldığını veya yok edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.^{20, 189} Antioksidan savunma mekanizması üyelerinin, ROM'ların oluşmasını engellemek ve olası oksidanları yok etmekle görevli olduğu ve

bu şekilde oksidatif strese bağlı doku hasarını en aza indirdikleri rapor edilmiştir.¹⁸⁹ Bununla birlikte, antioksidan savunma mekanizmasının kısmen veya tamamen yetersiz kalması halinde oksidatif stresin artacağı ve bunun da koroner kalp rahatsızlıkları ve kanser gibi bir takım rahatsızlıkların hem sebebi hem de sonucu olabileceği vurgulanmıştır.¹⁸⁹⁻¹⁹²

Rezin içerikli restoratif materyallerin veya rezin esaslı bağlayıcı ajanların yetersiz polimerizasyonunun, aktive edilmemiş serbest rezin monomerlerinin oluşmasına neden olabileceği ve bunların da rezin matriksinden oral kavitedeki sıvılara salınabileceği bilinmektedir.¹⁹³ Yetersiz polimerize edilmiş rezin matriksinden salınan materyaller olarak, TEGDMA, Bis-GMA, UDMA, HEMA ve MMA rapor edilmiştir.¹⁹⁴ Ayrıca, bu monomerlerin, insan gingival fibroblast hücrelerinde sitotoksikite durumlarında hücre içindeki majör indirgeyici ajan olan GSH'nin azalmasına neden olduğu ve GSH transferaz P1'in aktivitesini etkilediği ifade edilmiştir.¹⁹⁵ TEGDMA ve HEMA gibi monomerlerin, sitotoksik etkilerinin oksidatif stresle ilişkili olabileceği de bildirilmiş olmasına rağmen kesin olarak sitotoksikite mekanizması ortaya koyulamamıştır.¹⁶⁷

Bir restoratif materyal geliştirilirken, kimyasal ve mekanik özelliklerin yanında biyoyumluluğu da göz önünde bulundurulmaktadır.¹⁰⁴ İn vivo olarak kullanılması düşünülen materyallerin dokular üzerindeki toksik etkilerinin ve oluşabilecek istenmeyen doku cevaplarının değerlendirilmesi amacıyla in vitro biyoyumluluk testleri geliştirilmiştir.^{104, 196}

Restoratif materyallerin biyoyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda çeşitli test metotları kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yaygın olarak kullanılan testler hayvan deneyleri ve hücre kültür testleridir. Dental materyallerin sitotoksitesini değerlendirmek için hayvan deneyleri yapılmasının uzun zaman alması, pahalı olması ve etik olarak

tartışmalara neden olabilmesi hayvan deneylerinin dezavantajlarıdır. Hücre kültür test yöntemleri ise, daha iyi standardize edilebilir ve tekrarlanabilir. Aynı zamanda, hayvan deneylerine kıyasla uygulaması daha kolay, daha az zaman alan ve daha ekonomik testlerdir.¹² ISO 10993-5¹³ spesifikasyonuna göre in vitro sitotoksosite testleri; direkt, indirekt ve özüt testleri olmak üzere üç farklı materyal hücre temas yöntemiyle yapılabilmektedir. Diş hekimliği materyallerinin her üç temas yöntemiyle de toksisite çalışması yapılmıştır.¹⁴⁻¹⁷ Cao ve ark.¹⁴ ve Saw ve ark.¹⁵ farklı temas şekillerinin sitotoksosite sonuçları üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalara göre, direkt ve indirekt testler arasında iyi bir ilişki bulunmuş, en az hassasiyeti ise özüt testi göstermiştir.

Hücre kültür yöntemlerinde yaygın olarak MTT testinin güvenilirliği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.^{14, 197, 198} Fotakis ve Timbrell¹⁸, iki farklı hücre hattı kullanarak dört farklı sitotoksosite değerlendirme yönteminin etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, nötral kırmızı ile MTT testlerinin sonuçlarının daha hassas olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, farklı toksisite testlerinin uygulanmasının bir materyalin toksik özellikleri değerlendirilirken daha güvenilir sonuçlar vereceğini ifade etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hücre kültürü ve direkt temas test yöntemleri tercih edilmiştir.

Restoratif diş hekimliğinde kullanılan, polimerize olabilen bütün materyaller için yetersiz polimerizasyon nedeniyle biyolojik reaksiyon oluşturabilme riski ifade edilmiştir.¹⁹⁹ Teorik olarak tam bir polimerizasyon mümkün gibi görünse de metakrilat monomerlerinin, %25-50 oranında çift bağ oluşturması ve reaktive olmadan kalmaları, bu nedenle de dentinal tübüllerden geçip, pulpaya ulaşarak biyolojik reaksiyonlara neden olabilmelerinin söz konusu olabileceği bildirilmiştir.¹⁹⁹⁻²⁰¹

Gül²⁰² yapmış olduğu in vivo tez çalışmasında, 18-25 yaşları arasındaki, sadece oklüzal çürüğü bulunan ve daha önce herhangi bir dental restoratif işlem uygulanmamış, sağlıklı, sigara ve alkol kullanmayan ve son üç ay içerisinde herhangi bir ilaç kullanmamış bireylerin restoratif işlemlerden önce ve sonra tükürük örneklerini almış ve tükürük örneklerindeki artık monomerleri ve oksidatif durum parametrelerini değerlendirmiştir. Çalışmasının sonucunda, bir ay sonunda bile kompozitlerden tükürüğe TEGDMA, HEMA, Bis-GMA ve UDMA geçişi olduğunu ve bu monomerlerin oksidatif stres kaynağı olabileceğini belirtmiştir.

Rezin bazlı materyallerinin polimerizasyonu, materyallerin kimyasal içerikleri, tonları²⁰³ ve translüsentlikleri gibi materyale bağlı²⁰⁴ veya spektral dağılım, yoğunluk ve ışık başlığının konumu gibi ışık cihazına bağlı²⁰⁵ faktörlerden etkilenebilmektedir. Farklı ışık kaynakları ve polimerizasyon yöntemleriyle polimerize edilmiş materyallerin etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır.^{130, 206-208}

Çatakçı¹³⁰ tez çalışmasında, insan amniyon hücresinden alınan fibroblast hücreleri üzerine kuartz-tungsten-halojen, LED, ve plazma ark ışık cihazları kullanılarak 20, 40, 80, 100 ve 140 Joule toplam enerji yoğunluğunda ışık uygulamış ve nötral kırmızı testi yöntemiyle canlı hücre sayısını, TAK ve TOD parametreleri ile de oksidatif stres değerlerini 2, 24 ve 72 saat sonunda değerlendirmiştir. Tunç ve ark.²⁰⁶ halojen ve LED ışık kaynakları ile polimerize edilmiş üç farklı kompomer materyalin insan pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini agar overlay metodunu kullanarak araştırmışlardır. Ergün ve ark.²⁰⁹ LED ışık cihazıyla 20 saniye ve 40 saniye polimerize ettikleri beş farklı yapıştırıcı rezin siman materyalinin 24 saat sonunda L-929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Ergün ve ark.¹⁹⁸ LED ve halojen ışık kaynaklarıyla polimerize ettikleri dentin bağlayıcı ajanların, 24 ve 72 saat sonra, L-929 fare fibroblast hücreleri üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Tunç ve ark.²⁰⁶ halojen ve LED ışık kaynakları ile polimerize edilmiş üç farklı kompomer materyalin insan pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kullanılan bütün kompomerlerin orta derecede sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak, LED ışık cihazı ile polimerize edilen örneklerin daha toksik olduğunu ifade etmişlerdir. Işık kaynağına bağlı farklılıkları ortadan kaldırmak için çalışmamızda, sadece LED ışık kaynağı kullanılarak materyallerin polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çatakçı,¹³⁰ insan amniyon hücresinden alınan fibroblast hücreleri üzerine kuartz-tungsten-halojen, LED ve plazma ark ışık cihazlarının 2, 24 ve 72 saat sonunda farklı enerji yoğunluklarındaki sitotoksik etkilerini, nötral kırmızı testi, TAK ve TOD parametreleri ile değerlendirdiği tez çalışmasında, 100 ve 140 joule enerji uygulamasının her üç ışık sistemi ile de sitotoksik etki oluşturduğunu, plazma ark ve halojen ışık kaynaklarının, LED ışık kaynağından daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. İlaveten, 20 ve 40 joule yoğunluklarında herhangi bir sitotoksik etki görülmediğini rapor etmiştir. Benzer şekilde, Ergün ve ark.¹⁹⁸ çalışmalarında LED ve halojen ışık kaynaklarıyla polimerize ettikleri dentin bağlayıcı ajanların, 24 ve 72 saat sonra, L-929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, LED ışık cihazıyla polimerize edilen dentin bağlayıcı ajanların hücre canlılık değerlerini, halojen ile polimerize edilen materyallerin değerlerinden daha yüksek bulmuşlardır.

Ergün ve ark.²⁰³ üç farklı ışık kaynağı ile farklı mesafelerden polimerize edilen beş farklı kompozit materyalin, L929 fare fibroblastları üzerine, 24 saat ve 72 saat sonundaki sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kompozit materyallerin her kombinasyonda sitotoksik etki gösterdiğini ancak farklı mesafelerden ve farklı ışık kaynakları ile polimerize edilen materyallerin sitotoksik etkileri arasında anlamlı bir

farklılık olmadığını ortaya koymamışlardır. Bununla birlikte, ışık kaynağının ucu ile polimerize edilecek olan restoratif materyal arasındaki mesafenin, rezin esaslı materyallerin yeterli polimerizasyon elde edilebilmesi için önemli olduğu ve mümkün olan en az seviyede tutulması gerektiği belirtilmiştir.²⁰⁷ Araştırmanın sonuçları dikkate alınarak çalışmamızda örneklerin polimerizasyon mesafesi 2 mm olarak ayarlanmıştır.

Beriat ve ark.²⁰⁸ LED ve halojen ışık kaynakları ile polimerize edilmiş beş farklı kompozit rezinin, 8, 24, 48 ve 72 saat sonunda, L-929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini MTT testi yöntemiyle inceledikleri çalışmalarında, LED ile polimerize edilmiş olan materyallerin hücre canlılığını daha az azalttığını rapor etmişlerdir.

Diş hekimliğinde kullanılan kompozit restoratif materyallerin biyoyumluluğunun artması için, monomerden polimere dönme oranının mümkün olduğunca fazla olması gerektiği gösterilmiştir.¹⁴ Caughman ve ark.²¹⁰ dönüşüm oranı arttıkça sitotoksitenin azaldığını ifade etmişlerdir.

Araştırmacılar, rezin esaslı materyallerden, sertleşme sürecinde farklı monomerlerin salınabildiğini belirtmişlerdir.^{6, 211-213} Resin esaslı materyallerin biyoyumluluğunu, özellikle materyalden salınan çeşitli monomerler ve uygulanan yüzeyin özellikleri gibi faktörler etkilemektedir.⁸⁴ Önceki araştırmalarda, salınan monomerlerin hücre kültürlerinde biyolojik etkilere yol açtığı ispatlanmıştır.^{167, 214}

Literatürde çeşitli materyallerin sitotoksik etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, RMCİS materyallerin çalışmamızdakine benzer şekilde diğer materyallerden daha toksik olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur.²¹⁵⁻²¹⁸ Selimović ve ark.²¹⁵ UMR-106 rat odontoblast benzeri hücrelerinde, geleneksel ve

rezin içerikli cam iyonomer simanların sitotoksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, araştırmamızın sonuçlarına paralel bir şekilde RMCİS'lerin anlamlı ölçüde daha fazla toksisite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Chen ve ark.²¹⁶ kompozit, kompomer, RMCİS ve CİS materyallerin insan süt dişi pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde bütün materyallerin toksik etki gösterdiğini, ayrıca, RMCİS materyalinin kompozit rezin ve kompomer materyallerinden daha toksik olduğunu ifade etmişlerdir. İlâveten, en düşük toksisiteyi kompomer materyalin gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ise en düşük toksisiteyi akıcı kompozit rezin materyal (Grandia Flow) ve ormoser esaslı materyal (Admira) göstermiştir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar, hücre kültürü ve değerlendirme kriterlerindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, akıcı kompozit rezinlerde doldurucu içeriğinin, çalışmamızda kullandığımız diğer materyallere göre daha az olması,²¹⁹ benzer içerikteki materyallere oranla daha fazla polimerize edilmiş olması sonucunda artık monomer miktarının azalmasını ve sitotoksik etkisinin azalmasını sağlamış olabileceğini düşünmekteyiz.

Becher ve ark.²²⁰ iki farklı kompomer özütünün, GDMA, TEGDMA ve HEMA solüsyonlarının farklı konsantrasyonlarının, fare alveolar makrofaj kültürü canlılığı üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kompomerin %20-40 seyreltilmiş halinin 8 saat uygulanmasından sonra %90, 20 saat sonra %80-95 canlılık oranı, seyreltilmemiş örneklerin uygulanmasından 8 saat sonra %40-70, 20 saat sonra ise %10-15 canlılık oranı tespit etmişlerdir. Toksik etkinin bu kadar fazla olmasında, kullanılan örneklerin 5 mm kalınlıkta olması nedeniyle tamamen polimerize olamamaları, bu nedenle de artık monomerlerin fazla olmasının etkili faktör olabileceğini ifade etmişlerdir. Resin esaslı materyallerde monomerden polimere

dönüşüm oranının yüksek olmasının, salınan artık monomer miktarını dolayısıyla da materyallerin sitotoksik etkilerini azaltacağı bildirilmiştir.^{85, 221} Rezin esaslı materyallerde, monomerlerin dönüşüm oranına, kullanılan ışığın yoğunluğu ve süresi, materyal içerisindeki başlatıcılar ve monomer sisteminin özellikleri gibi çeşitli faktörler etki etmektedir.²¹⁸

Yapılan araştırmalar da, kimyasal ve ışıkla polimerize olan simanlarda ışığın ulaşmadığı bölgelerin, hiçbir zaman kimyasal sertleşen simanlardaki kadar tam sertliğe ulaşmadığını göstermiştir.²²² Franz ve ark.²²³ tepilebilir olan ve olmayan kompozitlerde yaptıkları çalışmalarda, bütün materyallerde toksisite saptamışlardır. Ayrıca, bütün materyallerin 5 mm kalınlıkta hazırlanan örneklerinin 2.5 mm olarak hazırlanan örneklerden daha fazla toksik bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda, örnek kalınlığında standardizasyon sağlanabilmesi amacıyla, kullanılan bütün materyallerin örnekleri 2 mm kalınlığında hazırlanmıştır.

Schmid-Schwap ve ark.²²⁴ adeziv ve self adeziv rezin siman gruplarının sitotoksitesini karşılaştırdıkları çalışmalarında, dual sertleşen simanların self cure simanlardan daha az toksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

de Souza Costa ve ark.²¹⁷ MDPC-23 (fare dental papilla hücreleri) kültürü üzerine CİS ve RMCİS materyallerin sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, çalışmamıza benzer şekilde RMCİS materyallerin en yüksek sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Geurtsen ve ark.⁷ RMCİS ve kompomerlerin sitotoksitesilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, kompomer materyallerin orta derecede ve ışıkla sertleşen CİS materyallerin ise, daha fazla toksisite gösterdiğini belirtmişler ve ortamda diğer bileşenlere oranla çok daha fazla bulunan TEGDMA ve bir foto iniciyatör olan DPICl (diphenyliodoniumchloride)'in sitotoksik reaksiyonlara birincil neden olabileceğini

bildirmişlerdir. Ayrıca, 24 saat sonunda en toksik etkiyi ışıkla sertleşen cam iyonomer materyal ve kompomer materyalin gösterdiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda, 24 saat sonunda en toksik etkiyi HEMA içerikli Fuji II LC ve Bis-GMA içerikli Clearfil Majesty materyalleri göstermiştir. TEGDMA içerikli materyallerden Twinky Star ve Glasiosite materyallerin sitotoksitesisi kontrol grubu ve diğer materyallere kıyasla orta düzeyde iken, Admira ve Grandio Flow materyallerinin sitotoksitesite değerleri en düşük olarak kaydedilmiştir. Araştırmamızda da, rezin içerikli Fuji II LC materyalinin sitotoksitesisi, araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir.

Harorlı²²⁵ yapmış olduğu tez çalışmasında, TEGDMA'nın konsantrasyona bağlı olarak farklı toksik etkiler gösterdiğini göstermiştir. Araştırmacının tez çalışmasına benzer şekilde çalışmamızda da benzer konsantrasyonda TEGDMA içeren farklı materyallerin (Twinky Star ve Glasiosite) 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonundaki sitotoksik etkileri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. 24 saat sonundaki verilere göre ise, TEGDMA içeren hiçbir grubun MTT değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Diğer zamanlardaki değerler arasında tespit edilen farklılıklar, değerlendirme zamanlarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda, dentinin birçok materyal ve kimyasalın neden olabileceği hücre zararını engelleyen etkin bir bariyer olduğu gösterilmiştir.^{12, 226} Ayrıca, dentin disk kalınlığı artırıldığında dental materyallerin sitotoksitesisinin azaldığı da belirtilmiştir.²²⁷ Çalışmamızdaki sitotoksik etkilerin bütün materyallerde zamanla artış göstermesi, dentin bariyeri kullanılmamasına bağlı olabilir. İn vivo şartlarda restoratif materyal ile pulpa hücreleri arasında kalacak olan dentinin, doğal bariyer görevi görerek materyallerin sitotoksik etkilerini azaltacağı söylenebilir.

Quinlan ve ark.²²⁸ kompozit rezin ve kompomer materyallerin dentin bariyerli/bariyersiz ve farklı ışıkla sertleşme oranlarının insan endotel hücreleri üzerine,

24, 48 ve 72 saat sonunda, sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, dentin bariyersiz ve tam sertleşme olmadığı şartlarda her iki materyali de daha toksik bulmuşlardır. Ayrıca çalışmada kompozit materyalin kompomer materyalinden daha toksik olduğu ortaya koyulmuştur. Kompozit ve kompomer materyallerinin toksisitesi, çalışmamızdakine benzer şekilde zamanla artış göstermiş olmasına rağmen, Glasiosite, Clearfil Majesty ve Grandio Flow materyallerinin toksisitesi 24 saat ve 72 saat arasında azalma gösterirken, 7 gün sonunda önemli oranda artış göstermiştir. Bu farklılığın hücre kültürü ve değerlendirme srelerindeki farklılıklardan ve dentin bariyerinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Tunç ve ark.²⁰⁶ u farklı kompomer materyalinin insan fibroblast hücreleri üzerine uygulanmalarının toksik etkilerini agar overlay yöntemini kullanarak araştırdıkları çalışmalarında, kullanılan u kompomerin de çalışmamızın sonucu ile uyumlu olarak, orta derecede toksik olduğunu bulmuşlardır.

Mendonça ve ark.²²⁹ ve Bouillaguet ve ark.²³⁰ HEMA moleküllerinin düşük seyrelti faktörü nedeniyle odontoblast benzeri hücrelere dentin bariyerini geçerek ulaşabileceğini ne sürmüşlerdir. Mendonça ve ark.²²⁹ smear tabakasının kalınlığının bir RMCİS'in bağlanma gücü ve transdental sitotoksitesine etkisini araştırdığı çalışmalarında, smear tabakasının ince olması, kalın olması veya hiç olmaması durumlarının hepsinde toksik etki bildirmişlerdir.

Stanislowski ve ark.¹⁶⁷ fibroblastlar üzerinde TEGDMA kaynaklı toksisitenin mekanizmasını araştırdıkları çalışmalarında, TEGDMA'nın neden olduğu sitotoksitenin hızlı glutasyon boşalmasına bağlı olabileceğini ve TEGDMA nedeniyle salınan glutasyonun fibroblastlarda reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada, toksik etkinin TEGDMA miktarlarıyla orantılı olduğu da gösterilmiştir. Çalışmamızda da, materyallerin tamamında hücre canlılığının

en düşük olduğu, 7 gün sonunda kültür ortamlarındaki oksidatif stres değerleri en yüksek olarak ölçülmüştür. Bu da kültür ortamındaki oksidatif stresin, toksisiteyi pozitif yönde etkilemiş olabileceğini açık bir şekilde göstermektedir.

Laboratuvar koşullarında kompozitlerdeki monomer salımının büyük oranda ilk 24 saatte tamamlandığı, bundan dolayı, rezin kompozitlerin toksik etkilerinin daha çok bu safhada meydana geldiğini ve azalarak devam ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.²³¹ Bununla birlikte, polimerizasyondan bir ay sonra bile monomerin kompozit rezin dolgulardan tükürüğe geçtiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur.^{202, 232} Bouillaguet ve ark. rezin materyallerin uzun dönem sitotoksitelerini araştırdığı çalışmalarında, bazı materyallerin zamanla azalsa da 8 hafta sonunda sitotoksik etkileri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, ytterbium trifluoride ve silicone dioxide içeren bir materyalin çalışmamızdaki, aynı içeriğe sahip Filtek Silorane materyaline benzer şekilde, başlangıçtan ilk haftanın sonuna doğru hızlı bir toksisite artışı gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ancak 8 hafta sonunda başlangıç değerlerine gelmiştir. Sitotoksisite değerlerindeki benzerlikler, kullanılan materyallerin aynı içeriğe sahip olmasından kaynaklanabilir.

Trichaiyapon ve ark.²³³ akıcı kompozit ve mineral trioksit agregat (MTA) materyallerin insan periodontal ligament hücreleri (PDLC) üzerine sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, yeni hazırlanmış olan MTA ve florid salımı yapabilen akıcı kompozit rezin materyalleri daha toksik, diğer akıcı kompozitleri en az toksik olarak bulmuşlardır. Araştırmacıların sonuçlarını destekler nitelikte çalışmamızda da, akıcı kompozit rezin olan Grandio Flow en az sitotoksik etki gösteren materyal olmuştur.

Florid içeriği etken olarak düşünölebileceği gibi, CİS ve RMCİS'lerin karşılaştırıldığı çalışmaların çoğunda, RMCİS materyallerin çok daha toksik bulunması,

fluoridin etkisinin diğerk bileşenlere oranla daha geri planda olabileceği sonucunu da düşündürebilir. Bununla birlikte, Fuji II LC başta olmak üzere çalışmamızda florid içeriği olan materyallerin hepsi diğerk materyallere oranla daha fazla sitotoksik etki göstermiştir ve çalışmamızın bulguları önceki araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ayrıca başlangıçta, florid salımı daha fazla olan Fuji II LC materyalinin sitotoksik etkisinin florid salımına paralel bir seyir izlemesi de şüphemizi doğrulamaktadır. Fakat, daha kesin sonuçlar elde edebilmek için ileriye yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hanks ve ark.⁴⁶ sıvı solüsyonlarda nispeten daha zor çözünen diğerk rezin monomerleri ile HEMA'yı kıyasladıkları çalışmalarında, HEMA'nın düşük moleköl ağırlığından dolayı, bu monomerin dentinden daha rahat geçebileceğini ifade etmişlerdir. Hanks ve ark.⁸ yapmış oldukları çalışmalarında, Bis-GMA, TEGDMA ve UDMA'nın HEMA'dan daha toksik olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmamızda ise, HEMA içeriği bulunan Fuji II LC materyali diğerk materyallerden daha toksik bulunmuştur. Farklılık, hücre kültürlerinin ve değerlendirme yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Shajji ve ark.²³⁴ TEGDMA'nın sitotoksik etkilerinden, moleköl ağırlığı daha düşük bir ayrışma ürününü olan TEGMA'nın sorumlu olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda da moleköl ağırlığı diğerk monomerlerden daha düşük olan HEMA içerikli Fuji II LC daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Bis-GMA, TEGDMA, UDMA ve HEMA gibi rezin monomerlerinin tip I kollajen, osteonektin ve dentin sialoprotein gibi pulpa tamirinde önemli rol oynayan bazı proteinlerin oluşmasına, DNA düzeyinde etki edebildiği ve intraselüler glutasyon salınmasına neden olabildiği bildirilmiştir.^{168, 235} Pulpa dentin kompleksinin dış uyaranlara tepkisinin, uygulanan dental materyallerden ziyade, mikrosızıntı varlığına bağlı olduğu ve bakterilerin pulpal cevabı olumsuz

etkileyebileceğini ve yıkıma neden olabileceğini ortaya koyan araştırmaların dikkate alınması gerektiği ve in vitro şartlarda elde edilen verilerin, materyallerin sağlıklı veya şürükten etkilenmiş yüzeylere uygulandığı klinik koşullardaki sonuçları tahmin etmede yetersiz kalabileceği ifade edilmiştir.^{226, 236-238}

Sonuç olarak, şalışmamızda kullandığımız materyallerin farklı oranlarda sitotoksik etki gösterdikleri ve zamanla ortaya koydukları toksisite değerleri ve oksidatif stresle ilişkilerini destekleyen kapsamlı şalışmalara ihtiyaç vardır. Klinik koşullarda uygulanan rezin içerikli restorasyonların; pulpa ile aralarında dentin dokusunun bulunması ve bağlayıcı ajanların kullanılıyor olması, ağız ortamında ışık kaynakları ile yapılan polimerizasyonun farklı olması nedeniyle materyallerin sitotoksitesisi in vivo koşullarda farklılık sergileyebilir.

Özellikle derin dentin şürüklerinin restorasyonları gibi, kavite hazırlandıktan sonra kalan dentin kalınlığının az olduğu klinik koşullarda, rezin esaslı materyallerle başarılı bir restorasyon yapılırsa bile, materyallerden salınabilecek monomerlerin pulpaya ulaşabileceği ve pulpa hücrelerine sitotoksik etki gösterebileceği aşıkardır. Bu sebeple, rezin içerikli materyallerin biyouyumluluğunun artırılmasına yönelik ileri şalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda kullanılan materyallerin tamamı, 24 saat, 72 saat ve 7 gün sonunda, insan fibroblast hücreleri üzerine toksik etki göstermiştir.
2. En fazla sitotoksik etki gösteren materyal RMCİS (Fuji II LC), en az sitotoksik etki gösteren materyal ise akıcı kompozit rezin (Grandio Flow) olmuştur.
3. Materyallerin içeriklerinin sitotoksik etki açısından önemli olduğu desteklenmiştir. HEMA içeriğinin sitotoksisiteyi artırıcı faktör olduğu görülmüştür.
4. Oksidatif stresin bir toksisite mekanizması olduğu görüşü desteklenmiştir.
5. Klinik olarak kullanılan rezin içerikli restoratif materyallerin tabaka yöntemiyle ve kalınlığı 2 mm'i geçmeyecek tabakalar halinde kaviteye uygulanması ve her bir tabakanın yeterli polimerizasyonunun sitotoksisiteyi azaltmada etkili olabileceğini düşünmekteyiz.
6. Klinik açıdan başarılı materyallerin ve bu materyallerin toksisitelerini azaltmaya yönelik girişimlerin ön planda olduğu ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Six N, Lasfargues J-J, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 413-422.
2. Brännström M, Vojinović O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, 1975, 43: 83-89.
3. Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1987, 57: 1-8.
4. Grieve A, Alani A, Saunders W. The effects on the dental pulp of a composite resin and two dentine bonding agents and associated bacterial microleakage. *International Endodontic Journal*, 1991, 24: 108-118.
5. Melo MAVd, Moysés MR, Santos SGd, Alcântara CEP, Ribeiro JCR. Effects of different surface treatments and accelerated artificial aging on the bond strength of composite resin repairs. *Brazilian Oral Research*, 2011, 25: 485-491.
6. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light-curing pit and fissure sealants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 44: 73-77.
7. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *Journal of Dental Research*, 1998, 77: 2012-2019.
8. Hanks C, Strawn S, Watahai J, Craig R. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 1991, 70: 1450-1455.
9. Ferracane J, Condon J. Rate of elution of leachable components from composite. *Dental Materials*, 1990, 6: 282-287.
10. Tortop T, *Çocuk Diş Hekimliği Bebeklikten Ergenliğe*. Ankara, 2009.

11. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 2007, 12: 258-266.
12. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *Journal of Endodontics*, 2001, 27: 96-102.
13. International, Standardization Of. Biological evaluation of medical devices : *Tests for Cytotoxicity: In-vitro methods*, 1999.
14. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*, 2005, 25: 101-108.
15. Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicology in vitro*, 2005, 19: 145-154.
16. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola C, Savarino L, Stea S, Montanaro L, Pizzoferrato A. Established Cell Lines and Primary Cultures in Testing Medical Devices In Vitro. *Toxicology in vitro*, 1999, 13: 801-810.
17. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical oral Investigations*, 1998, 1: 154-162.
18. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 2006, 160: 171-177.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

20. Gutteridge J, Quinlan GJ, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1994, 124: 263.
21. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 2003, 17: 1195-1214.
22. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma.
23. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg*, 2004, 15: 91-96.
24. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 1993, 84: 407-412.
25. Zhou Z, Zheng J. Tribology of dental materials: a review. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2008, 41: 113001.
26. Avery JK, Steele PF, Avery N. Structure and Function of the Teeth. In: Piesco NP, Simmelink J (eds.). *Oral Development and Histology*
3rd ed. New York, Thieme, 2002: 153-225.
27. Roberson TM, Heymann H, Swift EJ, Sturdevant CM. Clinical Significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology and Occlusion. In: JR S (ed.). *Sturdevant's art & Science of Operative Dentistry*
5th ed. St. Louis, Mo., Mosby Elsevier, 2006: 15-63.
28. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 1993, 4: 679-728.

29. Abdullah Saud A-H. Cavity Surface Interaction with Resin-modified Glass Ionomer: Surface Morphology, Interface Adaptation, Tooth Demineralization and Fluoride Uptake. University of Iowa, 2002.
30. Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, 1997, 25: 441-458.
31. Ten Cate AR. Dentin-pulp complex. In:CD T (ed.). *Oral Histology : Development, Structure, and Function* 4th Edition ed. St. Louis, Mosby, 1994: 169-217.
32. Theodore R, Harald H, Edward S. Clinical significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology and Occlusion. In:JR. S (ed.). *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry*, St. Louis, Mosby, 2006: 17-63.
33. Ten Cate AR. *Oral Histology : Development, Structure, and Function*. ed. St. Louis, Mosby, 1980.
34. Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Archives of Oral Biology*, 1994, 39: 185-190.
35. Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Archives of Oral Biology*, 1991, 36: 775-778.
36. Mjör IA. *Pulp-dentin Biology in Restorative Dentistry*. ed. Quintessence Chicago, 2002.
37. Kinney J, Balooch M, Marshall S, Marshall Jr G, Weihs T. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Archives of Oral Biology*, 1996, 41: 9-13.
38. Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microscopy*, 1989, 3: 161.

39. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology*, 1976, 21: 355-362.
40. Pashley D, Carvalho R. Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry*, 1997, 25: 355-372.
41. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Brazilian Dental Journal*, 2009, 20: 3-16.
42. Ghazali FBC. Permeability of dentine. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 2003, 10: 27.
43. Pashley D. Clinical correlations of dentin structure and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1991, 66: 777-781.
44. Vongsavan N, Matthews R, Matthews B. The permeability of human dentine in vitro and in vivo. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 931-935.
45. Pashley DH, Pashley EL, Carvalho RM, Tay FR. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *The Dental Clinics of North America*, 2002, 46.
46. Hanks C, Wataha J, Parsell R, Strawn S, Fat J. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1994, 21: 475-487.
47. Pashley D. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *Journal of Dental Research*, 1985, 64: 613.
48. AL-HelalAbdullah Saud. Cavity Surface Interaction with Resin-modified Glass Ionomer: Surface Morphology, Interface Adaptation, Tooth Demineralization and Fluoride Uptake. University of Iowa, 2002.
49. O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *Journal of Endodontics*, 2000, 26: 739-743.

50. Pashley D. Smear layer: Overview of structure and function. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia*, 1992, 88: 215.
51. Van Meerbeek B, S., Perdigao, J., Lambrechts, Pc, Vanherle, G. Enamel and dental adhesion. In:Summitt JB, Robbins JW, Schwartz RS, dos Santos J (Ed). *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach*, Quintessence Pub., 2001: 178-235.
52. Trowbridge H, Kim S, Suda H. Structure and functions of the dentin and pulp complex. *Pathways of the Pulp. St. Louis, Missouri: Mosby, Inc*, 2002: 411-455.
53. Bayırlı G. Diş Pulpası ve Ağrı. In:*Pulpanın Histolojisi ve Fizyolojisi* İstanbul, İ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi, 1999: 41-94.
54. Alaçam T. Pulpa ve periapikal dokuların biyolojisi. *Endodonti*, Ankara, Barış Yayınları, 2000: 17-44.
55. T O. Pulp as a connective tissue. S Seltzer IB (Ed). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, Chicago, Quintessence Publishing, 2000: 95-122.
56. Ingle JJ. *Ingle's Endodontics 6*. (Ed). B.C. Decker, 2008.
57. Tuncer S. Farklı Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Sitotoksik Etkileri. Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2010.
58. Smith A. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Research*, 2010, 36: 223-232.
59. Tziafas D, Smith A, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry*, 2000, 28: 77-92.
60. Smith A, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2001, 12: 425-437.

61. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of Dental Education*, 2003, 67: 678-689.
62. Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Archives of Oral Biology*, 2003, 48: 1-14.
63. Ruch J, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1995, 39: 51.
64. Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin H. Control of ameloblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1995, 39: 69.
65. Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney J, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *The International Journal of Developmental Biology*, 1992, 36: 491.
66. Begue-Kirn C, Smith A, Lorient M, Kupferle C, Ruch J, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 1994, 38: 405.
67. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1990, 5: 717-723.
68. Cassidy N, Fahey M, Prime S, Smith A. Comparative analysis of transforming growth factor- β isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of Oral Biology*, 1997, 42: 219-223.
69. Roberts-Clark D, Smith A. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 1013-1016.

70. Smith A, Matthews J, Hall R. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *European Journal of Oral Sciences*, 1998, 106: 179.
71. Sloan AJ, Perry H, Matthews JB, Smith AJ. Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *The Histochemical Journal*, 2000, 32: 247-252.
72. Sloan A, Moseley R, Dobie K, Waddington R, Smith A. TGF- β latency-associated peptides (LAPs) in human dentin matrix and pulp. *Connective Tissue Research*, 2002, 43: 381-386.
73. Sloan A, Smith A. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. *Archives of Oral Biology*, 1999, 44: 149-156.
74. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges J-C, Couble M-L, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGF β 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth Slices. *Journal of Dental Research*, 2000, 79: 1689-1696.
75. Sloan A, Rutherford R, Smith A. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 173-177.
76. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*. (Ed). Berlin, Springer, 2009.
77. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2001, 86: 203-209.
78. L FAFL. Pulpal Reactions to Caries and Dental Procedures. In:Cohen S, Burns RC, Hargreaves KM, Berman LH (Ed). *Pathways of the Pulp*, Tenth Edition ed. Elsevier Mosby, 2006.

79. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1998, 25: 45-51.
80. Cohen S, Burns RC, Hargreaves KM, Berman LH. *Pathways of the Pulp*. (Ed). Elsevier Mosby, 2006.
81. Ferracane J. Current trends in dental composites. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1995, 6: 302-318.
82. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European Journal of oral Sciences*, 1997, 105: 97-116.
83. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2002, 87: 364-379.
84. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2000, 11: 333-355.
85. Ferracane J. Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1994, 21: 441-452.
86. Noda M, Wataha J, Kaga M, Lockwood P, Volkmann K, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *Journal of Dental Research*, 2002, 81: 265-269.
87. Michelsen VB, Moe G, Skålevik R, Jensen E, Lygre H. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *Journal of Chromatography B*, 2007, 850: 83-91.
88. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 1996, 12: 186-193.

89. Smith DC, Williams DF. *Biocompatibility of Dental Restorative Materials*. (Ed). Florida, CRC Press, 2001.
90. Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. *Biomaterials*, 2000, 21: 1711-1721.
91. Nicholson JW. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. (Ed). Royal Society of Chemistry, 2002: 186-195.
92. Maser E, Oppermann UC. The 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase System, A Determinant of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Action. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 249: 365-369.
93. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity Testing with Three-Dimensional Cultures of Transfected Pulp-Derived Cells. *Journal of Endodontics*, 2001, 27: 259-265.
94. Camps J, Burger A-S, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin J-C. Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dental Materials*, 2005, 21: 156-163.
95. Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spångberg LS. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *Journal of Endodontics*, 1993, 19: 554-557.
96. Spångberg L. The study of biological properties of endodontic biomaterials, Chap. 8. *Experimental Endodontics*, Florida, CRC Press, 1990.
97. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2005.
98. Browne R. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials—does it have a role? *International Endodontic Journal*, 1988, 21: 50-58.
99. Hensten Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *International Endodontic Journal*, 1988, 21: 89-99.

100. Stanford J. Recommended standard practices for cytotoxicity testing. FDI World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dental J*, 1980, 30: 141-173.
101. ISO IOFS. preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. *Dentistry*, 1997, 7405.
102. JC W. Biocompatibility of Dental Materials. In:Anusavice KJ (Ed). *Phillips' Science of Dental Materials*, Saunders, 2003: 171-202.
103. ISO IOFS. International Standard *Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: In-vitro methods.*, 1999, 10993.
104. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 1996, 12: 186-193.
105. ISO IOFS. Tests for cytotoxicity. *Biological Evaluation of Medical Devices.* , 1993.
106. Schmalz G. Agar overlay method. *International Endodontic Journal*, 1988, 21: 59-66.
107. Outhwaite WC, Mckenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *Journal of Dental Research*, 1974, 53: 1503-1503.
108. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *Journal of Dental Research*, 1977, 56: 1285-1290.
109. Hume W. A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. *Journal of Dental Research*, 1985, 64: 1322-1325.
110. Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *Journal of Endodontics*, 1996, 22: 249-252.

111. Schmalz G, Hiller K-A, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *Journal of Endodontics*, 2001, 27: 23-30.
112. Camps J, Tardieu C, Franquin JC, Ladaique P, Rieu R. In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dental Materials*, 1997, 13: 34-42.
113. UZUN İH. Sabit Protetik Restorasyonlarda Kullanılan Farklı Materyallerin Biyouyumluluklarının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı. Doktora, Erzurum: Atatürk üniversitesi, 2009.
114. Anusavice KJ. *Phillips' Science of Dental Materials*. ed. Saunders, 2003.
115. Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. Toxicity tests with mammalian cell cultures. *Short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990: 75-97.
116. Murphy W. The testing of endodontic materials in vitro. *International Endodontic Journal*, 1988, 21: 170-177.
117. Rauschenberger C. Dentin permeability. The clinical ramifications. *Dental clinics of North America*, 1992, 36: 527.
118. Griffiths B, Freshney R. Animal cell culture; a practical approach. 1992.
119. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76: 5665-5668.
120. Culture BC. Basic cell culture protocols. *Methods in molecular biology*, 1997, 290.

121. Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, 2002, 18: 318-323.
122. Harrison MA, Rae IF. *General techniques of cell culture*. ed. Cambridge University Press, 1997.
123. Wise C. *Epithelial Cell Culture Protocols*. ed. Humana Press Inc, 2002.
124. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's Restorative Dental Materials, 13/e*. ed. Elsevier India, 2006.
125. Tsaryk R, Kalbacova M, Hempel U, Scharnweber D, Unger RE, Dieter P, Kirkpatrick CJ, Peters K. Response of human endothelial cells to oxidative stress on Ti6Al4V alloy. *Biomaterials*, 2007, 28: 806-813.
126. Messer RL, Bishop S, C Lucas L. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*, 1999, 20: 1647-1657.
127. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller K-A, Schweikl H. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *European Journal of Oral Sciences*, 1997, 105: 86-91.
128. Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicology in vitro*, 2002, 16: 63-69.
129. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288: 369-376.
130. Çatakçı A. Işıklı Dolgu Cihazlarının İnsan Fibroblast Hücrelerinde Oluşturduğu Biyolojik Etkilerin Canlılık Aktivite ve Oksidatif Stres Yönünden Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.

131. Kawaguchi M, Fukushima T, Miyazaki K. The relationship between cure depth and transmission coefficient of visible-light-activated resin composites. *Journal of Dental Research*, 1994, 73: 516-521.
132. ISO IOFS. test methods for dental materials. *Dentistry - Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry*, 1997
133. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontologica*, 1999, 57: 316-322.
134. Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials*, 2009, 2: 514-548.
135. Schmalz G. Biological proof of filling materials in the Götting miniature pig-a pilot study]. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, 1981, 36: 357.
136. Van Reis R, Zydney A. Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 208-211.
137. Wever D, Veldhuizen A, Sanders M, Schakenraad J, Van Horn J. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 1997, 18: 1115-1120.
138. ISO ISO. evaluation of medical devices. 1997.
139. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya*, 1995, 1.
140. Aydılek N, Aksakal M. Testosteronun Tavşanlarda Karaciğer Antioksidan Sistemi Üzerine Etkisi. *YYU Vet Fak Derg*, 2003, 14: 22-25.
141. Guyton K, Kensler T. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 523-544.

142. Yıldırım A. İntakt ve Adrenalektomili Sıçanların Eritrosit ve Mide Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2003.*
143. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 1997: 3-4.*
144. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine.* ed. Clarendon press Oxford, 1989.
145. Candan S. Nikel ve oksidatif stres. *Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2002.*
146. Eken A. Hiberbarik oksijen tedavisi, oksidatif stres ve genetik toksisite arasındaki ilişkinin araştırılması. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, Ankara, 2003.*
147. Devasagayam T, Tilak J, Bolor K, Sane K, Ghaskadbi S, Lele R. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *JAPI2004, 2004, 52: 794-804.*
148. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44: 275-295.*
149. Mavi A. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 2005.*
150. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions, 2006, 160: 1-40.*
151. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology, 2001, 54: 176-186.*

152. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37: 277-285.
153. Aycicek A, Iscan A, Erel O, Akcali M, Selek S. Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatric Neurology*, 2006, 35: 382-386.
154. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003, 189: 41-54.
155. Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, 36: 201.
156. Grzelak A, Bartosz G. Melatonin does not affect total antioxidant capacity of blood plasma in vitro. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 2005, 65: 77-81.
157. Bedaiwy M, Agarwal A, Said TM, Goldberg JM, Sharma RK, Worley S, Falcone T. Role of total antioxidant capacity in the differential growth of human embryos in vitro. *Fertility and Sterility*, 2006, 86: 304-309.
158. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 286: R431-R444.
159. Yeni E, Gulum M, Selek S, Erel O, Unal D, Verit A, Savas M. Comparison of oxidative/antioxidative status of penile corpus cavernosum blood and peripheral venous blood. *International Journal of Impotence Research*, 2004, 17: 19-22.
160. Yanik M, Erel O, Kati M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica*, 2004, 16: 200-203.

161. Nakamura K, Endo H, Kashiwazaki S. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. *International Journal of Tissue Reactions*, 1987, 9: 307.
162. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Medical Weekly*, 2003, 133: 563-566.
163. Ceylan E, Gülsün A, Gencer M, Aksoy N. A new parameter in the detection of tuberculosis activity: reactive oxygen metabolites. *Respiration*, 2005, 72: 156-159.
164. Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005, 75: 272-276.
165. Spagnuolo G, D'Antò V, Valletta R, Strisciuglio C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. *Journal of Endodontics*, 2008, 34: 684-688.
166. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004, 287: C246-C256.
167. Stanislowski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGDMA induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 66: 476-482.
168. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, Von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 2004, 25: 4573-4580.

169. Tomasch R, Wagner K-H, Elmadfa I. Antioxidative power of plant oils in humans: The influence of α -and γ -tocopherol. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2001, 45: 110-115.
170. Pashley DH. Pulpodentin complex. Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR (eds.). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, Quintessence Publishing Company, 2002.
171. Davidson C, Feilzer A. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *Journal of Dentistry*, 1997, 25: 435-440.
172. Ölmez A, Tuna D. Polimerizasyon büzülmesine etki eden faktörler. *CÜ Dişhek Fak Derg*, 2002, 5: 52-56.
173. Dennison JB, Yaman P, Seir R, Hamilton JC. Effect of variable light intensity on composite shrinkage. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2000, 84: 499-505.
174. Jedrychowski J, Bleier R, Caputo A. Shrinkage stresses associated with incremental composite filling techniques in conservative Class II restorations. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, 2001, 68: 161.
175. Yap A, Ng S, Siow K. Soft-start polymerization: Influence on effectiveness of cure and post-gel shrinkage. *Operative Dentistry*, 2001, 26: 260.
176. Baumgartner JC. Pulpal infections including caries. In:Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR (eds.). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, Chicago, Quintessence Publishing Company, 2002.
177. Fouad AF. Molecular mediators of pulpal inflammation. In:Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR (eds.). *Seltzer and Bender's Dental Pulp*, Chicago, Quintessence Publishing Company, 2002.
178. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Determination of biocompatibility. In:Schmalz G (ed.). *Biocompatibility of Dental Materials* Berlin, Springer, 2009: 13-40.

179. Krifka S, Seidenader C, Hiller K-A, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clinical Oral Investigations*, 2012, 16: 215-224.
180. Sloan A, Smith A. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases*, 2007, 13: 151-157.
181. Campisi J, di Fagagna FdA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 729-740.
182. Smith A, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch J, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 1995, 39: 273.
183. Lesot H. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. *Cell Mater*, 1993, 3: 201-217.
184. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *European Journal of Oral Sciences*, 2000, 108: 202-206.
185. Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *European Journal of Oral Sciences*, 2001, 109: 422-424.
186. Schweikl H, Schmalz G, Bey B. Mutagenicity of dentin bonding agents. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1994, 28: 1061-1067.
187. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1996, 368: 181-194.
188. Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104: 298.
189. Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239: 70-76.

190. Aruoma O. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 1994, 32: 671-683.
191. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 1995, 25: 111-121.
192. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 1993, 49: 481-493.
193. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Dentistry*, 1998, 26: 137-145.
194. Lee DH, Lim B-S, Lee Y-K, Ahn S-J, Yang H-C. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental Materials*, 2006, 22: 1086-1092.
195. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. *Journal of Dental Research*, 2001, 80: 869-875.
196. Williams DF, Smith DC. *Biocompatibility of Dental Materials*. (Ed). Boca Raton, Fla., CRC Press, 2002.
197. Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 2008, 24: 895-900.
198. Ergün G, Eğilmez F, Üçtaşı M, Yılmaz Ş. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *International Endodontic Journal*, 2007, 40: 216-223.

199. Zorba YO, Yıldız M, Yildirim A, Gursan N, Ercan E. Reactions of connective tissue to self-etching/priming dentin bonding systems: oxidative stress, tumor necrosis factor α expression, and tissue reactions. *Journal of Dental Sciences*, 2009, 4: 136-148.
200. Imazato S, McCabe J, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dental Materials*, 2001, 17: 178-183.
201. Hume W, Gerzina T. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1996, 7: 172-179.
202. Gül P. Kompozit Dolgu Maddesinden Zamanla Salınan Artık Monomer Miktarları ve bu Monomerlerin Tükürük MDA Düzeyi ve Bazı Antioksidan Enzim Seviyeleri Üzerine Etkileri. Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı. Doktora, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.
203. Aguiar FHB, Lazzari CR, Lima DANL, Ambrosano GMB, Lovadino JR. Effect of light curing tip distance and resin shade on microhardness of a hybrid resin composite. *Brazilian Oral Research*, 2005, 19: 302-306.
204. Shortall A, Wilson H, Harrington E. Depth of cure of radiation-activated composite restoratives-Influence of shade and opacity. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1995, 22: 337-342.
205. Harrington E, Wilson H, Shortall A. Light-activated restorative materials: a method of determining effective radiation times. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1996, 23: 210-218.
206. Tunç EŞ, Özer L, Sarı Ş, Cetiner S. Cytotoxic effects of halogen-and light-emitting diode-cured compomers on human pulp fibroblasts. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 2009, 19: 55-60.

207. Gulfem Ergun FE, Isil Cekic-Nagas. The cytotoxicity of resin composites cured with three light curingunits at different curing distances. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2011, 16: 252-259.
208. Beriat NC, Ertan AA, Canay S, Gurpinar A, Onur MA. Effect of different polymerization methods on the cytotoxicity of dental composites. *European Journal of Dentistry*, 2010, 4: 287.
209. Ergun G, Egilmez F, Yilmaz S. Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power led. *Journal of Applied Oral Science*, 2011, 19: 286-292.
210. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*, 1991, 12: 737-740.
211. Ruyter I. Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials in an aqueous environment. *Advances in Dental Research*, 1995, 9: 344-347.
212. Gerzina T, Hume W. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *Journal of Dentistry*, 1996, 24: 125-128.
213. S. A. Farklı rezin simanların artık monomer salınımının in vitro şartlarda incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Konya: Seelçuk Üniversitesi, 2007.
214. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 2005, 26: 5130-5137.

215. Selimović-Dragaš M, Huseinbegović A, Kobašlija S, Hatibović-Kofman Š. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2012, 12: 273-278.
216. Chen CC, Chen RCS, Huang ST. Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 60: 452-457.
217. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, 2003, 24: 3853-3858.
218. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *European Journal of Oral Sciences*, 1998, 106: 687-695.
219. Ferracane JL. Resin composite—State of the art. *Dental Materials*, 2011, 27: 29-38.
220. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials*, 2006, 22: 630-640.
221. Ülker HE. Dentin Bariyer Testi ile Dis Hekimliğinde Kullanılan Kompozit Rezin Simanların Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi. Dis Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
222. Darr A, Jacobsen P. Conversion of dual cure luting cements. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1995, 22: 43-47.
223. Franz A, König F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch W-D, Lucas T, Sperr W, Schedle A. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dental Materials*, 2003, 19: 382-392.

224. Schmid-Schwap M, Franz A, König F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E, Watts DC, Schedle A. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dental Materials*, 2009, 25: 360-368.
225. Harorlı OT. TEGDMA nın Biyouyumluluğunun Hücre Kültürü Yöntemiyle Sitomorfolojik Olarak İncelenmesi. Diş Hastalıkları ve Tedavisi. DOKtora, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.
226. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dental Materials*, 2006, 22: 954-962.
227. Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *European Journal of Oral Sciences*, 2006, 114: 138-146.
228. Quinlan C, Zisterer D, Tipton K, O'sullivan M. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International Endodontic Journal*, 2002, 35: 47-55.
229. Mendonça AAMd, Oliveira CFd, Hebling J, Costa CAdS. Influence of thicknesses of smear layer on the transdental cytotoxicity and bond strength of a resin-modified glass-ionomer cement. *Brazilian Dental Journal*, 2012, 23: 379-386.
230. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *Journal of Endodontics*, 1996, 22: 244-248.
231. Issa Y, Watts D, Brunton P, Waters C, Duxbury A. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, 2004, 20: 12-20.
232. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha J, Krejci I. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2002, 29: 7-13.

233. Trichaiyapon V, Torrungruang K, Panitvisai P. Cytotoxicity of flowable resin composite on cultured human periodontal ligament cells compared with mineral trioxide aggregate. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2012, 3: 215-220.
234. Shajii L, Paul Santerre J. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials*, 1999, 20: 1897-1908.
235. Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 63: 418-423.
236. Melo de Mendonça AA, Chaves Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2007, 104: e102-e108.
237. Brännström M, Nyborg H. Pulpal reaction to composite resin restorations. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1972, 27: 181.
238. Cox C. Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. *Operative Dentistry*, 1987, 12: 146.

EKLER





EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Tevfik DEMİRCİ
Doğum tarihi	01.12.1984
Doğum yeri	Erzurum
Medeni hali	Evli
Uyruğu	T.C.
Adres	Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı 25240 ERZURUM
Tel	0442 231 18 28
Faks	0442 236 09 45
E-mail	tevfik2111@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	Maltepe Askeri Lisesi (2001)
Lisans	Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2002-2008)
Doktora	Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı (2008-2013)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	İyi derecede (KPDS 85; 20 Mayıs 2012)

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

“2011. 3.1/1 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 30.06.2011

3.1/1- Enstitümüz Pedodonti Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Tefvik DEMİRCİ' nin
“ Çocukların Diş Tedavilerinde Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Materyallerin
Sitotoksisite ve Genotoksisitelerinin Değerlendirilmesi” tez konusu görüşüldü;
İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof.Dr.Türkan PASINLIOĞLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	Katılmadı
Prof. Dr. İsmail CEYLAN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Doç. Dr. Hakan USLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Raportör	