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

FARKLI DENTİN BAĞLAYICI AJANLARIN DENTİN BARİYER TESTİ KULLANILARAK L 929 HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTELERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Mahmut KUŞDEMİR

Danışman
Doç. Dr. Şölen KARAKAYA

Konya-2007

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ 1

2-LİTERATÜR BİLGİ 3

2.1. Dentin Dokusu 3
2.1.1.Dentinin Bileşenleri ve Dağılımı 4
2.1.2. Dentinin Geçirgenliği ve Tubuller Arası Dentin Matriksinin Nitelikleri 5
2.1.3.Monomerlerin Difüzyon Yapabilme Gücü 7
2.1.4.Dentin Geçirgenliği ve Monomer Difüzyonu Arasındaki Etkileşimi İlgilendiren Faktörler 8
2.1.4.1.Kollajen Fibril Ağı 8
2.1.4.2.Kollajen Olmayan Proteinler 8
2.1.4.3.Primerin Çözünürlüğü 9
2.1.4.4.Sıvı Akışı 10
2.1.4.5.Tubullerin Dallanması 10
2.2. Dentin Bağlayıcı Ajanlar 11
2.2.1.Adezyonun Temel Prensipleri 11
2.2.2.Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması 11
2.2.2.1.Total-etch Sistemler 12
2.2.2.2.Self-etch Sistemler 13
2.2.2.2.1 Self-etch Adeziv Sistemlerin Bileşenleri 15
2.2.2.3.Cam-iyonomer Adeziv Sistemler 16
2.3. Biyouyumluluk 16
2.3.1.Dental Materyallerin Biyouyumluluk Değerlendirmeleri 17
2.3.1.1 Hayvan Deneyleri 17
2.3.1.2 In Vitro Testler 18
2.3.1.3 Klinik Deneyler 18
2.3.2 Sitotoksisite Testleri 18
2.3.2.1 İn Vitro Sitotoksisite Test Yöntemleri 20
2.3.2.1.1 Agar Difüzyon Testi 21
2.3.2.1.2 Filtre Difüzyon Testi 21

2.3.2.1.3 Direkt Temas Testleri 21
2.3.2.1.4 Dentin Bariyer Testi 22
2.4 Hücre Kültürü 24
2.4.1 Hücre Kültürünün Tarihçesi 26
2.4.2 Hücre Kültürünün Kullanım Alanları 27
2.4.3 Hücre Kültürü Yöntemlerinin Avantajları ve Dezavantajları 28
2.4.3.A Avantajları 28
2.4.3.B Dezavantajları 28
2.4.4 Hücre Kültürü Laboratuarının Özellikleri 29
2.4.5 Hücreleri Üretme Yüzeyleri 30
2.4.6 Kontaminasyon 30
2.4.7 Hücre Kültürü Vasatları 31
2.5 Hücre Kültür Yöntemlerinin Temel Aşamaları ve Hücre Devamlılığı 32

3- MATERYAL VE METOT 36
3.1 Hücre Kültürü Çalışması 39
3.2 Adeziv Sistemlerin Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanması 41
3.3 Dentin Disklerinin Hazırlanması 42
3.4 Sitotoksisite Testlerinin Uygulanması 44
3.4.1 Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi 44
3.4.2 Farklı Kalınlıklarda Hazırlanan Dentin Disklerine Uygulanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi 47
3.5 İstatistiksel Analiz 49

4. BULGULAR 50
4.1 Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisite Değerlendirmeleri 50
4.1.1 L-929 Hücreleri Üzerine Uygulanan % 50'lik Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri 51
4.1.2 L-929 Hücreleri Üzerine Uygulanan % 20'lik Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri 53

4.1.3 L-929 Hücreleri Üzerine Uygulanan % 10'luk Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerinin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri 56
4.1.4 L-929 Hücreleri Üzerine Uygulanmış % 1'lik Konsantrasyonda Hazırlanmış Bağlayıcı Sistemlerinin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri..... 58
4.2. Farklı Kalınlıklardaki Hazırlanan Dentin Disklerine Uygulanan Self-etch Adeziv Sistemlerin L-929 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi 60
4.2.1 Kalınlığı 1.5mm olan Dentin Diski Altındaki L-929 Hücreleri Üzerine Self-etch Adeziv Sistemlerin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi 60
4.2.2 Kalınlığı 0.5mm olan Dentin Diski Altındaki L-929 Hücreleri Üzerine Self-etch Adeziv Sistemlerin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi 63

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 66

6. ÖZET 77

7. SUMMARY 80

8. KAYNAKLAR 83

9. ÖZGEÇMİŞ 95

10. TEŞEKKÜR 96

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.4.1 Hücre serileri ve kökenleri 25
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan adeziv sistemler, içerikleri, üretici firmaları ve üretim numaraları 37
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan adezivlerin uygulama prosedürleri 38
Tablo 4.1.1 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri 50
Tablo 4.1.1.1 % 50'lik konsantrasyonda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu 52
Tablo 4.1.2.1 % 20'lik konsantrasyonda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu 55
Tablo 4.1.3.1 % 10'luk konsantrasyonda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu 57
Tablo 4.1.4.1 % 1'lik konsantrasyonda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu 59
Tablo 4.2.1.1 Kalınlığı 1.5mm olan dentin diski üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri 61
Tablo 4.2.2.1 Kalınlığı 0.5mm olan dentin diski üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri 63

ŞEKİL & GRAFİK LİSTESİ

Şekil 3.3.1 Dentin bariyer testi için 3X3mm boyutlarında 0.5mm ve 1.5mm kalınlıklarında dentin disklerinin elde edilmesi 43
Grafik 4.1.1.1 Konsantrasyonu %50'lik olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 52
Grafik 4.1.1.2 L–929 hücreleri üzerine uygulanan %50'lik konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri 53
Grafik 4.1.2.1 Konsantrasyonda %20'lik olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 54
Grafik 4.1.2.2 L–929 hücreleri üzerine uygulanan %20'lik konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri 55
Grafik 4.1.3.1 Konsantrasyonda %10'luk olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 56
Grafik 4.1.3.2 L–929 hücreleri üzerine uygulanan %10'luk konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri 57
Grafik 4.1.4.1 Konsantrasyonda %1'lik olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 59
Grafik 4.1.4.2 L–929 hücreleri üzerine uygulanan %1'lik konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri 60
Grafik 4.2.1.1 Kalınlığı 1.5mm olan dentin diskleri üzerine uygulanan adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 62
Grafik 4.2.1.2 Kalınlığı 1.5mm olan dentin diski altındaki L–929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri 62
Grafik 4.2.2.1 Kalınlığı 0.5mm olan dentin diskleri üzerine uygulanan adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri 64
Grafik 4.2.2.2 Kalınlığı 0,5mm olan dentin diski altındaki L–929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri 65

RESİM LİSTESİ

Resim 2.3.2.1.4.1 Split Chamber aleti 22
Resim 3.1 Çalışmada kullanılan self-etch adeziv sistemler 38
Resim 3.1.1 Laminar Flow kabin 40
Resim 3.1.2 %5 CO_2 içeren İnkübatör ve CO_2 tüpü 40
Resim 3.3.1 Dentin disklerinin hazırlanmasında kullanılan Isomet Testere 43
Resim 3.4.1.1 MTT maddesi 44
Resim 3.4.1.2 48 Kuyucuklu hücre kültür kabı 44
Resim 3.4.1.3 Santrifüj aleti 45
Resim 3.4.1.4 Hücre sayma aparatı 45
Resim 3.4.2.1 Dentin disklerinin yerleştirildiği kalıp 48
Resim 3.4.2.2 Dentin Diski yerleştirilmiş kalıp 48
Resim 3.4.2.3 96 Kuyucuklu hücre kültür kabında optik yoğunluk incelemesi yapılmış Clearfil SE Bond, Clearfil Tri-S Bond ve Kontrol gruplarına ait örnekler 49

1-GİRİŞ

Toplumsal bilinç düzeyinin giderek artması, insanların sağlıklarına verdikleri önemi de arttırmakta ve bu hassasiyet dişhekimliği alanına da yansıyarak, hastaların daha uzun ömürlü, daha estetik ve daha fonksiyonel restorasyonlar talep etmelerine sebep olmakta, hekimleri de bu yönde zorlamaktadır. Bunun bir sonucu olarak, gerek araştırıcılar ve gerekse klinisyenler tarafından estetik materyallerin sürekli geliştirilmesi ve kullanılması kaçınılmaz olmaktadır. Dental teknoloji alanındaki gelişmeler ile kullanıma sunulan materyallerin öncekilere göre diş dokularına daha güçlü bağlantı yapması, mikrosızıntılarının çok daha düşük seviyelerde olması, çiğneme kuvvetlerine karşı daha iyi direnç göstermeleri öncelikli olarak aranılan özellikler gibi görünse de bu materyallerin dişlerin canlı dokusu olan pulpa üzerine de zararlı etkilerinin olmaması belki de bugünün bilinçli hekim ve hastaları için en önemli ve aranılan özelliklerden biri olmalıdır.

Geleneksel kavite preparasyon yöntemleri ile tutuculuğu arttırmak amacıyla, fazla miktarda sağlıklı diş yapısının kaldırılması, günümüzde sıklıkla kullanılan adeziv sistemler sayesinde terk edilmekte ve hastaya minimum zarar vererek maksimum tedavi imkanı sağlanabilmektedir. Adeziv teknolojisindeki yenilikler, estetiğin daha kolay ve ekonomik bir yöntemle uygulanması yönünden dişhekimine büyük olanaklar sağlamaktadır. Ancak, bu adeziv sistemlerin biyouyumlulukları da önemli bir noktadır. Dişhekimliğinde yaygın olarak kullanılan adeziv sistemler birçok bağımsız testten geçmekte ve çeşitli araştırıcılar tarafından farklı kriterlere göre incelenmekte olup yapılan çalışmalar, materyallerin fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi yanında, biyouyumluluğu üzerinde de yoğunlaşmaktadır.

Dentin bağlayıcı sistemler geliştirilirken kolay kullanım ve diş dokularına daha iyi bağlantı meydana getirme gibi özelliklerin üzerinde durulmaktadır. Fakat, bu sistemleri meydana getiren komponentlerin özellikleri, birbirleriyle etkileşimleri de biyouyumluluk açısından büyük önem taşımaktadır.

Dentin bağlayıcı sistemlerin kimyasal analizlerine bakıldığında, bu ürünlerin genel olarak Bisfenol A glisidil metakrilatın (Bis-GMA), halofosfor esterleri, poliüretan ve etil-metakrilat esasına dayandığı görülmektedir. Yeni bağlayıcı sistemler geliştirilirken, materyallerin içerisine farklı özelliklere sahip maddeler ilave edilebilmekte ve daha iyi sonuçlar elde edilmeye çalışılırken bu maddelerin bazı zararlı özellikleri göz ardı edilebilmektedir.

Adeziv sistemlerin içeriklerinde bulunan komponentlerin, canlı diş dokuları üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığının anlaşılabilmesi için biyouyumluluklarının incelenmesine gerek duyulmaktadır. Çeşitli metodlarla yapılan bu incelemeler, materyallerin geliştirilme safhaları kadar önem taşıyan bir safhadır.

Self-etch sistemler günümüzde hekimler tarafından kliniklerde sıklıkla kullanılan ve kullanım oranı gün geçtikçe artmakta olan bağlayıcı sistemlerdir. Piyasaya sunulmasından bu yana özellikleri gün geçtikçe geliştirilmiş, uygulama basamaklarının sayısı azaltılmıştır. Kullanım kolaylıkları, diş dokularına iyi bağlantı yapabilme gibi özellikleri nedeniyle hem hekimler tarafından tercih edilmektedirler. Kullanımlarının artması araştırmacıların da yaptıkları farklı çalışmalarda bu materyalleri kullanmaya yöneltmiştir. Literatürde, self-etch adeziv sistemler ile yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada da farklı özelliklere sahip self-etch adeziv sistemler (Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Adper Prompt, Clearfil Tri-S Bond, Reactmer Bond, Prime Bond NT/NRC) ile diş pulpa hücresi yerine kullanılan L 929 hücreleri (fare fibroblast hücresi) arasına farklı kalınlıklarda dentin diskleri yerleştirilerek, bu diskler üzerine uygulanan adezivlerin meydana getirdikleri olası sitotoksik etkiler MTT test yöntemi ile incelenmiştir.

2.LİTERATÜR BİLGİ

Günümüzde sürekli gelişim göstermekte olan adeziv dişhekimliğinin en önemli öğelerinden birisi olan bağlayıcı ajanların diş dokularıyla ilişkisinin temeli, inorganik diş yapısının sentetik rezinlerle yer değişim sürecine dayanmaktadır. Bu sürecin oluşumunu anlayabilmek için hem adeziv sistemlerin hem de diş dokusunun özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.1. Dentin Dokusu

Dentinin mikroyapısı ve özellikleri restoratif dişhekimliğinde yapılan hemen hemen tüm işlemlerde temel belirleyici faktördür. Geçtiğimiz yirmi yıl içinde koruyucu ve restoratif dişhekimliğinde, çürük oluşum sürecinin anlaşılması ve etkili bağlayıcı sistemlerin geliştirilmesi sonucu önemli gelişmeler görülmesine rağmen, dentin yapısının detaylı bir biçimde anlaşılamaması problem olarak kalmıştır. Dentin, fizyolojik olaylar, yaşlanma ve hastalık süreçlerinden etkilenerek primer dentin, sekonder dentin, tersiyer dentin, sklerotik dentin gibi farklı biçimlerde modifiye olabilir. (Marshall ve ark. 1997).

Primer dentin, dentinin esas yapısını oluşturur. Diş gelişimi sırasında apeksin kapanmasına kadar yapılan dentin olup kanallar oldukça düzgün bir yapıdadır. Sekonder dentin, canlı dişte, hayat boyunca çok yavaş olarak tüm pulpanın etrafında düzenli bir şekilde oluşur. Primer dentinden daha az mineralizedir ve kanallar düzenini kaybetmiştir. Primer ve sekonder dentin sınırı bu yüzden fark edilebilir. Tersiyer veya tamir dentini ise açığa çıkmış dentindeki lokalize yaralanmaya cevap olarak, bu bölgelerde hızlı bir şekilde oluşur. Tersiyer dentin yaralanma bölgesini kapatmaya çalıştığından tamir dentini adını da alır.

Transparan dentin olarak da adlandırılan sklerotik dentin**,** travma veya fizyolojik yaşlanmaya bağlı olarak dentin tübüllerinin kalsifikasyonu sonucu dentinin translüsent hale gelmiş formudur ve dentin tübüllerini izlemek zordur (Bath-Balogh ve Fehrenbach 1997).

2.1.1 Dentinin Bileşenleri ve Dağılımı

Dişin hacimsel olarak en büyük bölümünü oluşturan dentin, birbirlerine paralel, submikron ile nanometre boyutu arasında değişen, içi boş silindirler arasında yayılmış, kalsiyumdan fakir, karbonattan zengin apatit kristalleriyle dolu kollajen matriksten meydana gelmiş biyolojik bir bileşim olarak tanımlanmıştır (Marshall ve ark, 1997).

Dentinin kimyasal kompozisyonu %50 oranında mineral, %20 oranında plazma sıvısına benzer sıvı ve %30 oranında ise büyük miktarı Tip I kollajen olan organik matriksten oluşmaktadır (LeGeros 1991; Marshall ve ark. 1997). Diğer kollajen yapıda olmayan proteinler ve organik komponentler küçük miktarlarda bulunmakla birlikte bunların fonksiyonları tam anlaşılamamıştır ve dikkate alınmamaktadırlar (Ten Cate 1994)

Ağırlık olarak ise %70 inorganik materyal, %20 organik materyal, %10 su ve diğer maddelerden meydana gelmektedir. İnorganik yapının büyük bir bölümünü hidroksiapatit kristalleri oluştururken organik yapı kollajenden ibarettir (Dayangaç 2000).

Dentinin en önemli yapılarından biri olan tübüller, odontoblast hücrelerinin uzantısı ile oluşmuştur, pulpa odasından mine-dentin birleşim noktasına kadar uzanırlar ve dentin boyunca sıvı difüzyonunun gerçekleştiği en önemli yol olarak tanımlanabilirler (Ozawa ve ark. 2002). Tübüller, pulpa odasına doğru birbirlerine yaklaşırlar ve bu yüzden tübül yoğunluğu ve oriyentasyonu bölgeden bölgeye değişim gösterir. Tübül sayısı, mine-dentin sınırında en az iken predentin yüzeyi ile pulpa odası sınırında en fazladır.

Tübüllerin içinde sıvı ile beraber tübül boyunca kısmen veya tamamen devam eden odontoblastik uzantılar vardır (Marshall ve ark. 1997).

Çapı 1µm olan tübül lümeninin önemli bir kısmı yüksek derecede mineralize olmuş peritübüler dentin kıvrımlarıyla, daha uygun bir tanımlamayla, büyük oranda apatit kristali ve çok az organik matriks içeren intratübüler dentin ile örtülmüştür.

Tübüller, apatit ile güçlenmiş, Tip 1 kollajen içeren matrikse sahip intertübüler dentin ile birbirlerinden ayrılır. Apatit kristalleri minedekilerden daha küçüktür ve hidroksiapatit ile kıyaslandığında %4–5 oranında karbonat içerir (Ten Cate 1994).

Derin dentindeki tübüllerin yüzeyel dentindekilerden daha geniş olması ve tübüller arası kollajenin derin dentinde daha az olması nedeniyle dentinin birim hacmi başına düşen kollajen miktarı süperfisiyal bölgeden derine doğru gittikçe azalmaktadır (Garberoglio ve Brannstrom 1976).

2.1.2. Dentinin Geçirgenliği ve Tübüller Arası Dentin Matriksinin Nitelikleri

Dolgu materyallerinin fiziksel ve biyolojik özellikleri, dentinle temas ettikleri zaman dentinin yapısal özellikleri nedeniyle modifiye olabilir. Dentin geçirgenliği konusu, materyallerin dentine bağlanmasını ve pulpa üzerindeki biyolojik etkilerini ilgilendirdiği için özel ilgi duyulan bir konudur (Pashley ve Carvalho 1997). Dentin geçirgenliği, hidrodinamik teoriye göre; sıvının, birim yüzey alandan, birim basınç altında belli bir zamanda geçmesidir. Dentin, difüzyon ve adsorpsiyon bariyeri olarak görev yaparak pulpal reaksiyonlara neden olan maddelerin, tübüllerden geçen konsantrasyonlarını azaltır (Pashley 1991; Vongsavan ve ark. 2000).

Kavite preparasyonu esnasında frez veya benzeri kesici aletlerle yapılan aşındırma işlemi sonucunda, dentin dokusu üzerinde 1–5µm kalınlığında, artık organik ve inorganik bileşenlerden oluşan bir tabaka meydana gelir. “Smear tabakası” denilen bu tabakanın kalınlığı, preparasyon aletleri ile ıslak veya kuru çalışılmasına, çalışılan bölgenin lokalizasyonuna, dentinin organik/inorganik madde oranına ve tübül çapı ile derinliğine göre değişebilmektedir (Nakabayashi ve Pashley 1998). Smear tabakasının varlığı tübüler ve intertübüler dentinin geçirgenliğini büyük oranda azaltır (Watanabe 1994).

Bu nedenle, smear tabakası ile kaplı dentin yüzeyine primer veya bağlayıcı ajan uygulandığında, alttaki dentin matriksine infiltrasyon yavaşlar (Nakabayashi ve Saimi 1996).

Dentin geçirgenliği, dentinin lokalizasyonuna bağlı olarak da değişkenlik gösteren bir olaydır. Pulpa yakınında ve pulpa boynuzları civarında daha fazladır. Bunun nedeni, tübül yoğunluğundaki farklılıklar, yani mm^2 deki tübül sayısının aynı olmaması ve pulpaya yaklaşıldıkça tübül çaplarının artış göstermesidir (Vongsavan ve ark. 2000).

Dentin-mine birleşiminin hemen altında lokalize olmuş dentin, yaklaşık 0.8µm çapında, mm^2 de 15000–19000 tübül içerirken, pulpa yakınındaki dentin yaklaşık 2.5µm çapında ve mm^2 de 45000–60000 civarında tübul içermektedir (Dayangaç 2000).

Pulpa yakınlarındaki dentinde, intertübüler dentinin azalması sebebiyle tübül çapı ve yoğunluğu artacak, dolayısıyla kalan dentin kalınlığı ile ters orantılı olarak geçirgenlik artmış olacaktır (Hamid ve Hume 1997).

İki tip dentin geçirgenliğinden söz edilebilir. Birinci tip dentin geçirgenliği, sıvının dentin tübülleri içinden akışı, yani "intratübüler geçirgenlik" olup dentin hassasiyetinden veya ağrıdan sorumludur. Maddelerin dentin sıvısı ile dolu tübüllerden difüzyon yoluyla pulpaya ulaşması intratübüler dentin geçirgenliğinin bir örneğidir (Hansen ve ark. 1992; Hanks ve ark. 1994). Resin monemerlerin dentin tübülleri içine, hibridize rezin uzantılar oluşturmak için penetre olması da yine intratübüler dentin geçirgenliğine örnektir (Nakabayashi ve ark. 1995**).**

İkinci tip dentin geçirgenliği ise monomerlerin tübüller arasındaki dentine, yani intertübüler dentine difüzyonudur. Bu durum "intertübüler dentin geçirgenliği" olarak adlandırılabilir. Hibrid tabakası oluşması için intertübüler dentin matriksinin kollajen fibrillerinin açığa çıkması ve monomer infiltrasyonunda difüzyon yolları meydana getirmek için demineralize olması gerekmektedir.

Resin monomerin bu devamlı ve birbirine bağlı dar kanallar içine hareketi intertübüler geçirgenliğe örnektir. İntertübüler dentin geçirgenliği de intratübüler geçirgenlik gibi dentinin muamele koşullarına bağlıdır (Nakabayashi ve ark. 1995).

2.1.3. Monomerlerin Difüzyon Yapabilme Gücü

Demineralize olmuş dentinin kollajen fibrilleri arasındaki boşluklar su ile dolduğunda, hangi solventi içerirse içersin monomerlerin bu bölgelere infiltrasyonu için geçerli tek mekanizma difüzyondur. Bu bölgenin bazen "rezin interdifüzyon bölgesi" olarak adlandırılmasının nedeni budur (Van Meerbeek ve ark. 1992, 1993, 1996).

Bir primer veya bağlayıcı ajan içinde farklı molekül ağırlığına sahip monomerler bulunduğundan, bu maddelerin gerçekleştirebileceği difüzyon miktarı da farklı olacaktır. Örneğin, metil metakrilat (MMA) ve polimetilmetakrilat (PMMA) karışımında molekül ağırlıkları farklıdır (MMA=100, PMMA=300000). Difüzyon oranı, molekül ağırlığının kareköküyle orantılı olduğu için hafif molekül ağırlığına sahip moleküllerin difüzyon miktarı daha fazla olacaktır, yani PMMA'nın aynı sürede dentin içine diffüze olabileceği mesafe MMA'ya göre çok daha azdır. Bu nedenle, hibrid tabakası içindeki MMA ve PMMA oranları, uygunlandıkları andaki oranlarından daha farklı olacaktır.

Monomerlerin demineralize dentin içine penetrasyonu zamana da bağlıdır. Daha uzun difüzyon zamanına izin verilirse geçiş özelliği az olan monomerler bile demineralize mine ve dentin içinde daha derinlere diffüze olabilirler (Toida ve Nakabayashi 1997).

Aseton bazlı primerler kullanıldığında, monomer difüzyonunda bazı alışılmadık problemlerle karşılaşılabilinir. Adeziv monomerler aseton içinde daha rahat çözülürler. Aseton çok ucucudur ve dentin yüzeyinden çok hızlı şekilde buharlaşabilir. Fakat bu uçuculuk dezavantaj getirir, çünkü solvent, bağlayıcı ajanları taşıyan şişelerden buharlaşarak uzaklaşabilir (Nakabayashi ve Pashley 1998).

2.1.4. Dentin Geçirgenliği ve Monomer Difüzyonu Arasındaki Etkileşimi İlgilendiren Faktörler

2.1.4.1. Kollajen Fibril Ağı

Yüksek su miktarı ve asidik pH gibi durumlarda kollajen fibriller çap ve uzunluklarını arttırarak hafifçe büyürler ve fibriller arası boşluğu azaltarak monomerlerin kollajen ağının içine infiltrasyonunu zorlaştırırlar. Hava ile kurutma, su ile karışabilen organik solventlerin dehidratasyon yapması gibi durumlarda da kollajen fibriller çaplarını azaltarak küçülür ve fibriller arası boşluklar artar (Nakabayashi ve Pashley 1998). Kollajen fibril ağının çökmesine izin verilirse, fibriller arası boşluk kaybolur.

Su veya diğer hidrojen bağı oluşturan maddelerin eksikliğinde, kollajen peptitler en yakındaki komşu peptitle moleküller arası hidrojen bağı meydana getirirler ve fibrillerin kısalmasına, sertliklerinin artmasına sebebiyet vererek kollajen ağının yıkımına katkıda bulunurlar (Maciel ve ark. 1996). Su, HEMA (2-hidroksietilmetakrilat) ve 4-META (4-metakriloksietiltrimellitik anhidrit) veya 2-Fenil-P gibi asidik monomerlerin ilave edilmesi, bu moleküller arası hidrojen bağlarını kırabilir ve ağın yumuşaması ile tekrardan genişlemesine olanak verebilir (Nakabayashi ve Pashley 1998)**.**

2.1.4.2 Kollajen Olmayan Proteinler

Kollajen fibriller arasına dağılmış fosforin, siyaloprotein ve glikozaminoglikanlar gibi proteinler dentin matriksinin protein içeriğinin yaklaşık %10'unu meydana getirirler. Bunlar hayli saldırgan moleküllerdir ve demineralize dentinde büyük miktarda suya bağlanabilirler (Butler 1995).

Kollajen, kollajen olmayan proteinler ve glikozaminoglikan kombinasyonu, büyük miktarda su ile beraber hidrojel yapıda bir matriks oluşturur (Linden ve ark. 1995). Bu hidrojel yapı, ıslak yapının hidrasyonunun devamını sağlayarak önemli bir görev üstlenir. Primer ve adeziv monomerleri demineralize dentin matriksi içine diffüze oldukları için, polimerlere dönüşüm ve çapraz bağlanma yapabilme dereceleri intertübüler dentin içindeki

perifibrillerin arasındaki boşlukta bulunan su miktarına bağlı olarak değişkenlik gösterir (Jacobson ve Soderholm 1995; Vongsavan ve ark. 2000).

2.1.4.3 Primerin Çözünürlüğü

HEMA gibi bazı hidrofilik monomerler su veya aseton içinde aşırı derecede çözünürler. Eğer, HEMA kollajen fibriller etrafındaki suyun yerini alabilirse yeterli difüzyon zamanı verildiğinde, sonradan uygulanan adeziv monomerler için polimerize olabilen solvent görevi yapabilir. Adeziv monomerlerin bu boşluklar içine çekilmesi, boşlukları meydana getiren solvent içinde çözünebilirliklerine, uygulanan konsantrasyonlarına, solvent içindeki monomerin difüzyon katsayısına, monomerin substrata karşı olan afinitesine ve penetrasyon için verilen zamana bağımlıdır (Jacobson ve Soderholm 1995).

Diğer tarafta ise demineralize dentinin monomeri alması, kollajen fibriller arası boşluğun boyutlarına ve derinliğe bağlıdır. Kollajen fibriller arasında, havayla kurutulmuş dentinin tamamen çökmüş kollajen fibrillerinin arasındaki gibi boşluk olmazsa, monomere karşı geçirgenlik çok düşük olacaktır (Carvalho ve ark. 1996). Öte yandan, ıslak durumdaki demineralize dentinde kollajen ağı aşırı genişlemiştir ve suyla dolu fibriller arasında çok fazla mesafe vardır. Bağlayıcı ajan, bu koşullarda yüksek geçirgenliğe sahip olacaktır. Bunun yanında, eğer su içindeki çözünme kabiliyeti düşük bir primer, nemli durumdaki demineralize dentine uygulanırsa, monomerin difüzyonu çok az ve bağlanma kuvveti de düşük olacaktır. Bağlanma için ideal koşul, dentinin geçirgenliği ve resin monomerin yüksek difüzyon yeteneğinin olduğu koşuldur (Nakabayashi 1992).

2.1.4.4 Sıvı Akışı

Primer uygulandıktan sonra, dentin yüzeyleri düzgün bir parlaklık gösterir. Bununla birlikte, bazen parlak dentinle çevrili, mat renkte bazı izole bölgeler görülebilir. Bu bölgeler, monomer konsantrasyonunun komşu parlak bölgelerdekinden daha az olduğu ve dentine ideal bağlanma değerlerinin düşük olduğu bölgeleri işaret eder ve muhtemelen, yüksek geçirgenlikte ve pulpayla direkt bağlantıdaki bölgelerdir. Bu tür bölgelerin dehidrate olması zordur, çünkü yüzeydeki su uzaklaştığı için pulpadan tübüllere doğru daha çok sıvı diffüze olmaya devam eder. Bununla birlikte, primerin birden fazla uygulanması ile tübüller yeterli derecede rezin monomerle dolar ve pulpadan suyun daha fazla difüzyonu engellenmiş olur (Nakabayashi ve Pashley 1998)**.**

2.1.4.5 Tübüllerin Dallanması

Dentin tübülleri, adeziv monomerlere tübüller boyunca çeşitli mesafelerde difüzyon imkanı verir. Tübüllerin pek çoğu lumenden 2–6μm arası yayılan çok sayıda lateral dallara sahiptir. Bu küçük dallar, hibrid tabakası oluşumu için gerekli monomerlerin infiltrasyonunda farklı rotalar meydana getirir (Mjör ve Nordhal 1996). Bu durum, intratübüler dentin geçirgenliğinin bir tipi olarak sınıflandırılabilir. Pek çok çalışmada bu yan dalların rezinler tarafından doldurulduğu gösterilmiştir (Chappell ve ark. 1994; Tay ve ark. 1996a; Van Meerbeek ve ark. 1996). Bu dallar, küçük olmaları nedeniyle rezin retansiyonunda önemli rol oynamasa da monomerlerin demineralize bölgenin alt kısımlarına infilte olmasını kolaylaştırır (Nakabayashi ve Pashley 1998).

2.2 Dentin Bağlayıcı Ajanlar

2.2.1 Adezyonun Temel Prensipleri

Diş sert dokuları ile restoratif materyaller arasındaki adezyonun temel prensibi, dişin inorganik kısımlarının sentetik rezin ile yer değiştirmesidir (Van Meerbeek ve ark. 2001b). İki aşamadan oluşan bu sistemin birinci basamağı, kalsiyum-fosfatın uzaklaştırılması sonucu mine ve dentinde mikroporozite oluşumu, ikinci basamağı ise hibridizasyon olarak tabir edilen, rezinin oluşan mikroporoziteler arasına girip polimerize olmasıdır. Mikromekanik adezyon, diş sert dokuları ile restoratif materyallerin bağlanması için anahtardır (Van Meerbeek ve ark. 1998), ancak son dönemde buna ilave olarak fonksiyonel monomerler ile diş sert dokuları arasındaki kimyasal bağlanmanın potansiyel yararları üzerinde de durulmaktadır.

2.2.2. Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması

Daha önceleri en sık kullanılan sınıflama, bağlayıcı sistemlerin piyasaya sunum sıralarının kronolojik olarak düzenlenmesiyle yapılan sınıflamaydı. Bu sınıflamaya göre bağlayıcı sistemler;

- 1.Jenerasyon: Düşük bağlanma dayanımına sahip kavite primerleri
- 2.Jenerasyon: Asitlenmiş mineye daha iyi bağlanabilen dentin-mine bağlayıcı ajanlar
- 3.Jenerasyon: Dentinin asitlenmesi + smear tabakasının kısmen uzaklaştırılması ve modifiye edilmesi
- 4.Jenerasyon: Total-etch tekniği ve hibrid tabakasıyla rezin tagların oluşumu
- 5.Jenerasyon: Klinik prosedürlerin basitleştirilmesi- Tek şişe sistemler ve self-etch primerler
- 6.Jenerasyon: Mine ve dentine yeterli derecede bağlanabilen tek aşamalı bağlayıcı sistemler olarak belirlenmiştir (Kugel ve Ferrari 2000).

Bununla birlikte, bu sınıflama bilimsel geçmişle bağdaşmayan ve bağlayıcı sistemlerin objektif kriterlere uymadığı bir sınıflama olduğu için, bir süre, kavite preparasyonu esnasında oluşan smear tabakasına yaklaşıma göre isimlendirilen bir sınıflama kullanılmıştır. Bu sınıflamada, bağlayıcı ajanlar;

1. Smear tabakasını modifiye eden
2. Smear tabakasını tamamen kaldıran
3. Smear tabakasını çözen bağlayıcı ajanlar olarak adlandırılmıştır (Van Meerbeek ve ark. 1998; Van Meerbeek ve ark. 1992).

En son yapılan ve halen geçerli olan sınıflama, klinik uygulama basamaklarının göz önünde bulundurulduğu ve daha da önemlisi diş dokularıyla etkileşimin ön planda olduğu sınıflamadır (Van Meerbeek ve ark. 2001).

Bu yaklaşıma göre, günümüzde kullanılan adeziv sistemler diş sert dokularına olan adezyon stratejileri açısından şu şekilde sınıflandırılmaktadır (Peumans ve ark. 2005; Inoue ve ark.2000; Kugel ve Ferrari 2000; Van Meerbeek ve ark. 2001; de Munck ve ark.2005) ;

1. Total-etch adeziv sistemler
2. Self-etch adeziv sistemler
3. Cam iyonomer adeziv sistemler

2.2.2.1.Total-etch Adeziv Sistemler

Bu sistemler, yüzeyin asitleme ve yıkama işlemlerini gerektirir. Asitleme ve yıkama, mineye en etkili bağlanmayı sağlayan yaklaşımdır. Üç basamaklı total-etch adeziv sistemlerde asitleme ve yıkama işlemini, primerleme ve adeziv rezin uygulaması takip etmektedir. Uygulaması daha basitleştirilmiş iki basamaklı total-etch sistemlerde ise primer ve adeziv rezin tek bir şişede birleştirilmiştir, ancak asitleme ve yıkama işlemi ayrı olarak yapılmaktadır. Total-etch sistemler, smear tabakasını tamamen ortadan kaldırıp, yüzeyel dentinde demineralizasyon meydana getirerek sadece mikromekanik adezyonla bağlanmayı sağlar, başka bir deyişle dentine bağlanma mekanizmaları esas olarak difüzyon

temeline dayanmaktadır. Dentinin fosforik asitle dağlanması kollajen ağını açığa çıkartır ve neredeyse bütün hidroksiapatitleri ortamdan uzaklaştırır (Peumans ve ark. 2005; Van Meerbeek ve ark. 2001; de Munck ve ark.2005). Bu bağlantı ilk defa Nakabayashi ve ark. tarafından (1982) tarif edilmiştir ve hibrit tabakası olarak isimlendirilmiştir.

Sonuç olarak, açığa çıkmış kollagen iskelet içine, rezinin infiltrasyon ve hibridizasyonu ile bağlantı gerçekleşir. Fakat burada bir kimyasal bağlantı olanaksızdır, çünkü monomerlerin fonksiyonel gruplarının hidroksiapatitten arınmış kollagene çok zayıf bir afinitesi vardır (Van Meerbeek ve ark. 2003).

Total-etch adeziv sistemleri mineye etkin ve uzun süreli bağlanma açısından oldukça başarılı sistemler olmasına rağmen dentin uygulamalarında teknik hassasiyetleri yüksektir. Özellikle aseton bazlı sistemlerin, dentin yüzeyinin neminden, etanol ve su bazlı sistemlere göre daha fazla etkilendikleri saptanmıştır (Tay ve ark. 1996b; Swift ve ark. 1997). Dentinde oluşturdukları demineralizasyon derinliği, monomer penetrasyonundan fazla olduğunda, hibrit tabakasının altından nanosızıntı riskleri vardır (Sano ve ark. 1995a; Sano ve ark. 1995b)

Günümüzdeki total-etch bağlayıcı sistemler, klinik olarak kabul edilebilir seviyede bağlanma etkinliğine ulaşmışlardır.

2.2.2.2. Self-etch Adeziv Sistemler

Self-etch adeziv konsepti ilk kez 1990'lı yılların başında Scotchbond 2 (3M, Dental Product Division, St.Paul, USA)' nin piyasaya sunulması ile başlamıştır. Fakat bu sistem, sadece dentine uygulanmak üzere tasarlandığı için ayrı bir asitleme safhası gerektiriyordu. Günümüz self-etch adeziv sistemleri, yıkama gerektirmeyen, asidik monomerlerin, yüzey düzenleme ve primer uygulama işlemlerini aynı anda gerçekleştirmesi temeline dayanmaktadır (Van Meerbeek ve ark.2001).

Self-etch adeziv sistemler ile diş yüzeyi yıkanmadığından klinik uygulama zamanı azaldığı gibi fosforik asidin mine ve dentinden uzaklaştırıldığı, teknik hassasiyet gerektiren

safha da elimine edilmiş olur (Moszner ve ark. 2005; Peumans ve ark. 2005; de Munck ve ark. 2005).

Self-etch adeziv sistemleri, smear tabakasını asidik monomerler ile çözerek veya modifiye ederek adezyon proçesine katılmakta ve yüzeyel dentindeki kalsiyum ile de kimyasal bağlanma sağlayabilmektedir (Van Meerbeek ve ark. 2003). Self-etch sistemler ile sağlanan demineralizasyon derinliği, asidik monomerlerin tipine, konsantrasyonuna, uygulama süresine ve dentinin yapısına bağlıdır (Ikemura ve ark. 1996). Ko-monomerlerin asitlenmiş mine veya dentin tübülleri ile intertübüler dentin içine rezin tag oluşumu ile difüzyonu sonucu, hibrid tabakası meydana gelir (Nakabayashi 1982).

Günümüzde sık kullanılan self-etch adeziv sistemler iki basamaklı olanlardır. Dentin ve mine yüzeyinin self-etch primer ile düzenlenmesini takiben adeziv rezinin uygulanması şeklinde kullanılır. Son yıllarda, piyasalara all-in-one veya tek aşamalı self-etch sistemler olarak isimlendirilen, asit, primer ve adeziv rezin uygulama basamaklarının birleştirildiği sistemler de sunulmaktadır.

Tek basamaklı self-etch sistemler yapılarındaki hidfofilik asidik rezin monomer oranının arttırılması nedeniyle dentin yüzeyini nemlendirmekte oldukça etkilidirler, ancak bu nedenle uzun dönemde degredasyona daha meyilli hale gelmektedirler (Tay ve Pashley 2001; Tay ve ark. 2002).

Ayrıca, self-etch adeziv sistemler pH değerlerine ve asitleme potansiyellerine göre güçlü, orta ve zayıf olarak da sınıflandırılabilirler. Bu sistemlerin çoğu, metakrilat bazlı, pH'ları 1.5–2.5 arasında değişen özelliktedir (Watanabe ve ark. 1994). Zayıf olanların pH' ları yaklaşık 2 iken güçlü self-etch adezivlerin pH değerleri 1 veya daha düşüktür (Van Meerbeek ve ark. 2001; Inoue ve ark. 2000).

Güçlü self-etch adezivler, etch-and-rinse adezivler gibi hidroksiapatitleri dentin yüzeyinden tamamiyle uzaklaştırarak nispeten daha derin bir hibridizasyon meydana getirirken zayıf self-etch adezivler, açığa çıkmış kollajenlerin etrafında kısmen

hidroksiapatit bırakarak submikron kalınlığında hibrid tabakası meydana getirirler (Nakabayashi ve Saimi 1996; Yoshida ve ark. 2004; de Munck ve ark. 2005).

Klinik olarak, self-etch sistemler dentin yüzeyinin durumuna bağlı olarak düşük seviyede teknik hassasiyete buna bağlı olarak ta düşük postoperatif hassasiyete sahiptirler ve bu özelliklerinden dolayı da en çok umut veren adeziv sistemler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Van Meerbeek ve ark. 2003; Moszner 2005; Peumans ve ark. 2005).

2.2.2.2.1 Self-etch Adeziv Sistemlerin Bileşenleri

Self-etch adeziv sistemlerin içeriklerinde klasik rezin monomerler, fotoaktivatörler ve doldurucuların yanında bir veya daha çok karboksilik veya fosforik asit grubu aşılanmış monomerler bulunmaktadır. PENTA (dipentaerythriyol penta acrylate monophosphate) ve Phenyl-P (2-methacryloxyethyl phenyl hydrogen phosphate)'yi fosforik asitli monomerlere, 4-META (4-methacryloxyethyltrimellitic acid)'yı da karboksilik asitli monomerlere örnek gösterebiliriz (Van Meerbeek ve ark.2003; Yoshida ve ark. 2004).

Hemen hemen tüm self-etch adeziv sistemlerde su ve HEMA bulunmaktadır. HEMA, suda az çözünen diğer monomerlere yardımcı olabilmek için ve nemli ortamlara diffüze olabilme özelliğinden dolayı kullanılmaktadır. Self-etch adezivlerin içeriğindeki asidik monomer yapılar su ile karşı karşıya geldikleri zaman, iyonizasyon reaksiyonu görülür ve diş sert dokularında demineralizasyon meydana getirecek duruma gelirler.

Asitleme işlemi ilerledikçe solusyonun asiditesi; dentin ve mineden çözülen mineral bileşenleri ve smear tabakası yardımıyla tamponlanarak pH istenilen seviyeye yükselince demineralizasyon olayı durur (Gordan ve ark. 1997).

2.2.2.3. Cam-iyonomer Adeziv Sistemler

Cam-iyonomerler, diş yüzeyine herhangi bir uygulama yapılmadan, kendi kendine bağlanabilen tek materyaldir (Yoshida ve ark. 2000). Ancak, zayıf polialkenoik asit ile bir ön tedavinin yapılması bağlanma etkinliğini arttırır.

Polialkenoik asit diş yüzeyini temizler, smear tabakasını uzaklaştırır ve kollajen fibrilleri 0.5–1μm derinliğe kadar açığa çıkararak cam-iyonomer komponentlerinin difüzyonuna yardım ederek hibridizasyon prensibine uygun, mikro-mekanik olarak ilave bir bağlanmanın gerçekleşmesine yol açar (Inoue ve ark. 2001). Polialkenoik asit uygulanması, geleneksel fosforik asit uygulamasından daha az invaziv etkiye sahip bir işlemdir ve bu yolla kollajenler çevresindeki hidroksiapatitlerin tamamen uzaklaştırılması engellenmiş olur (Lin ve ark. 1992; Van Meerbeek ve ark. 2001; de Munck ve ark. 2005). Kimyasal bağlantı ise polialkenoik asidin, karboksil gruplarının, kollajen fibrillere bağlı hidroksiapatitlerinin, kalsiyum iyonları ile iyonik etkileşimleri sonucu meydana gelir (Yoshida ve ark. 2000).

Bağlantı kuvvetindeki artış;

1-Smear tabakasının ortadan kaldırılması ile yüzeyde sağlanan temizlik etkisine

2-Mekanik kilitlenmeyi sağlayacak olan yüzeydeki mikroporoziteleri arttıran parsiyel demineralizasyon etkisine

3-Polyalkenoik asit ile hidroksiapatit arasındaki kimyasal etkileşimlere bağlanabilir (Van Meerbeek ve ark. 2001).

2.3 Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, bir biyomateryalin canlı dokularla temas halinde iken vücudun yumuşak ve sert dokularında, lokal veya sistemik toksisite, alerji, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi “doku reaksiyonları” oluşturmaması olarak ifade edilir (Hanks ve ark. 1996).

2.3.1. Dental Materyallerin Biyouyumluluk Değerlendirmeleri

Dişhekimliğinde kullanılan rezin esaslı restoratif materyaller tamamlanmamış polimerizasyona bağlı olarak sitotoksik etkiler gösterebilmektedir. Bir restoratif materyal geliştirilirken, dayanıklılık, estetik ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerin yanında biyouyumluluğu da göz önünde bulundurulmalıdır (Hanks ve ark. 1996).

Materyallerin klinik kullanımlarına geçilmeden önce, materyalin oral dokular üzerindeki potansiyel zararlı etkileri, in vitro testler ile incelenmeli ve daha sonra yapılacak hayvan çalışmalarında elde edilecek sonuçlara göre materyalin toksik olup olmadığında dair ilk yanıtları verilmelidir (Saw ve ark. 2005). Restoratif dişhekimliğinde adeziv biyomateryallerin hızlı bir biçimde geliştirilmesi, bu materyallerin kontrollerinde kullanılacak, güvenilir ve klinik koşullara uygun sitotoksisite değerlendirme testlerinin de aynı anda geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Biyouyumluluk üç tip biyolojik test ile ölçülebilir (Hanks ve ark. 1996; Cao ve ark. 2005; Wataha 2001).

Bu testler;

—Hayvan deneyleri

—İn vitro testler

—Klinik deneylerdir.

2.3.1.1 Hayvan Deneyleri

Bir memeli organizması kullanılarak, materyal ile biyolojik ortam arasında oluşan kompleks ilişkilerin test edilmesi sağlanır. Denenecek olan materyal, fare, rat, köpek, kedi, koyun, keçi veya maymun gibi deney hayvanlarına implante edilir. Böylece, biyolojik cevap in vitro testlere göre daha anlamlı ve kompleks bir şekilde belirlenmiş olur. Ancak, hayvan deneylerinde değişkenleri kontrol etmek zordur, uzun sürer, pahalıdır ve etik açıdan bilim çevrelerinde tartışılmaktadır (Wataha 2001; Cao ve ark. 2005; Schmalz 1997)

2.3.1.2. İn Vitro Testler

Amaç, çeşitli hücreler ile materyalin temasında ortaya çıkan biyolojik cevapların test edilmesidir. Materyale maruz kalan hücrelerin sayısı, gelişim hızı, çeşitli metabolik fonksiyonları veya hücresel fonksiyonları ölçülerek etkiler değerlendirilir. Bu testler, tekrarlanabilen, çabuk sonuç alınan, uygulaması daha kolay testlerdir (Wataha 2001; Cao ve ark. 2005).

2.3.1.3 Klinik Deneyler

Laboratuar ve hayvan deneylerinde biyouyumlu olduğu kanıtlanmış olan materyaller daha sonra insan üzerinde denenmelidir. Materyal gönüllü bir insana yerleştirilir. En gerçek cevap alınan test yöntemidir. Fakat çok pahalı, uzun zaman alan, kontrolü ve yorumlaması zor, etik açıdan çok tartışmalı olan bir test metodudur (Wataha 2001; Cao ve ark. 2005).

2.3.2 Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite, polimer kimyasının ana yapıları olan makromoleküler arasındaki sentezler ile moleküler olaylar zincirinin karışması sonucu görülen etkinin, hücrenin fonksiyonları ve yapısında net hasarlar meydana getirmesi olarak tanımlanabilir.

Klinik kullanıma sunulmadan önce, materyallerin sitotoksisitelerini belirlemek amacıyla üretim aşamasında bazı testlerden geçmesi gerekmektedir (Murray ve ark. 2000).

Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas edeceği yol, büyük önem taşımaktadır. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya bir geçiş sonucu olabilir. Araştırıcılar sitotoksisite testlerinde farklı hücre-materyal temas metodları kullanmışlardır (Schuster ve ark. 2001; Saw ve ark. 2005; Cao ve ark. 2005; About ve ark. 2005).

Ayrıca kullanılacak hücre tipinin uygun seçimi de önem taşımaktadır. ISO'nun (International Organization for Standardization) belirlediği sitotoksisite testleri standartlarında, L929, Balb/3T3 ve WI38 gibi hücre serilerinin kullanılması önerilmektedir. Bu hücre serileri, üreme karakterleri ve homojen morfolojileri nedeniyle in vitro sitotoksisite tespitinde yararlı olmaktadırlar (Schmalz 1994; Hanks ve ark. 1996; Geurtsen ve ark. 1998).

Biyomateryaller uygulandıkları bölgedeki hücreler üzerinde bazı etkiler meydana getirirler (Araki ve ark. 1993; Schmalz 1997). Bunlar;

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

Bu etkilerin incelenmesinde kullanılan test yöntemleri iki grupta toplanır.

A. Statik inceleme yöntemleri;

- Hücre sayısının tespiti
- Hücre ölümü
- Hücre tutunmasının inhibisyonu
- Koloni oluşumu
- Hücre canlılık oranlarının belirlenmesi ile yapılır (Spangberg 1990; Freshney 1994).

B. Dinamik inceleme yöntemleri;

- ^{3}H-Timidin ile otoradyografi yöntemi
- ^{51}Cr salınım yöntemi
- ^{3}H-Lösin ile işaretleme yöntemi
- Sitometrik analiz yöntemi

- MTT test yöntemi (Spangberg 1990; Freshney 1994)

2.3.2.1 İn Vitro Sitotoksisite Test Yöntemleri

İn vitro sitotoksisite testlerinin hedefi, materyalin vücut dokuları üzerine veya içine uygulandığında, dokunun gösterdiği reaksiyonların, laboratuar ortamında ortaya çıkarılarak belirlenmesidir. Materyallerin ilk olarak laboratuar şartlarında test edilmeden hayvanlar üzerinde denenmesi, hem zaman alıcı hem de pahalı bir yoldur.

Ayrıca etik olup olmadığı da tartışma konusudur (Hanks ve ark. 1996). Son otuz yıl içinde, dentin adezivlerin meydana getirdiği biyolojik etkileri ölçen in vivo testlerin sahip olduğu kısıtlamaları aşmak için çok sayıda in vitro metot geliştirilmiştir. İlk geliştirilen testler nispeten basit tasarıma sahip ve hayvan çalışmalarından daha az komplikasyona neden olan testlerdi. Bu testlerde, sitotoksik etkiler, materyallerin monolayer kültür ile elde edilen hücreler üzerine direkt temas ettirilmesi sonucu, hücre sayımı ile değerlendirilmekteydi.

Dentin; üzerine uygulanan materyallerin fiziksel ve biyolojik özelliklerini modifiye ederek değiştirebilme gücüne sahiptir. Bu yüzden dentin üzerine uygulanan materyallerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde, direkt temas yönteminin etkinliği üzerine şüpheler duyuldu ve test modellerinde, materyal ile hücreler arasında dentin gibi bir bariyer kullanılırsa in vivo koşullardaki yanıtlara daha yakın sonuçlar elde edilebileceği düşünülerek daha gelişmiş test metodları kullanılmaya başlandı. Halen, sitotoksisite testleri materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Bouillaguet ve ark. 1998).

ISO tarafından hazırlanan standartlara göre, kullanılması önerilen in vitro sitotoksisite testleri, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, direkt kontak testi ve dentin bariyer testidir (ISO 10993–5, 1993).

2.3.2.1.1 Agar Difüzyon Testi

Schmalz (1988) tarafından tanıtılan bu test metodunda, L 929 hücreleri, plastik hücre kültürü kaplarında büyütülerek üzerleri agar ile kaplanır. Toksisitesi incelenecek olan materyal, agarın üzerine yerleştirilir. Agardan diffüze olan materyalin sitotoksik etkisini belirlemek için ortama verilen nötral kırmızı boyanın, hücre membranındaki geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikmesine göre hücre aktivitesini değerlendiren bir test metodudur. Bu test metodu, agardan geçemeyen materyal komponentleri için uygun değildir.

Testte, fibroblast veya epitelyal hücre dizisi kullanılmalıdır. En az dört kez tekrarlanan testlerde, hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı verilen yanıtlar belirlenir ve materyallerin sitotoksisiteleri hakkında sonuca varılır (ISO 10993–5, 1993)**.**

2.3.2.1.2 Filtre Difüzyon Testi

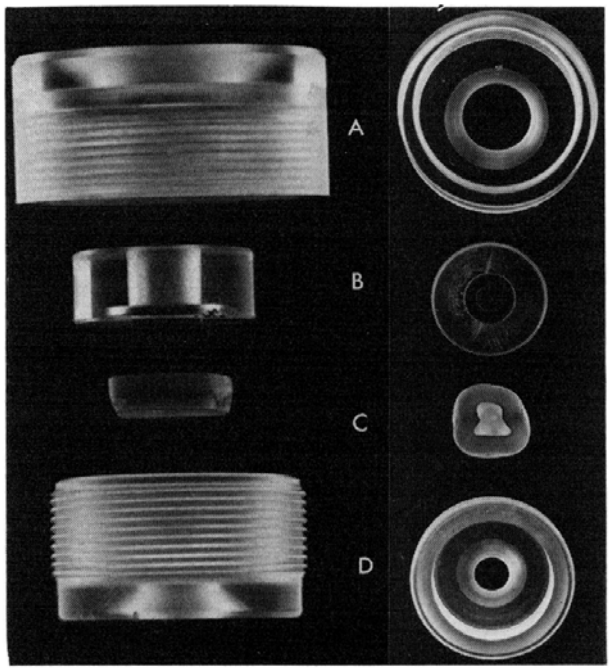
Bu test yönteminde, selüloz asetat filtreden diffüze olan materyallerin sitotoksik etkileri incelenir. Fibroblastlar veya epitelyal hücreler kullanılmalıdır. Süksinat dehidrogenaz veya spesifik olmayan hidrolaz boyanmasına uygun ortam sıvıları hazırlanır. Hücrelerde meydana gelen hasarlar dekolorizasyon alanının ölçülmesi veya boyanma yoğunluğu incelenerek tespit edilir (ISO 10993–5, 1993).

2.3.2.1.3 Direkt Temas Testleri

Direkt temas testleri; hücrelerin, test edilen örneklerin üzerine direkt olarak yerleştirilmesi esasına dayanır. Örneklerin şekline ve hidrofobik özelliklerine bağlı olarak, hücrelerin yüzeye bağlanmalarında yanlış pozitif etkiler meydana getiren bazı problemler meydana gelebilir. Bu testler, nispeten ucuz maliyetli, fazla zaman almayan ve uygulaması basit testlerdir. Fakat uygunluğu halen tartışıldığı için diğer testlerle kombine şekilde uygulanması önerilmektedir (ISO 10993–5, 1993; Bouillaguet ve ark. 1998).

2.3.2.1.4 Dentin Bariyer Testi

Outhwaite ve ark. 1974 yılında, dentinin geçirgenlik özelliğinin incelendiği çalışmalar sırasında, daha küçük deney düzeneklerinde çalışabilmek amacıyla, iç içe geçen iki rezervuar, silikon bir halka ve plastik bir yıkayıcıdan oluşan "split-chamber" aletinin yapımı ile ilgili olarak, dentin bariyer testlerinin yapılmasına ışık tutacak kısa bir makale yayınladı.



A- üst rezervuar

B- plastik yıkayıcı ve halka

C- dişin yerleştiği kısım

D- odanın alt kısmı

Resim 2.3.2.1.4.1 *Split Chamber Aleti*

1977 yılında Tyas tarafından, bir dentin bariyer varlığında, materyallerin biyolojik etkilerinin incelendiği bir cihaz tasarımı sunuldu.

Hume tarafından 1985 yılında ikinci bir dentin bariyer cihazı tasarlandı. Cihazın problemi; 1.6–2.0mm kalınlığında dentin kullanması, bu kalınlığın kontrol edilememesi, yüzey alanının düzenli olmaması ve diffüze olan materyallerin konsantrasyonlarının belirlenememesiydi.

Pashley 1989 yılında split-chamber aletinden de faydalanarak, moleküllerin boyutları ve konsantrasyonları, dentin tübüllerinin yoğunluğu, çapı ve ısı farklılıkları gibi tübüllerden difüzyonu etkileyen faktörleri tanımladı.

Günümüzde araştırmacılar, hem tek hem de çok ortamlı split-chamber cihazları kullanmaktadır. İlk olarak aynı kalınlık ve hidrolik geçirgenlik değerine sahip oniki adet dentin diski kullanan, moleküllerin difüzyonunu ve sitotoksisitelerini aynı anda ölçen çok odalı cihaz geliştirilmiştir. Bununla beraber bu çok odalı cihazın çok kullanışsız olduğu kanıtlanmış ve iki aşamalı bir cihazın daha iyi olacağı düşünülmüştür.

Bu aşamalar, biyolojik etkilere neden olan konsantrasyonların belirlenmesi ve çeşitli şartlar altında materyallerin dentinden diffüze olabilme derecelerinin incelenmesine olanak sağlamıştır (Hanks ve ark. 1996).

En son olarak Schmalz (1994), sığır dişlerinden elde ettiği dentin disklerinin okluzal yüzeyine materyali uygulayıp, L 929 hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek için 24 saat inkübe ettikten sonra, pulpal dentin yüzeyinde kalan canlı hücreleri florasan boyalar kullanarak görüntüleyebilmiştir.

Tüm bu gelişmelere rağmen halen dentin bariyer testleri ile ilgili bazı problemler bulunmaktadır (Hanks ve ark. 1996; Camps ve ark. 1997). Bunlar;

1. Farklı modeller arasındaki çeşitlilik.
2. Dentin diskinin pulpal yüzeyinde diffüze olan materyalin hacminin azalması
3. Pulpadaki çok sayıda farklı hücrenin çeşitli biyolojik cevaplar üretmesidir.

Dentin bariyer testlerinde insan dentini kullanılmasının avantajı, in vivo hedef dokuyu taklit etmesi, dezavantajı ise geçirgenlik özelliklerinde çok çeşitlilik görülmesi ve çok miktarda kullanılması gereken çalışmalarda, dentin bariyerin elde edilmesinde görülen kısıtlılıktır (Schmalz ve ark. 2001). Bu nedenle, in vitro dentin bariyer testlerinde sığır dişlerinden elde edilen dentin de kullanılmaktadır. Avantajı, çok sayıda elde edilebilmesi ve geçirgenlik bakımından insan dentininden daha az çeşitlilik göstermesi nedeniyle standartize edilebilmesidir (Schmalz ve Schweikl 1994).

2.4 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik ve enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültürü, zarla çevrili organelleri ve gerçek çekirdekleri olan çok hücreli ökaryotlardan, özellikle de hayvanlardan elde edilen hücrelerin üretilmesi için kullanılabilir. Hücre kültürleri, primer doku eksplantlarından yani, doku parçacıklarının canlılıklarının in vitro koşullarda devamının sağlanmasıyla veya hücre süspansiyonlarından üretilebilir. Bir organizmanın dokularından doğrudan alınarak, in vitro hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan kültürlere "primer kültür" denir. Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlere de "sekonder kültür" denir. Böylece, elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmaya devam ederler. Günümüzde, kültürler çoğunlukla dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonları ile yapılmaktadır. Ancak çoğu doku hücreleri, süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu olmadıklarından bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Bu gereksinim, plastik doku kültür kaplarının yüzeyleri ile karşılanmaktadır (Harrison ve Rae 1997; Pizzoferrato ve ark. 1994). Yaygın olarak kullanılmakta olan hücre serileri ve köken aldıkları dokular Tablo 2.4.1.'de gösterilmiştir (van Wyk ve ark. 2000).

Hücre kültürü metodlarıyla; hücrenin yapısı, fizyolojik özellikleri ve patojen hücre ilişkileri tespit edilebilmektedir. Ayrıca, in vivo şartlarda kısa zaman aralıklarında incelenmesi mümkün olmayan bir materyalin fiziksel ve kimyasal etkileri araştırılabilir. Bunun yanında, ilaçların, biyomateryallerin, mutajen faktörlerin incelenmesi, yapısal ve kromozomal bozuklukların değerlerlendirilmesinde de kullanılan bir yöntemdir

Tablo 2.4.1. *Hücre serileri ve kökenleri*

Hücre serisi	Hücre tipi ve kökeni
L 929	Fibroblast (fare)
3T3	fibroblast (fare)
BHK21	fibroblast (hamster)
MDCK	epitel hücresi (köpek)
HeLa	epitel hücresi (insan)
PtK1	epitel hücresi (rat)
L6	miyoblast (rat)
SP2	plazma hücresi (fare)
COS	böbrek (maymun)
DT40	lenfoma hücresi (civciv)
R1	embryonik kök hücreler (fare)
HepG2	karaciğer epitel hücresi (insan)
HEK293	böbrek epitel hücresi (insan)
HL60	lösemi (lenfoblastik benzeri) hücresi (insan)
SH-SY5Y	nöroblastoma hücresi (insan)
H1, H9	embryonik kök hücreler (insan)
PC 12	kromaffin hücresi (rat)
293	böbrek (insan), adenovirüsle transforme edilmiş
CHO	over (hamster)
E14,1	embryonik kök hücreler (fare)
T24	mesane epitel hücresi (insan)
S2	makrofaj benzeri hücreler (drosofila)
BY2	farklılaşmamış meritematik hücreler (tütün)

2.4.1 Hücre Kültürünün Tarihçesi

Hayvan hücrelerinin kültürlerinin elde edilmesi işlemi 1950'lerden bu yana yapılan rutin bir işlemdir. Fakat, orjinal dokularından alınan canlı hücre dizilerinin canlılığının devam ettirilmesi işlemi ilk kez 19. yüzyılda gerçekleştirilmiştir. İngiliz fizyolog Sydney Ringer, 1883 yılında izole edilmiş bir hayvan kalbinin, vücut dışında atmasını sağlayan sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyum kloridlerini içeren tuz solusyonunu geliştirmiştir.

1885'te Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun meduller tabakasını alarak, ılık salin solusyonu içinde günlerce canlı tutarak doku kültürünün temellerini atmıştır.

1903 yılında Jolly, semenderlerden bir ay boyunca aşılı damlalar şeklinde lökosit elde ederek, in vitro koşullarda hücre bölünmesi ve yaşamı ile ilgili ilk detaylı gözlemleri yapmıştır. Bu çalışma üç yıl sonra 1906 yılında, Ewing ve Bebe tarafından takip edilmiş ve doku kültürü kavramına ilk gerçek teşebbüsü oluşturmuştur.

1913 yılında Burrows ve Carrell, hayvan hücrelerinin aseptik koşullar altında düzenli beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre büyüyebileceğini göstermişlerdir.

1949 yılında Alan Parks tarafından geliştirilen ve halen kullanılmakta olan bir metot ile hücreler dondurulmuş ve -196°C' de bir yıl boyunca saklanmıştır.

1955–1960 yılları arasında Eagle, bugün de kullanılmakta olan temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır. Bu, hücre kültürü çalışmaları için önemli adımlardan biri olmuştur.

1960'lı yıllarda hücre füzyonu çalışmaları ile monoklonal antikor üretimine öncülük edilmiş ve ilk olarak 1961 yılında, Barskib ve arkadaşları in vitro koşullarda, somatik hücre hibridlerini elde etmişlerdir.

1979 yılında Gren ve arkadaşları epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır.

1981 yılında Schmalz, dental materyallerin sitotoksisitesini test etmek için agar overlay tekniğini ilk kullanan dişhekimliği araştırmacısı olmuştur.

1989 yılında hücre kültürü teknolojisi, homogreft yapımı ve rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır.

1992'de Rosenfeld ve arkadaşları genetik olarak modifiye edilmiş hücreleri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır ki bu, hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı son ve önemli gelişmelerden birisi olmuştur (Harrison ve Rae 1997)

2.4.2 Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Hücre kültürlerinin çok yaygın kullanım alanları vardır. Bu alanlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Aydıntuğ 2003);

1. Viral aşılar ve viral teşhis amacı ile
2. Monoklonal antikorlar ile antikor üretiminde
3. İnterferon üretiminde
4. İnsektisit ve insekt aşı üretiminde
5. İnterlökin gibi immünoregülatörlerin üretiminde
6. Hormon üretiminde
7. Enzim üretiminde
8. Büyüme faktörlerinin üretiminde kullanılabilmektedir.

Son yıllarda ise;

1. Somatik gen tedavisinde
2. Tümör aşılarında
3. Canlı hücrelerin greft amaçlı olarak kullanılmasında;

- Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması.
- Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
- Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
- Organizma dışında hücre modifikasyonu

4. Kompleks üç boyutlu dokuların elde edilmesi işlemlerinde de kullanılmaktadır.

- Yapay deri
- Yapay kıkırdak
- Yapay karaciğer
- Yapay pankreas

2.4.3 Hücre Kültürü Yöntemlerinin Avantajları ve Dezavantajları

2.4.3.A. Avantajları;

1. Uygulamalar standart şartlarda tekrarlanabilirler
2. Kısa süreli etkileşimlerin incelenmesinde kullanışlı bir yöntemdir
3. Hücreler üzerindeki etkiler direkt olarak gözlenerek standart ölçümler yapılabilir
4. Hücreler pH, ısı, osmotik basınç, nem, oksijen ve karbondioksit miktarının standart olduğu ve bu değerlerin kontrol edilebildiği bir ortamda saklanabilirler
5. Ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilirler. (Freshney 1994; Pizzoferrato ve ark. 1994; Aydıntuğ 2003)

2.4.3.B. Dezavantajları;

1. Primer kültür ile işleme başlandıktan sonra birbirini takip eden pasajlarda hücreler farklılaşabilir ve bir miktar ölüm gerçekleşebilir.

2. Hijyen çok önemli olduğu için, primer kültürlerin elde edildiği doku ve bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkileyebilir.

3. Kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler pahalıdır.

4. Deneyim önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskobik inceleme bir uzmanlığı gerektirir (Freshney 1994; Pizzoferrato ve ark. 1994; Aydıntuğ 2003)

2.4.4. Hücre Kültürü Laboratuarının Özellikleri

Hücre kültürü laboratuarlarını diğerlerinden ayıran en önemli özellik, aseptik koşulların çok iyi sağlanması zorunluluğudur. Hücre kültürü işlemlerinde, hayvansal hücreler ile bakteri ve mantarların meydana getirdiği kontaminasyonlar risk oluşturmaktadır.

Bu nedenle, kullanılan malzemelerden çalışılan odaya kadar temizlik ve sterilizasyon çok önem taşımaktadır. Laboratuarın genel temizliği iki günde bir yapılmalı, kontaminasyon riskini önlemek için ayda bir kez formol ile dezenfekte edilmelidir.

Bir hücre kültürü laboratuarında bulunması gereken cihazlar şunlardır (Harrison ve Rae 1997; Scott ve ark. 1999; Wolf 2004) ;

1. Laminar flow kabin
2. İnkübatör
3. Sterilizatör
4. Buzdolabı (+4°C)
5. Derin Dondurucu (-20° C)
6. Derin Dondurucu (-80° C)
7. Faz kontrast ve florasan mikroskoplar
8. Yıkama Düzeneği
9. Masa Santrifüjü
10. Sıvı Azot Tankı
11. Manyetik Karıştırıcılar
12. CO_2'li etüv
13. pH metre

2.4.5 Hücre Üretme Yüzeyleri

Hayvan hücrelerinin üretilmesinde kullanılan yüzeyler genel olarak cam veya tek kullanımlık plastik malzemeden yapılmıştır. Cam, kolay temizlenebilir olması, maliyetinin ucuz olması, büyümeyi destekleyici, ekstra maddelere gerek duyulmaması ve sterilizasyonunun da kolay olması nedeniyle tercih edilen bir malzemedir. Tek kullanımlık plastik materyaller ise optik özellikleri ve düzgün yüzeylere sahip oluşları nedeniyle tercih edilebilirler. Bu malzemeler ayrıca değişik şekillerde modifiye edilerek de kullanılabilirler. Pahalı olmalarına rağmen, günümüzde en çok bu malzemeler kullanılmaktadır. Hücre üretme yüzeyleri, özellikle yüzeye bağımlı olarak üreyen hücreler için önemlidir.

Çünkü, bu hücrelerin kültür ortamında canlılıklarını sürdürüp üreyebilmeleri, ancak bir yüzeye tutunmaları ile mümkün olmaktadır. Hücre üretme yüzeyleri için sıklıkla kullanılan malzemeler aşağıdaki gibidir; (Freshney 1994; Scott ve ark. 1999)

1. Polistiren (PS)
2. Polivinil Klorür (PVC)
3. Polikarbonat (PC)
4. Thermonaks (IPX)
5. Politetrafloroetilen (PTFE)
6. Melineks

2.4.6 Kontaminasyon

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

Bu nedenle, hücreler ile çalışılan ortamın, laboratuar girişinden uzakta bulunması gerekmektedir (Harrison ve Rae 1997; Wolf 2004).

2.4.7 Hücre Kültürü Vasatları

Hücre üremesi için uygun ortamın oluşturulmasında hücre kültürü vasatlarından yararlanılır. Toz halinde olup kullanıcı tarafından hazırlanabildiği gibi, sıvı olarak da satılırlar. Hazır sıvı olanlar daha güvenilir olması nedeniyle tercih edilirler. Toz vasatlar, sterilizasyonları yapılmış ve içinde gerekli bütün komponentleri içerecek şekilde satılır. Bunlar gerekli miktarlarda su ile çözülürler. Ardından serum, antibiyotik ve sodyum bikarbonat ve gerekiyorsa glutamin ilavesi yapılır. Hazırlanan vasatların sterilizasyonu, otoklav veya filtrasyon ile yapılır. Otoklav her vasat için geçerli değildir. Filtrasyon, daha sıklıkla ve güvenle kulanılan bir yöntemdir.

Filtrasyonun da değişik tipleri vardir;

1. Asbest filtreler
2. Membran filtreler

Hücre üretme vasatlarının fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir;

1. pH ve ozmolorite gibi fizikokimyasal şartların devamlılığını sağlamak
2. Hücre ve hücre ürünlerinin sentezi için gerekli besinleri sağlamak
3. Hücrelerin yapısal ve metabolik aktivitelerini yerine getirmeleri için gerekli maddeleri oluşturmak (Harrison ve Rae 1997).

Vasatların bileşiminde; (Wise 2002; Wolf 2004)

1. Dengelenmiş tuz çözeltileri (Balanced Salt Solution-BSS)
2. Enerji Kaynakları
3. Aminoasitler
4. Vitaminler
5. Gazlar
6. İz elementler

7. Organik tampon çözeltileri
8. Antibiyotikler
9. Su
10. Serum
11. Nükleik asit sentezini teşvik edici maddeler bulunmaktadır

Vasatların içeriğinde, serumun total hacime oranı %10 olarak ayarlanır. Antibiyotikler bakteri üremesini önlemek için ortama ilave edilirler. Kültür yapılan hücreler, özel kaplarda 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve %95 hava içeren ortamda inkübe edilirler. Vasatların içindeki maddelerin özelliklerinin iyi bilinmesi, toksik olmamaları, suda eriyebilmeleri ve stabil olmaları gerekmektedir (Freshney 1994; Wise 2002).

2.5. Hücre Kültür Yöntemlerinin Temel Aşamaları ve Hücre Devamlılığı

Primer kültür; hücrelerin mekanik veya enzimatik yollarla dokudan ayrılarak elde edilmesidir. Değişik dokular kullanılsa da primer kültür yöntemleri temelde aynıdır. Eğer doku, laboratuarda elde edilip hemen kullanılacaksa zaman problemi yoktur. En ideal olan, dokunun hemen kullanılmasıdır. Ancak, bu mümkün değilse doku, taşıma solusyonları içinde 4–8°C' de 1–2 gün canlı kalabilir. Doku taşıma solusyonu olarak genellikle dengeli tuz çözeltileri kullanılmaktadır.

Hücre kültürü işleminin yapıldığı laminar flow kabinlerin, kullanım öncesinde UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonunun sağlanması gerekir. Hücreler yaklaşık olarak %5 CO_2 içeren ortamda üretildikleri için CO_2 etüvlerinden yararlanılmaktadır. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır.

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da lag faz (evre) denilen bir döneme girerler. Bunu, en yüksek metabolik aktivitenin gözlendiği logaritmik artış (üreme) dönemi izler.

Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı durağan bir evreye girerler (Bu evrede tüm üreme yüzeyleri, hücre ile kaplanmıştır).

Primer kültürden sonraki aşama, pasajlama ile alt kültür elde edilmesidir. İlk pasajdan sonra devam eden kültürler "cell line" olarak tanımlanmaktadır. Her alt kültür elde edilmesi sırasında pasajlama yapılır.

Pasajlama için ilk neden, hücre yoğunluğunun artmasıdır. Bu yoğunluk artınca ortam pH' sı düşer, besin maddeleri azalır ve artık ürün miktarı artar. Bu olumsuz etkilerden korunmak için, hücreler daha büyük bir hacime alınırlar ve yoğunlukları azaltılmış olur. Bunun için, bir yüzeye tutunmuş olarak üreyen hücrelerin, yüzeyden kaldırılarak yeni bir yüzeyde üremeleri sağlanır (Harrison ve Rae 1997; Wise 2002).

Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

- Mekanik yöntem: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte, bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda tercih edilebilir.
- Proteolitik enzimlerin kullanımı: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz, genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon, ortama serum içeren tam kültür vasatının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir. Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir (Scott ve ark.1999; Wolf 2004).

İlk önce hücrelerin vasatı dökülür ve serum etkisini ortadan kaldırmak için hücreler az miktarda serum ile yıkanır. Daha sonra hücrelerin üzerine bir miktar tripsin konur ve belli bir süre etüvde bekletilir. Tripsin etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra vasat ile süspanse edilerek yeni bir kültür kabında inkübasyona kaldırılırlar.

Kültür kapları CO_2 etüvüne (37^oC, %5 CO_2) koyulduğu zaman gaz giriş çıkışı için kapların ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan korunması da gereklidir. Pasajlanan hücrelerin vasatları iki günde bir değiştirilir.

İki pasaj arasında geçen süre en az üç gün olmalıdır. Hücre kültürü çalışmalarında da tüm laboratuar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir.

Toplam ve canlı hücre sayısını belirlemek için hemositometre kullanılmaktadır. Kullanılan bir protokole göre, bunun için 0.1ml örnek alınıp 2ml'ye seyreltilir. Bu seyreltik süspansiyondan hemositometre lamının her dış köşesindeki karelere 1'er damla damlatılır. Dört dış karedeki hücreler ışık mikroskobu altında sayılır ve her bir karedeki ortalama sayıyı belirlemek için 4'e bölünür. Bu sonuç, hücre sayısı $x10^4$ olarak ifade edilir. Bu da yirmi ile (seyreltme faktörü) çarpılarak mililitredeki süspansiyon başına düşen hücre sayısı elde edilir. Canlı hücreleri belirleme yöntemlerinden bazıları, çeşitli boyalarla ölü hücrelerin boyanması temeline dayanır. Böylece ölü ve canlı hücrelerin oranı bulunur. Tripan mavisi canlı hücreleri belirlemek için yararlanılan boyalardan biridir (Harrison ve Rae 1997; Wise 2002).

Canlı hücreleri belirlemek için bir tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenme özelliğine dayanan yöntemde ise, ölü hücrelerin bu boyayı indirgeme özelliğini yitirmesi prensibinden yararlanılır. Kalorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemle, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Yöntem, sağlam hücrelerdeki mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi üzerine dayanmaktadır (Issa ve ark. 2004; Yaka ve ark. 2006).

Bu reaksiyon mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu, soluk sarı renkli MTT boyası koyu, mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir.

Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renk boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

Ölçümler, plak okuyucusunda, absorbans değerleri 570nm dalga boyu kullanılarak yapılır (Harrison ve Rae 1997; Yaka ve ark.2006).

Dentin-pulpa kompleksinin canlılık ve fonksiyonunu sürdürebilmesini amaç edinen tedavi seçenekleri gün geçtikçe artmaktadır. Bunun için, diş gelişimi esnasında oluşan moleküler ve hücresel değişimler, bu değişimlerin diş dokusuna uygulanan tedavilerden nasıl etkilendiği iyi bilinmelidir.

Bu konuların aydınlatılmasında hücre kültürü tekniklerinden faydalanılmakta ve adezivlerdeki gelişmelere ayak uyduracak değerlendirme testlerinin geliştirilmesi için çalışılmaktadır. Geliştirilen veya kullanımda olan materyallerin sitotoksik etkilerinin bilinmesiyle, yapılacak tedavilerde, materyal seçim aşamasında, insan sağlığının korunması gerekliliği de düşünülerek biyouyumluluğu daha yüksek olan materyaller tercih edilecektir.

Bu çalışmanın amacı;

1. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dentin bağlayıcı sistemlerin L 929 hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyerek in vivo şartlardaki muhtemel sitotoksik potansiyellerini ve
2. Materyal ile hücreler arasındaki dentin kalınlığının, materyallerin L 929 hücreleri üzerindeki sitotoksisitelerini hangi derecede etkilediğini belirlemektir.

3. MATERYAL ve METOT

Tez projesi belirlendikten sonra, Japonya, Osaka Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi Laboratuarları'nda, Doç. Dr. Satoshi Imazato'nun katkıları ile kullanılacak deney düzeneği tasarlanarak, proje ile ilgili bir ön çalışma yapılmıştır. Daha sonra çalışmaya Selçuk Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Araştırma Laboratuarı'nda devam edilerek proje dört bölüm halinde yürütülmüştür.

1. Hücre Kültürü Çalışması
2. Adeziv Sistemlerin Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanması
3. Dentin Disklerinin Hazırlanması
4. Sitotoksisite Testlerinin Uygulanması

A) Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi

B) Farkı Kalınlıklarda Hazırlanan Dentin Disklerine Uygulanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan self-etch adeziv sistemlerin (Resim 3.1) içerikleri, üretici firmaları ve üretim numaraları Tablo 3.1'de, uygulama prosedürleri de Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 *Çalışmada kullanılan adeziv sistemler, içerikleri, üretici firmaları ve üretim numaraları*

	Adeziv Sistem	İçerik	Üretici Firma	Üretim No
İki Basamaklı self-etch adezivler	**Clearfil SE Bond**	Primer: MDP, HEMA, dimetakrilat monomeri, su, katalizörler,kamforokinon Adeziv rezin: MDP,Bis-GMA, HEMA,hidrofobik dimetakrilat,kamforokinon	Kuraray, Japonya	Primer: 00816A
	Clearfil Protect Bond	Primer: MDPB, MDP, HEMA, hidrofobik dimetakrilat, su, initiatör Adeziv rezin: MDP, HEMA, Bis-GMA, hidrofobik dimetakrilat, kamforokinon, sodyum florid	Kuraray, Japonya	Primer: 00014B
	Prime Bond NT/NRC	NRC: su, itatonik asit, maleik asit Adeziv rezin: PENTA, UDMA, aseton, initiyatör, setilamin hidroflorid, stabilizatör	Dentsply De Trey, Konstanz, Almanya	0506001316
Tek basamaklı self-etch adezivler	**Reactmer Bond**	Bond A: Floroaluminosilikat cam, su, aseton Bond B: 4-AET, 4-AETA, HEMA, UDMA, Fotoinitiyatörler	Shofu Inc, Japonya	040510
	Clearfil Tri-S Bond	MDP, Bis-GMA, HEMA, Hydrofobic dimetakrilat, kamforokinon, etil alkol, silanlanmış kolloidal silika	Kuraray, Japonya	00039A
	Adper Prompt	Metakrilatlı fosforik asit esterleri, su, stabilizatör, florid kompleksi	3M Espe, Almanya	Likit A: 211256 Likit B: 218117

Tablo 3.2 *Çalışmada kullanılan adezivlerin uygulama prosedürleri*

Adeziv Sistem	Uygulama Prosedürü
Clearfil SE Bond	• Dentin yüzeyine tek kullanımlık fırçalar ile primerin 20sn uygulanması • Uçucu içeriğin buharlaşması için hava ile hafifçe kurutma
Clearfil Protect Bond	• Dentin yüzeyine tek kullanımlık fırça ile primerin 20sn uygulanması • Uçucu içeriğin buharlaşması için hava ile kurutma
Prime Bond NT/NRC	• NRC'nin 20sn uygulanması ve havayla kurutulması • Adhesive rezinin 20sn uygulanması • 5sn kurutma • 10sn ışık ile polimerizasyon(Hilux 250, Benlioğlu Dental, Türkiye)
Reactmer Bond	• A ve B şişeleri karıştırılarak, yüzeye 20sn uygulanması • Hafifçe kurutma • 20sn ışık ile polimerizasyon (Hilux 250, Benlioğlu Dental, Türkiye)
Clearfil Tri-S Bond	• Dentin yüzeyine 20sn süreyle bağlayıcı rezin uygulanması • 5 sn'den az olmamak üzere basınçlı hava ile kurutma • Bağlayıcı rezinin 10sn ışık ile polimerizasyonu (Hilux 250, Benlioğlu Dental, Türkiye)
Adper Prompt	• A ve B şişelerinin karıştırılarak, yüzeye 15sn uygulanması • 2. katın sürülmesi • Hafif hava ile kurutma • 10sn ışık ile polimerizasyon (Hilux 250, Benlioğlu Dental, Türkiye)



Tek basamaklı self-etch adezivler



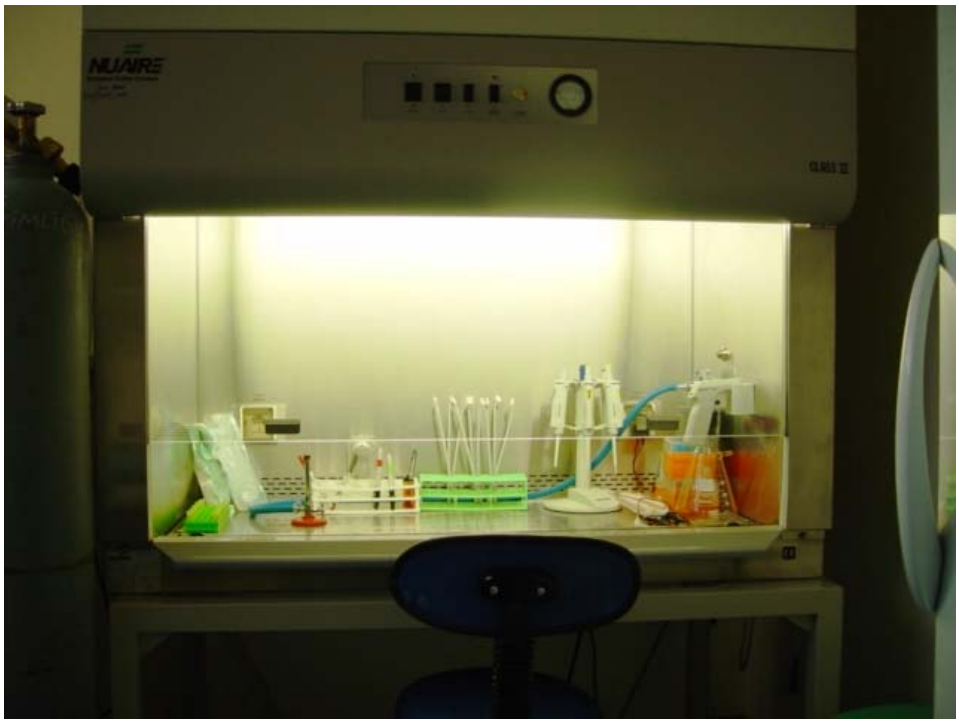
İki basamaklı self-etch adezivler

Resim 3.1 *Çalışmada kullanılan self-etch adeziv sistemler*

3.1 Hücre Kültürü Çalışması

Çalışmada L 929 fare fibroblast hücrelerinin (L 929 An2 Hükük 95030802; Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) 7. pasajları kullanıldı. Kültür ortamları 2 günde bir %10 fetal inek serumu (FBS; Biological Industries, Kirbuta Beit Haemek, Israel), %1 penisilin-streptomisin solusyonu (Biological Industries), %1 glutamin (Biological Industries) içeren taze kültür ortamıyla yenilendi. Pasajlama aşamaları 4'er gün arayla tekrarlandı. Pasajlama işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Hücre kültürü kabındaki (Corning, USA) ortam sıvısı, otomatik pipet yardımıyla çekilerek, 10ml Phosphorilated Buffer Solution (PBS; Biological Industries) kültür kabına boşaltıldı ve hücreler yıkandıktan sonra PBS kaptan çekilerek 3ml Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kabın içine boşaltıldı ve 5dk süreyle karbondioksit inkübatöründe 37°C'de bekletildi. Tripsin-EDTA kullanılmasındaki amaç, hücre kültür kabı yüzeyine yapışık halde bulunan hücrelerin yüzeyden ayrılmalarını sağlamaktı. Mikroskop altında hücre kültürleri incelenip, hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildikten sonra, içine 10ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Biological Industries) konulan yeni hücre kültürü kabına, içinde yüzeyden ayrıştırılmış hücreler bulunan kültür kabından (hücre+3ml tripsin-EDTA), pipet yardımıyla 1ml alınarak ilave edildi ve pasajlama işlemi tamamlanmış oldu. Bu işlemden sonra hücrelerin durumu mikroskopta tekrar incelenerek diğer pasajlama işlemine kadar %5 CO_2 içeren inkübatörde 37°C'de bekletildi. İlk önce, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksisitelerinin belirlenmesi çalışması yapıldığı için, farklı kalınlıklarda hazırlanan dentin disklerine uygulanan adeziv sistemlerin sitotoksisitelerinin belirlenmesi çalışmasının yapılacağı zamana kadar, kalan hücreler dondurularak -80°C'de bekletildi. Hücre kültürü işlemlerinde kullanılan cihazların bazıları Resim 3.1.1 ve Resim 3.1.2'de gösterilmektedir.



Resim 3.1.1. *Laminar Flow Kabin*



Resim 3.1.2 *% 5 CO_2 içeren inkübatör ve CO_2 tüpü*

3.2 Adeziv Sistemlerin Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanması

Çalışmada üç adet iki basamaklı self-etch adeziv sistem olan Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Japonya), Clerafil Protect Bond (Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Japonya), Prime Bond NT/NRC (Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) ve üç adet tek basamaklı self-etch adeziv sistem olan Adper Prompt (3M ESPE AG, Seefeld, Almanya), Clearfil Tri-S Bond (Kuraray Medical Inc, Kurashiki, Japonya) ve Reactmer Bond (Shofu Inc; Japonya) kullanıldı (Tablo 3.1).

Çalışmada kullanılan self-etch adezivlerin farklı konsantrasyonlarının L 929 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla %50, %20, %10 ve %1' lik konsantrasyonlar hazırlandı. Bu şekilde hazırlanan konsantrasyonlar ile adezivlerin içerdikleri komponentlerin hücreler üzerindeki etkileri doza bağlı olarak incelenerek in vivo şartlardaki muhtemel sitotoksik potansiyelleri tahmin edilebilir. Konsantrasyonların hazırlanması esnasında, adeziv sistemler, hücre canlılığının devam edebilmesi için gerekli olan DMEM ve FBS ile karıştırılarak toplam 6ml sıvıya tamamlanacak şekilde aşağıdaki oranlarda hazırlandı.

- %50'lik konsantrasyon: 3ml DMEM + FBS, 3ml adeziv sistem
- %20'lik konsantrasyon: 4800µl DMEM + FBS, 1200µL adeziv sistem
- %10'luk konsantrasyon: 5400µl DMEM + FBS, 600µL adeziv sistem
- %1'lik konsantrasyon: 5940µl DMEM + FBS, 60µL adeziv sistem

Daha sonra hazırlanan konsantrasyonlar test edilinceye kadar, 15ml'lik steril falkon tüplerinin içine konarak +4°C'de saklandı. Tüplerin dış yüzeyi solusyonların ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile kaplandı.

3.3 Dentin Disklerinin Hazırlanması

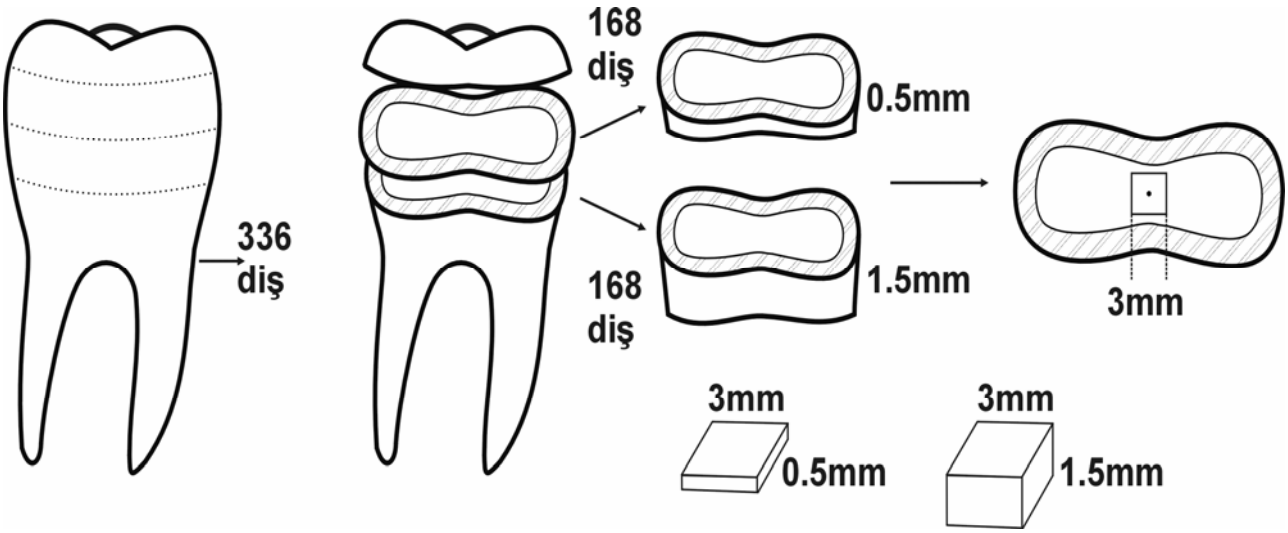
Dentin bariyer testinde kullanılmak üzere dentin disklerinin hazırlanması için 336 adet çürüksüz, insan üçüncü molar dişi kullanıldı. Çekimi takiben en çok 3 ay içinde kullanılan dişler, yumuşak doku artıkları ve eklentilerinden arındırıldıktan sonra kullanılana kadar +4°C' de, %0.01'lik timol içeren serum fizyolojik solusyonu içerisinde saklandı. Daha sonra dentin tübüllerinin sayı ve çaplarında belli bir standardı sağlayabilmek amacı ile dişlerin kuron kısımları, izafi olarak üçe bölündü. Orta üçlü bölgesi kullanılacak şekilde dişin uzun aksına dik olarak, düşük hızda çalışan elmas bir separe ile (Isomet Saw; Buechler, Lake Bluff, IL, USA; Resim 3.3.1) 0.5mm ve 1.5mm'lik kalınlıklarda ve su soğutması altında, dişin okluzal çapı büyüklüğünde dentin diskleri elde edildi. 0.5mm kalınlığındaki dentin diskleri yine dişin orta üçlüsü bölgesinde fakat pulpaya daha yakın bölgeden elde edildi. Disklerin okluzal ve pulpal yüzeylerinin karışmaması için yüzeyler her işlem sırasında sabit kalem ile işaretlendi. Elde edilen bu disklerin hem okluzal hem de pulpal yüzeyleri #600 grit zımpara kağıdı ile pürüzsüzleştirildikten sonra pulpa odası üstüne gelen bölgeden itibaren 3x3mm boyutlarında kare şeklinde dentin diskleri, yine su soğutması altında elmas separe ile kesilerek elde edildi (Resim 3.3.2). Diskler tekrar işaretlendikten sonra, kullanılacağı zamana kadar serum fizyolojik içinde bekletildi.

Test yapılacağı zaman, 0.5 ve 1.5mm kalınlıklarda hazırlanmış olan 168'er adet dentin diski 121°C' de 25dk otoklavda steril edildikten sonra rastgele 7 gruba ayrılarak (n=24) kalıplara yerleştirildi ve adeziv sistemler uygulandı. Her grup için sitotoksisite testi 2 kez tekrarlandığı için her grup kendi içinde rastgele 12'şerli 2 gruba ayrıldı. Adeziv sistemlerin uygulanmaları üretici firmaların önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Ancak iki basamaklı self-etch adeziv sistemlerin sadece primerleri çalışmaya dahil edildi. Sistemlerin adeziv rezinlerinin çalışmaya dahil edilmemesinin nedeni, primer ve adezivin karıştırılması sonucu bazı komponentlerin birbiriyle etkileşimi söz konusu olacağından, deney sonucunu

etkileyebilecek durumları elimine etmekti. Adeziv sistemlerin uygulama prosedürleri Tablo 3.2'de gösterilmektedir.



Resim 3.3.1 *Dentin disklerinin hazırlanmasında kullanılan Isomet Testere*



Şekil 3.3.1 *Dentin bariyer testi için 3X3mm boyutlarında 0.5mm ve 1.5mm kalınlıklarında dentin disklerinin elde edilmesi*

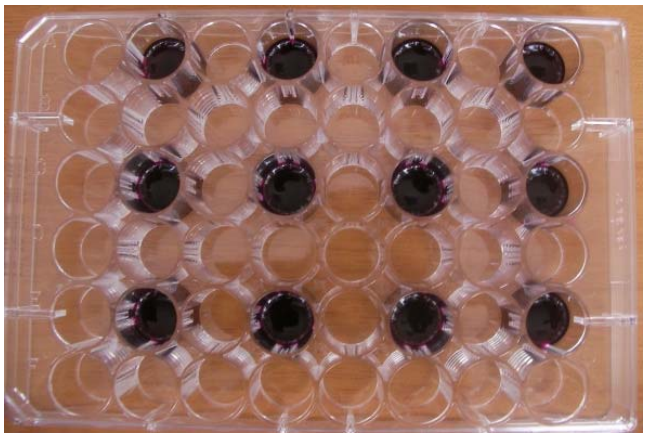
3.4. Sitotoksisite Testlerinin Uygulanması

3.4.1 Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksisitelerinin 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 yapıldı (Resim 3.4.1.1). Daha önce 7 kez pasajlanmış olan L 929 hücreleri, 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına (Resim 3.4.1.2) $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre sayma lamı ile sayıldıktan sonra yerleştirildi.



Resim 3.4.1.1 *MTT Maddesi*



Resim 3.4.1.2 *48 Kuyucuklu Hücre Kültür Kabı*

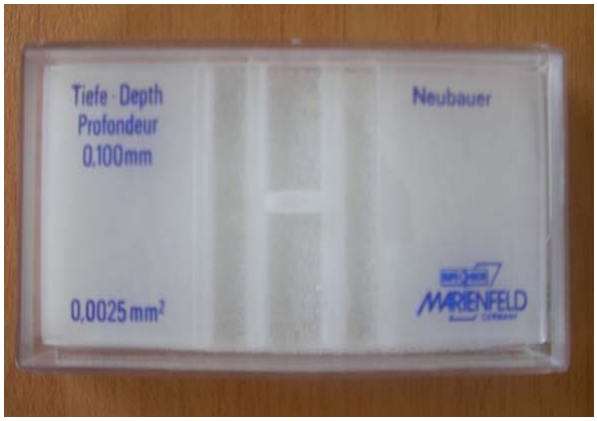
Hücre sayma işlemi aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- İçinde 7. pasajdaki L 929 hücreleri bulunan hücre kültür kabındaki ortam sıvısı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- 3ml tripsin-EDTA karışımı, kabın içine 5ml'lik pipet yardımıyla ilave edildi.
- Hücre kültür kabındaki EDTA ile hücrelerin yüzeyden mümkün olduğu kadar ayrılmasının sağlanması için 6–7 kez EDTA-hücre karışımının pipet içine çekilip geri bırakılması ile pipetaj yapıldı ve mikroskopta hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Eğer tam bir ayrılma gerçekleşmemişse ayrılma görülene kadar pipetaj yapılmaya devam edildi.

- 50ml'lik falkon tüpü içine pipet ile 10ml ortam sıvısı (DMEM) ve hücre kültürü kabından 2ml hücre+tripsin-EDTA karışımı ilave edildi.
- Santrifüj aletinde (µQuant, Biotek Instruments, USA; Resim 3.4.1.3) 27°C' de 2910 rpm/dk ile 3dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutularak hücrelerin tüpün tabanında toplanması sağlandı. Santrifüj esnasında sıvıların dengelenmesi amacıyla tüpün konulduğu haznenin tam karşısına, içinde tüple eşit miktarda suyun bulunduğu başka bir tüp, dengeleyici olarak konuldu.
- Falkon tüpünün içindeki ortam sıvısı pipet ile çekildi, tabandaki hücrelerin üzerine 5ml DMEM ilave edildi ve 4–5 kez pipetaj yapıldı.
- Hücre sayma aparatı (Neubauer, Marienfeld, Germany; Resim 3.4.1.4) kullanılarak mikroskopta (TS100 Nikon Eclipse) hücre sayma işlemi gerçekleştirildi. Falkon tüpüne, ortamda $5x10^4$ hücre/µl bulunmasını sağlamak için gerekli konsantrasyonda ortam sıvısı ilave edildi.
- Mikropipet yardımıyla falkon tüpünden 500µl çekilerek 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına yerleştirildi.



Resim 3.4.1.3 *Santrifüj Aleti*



Resim 3.4.1.4 *Hücre Sayma Aparatı*

Uygun miktarda hücre ($5x10^4$ hücre/kuyucuk) 48 kuyucuklu hücre kültür kabına koyulduktan sonra 24 saat süreyle 37°C' de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. MTT testi ile sitotoksisiteyi belirlemek için 1ml PBS içinde 5mg MTT tozu olacak şekilde hazırlanan karışım, 0.20µm'lik steril filtreden (Corning, Almanya) geçirilerek dış yüzeyi aliminyum folyo ile kaplandıktan sonra +4°C' de kullanılacağı zamana kadar bekletildi.

İnkübe edilen hücrelerin ortam sıvıları çekildikten sonra, daha önceden hazırlanmış olan %50, %20, %10 ve %1'lik konsantrasyonlardaki adeziv sistemler her kuyucuğa 500µl ilave edilerek 24 saat süreyle 37°C' de %5 CO_2 içeren ortamda tekrar inkübasyona bırakıldı. Böylece adeziv sistemlerin 24 saat sonundaki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş oldu. İnkübasyon periyodundan sonra, kuyucuk içindeki dilüe edilmiş konsantrasyonlar pipet yardımıyla çekildi ve 500µl PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 50µl/kuyucuk MTT sıvısı + 500µl/kuyucuk DMEM ilave edilerek 4 saat süreyle 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

MTT maddesisin uygulanması sonucu oluşan formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için 99.4ml Dimetilsülfoksit (DMSO), 0.6ml Hidroklorik asit (HCl) ve 10g Sodyum lauryl sülfat (SDS) içeren karışımdan 500µl/kuyucuk olacak şekilde ilave edilerek 8 saat süreyle tekrar inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra optik yoğunluklarını ölçmek için 48 kuyucuklu kaplardan 96 kuyucuklu kaplara 200µl/kuyucuk olacak şekilde içerisinde hücrelerin bulunduğu sıvıdan konuldu ve ölçümler, 570nm dalga boyunda, otomatik microplate okuyucu ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak taze ortam sıvısı kullanıldı ve deneyler 2 kez tekrarlandı. Optik yoğunluk, optik bir elementin belirlenen bir dalga boyunda, bir birim mesafedeki emilim miktarı demektir. MTT testinde, canlı hücreleri belirlemek için tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenme özelliğinden yararlanılır. 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, mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuçta canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

3.4.2 Farklı Kalınlıklarda Hazırlanan Dentin Disklerine Uygulanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisitelerinin Belirlenmesi

Kalınlıkları 0.5mm ve 1.5mm olan ve 3x3mm boyutlarında hazırlanan dentin disklerinin L 929 hücreleri ile temas edebilmesi için ilk kez bu çalışmada kullanılacak bir düzenek tasarlandı. Hidrofilik vinil polisiloksan bir ölçü maddesinden (Examixfine, GC. Corp, Japonya) 48 kuyucuklu hücre kültür kabının kuyucuklarının ölçüsünde ve kabın ağız kısmını tamamen kapatacak şekilde, ortasında dentin diskinin yerleştirileceği 2.8x2.8mm boyutlarında kare şeklinde bir boşluk bulunan, 3mm yüksekliğinde kalıplar hazırlandı (Resim 3.4.2.1). Daha önce yapılan ön çalışmada, dentin disklerinin boyutlarıyla kalıplardaki boşluklar aynı ölçüde hazırlanmış ve deney aşamasında kalıplar hücre kültürü kabına yerleştirildiği zaman disk ile yerleştiği bölge arasında sıvı sızıntısı olduğu tespit edilmişti.

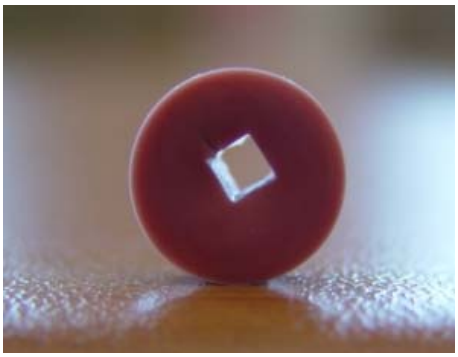
Bu durum, deney sürecini olumsuz etkileyeceği için, disklerle kalıp arasında daha iyi bir sıkışma sağlamak amacıyla boşluk, dentin disklerinin boyutlarından daha küçük hazırlandı.

Hazırlanırken pulpal yüzeylerinin karıştırılmaması için işaretlenmiş olan disklerin pulpal yüzeyleri, yüzeydeki smear tabakasının kaldırılması amacıyla %37'lik fosforik asitle 60sn asitlendikten sonra yıkanıp kurutuldu ve pulpal yüzeyleri silikon kalıpla aynı seviyede olacak şekilde kalıplara yerleştirilerek 121°C' de 25dk otoklavda steril edildi.

Steril edilen kalıp içindeki diskler (Resim 3.4.2.2) hem hidrate olmaları için hem de herhangi bir kontaminasyon riskinden korunmak için ortam sıvısı dolu petri kaplarına yerleştirilerek 24 saat süreyle inkübatörde bekletildi.

Hücreler, daha önce anlatıldığı gibi $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki 12 adet kuyucuğa yerleştirildi ve 24 saat süreyle 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. Her kapta 12 adet kuyucuğun kullanılmasının nedeni, kalıpların yerleştirme ve çıkarma işlemleri esnasında olası bir sıvı teması veya karışımını engellemekti.

Ortam sıvısı içinde inkübatörde 24 saat süreyle bekletilmiş steril kalıplar ve diskler, puar yardımıyla kurutulduktan sonra adeziv sistemler kalıpların üst kısmındaki boşluktan tek kullanımlık fırçalar yardımıyla dentin disklerinin okluzal yüzeylerine Tablo 3.2'de belirtildiği gibi uygulandıktan sonra kalıplar, dentin disklerinin pulpal yüzeyleri, ortam sıvısıyla temas edecek şekilde kuyucuklara yerleştirildi ve düzenek 24 saat süreyle 37°C' de %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Dentin diskinin pulpal yüzeyi ortam sıvısıyla temasta olduğu için materyallerin olası etkileri ortam sıvısıyla dolu hücre kültür kabının tabanında bulunan hücreler üzerinde görülebilecekti.



Resim 3.4.2.1 *Dentin diskinin yerleştirildiği kalıp*



Resim 3.4.2.2 *Dentin diski yerleştirilmiş kalıp*

Daha sonra kalıplar 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarından çıkarıldı ve 96 kuyucuklu kaplara (Resim 3.4.2.3) 200'er µl aktarılarak MTT testine geçildi ve 570nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri ölçüldü. Kontrol grubu olarak, üzerlerine hiçbir materyal uygulanmadan kalıplara yerleştirilen diskler kullanıldı.

Her grup için optik yoğunluk değeri, tekrarlanan testlerin sonuçlarının ortalamasının alınıp tek bir değer olarak hesaplanmasıyla elde edildi.



Resim 3.4.2.3 *96 kuyucuklu hücre kültürü kabında optik yoğunluk incelemesi yapılmış Clearfil SE Bond, Clearfil Tri-S Bond ve kontrol gruplarına ait örnekler.*

3.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Windows SPSS 11.0 paket programında, hem farklı konsantrasyonlarda hazırlanan self-etch adeziv sistemlerin direkt temas test metoduyla hem de farklı kalınlıklarda dentin disklerinin kullanıldığı dentin bariyer test metoduyla sitotoksik etkileri olup olmadığının incelenmesinde One Way ANOVA, kendi aralarındaki sitotoksisite farklılıklarının incelenmesinde de Tukey HSD testleri kullanıldı ($p<0.05$)

4.BULGULAR

4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Adeziv Sistemlerin Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Çalışmada kullandığımız self-etch adeziv sistemlerin %50'lik, %20'lik, %10'luk ve %1' lik konsantrasyonlarının L 929 hücreleri üzerine direkt temas test metodu kullanılarak yapılan sitotoksik değerlendirmelerinde, MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluklara ait Ortalama ± Standart Sapma değerleri Tablo 4.1.1'de verilmiştir. Kontrol grubu olarak taze ortam sıvısı kullanılmıştır.

Tablo 4.1.1 *Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri (Ort±SS).*

Adeziv Sistemler	n	%50'lik konsantrasyon	%20'lik konsantrasyon	%10'luk konsantrasyon	%1'lik konsantrasyon
Clearfil SE Bond	24	0.375±0.005	0.403±0.005	0.496±0.005	0.505±0.004
Protect Bond	24	0.365±0.006	0.414±0.005	0.453±0.006	0.485±0.007
Clearfil Tri-S Bond	24	0.322±0.007	0.392±0.005	0.411±0.007	0.434±0.003
Reactmer Bond	24	0.348±0.006	0.401±0.007	0.412±0.005	0.453±0.004
Prime Bond NT/NRC	24	0.326±0.013	0.391±0.008	0.406±0.007	0.426±0.006
Adper Prompt	24	0.312±0.007	0.398±0.006	0.412±0.005	0.432±0.003
Kontrol grubu	24	0.598±0.025	0.598±0.025	0.598±0.025	0.598±0.025

Optik yoğunluk değerinin 0.000'a yaklaşması, materyalin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin yüksek olması anlamına gelmektedir. Değer yükseldikçe sitotoksik etki de azalacaktır. Nitekim, tablo 4.1.1'de de görüldüğü gibi kontrol grubu olarak kullanılan taze ortam sıvısı optik yoğunluk değeri bütün materyalerden oldukça yüksek bulunmuştur.

Materyallerin optik yoğunluk değerleri (OD) üzerinden yola çıkılarak, uygulandıkları hücreler üzerindeki ölüm oranları % olarak aşağıdaki formül ile hesaplandı.

% Hücre ölümü = Kontrol grubu OD – İncelenen grup OD X 100
Kontrol grubu OD

Örneğin; %50'lik konsantrasyonda dilüe edilmiş Clearfil SE Bond' un ölçümler sonrasında elde edilen optik yoğunluk değeri 0.375±0.005, kontrol grubumuzun optik yoğunluk değeri ise 0.598±0.025 olarak bulunmuştur. Formüle uyarlarsak,

% Hücre ölümü = 0.598-0.375 = 0.37 x 100 = 37
0.598

Clearfil SE Bond' un %50'lik konsantrasyonda L 929 hücrelerinin %37'sini öldürdüğünü söyleyebiliriz.

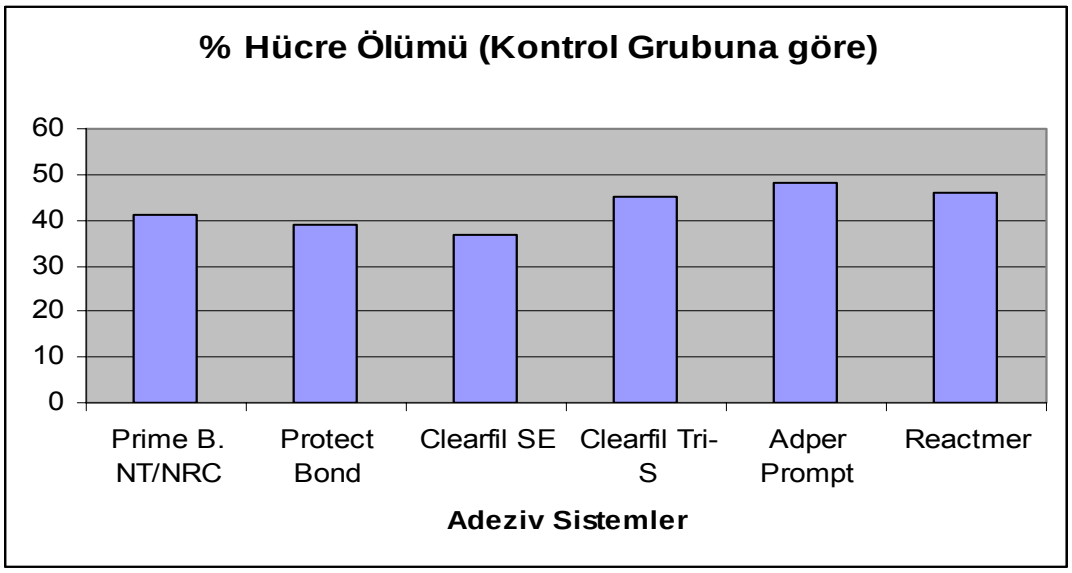
4.1.1 L 929 Hücreleri Üzerine Uygulanan %50'lik Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Konsantrasyonu %50'lik olarak hazırlanan self-etch adezivlerin MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde; tüm self-etch adezivler, sadece taze ortam sıvısı uygulanan kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$).

Kullanılan adezivleri kendi aralarında değerlendirdiğimiz zaman; Protect Bond ile Clearfil SE Bond arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken bu iki sistem diğer bağlayıcı sistemlerden daha az ($p<0.05$) sitotoksik bulundu. Reactmer Bond ise Clearfil SE Bond ve Protect Bond' dan daha fazla ($p<0.05$), diğer gruplardan daha az ($p<0.05$) sitotoksik etki gösterdi. Adper Prompt, Prime Bond NT/NRC ve Clearfil Tri-S Bond arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ancak diğer adeziv gruplarına göre %50'lik konsantrasyonlarında en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdiler ($p>0.05$).

Elde edilen optik yoğunluk değerlerine göre hücre ölüm oranları incelendiği zaman, Clearfil SE Bond kullanılan grupta %37 ile en düşük hücre ölümü gözlenirken, en yüksek ölüm oranı %48 ile Adper Prompt kullanılan grupta görüldü. Protect Bond' un %39,

Reactmer Bond' un %46, Prime Bond NT/NRC' nin %41, Clearfil Tri-S Bond' un %45 oranında hücre ölümüne neden olduğu görüldü. Grafik 4.1.1.1 de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



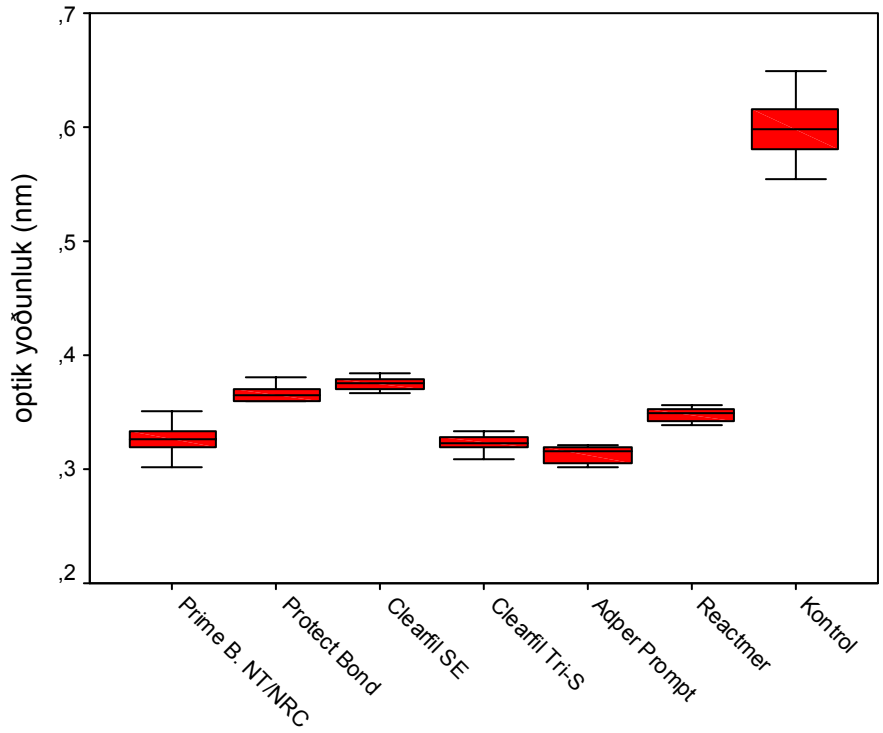
Grafik 4.1.1.1 *%50'lik konsantrasyonda hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Tablo 4.1.1.1 de konsantrasyonu %50'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlere ait gruplar arası istatistiksel farklılıklar anlamlılık değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.1.1.1 *Konsantrasyonu %50'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu, Tukey HSD (P). (FY: Fark yok)*

	PrimeB NT/NRC	**Clearfil Tri-S B.**	**Adper Prompt**	**Reactmer Bond**	**Protect Bond**
Clearfil SE Bond	0.000	0.000	0.000	0.000	FY
Protect Bond	0.000	0.000	0.000	0.013	
Reactmer Bond	0.001	0.000	0.000		
Adper Prompt	FY	FY			
Clearfil Tri-S B.	FY				

Optik yoğunluk değerlerinin ölçülmesiyle elde edilen değerler grafik 4.1.1.2'de gösterilmektedir.



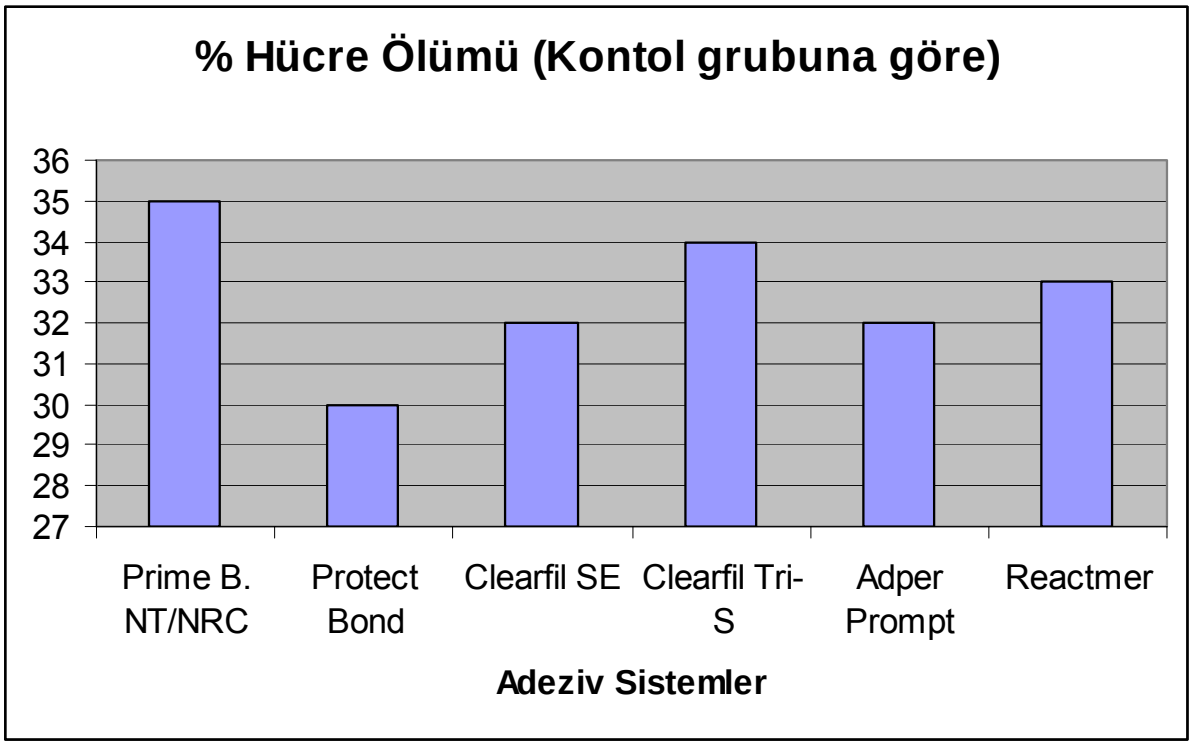
Grafik 4.1.1.2 *L 929 hücreleri üzerine uygulanan %50' lik konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri*

4.1.2 L 929 Hücreleri Üzerine Uygulanan %20'lik Konsantrasyonda Hazırlanmış Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Konsantrasyonu %20'lik olarak hazırlanan self-etch adezivlerin MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde; tüm adeziv sistemler sadece taze ortam sıvısı uygulanmış kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$).

Kullanılan self-etch adeziv sistemler kendi aralarında değerlendirildiğinde; Protect Bond' un diğer gruplardan daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu bulundu ($p<0.05$). Clearfil SE Bond ile Reactmer Bond, Clearfil Tri-S Bond, Adper Prompt ve Prime Bond NT/NRC arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı, ancak bu adezivler arasında Prime Bond NT/NRC sayısal olarak en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdi.

Elde edilen optik yoğunluk değerlerine göre hücre ölüm oranlarına bakıldığında ise, en düşük hücre ölüm oranı %30 ile Protect Bond kullanılan grupta, en yüksek ölüm oranı ise %35 ile Prime Bond NT/NRC kullanılan grupta görüldü. Clearfil SE Bond, Adper Prompt, Reactmer Bond ve Clearfil Tri-S Bond kullanılan gruplarda ise sırasıyla, %32, %33, %33, %34 oranında hücre ölümü tespit edildi. Grafik 4.1.2.1 de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



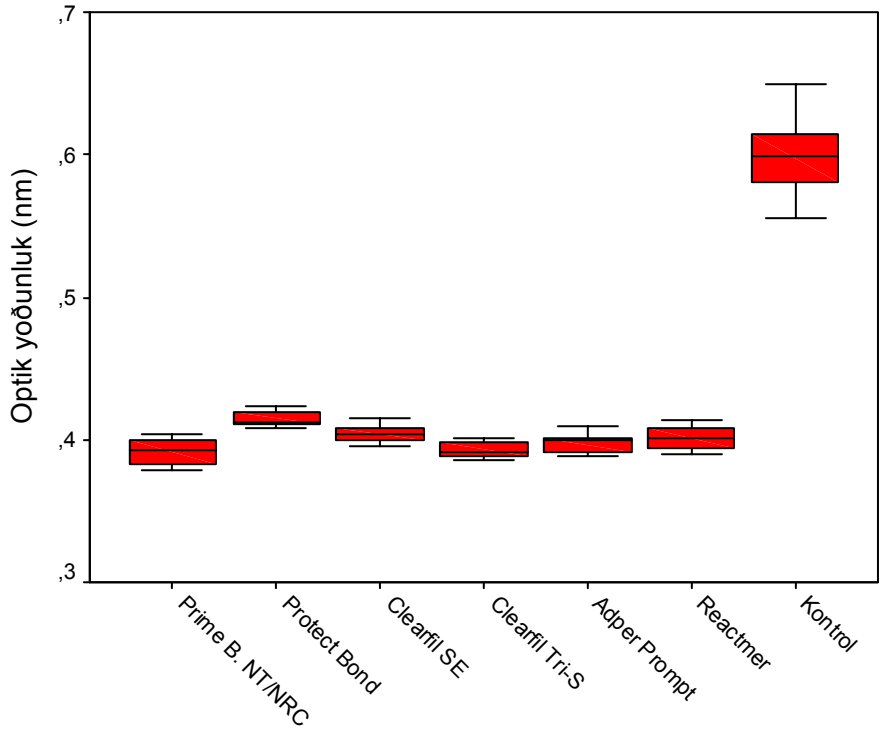
Grafik 4.1.2.1 *Konsantrasyonu %20'lik olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Tablo 4.1.2.1'de konsantrasyonları %20'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlere ait gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar anlamlılık değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.1.2.1 *Konsantrasyonları %20'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu, Tukey HSD (P). (FY: Fark yok)*

	PrimeB NT/NRC	**Clearfil Tri-S B.**	**Adper Prompt**	**Reactmer Bond**	**Protect Bond**
Clearfil SE Bond	FY	FY	FY	FY	0.038
Protect Bond	0.000	0.000	0.010	0.040	
Reactmer Bond	FY	FY	FY		
Adper Prompt	FY	FY			
Clearfil Tri-S B.	FY				

Optik yoğunluk değerlerinin ölçülmesiyle elde edilen değerler grafik 4.1.2.2'de gösterilmektedir.

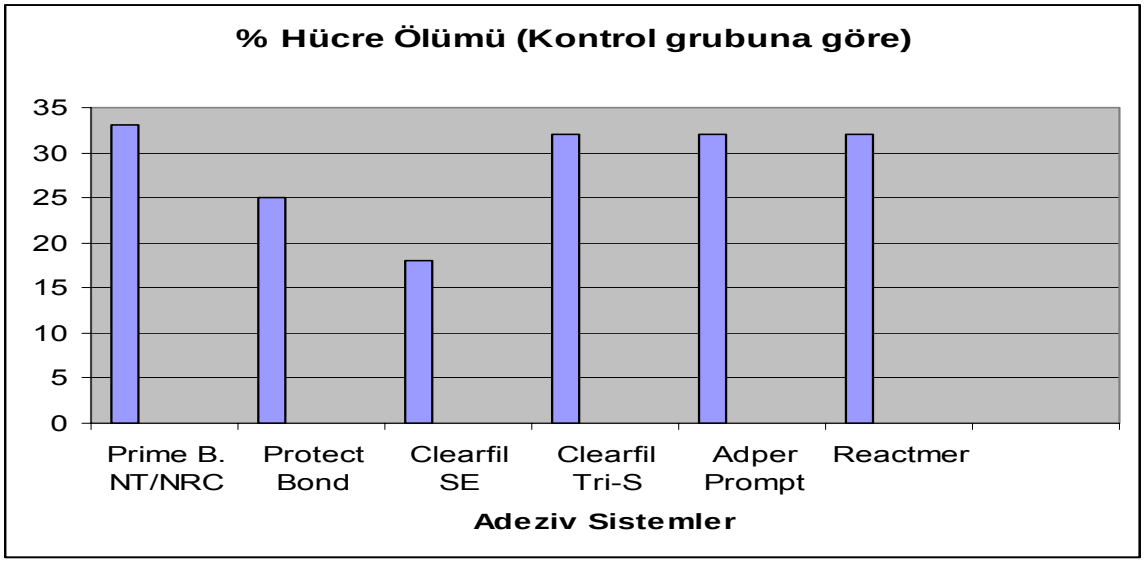


Grafik 4.1.2.2 *L 929 hücreleri üzerine uygulanan %20'lik konsantrasyondaki adeziv sistemlerin optik yoğunluk değerleri*

4.1.3 L 929 Hücreleri Üzerine Uygulanan % 10'luk Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Konsantrasyonları %10'luk olarak hazırlanan self-etch adezivlerin tümü MTT testi sonucunda sadece taze ortam sıvısı uygulanmış kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Kullanılan adezivler kendi aralarında değerlendirildiğinde; Clearfil SE Bond, kullanılan tüm adeziv materyallerden daha az sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$) Protect Bond, ise Clearfil SE Bond' dan sonra en az sitotoksik etki gösteren adezivken daha fazla sitotoksisiteye neden olan Prime Bond NT/NRC, Clearfil Tri-S Bond, Adper Prompt ve Reactmer Bond arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$)

Elde edilen optik yoğunluk değerlerine göre hücre ölüm oranları incelendiğinde; Clearfil SE Bond kullanılan grupta %18 oranında hücre ölümü gözlenirken, Protect Bond kullanılan grupta %25, Clearfil Tri-S Bond, Reactmer Bond, Prime Bond NT/NRC ve Adper Prompt kullanılan gruplarda sırasıyla %32, %32, %33, %32 oranında hücre ölümü gözlendi. Grafik 4.1.3.1 de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



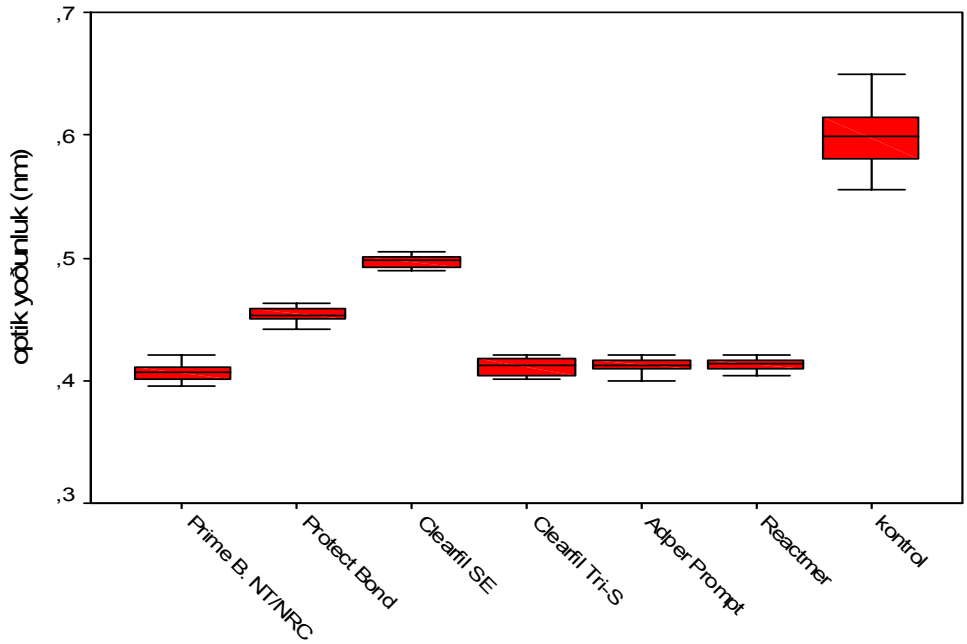
Grafik 4.1.3.1 *Konsantrasyonu %10'luk olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Tablo 4.1.3.1 de konsantrasyonu %10'luk olarak hazırlanan adeziv sistemlere ait gruplar arası istatistiksel farklılıklar anlamlılık değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.1.3.1 *Konsantrasyonu %10 olarak hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu, Tukey HSD (P). (FY: Fark yok)*

	PrimeB NT/NRC	**ClearfilTri-S**	**Adper Prompt**	**Reactmer Bond**	**Protect Bond**
Clearfil SE Bond	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Protect Bond	0.000	0.000	0.000	0.000	
Reactmer Bond	FY	FY	FY		
Adper Prompt	FY	FY			
Clearfil Tri-S B.	FY				

Optik yoğunluk değerlerinin ölçülmesiyle elde edilen değerler grafik 4.1.3.2'de gösterilmektedir.



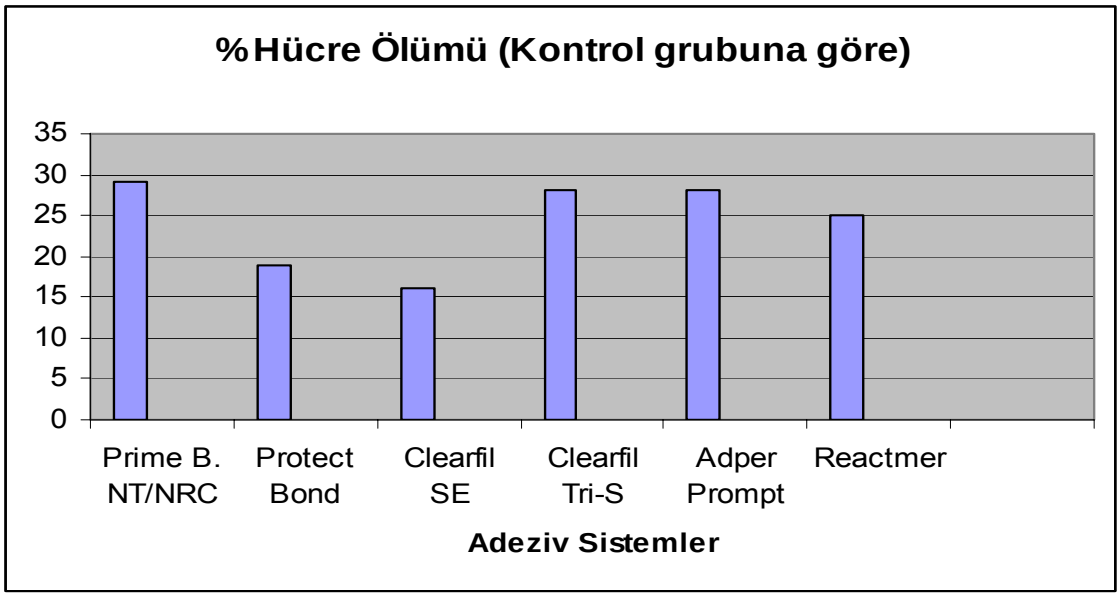
Grafik 4.1.3.2 *L 929 hücreleri üzerine uygulanan %10'luk konsantrasyondaki bağlayıcı sistemlerin optik yoğunluk değerleri*

4.1.4 L 929 Hücreleri Üzerine Uygulanan %1'lik Konsantrasyonda Hazırlanan Self-etch Adeziv Sistemlerin MTT Testi Sonucu Elde Edilen Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Self-etch adezivlerin %1'lik olarak hazırlanan konsantrasyonlarının tümü MTT testi sonucunda taze ortam sıvısı uygulanmış kontrol grubuna göre daha fazla sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Kullanılan adezivler kendi aralarında değerlendirildiğinde; Clearfil SE Bond diğer tüm gruplardan daha az sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Protect Bond ise Clearfil SE Bond' dan daha fazla, Clearfil Tri-S Bond ve Adper Prompt, Reactmer Bond ve Prime Bond NT/NRC' den daha az sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Reactmer Bond, Clearfil SE Bond ve Protect Bond'dan daha fazla sitotoksik etki gösterirken ($p<0.05$), diğer gruplardan daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlendi ($p<0.05$).

Prime Bond NT/NRC, Adper Prompt ve Clearfil Tri-S Bond ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) ve bu adezivler en fazla sitotoksik etkiye sahip olarak bulundu.

Elde edilen hücre ölüm oranları incelendiğinde; Clearfil SE Bond %16 ile en düşük değeri gösterirken, Protect Bond %19 ile Reactmer Bond' da %25 ile diğer gruplardan daha az hücre ölümüne sebebiyet verdi. Prime Bond NT/NRC %29, Clearfil Tri-S Bond ve Adper Prompt ise %28 oranında hücre ölümüne sebebiyet vererek daha fazla sitotoksik etki gösterdiler. Grafik 4.1.4.1'de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



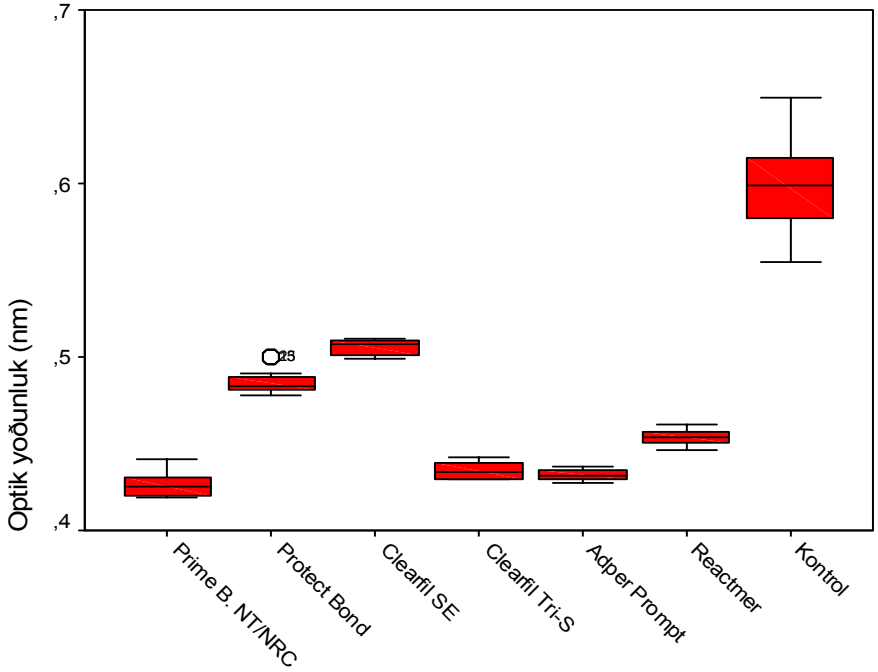
Grafik 4.1.4.1 *Konsantrasyonu %1'lik olarak hazırlanmış adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, materyalerin karışım içindeki konsantrasyonları azaldıkça sitotoksik etkilerinin de azalmakta olduğu açıkca görülebilmektedir. Tablo 4.1.4.1'de konsantrasyonu %1'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlere ait gruplar arası istatistiksel farklılıklar anlamlılık değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.1.4.1 *Konsantrasyonu %1'lik olarak hazırlanan adeziv sistemlerin sitotoksik etkileri arasındaki anlamlılık tablosu, Tukey HSD (P). (FY: Fark yok)*

	Prime B NT/NRC	**ClearfilTri-S Bond**	**Adper Prompt**	**Reactmer Bond**	**Protect Bond**
Clearfil SE Bond	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Protect Bond	0.000	0.000	0.000	0.000	
Reactmer Bond	0.000	0.001	0.000		
Adper Prompt	FY	FY			
Clearfil Tri-S B.	FY				

Optik yoğunluk değerlerinin ölçülmesiyle elde edilen değerler grafik 4.1.4.2'de gösterilmektedir.



Grafik 4.1.4.2 *L 929 hücreleri üzerine uygulanan % 1'lik konsantrasyondaki bağlayıcı sistemlerin optik yoğunluk değerleri*

4.2 Farklı Kalınlıklarda Hazırlanan Dentin Disklerine Uygulanan Self-etch Adeziv sistemlerin L 929 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.2.1 Kalınlığı 1.5mm olan Dentin Diski Altındaki L 929 Hücreleri Üzerine Self-etch Adeziv Sistemlerin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4.2.1.1'de kalınlığı 1.5mm olarak hazırlanan dentin diskleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin, disk altına yerleştirilmiş olan L 929 hücreleri üzerine göstermiş olduğu sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılan MTT testi sonucunda elde edilen veriler gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak, kalıplara yerleştirilmiş ve üzerlerine herhangi bir adeziv sistem uygulanmayan dentin diskleri kullanılmıştır.

Tablo 4.2.1.1 *Kalınlığı 1.5mm olan dentin diski üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri (Ort±SS) (n=24)*

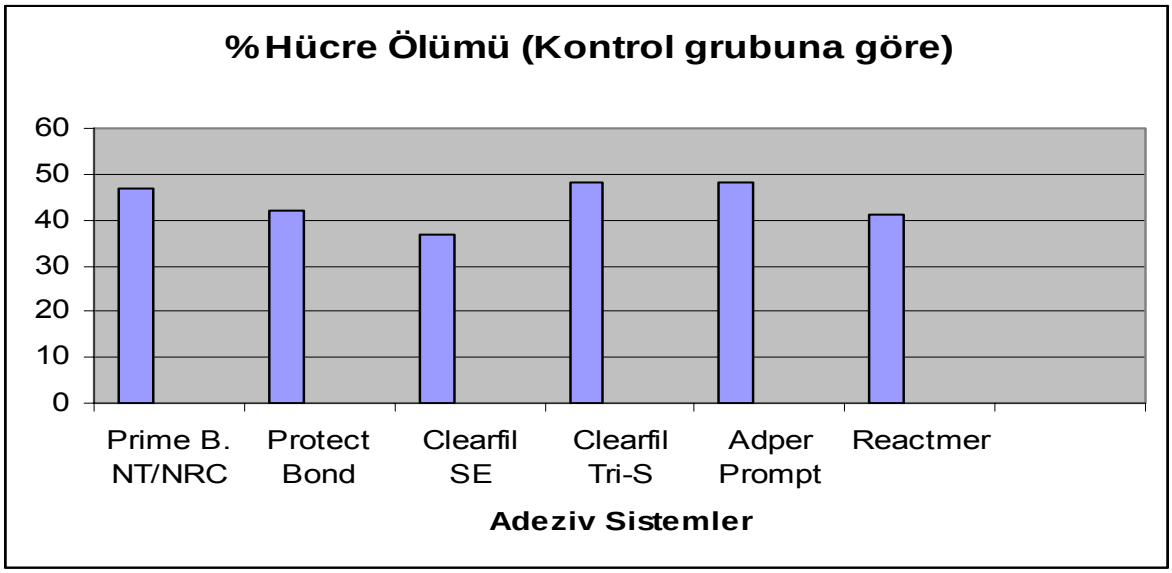
Adeziv Sistemler	Ortalama ± Standart Sapma
Clearfil SE Bond	0.381 ± 0.017
Reactmer Bond	0.357 ± 0.010
Protect Bond	0.353 ± 0.012
Adper Prompt	0.314 ± 0.014
Clearfil Tri-S Bond	0.319 ± 0.015
Prime Bond NT/NRC	0.322 ± 0.009
Kontrol grubu	0.602 ± 0.031

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 1.5mm'lik dentin üzerinden uygulanan self-etch adezivlerin tümünün kontrol grubuna göre L 929 hücreleri üzerine daha fazla sitotoksik etki gösterdiği ($p<0.05$) bulundu.

Kullanılan adezivler kendi aralarında değerlendirildiğinde; Clearfil SE Bond adeziv kullanılan tüm gruplardan daha az sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Protect Bond ile Reactmer Bond arasında bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), Prime Bond NT/NRC, Clearfil Tri-S Bond ve Adper Prompt'a göre Protect Bond daha az sitotoksik etki gösterdi ($p>0.05$). Prime Bond NT/NRC, Adper Prompt ve Clearfil Tri-S Bond kulanılan gruplar arasında fark gözlenmezken ($p>0.05$) bu üç grup da en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdi.

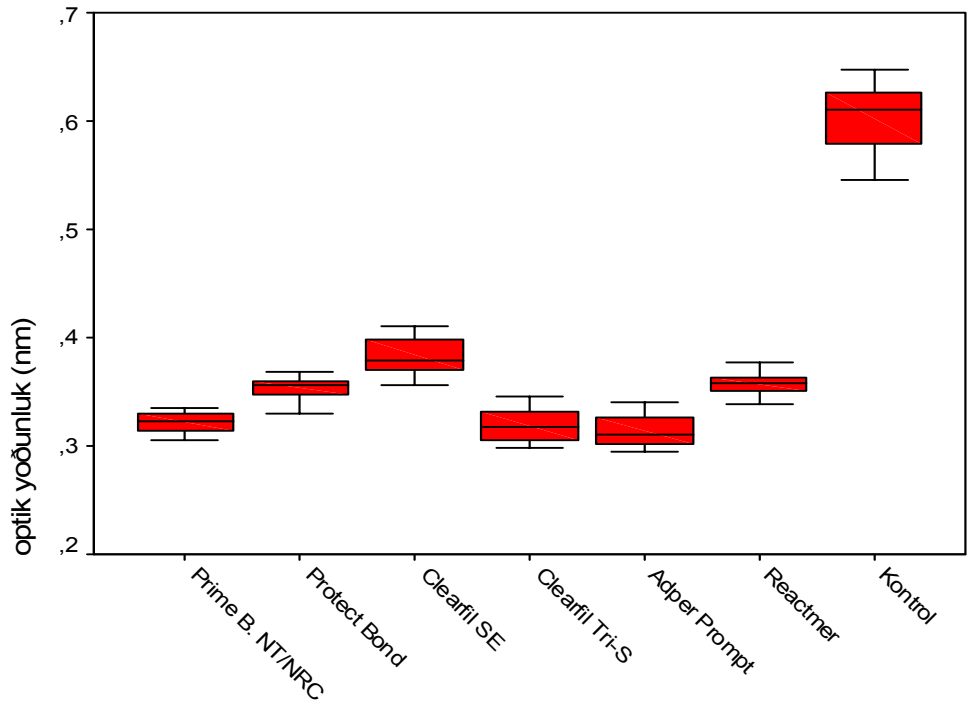
Elde edilen optik yoğunluk değerlerine göre hücre ölüm oranları incelendiğinde; self-etch adeziv sistemlerden Clearfil SE Bond %37 ile en düşük değeri gösterirken, daha sonra sırasıyla Reactmer Bond %41, Protect Bond %42, Prime Bond NT/NRC %47, Adper Prompt ve Clearfil Tri-S Bond %48 oranında hücre ölümüne sebebiyet verdi.

Grafik 4.2.1.1 de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



Grafik 4.2.1.1 *Kalınlığı 1.5mm olan dentin diskleri üzerine uygulanan adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Kalınlığı 1.5mm olan dentin diski altındaki L 929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri grafik 4.2.1.2'de gösterilmiştir.



Grafik 4.2.1.2 *Kalınlığı 1.5mm olan dentin diski altındaki L 929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri*

4.2.2 Kalınlığı 0.5mm olan Dentin Diski Altındaki L 929 Hücreleri Üzerine Self-etch Adeziv Sistemlerin Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Kalınlığı 0.5mm olarak hazırlanan dentin diskleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin, disk altına yerleştirilmiş olan L 929 hücreleri üzerine üzerine göstermiş olduğu sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılan MTT testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.2.2.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak, kalıplara yerleştirilmiş ve üzerlerine herhangi bir adeziv sistem uygulanmayan dentin diskleri kullanılmıştır.

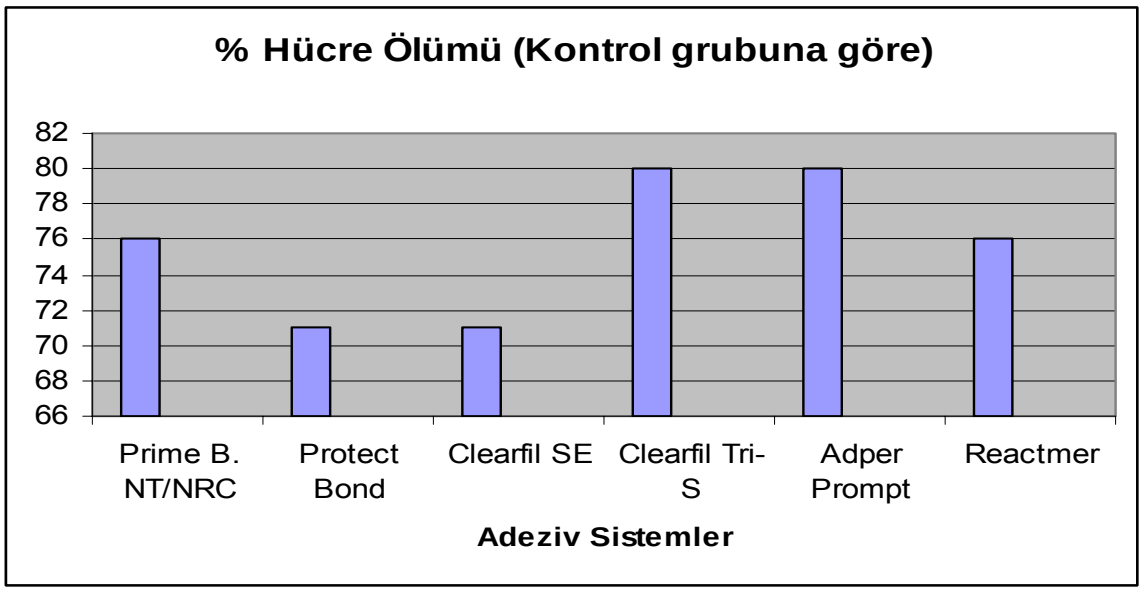
Tablo 4.2.2.1 *Kalınlığı 0.5mm olan dentin diski üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri (Ort±SS) (n=24)*

Adeziv Sistemler	**Ortalama ± Standart Sapma**
Clearfil SE Bond	0.171 ± 0.012
Reactmer Bond	0.143 ± 0.029
Protect Bond	0.162 ± 0.018
Adper Prompt	0.124 ± 0.009
Clearfil Tri-S Bond	0.123 ± 0.018
Prime Bond NT/NRC	0.147 ± 0.007
Kontrol grubu	0.602 ± 0.031

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; 0.5mm'lik dentin üzerinden uygulanan self-etch adezivlerin tümü kontrol grubuna göre L 929 hücreleri üzerine daha fazla sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$).

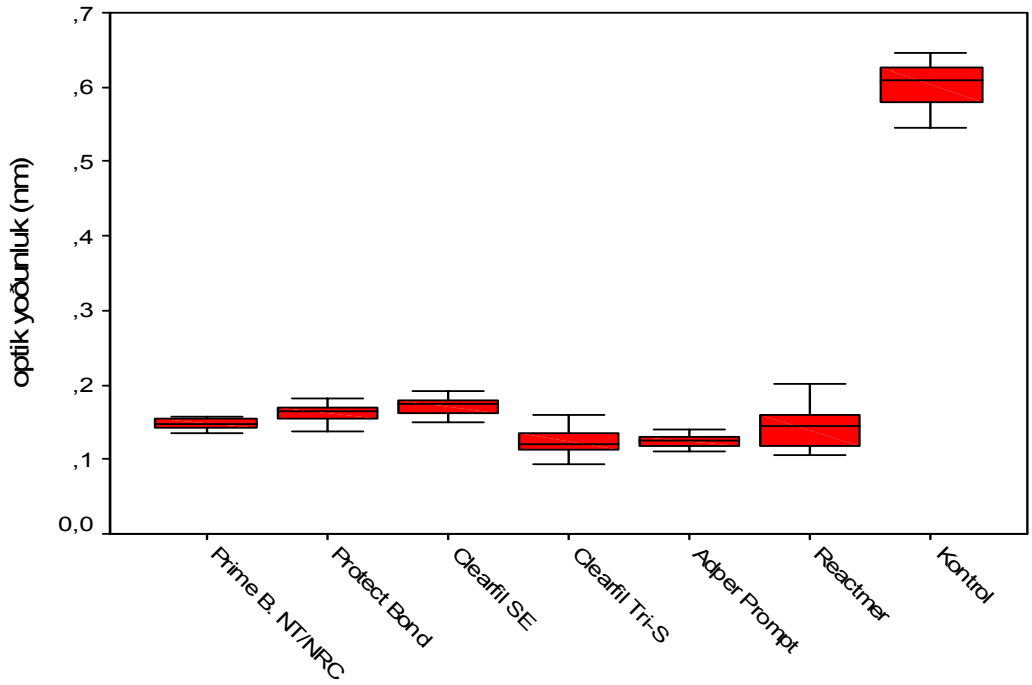
Kullanılan adezivler kendi aralarında değerlendirildiğinde; Clearfil SE Bond ve Protect Bond en az sitotoksik etkiyi gösteren self-etch adeziv olurken ($p<0.05$), Reactmer Bond ve Prime Bond NT diğer gruplardan daha az sitotoksik etki gösterdi ($p<0.05$). Gruplar arasında en fazla sitotoksik etkiyi Clearfil Tri-S Bond ve Adper Prompt gösterirken bu iki self-etch adeziv sistem arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$)

Hücre ölüm oranları incelendiğinde; Clearfil SE Bond ve Protect Bond sırasıyla %71 ve %73 oranında hücre ölümüne neden olarak sitotoksisiteleri en düşük gruplar olurken, %80 oranında hücre ölümüne yol açan Clearfil Tri-S Bond ve Adper Prompt en sitotoksik self-etch adeziv sistemler olarak görüldü. Reactmer Bond ve Prime Bond NT/NRC' de %76 ile aynı oranda sitotoksik etkiye sahip olarak bulundu. Grafik 4.2.2.1'de adeziv sistemlerin hücre ölümüne sebebiyet verme değerleri kontrol grubuna göre yüzde olarak gösterilmiştir.



Grafik 4.2.2.1 *Kalınlığı 0.5mm olan dentin diskleri üzerine uygulanan adeziv sistemlerin kontrol grubuna göre % hücre ölümü değerleri*

Kalınlığı 0.5mm olan dentin diski altındaki L 929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri grafik 4.2.2.2'de gösterilmiştir.



Grafik 4.2.2.2 *Kalınlığı 0.5mm olan dentin diski altındaki L 929 hücreleri üzerine uygulanan self-etch adezivlerin optik yoğunluk değerleri*

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, 0.5mm ve 1.5mm'lik dentin disklerinin dentin bariyeri olarak kullanılmasının, materyallerin sitotoksik etkilerini engellemekte yeterli derecede etkili olmadığı, fakat dentin kalınlığı arttıkça, görülen sitotoksik etkinin de azaldığı gözlemlendi. Kullanılan tüm self-etch adeziv sistemler kalınlıkları 1.5mm olan dentin diskleri üzerine uygulandıkları zaman daha az hücre ölümüne sebebiyet verdi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda geliştirilen ve hekimler tarafından rutin olarak kullanılan dental adezivlerin in vitro şartlarda incelendiği çalışmalarda, genellikle diş dokularına bağlanma dayanımları, dayanıklılıkları, sızdırmazlıkları incelenirken, bu tür materyallerde bulunması çok önemli bir özellik olan biyouyumlulukları daha az incelenmiştir (Hanks ve ark. 1996, Teixeria ve ark. 2006).

Oysa yapılan çalışmalarda, bu materyallerin sitotoksik etkilerinin de bulunduğu gösterilmiştir (Hanks ve ark. 1991; Ratanasathien ve ark. 1995; Bouillaguet ve ark. 1996; Gaynour ve ark. 1999; Chen ve ark. 2003).

Materyal bilimindeki hızlı gelişmeye ayak uydurabilmek için, güvenilir ve klinik şartlara uygun olacak şekilde, materyallerin biyouyumluluklarının belirlenmesini sağlayan testlerin de geliştirilmesi gerekmektedir (Spangberg 1978). In vitro biyouyumluluk testlerinin amacı, materyaller vücüt dokularının içine veya üzerine uygulandığında bu materyale karşı gelişebilecek biyolojik reaksiyonların taklit edilerek sitotoksisitelerinin laboratuar şartlarında belirlenmesidir (Hanks ve ark. 1996).

Günümüze kadar, biyomateryallerin sitotoksik özelliklerinin incelenmesi için çeşitli sayıda test metodu geliştirilmiştir. Materyalin, bariyer olmadan direkt, hücrelerle temas edebileceği direkt kontakt testleri (Schedle ve ark. 1998; Abdullah ve ark. 2000), materyal ve hücreler arasında agar tabakası, milipor filtre veya diş dokusu gibi bir bariyerin bulunduğu indirekt kontakt testler (Sjögren ve ark. 2000) kompozit materyalden salınan bazı maddelerin hücrelerle ekspoze olduğu ekstrakt testleri (Sletten ve Dahl 1999; Sjögren ve ark. 2000; Wataha ve ark. 2003) bu testlerden bazılarıdır.

Kullanılan bu testleri standardize etmek için önemli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, teknoloji, standart oluşturma işleminden daha hızlı geliştiği için standartların geliştirilmesi zor ve devamlılık isteyen bir süreç haline gelmiştir.

Materyallerin test edilmeleri esnasında izlenecek yolları standart hale getirmeye çalışan American Society for Testing and Materials (ASTM), International Organization for Standartization (ISO), Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Associatiton gibi bazı kuruluşlar bulunmaktadır. Bu çalışma, geçerliliği daha fazla kabul görmüş olan ISO' nun 1993 yılında belirlediği standartlara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Dişhekimliğinin pek çok dalında, özellikle restoratif diş hekimliğinde, dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirmeleri yapılırken hücre kültürü kullanılması giderek önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan in vitro sitotoksisite belirleme testlerinde biyouyumluluk, hücre kültürü işlemi yapılarak değerlendirilmektedir (Schedle ve ark. 1998; van Wyk ve ark. 2000; Schuster ve ark. 2001; Schmalz ve ark. 2002; Quinlan ve ark. 2002).

In vitro koşullarda çalışmanın, deneye etki eden faktörleri daha kolay kontrol edebilme gibi büyük bir avantajı bulunmaktadır. Bu metotlar, basit, tekrarlanabilir, verimli ve dişhekimliğinde kullanılan materyallerin değerlendirilmesi için uygundur (Mjör 1978). In vitro çalışmalarla materyallerin biyouyumluluğu belirlenirken kullanılan test metodlarının yanı sıra üzerinde, materyalin etkisinin inceleneceği hücre tipi de önem taşımaktadır. Literatürde, rezinlerin sitotoksisitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda, pulpa fibroblastları, 3T3, gingival fibroblastlar, sığır dental papillasından elde edilen immortalize hücreleri, fareden elde edilen odontoblast benzeri hücrelerin (MDPC-23) kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Ratanasathien ve ark. 1995; Camps ve ark. 1997; Geurtsen ve ark. 1998; Huang ve Chang 2002; Issa ve ark. 2003; Vajrabhaya ve ark. 2003). In vitro şartlarda gerçekleştirilen çalışmamızda kullandığımız L 929 hücreleri ISO standartları (ISO 10993–5 1999) tarafından Balb/3T3 ve WI38 gibi hücre tipleriyle birlikte kullanılması önerilen hücrelerden birisidir.

Bu hücre tipleri homojen morfolojileri ve büyüme karakterleri nedeniyle in vitro sitotoksisite görüntülenmesinde, tekrarlama imkanı vermektedirler. Ayrıca, kolay bulunabilmeleri ve in vitro hücre kültürü koşullarında güçlü üreme karakterleriyle de sıklıkla tercih edilen hücrelerdir (Cao ve ark. 2005).

Literatürde, pulpadan elde edilen hücrelerin, dişhekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik değerlendirmelerine, fare fibroblastlarından farklı hassasiyet gösterdiği bildirilmiştir (Selden ve ark. 1997).

Pulpadan elde edilen hücreler, kısıtlı miktarda elde edilebilmeleri, standartize edilememeleri, uzun süre işleme tabi tutulduklarında protein ekspresyon modellerinde değişiklikler göstermeleri gibi olumsuz bazı özelliklere sahiptir (Schmalz ve ark. 2001). Pulpadan elde edilen hücrelerin, kabul edilebilir olması için, kolay işlenmeleri, materyallere karşı gösterdikleri etkilerin, tekrar testlerde de görülebilmesi gerektiği bildirilmiştir (van Wyk ve ark. 2000). Farklı bireylere ait dişlerden elde edilen hücreler aynı tip olsa bile kültür işlemi esnasında farklı reaksiyonlar verebilirler. Moule ve ark. (1995) pulpa fibroblast hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, pulpadan alınan hücrelerin proliferatif aktiviteleri esnasında, dişlerin alındığı kişilerin yaşı, kaynağı ve pasaj sayısı gibi faktörlerle ilişkili olmadığı düşünülen büyük bir çeşitlilik bildirmişlerdir. Bu tür sorunların önüne geçmek için diğer hücre dizinlerinin kullanılması doğru olacaktır. Çalışmamızda, L 929 hücre serisi kullanarak bu problemlerle karşılaşma ihtimali elimine edilmeye çalışılmıştır.

Test edilecek materyallerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin hücre canlılıklarıyla değerlendirildiği çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Canlı kalan hücrelerin sayılması, proliferasyon oranlarının hesaplanması, hücresel makromoleküllerin sentezi veya enzim aktivitesinin belirlenmesi bu metotlardan bazılarıdır (Schmalz 1998).

Sıklıkla kullanılan sitotoksisite testlerinde, hücre ölümü en önemli değerlendirme kriteri olarak görülür. Yapılmış çalışmaların büyük kısmında sitotoksisite, süksinik dehidrogenaz (SDH) isimli mitokondriyal enzimin aktivitesinin genellikle MTT testi kullanılarak ölçülmesiyle değerlendirilmiştir (Hashieh ve ark. 1999; Schmalz ve ark. 2002; Vajrabhaya ve ark. 2003; Becher ve ark. 2006; Sengun A ve ark. 2006). Bu nedenle tam bir risk değerlendirilmesi yapılabilmesi için, in vitro test modeli klinik koşulları mümkün olabildiği kadarıyla taklit edebilmelidir. İlk olarak, komponentlerin hücreler üzerindeki etkileri doza bağlı olarak incelenebilir ve in vivo şartlardaki muhtemel sitotoksik potansiyelleri tahmin edilebilir.

Yaptığımız çalışmada, dişhekimliği pratiğinde yoğun olarak kullanılan self-etch adeziv sistemlerin sitotoksisitelerinin belirlenmesi için ilk olarak direkt kontak test metodu kullanılmış ve farklı yüzdelerde dilüe edilmiş self-etch adeziv sistem bileşenleri L 929 hücreleri üzerine uygulanmıştır. Bütün materyallerde %50'lik dilüsyonlarda sitotoksik etki en fazla bulunurken, konsantrasyon azaldıkça sitotoksik etkinin de azaldığı görülmüştür. Dilüsyon oranı azaldıkça sitotoksik etkinin de azalması materyalde bulunan zararlı komponent miktarının da orantılı olarak azalmasına bağlıdır. Materyallerin dilüe edilerek kullanılması, dentin tübüllerinden pulpaya ulaşıp sitotoksik etki gösterme ihtimalini azaltacaktır. Ancak, dilüe edilmiş materyalin fiziksel ve mekanik özelliklerinin de araştırılması gerekecektir.

Hashieh ve ark. (1999), 4. ve 5. jenerasyon bağlayıcı sistemlerin sitotoksisitelerini inceledikleri çalışmalarında, 10^{-1} – 10^{-8} arası dilüe edilen bonding sistemleri L 929 hücreleri üzerine uygulamışlar ve MTT testiyle sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, tüm dilüsyonların sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin dilüsyon oranı $10^{-8'}$ e yaklaştıkça azaldığını tespit etmişlerdir.

Chen ve ark. (2003) farklı konsantrasyonlarda dilüe ettikleri bağlayıcı ajanların 24 saatlik süreden sonra pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişler ve konsantrasyon arttıkça sitotoksik etkinin de arttığını bildirmişlerdir.

Ratanasathien ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmanın sonucu olarak materyalin konsantrasyonu azaldıkça sitotoksisitenin de azaldığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; literatürde farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak canlı hücrelere uygulanan adeziv sistemlerin sitotoksisitelerinin incelendiği çalışmalarla bizim çalışmamızın uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan adeziv sistemlerin sitotoksik etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak azalması, en çok Clearfil SE Bond ve Protect Bond kullanılan gruplarda belirgindi. İncelenen tüm konsantrasyonlarda en fazla sitotoksik etkiyi Clearfil Tri-S Bond gösterdi.

Materyallerin sitotoksik etkilerinde çok farklı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle, materyallerde hücresel yapılarla etkileşimlerden sorumlu bileşiklerin tespit edilmesi için çalışmalar yoğunlaştırılmış ve bu materyallerin sitotoksik etkiye sahip monomerleri, ko-monomerleri tespit edilmiş ve bunlar arasındaki ilişkiler belirlenmiştir (Hanks ve ark. 1991; Yoshii 1996)

Rezinler tam polimerize olmadıkları zaman bir süre sonra degredasyon başlar ve dentin bağlayıcı ajanlar, taglardan süzülerek çeşitli konsantrasyonlarda olmak üzere pulpaya ulaşırlar. Çeşitli çalışmalarda, kromatografik incelemeler sonucunda, HEMA, Bis-GMA, UDMA, TEGDMA gibi bağlayıcı ajan komponentlerinin polimerizasyon sonrasında aköz yapıda bulunduğu tespit edilmiştir (Spahl ve ark. 1998; Geurtsen ve ark. 1999).

Gerzina ve Hume (1994) polimerizasyondan yüz gün sonra bile dentinden geçerek pulpal dokuya ulaşan TEGDMA ve HEMA varlığını tespit etmişlerdir.

Geurtsen ve ark. (1998) otuzbeş farklı komponenti inceledikleri çalışmalarında, molekül ağırlığı ve sitotoksisite derecesi arasında direkt bir ilişki tespit etmişler, HEMA

gibi molekül ağırlığı daha az olan moleküllerin, daha ağır Bis-GMA ve TEGDMA gibi moleküllere göre daha az sitotoksik etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Ratanasathien ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada UDMA' nın HEMA'dan daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve sitotoksik etkide bağlayıcı ajanların konsantrasyonları yanında içeriklerindeki maddelerin birbirileriyle olan etkileşimlerinin de etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Issa ve ark (2003) gingival fibroblastlar üzerinde yaptıkları çalışmada, 24 saat süreyle monomerler ile temas halinde kalan hücreler üzerinde en fazla sitotoksik etkinin Bis-GMA tarafından meydana getirildiğini, sonrada sırasıyla TEGDMA ve HEMA'nın geldiğinin göstermişlerdir.

Nassiri ve ark (1991) yaptıkları bir çalışmada UDMA'nın sitotoksik etkisini incelemişler ve UDMA'nın hücre siklüsünü etkileyen sitopatik bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bağlayıcı ajanların içerisindeki komponentlerin sitotoksik etkilerinin incelendiği birçok çalışmada Bis-GMA'nın en toksik yapı olduğu bunu sırasıyla UDMA, TEGDMA, HEMA ve MMA'nın takip ettiği bildirilmiştir (Hanks 1991; Yoshii 1996; Sletten ve Dahl 1999; Kaga 2001).

Huang ve Chang (2002) bağlayıcı ajanların sitotoksik etkilerini inceledikleri bir çalışmada, Prime Bond NT/NRC nin Clearfil SE Bond'dan daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğunu bulmuşlar ve bunun nedeni olarak, Prime Bond NT/NRC içindeki UDMA' nın Clearfil SE Bond içindeki HEMA'dan daha sitotoksik etkiye sahip olmasını göstermişlerdir.

Bizim de çalışmamızda kullandığımız adeziv sistemlerin tüm konsantrasyonlarının sitotoksik etkiye sahip olmalarının nedenini; içerdikleri, Bis-GMA, HEMA, UDMA gibi komponentlere bağlayabiliriz. Tüm konsantrasyonlarda, HEMA veya HEMA ile UDMA gibi komponentleri beraber içeren bağlayıcı sistemler daha az sitotoksik etki gösterirken

(Clearfil SE Bond, Protect Bond, Reactmer Bond) sitotoksik etkileri daha fazla olan sistemlerin (Clearfil Tri-S Bond, Prime Bond NT/NRC) özellikle Bis-GMA ve UDMA içerdiği görülmüştür. Prime Bond NT/NRC içindeki UDMA'nın Clearfil SE Bond içindeki HEMA' dan daha toksik etki göstermesi, Huang ve Chang' ın 2002'de yaptıkları çalışmada olduğu gibi diğer tüm çalışmalarla da uyum içindedir.

Yapılan restorasyonlarda önemli bir nokta, dentinin diş canlı dokusu için kullanılan materyallere karşı yeterli korumayı sağlayıp sağlayamadığıdır. Dentinin birçok özelliği restoratif materyallerin sitotoksik potansiyellerini etkilemektedir. Dentinin limitli miktardaki ıslanabilirliği, uygulanan materyalin çözülme oranını sınırlarken, dentin hidroksiapatitlerinin sahip oldukları tamponlama kapasitesi, asit-baz reaksiyonu ile etki gösteren materyallerin ve sıvı haldeki asitlerin yüzeye uygulanmasına izin vermektedir (Pashley 1996).

Rezin komponentlerin, dentinden diffüze olabilme özellikleri temeline dayanarak yapılan çalışmalarda, polimerize olmamış dentin bağlayıcı sistem komponentlerinin pulpaya doğru diffüze olarak canlı doku üzerinde toksik etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Bouillaguet ve ark. 1996; Hanks ve ark. 1996).

İn vivo koşulları taklit etmek amacıyla materyal ve hücreler arasına bir bariyer konularak da değerlendirme yapılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pulpa odasını taklit eden cihazların kullanımı yaygınlaşmıstır. Biz de, Osaka Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi'nde yaptığımız ön çalışmalarda Dr. Satoshi Imazato'nun katkılarıyla planladığımız basit bir düzenekle, arada dentin diskinin bulunduğu koşulda bağlayıcı sistemlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledik. Restoratif materyallerin hücreler üzerine etkisinin, araya dentin bariyer konularak incelendiği çalışmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır.

Tyas (1977); Meryon ve Jakeman (1986); Wataha ve ark. (1994)' nın yaptıkları çalışmalarda kullanılan hücreler pulpa odasını taklit eden düzeneğin tabanında inkübe

olmuşlar, materyalden çıkan elementlerde aradaki bariyerden diffüze olarak ortama girmişler ve hücreler üzerinde etki göstermişlerdir.

About ve ark. (2005) pulpa odasını taklit eden bir cihaz kullanarak yaptıkları çalışmalarında, 0.7mm kalınlığında dentin disklerini kullanmışlar ve dilüe edilmemiş bağlayıcı sistemlerle, %50 ve %20 oranında dilüe edilmiş sistemlerin sitotoksik etkilerinin bulunduğunu, %10 ve %1'lik dilüsyonlarda ise sitotoksik etkinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Imazato ve ark. (2000), %1, %2 ve %5'lik primer solusyonlarına metakriloloksidodesilpridinyum (MDPB) ilave ederek pulpa odası şartlarını taklit eden basit bir düzenek ile 0.5mm kalınlığında dentin disklerini kullanarak sitotoksisiteyi inceledikleri çalışmalarında HEMA' nın dentin disklerinden diffüze olarak sitotoksik etkiye neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Bouillaguet ve ark. (1998) yaptıkları bir çalışmada 0.5mm kalınlığındaki dentin disklerini bariyer olarak kullanarak bağlayıcı sistemlerin sitotoksisitelerini incelemişler ve kontrol edilen örneklerde en yüksek sitotoksik etkinin 24 saat sonunda görüldüğünü bulmuşlardır.

Galler ve ark. (2005), 0.1mm ile 0.5mm arasında değişen kalınlıklarda dentin disklerini bariyer olarak kullanarak farklı bonding sistemlerin sitotoksisitelerini inceledikleri çalışmalarında, 24 saat sonunda farklı kalınlıklardaki diskler arasında bir farklılık bulamamışlar ve çalışmadaki bonding sistemlerin tüm kalınlıklarda sitotoksik etki gösterdiğini, ayrıca dentin diskinin kalınlığı arttıkça sitotoksik etkinin azaldığını bildirmişlerdir.

Hamid ve Hume (1997) dentin kalınlığının rezin monomerlerin difüzyonlarına olan etkisini inceldikleri çalışmalarında, 0.4–3.6mm arasında farklı kalınlıklarda dentin üzerinden 2 farklı bağlayıcı ajan uygulayarak 24 saat sonunda pulpa tarafında

komponentlere rastlamışlar ve azalan dentin kalınlığına bağlı olarak dentin yoluyla difüzyonun da fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Vajrabhaya ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada, test edilen self-etch sistemleri dentin diskleri üzerinden uygulayarak L 929 hücreleri üzerindeki etkiye bakmışlar ve 0.5mm lik kalınlıkta kullandıkları self-etch sistemlerin sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda materyallerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri, 24 saat sonraki incelemeye göre değerlendirilmiştir. Dentin diskleri üzerinden uygulanan tüm adeziv sistemler, L 929 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Dentin disklerinin kalınlığı 0.5mm'den 1.5mm'ye arttıkça tüm materyallerin sitotoksik etkileri azalmaktadır. Bağlayıcı sistemler, 1.5mm'lik diskler üzerine uygulandığı zaman hücrelerde daha az sitotoksik etki görülmüş fakat aradaki dentin bariyer, hücreler için yeterli korumayı sağlayamamış ve belirli yüzdelerde hücre ölümü görülmüştür.

Sitotoksisitenin kalınlıkla ilişkisi, bu etkiyi gösteren materyallerin dentinden diffüze olabilme yetenekleriyle ilişkilidir. Dentinin en önemli yapılarından biri olan tübüller, odontoblast hücrelerinin uzantısı ile oluşmuştur, pulpa odasından mine-dentin birleşim noktasına kadar uzanırlar ve dentin boyunca sıvı difüzyonunun gerçekleştiği en önemli yol olarak tanımlanabilirler. Tübüller, pulpa odasına doğru birbirlerine yaklaşırlar ve bu yüzden tübül yoğunluğu ve oriyentasyonu bölgeden bölgeye değişir. Tübül sayısı, mine-dentin sınırında en az iken pulpa odası sınırında en fazladır. Aynı zamanda tübül çapları, pulpaya yaklaştıkça artış göstermektedir. Sonuç olarak, pulpa yakınındaki dentinde, kalan dentin kalınlığı ile ters orantılı olarak geçirgenlik artmış olmakta ve monomer komponentleri, bu geniş çaplı ve çok sayıdaki tübülden daha kısa bir yol katederek hızla pulpaya ulaşabilmektedir.

Çalışmamızda 1.5mm'lik disklerde, monomerlerin tübüller içinden geçerken yan dallara da girdiğini ve pulpaya ulaşana kadar kanallar içinde kat ettiği uzun mesafede tutulduğu da söylenebilir. 0.5mm'lik dentin diskleri, pulpaya daha yakın olan bölgelerden elde edildiği için, materyallerin bu kalınlıktaki sitotoksik etkileri yukarıda anlatılanlar doğrultusunda da daha fazla olmuştur.

Cao ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada, direkt ve indirekt kontakt testlerini kullanarak adeziv rezinlerin L 929 hücreleri üzerindeki sitotoksik özelliklerini incelemişler ve iki test metodu sonucu elde edilen bulgular arasında paralellik tespit etmişlerdir. Her iki metod sonucunda da materyaller sitotoksik etkiye sahip olarak bulunmuştur.

Dentin bariyeri kullanarak yaptığımız sitotoksisite testi sonucunda elde edilen sonuçlar, farklı konsantrasyonlardaki bağlayıcı sistemlerin direkt kontakt yöntemi kullanarak yaptığımız sitotoksisite test sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Farklı konsantrasyonları, diğer materyallerden daha fazla sitotoksik etki gösteren Prime Bond NT/NRC, Adper Prompt ve Clearfil Tri-S Bond gibi self-etch sistemler, dentin diski arada bariyer olarak kullanıldığı zaman da aynı şekilde yüksek sitotoksik etki göstermişlerdir.

Sonuçlar yorumlanırken, insan dentinin geçirgenlik özelliğinin çeşitli faktörlere bağlı olduğu unutulmamalıdır. Tam bir standart sağlanmaya çalışılsa bile gerek deney düzeneğinden kaynaklanan gerekse hem materyallere hem de dentin disklerine bağlı olan faktörlerden dolayı sonuçlarda farklılıklar görülmüş olabilir.

Sonuç olarak;

1. Dişhekimliğinde kullandığımız bağlayıcı sistemler canlı dokular üzerinde sitotoksik etkilere sahiptirler. Sitotoksik etkileri, kullanılan konsantrasyonlarına, canlı dokuyla temas şekline ve süresine, içerdikleri yapıların cinsine ve birbirleriyle olan etkileşimlerine bağlıdır.

2. Materyal ile canlı doku arasında bir bariyer bulunduğunda ki diş dokuları için bu bariyer dentindir, sitotoksik etki yine görülmektedir. Dentin tübüllerinden geçerek, canlı dokuya ulaşan materyal komponentleri, sitotoksik etkiler meydana getirebilmektedir. Bariyerin kalınlığı arttıkça görülen sitotoksik etki de azalmaktadır.

Burada minimal invaziv tedavilerin önemi bir kez daha karşımıza çıkmaktadır. Hekim, kavite preparasyonu sırasında sağlam dentini ne kadar çok koruyacak olursa kullanılan materyallerin canlı dokular için o kadar az sitotoksik olacağı unutulmamalıdır.

Yeni geliştirilen materyaller, hekimler tarafından kullanılmadan önce diğer özelliklerinin yanında biyouyumlulukları da çeşitli testlerle incelenmeli ve rutin kullanıma daha sonra sunulmalıdır. Günümüzde hızla gelişmekte olan dişhekimliğinde geliştirilmiş mekanik ve fiziksel özellikler yanında doku dostu biyomateryallerin kullanılmasıyla restorasyonun estetiğinin ve dayanıklılığının yanında dişin uzun ömürlülüğü de sağlanacaktır.

6. ÖZET

S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitiüsü

Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2006

MAHMUT KUŞDEMİR

Farklı Dentin Bağlayıcı Ajanların Dentin Bariyer Testi Kullanılarak L 929 Hücreleri Üzerine Sitotoksisitelerinin İncelenmesi

Dişhekimliği teknolojisindeki gelişmeler ile hergeçen gün artan sayıda materyal klinisyenlerin kullanımına sunulmaktadır. Bu materyaller, estetik, dayanıklılık gibi kriterlerin yanında diş dokularıyla biyouyumluluk gibi çok önem taşıyan bir özelliğe de sahip olmalıdır. Hastaların sağlıklı dişlere sahip olma isteklerini yerine getirmeye çalışırken kullanılan malzemelerin diş dokularına zararlı etkilerinin olmaması da gerekmektedir. Piyasaya yeni sunulan materyallerin biyouyumluluk değerlendirmelerinin üretim safhasından hemen sonra yapılmasıyla daha doku dostu materyallerin kullanılması sağlanacaktır.

Bu çalışmanın amacı, güncel self-etch adeziv sistemlerin farklı oranlarda dilüe edilerek ve farklı kalınlıklarda hazırlanan dentin diski yüzeylerine uygulanarak, disklerin altında bulunan L 929 hücreleri üzerinde meydana getirdikleri olası sitotoksik etkileri MTT test yöntemi ile incelemektir.

Çalışmada, 0.5 ve 1.5mm kalınlıklarında dentin diskleri elde edebilmek için 336 adet çürüksüz insan 3.molar dişi kullanıldı. Dişlerin okluzal mine kısımları dişin uzun aksına dik olacak şekilde düşük hızda çalışan elmas bir separe ile su soğutması altında uzaklaştırıldı ve #600 grit zımpara kağıdı ile aşındırılarak dentin kalınlığının orta üçlüsünden 3x3mm büyüklüğünde 0.5 ve 1.5mm kalınlıklarda, düz yüzeye sahip dentin diskleri elde edildi.

Hücre kültürü işlemlerinde kullanılan 48 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğundan polisiloksan yapıda ölçü maddesi kullanılarak ölçü alındı ve kullanılacak dentin diski sayısı kadar düzenek yapıldı. Bu düzenek, kuyucuğun üst kısmını kapatacak ve içine boyutları 3x3mm olan diskin yerleştirilip hücrelerle direkt temas içinde olabileceği şekildeydi. Dentin diski ve yerleşeceği alan arasında daha sıkı ve sızdırmaz bir örtücülük sağlanması amacıyla, alan 2.8x2.8mm boyutlarında hazırlandı. Her grupta sitotoksisite testi 2 kez tekrarlanacağı için diskler rastgele 7 gruba ayrılarak (n=48) kullanılacağı zamana kadar serum fizyolojik içinde bekletildi.

Hücre kültürü işlemlerinden sonra, hücreler deney için kullanılacak duruma geldiği zaman, önce %50-20-10-1'lik şekilde dilüe edilmiş ve +4°C'de saklanmakta olan 6 adet bağlayıcı sistem (Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Clearfil Tri-S Bond, Reactmer Bond, Adper Prompt, Prime Bond NT/NRC) ve kontrol grubu olarak kullanılan taze ortam sıvısı.direkt temas metodu kullanılarak her kuyucuğunda $5x10^4$ hücre/well bulunan 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına kondu (n=24).

Dentin bariyer testinin kullanıldığı bölümde ise önceden 7 gruba ayrılmış olan diskler (n=48) grup içinde rastgele şekilde 2 alt gruba ayrılarak düzeneklere yerleştirildi. Gerekli sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra her kuyucuğunda $5x10^4$ hücre/well bulunan kaplara, disklerin önceden asit uygulanmış pulpal yüzeyleri hücrelerle direkt temas halinde olacağı şekilde düzenekler yerleştirildi. Üretici firma talimatları doğrultusunda bağlayıcı ajanlar uygulandı. Kontrol grubu olarak, dentin diski tek başına kullanıldı.

Her iki testte de 24 saat süren inkübasyon süresinden sonra sitotoksisite değerlendirilmesi için MTT testi kullanıldı. Optik yoğunluk değerlendirilmesi 570nm dalga boyunda yapıldı. İstatistiksel analizlerde tek yönlü ANOVA testi, Tukey HSD testi kullanıldı.

MTT testi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerlendirmelerine göre; farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bağlayıcı sistemlerin sitotoksik incelemelerinde tüm konsantrasyonlar sitotoksik etkiye sahip bulundu. %50'lik konsantrasyonda, Clearfil SE Bond ve Protect Bond diğer gruplardan daha az sitotoksik etki gösterirken ($p<0.05$), en fazla sitotoksik etkiyi gösteren Adper Prompt ile Prime Bond NT/NRC ve Clearfil Tri-S arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($p>0.05$). %20'lik konsantrasyonda, Protect Bond en düşük sitotoksik etkiyi gösterirken ($p>0.05$), %10'luk konsantrasyonda, Clearfil SE Bond istatistiksel olarak en az sitotoksik etkiye sahip olarak bulundu ($p<0.05$). Protect Bond, Clearfil SE Bond' dan daha fazla, diğer gruplardan daha az sitotoksik bulunurken ($p<0.05$). %1'lik konsantrasyonda, Clearfil SE Bond en az sitotoksik etkiye sahip olarak bulunurken ($p<0.05$) Prime Bond NT/NRC en fazla sitotoksik etkili bağlayıcı sistem oldu.

Farklı kalınlıklarda dentin disklerinin bariyer olarak kullanıldığı çalışmada ise kalınlığı 0.5mm olan dentin diski kullanılan grupta tüm materyallerin sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlendi ($p<0.05$). Clearfil SE Bond ve Protect Bond diğer gruplardan daha az sitotoksik etki gösterdiler ($p<0.05$). Kalınlığı 1.5mm olan dentin diskinin kullanıldığı grupta, Clearfil SE Bond en az sitotoksik etkiye sahip materyal olarak tespit edildi.

Sonuç olarak; materyallerin dilüe edilmeleri sitotoksik etkilerinin de azalmasına neden olmaktadır. Materyallerin içeriğindeki monomerlerin cinsi ve diğer moleküllerle etkileşimleri de sitotoksik özelliklerinde etkilidir. Bis-GMA, UDMA, HEMA, PENTA gibi monomerler yapılan çalışmalarda toksik etkiye sahip olarak bulunmuştur. Materyal ile hücreler arasında bariyer bulunsa bile monomerler dentin tübüllerinden difüzyon yoluyla geçerek sitotoksik etki meydana getirebilmektedirler. Ancak, dentin kalınlığı arttıkça, materyallerin sitotoksisitelerinde de azalma olmakta ancak tamamen ortadan kalkmamaktadır.

7. SUMMARY

The Evaluation of Cytotoxic Effects of Different Dentin Bonding Systems on L 929 Cells with Dentin Barrier Test

As a result of development in the dental technology, there are so many materials in the market and used by the practioners. Besides their aesthetic and durability, these materials must be biocompatible to dental tissues. Materials used for assuming the patient demands to have a healty oral environment should not have detrimental effects to tooth structures. Before introduction of new materials to the market by the biocompatibility evaluation made after the production stage, the usage of more tissue friendly materials will be provided.

The aim of this study was to evaluate the possible cytotoxic effects of currently used dentin bonding systems, in different dilutions and also when applied to dentin surface which is used as a barrier, on the underlying mouse fibroblast cells with MTT assay.

336 extracted, non-carious, human molar teeth were used for preparing the 0.5mm and 1.5mm thick dentin discs. The occlusal third of teeth crowns were removed perpendicular to their long axis by a low speed diamond saw under water coolant and at 3x3mm size flat dentin surfaces were prepared at the middle third dentin thickness by grinding the surfaces using #600 grid SiC paper. With a hydrophilic vynil polysiloxane imression material, number of lids that fit the 48 well plate every single well were made. In the centre of the lid, there was a place 2.8x2.8mm size in which the dentin disc will be placed and make a contact with the cells. The size of the place was smaller than the dentin disc in order to get a more tight and leakproof seal. Because the experiment was performed twice, dentin discs were randomly divided in to 7 groups (n=48) and kept in saline till the time of experiments begin.

After cell culture procedure, when the cells are ready for experiment, different dilutions of the bonding systems (Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Clearfil Tri-S Bond, Reactmer Bond, Adper Prompt, Prime Bond NT/NRC) and the fresh medium as the control group were placed to the 48 well plate in which $5x10^4$ cell/well is ready for the direct contact test (n=24).

For dentin barrier test, the previously divided discs were randomly divided again into 2 subgroups and placed to the lids. After autoclaving procedure, the lids were placed to each well which are containing $5x10^4$ cell/well. Dentin bondings were applied according the manufacturers. As control group, dentin discs without dentin bonding were used.

After 24 hours incubation period, cytotoxicity is assesed by MTT assay. Optical density (OD) evaluation was measured at 570nm. Statistical analysis was performed applying a one way ANOVA test and Tukey HSD test.

According to the OD values; all different dilutions of dentin bonding systems have cytotoxic effects ($p<0.05$). In 50% diluted group, while Clearfil SE Bond and Protect Bond had significantly lower cytotoxic effects than the other groups ($p<0.05$), there were no statistically significant difference among the other three groups but Adper Prompt was the most cytotoxic system to the cells ($p>0.05$). In the 20% diluted group, Protect Bond was the least cytotoxic system. In the 10% diluted group, Clearfil SE Bond was the least cytotoxic bonding system ($p<0.05$). In the 1% diluted group, Clearfil SE Bond was the least cytotoxic bonding system ($p<0.05$).

According to the OD values; all dentin bonding systems applied to the 0.5mm thick dentin discs have cytotoxic effects ($p<0.05$). Clearfil SE Bond and Protect Bond were lower cytotoxic effects than the other groups ($p<0.05$) but showed no statistically significant difference between each other ($p>0.05$). Clearfil SE Bond was the least cytotoxic bonding system among all groups applied to 1.5mm thick dentin disc ($p<0.05$).

As a result, the lower the percentage of dilution the lower the cytotoxic effect was found. The monomer type and the interactions between these monomers are found important in the cytotoxic effects. Even in the presence of a barrier between the material and cells, monomers can diffuse through the dentinal tübüles and effect the cells. But, when the dentin thickness increase the harmful effect is decreased.

8. KAYNAKLAR

Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F (2002) *An evaluation of accelerated portland cement as a restorative material,* Biomaterials, 23, 4001–4010.

About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler W, Franquin JC (2005) *Polymerized bonding agents and the differantiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells,* Dent Mater, 21, 156–163.

Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spangberg LSW (1993) *Reduced cytotoxicity at a root canal sealer through eugenal substitution,* J Endod, 19, 554–557.

Aydıntuğ YS (2003) *Hücre Kültürü ve dişhekimliğindeki uygulamaları,* Doktora Semineri, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Bath-Balogh M & Fehrenbach M (1997) *Illustrated dental embryology, histology and anatomy,* WB Saunders Company, 1st Edition.

Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE (2006) *Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts,* Dent Mater, 22, 630–640.

Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J (1996) *In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA,* The American Association of Endodontics, 22(5), 244-248.

Bouillaguet S, Virtiliggo M, Wataha J, Ciucchi B (1998) *The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro*, J Oral Rehabil, 25; 45–51.

Buonocore MG (1955) *A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces,* J Dent Res, 34, 849–853.

Butler WT (1995) *The Nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins,* Int J Dev Biol, 39, 169–179.

Camps J, Tardieu C, Dejou J, Franquin JC, Ladaique P, Rieu R (1997) *In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure,* Dent Mater,13, 34–42.

Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML (2005) *Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins,* Journal of Applied Toxicology, 25, 101–108.

Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH (1996) *In vitro study on the dimensional changes of human dentine after demineralization,* Arch Oral Biol, 41, 369–377.

Chappell RP, Cobb CM, Spencer P, Eick JD (1994) *Dentinal tubule anastomosis, A potential factor in adhesive bonding?,* J Prosthet Dent, 72, 183-188.

Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP (2003) *Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells,* J Dent, 31; 223–229.

Dayangaç B (2000) *Bonding Sistemleri " Kompozit Rezin Restorasyonlar"* 21–38, Güneş Kitabevi Ltd Sti, Ankara.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B (2005) *A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and Results*, J Dent Res, 84, 118- 132.

Fosse G, Saele P, Eide R (1992) *Numerical density and distrubutional pattern of dentin tübüles.* Acta Odontol Scand, 50, 201–210.

Freshney RI (1994) *Culture of animal cells, a manual basic technique,* 3rd edn. New York, Wiley-Liss.

Garberoglio R & Brannstrom M (1976) *Scanning electron microscopic investigation of human dentin tübüles,* Arch Oral Biol, 21, 355–362.

Gaynour BGS, Sletten G, Dahl JE (1999) *Cytotoxic effects of extracts of compomers,* Acta Odontol Scand, 57, 316–322.

Gerzina TM & Hume WR (1994) *Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro,* J Oral Rehabil, 21, 463–468.

Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998) *Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures,* J Biomed Res, 41, 474–480.

Geurtsen W, Spahl W, Müler K, Leyhausen G (1999) *Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals,* J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 48, 772–777.

Gordan V, Vargas M, Cobb D, Denehy G (1997) *Evaluation of adhesive systems using acidic primers,* Am J Dent, 10, 219–223.

Hamid A & Hume WR (1997) *The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro,* J Oral Rehabil, 24, 20–25.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) *Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts,* J Dent Res 70(11), 1450–1455.

Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC (1994) *Permeability of biological and synthetic molecules through dentin.* J Oral Rehabil, 21, 475–487.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996) *In vitro models of biocompatibility: A review,* Dent Mater, 12, 186–193.

Hansen S, Swift EJ, Krell KV (1992) *Permeability effects of two dentin adhesive systems.* J Esthet Dent, 4, 169–171.

Harrison MA & Rae IF (1997) *General techniques of cell culture,* Cambridge University Pres, UK.

Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J (1999) *In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems,* Journal of Endodontics, 25(2), 88–92.

Huang FM & Chang YC (2002) *Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro,* Int End J, 35, 905–909.

Hume WR (1985) *A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures,* J Dent Res, 64(11), 1323–1325.

Ikemura K, Kouro Y, Endo T (1996) *Effect of 4-acryloxyethyltrimellitic acid in a self-etching primer on bonding to ground dentin,* Dent Mater, 15(2), 132–143.

Inoue S, Van Meerbeek B, Vargas M, Lambrechts P, Vanherle G (2000) *Adhesion mechanism of self-etching adhesives,* 3th International Kuraray Symposium Proceeding Book, 131–148.

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ (2003) *Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro,* Dent Mater, 20, 12–20.

ISO 10993–5 (1993) *Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods*, International Organization for Standartization, Geneva.

Jacobson T & Soderholm KJ (1995) *Some effects of water on dentin bonding,* Dent Mater, 11, 132–136.

Kanca J (1991) *A method for bonding to tooth structure using phosphoric acid as a dentin enamel etchant,* Quint Int, 22(4), 285.

Koliniotou-Koubia E, Dionyspoulos P, Koulaouzidou EA, Korstaris AH, Papadogiannis Y (2001) *In vitro cytotoxicity of six dentin bonding agents,* J Oral Rehabil, 28, 971–975.

Kugel G & Ferrari M (2000) *The science of bonding: From first to sixth generation,* JADA, 131, 20–25

LeGeros RZ (1991) *Calcium phosphates in oral biology and medicine, vol 15.* In: Myers HM (ED). Momographs in Oral Sciences, New York: Karger; 109–111.

Lin A, McIntyre NS, Davidson RD (1992) *Studies on the adhesion of glass-ionomer cements to dentin,* J Dent Res, 71(11), 1836–1841.

Linden LA, Kallskog O, Wolgast M (1995) *Human dentine as a hydrogel,* Arch Oral Biol, 40, 991–1004.

Lönnroth EG & Dahl JE (2001) *Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using MTT and neutral red tests,* Acta Odontol Scand, 59, 34–39.

Lönnroth EG & Dahl JE (2003) *Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using MTT and neutral red tests,* Acta Odontol Scand, 61, 52–56.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M (1997) *The dentin substrate: structure and properties related to bonding,* J Dent, 25, 441–458.

Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH (1996) *The effects of acetone, ethanol, HEMA and air on the stiffness of human decalfied dentin matrix.* J Dent Res, 75 (11), 1851–1858.

Mjör IA (1978) *Biologic assesment of restorative dental materials: Interrelationship of biologic and technologic properties,* Oper Dent, 3, 9–13.

Mjör IA & Nordhal I (1995) *The density and branching of dentinal tübüles in human teeth,* Arch Oral Biol, 41, 401–412.

Moszner N, Salz U, Zimmermann J (2005) *Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: A systematic review,* Dent Mater, 21, 895–910.

Moule AJ, Li H, Bartold PM (1995) *Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts,* Aust Dent J, 40, 110–114.

Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ (2000) *Tooth slice organ culture for cytotoxicity assesment of dental materials,* Biomaterials, 21, 1711–1721.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E (1982) *The promotion of adhesion by the filtration of monomers into tooth substrates,* J Biomed Mater Res, 16, 265–273.

Nakabayashi N (1992) *Adhesive bonding with 4-META,* Oper Dent 1992, 17, 125–130.

Nakabayashi N & Takarada K (1992) *Effect of HEMA on bonding to dentin,* Dent Mater, 8, 125–130.

Nakabayashi N, Watanabe A, Iketa W (1995) *Intra-oral bonding of 4-META/MMB-TBB resin to vital human dentin,* Am J Dent, 8, 37–42

Nakabayashi N & Saimi Y (1996) *Bonding to intact dentin,* J Dent Res, 75, 1706–1715.

Nakabayashi N & Pashley DH (1998) *Hybridization of dental hard tissues,* Tokyo Quintessence Publishing Co, Ltd, Tokyo.

Nassiri MR, Hanks CT, Cameron MJ, Strawn SE, Craig RG (1991) *Applicaiton of low cytometry to determine the cytotoxicit of UDMA in human cells,* J Biomed Mater Res, 28, 153–158.

Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH (1974) *A versatile split-chamber device for studying dentin permeability,* J Dent Res, 53(6), 1503.

Ozawa M, Ikeda H, Suda H (2002) *The effect of pulpward pressure on the response to % 50 lidocaine applied to exposed dentine in cats.* Arch Oral Biol, 47, 333–336.

Pashley DH (1989) *Dentin Permeability: Theory and Practic,* Experimental Endodontics, Boca Raton: CRC Pres, 19–49.

Pashley DH (1991) *The clinical correlations of dentin structure and function.* J Prosthet Dent, 66, 777–781.

Pashley DH (1996) *Dynamics of the pulp-dentin complex,* Crit Rev Oral Biol Med, 7, 104–133.

Pashley DH & Carvalho RM (1997) *Dentine permeability and dentine adhesion,* J Dent, 25(5), 355–372.

Peumans M, Kanumili P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B (2005) *Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials,* Dent Mater, 21, 864–881.

Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D (1994) *Cell Culture Methods for Testing Biocompatibility,* Clin Mater, 15(3), 173-190.

Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O' Sullivan MI (2002) *In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer,* Int End J, 35, 47–55.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) *Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on Mouse fibroblasts,* J Dent Res, 74, 1602–1606.

Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Mathews WG, Pashley DH (1995a) *Nanoleakage: Leakage within the hybrid layer,* Oper Dent, 20, 18–25.

Sano H & Yoshiyama M (1995b) *Comperative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer,* Oper Dent, 20, 160–167.

Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML (2005) *Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assesment of dental materials*, Toxicology in vitro, 19, 145–154.

Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P (1998) *Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements,* Dent Mater, 14, 429–440.

Schmalz G (1981) *Toxicity tests on dental filling materials,* Int Dent J, 31, 185–192.

Schmalz G (1988) *Agar Overlay method,* Int End J, 21, 59–66.

Schmalz G (1994) *"Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations",* J Dent, 22, 6–11.

Schmalz G, Schweikl H, Eibl M (1994) *Growth kinetics of fibroblastss on bovine dentine,* J Endod, 20,453–456.

Schmalz G (1997) *Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials,* Clin Oral Investig, Dec,1(4), 154–162.

Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S (2001) *Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells*, J Endod, 27, 96–102.

Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K (2001) *Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions,* J Endod, 27, 23–30.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H (2002) *Cytotoxicity of low pH dentin bonding agents in a dentin barrier test in vitro*, J Endod, 28, 188–192.

Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzi C (2001) *Cytotoxicity testing with three dimensional cultures of transfected pulp-derived cells*, J Endod, 27, 259–265.

Schweikl H, Spagnulo G, Schmalz G (2006) *Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers,* J Dent Res, 82(10), 870–877.

Scott MF, Bentley CM, Marshall CT (1999) *Setting up a new cell culture laboratory. In Animal cell biotechnology,* Humana Pres, Eli Lilly Inc. Indianapolis, IN, USA.

Selden JK, Cames DL, MacDougall M (1997) *Evaluation of immortalized clonal mouse odontoblasts and dental pulp cell lines for in vitro biocompatibility testing (abstract),* J Dent Res, 76, 156.

Sengun A, Buyukbas S, Hakkı SS (2006) *Cytotoxic effects of dental desentizers on huamn gingival fibroblast,* J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 78(B), 131–137.

Sjögren G, Sletten G, Dahl JE (2000) *Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramic assessed by Millipore fitler, agar overlay and MTT tests*, J Prosthet Dent, 84, 229–236.

Sletten GBG & Dahl JE (1999) *Cytotoxic effects of extracts of compomers,* Acta Odontol Scand, 57, 316–322.

Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S (2004) *Cytotoxicity and oxidative stres caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights*, Clin Oral Invest, 8, 81–85.

Spahl W, Budzikiewics H, Geurtsen W (1998) *Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectometry,* J Dent, 26, 137–146.

Spangberg LSW (1978) *Correlation of in vivo and in vitro screening tests,* J Endod, 4, 296–299.

Spangberg LSW (1990) *The study of biological properties of endodontic biomaterials,* Experimental Endodontics, Boca Raton, FL, CRC Press.

Swift EJ Jr & Bayne SC (1997) *Shear bond strength of a new one-bottle dentin adhesive,* Am J Dent, 10, 184–188.

Szep S, Kunkel A, Range K, Heidemann D (2002) *Cytotoxicity of modern dentin adhesives-in vitro testing on gingival fibroblasts*, J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 63, 53–60.

Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY (1996a) *Micromorphological spectrum from overdrying to owerwetting acid-conditioned dentin in water-free, acetone based, single bottle primer/adhesives,* Dent Mater, 12, 236–244.

Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY (1996b) *Resin permeation into acid conditioned, moist and dry dentin: A paradigm using water-free adhesive primers,* J Dent Res, 75(4), 1034–1044.

Tay FR & Pashley DH (2001) *Aggressiveness of contemporary self-etching systems-I: Depth of penetration beyond dentin smear layers,* Dent Mater, 17, 296–308.

Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagorun A (2002) *Single-step adhesives are semipermeable membranes,* J Dent, 30(7–8), 371–382.

Teixeria HM, Do Nascimento ABL, Hebling J, de Souza Costa CA (2006) *In vivo evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents,* J Oral Rehabil, 33, 542–550.

Ten Cate A.R (1994) *Oral Histology: Development, Structure and Function,* 4th edn, Mosby, St Louis

Toida T & Nakabayashi N (1997) *Adhesion to shrunken demineralized dentin- Effects of methacrylates with hydrophilic anf hydrophobic groups dissolved in primers on recovery of shrunken demineralized dentin,* J Jpn Dent Mater, 16, 232–238.

Tyas MJ (1977) *A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials,* J Dent Res, 56(10), 1285–1290.

Vajrabhaya L, Passauk A, Harnirattisai C (2003) *Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents*, Oper Dent, 28, 440–444.

van Wyk CW, Oliver A, Maritz JS (2001) *Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing?,* J Oral Pathol Med, 30, 168-177.

Vongsavan N, Matthews RW, Matthews B (2000) *The permeability of human dentine in vitro and in vivo*, Arch Oral Biol, 45, 931–935.

Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G (1992) *Morphological aspects of the resin-dentin inter-diffusion zone with different dentin adhesive systems,* J Dent Res, 71, 1530–1540.

Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrecths P, Vanherle G (1993) *Comperative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone,* J Dent Res, 72, 495–501.

Van Meerbeek B, Peumans M, Verschueren M, Gladys S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G (1994) *Clinical status of ten dentine adhesives,* J Dent Res, 73(11), 1690–1702.

Van Meerbeek B, Conn LJ, Duke ES, Eick JD (1996) *Correlative Transmission electron microscopy examination of nondemineralized and mineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems,* J Dent Res, 75, 879–888.

Van Meerbeek B, Perdiago J, Lambrechts P, Vanherle G (1998) *The clinical performances of adhesives,* J Dent, 26(1), 1–20.

Van Meerbeek B, Inoue S, Perdigao J, Lambrechts P and Vanherle G (2001a) *Enamel and dentin adesion* In 'Fundamentals of operative dentistry' Ed. by EM Solaro, 141–186, Quintessence Pub Co Inc ıllınois, USA.

Van Meerbeek B, Vargas S, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, Vanherle G (2001b) *Adhesives and cements to promote preservation dentistry,* Oper Dent, Supplement 6, 119–144.

Van Meerbeek B, Munck DJ, Yoshida Y, Inoue et all (2003) *Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges.* Oper Dent 28, 215–35.

Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC (1994) *Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials,* J Oral Rehabil, 21, 453–462.

Wataha JC (2001) *Principles of biocompatibility for dental practioners,* J Prosth Dent, 86, 203–209.

Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Nada M (2003) *In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials*, Dent Mater, 19, 25–31.

Watanabe I, Saimi Y, Nakabayashi N (1994) *Effect of smear layer on bonding to ground dentin- Relationship between grinding condition and tensile bond strength.* J Jpn Dent Mater, 13, 101–108.

Wise C (2002) *Epithelial Cell Culture Protocols in Methods in Molecular Biology, Volume 188,* Humana Press Inc, New Jersey, USA

Wolf JB (2004) *Tissue Culture Methods,* Web Sayfası, İnternet Adresi: http://www.research.umcb.edu/jwolf/method5.htm

Yaka E, Eğrilmez MY, Keskinoğlu P, Çavdar Z, Genç Ş, Genç K, İyilikçi L, Yener GG (2006) *Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı canlılığı üzerinde in vitro etkisinin değerlendirilmesi,* Türk Geriatri Dergisi, 9(1), 1–9.

Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, Vanherle G, Wakasa K (2000) *Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces,* J Dent Res, 79(2), 709–714.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B (2004) *Comperative study on adhesive performance of functional monomers,* J Dent Res, 83(6), 454–458.

Yoshii E (1996) *Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity,* J Biomed Mater Res, 37, 517–524.

9. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini Mersin' de Özel Toros Okulları' nda tamamladı. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesini kazandı ve 2000 yılında mezun oldu. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı' nda doktora eğitimine başladı. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.

10. TEŞEKKÜR

Tüm eğitim hayatım boyunca bugünlere gelebilmem için her konuda tam desteklerini yanımda hissettiğim çok sevgili aileme; yurtdışında ön çalışma yapmamda büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Füsun ÖZER'e; tezimin hazırlanması esnasında ve hücre kültürü uygulama tekniklerini öğrenmemde yardımlarını esirgemeyen, Osaka Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr Satoshi IMAZATO'ya, tezimin hazırlanmasında bana destek olan çok değerli bölüm hocalarım Doç.Dr Abdulkadir Şengün ve Doç.Dr Nimet Ünlü'ye, konu hakkındaki bilgilerini benimle paylaşan Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Sema HAKKI'ya, istatistik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Aşır GENÇ ve tezimin yapımı ve yazımı esnasında, üstlendiğim görevlerde bana müsamaha gösteren ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma en içten duygularımla teşekkür ederim.