

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

DOKTORA TEZİ

**FARKLI DENTİN BAĞLAYICI SİSTEMLERİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

SAFA TUNCER

**DANIŞMAN
PROF.DR. MUSTAFA DEMİRCİ**

**DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANABİLİM DALI
KONSERVATİF DİŞ TEDAVİSİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

02 / 03 / 2010


Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (Vekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Diş Hastalıkları ve Tedavisi
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Dt.Safa TUNCER
Tez Başlığı : Farklı Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Sitotoksik Etkileri
Sınav Yeri : İ.Ü.Dişhekimliği Fakültesi
Sınav Tarihi : 26 / Şubat / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Mustafa DEMİRCİ / İ.Ü.Dişhekimliği Fakültesi / DişHastalıkları ve Tedavisi A.B.Dalı Öğretim Üyesi (Danışman)
- 2.Prof.Dr.Taner YÜCEL / İ.Ü.Dişhekimliği Fakültesi / Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Başkanı
- 3.Prof.Dr.Ayhan BİLİR / (İ.Ü.Tıp Fakültesi/ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi)
- 4.Prof.Dr.Berna TARIM /İ.Ü.Dişhekimliği Fakültesi / Diş Hastalıkları ve Tedavisi Öğretim Üyesi
- 5.Prof.Dr.Funda YANIKOĞLU /M.Ü.Dişhekimliği Fakültesi / Diş Hastalıkları ve Tedavisi A.B.Dalı Öğretim Üyesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SAFA TUNCER

İTHAF

Canım anneme ve babama ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım sırasında bilgileri ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Demirci'ye, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Taner Yücel'e ve tüm diğer hocalarıma,

İ.Ü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'e ve değerli asistanı Dr. Mine Ergüven'e

Tez çalışmam boyunca her an yanımda olan sevgili eşim, değerli meslektaşım Aysun Kara Tuncer'e ve aileme çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3230

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XİV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİİ
ÖZET.....	XİX
ABSTRACT.....	XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Diş Dokuları	3
2.1.1. Pulpa Dentin Kompleksi	3
2.1.2. Dentinin Dokusunun Özellikleri.....	4
2.1.3. Dentinin Histolojisi	5
2.1.3.1. Dentin Kanalları	5
2.1.3.2. Peritübüler (intratubular) Dentin.....	6
2.1.3.3. İntertübüler Dentin	6
2.1.3.4. İnterglobüler Dentin	6
2.1.4. Dentin Dokusunun Geçirgenliği	7
2.1.5. Pulpa.....	9
2.2. Dental Adezyon.....	11
2.3. Adezyonun Temel Prensipleri	11
2.3.1. Dentin Bağlayıcı Sistemler (Adeziv Sistemler-Bonding Ajanlar).....	13
2.3.2. Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması	14
2.3.2.1. Bağlayıcı Sistemlerin Gelişimine Göre Yapılan Sınıflandırma	14
2.3.2.2. Dentin Bağlayıcı Sistemlerde Modern Sınıflandırma	17
2.3.2.3. Etch & Rinse Bağlayıcı Sistemler	18
2.3.2.4. Self Etch Bağlayıcı Sistemler	19

2.3.2.5. Cam İyonomer Bağlayıcı Sistemler	20
2.4. Materyallerin Biyolojik Özellikleri	21
2.4.1. Biyouyumluluk	21
2.4.2. Toksisite	22
2.4.3. Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri	23
2.4.4. İn Vitro Test Yöntemleri	25
2.4.5. Hücre Kültürü	25
2.4.6. Sitotoksite	28
2.4.6.1. a- Direkt hücre kültürü	30
b- Bariyer test metodu.....	31
2.4.6.2. Agar Difüzyon Testi	31
2.4.6.3. Milipor Filtre Difüzyon Testi.....	32
2.4.6.4. Dentin Bariyer Testi	32
2.4.7. Sitotoksite Değerlendirme Yöntemleri.....	35
2.4.7.1. Canlılık Değerlendirme Testleri:.....	35
2.4.7.2. Yaşam Değerlendirme Testleri	36
2.4.7.3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri:	36
2.4.7.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri:.....	37
2.4.8. Glutasyon Tespiti:	38
2.4.9. Apoptoz Değerlendirme Yöntemleri:.....	39
2.4.10. Mutajenite Testleri:	42
2.4.11. Östrojenite Testleri.....	43
2.4.12. Hayvan Testleri.....	43
2.4.13. Kullanım Testleri	44
2.4.14. Allerji Testleri.....	45
2.5. Dentin Bağlayıcı Sistemlerde Biyouyumluluk ve Konu ile İlgili Çalışmalar	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1. Çalışmada Kullanılan Dentin Bağlayıcı Sistemler ve Kontrol Materyalleri.....	54
3.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler ...	56
3.2.1. Cihaz ve Aletler	56
3.2.2. Kimyasal Malzemeler	58
3.2.3. Sarf Malzemeler.....	58

3.3. Akım Sitometrik (Flow Sitometrik) Anneksin-V-FITC/PI Boyamasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	58
3.3.1. Cihaz ve Aletler	58
3.3.2. Kitler	58
3.4. Sentez Fazı Uygulamasında BRDU-LI Boyamasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	59
3.4.1. Kimyasal Malzemeler	59
3.4.2. Antikor.....	59
3.4.3. Kitler	59
3.4.4. Sarf Malzemeler.....	59
3.5. İki Boyutlu (Tek Tabakalı) 3T3 Fibroblast Hücre Kültürü.....	59
3.6. Hücre Kültür İnsert Testi	60
3.7. Dentin Bariyer Testi.....	64
3.7.1. Dentin Diskinin Hazırlanması	64
3.7.2. Dentin Bariyer Test Düzeneginin Hazırlanması.....	66
3.7.3. Dentin Bariyer Test Düzenegi Örneklerinin Hazırlanması	67
3.8. Toplam Hücre Sayısı Tayini	69
3.9. İki Boyutlu Hücre kültürlerinde Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile Apoptoz Tayini.....	70
3.10. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde Bromodeoksiüridin (BrDU) İşaretleme İndeksi	70
3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Test Materyallerinin Hücre Morfolojisine Etkilerinin Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi	71
3.12. İstatistiksel Yöntem	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. Toplam Hücre Sayısı Tayini	73
4.1.1. Hücre Kültür İnsert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları	73
4.1.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları.....	73
4.1.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları.....	77
4.1.1.3. Hücre Kültürü İnsert Testinde 24 saat ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi	82
4.1.2. Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları	84

4.1.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları	84
4.1.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları	86
4.1.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 saat ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi	89
4.2. Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile Apoptoz Oranı (%) Bulguları	90
4.2.1. Hücre Kültür İnsert Testinde Apoptoz Oranı Bulguları.....	90
4.2.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları	90
4.2.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları	94
4.2.1.3. Hücre Kültürü İnsert Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Apoptoz Oranlarının Değerlendirilmesi.....	98
4.2.2. Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı Bulguları	99
4.2.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları...	99
4.2.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları.	102
4.2.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Apoptoz (%) Oranlarının Değerlendirilmesi	105
4.3. Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI) İmünohistokimyası ile Sentez Fazı Hücre Oranı Bulguları.....	106
4.3.1. Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları	106
4.3.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları.....	106
4.3.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları.....	114
4.3.1.3. Hücre Kültürü İnsert Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Hücrelerin BrDU ile İşaretlenme Oranlarının (%) Değerlendirilmesi	121
4.3.2. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları	122
4.3.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları	122
4.3.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları.....	127
4.3.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Hücrelerin BrDU ile İşaretlenme Oranlarının Değerlendirilmesi	131
4.4. Test Materyallerinin Hücre Morfolojilerine Etkilerinin Taramalı Elektron Mikroskopu ile Değerlendirilmesi.....	132
5. TARTIŞMA	142
KAYNAKLAR	163
ÖZGEÇMİŞ	179

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Kuronal dentinde mm ² deki ortalama dentin kanal dağılımı .	6
Tablo 2.2: Biyouyumluluk test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları.	24
Tablo 3.1: Çalışmamızda kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin içerikleri	55
Tablo 3.2: Çalışmamızda kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin uygulama prosedürleri	56
Tablo 4.1: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi.	73
Tablo 4.2: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin ikili hücre sayısı karşılaştırmaları.	75
Tablo 4.3: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının (*S: Anlamlı p<0.05, NS: Anlamlı değil)	77
Tablo 4.4: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi.	78
Tablo 4.5: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin ikili toplam hücre sayısı karşılaştırmaları	80
Tablo 4.6: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı p<0.05, NS:Anlamlı değil)	82
Tablo 4.7: Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi	83
Tablo 4.8: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi	84
Tablo 4.9:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayısı için ikili istatistiksel karşılaştırmaları	85
Tablo 4.10: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı p<0.05, NS:Anlamlı değil)	86
Tablo 4.11: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi	86

Tablo 4.12: Dentin bariyer kültür testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayısı için ikili karşılaştırmaları	88
Tablo 4.13: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil)	89
Tablo 4.14:Dentin bariyer kültür testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin hücre sayılarının değerlendirilmesi	89
Tablo 4.15:Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının (%) değerlendirilmesi	91
Tablo 4.16: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları.....	92
Tablo 4.17: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).....	94
Tablo 4.18:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz (%) oranlarının değerlendirilmesi	95
Tablo 4.19:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları.....	96
Tablo 4.20:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil)	98
Tablo 4.21: Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin apoptoz oranlarının değerlendirilmesi.....	98
Tablo 4.22: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz düzeylerinin değerlendirilmesi.....	100
Tablo 4.23: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları	101
Tablo 4.24: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının Mann Whitney U Test yöntemi ile karşılaştırmaları $p<0.05$ (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil) ...	102
Tablo 4.25: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz düzeylerinin değerlendirilmesi.....	102

Tablo 4.26: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları	104
Tablo 4.27: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel ikili anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).	105
Tablo 4.28:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin neden olduğu apoptoz (%) oranlarının değerlendirilmesi	105
Tablo 4.29:Hücre kültürü insert kültür testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi.....	107
Tablo 4.30: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili karşılaştırmaları	109
Tablo 4.31: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p<0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).	111
Tablo 4.32:Hücre kültürü insert kültür testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi.....	114
Tablo 4.33:Hücre kültürü insert testinde BrDU pozitif hücre oranlarının (%) 72. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları	116
Tablo 4.34: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p<0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).	118
Tablo 4.35: Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının (%) değerlendirilmesi	121
Tablo 4.36:Dentin bariyer kültür testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi.....	123
Tablo 4.37:Dentin bariyer testinde BrDU pozitif işaretlenmiş hücre oranlarının (%) 24. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları	124
Tablo 4.38: Dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p<0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).	125
Tablo 4.39:Dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi	127

Tablo 4.40: Dentin bariyer testinde BrDU pozitif işaretlenmiş hücre oranlarının (%) 72. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları	129
Tablo 4.41: Dentin bariyer kültür testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p<0.05$) ile karşılaştırmaları)	130
Tablo 4.42:Dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının (%) değerlendirilmesi.....	131

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:Modern dentin bağlayıcı sistemlerin sınıflandırılması .	17
Şekil 2.2: Split chamber cihazı	33
Şekil 2.3:Tyas'ın tasarladığı bariyer test cihazı .	33
Şekil 2.4:Dentin bariyer perfüzyon cihazı	34
Şekil 2.5:R1 (PI -, Anneksin V-) canlı hücreler, R2 (PI -, Anneksin V+) erken apoptotik hücreler, R3 (PI +, Anneksin V+) geç apoptotik veya nekrotik hücreler. R4 (PI +, Anneksin V-) hasar görmüş hücreler	41
Şekil 3.1: : Çalışmada kullanılan dentin bağlayıcı sistemler ve kontrol materyali	54
Şekil 3.2:Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan)	57
Şekil 3.3:İnkübatör (Sanyo)	57
Şekil 3.4:Ters (İnvert) mikroskop (Leitz Wetzlar)	57
Şekil 3.5:Akım Sitometri (BD FACS Calibur)	59
Şekil 3.6:Hücre kültür inserti	60
Şekil 3.7:Hücre kültür inserti polietilen tereftalat membrane	61
Şekil 3.8: Çalışmamızda kullanılan teflon kalıp	61
Şekil 3.9: Çalışmamızda kullanılan halojen ışık kaynağı (VIP, Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA)	62
Şekil 3.10: Çalışmamızda kullanılan radyometre (Hilux Ledmax Light Curing Meter, Benlioglu Dental Inc, Ankara, Turkey)	62
Şekil 3.11:Hazırlanan test materyallerinin hücre kültür insertleri içerisinde hücre kültür kaplarına uygulanması	63
Şekil 3.12:Örneklerin akrilik bloklara gömülmesi	64
Şekil 3.13:Isomet Saw; Buechler, Lake Bluff, IL, USA	65
Şekil 3.14:Dentin disklerinin elde edilmesi	65
Şekil 3.15:Dentin bariyer test düzeneği	66
Şekil 3.16:Dentin bariyer test düzeneği iç ve dış parçaları	67
Şekil 3.17:Polivinilsiloksan ölçü maddesinin dentin bariyer test düzeneği dış parçasına uygulanması	67
Şekil 3.18:Polivinilsiloksan ölçü maddesinin dentin bariyer test düzeneği dış parçasına uygulanmış hali	68
Şekil 3.19:Bariyer test düzeneklerinin hücre kültürlerine yerleştirilmesi	69

Şekil 4.1: Hücre kültürü insert testinde materyaller uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra toplam hücre sayısı değerleri	83
Şekil 4.2: Hücre kültürü dentin bariyer testinde materyaller uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra toplam hücre sayısı değerleri	90
Şekil 4.3:Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin neden olduğu apoptoz oranları	99
Şekil 4.4:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin apoptoz oranları	106
Şekil 4.5:Hücre kültür insert testinde 24. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)HEMA (orjinal büyütme x40) b)pozitif kontrol grubu (orjinal büyütme x40) Nukleusu kırmızı ile işaretli görünen hücreler BRDU-LI pozitif kabul edilmiştir ve ok (→) ile gösterilmiştir.	111
Şekil 4.6: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları bond kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE bond (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP bond (orjinal büyütme x40).	112
Şekil 4.7: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları primer kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)AdheSE primer (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond primer (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP primer (orjinal büyütme x40)	113
Şekil 4.8: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)Xeno V (orjinal büyütme x40) b)XP Bond (orjinal büyütme x40)	113
Şekil 4.9: Hücre kültür insert testinde 72. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol grubu (orjinal büyütme x40) b) HEMA (orjinal büyütme x40) Nukleusu kırmızı ile işaretli görünen hücreler BRDU-LI pozitif kabul edilmiştir ve ok (→) ile gösterilmiştir	118
Şekil 4.10: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları bond kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE bond (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP bond (orjinal büyütme x40).....	119

Şekil 4.11: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları primer kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)AdheSE primer (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond primer (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP primer (orjinal büyütme x40)	120
Şekil 4.12: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)Xeno V (orjinal büyütme x40) b)XP Bond (orjinal büyütme x40)	120
Şekil 4.13:Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranları	122
Şekil 4.14:Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol (orjinal büyütme x40) b) negatif kontrol (Vitrebond) (orjinal büyütme x10).....	125
Şekil 4.15:Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP (orjinal büyütme x40)	126
Şekil 4.16:Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)Xeno V (orjinal büyütme x40)b) XP Bond (orjinal büyütme x40).....	126
Şekil 4.17:Hücre kültür dentin bariyer testinde 72 saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol (orjinal büyütme x40) Negatif kontrol grubundan hücre görüntüsü elde edilememiştir.	130
Şekil 4.18:Hücre kültür dentin bariyer testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond (orjinal büyütme x40). Scotchbond MP ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcıların Xeno V ile XP bond'da hücre görüntüsü elde edilememiştir.	131
Şekil 4.19:Dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin BrDu pozitif işaretlenme oranları	132
Şekil 4.20: Hücre kültürü insert testi negatif kontrol SEM görüntüsü (x1000 büyütme)	134

Şekil 4.21:Hücre kültürü insert testi pozitif kontrol (HEMA) SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	134
Şekil 4.22: Hücre kültürü insert testi AdheSE bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	135
Şekil 4.23: Hücre kültürü insert testi AdheSE primer kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	135
Şekil 4.24: Hücre kültürü insert testi Protect Bond bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	136
Şekil 4.25: Hücre kültürü insert testi Protect Bond primer kısmı SEM görüntüsü (x2000 büyütme).....	136
Şekil 4.26: Hücre kültürü insert testi Scotchbond MP bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	137
Şekil 4.27: Hücre kültürü insert testi Scotchbond MP primer kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	137
Şekil 4.28: Hücre kültürü insert testi Xeno V SEM görüntüsü (x2000 büyütme).....	138
Şekil 4.29:Hücre kültürü insert testi XP Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	138
Şekil 4.30:Hücre kültürü dentin bariyer testi Vitrebond SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	139
Şekil 4.31:Hücre kültürü dentin bariyer testi AdheSE SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	139
Şekil 4.32: Hücre kültürü dentin bariyer testi Protect Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	140
Şekil 4.33: Hücre kültürü dentin bariyer testi Scotchbond MP SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	140
Şekil 4.34: Hücre kültürü dentin bariyer testi Xeno V SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	141
Şekil 4.35:Hücre kültürü dentin bariyer testi XP Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	141

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NPG-GMA	:	N-fenilglisin glisidilmetakrilatı
Bis-GMA	:	bisfenol A-glisidil metakrilat
4-META	:	4-metakriloksietil trimellitat anhidrit
BPDM	:	bifenil dimetakrilat
HEMA	:	hidroksietil metakrilat
PENTA	:	dipentaeritritol penta akrilat monofosfat
GPDM	:	gliserofosforik asit dimetakrilat
TEGDMA	:	trietilen glikoldimetakrilat
UDMA	:	üretan dimetakrilat
MDPB	:	12-methacryloyloxydodecyl-pyridinium bromide
ISO	:	Uluslararası Standardizasyon Birliği
DNA	:	deoksiribonükleik asit
RNA	:	ribonükleik asit
BrDU	:	bromodeoksiuridin
MTT	:	(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
LDH	:	laktat dehidrogenaz
GSH	:	indirgenmiş glutatyon
ROS	:	reaktif oksijen ürünleri
PI	:	propidium iyodür
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
Scotchbond MP	:	Scotchbond Multipurpose

ÖZET

Tuncer, S. Farklı Dentin Bağlayıcı Sistemlerin Sitotoksik Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diş Hastalıkları ve Tedavisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2010.

Sitotoksik olarak kabul edilen dentin bağlayıcı sistemlerden salınan bileşenlerin çeşitleri ve miktarları reçine esaslı restorasyonların biyolojik özelliklerini belirgin olarak etkilemektedir. Çalışmamızda hipotez olarak klinikte uygulanan çeşitli dentin bonding ajanların içeriklerine bağlı olarak farklı sitotoksik etki sergileyebileceklerini ileri sürmekteyiz. Bu çalışmada 5 farklı tipteki dentin bağlayıcı sistemin (Scotchbond Multi Purpose, XP Bond, Xeno V, Clearfil Protect Bond, AdheSE) 3T3 fare fibroblastları üzerindeki etkilerinin bariyer (insert) test metodu ve dentin bariyer testleri ile incelenerek olası *in vivo* sitotoksik potansiyellerinin saptanması amaçlanmıştır. Bariyer test metodunda kullanılacak dentin bağlayıcılar 5 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde teflon kalıplar içinde halojen ışık kaynağı kullanılarak polimerize edilmiştir. Hazırlanan örnekler 24 kuyucuklu içerisinde hücre kültür insertleri bulunan kültür kaplarına uygulanmıştır. İnsan 3.molar büyük azı dişlerinden hazırlanan 500 µm dentin diskleri bu çalışma için tasarlanmış paslanmaz çelik dentin bariyer test cihazlarına yerleştirilmiş ve test materyalleri dentine uygulanarak 24 kuyucuklu kaplara taşınmıştır. Bu işlemler sonrası test materyalleri 24 ve 72 saatlik sürelerde bekletilerek değerlendirilmeleri yapılmıştır. Her test materyali için deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Sitotoksik değerlendirme 4 farklı yöntemle göre yapılmıştır. Bu metotlar; toplam hücre sayısı, apoptotik hücre oranı (Anneksin-5/FITC/PI), hücre proliferasyon oranı (BrDU-LI) ve SEM ile hücre morfolojisi tespitidir. Çalışmamızda uygulanan dentin bağlayıcıların farklı değerlendirme yöntemleri ile değişen düzeyde sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımları polimerize edilerek uygulanan bonding kısımlarından genellikle daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Dentin bariyer test metodunda ise etch&rinse bağlayıcı sistemlerin self etch sistemlerden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Dentin bağlayıcı sistemler, dentin, biyouyumluluk, sitotoksikite, hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3230

ABSTRACT

TUNCER S. Cytotoxic effects of different dentin adhesives. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Operative Dentistry. Postgraduate Thesis. İstanbul. 2010.

Dentin bonding agents individually are prone to be cytotoxic, and it has been found that the type and quantity of leacheable components significantly influence the biological behaviour of the resin restorations. The hypothesis to be tested in this study was that different dentin bonding agents used in clinical dentistry have cytotoxic effects according to their ingredients. The purpose of this *in vitro* study was to evaluate the cytotoxicity of five commercially available dentin bonding agents (Scotchbond Multi Purpose, XP Bond, Xeno V, Clearfil Protect Bond, AdheSE) and to show their possible *in vivo* cytotoxic effects on 3T3 mouse fibroblasts with barrier (insert) test method and dentin barrier test. For the barrier test method, dentin bonding agents were embedded in teflon moulds measuring 5mm diameter 2mm height and light cured with quartz tungsten halogen light curing unit. Then polymerized dentin bonding discs were carried to 24 well culture plate inserts. 500 µm dentin discs, prepared from human third molar teeth, were placed into the stainless steel test device which was fabricated for this study. Then the test materials were applied on dentin discs and carried to 24 well culture plates. After these procedures cytotoxicity of test materials were examined for 24 hour and 3 days. After this procedure cytotoxicity of test materials were examined for 24 hour and 3 days. Tests were repeated three times for each test material. Four different methods were used for the evaluation of cytotoxic effects including: total cell number, for the cell proliferation rate histochemical assay for detection of BrdU incorporated into cellular DNA, for apoptosis Annexin-V-FITC/PI and SEM for the cell morphology. The used dentin adhesives has been showed different cytotoxic effects based on the evaluation method. As a conclusion it was found that primer parts of adhesive systems are more cytotoxic than the bonding parts and in dentin barrier test etch&rinse adhesive systems are more cytotoxic than self etch adhesives used in this study.

Key Words: Dentin adhesive system, dentin, biocompatibility, cytotoxicity, cell culture
The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.3230

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş hekimliğinde restorasyon işlemlerinde kullanılan materyallerdeki gelişmelerin esas amacı madde kaybına uğramış diş dokularını restore edebilecek en ideal materyali elde etmektir. Bunun sonucunda farklı içerik ve özelliklere sahip çok çeşitli materyaller üretilmiş ve klinik kullanıma sunulmuştur. Bu materyallerin çoğu uygulandıklarında yumuşak doku ve sıvılarla temas etmektedir. Böylece yeni bir materyal seçiminde, mekanik ve fiziksel özelliklerin yanında biyolojik uyumlulukta göz önüne alınmaktadır.

Dentin adeziv sistemler, kompozit reçineler ile dentin arasındaki bağlanmayı arttırmak için geliştirilen materyallerdir (1). Bu reçine materyaller, kavite duvarı ile restoratif materyal arasındaki yüzeyi hermetik olarak kapatarak mikrosızıntıyı, marjinal renklemeyi, sekonder çürükleri ve bunların sonucunda pulpa reaksiyonlarını önlerler. Dentin adeziv sistemler ayrıca diş ve restoratif materyaller üzerine gelen fonksiyonel stresleri engeller ve zayıflamış diş dokularını güçlendirirler(2). Adeziv sistemler total-etch ve self-etch olarak sınıflandırılır. Total-etch sistemler üç aşamalı ve iki aşamalı (tek şişe) olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar (1).

Dentine asit uygulanmasından sonra primer ve adeziv reçine uygulanarak aside dirençli hibrit tabaka meydana getirilir ve aynı zamanda dentin kanalları içindeki reçine uzantılarının polimerizasyonu sağlanır (3). Primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılardan ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılardan salınan monomerler ve diğer toksik bileşenler dentin kanalları aracılığı ile pulpaya ulaşarak pulpa üzerinde toksik etki gösterebilirler. Klinik durumun taklit edilebilmesi için membran filtreler, dentin talaşları veya dentin diskleri gibi hücre ile test materyali arasında bariyer görevi gören ara materyaller indirekt sitotoksite testlerinde kullanılmaktadır. Bu bariyer görevi gören materyallerden diffuse olabilen test materyallerinden çözünen bileşenler, medyuma geçerek hücreler üzerinde etkinliklerini gösterirler (4-6). Hücre kültür testlerinin duyarlı olması nedeniyle bu testler hayvan deneylerini desteklemesi açısından ilgi çeken araştırma yöntemleridir. *In vitro* bir test yöntemi olan ve özellikle klinik durumu taklit etmesi için geliştirilen dentin bariyer testleri, restoratif materyallerin biyolojik olarak uyumluluğunu dentin kalınlığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak inceleme olanağı sunar (6).

Dentin adeziv sistemlerin sitotoksitesi ile ilgili çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır (7-48). Çeşitli metotlar kullanılarak yapılan bu çalışmalar, materyallerin geliştirilmesi ve klinikte güvenli bir şekilde kullanılmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Diş hekimliği kliniklerinde birçok dentin bağlayıcı sistem kullanılmaktadır. Bu dentin bağlayıcı sistemler farklı bileşimlere sahiptir. Bu nedenle bu adeziv sistemlerin neden olduğu sitotoksik etkilerde materyale bağlı olarak farklılık gösterebilir (49).

Çalışmamızda 5 farklı tipteki adeziv sistemin (Scotchbond Multi Purpose, XP Bond, Xeno V, Clearfil Protect Bond, AdheSE) klinik uygulama şekilleri birebir taklit edilerek, hücre kültür insert ve dentin bariyer test yöntemi kullanılarak gerek hücre canlılığı gerek hücre proliferasyonu ve morfolojisi üzerindeki sitotoksik etkilerinin 4 farklı metot ile incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece elde edilecek sonuçların bu konuda yapılan ve yapılacak olan araştırmalara katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Dokuları

Makroskopik olarak diş kron ve kök olmak üzere ikiye ayrılır. Vücutta en iyi mineralize doku olan mine tamamen aselüler bir yapıdadır ve kron kısmını örter. Mine, epitel hücrelerinin salgılama ve rezorpsiyon aktivitelerini birlikte gerçekleştirmesi sonucu üretilir (50,51). Dentin dokusu odontoblastların ve odontoblast uzantılarının salgılama işlevi sonucu üretilir. Dentin dokusu dişin gövde kısmını oluşturur. Dentin pulpayı örterek koruyucu görevini yerine getirirken mine altında uzanmasından dolayı da bu dokuya destek sağlar. Dişlerde kök yüzeyini kaplayan sement diğer bir kalsifiye diş dokusudur. Bu doku dentine benzer şekilde ektomezenkim kaynaklı olup kemik ve dentinden daha az mineral içermektedir. Pulpa dokusu ise ektomezenkim hücreleri ya da nöral krest hücreleri tarafından üretilen gevşek bir bağ dokusudur. Pulpa odası ve kök kanalları ile çevrelenmiştir. Pulpa genellikle dentinle birlikte düşünülür. Fonksiyonel anatomik gelişimsel ilişkilerinden dolayı pulpa dentin kompleksi olarak ifade edilir (51).

2.1.1. Pulpa Dentin Kompleksi

Dental papilladan oluşan dentin ve pulpa dokuları mezoderm kaynaklı özelleşmiş bağ dokularıdır (52). Dentin, pulpa dentin kompleksinin sert doku bölümünü oluştururken pulpa, dentinin canlılığını devam ettiren yumuşak bağ dokusu kısmını oluşturur. (53,54) Dentin pulpa bütünlüğü, dentin yapımından ve dişin korunmasından sorumludur. Pulpa dentin kompleksinde en önemli hücreler odontoblastlardır. Yapısal olarak odontoblast uzantıları ve sinir uçları gibi pulpa elemanları dentin içine uzanır. Dentinle pulpa arasındaki fonksiyonel birlikteliğe çeşitli örnekler verilebilir. Bunlar:

- 1- Pulpa hem fizyolojik olarak hem de dış kaynaklı uyarılara cevap olarak dentin üretme kapasitesiyle dentinin genişlemesini sağlar.
- 2- Pulpa sinirleri dentine taşıyarak bu dokunun duyarlılığını sağlar.
- 3- Direkt bir uyarı gelmediği zaman bile pulpa bağ dokusu dentin yaralanmalarına cevap verebilme potansiyeline sahiptir.
- 4- Dentin pulpayı bir kapsül gibi çevreleyerek onu dış etkilere koruma görevini yerine getirir (51,54).

2.1.2. Dentinin Dokusunun Özellikleri

Dentin odontoblast hücrelerinin salgıladığı kollajenden zengin organik matriksin mineralizasyonu ile oluşur. Dişin hacimsel olarak en büyük bölümünü oluşturan dentin dokusu odontoblast uzantıları ve sinir hücreleri bulunması nedeniyle canlı bir dokudur. Genç bireylerde dentin açık sarı renktedir. Mineralizasyonu mineden daha az olduğundan daha opak görünür (2,54).

Dentin dokusu; içeriğinin ağırlık olarak yaklaşık %70'i hidroksiapatit, %18'i kollajen esaslı organik madde ve %12'si de sudan oluşmuş heterojen bir yapıdır. Mineye oranla dentin dokusunun inorganik içeriği daha az ve hidroksiapatit kristallerinin boyutları daha küçüktür. Bu nedenlerle mineye göre dentin daha elastik bir yapıya sahiptir (52). Dentinin organik yapısı % 90 oranında kollajenden oluşurken bu kollajen yapının büyük kısmı Tip I kollajendir. Fonksiyonları tam olarak açıklanamayan non-kollajen proteinler ve organik komponentler düşük miktarda bulunmaktadır (2).

Gelişim dönemindeki embriyolojik etkileşimlere bağlı olarak ya da dış çevreden gelen uyarılara fizyolojik bir cevap sonucu gelişen dentin tipleri tanımlanmıştır. *Primer dentin* diş sürmesinden önce ve diş sürmesi sırasında oluşur, dişin büyük bir kısmını oluşturarak ilk şeklini meydana getirir. Primer dentinin minenin altındaki dış tabakası manto dentin olarak isimlendirilir. Manto dentin, altında bulunan primer dentin yapısından farklıdır. Yeni farklılaşmış odontoblastlar tarafından üretilen 150µm genişliğindeki bu dentin tabakası fosforinlerden eksik bir ana madde ile kaba kollajen fibrillerden oluşur. Matriks, primer dentine göre biraz daha (%4) mineralizedir. Kök oluşumu tamamlandıktan sonra odontoblastlar çok daha yavaş bir hızda dentin üretimine devam eder. *Sekonder dentin* olarak adlandırılan bu dentin tabakasının kanalcıklı yapısı primer dentine göre daha düzensizdir. *Tersiyer dentin*, çürük, restoratif işlemler, atrizyon veya travma gibi zararlı dış uyaranların varlığında oluşan dentindir. Tüm mine dentin sınırı boyunca üretilen primer ve sekonder dentinden farklı olarak tersiyer dentin sadece dış uyaranlarla etkilenen sekonder odontoblastlar tarafından üretilir. Bu dentinin kalitesi ve miktarı meydana gelen odontoblast cevabı ile paraleldir, bu cevabı uyarının yoğunluğu ve şiddeti belirler. Koruyucu bir reaksiyon olarak üretilen tersiyer dentin düzensiz ve az sayıda dentin kanallarına sahiptir. Dentinin pulpa tarafında yer alan en iç tabakası predentin tabakası olarak isimlendirilir. Bu tabaka mineralize olmamış dentin matriksinden meydana gelir ve bu matriks esas olarak kollajen, glikoprotein ve proteoglikanlardan oluşur. Predentin dentinogenezin aktif

olduğu yerlerde çok kalındır ve bu tabakanın varlığı dentin bütünlülüğünün devamı açısından önemlidir (53,54).

2.1.3. Dentinin Histolojisi

Dentin mikroskop altında incelendiği zaman çeşitli yapısal özellikler gösterir. Bunlar dentin kanalları, peritübüler–intertübüler dentin, kalsifikasyonun yetersiz olduğu alanlar (interglobuler dentin) ve gelişim çizgileridir (54).

2.1.3.1. Dentin Kanalları

Kanallı yapı dentinin önemli bir özelliğidir. Odontoblast hücreleri mine sınırında merkeze doğru organik matriks sentezleyerek geri çekilirler ve mineralize olan matriks içerisinde odontoblast hücrelerinin protoplazmik uzantıları kalır. Bunun sonucunda dentin kanallı bir yapı kazanır. Dentin kanalları kuronda mineye kadar uzanırken, kökte sement sınırına gelmeden sonlanırlar. Kanallar, ince yan kanallar aracılığı ile komşu kanallarla anastomoz yaparlar. Dentin kanallarının her birinin içini bir odontoblast uzantısı doldurur. Kanallar odontoblast uzantıları yanında dentin lenfi adı verilen sıvıyı içerir. Dentin lenfi albumin, immunglobulin G (IgG), transferin, tenascin ve proteoglikan gibi kompleks protein karışımlarını içerir (53-55). Dentin kanallarında ayrıca sinir lifleri ve mineralize olmamış kollajen lifler de bulunabilir (56)

Dentin kanalları konik bir görünüme sahip olup mine dentin sınırında 0,6-0,8µm dentinin orta bölgesinde 1,2 µm ve pulpa yakınında ise 2,5µm çapına ulaşır (54). Kuronal dentinde, dentin kanallarının sayısı 8000 ile 58000 /mm² arasında değişmektedir. Kuronal dentinin değişik bölgelerindeki mm başına düşen kanal sayıları Tablo 2.1 de gösterilmektedir (57). Pulpa yakınında dentin kanallarının sayıca fazlalık göstermesi bu bölgedeki dentin alanının daha az olması ve odontoblastların kalabalık bir şekilde bir arada bulunmalarından kaynaklanmaktadır. Servikal dentin ile karşılaştırıldığında kök dentinindeki ortalama kanal yoğunluğunda anlamlı bir azalma gözlenir (54).

Tablo 2.1: Kuronal dentinde mm² deki ortalama dentin kanal dağılımı (57).

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

2.1.3.2. Peritübüler (intratubular) Dentin

Dentin kanallarını çevreleyen hipermineralize dentine peritübüler veya intratübüler dentin denir. Peritübüler dentin intertübüler dentine göre kollajenden fakir, mineralden zengin bir yapıya sahiptir. Mineral yapı, kalsiyumu eksik karbonatı fazla dolayısıyla kristalizasyon oranı artmış hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Bu nedenle intertübüler dentine göre 5 kat daha sert bir yapıya sahiptir (58). Dentin kanallarının yoğunluğunun pulpaya doğru artmasından dolayı peritübüler dentinin kapladığı alan predentin bölgesinde dentin alanının %60'ını mine dentin sınırında ise %3' ünü oluşturmaktadır (59).

2.1.3.3. İntertübüler Dentin

Dentin kanalları arasında kalan dentin intertübüler dentin olarak isimlendirilir. Odontoblastların ilk salgıladıkları dentindir ve fosfoprotein, proteoglikan, γ -karboksiglutamat içeren proteinler, glikoproteinler ve bazı plazma proteinler içerir (54). Ayrıca bu dentin bölümü minerallerin biriktiği sıkı örgü şeklinde tip 1 kollajen ağını içerir. Bu fibriller gelişigüzel şekilde dentin kanallarına dik açıya yakın bir doğrultuda dizilirler ve apatit kristalleri (ortalama 100nm uzunluğunda) genellikle uzun eksenleri boyunca liflere paralel yerleşmişlerdir. İntertübüler dentin predentin bölgesinde dentin alanının %12'sini mine dentin sınırında ise %96'sını kaplar. Peritübüler ve intertübüler dentin dağılımı nedeniyle dentinde birim hacme düşen kollajen miktarı mine dentin sınırından pulpaya doğru azalmaktadır (60).

2.1.3.4. İnterglobüler Dentin

İnterglobüler dentin mineralize olmamış veya hipomineralize dentin alanlarıdır. Mineralizasyon esnasında kalsifiye olmuş küresel alanların olgun dentin içinde tam olarak birleşememesi sonucu meydana gelir. Primer dentinin manto dentine yakın

bölgelerinde gözlemlenir. Dentin oluşumu sırasında vitamin D eksikliğine bağlı olarak veya florür iyonunun fazla alımıyla dişlerde bu alanların daha sık görüldüğü belirtilmiştir (54).

2.1.4. Dentin Dokusunun Geçirgenliği

Bir maddenin geçirgenliği, içinden sıvı, iyon, bakteri ve küçük partiküllerin geçmesine izin verme kapasitesi olarak tanımlanır. Fizik terimi olarak geçirgenlik standart koşullar altında bir cisimden veya dokudan geçme kolaylığı veya difüzyon oranı olarak tanımlanır. Bu geçişi, cisim veya dokunun yüzey alanı, yapısı ve kimyası, kalınlığı ile işlem sırasındaki basınç gibi birçok faktör etkiler (61).

Dentin geçirgenliği de bir maddenin dentin içerisine veya dentinden pulpaya geçmesi olarak tarif edilir (62). Çeşitli tipte dentin geçirgenliği tanımlanmıştır. Mine dentin sınırından pulpaya uzanan içi sıvı ile dolu olan dentin kanalları dentinin en önemli karakteristik özelliğidir. Hidrodinamik teoriye göre mine dokusu uzaklaşp dentin açığa çıktığında dış uyaranlar dentin kanalı içindeki sıvının hareketine neden olur. Bunun sonucunda pulpadaki sinirler uyarılır ve ağrı oluşur (63). Dentin sıvısındaki bu hareketlilik *transdentin geçirgenlik* olarak tanımlanır. Dentin hassasiyetinin nedeni olan transdentin geçirgenlik ayrıca açık dentin yüzeyinin sürekli olarak nemli kalmasını sağlar (64). Bağlayıcı reçine monomerlerinin dentin kanalları içine penetrasyonu *intratübüler dentin geçirgenliği* olarak adlandırılır. *İntertübüler dentin geçirgenliği* ise demineralize intertübüler dentine reçine penetrasyonunu ifade eder.

Dentinin kanallı yapısı, zararlı maddelerin pulpaya geçişini kolaylaştırırken, aynı zamanda dentin hassasiyetinin oluşmasında ve polimerize olabilen reçine monomerlerin penetrasyonunda çok önemli role sahiptir (65).

Dentin geçirgenliği; kanalların çapı ve uzunluğu, dentin sıvısının yoğunluğu ve içindeki bileşenlerin molekül boyutu, basınç değişimi, difüzyon yüzey alanı, kanalların genişliği ve pulpa dolaşımı tarafından uzaklaştırılan maddenin miktarı gibi değişik faktörlere bağlıdır. Dentin kanalları, 1µm çapında ve 3 mm uzunluğunda dentin lenfi ile dolu lümenlerdir. Uzun dentin kanalları pulpaya ulaşan toksik maddelerin konsantrasyonlarının azalmasına neden olur. Kavite preparasyonu gibi dentin kalınlığının azalmasına neden olan işlemler, dentin geçirgenliğinin artmasına yol açar (66,67). Dentin geçirgenliği dentin kanallarının fonksiyonel çapı ile ilişkilidir. Dentinin geçirgenlik derecesi çap ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Bunun yanında, dentin

geçirgenliği, mm^2 deki dentin kanal sayısına bağlı olarak dentinin değişik bölgelerinde farklılık göstermektedir (Tablo 2.1) (65). Kuraldan pulpa doğru mm^2 deki dentin kanal sayısı ve çapı artmaktadır. Bu nedenle pulpa boynuzlarının üzerindeki dentin okluzal yüzeyin ortasındaki dentinden, proksimal dentin okluzal dentinden ve kural dentin kök dentininden daha geçirgendir (68-70).

Aynı zamanda dentin kanalları ve dallanmaları sıvıların, iyonların ve moleküllerin pulpa geçiş yollarını oluşturmakta bunun sonucunda dentinin fizyolojisinin ve aktivitesinin sürekliliği sağlanmaktadır. Dentin kanalları çaplarına, bulundukları bölgelere ve yönlerine göre farklı çeşitlerde dallanmalar gösterir. Dentin kanalı ana dallanmaları kural ve kök dentini dış yüzeyinde $250\mu\text{m}$ uzunluğundadır. Delta şeklinde olan bu dallanmalar $0,5-1\mu\text{m}$ çapa sahiptirler. Daha ince dallanmalar ise kök dentininde ve kanal sayısının az olduğu bölgelerde görülür. $0,3\mu\text{m}$ ile $0,7\mu\text{m}$ arası değişen çaplara sahip bu dallanmalar dentin kanalı ile 45° açı yaparlar. Mikro dallanmalar dentinin herhangi bir yerinde bulunabilir ve yaklaşık $0,1\mu\text{m}$ çapa sahiptirler. Dentin kanalı ile 90° açı yaparlar (61).

Peritübüler dentindeki artma ve dolayısıyla dentin kanallarının tıkanması yaşla birlikte dentinde görülen karakteristik bir özelliktir ve çürük, aşınma gibi dış uyaranlarla bu olay hızlanabilir. Dentin kanallarında mineral tuzlarının birikmesi sonucu dentin hipermineralize olmaya başlar. Bu hipermineralizasyon odontoblastların kontrolünde canlı doku yanıtı olarak veya mineral tuzlarının dentin kanallarına çökmesi sonucu fizikokimyasal tıkanma şeklinde meydana gelir. Mineral birikimi ile dentin kanallarının tıkanması ya da kapanması dentin geçirgenliğinin azalması ile sonuçlanacaktır. Etkilenen dentinin pulpa tarafında oluşan tersiyer dentin atubular yapısı nedeniyle dentin geçirgenliğini azaltarak zararlı uyaranlara karşı pulpanın korunmasını sağlayan diğer bir mekanizmadır (61).

Dentin geçirgenliğinde önemli bir etken de smear tabakasıdır. Kavite preparasyonu sırasında döner aletler ve el aletleri ile uzaklaştırılan debrisin dentin yüzeyinde birikmesi ile oluşan tabaka *smear tabakası* olarak adlandırılmaktadır. Bu tabaka, kalınlığı $0,5\mu\text{m}$ 'den $15\mu\text{m}$ 'ye kadar değişen hidroksiapatit kristalleri, denatüre kollajen artıkları, kan, mikroorganizmalar ve tükürükten oluşan organik bir yapıdır. Smear tabakası, preparasyon sırasında açığa çıkmış dentin kanallarını bir örtü gibi kapatmaktadır. Smear tabakası, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) beyaz, oldukça düz, çok ince bir tabaka olarak gözükmektedir (71,72).

Kavite hazırlanmasından sonra kesik dentin tübüllerinin ağızlarında dentin debrisinden oluşan tıkaçlar gözlenmiştir. Bu tıkaçlara smear tıkaçı denmektedir. Smear tıkaçları dentin tübüllerine değişen uzunluklarda girmektedir ve genellikle smear tabakasının kalınlığından daha uzundurlar. Smear tıkaçları, dentin tübülleri içinde 40 µm derinliğe kadar uzanabilmektedir (73). Smear tabakası, koruyucu bir difüzyon bariyeri gibi davranarak, dentinin geçirgenliğini %86 oranında azaltır (1). Smear tabakasının dentin geçirgenliğini azaltmak, dentin içerisindeki sıvı hareketini önlemek ve bakterilerin dentin kanallarına geçişini engellemek gibi işlevleri vardır (74,75). Diğer taraftan bu tabakanın bakteri gelişimi açısından uygun bir ortam oluşturduğu ve besiyeri teşkil ettiği ifade edilmektedir. Smear tabakası dentin permeabilitesini azaltarak bir difüzyon engeli rolü oynamasına rağmen, materyallerin dentine bağlanmasını sağlama açısından dentin kanallarını tıkayan bu tabakanın kaldırılması önerilmektedir (65).

2.1.5. Pulpa

Pulpa; esas madde, hücreler, lifler, kan damarları ve sinir liflerinden oluşan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Pulpadan alınan histolojik kesitler incelendiğinde pulpada dıştan içe doğru odontoblast tabakası, hücreden fakir tabaka (Weil tabakası), hücreden zengin tabaka izlenir. Odontoblast tabakasını uzantıları dentin içinde bulunan odontoblast hücrelerinin gövdeleri oluşturur. Hücreden fakir tabakada yaygın olarak kapiller kan damarları ve miyelinsiz sinir lifleri bulunur. Hücreden zengin tabakada yoğun olarak farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve fibroblastlar olmak üzere makrofajlar ve lenfositler yer alır. Hücreden zengin tabaka harabiyete uğramış odontoblast hücrelerinin yerlerine yenilerinin yapımından sorumludur (76).

Pulpa esas maddesi, glikoprotein, protein ve mukopolisakkaridlerden oluşur. Esas madde tüm biyolojik faaliyetlerde aracı rol üstlenir (77).

Pulpa dentin kompleksinin en önemli hücrelerinden olan odontoblastlar, diş gelişimi sırasında primer dentin ve daha sonra ise sekonder ve tersiyer dentin yapımından sorumludurlar. Odontoblastların morfolojik yapısı dişin çeşitli kısımlarında değişiklik göstermektedir. Kuronda uzun silindirik olan odontoblastlar, kökün uç kısmında ise kısa ve kübik bir form alırlar (78).

Diş pulpasında sayıca en çok bulunan hücreler fibroblastlardır. Fibroblastlar, kollajen liflerin yapımından sorumludur. Fibroblastların sayısı ve aktivitesi pulpanın yaşını, vitalitesini ve dış etkilere dayanma gücünü belirlemektedir. Yaş, çürük, atrizyon,

erozyon veya abrazyonla birlikte onarım aktivitesinin bir sonucu olarak fibroblastların sayısında ve boyutlarında bir azalma, lif içeriğinde ise artış olur (79).

Pulpadaki hücreden zengin tabakanın çoğunu, farklılaşmamış mezenkim hücreleri oluşturmaktadır. Bu mezenkim hücreleri yaralanma ve enflamatuvar olay sırasında makrofaj veya osteoklast/odontoklast'lara ve odontoblastların harap olduğu durumlarda tamir dentinini meydana getirecek odontoblast benzeri hücreler haline dönüşürler. Pulpada klinik öneme sahip diğer hücrelerde makrofajlardır. Makrofajlar normal pulpa dokusunda görülür ve bunların sayısı pulpa yaralanmaları sonucu artar. Diğer yandan normal pulpa dokusunda seyrek olarak polimorf nuklear lokositlerde bulunur. Mast hücreleri normal pulpa dokusunda tipik olarak görülen hücreler değildir. Ancak pulpa iltihabı süresince bunlar pulpada bolca izlenir (80).

Apikal foramen aracılığıyla arterioller pulpaya girerler, venuller ve lenfatik damarlar da pulpadan ayrılır. Damarlar aynı zamanda yan kanallar aracılığıyla da pulpaya girerler. Bu yan kanallar kökün herhangi bir yerinde olabildiği gibi, genellikle apikal bölgede daha yaygın görülürler. Kuron kısmındaki pulpanın ihtiyacını karşılamak amacıyla büyük arterioller kök boyunca uzanırlar. Bu arterioller daha sonra dallanırlar ve kapillerler şeklinde sonlanırlar. Bu kapillerler kuron kısmındaki odontoblast tabakasında oldukça fazla sayıda bulunurlar. Bu kapillerlerin normal pulpada fonksiyon görmemesi klinik açıdan önemlidir. Pulpada kan akımında bir artış olduğunda örneğin lokal veya genel hiperemi meydana geldiği zaman yeni kapillerlerin gelişimine gerek kalmadan bu kapillerler kanla dolar. Klinik olarak kapillerlerin en önemli yapısal özelliklerinden biri endotel duvarının bir bütünlük göstermemesi ve pencereler içermesidir. Bunun sonucunda dokular arası sıvı ile kan damarları arası besinlerin ve artık maddelerin değişimi kolaylaşır. Bu değişim özellikle çürük, travma, operatif prosedürleri içeren yaralanmalar sonucu etkilenen pulpada çok önemlidir. Lenfatik damarlar ise pulpanın dışına likitleri taşır ve pulpadaki likit dengesinin sürekliliğinde önemli bir rol oynar. Myelinli ve myelinsiz sinirler apikal foremenden pulpaya girerek pulpa boyunca uzanırlar. Bunlar esas olarak kan damarlarını izlerler ve dallanırlar, dentin kanallarının periodontoblastik aralığında ve odontoblastik-subodontoblastik bölgedeki terminal uçları bir sinir ağı meydana getirir (81).

2.2. Dental Adezyon

Adezyon farklı iki materyalin sıkı bir şekilde birbirine bağlanması veya yapışması olarak ifade edilir. Adezyonu sağlamak için kullanılan materyale *adeziv*, adeziv materyalin uygulandığı ve bu madde aracılığı ile bağlanan yüzeye *aderent* denir. Yüzeylere adeziv uygulandığı zaman bu adeziv iki farklı materyali birbirinden ayrılmayacak şekilde bir araya getirir ve bu iki materyal arasında bağlanma oluşur (82). Yüzey gerilim değeri, adezivin aderent yüzeyi ıslatabilmesi ve adeziv materyalin aderent yüzey ile yaptığı temas açısı adeziv-aderent ilişkisini etkileyen üç önemli faktördür. Başarılı bir adezyonun gerçekleşebilmesi için adeziv sistemin yüzey gerilim değeri, aderentin yüzey gerilim değerine eşit veya ondan daha az olmalıdır. Aderentin ıslanabilirliği iyi olmalı yani adeziv sistemin temas açısı olabildiğince küçük olmalıdır (83).

Restoratif materyallerin diş dokularına adezyonu ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Black, 1917 yılında koruma için genişletme ve mekanik adezyonu arttırmak için sağlam diş dokularının kaldırılması esasına dayanan mekanik tutuculuk prensiplerini önermiş, bunun sonucunda Black kavite prensiplerini tanımlamıştır. Buonocore'un 1955 yılında mine yüzeyinde asitleme işleminin adezyonu arttırdığını bulması üzerine Black kavite prensipleri yerini konservatif ve adeziv restorasyon tekniklerine bırakmıştır (1,84). Asitlenmiş dentin yüzeyine zayıf bağlantı sağlanması ve dentin tübülleri aracılığı ile asitin pulpaya zarar verebileceği düşünüldüğü için uzun yıllar dentini asitleme işlemi tercih edilmemiştir. Fusayama; asitlenmiş dentin yüzeyine bağlantının daha iyi olduğunu ve adezyonun arttırılması için dokunun asitlenmesi gerektiğini belirtmiştir (85). Nakabayashi de asitleme ile dentin yüzeyinde mineralize dokunun uzaklaştırılmasının veya dentin kollajen matriksin açığa çıkarılmasının dentin adezyonunun arttırılmasında daha güvenilir ve pratik bir yöntem olduğunu bildirmiştir (3,86).

2.3. Adezyonun Temel Prensipleri

Reçine esaslı materyallerin diş dokusuna bağlanmasında 4 farklı mekanizmanın rolü vardır:

1. Mekanik: Adeziv materyalin, aderent yüzeydeki girinti ve çıkıntılara mikromekanik olarak kilitlenmesi

2. Adsorpsiyon: :Diş dokusu inorganik (hidroksiapatit) ve organik (genellikle tip1 kollajen) bileşiklerine kimyasal bağlanma.
3. Difüzyon: Reçine monomerlerin diş yüzeyine çökelen maddelere kimyasal veya mekanik olarak bağlanması
4. Bu üç mekanizmanın kombinasyonu (1,87).

Diş sert dokuları ile restoratif materyaller arasındaki adezyonun temel prensibi, dişin inorganik kısımlarının sentetik reçine ile yer değiştirmesidir (88). Bu süreç iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama, kalsiyum-fosfatın uzaklaştırılması sonucu mine ve dentinde mikroporozite oluşumu, ikinci aşama ise reçinenin oluşan mikroporoziteler arasına girip polimerize olması ve bunun sonucunda mikromekanik adezyonun sağlanmasıdır. Klinikte mikromekanik kilitlenmenin iyi bir bağlanma oluşturması yanında fonksiyonel monomerler ile diş dokularının kimyasal bir etkileşime girmesi de önem kazanmaktadır (89).

Adezyon sağlamak için uygulanan genel yöntemler şunlardır:

1. Yüzeyin (aderentin) hazırlanması
2. Fonksiyonel moleküllerin (primerin) yüzeye uygulanması
3. Primerle reaksiyona giren bağlayıcı reçine maddelerinin uygulanması (82).

Restoratif işlemler sırasında mine ve dentin yüzeyindeki kavite hazırlıklarının dışında asitleme işlemi de diş yüzeyinin uygun hale getirilmesinde önemli bir aşamadır. Smear tabakasının uzaklaştırılması, kollajen yapının açığa çıkarılması, dentin geçirgenliğinin artması ve apatit kristallerinin çözünmesi ile mikroporöz bir yüzey oluşur. Ayrıca asit uygulama sonrası aderentin yüzey enerjisi artar (90,91).

Mine dokusuna bağlanma, polimerlerin asitlenmiş yüzeye mikromekanik tutunması veya hidroksiapatite kimyasal bağlanması ile gerçekleşir. Mine dokusunun demineralizasyonu için ağırlık olarak %35 konsantrasyona sahip genel olarak pH'sı 1'den küçük fosforik asit kullanılmaktadır. Bu uygulama altın standart olarak kabul edilmektedir. Demineralize mine dokusuna primer ve bağlayıcı reçine örtücü uygulaması iyi bir mikromekanik bağlanmayı sağlar (1).

Nakabayashi tarafından tanımlanan hibridizasyon teorisi dentine bağlanmanın temelini oluşturmaktadır (3). Asit ile yüzeysel dentinin demineralizasyonu sonucu kollajen ağın açığa çıkması fibrillerin içinde ve arasında mikro boşlukların oluşmasını sağlar. Düşük vizkoziteli monomerlerin bu bölgeye uygulanması sonucu reçine ile dentinden oluşan bir difüzyon tabakası oluşur. Polimerizasyon sonucu karmaşık fibril ağı içerisine reçinenin girmesi sonucu oluşan bu iç içe girmiş dentin ve reçine tabakası hibrit tabaka olarak isimlendirilir. Bu hibrit tabaka oluşumu bağlayıcı sistemlerin asıl bağlanma mekanizmasını oluşturur.

Primer, çift fonksiyonlu bir moleküldür. Bu molekülün bir ucunda hidrofobik grup diğer ucunda ise hidrofilik grup bulunur. Hidrofilik olan ucu (adeziv grup), mine veya dentin ile reaksiyona girerken hidrofobik olan diğer ucu (polimerize olabilen grup), bonding adı verilen reçine örtücülere bağlanır. Böylece primer, kollajen ağının içine girerek yüzey gerilimini artırırken aynı zamanda dentinin ıslanabilirliğini arttırmaktadır. Primerin işlevi, demineralize dentinin porözitesini korumak ve nemli kollajen ağındaki su ile yer değiştirmektir. (82,92). Primer içerisinde adeziv ve polimerize olabilen grupları *spacer (aralayıcı)* adı verilen moleküller ayırır. Genellikle alkali zincirden oluşan spacer moleküller amid, ester ve aromatik gibi diğer grupları da içerirler. Polariteleri (iyonlaşma dereceleri), monomerlerin suda veya diğer solventlerde çözünmesini etkiler. Bu moleküller belirgin bir fonksiyon göstermemesine rağmen monomerlerin özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler (93).

Reçine örtücüler, primer ve uygulanan kompozit reçine ile birlikte polimerize olurlar. Bu örtücüler çok fazla çapraz bağ oluşturarak polimerize olma kapasitesine sahiptirler ve polimerizasyon sonucu adeziv bağlanmanın direncine önemli derecede katkı sağlarlar. Bunlar tipik olarak komonomerlerin bileşiminden meydana gelirler ve bu komonomerlerin her biri adeziv bağlanmanın oluşmasına katkı sağlayan spesifik özellikler taşırlar (82).

2.3.1. Dentin Bağlayıcı Sistemler (Adeziv Sistemler-Bonding Ajanlar)

Adeziv sistemlerin kullanılması ile diş dokuları ve restoratif materyal arasında gerçekleşen mikromekanik retansiyon sonucu ağızdaki sıvıların, bakteri ve bakteri ürünlerinin dentin kanalları aracılığı ile pulpaya geçişi önlenerek hassasiyet, kenar renklenmesi, sekonder çürük gibi klinik problemler en aza indirilebilmektedir (94). Adeziv restorasyonlar aynı zamanda zayıflamış diş dokularını fonksiyonel kuvvetlere

karşı korumaktadırlar. Ayrıca diş rengine adeziv restorasyonlar ile başarılı estetik sonuçlar alınmaktadır (1).

Adeziv restorasyonlarda klinik başarı kullanılan bağlayıcı sistem ve teknikle bağlantılıdır. Bağlayıcı sistemler reçine monomer solüsyonlarından oluşan, restoratif materyal ile diş dokusunu monomer polimerizasyonu ile birbirine bağlayan materyallerdir. Adeziv bağlantı iki yüzey arasında oluşurken diş hekimliğinde adezyon mine-dentin-bağlayıcı sistem-kompozit, porselen, amalgam vb. gibi daha kompleks yapılar arasında gerçekleşir (95).

2.3.2. Bağlayıcı Sistemlerin Sınıflandırılması

Bağlayıcı sistemleri sınıflandırmak amacıyla pek çok sistem kullanılmıştır. En genel sınıflama bu sistemlerin gelişim sırasına göre yapılan sınıflamadır.

2.3.2.1. Bağlayıcı Sistemlerin Gelişimine Göre Yapılan Sınıflandırma

Diş yüzeyinde retansiyon sağlamak için bir reçine tabaka kullanma fikri ilk olarak Oskar Hagger tarafından 1949 yılında ortaya atılmıştır. Bu amaçla Hagger gliserofosforik asit dimetakrilat ve metakrilik asitten oluşan, polimerizasyonu sülfonik asit başlatıcıları (inisiyatorleri) ile sağlanan Sevriton Cavity Seal adlı ürünü geliştirmiştir. Sevriton diş yüzeyine kimyasal olarak bağlanan ilk üründür (96). Buonocore; hidroklorik asit ile diş yüzeylerinin asitlenmesi sonucu gliserofosforik asit dimetakrilatın mine yüzeyine daha iyi bağlandığını ayrıca gliserofosforik asit dimetakrilatı dentin dokusuna uygulandığında ise adezyonda belirgin olmayan artışlar gösterdiğini saptamıştır (97). Örnekler suya daldırıldığında bu ilk adezyon metodu ile elde edilen bağlanma direncinin oldukça azaldığı bulunmuştur. Bu problemi çözmek amacıyla Bowen, N-fenilglisin glisidilmetakrilatı (NPG-GMA) tanıtmıştır. *Birinci nesil dentin bağlayıcıların* esasını oluşturan bu ürünler mekanik retansiyon oluşturulmadan restore edilen servikal erozyon restorasyonlarında kullanıldığı zaman yeterli olmayan klinik sonuçlar göstermişlerdir. 1–3 MPa bağlanma direncine sahip bu birinci nesil dentin bağlayıcılar yüksek polimerizasyon büzülmeleri ve ağız ortamında çözünmeleri sebebiyle başarısız olmuşlardır (83,98).

İkinci nesil dentin bağlayıcı sistemler 1970 lerin sonunda geliştirildi. Bu materyallerin birçoğu bisfenol A-glisidil metakrilat (Bis-GMA) veya hidroksietyl metakrilat (HEMA) gibi doldurucusuz reçine halo fosfor esterlerinden oluşmaktaydı. Bu bağlayıcı sistemlerin tutunma mekanizması halo fosfor gruplar ile diş sert dokularının

kalsiyum iyonları arasında iyonik bağlanma ile gerçekleşmekteydi (98). İkinci nesil dentin bağlayıcıları bağlanma direnci fazla artış göstermemiş ve nadiren 5-6 Mpa'yı geçmiştir (1). Birinci nesil dentin bağlayıcılar ile kıyaslandığında bu sistemler daha gelişmiş olmasına rağmen klinik olarak başarı gösterememişlerdir (98). Bu başarısızlığın asıl nedeni ikinci nesil bağlayıcıların esas olarak dentinden daha çok smear tabakasına bağlanması ve bundan dolayı ağız ortamında hidrolitik stabilitelerinin yeterli olmaması olarak açıklanmıştır (1). Dolayısıyla 1-10 MPa'lık bağlanma dayanımları smear tabakasının kohesiv tutunma gücüyle sınırlı kalmıştır.

1979 da Fusayama ve ark. dentini asitlemenin pulpaya bir zararı olmadığını belirtmesi, Nakabayashi ve ark. ise diş dokularına adezyonun monomer infiltrasyonu ile oluştuğunu bulmaları sonucunda *üçüncü nesil dentin bağlayıcı sistemlerin* geliştirilmesi sonucunu doğurmuştur (3,85). Bu sistemlerde smear tabakası modifiye edilerek veya tamamen kaldırılarak dentine reçine penetrasyonu sağlanmıştır (99). Üreticiler smear tabakasını modifiye etmek veya kaldırmak için zayıf asit solüsyonları kullanmışlardır. Asit uygulanması ve yıkanması sonrası primer olarak genellikle 4-Metakriloksietil trimellitat anhidrit (4-META) ve bifenil dimetakrilat (BPDM) içeren solüsyonlar kullanılmıştır ve bu işlemden sonra da bağlayıcı olarak genellikle Bis/GMA HEMA içeren reçine solüsyonlar uygulanmaktadır. Üçüncü nesil bağlayıcı sistemler ile dentine bağlanma kuvvetinde artışlar sağlanmış ve 10-14 MPa arasında bağlanma kuvvetleri elde edilmiştir (83,98).

1990'ların başlarından ortalarına doğru adeziv diş hekimliğinde önemli ilerlemeler çok aşamalı dentin bağlayıcıların geliştirilmesiyle yapılmıştır. *4. Nesil dentin bağlayıcıların* klinikte etkinliğinin ve bağlayıcı kapasitesinin artışında, dentine yüzey hazırlayıcı ajanlarla işlem yapılması ve primerlerin hidrofilik ve heterojen bir dentin yapısı oluşturarak daha kolay bir bağlanma gerçekleştirmesi esastır. Bu çok basamaklı dentin bağlayıcı sistemde son aşama doldurucu içermeyen ya da kısmen doldurucu içeren düşük vizkoziteli bir bağlayıcı reçine uygulamasını içerir. Bu reçine dentin yüzeyine uygulanan primer ile birlikte kopolimerize olur ve aynı zamanda üzerine uygulanacak kompozit reçine ile kopolimerize olması için uygun bağlanma ortamını oluşturur.

Üç aşamalı (asitleme, primer uygulama ve bağlayıcı ajan uygulama) sistem olan *4. nesil* bağlayıcılarda primerler genellikle çift fonksiyonlu (hidrofilik ve hidrofobik) bir grup içeren HEMA, BPDM ve 4-META gibi monomerlerden oluşur. Bağlayıcı ajan ise

sadece hidrofobik olan bis-GMA gibi monomerlerden meydana gelen doldurucusuz veya yarı dolduruculu, düşük vizkoziteli reçinelerdir (1,99). *4. nesil bağlayıcı sistemlerin bağlanma dayanımları ortalama 17-26 MPa arasındadır (100).*

Uygulama aşamalarını kolaylaştırmak ve hızlandırmak amacıyla *5. nesil bağlayıcı sistemler* geliştirilmiştir. 3. ve 4. nesilde üç aşamada uygulanan dentin bağlayıcı sistemler *5. nesil dentin bağlayıcılarda* 2 aşamalı olarak uygulanmaktadır. Bu sistemlerde primer ve bağlayıcı ajan tek şişede birleştirilmiştir. Bunun sonucunda ilk aşamada asit uygulaması yapılmakta, daha sonra primer ve bağlayıcı ajan bir arada ve tek aşamada uygulanmaktadır (101). Bu sistemler aynı zamanda tek şişe (one bottle) bağlayıcı sistemler olarak da pazarlanmaktadır.

Beşinci nesil dentin bonding sistemler aseton, etanol, etanol/su bazlı çözücüler içerisinde 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ya da dipentaeritritol penta akrilat monofosfat (PENTA), bisfenol glisidil dimetakrilat (Bis-GMA), gliserofosforik asit dimetakrilat (GPDM), bifenil dimetakrilat (BPDM) gibi monomerleri içerirler (102).

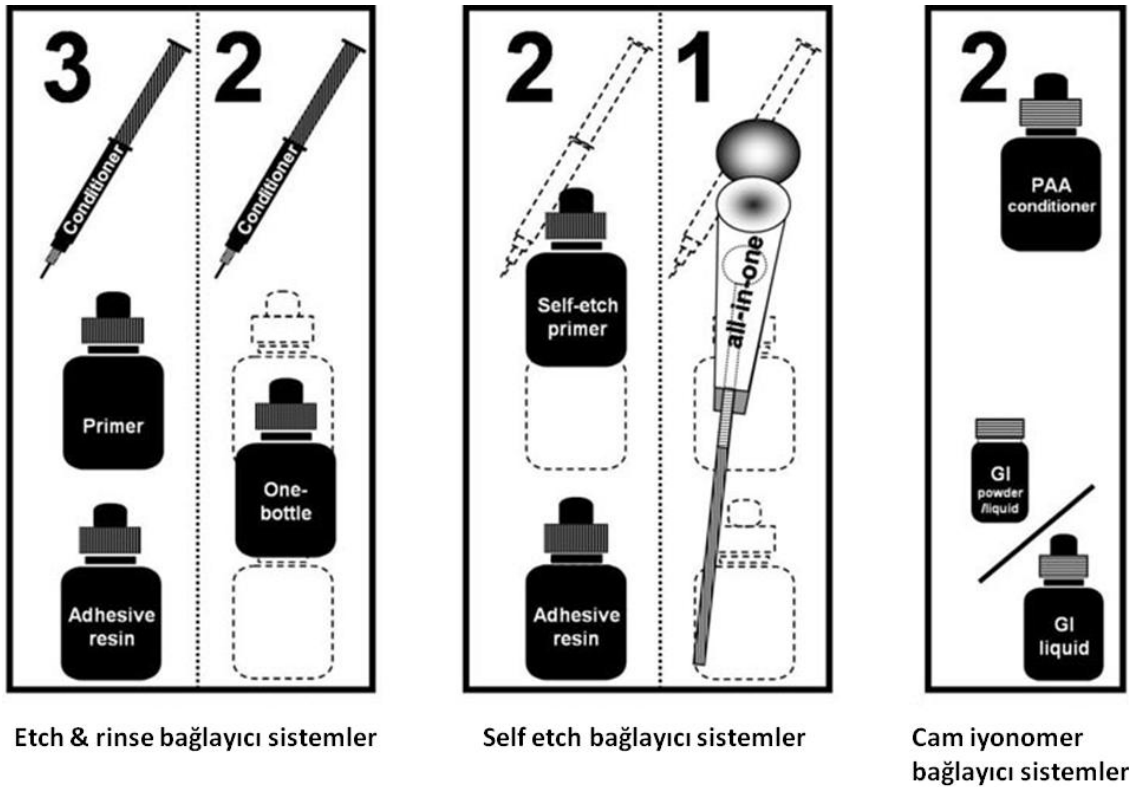
5. nesilin tanıtılmasıyla eş zamanlı olarak asidik primer olarak isimlendirilen, asit ve primerin birlikte ve tek aşamada, bağlayıcı reçinenin ise ikinci aşamada uygulanmasını içeren yeni bağlayıcı sistemler tanıtılmıştır. Bu sistemler *6. nesil dentin bağlayıcılar* olarak isimlendirilmiş ve genellikle Japon firmaları tarafından piyasaya sürülmüş bağlayıcı reçinelerdir ve asit jel içermezler (98).

7. nesil dentin bağlayıcılar günümüzde en son geliştirilen bağlayıcı sistemlerdir. 4. nesil bağlayıcı sistemlerde üç aşamalı uygulama ile meydana getirilen hibrit tabakası 7. nesil ile bağlayıcılarda tek aşamada oluşturulmaktadır. 7. nesil bağlayıcılar; asit, primer ve adeziv reçineyi tek bir şişe içinde ve bir arada içerirler. Tek aşamalı bonding sistemler (all in one) olarak da isimlendirilen bu bağlayıcılar diş hekimlerine kolay uygulama olanağı sağlarlar. Ancak kullanımı karmaşık yapıları nedeni ile monomer çözücü ayrışmalarına neden olurlar ve meydana getirdikleri adeziv tabakalarda kopmalar sergileyebilirler. Bu nedenlerden dolayı yedinci nesil dentin bonding sistemlerin dördüncü ve beşinci nesil daha düşük bağlanma dayanımına sahip oldukları ileri sürülmüştür (103).

2.3.2.2. Dentin Bağlayıcı Sistemlerde Modern Sınıflandırma

Gelişim sırasına göre yapılan sınıflamanın bilimsel açıdan eksik olması, smear tabakasına göre yapılan sınıflamanın da işlem basamakları hakkında tam bilgi vermemesi nedeniyle Van Meerbeek ve ark. 2001 yılında yeni bir sınıflama yapmışlardır (104). Bu sınıflandırmada dentin bağlayıcı ajanların uygulama basamaklarının sayısı yanı sıra mine ve dentine bağlanma stratejileri de esas alınmıştır. Bu sınıflamaya göre bağlayıcı sistemler üç gruba ayrılmıştır (Şekil 2.1):

- 1- Asit uygulama ve yıkama aşamaları ile uygulanan dentin bağlayıcı sistemler (etch&rinse sistemler)
- 2- Self etch bağlayıcı sistemler
- 3- Cam iyonomer bağlayıcı sistemler



Şekil 2.1: Modern dentin bağlayıcı sistemlerin sınıflandırılması (104).

2.3.2.3. Etch & Rinse Bağlayıcı Sistemler

Bu sistemler, mine ve dentin yüzeyini %30 – 40 konsantrasyonunda fosforik asit ile asitleme ve yıkama işlemlerini gerektirir. Asitleme işlemi sonrası smear tabakası tamamen uzaklaşır ve yüzeysel hidroksiapatit kristalleri demineralize olur. Geleneksel etch & rinse sistemlerde asitleme işlemini takiben primer ve ardından bağlayıcı reçine uygulaması yapılmaktadır (89). Aşamalarını azaltmak ve basitleştirmek için iki aşamalı etch & rinse bağlayıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerde primer ve adeziv uygulaması tek aşamada yapılmakta olup, one bottle bağlayıcılar olarak da isimlendirilmektedir (Şekil 2.1) hem iki hem üç aşamalı bağlayıcılar benzer adezyon mekanizmaları ile diş dokularına tutunurlar. Asit uygulama aşamasında fosforik asit smear tabakasını kaldırır, aynı zamanda dentini de 3-5µM derinliğinde kollajen fibril ağını açığa çıkarır. Açığa çıkmış bu kollajen fibriller mikro tutucu bir ağ yapısı oluşturur, reçinenin bu ağa difüze olması ile bir mikromekanik bağlanma meydana gelir (105). Asit uygulamasından sonra adezyonu arttıran monomerler bir ya da iki aşamada uygulanarak açığa çıkmış kollajen ağa penetre olurlar. Üç aşamalı etch & rinse bağlayıcılarda primer uygulaması, açığa çıkmış kollajenin yeterli bir şekilde ıslatılmasını ve kalan suyun uzaklaştırılmasını sağlayarak bağlayıcı reçine infiltrasyonu için dentin yüzeyini uygun hale getirir. Primer solüsyon organik çözücü içinde çözülmüş hidrofilik özelliğe sahip spesifik monomerlerin bir karışımıdır. HEMA bu primer solüsyonlara en fazla katılan önemli bir polimerdir. HEMA'nın hidrofilik doğası ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle kollajen ağının genişlemesini ve reçinenin bu ağa penetrasyonunu arttırarak bağlayıcının bağlanma direncini geliştirebileceği belirtilmektedir (52).

Bu sistemlerin bağlayıcı reçine kısmı ise çözücü içermeyen dolduruculu ya da doldurucusuz esas olarak hidrofobik monomer içeren bir solüsyondur. Bu bağlayıcının asıl fonksiyonu kollajen fibriller arasında kalan aralıkları doldurmaktır. Bu monomerlerin polimerizasyonu sonucu hibrit tabaka ve reçine uzantıları meydana gelir ve bunun sonucunda mikromekanik bağlanma gerçekleşir (52).

İki aşamalı etch & rinse sistemlerde primer ve bağlayıcı bileşenler tek bir solüsyonda birleştirilmiştir ve yukarda belirtilen fonksiyonları bu solüsyon yerine getirir. Bu sistemler aynı zamanda one bottle bağlayıcı sistemler olarak da isimlendirilir.

Üç aşamalı etch & rinse sistemlerde geleneksel mine dentin primerlerinde organik bir çözücü içerisinde polimerize olabilen monomerler bulunmaktadır (106).

Primer içerisindeki hidrofilik grup dentin ile hidrofobik grup ise reçine bağlayıcı ile temastır. Demineralize dentinin yüksek su oranı nedeniyle ilave hidrofilik komonomerler çözücü içerisinde eklenmiştir (107). Fotoinitörler, stabilizatörler ve doldurucular primer içerisindeki diğer bileşiklerdir (82).

Üç aşamalı sistemlerde primer aseton, etanol, su gibi çözücülerden birini ya da birkaçını içerir. Asetonun avantajı yüksek buharlaşma basıncı ve suyla yer değiştirmesidir (108). Solvent su ile ne kadar iyi yer değiştirirse demineralize dentin içerisindeki monomer difüzyonu o derece iyi gerçekleşir (109). Bununla beraber, yüksek uçuculuğu aseton içeren adezivlerin hızla buharlaşmasına yol açarak raf ömrünü azaltır (110). Etanol ve su polar çözücülerdir ve asitleme sonrası yıkama-kurulama işlemi sırasında kollaps olan kollajen yapının genişlemesine olanak sağlar (111).

Üç aşamalı sistemlerde bağlayıcı reçine kısmı çapraz bağlı metakrilatlardan oluşmaktadır. Bunlar bisfenol A glisidil dimetakrilat (Bis-GMA), trietilen glikoldimetakrilat (TEGDMA) ve üretan dimetakrilattır (UDMA) (112).

2.3.2.4. Self Etch Bağlayıcı Sistemler

Bu dentin bağlayıcı sistemler ayrı bir asitleme ve yıkama safhası gerektirmezler. Böylece uygulama süresi kısalmış, teknik hassasiyetleri ve uygulama süresince hata yapma oranı azalmıştır. Self-etch bağlayıcı sistemler, smear tabakasını asidik monomerler ile çözerek ya da modifiye ederek etki gösterirler (89). Self etch bağlayıcı sistemlerin yapısında bulunan asidik monomerler mine ve dentini pürüzlendirirken aynı zamanda primer işlevi görerek reçine infiltrasyonunu sağlarlar. Bunun sonucunda çözülmüş smear tabakası ve demineralizasyon ürünleri etch & rinse sistemlerdeki gibi yıkanarak uzaklaştırılmazlar, bu ürünler adeziv reçine ile birleşmiş bir şekilde bulunurlar (113). Böylece smear tabakası monomer infiltrasyonu ile modifiye edilerek hibrit tabakaya katılması sağlanır ve bağlanma ara yüzeyinin bir parçası haline gelir.

Self etch bağlayıcı sistemler iki şekilde sınıflandırılabilirler. Uygulama şekline göre iki aşamalı ve tek aşamalı self etch bağlayıcı sistemler olarak isimlendirilirler. İki aşamalı sistemlerde asidik monomer içeren primer uygulamasının ardından hidrofobik bağlayıcı reçine uygulanırken, tek aşamalı sistemlerde asit monomer ve bağlayıcı reçine tek bir şişede toplanmış, böylece uygulama tek aşamaya indirilmiştir (114).

Self-etch bağlayıcı sistemlerin içeriklerinde self etch adeziv monomerler, çapraz bağlı monomerler ve monofonksiyonel komonomer bulunmaktadır. Self etch adeziv

monomerler karboksilik, fosforik veya dihidrojenfosfat asit grubu içerirler. Bu gruplar sayesinde self etch bağlayıcı sistemler diş sert dokularında pürüzlendirmeyi sağlarlar. Ayrıca içerdiği monomerlerle diş sert dokularının inorganik kısmıyla şelasyon yaparak kimyasal bağlanma gerçekleştirirler. İyonik bağlanma için suya ihtiyaç vardır ve dolayısıyla self etch bağlayıcı sistemler genellikle su bazlıdır. Aseton ve etanol gibi yardımcı solventler de bu sistemler içerisine dahil edilebilir (115).

Self etch bağlayıcı sistemler pH değerlerine ve asitleme potansiyellerine göre kuvvetli ($\text{pH} \leq 1$), orta ($\text{pH} \approx 1,5$) ve zayıf ($\text{pH} \geq 2$) olarak da sınıflandırılırlar. Zayıf self etch bağlayıcı sistemler dentini yüzeysel bir şekilde demineralize ederken kollajen lifler etrafında hidroksiapatit kristalleri tamamen çözünmemiş bir halde bulunur. Bu sayede iyonik bir bağlanma da sağlanabilir. Ayrıca smear tıkaçları dentin kanallarından tamamen uzaklaştırılmaz. Zayıf self etch bağlayıcı sistemlerle yüzeysel bir hibrit tabaka oluşumu sağlanır. Zayıf self etch bağlayıcı sistemlerde reçine uzantılarının istenilen derinlikte olmaması ve ince bir hibrit tabaka oluşması nedeni ile mikromekanik retansiyonun yetersiz olduğu düşünülmektedir. Fakat self etch sistemlerin bağlanma direnci değerleri üzerinde hibrit tabaka kalınlığının ve reçine uzantılarının oluşmasının çok etkili olmadığı belirtilmektedir. Bu sistemlerin bağlanma direnci değerlerinde monomer ile hidroksiapatit arası kimyasal etkileşimin de etkin bir rol aldığı ileri sürülmektedir. Kuvvetli self etch bağlayıcı sistemler dentin yüzeyinde etch & rinse sistemlerin gösterdiği etkiye benzer etki gösterirler. Reçine uzantılarının oluşmasıyla beraber hidroksiapatitlerin uzaklaştırılması ve kalın bir hibrit tabaka oluşumu gözlenir. Orta kuvvetli self etch bağlayıcı sistemler zayıf ve kuvvetli self etch bağlayıcılar arasında olan özellikler gösterirler. Hibrit tabaka kalınlığı kuvvetli olanlara göre daha azdır, fakat zayıf olanlara göre mine ve dentin dokusu ile daha iyi mikromekanik bağlanma meydana getirir (105,116).

2.3.2.5. Cam İyonomer Bağlayıcı Sistemler

Cam iyonomer bağlayıcı sistemler, mine ve dentin dokusunda herhangi bir yüzey hazırlığı yapmadan bu dokulara bağlanabilen tek materyaldir. Bununla birlikte zayıf polialkenoik asit ile yüzeye işlem yapılması bağlanma direncini anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir. Bu cam iyonomer bağlanma bir ya da iki aşamalı uygulama ile elde edilebilir. Kısa süreli polialkenoik asit uygulaması yüzey temizler smear tabakasını kaldırır ve kollajen fibrilleri 0,5-1µm derinliğe kadar açığa çıkarır. Daha sonra cam

iyonomer bileşenler bu bölgeye difüze olur ve mikromekanik bir bağlanma oluşur. Ayrıca polialkenoik asitin karboksil grupları ile hidroksiapatitin kalsiyum iyonları arasında bir kimyasal bağlanma meydana gelir, böylece kollajen fibrillerine bağlı bir halde bulunur. Reçine esaslı self etch sistemlerle cam iyonomerler arasındaki temel fark cam iyonomerlerin daha yüksek moleküler ağırlığa sahip polikarboksil esaslı polimerleri içeren self etch sistemler olmasıdır. Bu özellik cam iyonomerlerin infiltrasyon yeteneklerini sınırlar ve yalnızca çok ince bir hibrit tabaka meydana gelir (117).

Dentin bağlayıcı sistemler bir çok materyalin birleşimiyle oluşmuşlardır. Yeni kimyasalların kullanımı, dentinin asitlenmesi, polimerizasyon için kullanılan yöntemlerdeki değişiklikler ve diş-restorasyon arasında tam örtücülük sağlanmasının gerekliliği yeni materyaller ve tekniklerin biyolojik güvenilirliği ile ilgili soruları artırmıştır.

2.4. Materyallerin Biyolojik Özellikleri

Dental materyallerin dokularda lokal ve sistemik olarak meydana getirdiği toksisite ve duyarlılık (sensitivite) materyallerin biyolojik özelliklerini oluşturur. Birçok dental materyal çeşitli dokular ile (mine, dentin/pulpa, periodonsiyum, yanak, dil) lokal olarak karşı karşıya gelir ve bu yüzden oluşan lokal reaksiyonlar farklı olabilir. Hücreler üzerindeki lokal toksik etkileri, klinik pulpa çalışmaları ya da doku kültür testleri ile değerlendirmek mümkündür. Materyaller, çeşitli toksik bileşenleri serbestleyebilir. Toksisiteyi belirleyen iki önemli klinik faktör vardır; potansiyel toksik maddenin konsantrasyonu ve toksik maddenin etkisine maruz kalma süresidir.

Biyomateryallerin etkileşimleri nedeni ile oluşan sistemik etkileri izlemek oldukça zordur. Biyouyumluluk ile ilgili verilerin çoğu uzun süreli kullanım ve indirekt gözlemler sonucu elde edilmiştir. Biyouyumluluk, yeni ya da alternatif restoratif materyallerin potansiyel risklerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

2.4.1. Biyouyumluluk

Bir materyalin biyouyumluluğu materyalin; tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlıdır (4). Biyouyumluluk bir materyalin canlı dokular ile temas halinde iken sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi doku reaksiyonları oluşturmamasıdır (5). Biyouyumlu bir materyal tamamen inert (etkisiz) olmayabilir. Bu nedenle uygun doku reaksiyonunun belirlenmesi gerekir. Meydana

gelebilecek doku reaksiyonları genellikle çeşitli uzmanlar tarafından spesifik kurallara göre değerlendirilir. Böylece bu materyalleri kullanacak olan klinisyenler açısından piyasaya sürülen materyallerin biyolojik uyumluluklarının karşılaştırılması bakımından bu değerlendirmeler yol gösterici olur. Bir materyalin biyolojik uyumluluğu bu maddeden çözünme ya da aşınma sonucu açığa çıkan bileşenlerle belirlenir. Bu bileşenler hücrelere zarar verebilir ya da belirli proteinlerin (interlökin-1 interlökin-6 gibi inflamasyon öncesi mediatörler) hücrede sentezlenmesini uyarabilir ve iltihapsal reaksiyon oluşmasına neden olabilirler. Benzer şekilde proteinlerin yüzeyde birikmesi ya da absorbe edilmesi veya materyalle ekstraselüler matriksin etkileşimi bir materyalin biyolojik davranışlarını belirlemede çok önemli bir rol oynar (örneğin materyal yüzeyinde hücre / bakteri bağlanması). Diğer taraftan materyallerin biyolojik davranışlarını etkileyen faktörlerden proteinlerin adezyonu (tükrük proteinleri tarafından pelikülün oluşturulması), materyalin fiziksel (ıslatabilirlik, yüzey enerjisi) ve kimyasal özelliklerinden etkilenir (6).

2.4.2. Toksisite

Toksisite bir materyalin kimyasal olarak biyolojik sisteme zarar vermesi şeklinde tanımlanmaktadır. Biyolojik sistemde meydana gelen zararlar lokal ve sistemik olarak iki şekilde oluşmaktadır. Lokal toksisitede reaksiyonlar materyalin uygulandığı alanda oluşurken sistemik toksisitede reaksiyonlar uygulanan alandan farklı bölgelerde meydana gelmektedir (118).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerden ağız ortamına salınan maddeler, tükürük veya solunum yolu ile vücuda girip kan dolaşımı ile çeşitli organlara ulaşarak *sistemik toksisiteye* neden olabilirler. Bu nedenle materyalden etkilenen bölge materyalin uygulandığı bölgeden farklılık gösterir. Maddelerin yüksek konsantrasyona ulaşması organ fonksiyonlarını etkileyebilir. 24 saatlik süre sonunda akut sistemik toksisite görülürken, 3 aya kadar subakut ve daha uzun sürelerde kronik sistemik toksisite görülebilir. Kronik toksisite hakkında çok az literatür bulunmaktadır (118).

Sistemik toksisitenin belirlenmesinde genellikle deney hayvanları kullanılır. Test maddeleri değişik şekillerde uygulanır. Eski uygulamalarda rutin olarak kullanılan akut LD₅₀ testi yerine günümüzde deney hayvanlarının ölmediği limit testleri (belirli doz uygulaması, örneğin 2000 mg/kg vücut ağırlığı) gibi testler uygulanmaktadır (6).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerden salınan maddeler, uygulandıkları bölgeye komşu dokularda (ağız mukozası, diş eti, pulpa, alveol kemiği) *lokal toksisite* reaksiyonuna neden olabilirler.

Lokal toksisite, lokal doku uyumluluğundan farklıdır. Lokal toksisite biyolojik moleküllerle toksik maddelerin kimyasal etkileşimi sonucu oluşurken lokal doku uyumu, materyal toksisitesi dışında, restorasyon sınırları içinde bakterilerin bulunması veya otopolimerizan reçinelerin neden olduğu ısı gibi nedenlerle oluşur.

Diş hekimliğinde kullanılan materyaller dört tip alerjik reaksiyondan tip 1 (ani reaksiyon) ve tip 4 (gecikmiş reaksiyon) reaksiyonlarına neden olabilir. Alerjik reaksiyona neden olan doz toksik dozdan çok daha küçüktür.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkileri de değerlendirilir. Materyallerden salınan maddeler DNA'da bazı değişikliklere neden olabilir. Hücreler tarafından onarılan bu genotoksik hasarların bir sonraki hücre nesline aktarılmasını önlemek için programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşir. Genotoksik hasarın bir sonraki hücre nesline geçmesine mutajenisite denir. Bu tür hücrelerden salınan maddeler malign tümör oluşumuna neden oldukları için karsinojenik etkiye sahiptir. Embriyonik gelişim sırasında oluşan malformasyonlar materyaller nedeni ile oluşmuş ise bu etkiye teratojenisite denir (118).

2.4.3. Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri

Geçmişte materyallerin biyouyumluluk değerlendirmelerinde insanlar üzerinde yapılan testler kullanılmıştır. Ancak günümüzde yeni bir materyalin insanlarda uygulanmadan önce geniş kapsamlı testler ile biyouyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Yeni bir materyalin biyolojik olarak kabul edilebilirliğini saptamak için günümüzde çeşitli testler kullanılmaktadır (119). Tek bir test metodu, materyale bağlı olarak gelişen çeşitli reaksiyonlar içerisinde yalnız bir tip reaksiyonun saptanması için uygulanır. Pulpa dentin testinde bir materyalin pulpa dokusuna uyumluluğu incelenirken bu test ile materyalin alerjik reaksiyonu değerlendirilemez (6). Diğer taraftan test metodlarının her biri meydana gelen reaksiyonların tek bir açıdan değerlendirilmesini sağlar. Örneğin hücre kültür testlerinde materyalin etkisi izole edilen hücrelerde saptanmaktadır. Ancak bu testten elde edilen sonuçlar hastalarda oluşacak reaksiyonlar ile ilgili yeterli bilgi verememektedir. Benzer şekilde metal bir alaşım hücre kültür testlerinde reaksiyon oluşturmaz ancak ağız içerisindeki pH'ın

düşmesi sonucu materyal dokularda reaksiyona neden olabilir. Hücre kültür testleri ile sadece hastada oluşabilecek, örneğin dişeti enflamasyonu gibi istenmeyen bir reaksiyonun mekanizması hakkında fikir edinilebilir. Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit *in vitro* test yöntemleri ile başlanır. Değerlendirmelere daha pahalı ve uzun zaman gerektiren hayvan testleri ile devam edilir. Bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde kullanım testleri (*in vivo* değerlendirme) gibi daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. (6). Uygulanan testlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2’ de gösterilmektedir.

Tablo 2.2: Biyouyumluluk test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (119).

Test	Avantaj	Dezavantaj
İn vitro testler	Hızlı uygulama Ucuz Standardize edilebilir Deney ortamının kontrolü kolaydır Geniş bir skalada değerlendirme yapılır	İn vivo ortamla ilişkisi tartışmalıdır
Hayvan testleri	Karmaşık sistemik etkileşimler tespit edilebilir İn vitro testlere göre daha geniş kapsamlı ve daha gerçekçidir	Kullanılan materyalle ilişkisi tartışmalıdır Pahalı Etik açıdan tartışmalıdır Kontrolü zor Sonuçların değerlendirilmesi zordur
Kullanım testleri	Kullanılan materyalin dokularla ilişkisi belirlenir	Çok pahalıdır Daha fazla zaman Etik açıdan daha fazla tartışmalıdır Kontrolü zor olabilir Sonuçların değerlendirilmesi zordur

2.4.4. İn Vitro Test Yöntemleri

Biyolojik uyumluluğun değerlendirilmesi için uygulanan *in vitro* testler bir test tüpü içinde, hücre kültürünün bulunduğu bir kap içinde ya da canlı organizmanın dışında yapılır. Bu testler materyalin bir bileşeninin bir hücre, enzim ya da diğer izole edilmiş biyolojik sistemlerle temas ettirilerek uygulanmasını gerektirir. Bu test metodu, arada herhangi bir bariyer olmaksızın materyalin hücre ile temas ettirilerek direkt uygulanabildiği gibi materyal ile hücre arasında küçük bir bariyer yerleştirilerek indirekt bir şekilde de uygulanabilir. Bu tür *in vitro* testlerde materyallere temas ettirilen hücrelerin sayıca canlılık oranı, büyüme oranı, metabolik fonksiyonları ya da diğer hücresel fonksiyonları ölçülerek materyalin etkisi saptanır (120).

İn vitro testlerin diğer biyoyumluluk testlerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Avantajları; hızlı bir şekilde uygulanması, hayvan ve insan deneylerine göre daha ucuz olmaları, standardize edilebilmeleri olarak sıralanabilir. Diğer yandan bu testlerin dezavantajı ağız ortamı gibi karmaşık biyolojik ortamların ve dokular üzerinde materyallerin meydana getireceği etkinin bu testler ile saptanan sonuçlarla tamamen uyuşmaması olarak açıklanabilir (119).

İn vitro sitotoksite testlerinde kullanılan biyolojik sistemler:

- Organ kültürleri
- Hücre kültürleri
- Hücre organelleri olabilir.

Dental materyallerin *in vitro* olarak sitotoksitesini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir, yalnız çok az test örneğin diş germi gibi organ kültürleri üzerinde uygulanmıştır (121).

2.4.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspanse ederek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre

süspansiyonu 36 °C’de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya *hücre kültürü* denir (122).

Hücre kültürleri; hücre yapısının, fizyolojik özelliklerinin, hücrelerdeki patolojik değişikliklerin, çoğalma ve tamir mekanizmalarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bunların dışında hücre kültürü moleküler biyoloji, viroloji ve toksikolojide farklı maddelerin etkilerinin belirlenmesinde de kullanılır. İlaçların hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde, kanser ve nörolojik hastalıkların mekanizmalarının aydınlatılmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır. Aynı zamanda materyallerin mutajen etkilerinin incelenmesi, materyallerin neden olabileceği yapısal ve kromozomal bozuklukların değerlendirilmesinde de hücre kültürü kullanılan yöntemlerden birisidir (123).

Hücre kültürlerinin kullanılmasının bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Avantajları (122);

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

Dezavantajları;

- İn vivo koşullarda uygulanan materyallerin hücreler farklı hücrelerle etkileşim içinde olmasına karşın *in vitro* koşullarda tek tip hücre kullanılarak test yapılması,
- Steril koşulların sağlanma zorluğu, bakteriyel ve kimyasal kontaminasyondan korunmak için dikkatli çalışma gerektirmesi,

- Çok sayıda hücre üretmenin zaman alması,
- Kùltürlerin hazırlanması ve mikroskopik incelemenin uzmanlık gerektirmektedir.

Hücre kùltürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kùltürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kùltür edilmesiyle elde edilir. Diş eti ve pulpa fibroblastları, primer kùltür hücrelerine örnektir. Primer hücre kùltürünün elde edilmesinde birçok hayvan türünün herhangi bir dokusu kullanılabilir. Primer hücre kùltürleri doğru bir şekilde elde edilirse biyopsi alınan doku hücrelerinin benzer özelliklerini taşırlar. Ancak bu hücrelerin çoğaltılmasında bazı problemler ortaya çıkabilir. Gelişimin farklı evrelerindeki embriyolardan veya farklı yaştaki insanlardan alınan doku örneklerinden elde edilen primer hücre kùltürlerinde önemli fizyolojik farklılıklar gözlemlenir. Bunun yanı sıra hücrelerin doku veya organdan ayrılma tekniğı de kùltür özelliklerini etkiler (6,123).

Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı *in vivo* özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. Fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleri (HeLa) çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatlarıdır (6,119).

Materyallerin sitotoksitesinin ölçülmesinde primer hücre kùltürleri devamlı hücre hatlarına göre daha uygundur. Ancak primer hücreler tek bir bireyden elde edilmesi, sınırlı genetik değişkenliklere sahip olması, viral veya bakteriyel ajanları barındırmasından dolayı özelliklerinin değişebilmesi ve bazen kùltür içerisine yerleştirildiklerinde hızlı bir şekilde *in vivo* fonksiyonlarını kaybetmeleri gibi çeşitli kullanım kısıtlamaları vardır. Bu nedenlerden dolayı genetik ve metabolik stabilitesi daha iyi olan devamlı hücrelerin kullanılması *in vitro* değerlendirme metotlarının standardize edilmesinde önemlidir (119).

2.4.6. Sitotoksite

Uygulanan materyalin hücrenin yaşamına olan etkisi biyouyumluluğu belirleyici etkindir. Sitotoksite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (124).

Sitotoksite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in-vitro olarak değerlendirilmektedir. Sitotoksite testleri (125):

- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre membranı
- Hücre organelleri
- Protein veya DNA sentezi
- Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir.

Sitotoksite testlerinde hücre ölümleri saptanır. Genel olarak iki çeşit hücre ölümü gerçekleşir. Bu hücre ölümleri apoptoz ve nekrozdur. Yoğun bir sitotoksik uyaran olduğu zaman hücre, yaşam döngüsünden uzaklaşır ve apoptoz olarak isimlendirilen programlanmış hücre ölümleri gerçekleşir. Bu hücre ölümü programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada iç düzenin bozulmadığı bir olaydır. Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılarak özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülürler ve birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde hücreler etrafında açık bir hale ile görülmektedir (126).

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (126).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimi ile membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin

vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (126,127).

Toksik bir etkene maruz kalan hücrelerin ölümü genellikle nekroz şeklinde gerçekleşir. Nekroz sonucu hücrelerde organeller çalışmaz hale gelir ve lizozomlardan otolitik enzimler salgılanır (127). Patolojik hücre ölümü olan nekrozda ATP miktarı azalır, hücre homeostazı hızla bozulur ve enflamasyon yanıtı gelişir (128).

Çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde, enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur. Sodyum ile suyun hücre içerisine girmesi ile hücre şişer. Hücre ile birlikte mitokondrilerde de şişme gözlenirken diğer organeller ise plazma içinde dağınık bir hale gelir. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde enflamasyon ile birlikte doku bütünlüğü bozulur (128).

Sitotoksite *in vitro* biyoyumluluk testlerinde en yaygın kullanılan test yöntemidir. İn vitro sitotoksite testlerinin avantajları şunlardır (121,129,130):

- Test edilecek malzemenin, diğer metabolik olaylardan bağımsız olarak, hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon üzerindeki etkisi değerlendirilebilmektedir.
- Aynı anda çok sayıda örnek, kısa zamanda test edilebilmektedir ve diğer testlere oranla daha ekonomiktir.
- Deneyler sonucunda kantitatif sonuçlara ulaşılmaktadır.
- Materyallerin toksisitesi kullanım testlerine oranla daha hassas şekilde değerlendirilebilmektedir.
- Deneyler sırasında test koşulları standardize edilebilmektedir.

İN vitro sitotoksite testlerinin dezavantajları ise şunlardır (121,129):

- Her test için bir tür hücre kullanılması gerekmektedir.
- Kültür hücreleri konak hücrelerinden farklılık göstermektedir.
- İn vivo koşullarda meydana gelebilen enflamatuvar reaksiyonlar ve diğer doku savunma reaksiyonlarının kültür ortamında oluşmaması önemli bir eksikliktir.

Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önemlidir. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile gerçekleşebilir. Kullanılacak hücre tipinin seçimi de önem taşımaktadır. Uluslararası Standardizasyon Birliği'nin (ISO) (131) açıkladığı sitotoksite test standartlarında, L929,

Balb/3T3 ve WI38 gibi hücre serilerinin kullanılması önerilmektedir. Bu hücrelerin üreme karakterleri ve homojen morfolojileri nedeni ile *in vitro* sitotoksitenin tespit edilmesinde kolaylık sağladığı açıklanmaktadır (121,130).

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için ISO, bazı kriterler belirlemiştir. ISO 7405 (132), Diş hekimliğinde kullanılan medikal materyallerin klinik öncesi biyoyoumluluk değerlendirmesi için önerilen test protokollerinden bir tanesidir. Bu protokolde ise agar difüzyon ve filtre difüzyon metotları detaylı olarak anlatılmaktadır. ISO 10993, medikal ürünlerin biyolojik olarak değerlendirilmesi için farklı metotların önerildiği diğer bir test protokolüdür. ISO 10993–5 *in vitro* sitotoksite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür. *In vitro* sitotoksite değerlendirmelerinde önerilen test metotları şunlardır (124,131):

- 1) a-Direkt hücre kültürü
 - i. Direkt temas testi
 - ii. Ekstrakt testi
- b- Bariyer test metodu
- 2) Agar difüzyon testi
- 3) Filtre difüzyon testi
- 4) Dentin bariyer testi

2.4.6.1. a- Direkt hücre kültürü

Direkt temas testinde dental materyal veya bileşenlerinin doğrudan kültür içerisindeki hücrelerin üzerine kısa sürelerde(> 24 saat) uygulanmasıdır. Direkt temas yoluyla yapılan testte materyal hücreler ile veya kültür medyumunu ile fiziksel bir temas halindedir. Suda çözünebilen materyaller medyum içerisinde çözünebilirler ve böylece çok iyi bir materyal hücre teması sağlanır. Suda çözünmeyen materyallerde ise birkaç yolla hücreler ile direkt temas sağlanabilir (133). Bu temas:

1. Test örneğinin hücrelere mümkün olduğunca yakın yerleştirilmesi ile,
2. Test örneğinin kullanılan hücrelerin tam üzerine uygulanması ile,
3. Test örneğinin hücre kültür kabının tabanına yerleştirilmesi ve hücre süspansiyonunun örnek üzerine uygulanması ile,
4. Hücrelerin direkt olarak örnekler üzerine yerleştirilerek kültür edilmesi metotları ile sağlanır.

Ekstrakt yolu ile temas testinde bir sıvı çözücü içerisinde materyalden çözünen bileşenlerin hücreler ile temas ettirilerek sitotoksitesi incelenmektedir. Ekstraksiyon sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı çözücüler serum içeren medyum, serum içermeyen medyum, fizyolojik tuz solusyonu veya diğer uygun çözücülerden biri olabilir (124,131).

Ekstraksiyon ortamı, materyalin toksikolojik riskinin doğru belirlenebilmesi için materyalin klinik kullanım ortamını taklit etmesi ve bu ortamın materyalin kimyasal yapısında önemli değişiklikler yapmaması gerekmektedir. Ekstrakt içinde maddelerin konsantrasyonu ve hücrelere temas edecek materyalden salınacak bileşenlerin oranı ekstraktı alınan materyalin; yüzey alanına, ekstraksiyon sıvısının hacmine, materyalin pH'sına, kimyasal çözülebilirliğine, difüzyon oranına, osmolaritesine, ısıya, zamana ve diğer faktörlere bağlıdır. Önerilen ekstraksiyon ortamları (124,131):

- a) 24 saatten az olmamak üzere 37 ± 2 °C
- b) 72 ± 2 saat 50 ± 2 °C
- c) 24 ± 2 saat 70 ± 2 °C
- d) 1 ± 0.2 saat 121 ± 2 °C

b- Bariyer test metodu

Ağız ortamında dentin, kaviteye uygulanan materyal ile pulpa arasında bariyer görevini üstlendiği için direkt materyal-hücre teması testleri klinik durumu taklit etmemektedirler. Bu nedenle bariyer test metodunda dentini taklit eden ve dentin gibi test materyali bileşenlerinin difüzyonuna izin veren çeşitli maddeler bariyer olarak kullanılırlar (124).

Çalışmamızda kullandığımız son yıllarda geliştirilen ve ticari olarak pazarlanan hücre kültür insert sistemleri bariyer olarak kullanılmaktadır. Bu sistemde materyal insert içine yerleştirilerek asılı bir şekilde medyum içinde tutulur. Bariyer görevi gören ve insertin alt kısmında bulunan poröz bir membran materyalden çözünen bileşenlerin geçişine olanak sağlayarak medyum tabanında bulunan hücrelerle temas etmesini sağlar (134).

2.4.6.2. Agar Difüzyon Testi

Agar difüzyon testi, toksisite deneylerinde en uzun süredir kullanılan bariyer test yöntemidir. Bu yöntem ile hücrelerin üzerini örten agardan difüze olan test materyalleri bileşenlerinin toksisitesi incelenir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucu nötral kırmızı

boyanın, hücre membranındaki geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikme miktarına göre hücre aktivitesini değerlendiren bir test metodudur. Hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı gelişen yanıtlar incelenir. Basit ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen agarda çözünemeyen veya difüze olamayan test materyali veya bileşenleri hücreler üzerinde her hangi bir etki gösteremezler (124).

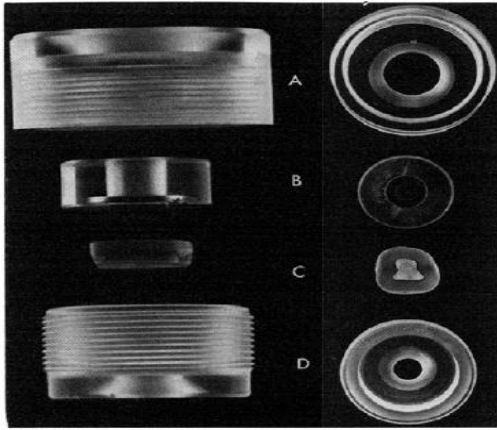
2.4.6.3. Milipor Filtre Difüzyon Testi

Milipor filtre metodunda filtre olarak selüloz asetat kullanılır. Filtrenin bir tarafına primer hücreler yerleştirilirken filtrenin diğer tarafına test materyali yerleştirilir. Hücrelerde meydana gelen hasarlar dekolorizasyon alanının ölçülmesi ile veya boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile tespit edilir. Test materyallerin, hücre üzerinde sitotoksik etki göstermesi için test materyalinden salınan bileşenlerin 0.45 µm filtreden difuze olmaları gerekmektedir (119,124).

2.4.6.4. Dentin Bariyer Testi

Sitotoksite testlerinde bariyer olarak farklı materyaller kullanılmıştır. Dentin bariyer testlerinin geliştirilmesi sitotoksite testlerini tamamlayan bir metottur. Outhwaite ve ark. 1974 yılında geliştirdikleri bölümlü oda (split chamber) aleti ile dentinin geçirgenlik özelliğini incelemişler ve materyallerin biyolojik uyumluluklarının değerlendirilmesinde dentinin geçirgenlik özelliğinden yararlanılması fikrini ortaya atmışlardır (135).

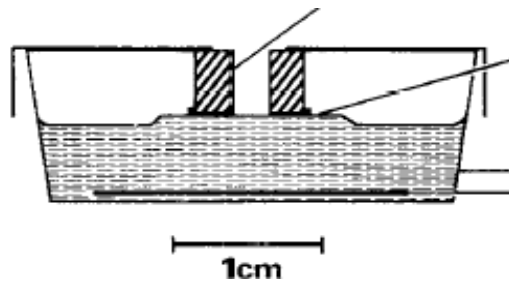
Outhwaite ve ark. (135) yaptıkları çalışmada 16–29 yaş arası hastaların sürmemiş 3.büyük azı dişlerinin kuronal orta bölümünden elde ettikleri 1,0–1,6 mm kalınlığında dentin disklerini split chamber cihazında kullanmışlardır. Dentin diskini iki plastik halka arasına sıkıştırmış ve bu halkalarıda birbiri içine geçen iki parçanın orta kısmına yerleştirmişlerdir. Sıvı basıncının uygulanabilmesi için test cihazının orta kısımda açıklık bırakmışlardır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Split chamber cihazı (135)

a) üst rezervuar (odanın üst kısmı) b) plastik halka c) dentinin yerleştiği kısım
d) odanın alt kısmı

Tyas 1977 yılında yaptığı çalışmada dentin bariyer varlığında, materyallerin biyolojik etkilerini kendi geliştirdikleri yeni bir cihaz ile incelemişlerdir (Şekil 2.3). Üçüncü büyük azı dişlerinden elde edilen $150 \pm 10\mu\text{m}$ kalınlığındaki dentin diskleri bu çalışmada kullanılmış ve Pyrex silindir ile kavite şekli oluşturulmuştur. Dentin diskleri bu silindirin alt kısmına sabitlenmiş ve petri kabının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra bu test düzeneği ile dentine uygulanan test materyalinin toksik etkisi kabın tabanında bulunan hücreler üzerinde incelenmiştir (136).



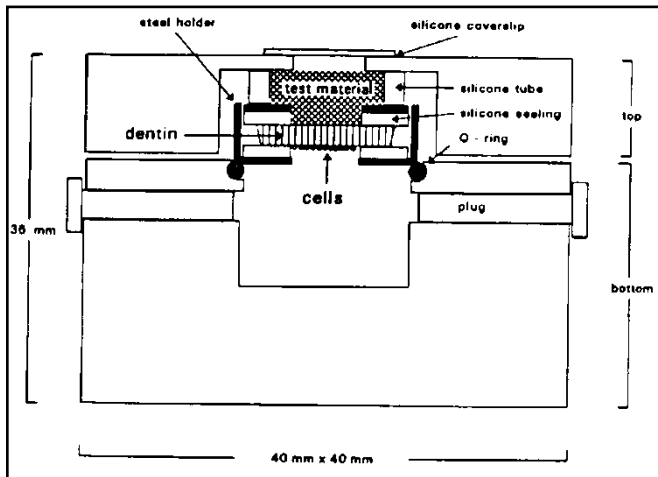
Şekil 2.3:Tyas'ın tasarladığı bariyer test cihazı (136).

Hume ise 1985 yılında yeni bir dentin bariyer test cihazı tasarlamıştır (137). Kök kısımları uzaklaştırılmış molar dişlere birinci sınıf kavite hazırlanmış daha sonra bu diş steril plastik taşıyıcıya mum ile sabitlenmiştir. Kavite hazırlığı sırasında kalan dentin kalınlığının (1,6–2 mm) kontrol edilememesi ve bu kalınlığın bazen fazla olması

dolayısıyla difüze olan materyalin konsantrasyonunun belirlenememesi bu cihazın dezavantajları olarak açıklanmıştır (130).

Test cihazlarının farklı materyallerden yapılması ve farklı boyutlarda olması ayrıca ticari olarak satılmamaları bu cihazların standart test uygulamalarında kullanılmasını engelleyen faktörlerdir. Bu nedenle dental materyallerin sitotoksite değerlendirmelerinde kullanmak için Schmalz ve ark. hücre kültür testlerinde kullanılan perfüzyon cihazında bazı değişiklikler yapmışlardır (138).

Ticari olarak pazarlanan diğer bir dentin bariyer test cihazı tabanı 40mm x 40mm ve yüksekliği 35 mm olan polikarbonattan yapılmış perfüzyon odasına sahip bölümlü oda aygıtından modifiye edilmiştir (Şekil 2.4). Orjinal perfüzyon odasındaki membran dentin diski ile yer değiştirilerek kullanılır (138). Bu dentin diski insan veya sıgır dişlerinden kesilerek hazırlanmış farklı kalınlıklardaki dentin disklerinden oluşabilir (139). Bu dentin diskinin pulpaya bakan tarafı asitle dağlanmışdır. Dentin diski bölümlü odaya biyolojik olarak uyumlu paslanmaz çelik bir tutucu ile yerleştirilir. Böylece bu oda dentin diski ile iki bölüme ayrılır. Hücreler dentin diskinin asitle dağlanmış tarafında üretilir ve hücrelerin üretildiği bu kısım pulpa tarafı (alt oda) olarak tanımlanır. Uygulanacak test materyali silikon bir tüp içinde dentin diskinin üst kısmına uygulanır. Materyalin uygulandığı bu kısım kavite bölümü olarak tanımlanır. Cihazın pulpa bölümü bir taraftan medyum şişesine bağlı diğer tarafı ise peristaltik pompa ve atık medyumun toplandığı şişeye bağlıdır.



Şekil 2.4: Dentin bariyer perfüzyon cihazı (138)

2.4.7. Sitotoksite Değerlendirme Yöntemleri

Sitotoksite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar:

1. Canlılık (viability) değerlendiren testler: kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
2. Yaşam (survival) değerlendiren testler: uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler:
4. Metabolik sitotoksite değerlendirme testleri:

2.4.7.1. Canlılık Değerlendirme Testleri:

Canlılık testleri toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılır. Canlılık testleri membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile veya membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan ya da notral kırmızı gibi boyaların kullanılması ile yapılır (122).

- Nötral kırmızı testi: Nötral kırmızı vital bir boyadır. Canlı hücrelerin içerisinde birikir ve bu sayede yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılır. Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu hemosimetre adı verilen bölümlenmiş cam üzerine yerleştirilir. Daha sonra optik mikroskop altında hemosimetredeki canlı hücrelerin yüzde oranı tespit edilir (140).
- Tripan mavisi testi: Tripan mavisi non-vital bir boyadır. Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikir. Hemosimetre yardımı ile tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilir (119). Vital ve non-vital boyaların kullanıldığı test yöntemlerinde mikrotitrasyon plaka okuyucuları kullanılarak spektrofotometrik olarak test materyallerinin sitotoksik etkileri değerlendirilir (140).
- Floresan metodu: Diasetil floresan canlı hücre içerisine girebilen bir boyadır (140). Propidium iodide boyası ise membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine girer ve DNA ile RNA'yı da etkiler. Floresan boyalar ile boyanmış hücreler flow sitometri veya ışık kaynağı ve filtrelerle sahip floresan mikroskobu

ile değerlendirilirler. Bu değerlendirme floresan görüntü veren hücreler ölü hücre anlamına gelmektedir (140).

2.4.7.2. Yaşam Değerlendirme Testleri

Kısa dönem testleri hızlı ve kolay uygulanabilir olmasına rağmen sadece değerlendirme esnasındaki ölü hücreleri göstermektedir. Bununla birlikte toksik etkilere maruz kalan hücrelerde etkiler birkaç saat, gün veya daha geç görülmektedir. Bu nedenle canlılık oranının belirlenmesinde, kısa dönemde ortaya çıkan toksisite reaksiyonlarda geri dönüşüm olabildiğinden uzun dönem testleri kullanılmaktadır (122).

Hücre yaşamı (survival) seyreltilmiş tek tip hücre süspansiyonundan hücrelerin ayrı ayrı koloni oluşturabilme kabiliyeti olarak tanımlanır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi (plating efficiency) hücre yaşamının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (122).

2.4.7.3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri:

Kültür içerisindeki hücrelerin bir kaç gün sonraki sayımı materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesinde de kullanılır. Ancak test süresi içinde belirli bir anda yapılan hücre sayımı belirgin bir sonuç vermediğinden dolayı en azından testin erken aşamalarında bir büyüme eğrisinin elde edilmesi gereklidir. Hücre sayımında büyüme eğrisi analizleri az sayıda örnek varsa kullanılabilir ancak sayı artarsa bu analizler çok kullanışlı değildir. Birçok örneğin incelendiği durumlarda belirli bir anda hücre sayımı (3 günden 5 güne kadar etkiye maruz kalan hücrelerin sayısı) yapılarak bu analiz uygulanır. Büyüme eğrisinde kontrol hücrelerinin log fazı (üreme fazı) tercihende mid-log fazı içinde yer aldığı an seçilmelidir. Herhangi anlamlı bir etki sonucu elde edilen gelişme eğrisinin ikinci bir gelişme eğrisi ile desteklenmesi gerekir ya da diğer değerlendirme yöntemleri kullanılmalıdır (122). Bu testte kullanılan yöntemler şunlardır:

- ³H-timidin testi: Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bir radyoizotop olan ³H-timidin proliferasyon sırasında uygulanarak hücre içine alınan bu maddenin radyoaktivite ölçümü ile yeni DNA sentezi tespit edilerek proliferasyon üzerindeki etkisi ölçülür.
- Bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik: İmmunohistokimya yöntemi ile işaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve doku antijenlerinin

gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine); DNA sentezini tayin etmek için kullanılan timidin testine eşdeğer bir yöntemdir. BrdU timidin benzeri bir maddedir ve DNA içine girer. BrdU uygulanan proliferasyon evresindeki canlı hücreler Anti- BrdU monoklonal antikor ile boyanarak sayımları yapılabilir veya değerlendirmede ELİSA (enzyme-linked immunosorbent assay) kiti de kullanılabilir (133,141).

2.4.7.4. Metabolizma Değerlendirme Testleri:

Örnekleme sayısı fazla olduğu durumlarda survival belirleme testlerinin hazırlık aşamaları ve testlerin analizleri zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca bazı düşük yoğunlukta hücre hatlarının özellikle yeni izole edilmiş hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri zayıftır. Bu nedenle yüksek yoğunluğa sahip hücrelerin değerlendirilmesi için bazı alternatif test metotları geliştirilmiştir. Bu testler ile doğrudan hücre yaşam (survival) değerlendirilmesi yapılamaz. Ancak yapılan bu testlerde hücre sayısındaki net artış, total protein miktarı veya DNA artışı belirlenir. Aynı zamanda bu test ile tetrazolyum tuzunun formazon kristaline indirgenmesi ya da DNA veya protein sentezi saptanarak devam eden metabolik aktivite belirlenir (122).

Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksisiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler (140). Metabolizma testlerinde hücrelerin canlılıkları mikropilaya okuyuculu spektrofotometre yardımı ile tespit edilir. Ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu gruba giren testler şunlardır:

- MTT testi: Kolorimetrik MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testi dental materyallerin sitotoksikite değerlendirmelerinde çok sık kullanılır. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Formazan oluşumu ise, spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesi veya test örneğinin çevresindeki formazan ışığın elektron mikroskopuyla belirlenmesi yöntemleriyle saptanmaktadır (122,133).

- Alamar mavisi testi: Alamar mavisi boyası ile metabolik aktivitenin belirlendiği dolayısıyla hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği florometrik (floresan ölçümü ile)/kolorimetrik bir test yöntemidir. MTT testine göre pahalı bir yöntemdir ancak renk değişiklikleri bu yöntemde hem florometrik hem de spektrofotometrik olarak tespit edilir. Ayrıca bu boya toksik olmadığından hücre canlılığı değerlendirmelerinde birden fazla boyama imkanı sağlar (133).
- LDH testi: Kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemi olan laktat dehidrogenaz (LDH) test yönteminde hücrede membran hasarı veya sitolizis durumunda açığa çıkan sitozolik bir enzim olan laktat dehidrogenazın ölçümü yapılarak sitotoksite belirlenir (133).

2.4.8. Glutasyon Tespiti:

Glutasyon (γ-glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. Glutasyonun, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutasyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. *Reaktif Oksijen Ürünleri* nin (ROS) oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. Bazı floresan ajanlar intraselüler GSH ile reaksiyona girerek glutasyonun hücresel miktarının tespitine olanak sağlar (142-144).

Hücrede glutasyon düzeyinin belirlenmesine olanak sağlayan floresan özellikli maddeler hücre içerisindeki GSH ile reaksiyona girerler. Monobromobimane insan hücrelerinde GSH'ın ölçümü için kullanılan maddelere bir örnektir (133).

HEMA ve TEGDMA'nın hücrelerde GSH düzeyini azalttığı bazı çalışmalarda belirtilmiştir(145,146). Intraselüler ROS üretimi ile DNA bazlarında tek sarmalda veya çift sarmalda meydana gelen kırılmalar sonucu DNA hasarı meydana gelir. DNA hasarı sonucu hücre döngüsünde bir gecikme olur. Bunun sonucunda belirli sinyal molekülleri hücre döngüsünün devamı ve DNA onarımı için hücrede aktive olurlar. DNA hasarı onarılamazsa hücrede apoptoz meydana gelir (147).

2.4.9. Apoptoz Değerlendirme Yöntemleri:

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şunlardır (148);

- I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- II. Histokimyasal yöntemler
- III. Biyokimyasal yöntemler
- IV. İmmunolojik yöntemler
- V. Moleküler biyoloji yöntemleri

I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

1. Işık Mikroskobu: a. Hematoksilen Boyama b. Giemsa Boyama

Nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır

2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop

a. Propidium İyodür (PI) b. Hoechst Dye

Floresan mikroskopi, floresan maddeler (örn. Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılarak yapılan boyamanın incelenmesidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile ölü hücrenin ayırımına olanak tanır. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptoz ile veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin yoğunlaşması veya nukleus bölünmesi olan hücrelerin apoptotik hücreler oldukları düşünülür (148).

3. Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozisde en değerli yöntem (“gold standard”) olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Ayrıca subsellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir (148).

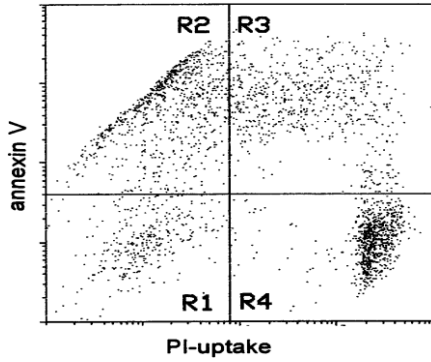
4. Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin, kültür ortamında “flask (cam kap)” veya “plakalarda” büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Mitozise giden hücreler de faz kontrast mikroskobuyla gözlenebilirler fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler (148).

II. *Histokimyasal yöntemler:*

1. Anneksin V Yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde (iç yüzünde) membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne geçerler. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (148). FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil florasan) ve non-vital boya olan propidium iodide (kırmızı florasan) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayrılır (Şekil 2.5)(149).



Şekil 2.5: R1 (PI -, Anneksin V-) canlı hücreler, R2 (PI -, Anneksin V+) erken apoptotik hücreler, R3 (PI +, Anneksin V+) geç apoptotik veya nekrotik hücreler. R4 (PI +, Anneksin V-) hasar görmüş hücreler (149).

2. TUNEL Yöntemi:

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan yöntemdir

3. M30 Yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir

4. Kaspaz-3 Yöntemi:

Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 bu immunohistokimyasal yöntemle belirlenir.

III. *Biyokimyasal yöntemler:*

1. Agaroz Jel Elektroforezi:

DNA kırıklarının gösterildiği yöntemdir. Apoptozda DNA 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. Bu nedenle agaroz jel elektroforez yöntemi apoptozu nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden birisidir (148).

2. Western Blotting

Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metotla belirlenebilir (148).

3. Flow Sitometri:

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar 13- phycoerithrin, FITC ve rhodamine-GG gibi farklı özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir (150). Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır. Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,

b. Anneksin V kullanılarak

IV. İmmunolojik yöntemler:

1. ELİSA

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür.

2. Fluorimetrik yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir

V. Moleküler biyoloji yöntemleri:

DNA microarray yöntemi ile apoptoz ile ilgili gen ekspresyonları tespit edilir (151).

2.4.10. Mutajenite Testleri:

Biyomateriyallerin hücre genetik materyalinde değişiklikler oluşturması genotoksite olarak tanımlanır. Hücreler sahip oldukları bazı mekanizmalarla meydana gelen genotoksik hasarı onarabilirler. Hücrelerde genetik hasarın bir sonraki nesle aktarılması programlanmış hücre ölümleri ile engellenebilir. Ancak genetik hasar bir sonraki nesle aktarılırsa bu etkiye mutajenite denir. Bir materyalin bakteri veya memeli hücre DNA'sına olan etkisi bazı test yöntemleri ile incelenmektedir. AMES testi en sık kullanılan test yöntemidir. Genetik yapısı değiştirilmiş bakteriler AMES test metodunda kullanılmaktadır. Bu bakteriler özel agar kültüründe çoğalmazlar ve koloni

oluşturmazlar ancak mutajenik bir etken ile karşılaşırlarsa çoğalırlar. Oluşan koloni sayısı mutajenite için bir göstergedir (6).

Bir diğer test yöntemi olan HPRT testi ile gende meydana gelen değişiklikler tespit edilir. Mikronukleus testi ile de kromozomlarda meydana gelen değişiklikler değerlendirilir. *In vitro* testlerden başka hayvanlarda yapılan genotoksite çalışmaları da vardır (6).

2.4.11. Östrojenite Testleri

Östrojen moleküllerinin hücredeki östrojen reseptörlerine bağlanması sonucu bu reseptörler aktif bir duruma geçer. Aktif duruma geçen östrojen-reseptör bağlantısı çekirdek içindeki gen aktivasyonu ve mRNA transkripsiyonunun meydana geldiği özel bölgelere (DNA dizilerine, çekirdek matriksine, non histon proteinlere ve çekirdek zarına) bağlanır. Çekirdekte oluşan bu etkileşim sonrası reseptör-östrojen bağlantısı ayrılır ve reseptör kullanılmayacak bir şekilde kalır. Bununla birlikte reseptör-hormon bileşiğinin gen transkripsiyonunu düzenlemesi östrojenin en önemli biyolojik aktivitesi olarak gösterilir. Ayrıca bu moleküllerin genomdan bağımsız diğer fonksiyonları da bulunur (152). Bazı kimyasal bileşenler östrojen benzeri etki göstererek hücrelerde bulunan östrojen reseptörlerine subtoksik konsantrasyonlarda bağlanırlar. Bisfenol-A bu kimyasal bileşenlerden bir tanesidir. Östrojenisitenin belirlenmesinde *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanılabilir. Hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* test yöntemlerinde reporter gene testi, competitive ligand-binding, hücre proliferasyon, yeast two-hybrid testlerine göre östrojenitenin belirlenmesinde daha hassas bir yöntemdir (153).

2.4.12. Hayvan Testleri

Genellikle memeli hayvanların kullanıldığı bu tür biyouyumluluk testlerinde test materyali fare, rat, köpek, köpek, kedi, koyun, keçi veya maymun gibi hayvanlara implante edilir. Hayvan deneylerinde değişkenleri kontrol etmek zordur, etik açıdan tartışmalı olan bu testler uzun sürer ve pahalıdır (119,120). Hayvan testlerinde biyolojik uyumluluğu test edilecek materyalin piyasaya sürülmeden önceki deneysel formu kullanılır bu nedenle hayvan testleri kullanım testlerinden (bazı testlerde hayvanlar da kullanılmaktadır) farklıdır (119).

İmplantasyon testlerinde test materyalleri deney hayvanlarının deri altı, kas içi veya kemik içine yerleştirilirler. Materyallerin dokulara farklı implantasyon

periyotlarından (1 hafta ile bir kaç ay arası) sonra dokular makroskopik ve mikroskopik olarak incelenir. Kısa implantasyon zamanı (1-2 hafta) sonrası öncelikle implante edilmiş materyal etrafındaki iltihabın derecesi tespit edilir. İmplantasyon periyodunun uzatılmasıyla oluşan bağ dokusu kapsülü de değerlendirilir (6).

Müköz membran irritasyon testinde test edilecek materyalin mukozada veya aşındırılmış deri üzerinde meydana getirdiği iltihap değerlendirilir. Test materyali, pozitif ve negatif kontrol maddeleri deney hayvanının ağız dokusuna yerleştirilir ve bir kaç hafta sonrasında doku reaksiyonları makroskopik olarak değerlendirilir. Daha sonra alınan biyopsi parçaları ile de histolojik değerlendirme yapılır (6).

Deri hassasiyet testi ile test edilecek materyallerin klinik öncesi alerjik özellikleri de deney hayvanlarında saptanır. Maksimizasyon testi ve Buhler testi alerjik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan test yöntemleridir. Bu test yöntemlerinde gine domuzları kullanılmaktadır. Maksimizasyon testinde test materyali Freud Complete Adjuvan (FCA) ile birlikte deney hayvanının deri altı bölgesine yerleştirilir. Yedi gün sonrasında test materyali aynı bölgeye tekrar 2 gün daha uygulanır. FCA ile arttırılan immunolojik etki sayesinde testin hassasiyeti artmış olur. Bu başlangıç periyodundan 14 gün sonra test materyali tekrar deride farklı bir bölgeye yerleştirilir ve deri reaksiyonunun değerlendirilmesi yapılır (6).

2.4.13. Kullanım Testleri

Kullanım testleri hayvanlar ve gönüllü insanlar üzerinde yapılır. Kullanım testleri materyalin klinik kullanımını her açıdan taklit etmelidir. Hayvanların kullanıldığı kullanım testlerinde köpek ve maymun gibi büyük hayvanlar kullanılır. İnsanlar üzerinde kullanım testlerinin yapılması test materyalinin biyouyumluluk değerlendirmesinde klinik deney aşamasıdır (119).

Pulpa irritasyon testleri, ortodontik amaçla çekilecek insan dişlerinde veya maymun ya da diğer uygun hayvanların sağlam, çürüksüz dişlerinde açılan class V kavitelere test materyalinin uygulanması ile yapılır. Test materyali 1 hafta ile birkaç ay arası dişlerde bekletilir ve dişlerin çekimi yapılır. Daha sonra bu dişler histolojik inceleme için hazırlanır ve pulpada meydana gelen akut veya kronik iltihap ve odontoblast reaksiyonları değerlendirilir (6,119).

Diş hekimliğinde kullanılan bazı materyaller mukoza ve diş eti ile sürekli bir temas halindedir. Bundan dolayı gingiva mukoza testinde diş eti altına uzanan kavitelere test materyalleri uygulanır, 7 ile 30 gün arasında meydana gelen reaksiyonlar tespit edilir. Ancak bakteri plağı varlığı, yapılan restorasyon yüzeyinin düzgün olmaması veya taşkın olması gibi nedenlerle diş eti bölgesinde oluşan iltihap test edilen materyalin oluşturduğu etkiyi değiştirebilir (119).

Endodontik materyal kullanım ve periapikal doku hasarı testi deney hayvanlarında yapılmaktadır. Bu yöntemde test materyalleri kanal tedavisi için hazırlanmış diş kök kanallarının içerisine yerleştirilir ve daha sonra histolojik değerlendirme yapılır (6).

2.4.14. Allerji Testleri

Dental materyallerin insanlar üzerindeki allerjik potansiyellerinin belirlenmesinde kullanılan en önemli test yöntemi patch testidir. Bu test yöntemi ile allerjik kontak dermatit gibi gecikmiş tip hipersensitivite (tip IV reaksiyon) belirlenir. Allerjik reaksiyon başlatabilecek konsantrasyonda materyallerin yerleştirildiği yapışkan bantlar patch testinde kullanılır. Bu bantlar hastanın sırt bölgesinde sağlam deri yüzeyine yapıştırılır. Bantların çıkarılmasını takiben 2-3 günlük sürede deri reaksiyonları değerlendirilir.

Ani reaksiyonlar (astım gibi tip I reaksiyon) ise prick testi ile belirlenir. Radioallergosorbent testi (RAST) prick testine alternatif olarak uygulanan veya prick testini destekleyen diğer bir testtir (6).

2.5. Dentin Bağlayıcı Sistemlerde Biyouyumluluk ve Konu ile İlgili Çalışmalar

Dentin bağlayıcı sistemler; metakrilatlar (ör: HEMA, 4-META), dimetakrilatlar (ör: TEGDMA), fosfanat penta akril esterler, akril amidler, aldehytler (ör: glutaraldehit) ve organik asitlerden meydana gelirler. Ayrıca dentin bağlayıcı sistemler Bis DMA da içerebilirler. Aseton, etanol ve su dentin bağlayıcı sistemler içerisinde çözücü olarak bulunmaktadır. Bazı bağlayıcı sistemler doldurucu partiküller de içerebilir. Günümüzde antibakteriyel monomer (MDPB) içeren dentin bağlayıcı ajanlar da piyasaya sürülmüştür (153).

Dentin bağlayıcı sistemlerin canlı dentin dokusunda kullanılmaya başlaması ile birlikte bu materyallerin pulpa dokusunda meydana getirecekleri etki büyük önem

kazanmıştır. Serbest monomerlerin sıvı ile dolu dentin kanallarını geçip pulpa dokusuna ulaşabilmesi için suda çözünebilir yapıda olması gerekmektedir. Dentin bağlayıcı sistemlerin TEGDMA veya HEMA gibi hidrofilik bileşenleri, kompozit reçine restoratif materyallerden salınan diğer bileşenler ile birlikte dentin dokusunu geçerek pulpaya difüze olurlar ve pulpada reaksiyona neden olabilirler. Bu nedenle HEMA gibi suda çözünebilen monomerler dentin sıvısında yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar ve kalan dentin kalınlığına ve dentin geçirgenliğine bağlı olarak sitotoksik etki gösterebilirler (65, 154).

Dentin bağlayıcı ajanların TEGDMA ve HEMA gibi hidrofilik bileşiklerinin toksisitesi BİSGMA ve UDMA gibi hidrofobik monomerlere göre daha azdır. Ancak monomerlerin birbiriyle olan ilişkisi sonucu meydana getirdikleri toksik reaksiyonlar tek tek meydana getirdikleri reaksiyondan daha fazladır. Hidrofilik monomerler hidrofobik monomerleri taşıyıcı rol oynayarak toksik reaksiyonun artmasına neden olurlar. Ayrıca HEMA ve TEGDMA gibi bileşenler immun sistemi baskılayarak veya uyarak bu sistem üzerinde etki gösterebilirler (7,155)

Dentin bağlayıcı sistemler kullanılarak hayvanlar üzerinde yapılan direkt pulpa kuafajı çalışmalarında bazı araştırmacılar pulpada herhangi bir patolojik değişim tespit etmemişler (8) fakat bazı araştırmacılar ise direkt pulpa kuafajı sonucu dentin bağlayıcı sistemlerin şiddetli derecede pulpa hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir (9). İnsan dişlerinde yapılan direkt pulpa kuafajı çalışmalarında dentin bağlayıcı ajanların, yabancı cisim reaksiyonuna bağlı enflamasyondan şiddetli düzeyde pulpa hasarına kadar farklı pulpa reaksiyonlarına neden olduğu açıklanmıştır (10,11). Bununla birlikte dentin dokusunun etkili bir difüzyon bariyeri olduğu belirtilmiş ve pulpa dokusunu sadece ojenol ve fenol gibi toksik maddelere karşı değil aynı zamanda glutaraldehit ve HEMA gibi maddelere karşı da koruduğu bildirilmiştir (12,138,139).

Lefebvre ve ark., oral epitelyal hücrelerde TEGDMA ve DMAEFMA etkisini incelemişler ve sonuçta bu bileşenlerin hücre büyümesini ve total polar lipid sentezini engellediklerini bildirmişlerdir (13). Polimerizasyon gerçekleşmiş olsa dahi reçine esaslı materyallerden hücrelerin metabolik aktivitesini değiştirecek düzeyde serbest monomer salınımı gerçekleşmektedir (14,15,142). HEMA ve TEGDMA'nın insan monosit hücrelerinde heat shock protein 72 ekspresyonunu baskıladığı ayrıca TEGDMA'nın mitokondri hasarına neden olduğu açıklanmıştır (16,142). Bununla birlikte, bazı

araştırmacılar dentin bağlayıcı ajanların sitotoksitesinin intraselüler tirozin fosforilasyonu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (17).

Üzerinde çalışılan hücre tipine bağlı olarak dentin bağlayıcı ajanlardan salınan materyallerin salınım süresi ve salınan materyallerin birbiriyle olan ilişkisi sitotoksite testlerinde önemli parametreleridir. Pulmoner hücreler kullanılarak yapılan çalışmada TEGDMA, HEMA'ya oranla 2-5 kat daha fazla toksik bulunmuştur. Polimerizasyon sonrası 2-6 saat içerisinde TEGDMA'nın hücre içi glutatyon düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (18,19).

Chang ve ark., HEMA'nın hücre çoğalmasını engellediğini ve hücre döngüsünde S-G fazını durdurarak bir düzensizliğe neden olduğunu açıklamışlardır. G₂/M ve S fazlarında meydana gelen duraklama, glutatyon düzeyinde azalma ve ROS üretimi hücrenin apoptoza uğramasında önemli faktörler olduğu belirtilmektedir (20).

Dumsha ve ark., ferrik oksalat, NPG-GMA, NTG-GMA, PMDM bileşiklerinin sitotoksik etkilerini agar difüzyon testi ve cell replication testi ile değerlendirmişlerdir. Tek başlarına sitotoksik etki gösteren bu dentin bağlayıcı sistemler agar overlay testinde dentin dokusu üzerine tavsiye edilen şekillerde uygulanması sonucu önemli bir sitotoksik etki göstermemişlerdir (21).

Meryon ve Brook, üç farklı dentin bağlayıcı ajanın (Triton, Gluma ve Scotchbond 2) sitotoksitelerini 100µm ve 500µm kalınlığında dentin diskleri kullanarak dentin bariyer test yöntemi ile incelemişlerdir. 100µm'lik dentin disklerinin kullanıldığı testte tüm dentin bağlayıcı ajanlar yüksek oranda sitotoksik bulunmuştur. 500µm'lik dentin disklerinin kullanıldığı testte ise Scotchbond 2 diğer dentin bağlayıcı ajanlara göre daha fazla toksisite göstermiştir (22).

Bouillaguet ve ark., dört farklı dentin bağlayıcı sistemin (Aelitebond, Optibond, Scotchbond Multi Purpose ve Prisma Universal Bond 3) sitotoksitesini dentin bariyer test yöntemi ile incelemişlerdir. Dentin bariyer test yönteminde kullanılan dentin diskleri geçirgenliklerine göre üç gruba ayrılmıştır (düşük, orta, yüksek). Bu üç farklı dentin diskine dentin bağlayıcı ajanların uygulanmasından sonra 24 saat aralıklarla 7 gün boyunca medyum değiştirilmiştir. Dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitesinin belirlenmesinde MTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada yüksek geçirgenliğe sahip dentin disklerinin dentin bağlayıcı ajan bileşenlerinin difüzyonuna daha fazla izin verdiği saptanmıştır. Araştırmacılar 24–48 saatlik erken zaman diliminde tüm test

materyallerinin diğer zaman aralıklarına göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini açıklanmışlardır (23).

Hashieh ve ark., 4. kuşağa ait dört dentin bonding (All Bond2, Scotch Bond Multi-Purpose, Syntac, ve Tenure) ve 5. kuşağa ait dört farklı dentin bonding (One Step, Scotchbond 1, Syntac Single Component, Tenure Quick) sistemin sitotoksitelerini MTT yöntemi kullanarak karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar One Step dışında diğer tüm 5. kuşak nesil dentin bonding ajanlarının 4. kuşağa ait dentin bondinglerden daha az sitotoksik olduğunu saptamışlardır (24).

Costa ve ark., üç dentin bağlayıcı ajanın (Single Bond, Prime & Bond 2.1, Syntac Sprint) MDPC-23 hücreleri üzerinde sitotoksitesini inceledikleri çalışmalarında polimerize edilmeden uygulanan tüm test materyallerinin yüksek derecede toksik olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar polimerize edilerek uygulanan bonding ajanlardan Single Bond'un en az sitotoksik etkiye sahip test materyali olduğunu bildirmişlerdir (25).

Geurtsen ve ark., Solobond Plus, Solist, Scotchbond Multipurpose, Syntac SC ve Prime & Bond 2.1 isimli dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında yüksek miktarda TEGDMA içeren Solobond Plus'ın en toksik dentin bağlayıcı ajan olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar sırasıyla Scotchbond Multipurpose ve Syntac SC dentin bağlayıcı ajanların yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (26).

Koliniotou-Koubia ve ark., 6 farklı dentin bonding ajanın (Syntac, Solobond, Bond 1, Scotchbond 1, Heliobond ve F 2000) sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar kullanılan tüm dentin bonding ajanların sitotoksik olduğunu ve F-2000 ile Scotchbond 1'in ise en fazla sitotoksik etkiye sahip dentin bonding ajanlar olduğunu açıklamışlardır (27).

Szep ve ark., farklı dentin bağlayıcı sistemlerin (Ariston Liner, Etch & Prime 3.0, Optibond Solo, Prime & Bond NT, Scotchbond 1, Syntac Sprint) dişeti fibroblast hücreleri üzerinde canlı hücre oranını karşılaştırarak sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında Scotchbond 1'in en toksik dentin bağlayıcı ajan olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan araştırmacılar Etch and Prime 3,0'm en az sitotoksik etki gösterdiğini ifade etmişlerdir (28).

Kaga ve ark., çeşitli dentin bonding ajanlardan (Scotchbond Multipurpose ve Clearfil Liner Bond 2) salınan monomerlerin sitotoksitesini ve L929 hücrelerinde hücre

canlılığı ve çoğalmasında rol oynayan tirozin fosforilasyonuna etkisini incelenmişlerdir. Araştırmacılar polimerize olmuş dentin bondinglerden salınan monomerlerin sitotoksik dozda olmadığını belirtmiştir. Diğer yandan araştırmacılar HEMA isimli monomerin tirozin fosforilasyonunu etkillediğini bildirmişlerdir (17).

Demarco ve ark., Scotchbond Multipurpose ve Clearfil Liner Bond 2 isimli dentin bonding ajanların *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda biyouyumluluklarını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu iki dentin bağlayıcı ajanın Ca(OH)_2 materyalinden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduklarını açıklamışlardır (29).

Chen ve ark., farklı ışık güçlerinde ($100, 200, 300 \text{ mW/cm}^2$) 10 saniye polimerize edilen Scotchbond Multipurpose dentin bağlayıcı ajanın sitotoksik etkilerini MTT yöntemi kullanarak karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar dentin bağlayıcı ajanların düşük ışık gücüne bağlı olarak yetersiz polimerizasyonun daha fazla sitotoksik etkiye neden olduğunu açıklamışlardır (30).

Huang ve Chang insan pulpa hücreleri üzerinde yaptıkları sitotoksik çalışmalarında 5 farklı dentin bonding ajanı MTT yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda dentin bonding ajanların oluşturduğu sitotoksik etkinin sırasıyla Single Bond>Prime & Bond NT>Syntac Single Component>Heliobond>Clearfil SE Bond şeklinde sıralandığı saptanmıştır (31).

Schmalz ve ark., düşük pH değerlerine sahip dentin bonding ajanların (Syntac, Syntac Single Component, Prime & Bond NT, All Bond 2, Prompt L-Pop) sitotoksitelerini bölümlü odalı perfüzyon cihazı kullanarak dentin bariyer test metodu ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar düşük pH değerine sahip dentin bonding ajanların sitotoksik olmadıklarını belirtmişlerdir (32).

Chen ve ark., insan pulpa hücrelerinde 3 farklı dentin bonding ajanın (Syntac Sprint, Prime & Bond, Single Bond) sitotoksik etkilerini MTT yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar yüksek konsantrasyonda ($1:1000$ [v/v]) kültür medyumunu ile hazırlanan dilüsyonlarda üç dentin bonding ajanın da yüksek oranda sitotoksik etkilerinin olduğunu açıklanmıştır (33).

Mantellini ve ark., Single Bond isimli bağlayıcı sistemin odontoblast benzeri hücrelerde, farklılaşmamış pulpa hücrelerinde ve makrofajlarda hücre canlılığına ve yaşam döngüsüne olan etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda Single Bond bağlayıcı sistemin hücrelerde apoptozu başlattığı ve hücre yaşam döngüsünü durdurduğunu açıklamışlardır (147).

Vajrabhaya ve ark., Single Bond, Prime & Bond 2.1, Syntac Single Component ve One Up Bond F dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerini 500µm kalınlığında dentin diski yerleştirerek bölümlü oda perfüzyon cihazının kullanıldığı dentin bariyer test metodu ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda One Up Bond F self etch bağlayıcı sistem diğer test edilen etch & rinse sistemlere göre daha az toksik bulunmuştur. Araştırmacılar etch & rinse dentin bağlayıcı sistemlerin (Single Bond, Prime & Bond 2.1) self etch sistemlere (Syntac Single Component ve One Up Bond F) göre daha toksik olduğunu bildirmişlerdir (34).

Spagnuolo ve ark., farklı iki ışık kaynağı (halojen ve LED) kullandıkları çalışmalarında Scotchbond 1 ve Optibond Solo dentin bağlayıcı ajanların sitotoksitelerini MTT yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Aynı zamanda araştırmacılar bu iki dentin bağlayıcı sistemin neden olduğu ROS üretimini de incelemişlerdir. Çalışma sonucunda LED ışık kaynağı kullanılarak polimerize edilen Scotchbond 1' in en toksik test materyali olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar LED ışık kaynağı ile hazırlanan test materyallerinin daha yüksek miktarda ROS üretimine neden olduğunu açıklamışlardır (35).

Galler ve ark., Syntac Classic, Prompt L-Pop ve Vitrebond test materyallerinin sitotoksitelerini farklı kalınlıkta (100, 200, 300 ve 500µm) dentin disklerinin kullanıldığı bölümlü oda perfüzyon cihazında dentin bariyer test metodu ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda Syntac Classic en toksik test materyali olarak tespit edilmiş ve araştırmacılar dentin kalınlığının artmasıyla sitotoksik etkinin azaldığını açıklamışlardır (36).

About ve ark., insan pulpa hücrelerinin odontoblast hücrelerine dönüşmesine One Step, Scotchbond 1, Prime and Bond NT ve Unibond isimli dentin bağlayıcı ajanların etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar dentin bariyer test yöntemi kullandıkları çalışmalarında 0.7mm dentin varlığında sekonder odontoblast hücre farklılaşmasının gerçekleşmediğini açıklamışlardır (37).

Gürpınar ve ark., Clearfil SE Bond ve FL Bond dentin bağlayıcı sistemlerin insan dişeti fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmalarında her iki dentin bağlayıcı sistemin de apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir (38).

Koulaouzidou ve ark., Clearfil Protect Bond, Adper Scotch Bond1, Excite, Tyrian SPE ve One Step Plus isimli dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerini üç

farklı hücre hattında değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda Clearfil Protect Bond diğer test edilen dentin bağlayıcı sistemlere göre daha az sitotoksik bulunmuştur. Araştırmacılar Scotchbond 1 ve Excite dentin bağlayıcı sistemlerin ise en fazla sitotoksik etkiye neden olan dentin bağlayıcılar olduğunu belirtmişlerdir (39).

Ergün ve ark., Swisstec SL Bond, Clearfil SE Bond, Adper Single Bond 2, Adper Prompt L-Pop, Xeno III, Pentron Bond 1 isimli dentin bağlayıcı ajanlardan hazırlanan test örneklerini iki farklı ışık kaynağı (halojen ve LED) kullanılarak polimerize etmişler ve sitotoksitelerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar LED kullanılarak polimerize edilen örneklerin halojen lamba ile polimerize edilen örneklerle göre daha az sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (40).

Grobler ve ark., Clearfil Protect Bond, Adper Scotch Bond1, Xeno III, Prime & Bond NT dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerini hazırladıkları dentin diski içermeyen test düzeneğinde incelemişler, ayrıca bu test düzeneğinde 120 µm kalınlığında dentin diski yerleştirerek yaptıkları değişikle Xeno III dentin bağlayıcı sistemin sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar test edilen tüm dentin bağlayıcı sistemlerin 3T3 fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirtilmişler ve ayrıca Xeno III'ün de bu sistemler içerisinde en toksik dentin bağlayıcı olduğu açıklamışlardır. Aynı zamanda Xeno III'ün dentin diski kullanılarak değiştirilen test cihazında da yüksek düzeyde sitotoksite sergilediğini açıklamışlardır (41).

Wiegand ve ark., üç hassasiyet giderici ajanın (Admira Protect, Gluma Desensitizer, Seal and Protect), bir self etch (Clearfil Protect Bond) ve bir etch and rinse dentin bağlayıcı sistemin (Optibond FL) sitotoksitesini farklı kalınlıklarda dentin disklerinin kullanıldığı dentin bariyer test yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 1 mm dentin kalınlığında Clearfil Protect Bond'un hücre enzim aktivitesini anlamlı düzeyde azaltarak toksik etki gösterdiğini diğer test materyallerinin ise sitotoksik etkisinin olmadığını açıklamışlardır (42).

Yasuda ve ark., insan pulpa hücreleri ve MDPC-23 hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında AQ Bond Plus, Clearfil Tri-S Bond, Absolute, G Bond ve Adper Prompt dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar AQ Bond Plus'ın en az, Adper Prompt ise en fazla sitotoksik etki gösteren dentin bağlayıcı sistem olduğunu bildirmişlerdir (43).

Vajrabhaya ve ark., Optibond Solo Plus SE Primer, Xeno III ve i Bond isimli self etch dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksitelerini 500µm kalınlığında dentin diski

kullanarak bölümlü oda perfüzyon cihazında dentin bariyer test yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda dentin bonding ajanların oluşturduğu sitotoksik etkinin sırasıyla i Bond> Xeno III> Optibond Solo Plus SE Primer şeklinde sıralandığı saptanmıştır (44).

Demirci ve ark., dentin bağlayıcı sistemlerin (Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, AdheSE, Excite) neden olduğu oksidatif stres, sitotoksikite ve genotoksiteyi incelemişlerdir. Araştırmacılar dentin primerler ve bonding ajanların doza bağlı hücre yaşamını etkilediğini açıklamışlardır. 50% hücre ölümüne neden olan konsantrasyonlara göre dentin bağlayıcı ajanların sitotoksitesi: Excite (0.16 mg/ml)>AdheSE bond (0.30 mg/ml)>Clearfil Protect bond (0.35 mg/ml)>Clearfil SE bond (0.37 mg/ml), ve Prompt L-Pop bond (0.68 mg/ml) şeklinde saptanmıştır. Araştırmacılar üç boyutlu hücre kültürünün kullanıldığı dentin bariyer testinde dentin bağlayıcı sistemlerin toksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca tüm dentin bağlayıcı ajanların doza bağlı olarak pulpa hücrelerinde ROS miktarını 5 kata kadar arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar AdheSE primerin ekstraktının mikronüklei sayısında 6 kata kadar artışa neden olduğunu açıklamışlardır (45).

Koulaouzidou ve ark., Clearfil Tri-S Bond, AdheSE ve XP Bond bağlayıcı sistemlerin i RPC-C2A ve L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini hücre proliferasyonunu inceleyerek değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda XP Bond'un diğer iki bağlayıcı sisteme göre her iki hücre hattında da daha fazla antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (46).

Lanza ve ark., dentin bariyer test yöntemi kullandıkları çalışmalarında 5 farklı dentin bağlayıcı ajanın sitotoksitesini MTT yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Aynı zamanda araştırmacılar taramalı elektron mikroskobu ile test materyallerinin hücre morfolojisinde meydana getirdikleri etkileri de incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda dentin bonding ajanların oluşturduğu sitotoksik etkinin sırasıyla Single Bond> Clearfil SE Bond= Xeno III=Clearfil Protect Bond≥Adper Prompt şeklinde sıralandığı saptanmışlardır (47).

Sigusch ve ark., farklı ışık kaynakları kullanarak polimerize edilen dentin bağlayıcı ajanların (Syntac, iBond TM, Clearfil Protect Bond, Prime and Bond NT, Adper Prompt L-Pop) sitotoksitelerini incelemişlerdir. Syntac ve Clearfil Protect Bond dentin bağlayıcı ajanların sitotoksik etkisi üzerinde ışık kaynaklarının etkisinin diğer bağlayıcı ajanlara göre daha fazla olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar iBond TM,

Prime and Bond NT ve Adper Prompt L-Pop'un en az sitotoksik etki gösteren bağlayıcı sistemler olduğunu saptamışlardır (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 5 farklı dentin bağlayıcı sistemin (Scotchbond Multi Purpose, XP Bond, Xeno V, Clearfil Protect Bond, AdheSE) 3T3 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri 24 ve 72 saatlik süreler sonunda hücre kültür insertleri ve dentin bariyer test metodu kullanılarak incelenmiştir. Değerlendirmede toplam hücre sayısı tayini hemositometre ile, apoptotik hücre oranı Anneksin-V-FITC/PI boyaması ile, proliferasyon oranı bromodeoksiüridin işaretleme indeksi ile ve hücre morfolojisi de taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hücre ve doku kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Programlı hücre ölümünün akım sitometri (FCM; flow cytometry) ile değerlendirilmesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) İmmünoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Dentin Bağlayıcı Sistemler ve Kontrol Materyalleri

Çalışmada kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin, kontrol materyallerinin (şekil 3.1) içerikleri, üretici firmaları ve üretim numaraları Tablo 3.1'de ve uygulama prosedürleri de Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: : Çalışmada kullanılan dentin bağlayıcı sistemler ve kontrol materyali

Tablo 3.1: Çalışmamızda kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin içerikleri

Dentin Bağlayıcı Sistem	İçerik	Üretici Firma	LOT numarası
Scotchbond Multi Purpose	Primer: HEMA, Polialkenoik asit, kopolimer, su Adeziv: Bis-GMA, HEMA, fotoiniyator	3M ESPE, St Paul, MN, USA	6BF 2009-06
			6PN 2009-06
XP Bond	TCB reçine, PENTA, UDMA, TEGDMA, HEMA, stablizör, etil-4-dimetilaminbenzoat, amorf slika, t-butanol	Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany	0703002776
Xeno V	Bifonksiyonel akrilik amid, asidik akrilik amid, fonksiyonel fosforik asit ester, su, tersiyer butanol, inisiyator, stabilizör	Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany	0801002439
Clearfil Protect Bond	Primer: MDP, MDPB, HEMA, hidrofilik dimetakrilat, su Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hidrofilik dimetakrilat, komforokinon, N,N-dietanol-p-toludin	Kuraray Medical, 1621 Sakazu, Kurashiki, Okayama, Japan	00043A
			00066A
AdheSE	Primer: Dimetakrilat, Fosfonik asit akrilat, su, inisiyator, stabilizör Bond: HEMA, Dimetakrilat, Silikon dioksit, inisiyator, stabilizör	Ivoclar vivadent, Schaan, Liechtenstein	K41839
			K40597
Vitrebond	Liquid: reçine modifiye alkenoik asit, HEMA, su, inisiyator Powder: Floroaminosilikat cam partikülleri	3M ESPE, St Paul, MN, USA	7JB 2010-12
			8MF 2010-12
HEMA	2-Hidroksietilmetakrilat	Sigma, St. Louis, MO, USA	S44678-477
Scotchbond Etchant	%35'lik fosforik asit jel	3M ESPE, St Paul, MN, USA	6HL 2009-09

Tablo 3.2: Çalışmamızda kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin uygulama prosedürleri

Dentin Bağlayıcı Sistem	Uygulama Prosedürleri
Scotchbond Multi Purpose	Scotchbond etchant dentin yüzeyine 15 saniye uygulanır. 15 saniye su ile yıkama ve 5 saniye hava ile kurutma yapılır. Asit uygulanmış yüzeye Adper Scotchbond Multi Purpose primer uygulanır. 5 saniye süre ile hafifçe kurutulur. Adper Scotchbond Multi Purpose adeziv uygulamasını takiben 10 saniye süre ile ışıkla polimerize edilir.
XP Bond	15 sn asit uygulaması ve su ile yıkama yapılır . Kavite tamamen kurutulmamalıdır. Bütün kavite yüzeyleri XP bond ile ıslatılmalı göllenmeden kaçınılmalıdır. XP bond kavite yüzeyinde 20 sn bırakılmalıdır. 5 sn hava uygulaması ile uniform ve parlak bir yüzey elde edilmelidir. En az 20 sn ışık ile polimerizasyon yapılmalıdır.
Xeno V	Xeno V clickdish kabına 1-2 damla dökülür. 30 dakika kapalı bir şekilde kalabilir. Her seferinde tüm kavite yüzeylerini eşit miktarda ıslatmak koşulu ile iki kez uygulama yapılır. Daha sonra adesiv 20 sn boyunca diş yüzeyine uygulanır. Hava su spreyi ile en az 5 sn hava uygulaması ile çözücünün buharlaşması sağlanır. 20 sn veya daha fazla ışık ile polimerizasyon sağlanır
Clearfil Protect Bond	20 sn primer uygulamasını takiben hava ile hafifçe kurutulur. 10 sn bonding uygulaması yapılır. Hafif hava ile bonding diş yüzeyine yayılır. 10 sn ışıkla polimerizasyon sağlanır.
AdheSE	30 sn'den az olmamak üzere primer uygulanır. yüzeyde sıvı hareketi görülmeyecek şekilde kuvvetli hava verilir. Tüm yüzeyleri kaplayacak şekilde bonding uygulanır ve çok hafif hava uygulaması yapılır. 10 sn ışıkla polimerizasyon sağlanır.
Vitrebond	Toz ve likit kısmı aynı ölçekte karıştırılarak dentin yüzeyine uygulanır. 30 sn ışıkla polimerizasyon sağlanır.

3.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.2.1. Cihaz ve Aletler

1-Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan) (Şekil 3.2), 2-İnkübatör (Sanyo) (Şekil 3.3), 3- Ters (İnvert) mikroskop (Leitz Wetzlar) (Şekil 3.4), 4-Çalkalayıcı su banyosu (Nüve ST402), 5-Soğutmalı santrifüj (Sigma 2-16K), 6-Derin dondurucu (-20C) (Vestel F15), 7- Derin dondurucu (-80C) (Nuair), 8-Buzdolabı (Bosch), 9-Manyetik karıştırıcı (IKA F20520162), 10-Digital fotoğraf makinası (Sony CyberShot), 11- Pipetleme aracı (Gilson F110755),12- Mikropipet seti (Gilson), 13-Otoklav (Victor Recker), 14-Hassas terazi (Precise BJ 1000C), 15-Distile su cihazı (Millipore)



Şekil 3.2:Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan)



Şekil 3.3:İnkübatör (Sanyo)



Şekil 3.4:Ters (İnvert) mikroskop (Leitz Wetzlar)

3.2.2. Kimyasal Malzemeler

1-L-Glutamin Solüsyonu (Sigma G7513), 2-Na-Piruvat Solüsyonu (Sigma S8636), 3-Tripan Mavisi Solüsyonu (Fluka 93595), 4-DMEM-F12 (Biological Industries 11-170-1M), 5-Tripsin (Amresco 0458), 6-Penicilin G Sodium (Biological Industries 41-501-25), 7- Streptomisin sülfat (Biological industries 41-502-100), 8-Gentamisin 80 mg ampul (İ.E. Ulagay), 9-0.5 M EDTA (Amresco E177), 9- Fötal sığır serumu (Biological industries 04-007-1A),

3.2.3. Sarf Malzemeler

1-Tek kullanımlık, 5 ml'lik steril plastik pipet (TPP 94005), 2- Tek kullanımlık, 10 ml'lik steril plastik pipet (TPP 94010), 3- 0.2 mikron'luk steril enjektör filtre (TPP 99722), 4- 50 ml'lik steril falkon tüp (TPP 91050), 5- 15 ml'lik steril santrifüj tübü (TPP 91015), 6- 6 kuyucuklu steril doku kültürü plağı (TPP 92006), 7- 24 kuyucuklu steril doku kültürü plağı (TPP 92024), 8- 0.22 mikron'luk steril medyum süzme filtresi (Sartorius 0507 11107 0604053), 9- Yuvarlak lamel, 10-Tek kullanımlık, steril plastik Pasteur pipeti (LP Italiana 135030) 11-Cam Pasteur pipeti (Isolab 108.03.02), 12-Tek kullanımlık, 25 cm²'lik steril plastik kültür kapları (TPP 90025), 13- Tek kullanımlık, 75 cm²'lik steril plastik kültür kapları (TPP 90075), 14- 15 mm çapında yuvarlak lamel (Deckglaser C911380), 15-Lamel (Isotherm), 16-pH kağıdı (Merck Neutralit 1.09564.0003), 17- Hemasitometre lameli (Marienfeld)

3.3. Akım Sitometrik (Flow Sitometrik) Anneksin-V-FITC/PI Boyamasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.3.1. Cihaz ve Aletler

1-Akım Sitometri (BD FACS Calibur) (Şekil 3.5)

3.3.2. Kitler

1-Anneksin-V-FITC (BD 556420), 2-Propidyum iodid (BD 556463)



Şekil 3.5: Akım Sitometri (BD FACS Calibur)

3.4. Sentez Fazı Uygulamasında BRDU-LI Boyamasında Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.4.1. Kimyasal Malzemeler

1-Absolü Etanol (Riedel-de-Haen 32221), 2-Etanol (Riadel de Haen 32221), 3- HCl (Riedel de Haen 07102), 4-Metanol (Sigma 322415), 5-Mayer'in Hematoksileni (Histoloji kürsüsü yapımı), 6-Hidrojen Peroksit (Merck 1.08597.1000), 7-PBS Tablet (Sigma P4417), 8-Kapama solüsyonu (Mounting medium; Zymed 00-8110)

3.4.2. Antikor

1- Monoklonal Fare BrDU antikor (Zymed 18-0103)

3.4.3. Kitler

1-Boyama kiti (Bloklama Solüsyonu, Sekonder antikor, Yabanturpu peroksidazı, AEC kromojen; Zymed 859743)

3.4.4. Sarf Malzemeler

1-50 ml'lik steril falkon tüp (TPP 91050), 2- 6 kuyucuklu steril doku kültürü plağı (TPP 92006), 3- 24 kuyucuklu steril doku kültürü plağı (TPP 92024), 4-Tek kullanımlık, steril plastik Pasteur pipeti (LP Italiana 135030) 5-Cam Pasteur pipeti (Isolab 108.03.02), 6- 15 mm çapında yuvarlak lamel (Deckglaser C911380), 7-Lamel (Isotherm), 8-pH kağıdı (Merck Neutralit 1.09564.0003)

3.5. İki Boyutlu (Tek Tabakalı) 3T3 Fibroblast Hücre Kültürü

3T3 Fibroblast hücre hattı Amerika Kültür Bankası'ndan (ATCC; American Type Culture Collection) alınmış ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku ve Hücre Kültür Laboratuvarı'nda üretilmiştir. Dulbecco'nun

modifiye eagle medyumunu ile birlikte besleyici karışım Ham'sın F12 medyumunu (DMEM-F12; Dulbecco's Eagle's Modified Eagle's Medium) ve içerdiği 50 ünite/ml penisilin ve streptomisin, 1.0 mM sodyum piruvat, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM esansiyel olmayan aminoasit, % 90; inaktive edilmiş % 10 fotal sıgır serumu (FBS) 3T3 Fibroblast hücre soyu için besi ortamını oluşturmuştur. Hücreler, 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda % 5 CO₂, % 95 nem içeren inkübatör ortamında tutularak çoğaltılmıştır. Hücreler maksimum yoğunluklarına ulaşp flaskın yüzeyini tamamen kaplayınca, haftada en az iki kere pasajlanarak üretilmiştir. Hücrelerin % 0.25 tripsin ile flasktan ayrılması sağlanmıştır. Hücreler, 5 ml'lik ve 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler yardımıyla (disposable) 20 ml'lik ve 50 ml'lik falkon tüplere aktararak 1500 rpm 3 dk olacak şekilde santrifüj edilmiş ve üst sıvının atılmasını takiben medyumla yeniden süspanse edilmiştir. Bütün hücreler tek Pasteur pipeti yardımı ile bir falkon tübünde olacak şekilde birleştirilmiş ve hücre sayısını saptamak amacı ile sayma kamarasına (hemasitometre) aktarılmıştır. Sayma kamarası ile ortama ilave edilen vital boya tripan mavisi ile süspansiyondaki hücrelerin hem sayısı hem de canlılık oranları belirlenmiştir. Deney protokolüne göre % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınan 5x10⁵ hücre her kuyucuğa medyum içine ekilmiştir.

3.6. Hücre Kültür İnsert Testi

Çalışmamızda 24 kuyucuklu kültür kabına asılabilen, tabanında 0,4 µm por genişliğine sahip polietilen tereftalat membranı olan hücre kültür inserti kullanılmıştır (Şekil 3.6, Şekil 3.7) (24-Well Millicell Hanging Cell Culture Insert, 0,4 µm PET; Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A. Lot number:07370116)



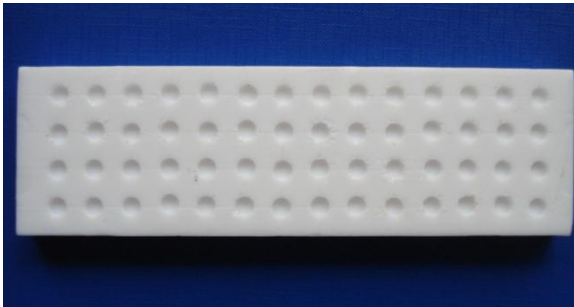
Şekil 3.6:Hücre kültür inserti



Şekil 3.7:Hücre kültür inserti polietilen tereftalat membrane

Hücre kültür insertlerinin içine yerleştirilmek üzere dentin bağlayıcı sistemlerden (Scotchbond Multi Purpose'un Bond kısmı, Protect Bond'un Bond kısmı ve Adhese'nin Bond kısmı, XP Bond, Xeno V) 2 mm yüksekliğinde 5 mm genişliğinde teflon kalıplar içerisine (Şekil 3.8) mikropipet yardımı ile 40µl damlatılarak halojen ışık kaynağı ile (VIP, Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) (Şekil 3.9) polimerizasyonları sağlanarak örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir 10 örneğin polimerizasyonunu takiben ışık kaynağının gücü radyometre (Hilux Ledmax Light Curing Meter, Benlioglu Dental Inc, Ankara, Turkey) (Şekil 3.10) ile ölçülmüştür.

Tabanına hücrelerin yerleştirildiği 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına içerisinde önceden hazırlanan polimerize edilmiş dentin bağlayıcıların bulunduğu insertler taşınmıştır (Şekil 3.11). Test materyalleri 24 ve 72 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi yapılmıştır.



Şekil 3.8: Çalışmamızda kullanılan teflon kalıp



Şekil 3.9: Çalışmamızda kullanılan halojen ışık kaynağı (VIP, Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA)



Şekil 3.10: Çalışmamızda kullanılan radyometre (Hilux Ledmax Light Curing Meter, Benlioglu Dental Inc, Ankara, Turkey)



Şekil 3.11: Hazırlanan test materyallerinin hücre kültür insertleri içerisinde hücre kültür kaplarına uygulanması

İçerisinde hücrelerin bulunduğu diğer 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarının içine yerleştirilen insertlerin içerisine ise dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımları (Scotcbond Multi Purpose Primer, Clearfil Protect Bond Primer, AdheSE Primer) mikropipet yardımı ile 40 µl damlatılarak 24 ve 72 saat 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Hücre kültür insert testinde pozitif kontrol olarak HEMA kullanılmıştır. HEMA dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımları gibi insertlerin içerisine mikropipet yardımı ile 40 µl damlatılmış 24 ve 72 saat 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

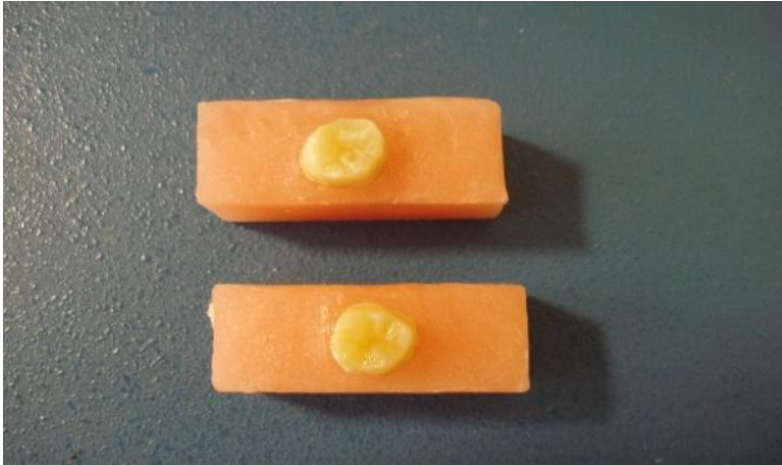
Çalışmamızda hücrelerin yerleştirildiği kuyucuklara materyal içermeyen boş insertler uygulanmış ve bu grup negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

24 ve 72 saat sonundaki sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi için hem test materyalleri hem de kontrol grupları için 3’er örnek hazırlanmıştır.

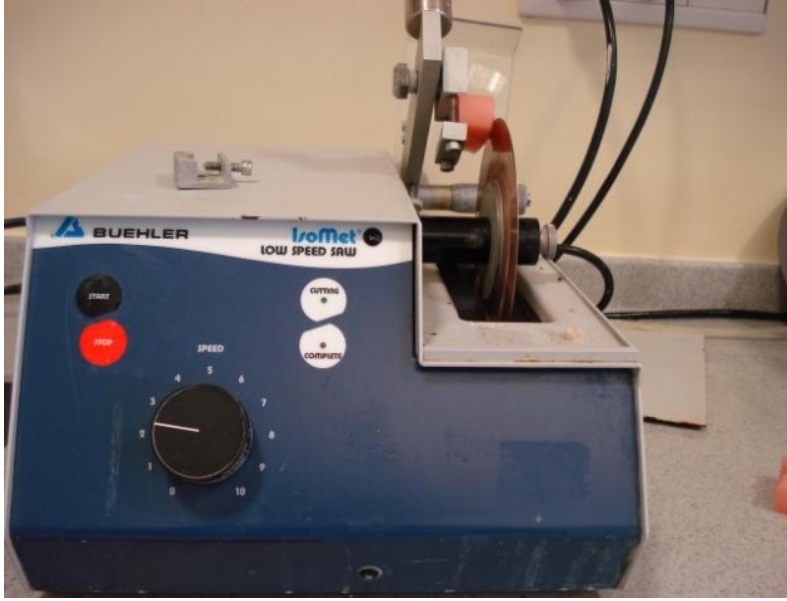
3.7. Dentin Bariyer Testi

3.7.1. Dentin Diskinin Hazırlanması

Dentin bariyer testinde kullanılmak üzere dentin disklerinin hazırlanması için 168 adet çürüksüz, kök oluşumu tamamlanmış, herhangi bir anomalisi bulunmayan, ağız içerisine sürmemiş insan üçüncü molar dişleri kullanılmıştır. Çekimi takiben, dişler yumuşak doku artıkları ve eklentilerinden arındırıldıktan sonra kullanılana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, distile su içerisinde saklanmış ve en geç 3 ay içinde kullanılmıştır. Daha sonra dişler kuron kısımları açıkta kalacak şekilde akrilik bloklara gömülmüştür (Şekil 3.12). Akrilik bloklara gömülen dişler dentin tübüllerinin sayı ve çaplarında belirli bir standart sağlayabilmek amacı ile ekvator hatlarının 1mm altından dişin uzun aksına dik olarak, düşük hızda (200 devir/dk) çalışan elmas bir separe ile (Isomet Saw; Buechler, Lake Bluff, IL, USA) (Şekil 3.13) su soğutması altında kesilmiştir

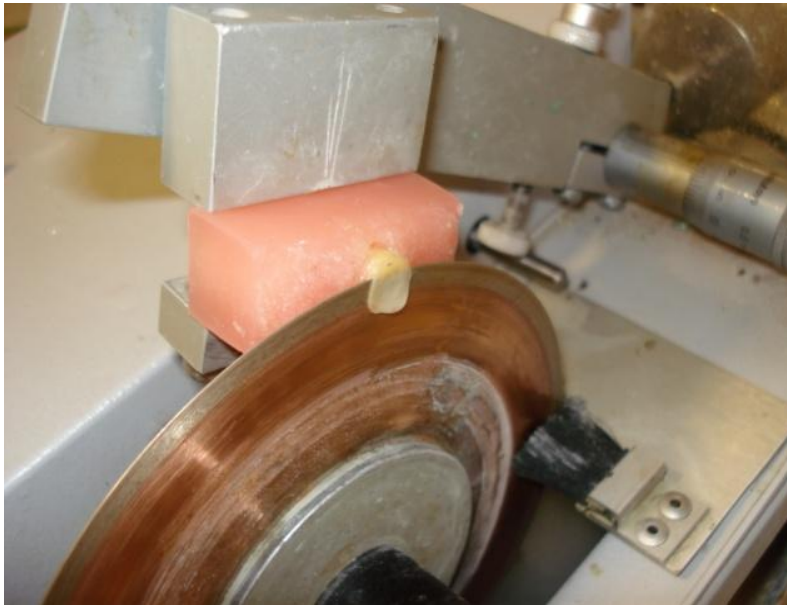


Şekil 3.12:Örneklerin akrilik bloklara gömülmesi.



Şekil 3.13: IsoMet Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, USA

Disklerin okluzal ve pulpal yüzeylerinin karışmaması için okluzal yüzeyler sabit kalem ile işaretlenmiştir. Daha sonra bu dişlerden $500 \pm 50 \mu\text{m}$ dentin kesitleri dişin uzun aksına dik olarak, düşük hızda (200 devir/dk) çalışan elmas separe ile elde edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: Dentin disklerinin elde edilmesi

Elde edilen bu kesitlerin hem okluzal hem de pulpal yüzeyleri #600 grit zımpara kağıdı ile pürüzsüzleştirildikten sonra kalınlıkları dijital kumpas (Mitutoyo, 1/100,

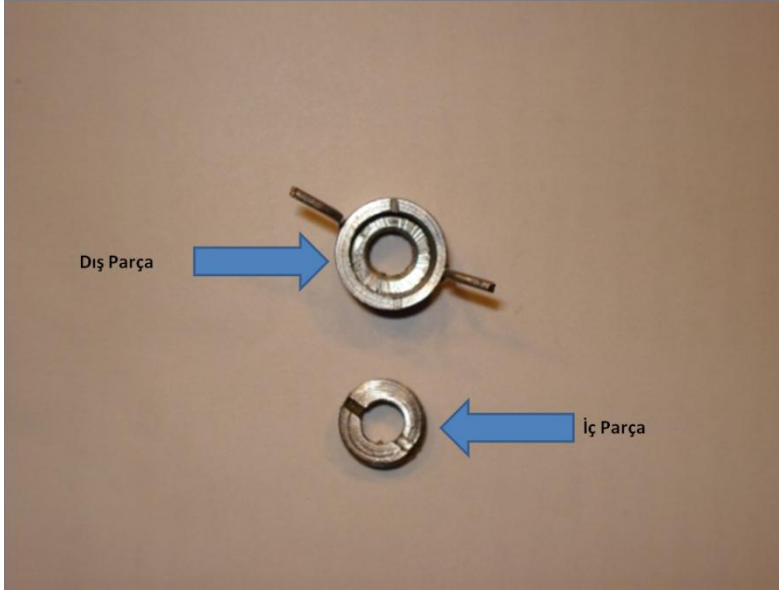
Japonya) ile ölçülmüştür. 500 ± 50 μm daha ince ya da daha kalın olan dentin kesitleri kullanılmamıştır. Dentin kesitlerinin pulpa odası üstüne gelen bölgesinden $\varnothing 6\text{mm}$ olan dentin diskleri su soğutması altında elmas frez ile kesilerek elde edilmiştir. Test öncesi dentin disklerinin pulpa yüzeylerine smear tabakasının uzaklaştırılması için 30 sn sitrik asit uygulanmıştır. Disklerin okluzal yüzeyleri tekrar işaretlendikten sonra, kullanılacağı zamana kadar serum fizyolojik içinde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de bekletilmiştir. Testler yapılacağı zaman, hazırlanmış olan dentin diskleri 121°C ' de 25dk otoklavda steril edildikten sonra rastgele 7 gruba ayrılmıştır.

3.7.2. Dentin Bariyer Test Düzenekinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan dentin bariyer test düzenekinin tüm parçaları paslanmaz çelikten yapılmıştır (Şekil 3.15). Birbirinden bağımsız iki parça halinde hazırlanan düzenekte iç parça dış parçanın içine vidalanacak şekilde tasarlanmıştır. Dış parçanın yüksekliği 13mm, dış $\varnothing 11\text{mm}$, iç $\varnothing 9\text{mm}$ 'dir. Dış parça tabanının da 5 mm $\varnothing$ çapında açıklık bulunmaktadır (Şekil 3.16). İç parçanın yüksekliği 4,5 mm, dış $\varnothing 9\text{mm}$, iç $\varnothing 5\text{mm}$ 'dir. Dış parçanın yan taraflarında dentin bariyer test düzenekinin, 24 kuyucuklu hücre kültür kabına tutunmasını ve kabın tabanından 2mm yüksekte kalmasını sağlamak için uzantılar yapılmıştır. Dentin bariyer test düzenekleri test öncesi 121°C ' de 25dk otoklavda steril edilmiştir.



Şekil 3.15:Dentin bariyer test düzenekİ



Şekil 3.16:Dentin bariyer test düzeneği iç ve dış parçaları

3.7.3. Dentin Bariyer Test Düzeneği Örneklerinin Hazırlanması

6 mm çapında hazırlanan dentin diskleri dış parçanın içine yerleştirilmeden önce sızdırmazlığı sağlamak için polivinilsiloksan light body ölçü materyali (Zhermack Oranwash L, lot number:81353; Zhermack Indurent Gel, lot number: 81023)) enjektör yardımı ile dış parçanın taban kısmındaki açıklığın etrafına uygulanmıştır (Şekil 3.17, Şekil 3.18). Ölçü materyali sertleşmeden dentin diskleri dış parçanın içine yerleştirilmiş daha sonra iç parça vidalanmıştır.



Şekil 3.17:Polivinilsiloksan ölçü maddesinin dentin bariyer test düzeneği dış parçasına uygulanması



Şekil 3.18:Polivinilsiloksan ölçü maddesinin dentin bariyer test düzeneği dış parçasına uygulanmış hali

Dentin diski yerleştirilmiş dentin bariyer test düzeneklerine test materyali Scotchbond Multi Purpose ve XP Bond isimli etch & rinse dentin bağlayıcı sistemler uygulamadan önce dentin yüzeyleri 15 sn Scotchbond Etchant ile asitlenmiş daha sonra steril distile su kullanılarak enjektör yardımı ile 10 saniye boyunca dentin yüzeyleri yıkanmıştır. Dentin yüzeyinde kalan fazla nem puar yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Diğer test materyalleri ise (Protect Bond, AdheSE, Xeno V) self etch bağlayıcı sistemler olduğundan dolayı dentine asitleme işlemi yapılmamıştır. Dentin diski yerleştirilmiş dentin bariyer test düzeneklerine test materyalleri üretici firma önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. Test materyallerinin polimerizasyonu için halojen ışık kaynağı kullanılmıştır. Hazırlanan her bir 10 örnek sonrası ışık kaynağının gücü radyometre ile ölçülmüştür.

Test materyallerinin uygulanması sonrası dentin bariyer test düzenekleri her bir kuyucuğuna daha önceden hücrelerin yerleştirildiği 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına dikkatli bir şekilde taşınarak, kuyucuk içerisinde bulunan medyumun dentin disklerinin pulpa yüzeyine temas etmesi sağlanacak şekilde uygulanmıştır. (Şekil 3.19).

Çalışmamızda ışıkla sertleşen bir reçine modifiye cam iyonomer simanı (Vitrebond) dentin bariyer testinde pozitif kontrol maddesi olarak kullanılmıştır. Üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlanan Vitrebond fulvar yardımı ile dentin

yüzeylerine uygulanmış ve halojen ışık kaynağı ile polimerizasyonu sağlanmıştır (Tablo 3.2).

Çalışmamızda dentin diski yerleştirilmiş fakat hiç bir materyal uygulanmamış dentin bariyer test düzeneklerinin hücre içeren kuyucuklara yerleştirilmesi negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

24 ve 72 saat sonunda sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi için hem test hem de kontrol grupları için 3'er adet dentin bariyer test düzeneği hazırlanmıştır.



Şekil 3.19: Bariyer test düzeneklerinin hücre kültürlerine yerleştirilmesi

24 saat ve 72 saatlik değerlendirme için ayrı ayrı hazırlanan test materyalleri ve kontrol gruplarını içeren dentin bariyer test düzenekleri 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına uygulanmıştır. Daha sonra bu kaplar 24 ve 72 saatlik sürelerle 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda sitotoksik ve apoptotik etkilerin değerlendirilmesi yapılmıştır

3.8. Toplam Hücre Sayısı Tayini

Deneyler için test ve kontrol grubuna ait materyaller uygulanmadan önce % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 5×10^5 3T3 fibroblast hücre hattı 24 ve 72 saatlik her bir test için DMEM-F12 medyumuna içeren 3'er kuyucuğa ekilmiştir. Daha sonra test ve kontrol materyalleri hücre kültür insert testi için insertlere, dentin bariyer testi için ise dentin bariyer test düzeneğine yerleştirilerek kuyucuklar içindeki hücreler üzerine uygulanmış ve 24 ve 72 saatlik sürelerle inkübatör ortamında tutulmuştur. Belirtilen

süreler sonunda hücreler toplanmış ve sayma kamarası (hemasitometre, Naubauer, Germany) ile sayılmıştır (156).

3.9. İki Boyutlu Hücre kültürlerinde Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile Apoptoz Tayini

Deneyler için test ve kontrol grubuna ait materyaller uygulanmadan önce % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 5×10^5 3T3 fibroblast hücre hattı 24 ve 72 saatlik her bir test için DMEM-F12 medyumunu içeren 3'er kuyucuğa ekilmiştir. Daha sonra test ve kontrol materyalleri hücre kültür insert testi için insertlere, dentin bariyer testi için ise dentin bariyer test düzeneğine yerleştirilerek kuyucuklar içindeki hücreler üzerine uygulanmış ve 24 ve 72 saatlik sürelerle inkübatör ortamında tutulmuştur. Belirtilen süreler sonunda hücreler toplanmış ve sayma kamarası (hemasitometre, Naubauer, Germany) ile sayılmış, PBS ile iki defa yıkanmış ve apoptoz kitinde bulunan bağlama tamponu (0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Bağlama solüsyonu içindeki hücre süspansiyonuna (100 μl bağlama solüsyonu içinde 1×10^5 hücre) 5 μl FITC-etiketli Anneksin-V-FITC ve vital boya olan propidyum iodid (PI) ile oda ısısında karanlıkta 15 dakika bekletilmiştir. Sonra Anneksin-V-FITC ve PI ile verdiği floresans BD FACS Calibur adlı akım sitometre cihazı ile ölçülmüştür. Sonuçlar CellQuest ve WinMDI adlı analiz programları ile değerlendirilmiş ve kontrol grubuna göre test materyallerinin ölü, canlı ve apoptotik hücre oranları üzerine etkileri saptanmıştır (157,158).

3.10. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde Bromodeoksiüridin (BrDU) İşaretleme İndeksi

Yuvarlak lameller 24 kuyucuklu kültür kaplarına alkolle yakılarak steril bir şekilde yerleştirilmiştir. Kuyucuk başına 70.000 hücre proliferasyon deneylerindeki her bir test (hücre kültür insert ve dentin bariyer)ve her bir zaman aralığı (24 ve 72 saat) için 4 lamel üzerine ekilmiş ve hücrelerin yapışması için 3 saat beklenmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra her bir kuyucuğa hücreleri kaldırmadan 1 ml medyum konmuştur. Her 24 saat sonunda hücrelere 20 μM BrDU uygulanmış ve hücreler 1 saat inkübatörde bekletilmiştir. Medyum uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml PBS konmuş ve 15 dakika 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra % 70 etanolde 30 dakika -

20 °C’de 30 dakika bekletilerek hücreler tespit edilmiştir. Lameller, etanol uzaklaştırıldıktan sonra oda ısısında (22-25 °C) kurutulmuştur.

Lameller PBS’de 20 dakika bekletildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini durdurmak için metanolle hazırlanmış % 0.5 H₂O₂ ‘de oda ısısında 20 dakika karanlıkta tutulmuştur. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa PBS ile yıkanmış ve DNA denatürasyonu için 2N HCl’de 30 dakika 37 °C’lik etüvde bekletilmiştir. PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra spesifik olmayan bağlanmayı engellemek için 10 dakika kitin içinde olan serum ile oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir ve serum uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan birincil antikor olan fare monoklonal BrDU antikoruna ile 1 saat nemli ortamda oda ısısında bekletilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra ikincil antikor olan geniş spektrumlu biotinlenmiş keçi anti-fare antikoruna ile 15 dakika nemli ortamda oda ısısında bekletilmiş, tekrar PBS ile yıkanmış ve yaban turbu streptavidin peroksidazla nemli ortamda oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra AEC kromojen oda ısısında karanlıkta ışık mikroskopunda renk oluşumu izlenerek 15 dakika bekletilmiş ve distile su ile yıkanmıştır. Lameller Ehrlich Hematoksilen ile 5 dakika zemin boyası yapıldıktan sonra çeşme suyunda 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra distile suya alınmıştır. Lameller kuyucuklardan çıkartılarak AEC kromojen ile uyumlu kapatıcı (Mount) ile lam üstüne kapatılmıştır. Çekirdekleri kırmızı ile boyanmış hücreler BrDU-LI pozitif kabul edilmiş, ışık mikroskopunda dijital kamera kullanılarak fotoğrafları çekilmiş ve her bir gruba ait preperatta 30 alan sayılarak işaretli hücre oranı/toplam hücre oranı % olarak belirlenmiştir (159).

3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Test Materyallerinin Hücre Morfolojisine Etkilerinin Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi

Yuvarlak lameller 24 kuyucuklu kültür kaplarına alkolle yakılarak steril bir şekilde yerleştirilmiştir. Kuyucuk başına 70.000 hücre proliferasyon deneylerindeki her bir test (hücre kültür insert ve dentin bariyer) ve 72 saatlik zaman için 4 lamel üzerine ekilmiş ve hücrelerin yapışması için 3 saat beklenmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra her bir kuyucuğa hücreleri kaldırmadan 1 ml medyum konmuştur. Daha sonra test ve kontrol materyalleri hücre kültür insert testi için insertlere, dentin bariyer testi için ise dentin bariyer test düzeneğine yerleştirilerek kuyucuklar içindeki hücreler üzerine uygulanmıştır.

72 saatlik süre sonunda hücreler medyumları çekilip atıldıktan sonra üzerlerine % 2.5’luk gluteraldehid konularak 40 dakika 4 °C’de bekletilerek tespit edilmiştir. PBS

ile 2 defa 10 dakika yıkandıktan sonra osmik asitte (osmium tetroksid) 1 saat 4 °C'de bekletilerek ikinci defa tespit edilmiştir. PBS ile 2 defa 10 dakika yıkanmış ve sırasıyla artan etanol serilerinde (% 30, %50, %70, %90 ve %100 etanol) 10 dakika, 1/3 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10 dakika, 1/1 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10 dakika, 3/1 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10 dakika, saf amilasetatta oda ısısında 1 saat bekletilmiştir. Parçalar kurutma cihazı yardımıyla kurutulmuş, kaplama cihazında altınla kaplanmış ve hücrelerin üç boyutlu yapısı SEM'de incelenmiştir (160).

3.12. İstatistiksel Yöntem

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanılmıştır. Hücre kültür insert testi ve dentin bariyer testi ile 24 ve 72 saat sonunda her bir test ve kontrol grupları için elde edilen hücre sayıları, apoptotik hücre oranları ve proliferasyona uğrayan hücre oranları her bir zaman grubu için kendi içinde Kruskal Wallis testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulunması durumunda test materyalleri ve kontrol gruplarına ait değerlerin birbiri ile ikili kıyaslaması ise Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Hücre kültür insert testi ve dentin bariyer testi ile 24 ve 72 saat sonunda her bir test ve kontrol grupları için elde edilen hücre sayıları, apoptotik hücre oranları ve proliferasyona uğrayan hücre oranları için elde edilen değerlerinin birbiri ile kıyaslanması Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Kullanılan bu istatistiksel testlerde p değeri 0.05'den küçük olan değerler için fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Toplam Hücre Sayısı Tayini

4.1.1. Hücre Kültür İnsert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

4.1.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond , Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait 24 saat sonundaki toplam hücre sayıları Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi

Insert (24 Saat)	Hücre Sayısı (x10 ⁴)		⁺ p
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş) ¹	8,67±0,33	9	0,001**
Kontrol (HEMA) ²	2,33±0,33	2	
AdheSE Bond ³	7,00±0,00	7	
AdheSE Primer ⁴	0,67±0,3	1	
Protect Bond Bond ⁵	4,00±0,00	4	
Protect Bond Primer ⁶	1,00±0,00	1	
Scotchbond MP Bond ⁷	3,67±0,88	4	
Scotchbond MP Primer ⁸	1,00±0,00	1	
Xeno V ⁹	3,00±0,58	3	
Xp Bond ¹⁰	0,67±0,33	1	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** p≤0.01

Hücre kültürü insert testinde 24 saat sonunda kontrol grupları ile test materyalleri hücre sayıları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.01). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.2'de görülmektedir.

24 saat sonunda hücre kültür insert testi sonucunda elde edilen toplam hücre sayısı bulguları değerlendirildiğinde en az sayıda hücre 2 aşamalı dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bulunmuştur. Negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında, diğer test materyalleri ve pozitif kontrol grubuna oranla AdheSE bond grubunda en fazla sayıda toplam hücre tespit edilmiştir.

Aynı zamanda tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol grupları için elde edilen toplam hücre sayısı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında, primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında negatif kontrol grubundan anlamlı olarak daha az sayıda hücre tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.3)

HEMA uygulanan grup (pozitif kontrol) ile kıyaslandığında uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında (AdheSE primer, Protect Bond primer, Scotchbond MP primer) ve Xp Bond'da anlamlı olarak daha az sayıda canlı hücre bulunmuştur. Diğer yandan dentin bağlayıcı sistemlerin bonding kısımları (AdheSE bond, Protect Bond bond, Scotchbond MP bond) ve Xeno V'e ait hücre sayılarının HEMA uygulanmış pozitif kontrol grubundan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. HEMA ile Protect Bond bond kısmı ve AdheSE bond kısmı arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlılık sergilerken, ($p<0.05$), Scotchbond MP bond kısmı ve Xeno V ile HEMA arasında hücre sayısında farklılık istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.

24 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait hücre sayılarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bu bağlayıcı sistemlerin bonding kısımlarından anlamlı olarak daha az sayıda hücre tespit edilmiştir. Diğer yandan dentin bağlayıcıların primer kısımlarında Xeno V den anlamlı olarak daha az sayıda hücre gözlemlenirken, XP bond ile aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Tablo 4.2: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin ikili hücre sayısı karşılaştırmaları

Insert (24 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)	Açıklama
	^{++}p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,034*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	1>2,3,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	3>2,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,246	5>2,4,6,8,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,034*	2,7,9>4,6,8,10
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,346	
Kontrol (HEMA) ² / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
AdheSE Bond ³ / AdheSE Primer ⁴	0,034*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Bond ⁵	0,025*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Primer ⁶	0,025*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,037*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,025*	
AdheSE Bond ³ / Xeno V ⁹	0,037*	
AdheSE Bond ³ / Xp Bond ¹⁰	0,034*	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Primer ⁶	0,317	

AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Primer⁸	0,317
AdheSE Primer⁴ / Xeno V⁹	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Xp Bond¹⁰	1,000
Protect Bond Bond⁵ / Protect Bond Primer⁶	0,025*
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Bond⁷	1,000
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Primer⁸	0,025*
Protect Bond Bond⁵ / Xeno V⁹	0,121
Protect Bond Bond⁵ / Xp Bond¹⁰	0,034*
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Bond⁷	0,037*
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Primer⁸	1,000
Protect Bond Primer⁶ / Xeno V⁹	0,037*
Protect Bond Primer⁶ / Xp Bond¹⁰	0,317
Scotchbond MP Bond⁷ / Scotchbond MP Primer⁸	0,037*
Scotchbond MP Bond⁷ / Xeno V⁹	0,500
Scotchbond MP Bond⁷ / Xp Bond¹⁰	0,046*
Scotchbond MP Primer⁸ / Xeno V⁹	0,037*
Scotchbond MP Primer⁸ / Xp Bond¹⁰	0,317
Xeno V⁹ / Xp Bond¹⁰	0,046*
⁺⁺ Mann Whitney U Test	* $p \leq 0.05$

Tablo 4.3: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		S	S	S	S	NS	S	NS	S
Adhese Bond	S	S		S	S	S	S	S	S	S
Adhese Primer	S	S	S		S	NS	S	NS	S	NS
Protect Bond Bond	S	S	S	S		S	NS	S	NS	S
Protect Bond Primer	S	S	S	NS	S		S	NS	S	NS
Scotchbond MP Bond	S	NS	S	S	NS	S		S	NS	S
Scotchbond MP Primer	S	S	S	NS	S	NS	S		S	NS
Xeno V	S	NS	S	S	NS	S	NS	S		S
XP Bond	S	S	S	NS	S	NS	S	NS	S	

****Mann Whitney U Test* $p\leq 0.05$**

4.1.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İncert Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond, Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait 72 saat sonundaki toplam hücre sayıları Tablo 4.4'de gösterilmektedir.

Tablo 4.4: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi

Insert (72 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)		⁺ <i>p</i>
	Ort $\pm$ SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	8,33 $\pm$ 0,33	8	
Kontrol (HEMA)²	2,67 $\pm$ 0,33	3	
AdheSE Bond³	2,33 $\pm$ 0,33	2	
AdheSE Primer⁴	1,00 $\pm$ 0,00	1	
Protect Bond Bond⁵	1,00 $\pm$ 0,00	1	
Protect Bond Primer⁶	0,00 $\pm$ 0,00	0	0,002**
Scotchbond MP Bond⁷	3,67 $\pm$ 0,88	4	
Scotchbond MP Primer⁸	0,67 $\pm$ 0,33	1	
Xeno V⁹	2,33 $\pm$ 0,33	2	
Xp Bond¹⁰	1,33 $\pm$ 0,33	1	

⁺ *Kruskal Wallis Testi*

**** $p \leq 0.01$**

Hücre kültürü insert testinde 72 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin hücre sayıları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.5’de görülmektedir.

72 saat sonunda toplam hücre sayısı değerlendirildiğinde 2 aşamalı dentin bağlayıcı sistemlerden Protect Bond’un primer kısmında en az sayıda hücre tespit edilmiştir. Protect Bond primerden sonra Protect Bond bond kısmı, AdheSE primer, XP Bond ve Scotchbond MP primerde en az sayıda hücre izlenmiştir. En fazla sayıda hücre ise 2 aşamalı dentin bağlayıcı sistemlerden Scotchbond MP’un bond kısmında gözlenmiştir.

Aynı zamanda 72 saat sonunda tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol grupları için elde edilen toplam hücre sayısı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında, primer ve

bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında negatif kontrol grubundan anlamlı olarak daha az sayıda hücre tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.6)

HEMA uygulanan grup (pozitif kontrol) ile kıyaslandığında uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında (AdheSE primer, Protect Bond primer, Scotchbond MP primer) ve Protect Bond bond kısmında istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha az sayıda canlı hücre bulunmuştur($p<0.05$). Diğer yandan Scotchbond'un bond kısmında HEMA pozitif kontrol grubuna kıyasla daha fazla hücre tespit edilmesine rağmen bu farklılık istatistiksel olarak bir anlamlılık sergilememiştir.

72 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait hücre sayılarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bu bağlayıcı sistemlerin bonding kısımlarından anlamlı olarak daha az sayıda hücre tespit edilmiştir. Diğer yandan dentin bağlayıcıların primer kısımlarında Xeno V' den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az sayıda hücre gözlemlenirken, XP Bond'un ise sadece Protect Bond'un primer kısmından anlamlı olarak daha fazla sayıda hücre canlılığı sergilediği görülmüştür.

Tablo 4.5: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin ikili toplam hücre sayısı karşılaştırmaları

Insert (72 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)	Açıklama
	^{++}p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,456	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,034*	
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	1>2,3,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,369	6<2,3,4,5,7,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*	2,3,7,9>4,5,8
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,456	
Kontrol (HEMA) ² / Xp Bond ¹⁰	0,068	
AdheSE Bond ³ / AdheSE Primer ⁴	0,034*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,246	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*	
AdheSE Bond ³ / Xeno V ⁹	1,000	
AdheSE Bond ³ / Xp Bond ¹⁰	0,099	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Bond ⁵	1,000	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Primer ⁶	0,025*	

AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Bond⁷	0,037*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Primer⁸	0,317
AdheSE Primer⁴ / Xeno V⁹	0,034*
AdheSE Primer⁴ / Xp Bond¹⁰	0,317
Protect Bond Bond⁵ / Protect Bond Primer⁶	0,025*
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Bond⁷	0,037*
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Primer⁸	0,317
Protect Bond Bond⁵ / Xeno V⁹	0,034*
Protect Bond Bond⁵ / Xp Bond¹⁰	0,317
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Bond⁷	0,037*
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Primer⁸	0,114
Protect Bond Primer⁶ / Xeno V⁹	0,034*
Protect Bond Primer⁶ / Xp Bond¹⁰	0,034*
Scotchbond MP Bond⁷ / Scotchbond MP Primer⁸	0,046*
Scotchbond MP Bond⁷ / Xeno V⁹	0,246
Scotchbond MP Bond⁷ / Xp Bond¹⁰	0,072
Scotchbond MP Primer⁸ / Xeno V⁹	0,043*
Scotchbond MP Primer⁸ / Xp Bond¹⁰	0,197
Xeno V⁹ / Xp Bond¹⁰	0,099
⁺⁺ Mann Whitney U Test	* $p \leq 0.05$

Tablo 4.6: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		NS	S	S	S	NS	S	NS	NS
Adhese Bond	S	NS		S	S	S	NS	S	NS	NS
Adhese Primer	S	S	S		NS	S	S	NS		NS
Protect Bond Bond	S	S	S	NS		S	S	NS	S	NS
Protect Bond Primer	S	S	S	S	S		S	NS	S	S
Scotchbond MP Bond	S	NS	NS	S	S	S		S	NS	NS
Scotchbond MP Primer	S	S	S	NS	NS	NS	S		S	NS
Xeno V	S	NS	NS	S	S	S	NS	S		NS
XP Bond	S	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	

**Mann Whitney U Test* $p \leq 0.05$

4.1.1.3. Hücre Kültürü İncert Testinde 24 saat ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi

Şekil 4.1’de materyallerin 24 ve 72 saat sonunda toplam hücre sayıları, Tablo 4.7’de materyallerin 24 ve 72 saat sonunda toplam hücre sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırmaları gösterilmektedir.

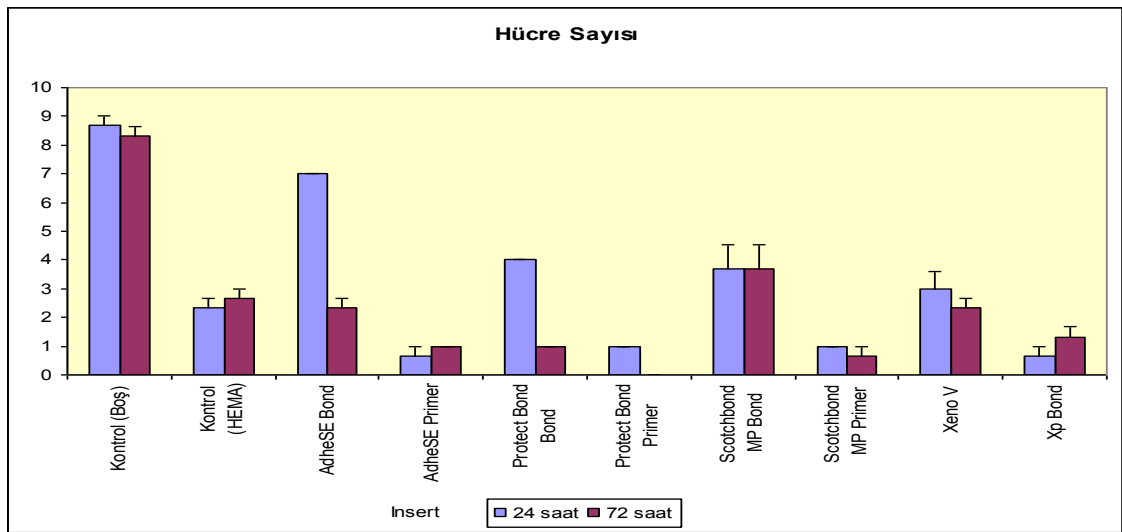
Tablo 4.7: Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi

Insert	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)		⁺⁺ <i>p</i>
	24 saat	72 saat	
	Ort $\pm$ SE (Medyan)	Ort $\pm$ SE (Medyan)	
Kontrol (Boş)¹	8,67 $\pm$ 0,33 (9)	8,33 $\pm$ 0,33 (8)	0,456
Kontrol (HEMA)²	2,33 $\pm$ 0,33 (2)	2,67 $\pm$ 0,33 (3)	0,456
AdheSE Bond³	7,00 $\pm$ 0,00 (7)	2,33 $\pm$ 0,33 (2)	0,034*
AdheSE Primer⁴	0,67 $\pm$ 0,3 (1)	1,00 $\pm$ 0,00 (1)	0,317
Protect Bond Bond⁵	4,00 $\pm$ 0,00 (4)	1,00 $\pm$ 0,00 (1)	0,025*
Protect Bond Primer⁶	1,00 $\pm$ 0,00 (1)	0,00 $\pm$ 0,00 (0)	0,025*
Scotchbond MP Bond⁷	3,67 $\pm$ 0,88 (4)	3,67 $\pm$ 0,88 (4)	1,000
Scotchbond MP Primer⁸	1,00 $\pm$ 0,00 (1)	0,67 $\pm$ 0,33 (1)	0,317
Xeno V⁹	3,00 $\pm$ 0,58 (3)	2,33 $\pm$ 0,33 (2)	0,346
Xp Bond¹⁰	0,67 $\pm$ 0,33 (1)	1,33 $\pm$ 0,33 (1)	0,197

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına, primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına, pozitif ve negatif kontrol grubuna ait 24 ve 72 saat sonundaki canlı hücre sayıları kıyaslandığında AdheSE'nin bond kısmının, Protect Bond'un hem bond hem de primer kısmının süre artışıyla orantılı olarak canlı hücrelerde anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edilmiş, dolayısıyla bu materyallerin sitotoksik etkisinin zamanla arttığı izlenmiştir.



Şekil 4.1: Hücre kültürü insert testinde materyaller uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra toplam hücre sayısı değerleri

4.1.2. Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

4.1.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonomer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait 24 saat sonundaki toplam hücre sayıları Tablo 4.8’de gösterilmektedir.

Tablo 4.8: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (24 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)		⁺ <i>p</i>
	Ort $\pm$ SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	9,67 $\pm$ 0,33	10	0,007**
Kontrol (Vitrebond)²	4,67 $\pm$ 0,33	5	
AdheSE³	8,00 $\pm$ 0,58	8	
Protect Bond⁴	4,00 $\pm$ 0,58	4	
Scotchbond MP⁵	3,33 $\pm$ 0,33	3	
Xeno V⁶	6,00 $\pm$ 0,58	6	
Xp Bond⁷	5,67 $\pm$ 0,33	6	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Dentin bariyer testinde 24 saat sonunda kontrol gruplarının ve test materyallerinin hücre sayıları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.9’da görülmektedir.

24 saat sonunda dentin bariyer testinden elde edilen toplam hücre sayısı bulguları değerlendirildiğinde en fazla hücre AdheSE grubunda, en az sayıda hücre ise Scotchbond MP ve Protect Bond grubunda tespit edilmiştir. 24 saat sonunda tüm test materyalleri, negatif ve pozitif kontrol grupları için elde edilen toplam hücre sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde AdheSE dışındaki diğer tüm dentin bağlayıcılar negatif kontrol grubundan anlamlı düzeyde hücre sayısında daha fazla azalmaya neden olmuşlardır ($p < 0.005$).

Vitrebond uygulanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında AdheSE dentin bağlayıcısına ait canlı hücre sayısının anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Diğer yandan AdheSE dışındaki diğer dentin bağlayıcılarla Vitrebond arasında hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p<0.005$).

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 24 saat sonundaki hücre sayıları birbirleri ile kıyaslandığında (Tablo 4.10) AdheSE test materyaline ait canlı hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde diğer dentin bağlayıcılardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun yanında Scotchbond MP ait hücre sayısının ise Protect Bond dışındaki diğer tüm dentin bağlayıcılardan anlamlı düzeyde daha az olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.9:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayısı için ikili istatistiksel karşılaştırmaları

Dentin Bariyer (24 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)	Açıklama
	^{++}p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (Vitrebond) ²	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE ³	0,072	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP ⁵	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁶	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ⁷	0,043*	
Kontrol (Vitrebond) ² /AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² / Protect Bond ⁴	0,346	
Kontrol (Vitrebond) ² /Scotchbond MP ⁵	0,068	
Kontrol (Vitrebond) ² /Xeno V ⁶	0,105	1>2,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷	0,099	3>2,4,5,6,7
AdheSE ³ / Protect Bond ⁴	0,050*	5<6,7
AdheSE ³ /Scotchbond MP ⁵	0,046*	
AdheSE ³ /Xeno V ⁶	0,046*	
AdheSE ³ /Xp Bond ⁷	0,046*	
Protect Bond ⁴ /Scotchbond MP ⁵	0,346	
Protect Bond ⁴ /Xeno V ⁶	0,077	
Protect Bond ⁴ /Xp Bond ⁷	0,072	
Scotchbond MP ⁵ /Xeno V ⁶	0,046*	
Scotchbond MP ⁵ /Xp Bond ⁷	0,043*	
Xeno V ⁶ /Xp Bond ⁷	0,637	

$^{++}$ Mann Whitney U Test

* $p\leq 0.05$

Tablo 4.10: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	NS	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	NS	NS	NS	NS
Adhese	NS	S		S	S	S	S
Protect Bond	S	NS	S		NS	NS	NS
Scotchbond MP	S	NS	S	NS		S	S
Xeno V	S	NS	S	NS	S		NS
XP Bond	S	NS	S	NS	S	NS	

** Mann Whitney U Test* $p \leq 0.05$

4.1.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Toplam Hücre Sayısı Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonomer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait 24 saat sonundaki toplam hücre sayıları Tablo 4.11’de gösterilmektedir.

Tablo 4.11: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayılarının değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (72 Saat)	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)		⁺ p
	Ort $\pm$ SE	Medyan	
Kontrol (Boş) ¹	6,67 $\pm$ 0,33	7	0,008**
Kontrol (Vitrebond) ²	2,33 $\pm$ 0,33	2	
AdheSE ³	5,33 $\pm$ 0,88	5	
Protect Bond ⁴	3,67 $\pm$ 0,33	4	
Scotchbond MP ⁵	2,67 $\pm$ 0,33	3	
Xeno V ⁶	3,67 $\pm$ 0,33	4	
Xp Bond ⁷	1,67 $\pm$ 0,33	2	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Dentin bariyer testinde 72 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin hücre sayıları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p \leq 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.12’de görülmektedir.

72 saat sonunda dentin bariyer testinden elde edilen toplam hücre sayısı bulguları değerlendirildiğinde en fazla hücre AdheSE dentin bağlayıcı grubunda, en az sayıda hücre ise XP Bond dentin bağlayıcı grubunda tespit edilmiştir. 72 saat sonunda tüm test materyalleri, negatif ve pozitif kontrol grupları için elde edilen toplam hücre sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde AdheSE dışındaki diğer tüm dentin bağlayıcılar negatif kontrol grubundan anlamlı düzeyde hücre sayısında daha fazla azalmaya neden olmuşlardır ($p < 0.005$).

Vitrebond uygulanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında AdheSE dentin bağlayıcısına ait canlı hücre sayısının anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer yandan AdheSE dışındaki diğer dentin bağlayıcılarla Vitrebond arasında hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p < 0.005$).

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 72 saat sonundaki hücre sayıları birbirleri ile kıyaslandığında (Tablo 4.13) XP Bond grubuna ait hücre sayısının Scotchbond MP dışındaki diğer tüm dentin bağlayıcılardan anlamlı düzeyde daha az olduğu saptanmıştır. Diğer yandan Scotchbond MP dentin bağlayıcısının yalnız AdheSe dentin bağlayıcısından anlamlı düzeyde daha fazla hücre sayısında azalmaya neden olduğu, AdheSE dışındaki diğer dentin bağlayıcılar ile Scotchbond MP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır.

Tablo 4.12: Dentin bariyer kültür testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayısı için ikili karşılaştırmaları

Dentin Bariyer (72 Saat)		Hücre Sayısı ($\times 10^4$)	Açıklama
		⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol	(Boş) ¹ / Kontrol	0,043*	
(Vitrebond) ²			
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE ³		0,246	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond ⁴		0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP ⁵		0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁶		0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ⁷		0,043*	
Kontrol (Vitrebond) ² /AdheSE ³		0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² / Protect Bond ⁴		0,068	
Kontrol (Vitrebond) ² /Scotchbond MP ⁵		0,456	1>2,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xeno V ⁶		0,068	3>2,5,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷		0,197	7<4,6
AdheSE ³ / Protect Bond ⁴		0,105	
AdheSE ³ /Scotchbond MP ⁵		0,046*	
AdheSE ³ /Xeno V ⁶		0,105	
AdheSE ³ /Xp Bond ⁷		0,046*	
Protect Bond ⁴ /Scotchbond MP ⁵		0,099	
Protect Bond ⁴ /Xeno V ⁶		1,000	
Protect Bond ⁴ /Xp Bond ⁷		0,043*	
Scotchbond MP ⁵ /Xeno V ⁶		0,099	
Scotchbond MP ⁵ /Xp Bond ⁷		0,099	
Xeno V ⁶ /Xp Bond ⁷		0,043*	

$^{++}$ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Tablo 4.13: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin toplam hücre sayıları için ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	NS	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	NS	NS	NS	NS
Adhese	NS	S		NS	S	NS	S
Protect Bond	S	NS	NS		NS	NS	S
Scotchbond MP	S	NS	S	NS		NS	NS
Xeno V	S	NS	NS	NS	NS		S
XP Bond	S	NS	S	S	NS	S	

** Mann Whitney U Test* $p \leq 0.05$

4.1.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 saat ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi

Şekil 4.2’de materyallerin 24 ve 72 saat sonunda toplam hücre sayıları, Tablo 4.14’de materyallerin 24 ve 72 saat sonunda toplam hücre sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırmaları gösterilmektedir.

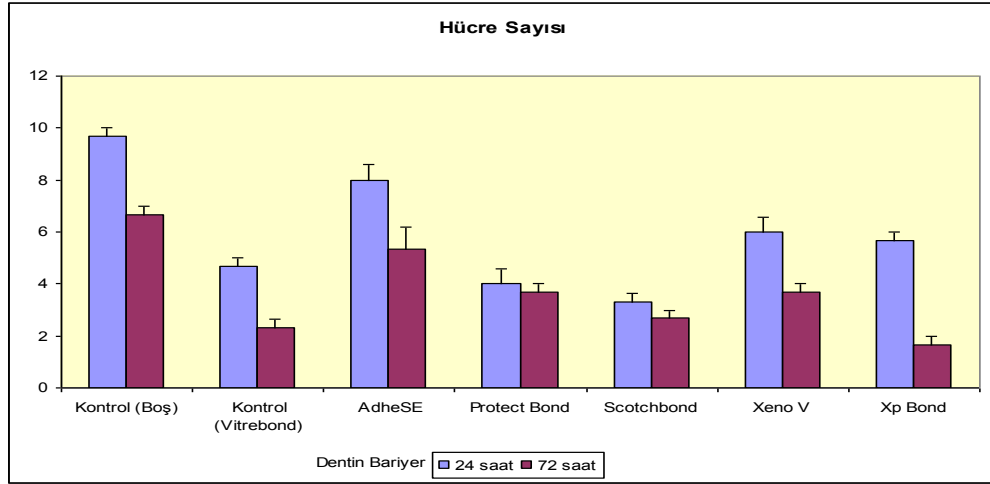
Tablo 4.14: Dentin bariyer kültür testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin hücre sayılarının değerlendirilmesi

Dentin Bariyer	Hücre Sayısı ($\times 10^4$)		⁺⁺ <i>p</i>
	24 saat	72 saat	
	Ort $\pm$ SE (Medyan)	Ort $\pm$ SE (Medyan)	
Kontrol (Boş) ¹	9,67 $\pm$ 0,33 (10)	6,67 $\pm$ 0,33 (7)	0,043*
Kontrol (Vitrebond) ²	4,67 $\pm$ 0,33 (5)	2,33 $\pm$ 0,33 (2)	0,043*
Adhese ³	8,00 $\pm$ 0,58 (8)	5,33 $\pm$ 0,88 (5)	0,077
Protect Bond ⁴	4,00 $\pm$ 0,58 (4)	3,67 $\pm$ 0,33 (4)	0,637
Scotchbond ⁵	3,33 $\pm$ 0,33 (3)	2,67 $\pm$ 0,33 (3)	0,197
Xeno V ⁶	6,00 $\pm$ 0,58 (6)	3,67 $\pm$ 0,33 (4)	0,046*
Xp Bond ⁷	5,67 $\pm$ 0,33 (6)	1,67 $\pm$ 0,33 (2)	0,043*

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Uygulanan dentin bağlayıcılar, pozitif ve negatif kontrol grubuna ait 24 ve 72 saat sonundaki canlı hücre sayıları kıyaslandığında Xeno V ve XP Bond dentin bağlayıcılarının süre artışıyla orantılı olarak canlı hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu tespit edilmiş, dolayısıyla bu materyallerin sitotoksik etkisinin zamanla arttığı izlenmiştir.



Şekil 4.2: Hücre kültürü dentin bariyer testinde materyaller uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra toplam hücre sayısı değerleri

4.2. Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile Apoptoz Oranı (%) Bulguları

4.2.1. Hücre Kültür İnsert Testinde Apoptoz Oranı Bulguları

4.2.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond , Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait Anneksin-V-FITC/PI boyaması ile akım sitometre kullanarak yapılan değerlendirme sonucu 24 saat sonunda elde edilen apoptotik hücre oranları Tablo 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4.15:Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının (%) değerlendirilmesi

Insert (24 Saat)	Apoptoz (%)		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	7,00±0,58	7	
Kontrol (HEMA)²	93,00±1,15	93	
AdheSE Bond³	36,00±0,58	36	
AdheSE Primer⁴	86,67±0,33	87	
Protect Bond Primer⁵	93,67±0,33	94	
Protect Bond Bond⁶	57,00±0,58	57	0,001**
Scotchbond MP Bond⁷	11,67±0,33	12	
Scotchbond MP Primer⁸	97,67±0,33	98	
Xeno V⁹	66,00±0,58	66	
Xp Bond¹⁰	87,33±0,33	87	

⁺ *Kruskal Wallis Testi*

**** $p \leq 0.01$**

Hücre kültür insert testinde 24 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin apoptoz (%) düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.16’da görülmektedir.

24 saat sonunda apoptotik hücrelerin oranları incelendiğinde en fazla apoptoz Scotchbond MP primerde izlenmiş en az apoptoz oranı ise Scotchbond MP bond grubunda gözlenmiştir. Tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol grupları için elde edilen apoptotik hücre oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında, primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında ve pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubundan anlamlı olarak daha fazla apoptotik hücre tespit edilmiştir. ($p < 0.05$)

HEMA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Scotchbond MP primer kısmı ve Protect Bond primer kısmı dışında diğer tüm test materyalleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az apoptotik hücre oranı göstermiştir. Diğer yandan Scotchbond MP primer ve Protect Bond primer kısmı daha fazla apoptotik hücre

sergilerken, Scotchbond MP primer kısmı ile HEMA arasındaki bu farklılık anlamlılık sergilemiştir. ($p<0.05$).

24 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait apoptotik hücre oranlarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bu bağlayıcı sistemlerin bonding kısımlarından anlamlı olarak daha fazla sayıda apoptoza uğramış hücre tespit edilmiştir (Tablo 4.17). Diğer yandan Xeno V grubu primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıların primer kısımlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücrelerde daha az oranda apoptoza neden olmuştur.

Tablo 4.16: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları

Insert (24 Saat)	Apoptoz (%)	Açıklama
	^{++}p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁵	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁶	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	8>1,2,3,4,5,6,7,9,10
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,046*	2,5>1,3,4,6,7,9,10
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,050*	4,10>1,3,6,7,9
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,046*	9>1,3,6,7
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,050*	6>1,3,7
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,046*	3>1,7
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁵	0,653	7>1
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁶	0,050*	
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,046*	
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,050*	

Kontrol (HEMA) ² / Xp Bond ¹⁰	0,046*
AdheSE Bond ³ / AdheSE Primer ⁴	0,046*
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Primer ⁵	0,046*
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Bond ⁶	0,050*
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,046*
AdheSE Bond ³ / Xeno V ⁹	0,050*
AdheSE Bond ³ / Xp Bond ¹⁰	0,046*
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Primer ⁵	0,043*
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Bond ⁶	0,046*
AdheSE Primer ⁴ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,043*
AdheSE Primer ⁴ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*
AdheSE Primer ⁴ / Xeno V ⁹	0,046*
AdheSE Primer ⁴ / Xp Bond ¹⁰	0,197
Protect Bond Primer ⁵ / Protect Bond Bond ⁶	0,046*
Protect Bond Primer ⁵ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,043*
Protect Bond Primer ⁵ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*
Protect Bond Primer ⁵ / Xeno V ⁹	0,046*
Protect Bond Primer ⁵ / Xp Bond ¹⁰	0,043*
Protect Bond Bond ⁶ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*
Protect Bond Bond ⁶ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,046*
Protect Bond Bond ⁶ / Xeno V ⁹	0,050*
Protect Bond Bond ⁶ / Xp Bond ¹⁰	0,046*
Scotchbond MP Bond ⁷ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*
Scotchbond MP Bond ⁷ / Xeno V ⁹	0,046*
Scotchbond MP Bond ⁷ / Xp Bond ¹⁰	0,043*
Scotchbond MP Primer ⁸ / Xeno V ⁹	0,046*
Scotchbond MP Primer ⁸ / Xp Bond ¹⁰	0,043*
Xeno V ⁹ / Xp Bond ¹⁰	0,046*

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Tablo 4.17: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil).

	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		S	S	S	NS	S	S	S	S
Adhese Bond	S	S		S	S	S	S	S	S	S
Adhese Primer	S	S	S		S	S	S	S	S	NS
Protect Bond Bond	S	S	S	S		S	S	S	S	S
Protect Bond Primer	S	NS	S	S	S		S	S	S	S
Scotchbond MP Bond	S	S	S	S	S	S		S	S	S
Scotchbond MP Primer	S	S	S	S	S	S	S		S	S
Xeno V	S	S	S	S	S	S	S	S		S
XP Bond	S	S	S	NS	S	S	S	S	S	
++ Mann Whitney U Test * $p \leq 0.05$										

4.2.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İncert Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond , Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait Anneksin-V-FITC/PI boyaması ile akım sitometre kullanarak yapılan değerlendirme sonucu 72 saat sonunda elde edilen apoptotik hücre oranları Tablo 4.18'de gösterilmiştir

Tablo 4.18:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz (%) oranlarının değerlendirilmesi

Insert (72 Saat)	Apoptoz (%)		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	20,00±0,00	20	0,003**
Kontrol (HEMA)²	88,33±0,88	88	
AdheSE Bond³	84,33±0,33	84	
AdheSE Primer⁴	96,00±0,58	96	
Protect Bond Bond⁵	95,67±1,45	96	
Protect Bond Primer⁶	93,67±0,33	94	
Scotchbond MP Bond⁷	30,67±0,33	31	
Scotchbond MP Primer⁸	94,33±0,88	94	
Xeno V⁹	96,00±0,00	96	
Xp Bond¹⁰	95,33±0,88	95	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Hücre kültür insert testinde 72 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin apoptoz (%) düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.19’da görülmektedir.

72 saat sonunda apoptotik hücre oranları incelendiğinde en az apoptoz Scotchbond MP bond kısmında izlenmiş en fazla ise Xeno V, Protect Bond bond ve AdheSE primer gruplarında izlenmiştir. Tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol grupları için elde edilen apoptotik hücre oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında, primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında ve pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubundan anlamlı olarak daha fazla apoptotik hücre tespit edilmiştir. ($p < 0.05$)

Diğer taraftan HEMA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AdheSE bond kısmı ve Scotchbond MP bond kısmı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az apoptotik hücre oranı göstermiştir. Bu test materyalleri dışında, primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan diğer tüm dentin bağlayıcılarında ve primer ve

bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında anlamlı olarak daha fazla apoptotik hücre oranı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

72 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait apoptotik hücre oranlarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında Scotchbond bond kısmı diğer tüm test materyallerinden anlamlı olarak daha düşük apoptotik hücre oranı sergilemiştir (Tablo 4.20). Benzer şekilde AdheSe'nin bond kısmı da Scotchbond MP bond kısmı dışında diğer tüm test materyallerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az apoptotik hücre oranı göstermiştir. Diğer yandan Xeno V'in Protect Bond primerden istatistiksel düzeyde anlamlı olarak hücrelerde daha fazla apoptoza neden olmuştur.

Tablo 4.19:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları

Insert (72 Saat)	Apoptoz (%)	Açıklama
	^{++}p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,037*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,037*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁵	0,037*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,037*	4,9>1,2,3,6,7
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,025*	5,10,6,8>1,2,3,7
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,037*	2>1,3,7
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,046*	3>1,7
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,050*	7>1
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁵	0,050*	
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁶	0,046*	
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,050*	
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,037*	

Kontrol (HEMA)²/ Xp Bond¹⁰	0,050*
AdheSE Bond³ / AdheSE Primer⁴	0,046*
AdheSE Bond³ / Protect Bond Bond⁵	0,046*
AdheSE Bond³ / Protect Bond Primer⁶	0,043*
AdheSE Bond³ / Scotchbond MP Bond⁷	0,043*
AdheSE Bond³ / Scotchbond MP Primer⁸	0,046*
AdheSE Bond³ / Xeno V⁹	0,034*
AdheSE Bond³ / Xp Bond¹⁰	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Protect Bond Bond⁵	1,000
AdheSE Primer⁴ / Protect Bond Primer⁶	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Primer⁸	0,184
AdheSE Primer⁴ / Xeno V⁹	1,000
AdheSE Primer⁴ / Xp Bond¹⁰	0,500
Protect Bond Bond⁵/ Protect Bond Primer⁶	0,369
Protect Bond Bond⁵/ Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
Protect Bond Bond⁵/ Scotchbond MP Primer⁸	0,500
Protect Bond Bond⁵/ Xeno V⁹	1,000
Protect Bond Bond⁵/ Xp Bond¹⁰	0,827
Protect Bond Primer⁶/ Scotchbond MP Bond⁷	0,043*
Protect Bond Primer⁶/ Scotchbond MP Primer⁸	0,637
Protect Bond Primer⁶/ Xeno V⁹	0,034*
Protect Bond Primer⁶/ Xp Bond¹⁰	0,105
Scotchbond MP Bond⁷/ Scotchbond MP Primer⁸	0,046*
Scotchbond MP Bond⁷/ Xeno V⁹	0,034*
Scotchbond MP Bond⁷/ Xp Bond¹⁰	0,046*
Scotchbond MP Primer⁸/ Xeno V⁹	0,121
Scotchbond MP Primer⁸/ Xp Bond¹⁰	0,376
Xeno V⁹ /Xp Bond¹⁰	0,487

⁺⁺ Mann Whitney U Test * $p \leq 0.05$

Tablo 4.20:Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		S	S	S	S	S	S	S	S
Adhese Bond	S	S		S	S	S	S	S	S	S
Adhese Primer	S	S	S		NS	S	S	NS	NS	NS
Protect Bond Bond	S	S	S	NS		NS	S	NS	NS	NS
Protect Bond Primer	S	S	S	S	NS		S	NS	S	NS
Scotchbond MP Bond	S	S	S	S	S	S		S	S	S
Scotchbond MP Primer	S	S	S	NS	NS	NS	S		NS	NS
Xeno V	S	S	S	NS	NS	S	S	NS		NS
XP Bond	S	S	S	NS	NS	NS	S	NS	NS	
++ Mann Whitney U Test * $p \leq 0.05$										

4.2.1.3. Hücre Kültürü İntert Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Apoptoz Oranlarının Değerlendirilmesi

Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin Apoptoz (%) değerlendirilmesi tablo 4.21’de, apoptoz oranları da şekil 4.3’de gösterilmektedir.

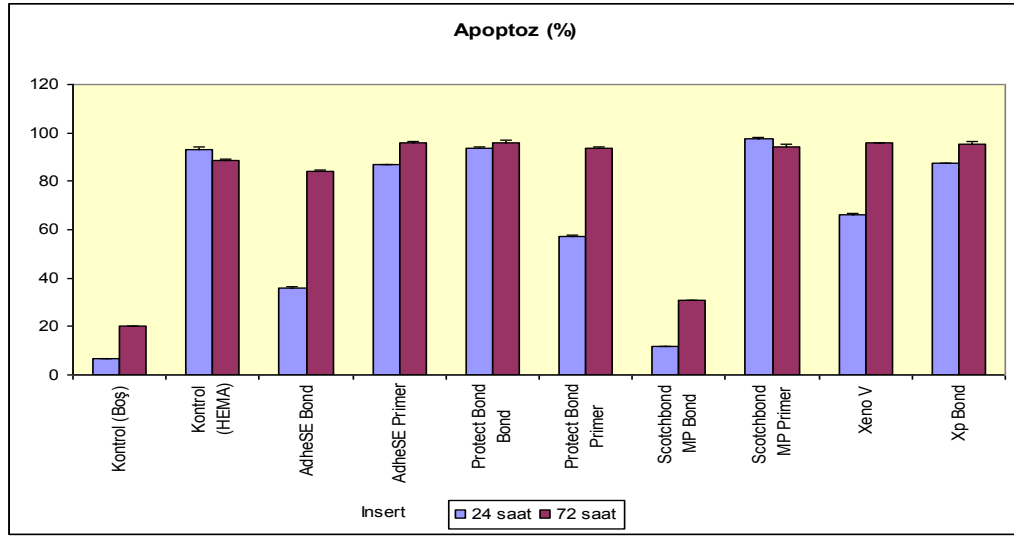
Tablo 4.21: Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin apoptoz oranlarının değerlendirilmesi

Insert	Apoptoz (%)		++ <i>p</i>
	24 saat Ort±SE (Medyan)	72 saat Ort±SE (Medyan)	
Kontrol (Boş) ¹	7,00±0,58 (7)	20,00±0,00 (20)	0,037*
Kontrol (HEMA) ²	93,00±1,15 (93)	88,33±0,88 (88)	0,050*
AdheSE Bond ³	36,00±0,58 (36)	84,33±0,33 (84)	0,046*
AdheSE Primer ⁴	86,67±0,33 (87)	96,00±0,58 (96)	0,046*
Protect Bond Primer ⁵	93,67±0,33 (94)	95,67±1,45 (96)	0,369
Protect Bond Bond ⁶	57,00±0,58 (57)	93,67±0,33 (94)	0,046*
Scotchbond MP Bond ⁷	11,67±0,33 (12)	30,67±0,33 (31)	0,043*
Scotchbond MP Primer ⁸	97,67±0,33 (98)	94,33±0,88 (94)	0,046*
Xeno V ⁹	66,00±0,58 (66)	96,00±0,00 (96)	0,037*
Xp Bond ¹⁰	87,33±0,33 (87)	95,33±0,88 (95)	0,046*

++ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait 24 ve 72 saat sonundaki apoptotik hücre oranları istatistiksel olarak kıyaslandığında Protect Bond primer kısmı dışında uygulanan tüm test materyallerinin hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin süre artışı ile bağlantılı olarak arttığı saptanmıştır.



Şekil 4.3:Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin neden olduğu apoptoz oranları

4.2.2. Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı Bulguları

4.2.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonmer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait Anneksin-V-FITC/PI boyaması ile akım sitometre kullanarak yapılan değerlendirme sonucu 24 saat sonunda elde edilen apoptotik hücre oranları tablo 4.22’de gösterilmiştir.

Tablo 4.22: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz düzeylerinin değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (24 Saat)	Apoptoz (%)		⁺ p
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	7,67±0,33	8	0,005**
Kontrol (Vitrebond)²	16,67±0,33	17	
AdheSE³	45,00±0,58	45	
Protect Bond⁴	67,33±0,88	67	
Scotchbond MP⁵	68,67±0,33	69	
Xeno V⁶	63,33±0,88	63	
Xp Bond⁷	68,67±0,88	69	

⁺ Kruskal Wallis Testi

**** p≤0.01**

Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin apoptoz düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.23’de görülmektedir.

Dentin bariyer test düzeneğinde 24 saat sonunda apoptotik hücrelerin oranları incelendiğinde en az apoptoz oranı AdheSE grubunda en fazla apoptoz oranı ise Scotchbond MP ve XP Bond dentin bağlayıcı gruplarında tespit edilmiştir. 24 saat sonunda tüm gruplar için elde edilen apoptoz oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm dentin bağlayıcı sistemler test materyali uygulanmadan dentin bariyer test düzeneğinin kullanıldığı negatif kontrol örneklerinden daha fazla apoptoza neden olmuşlardır ($p<0.05$).

Vitrebond uygulanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında uygulanan tüm dentin bağlayıcı sistemler istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha fazla apoptoza neden olmuştur. ($p<0.05$)

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 24 saat sonundaki apoptoza uğramış hücre oranları birbirleri ile kıyaslandığında AdeheSE ve Xeno V dentin bağlayıcıların diğer tüm dentin bağlayıcılardan anlamlı olarak daha az apoptoza neden olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (tablo 4.24). Diğer dentin bağlayıcılar arasında apoptotik hücre oranları açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 4.23: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları

Dentin Bariyer (24 Saat)	Apoptoz (%)	Açıklama
	⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (Vitrebond) ²	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP ⁵	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁶	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² /AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² /Scotchbond MP ⁵	0,043*	1<2,3,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xeno V ⁶	0,046*	2<3,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷	0,046*	3<4,5,6,7
AdheSE ³ / Protect Bond ⁴	0,050*	6<4,5,7
AdheSE ³ /Scotchbond MP ⁵	0,046*	
AdheSE ³ /Xeno V ⁶	0,050*	
AdheSE ³ /Xp Bond ⁷	0,050*	
Protect Bond ⁴ /Scotchbond MP ⁵	0,246	
Protect Bond ⁴ /Xeno V ⁶	0,050*	
Protect Bond ⁴ /Xp Bond ⁷	0,261	
Scotchbond MP ⁵ /Xeno V ⁶	0,046*	
Scotchbond MP ⁵ /Xp Bond ⁷	0,817	
Xeno V ⁶ /Xp Bond ⁷	0,050*	

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Tablo 4.24: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel anlamlılıklarının Mann Whitney U Test yöntemi ile karşılaştırmaları $p<0.05$ (*S: Anlamlı $p<0.05$, NS: Anlamlı değil)

	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XPBond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	S	S	S	S
Adhese	S	S		S	S	S	S
Protect Bond	S	S	S		NS	S	NS
Scotchbond MP	S	S	S	NS		S	NS
Xeno V	S	S	S	S	S		S
XPBond	S	S	S	NS	NS	S	

4.2.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde Apoptoz Oranı (%) Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonomer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait Anneksin-V-FITC/PI boyaması ile akım sitometre kullanarak yapılan değerlendirme sonucu 72 saat sonunda elde edilen apoptotik hücre oranları tablo 4.25’de gösterilmiştir.

Tablo 4.25: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz düzeylerinin değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (72 Saat)	Apoptoz (%)		⁺ p
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş) ¹	20,00±0,58	20	0,005**
Kontrol (Vitrebond) ²	27,67±0,33	28	
AdheSE ³	75,33±0,88	75	
Protect Bond ⁴	64,67±0,33	65	
Scotchbond ⁵	78,33±0,88	78	
Xeno V ⁶	75,33±0,88	75	
Xp Bond ⁷	76,67±0,33	77	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p\leq 0.01$

Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saat sonunda kontrol grupları ve test materyallerinin apoptoz oranları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.26'da görülmektedir.

Dentin bariyer test düzeneğinde 72 saat sonunda elde edilen apoptotik hücre oranları incelendiğinde en fazla apoptotik hücre oranı Scotchbond uygulanan grupta en az ise Protect Bond grubunda tespit edilmiştir. 72 saat sonunda tüm gruplar için elde edilen apoptoz oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm dentin bağlayıcı sistemler test materyali uygulanmadan dentin bariyer test düzeneğinin kullanıldığı negatif kontrol örneklerinden daha fazla apoptoza neden olmuşlardır ($p<0.05$).

Vitrebond uygulanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında uygulanan tüm dentin bağlayıcı sistemler istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha fazla apoptoza neden olmuştur ($p<0.05$).

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 72 saat sonundaki apoptoza uğramış hücre oranları birbirleri ile kıyaslandığında Protect Bond'un diğer tüm dentin bağlayıcılardan anlamlı olarak daha az apoptoza neden olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 4.27). diğer dentin bağlayıcılar arasında apoptotik hücre oranları açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Tablo 4.26: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel karşılaştırmaları

Dentin Bariyer (72 Saat)		Apoptoz (%)	Açıklama
		⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol	(Boş) ¹ / Kontrol	0,046*	
(Vitrebond) ²			
Kontrol	(Boş) ¹ / AdheSE ³	0,050*	
Kontrol	(Boş) ¹ / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol	(Boş) ¹ / Scotchbond MP ⁵	0,050*	
Kontrol	(Boş) ¹ / Xeno V ⁶	0,050*	
Kontrol	(Boş) ¹ / Xp Bond ⁷	0,046*	
Kontrol	(Vitrebond) ² /AdheSE ³	0,046*	
Kontrol	(Vitrebond) ² / Protect	0,043*	
Bond ⁴			
Kontrol	(Vitrebond) ² /Scotchbond	0,046*	1<2,3,4,5,6,7
MP ⁵			2<3,4,5,6,7
Kontrol	(Vitrebond) ² /Xeno V ⁶	0,046*	4<3,5,6,7
Kontrol	(Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷	0,043*	
AdheSE ³	/ Protect Bond ⁴	0,046*	
AdheSE ³	/Scotchbond MP ⁵	0,077	
AdheSE ³	/Xeno V ⁶	1,000	
AdheSE ³	/Xp Bond ⁷	0,246	
Protect Bond ⁴	/Scotchbond MP ⁵	0,046*	
Protect Bond ⁴	/Xeno V ⁶	0,046*	
Protect Bond ⁴	/Xp Bond ⁷	0,043*	
Scotchbond MP ⁵	/Xeno V ⁶	0,077	
Scotchbond MP ⁵	/Xp Bond ⁷	0,105	
Xeno V ⁶	/Xp Bond ⁷	0,246	

$^{++}$ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Tablo 4.27: Hücre kültürü dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta materyallerin neden olduğu apoptoz oranlarının ikili olarak istatistiksel ikili anlamlılık karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil).

	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	S	S	S	S
Adhese	S	S		S	NS	NS	NS
Protect Bond	S	S	S		S	S	S
Scotchbond MP	S	S	NS	S		NS	NS
Xeno V	S	S	NS	S	NS		NS
XP Bond	S	S	NS	S	NS	NS	
++ Mann Whitney U Test* $p \leq 0.05$							

4.2.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Materyallerin Apoptoz (%) Oranlarının Değerlendirilmesi

Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin Apoptoz (%) değerlendirilmesi tablo 4.28’de gösterilmektedir. Şekil 4.4’de 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin apoptoz oranları gösterilmektedir.

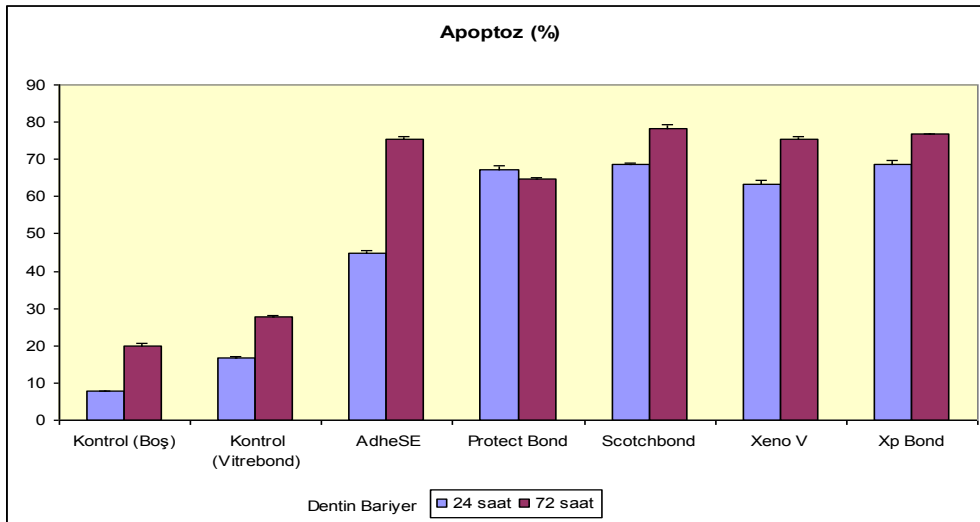
Tablo 4.28:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin neden olduğu apoptoz (%) oranlarının değerlendirilmesi

Dentin Bariyer	Apoptoz (%)		++ <i>p</i>
	24 saat	72 saat	
	Ort±SE (Medyan)	Ort±SE (Medyan)	
Kontrol (Boş)¹	7,67±0,33 (8)	20,00±0,58 (20)	0,046*
Kontrol (Vitrebond)²	16,67±0,33 (17)	27,67±0,33 (28)	0,043*
AdheSE³	45,00±0,58 (45)	75,33±0,88 (75)	0,050*
Protect Bond⁴	67,33±0,88 (67)	64,67±0,33 (65)	0,046*
Scotchbond MP⁵	68,67±0,33 (69)	78,33±0,88 (78)	0,046*
Xeno V⁶	63,33±0,88 (63)	75,33±0,88 (75)	0,050*
Xp Bond⁷	68,67±0,88 (69)	76,67±0,33 (77)	0,046*

++ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Uygulanan dentin bağlayıcılar, pozitif ve negatif kontrol grubuna ait 24 ve 72 saat sonundaki apoptotik hücre oranları kıyaslandığında Protect Bond dışında diğer tüm dentin bağlayıcılar süre artışıyla bağlantılı olarak apoptotik hücre oranında istatistiksel düzeyde anlamlı olarak artışa neden olmuşlardır. Diğer yandan Protect Bond'un apoptotik hücre oranında süre artışıyla bağlantılı olarak düşük düzeyde azalma görülmüş, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılık sergilemiştir.



Şekil 4.4:Hücre kültürü dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin apoptoz oranları

4.3. Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI) İmünohistokimyası ile Sentez Fazı Hücre Oranı Bulguları

4.3.1. Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları

4.3.1.1. 24 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond, Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait hücrelerin Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI)'nin immunohistokimyasal teknik ile incelendiği bu yöntemde 24 saat sonunda sentez fazında bulunan yani DNA sentezi izlenen hücrelerin oranı tablo 4.29'da gösterilmiştir.

Tablo 4.29:Hücre kültürü insert kültür testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi

Insert (24 Saat)	BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	18,67±0,33	19	0,001**
Kontrol (HEMA)²	5,00±1,00	6	
AdheSE Bond³	15,00±0,58	15	
AdheSE Primer⁴	0,67±0,33	1	
Protect Bond Bond⁵	8,00±0,00	8	
Protect Bond Primer⁶	1,67±0,33	2	
Scotchbond MP Bond⁷	8,00±0,58	8	
Scotchbond MP Primer⁸	2,00±0,00	2	
Xeno V⁹	6,33±0,88	6	
Xp Bond¹⁰	2,33±0,33	2	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Hücre kültürü insert testinde 24 saat sonunda kontrol grupları ile test materyallerinin BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı (%) düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.30'da görülmektedir.

24 saat sonunda en fazla DNA sentezi AdheSE bond grubunda izlenirken, en az sentez ise AdheSE primer grubunda izlenmiştir. Tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol gruplarına ait DNA sentezi sergileyen hücre oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında (Şekil 4.6, Şekil 4.7), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında (Şekil 4.8) ve pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubundan (Şekil 4.5) anlamlı olarak daha az hücrede DNA sentezi belirlenmiştir. ($p < 0.05$)

Diğer taraftan HEMA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında XP bond dışında uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında (AdheSE primer, Protect Bond primer, Scotchbond MP primer) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az oranda hücre proliferasyonu (DNA sentezi) tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Diğer yandan uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin bond kısımlarında (AdheSE bond,

Protect Bond bond, Scotchbond MP bond) anlamlı düzeyde daha yüksek oranda hücre proliferasyonu (DNA sentezi) gözlemlenmiştir ($p<0.05$).

24 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait hücre proliferasyon oranlarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bu bağlayıcı sistemlerin bonding kısımlarından anlamlı olarak daha az sayıda hücrede proliferasyon gözlenmiştir (Tablo 4.31). Diğer yandan Xeno V, uygulanan dentin bağlayıcıların primer kısımlarından anlamlı olarak daha az sayıda hücrede DNA sentezi inhibisyonuna neden olmuştur. XP bond grubunda ise Protect Bond primer ve Scotchbond primer dışında diğer tüm test materyallerinden anlamlı düzeyde daha az sayıda hücrede DNA sentezi görülmüştür.

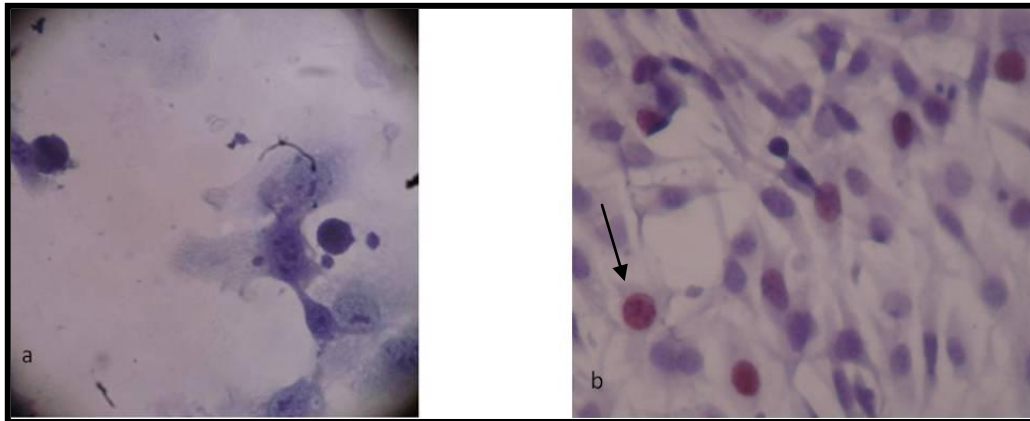
Tablo 4.30: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili karşılaştırmaları

Insert (24 Saat)	BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı (%)	Açıklama
	⁺⁺ p	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁶	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,046*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	1>2,3,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁶	0,043*	3>2,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	5,7>2,4,6,8,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,034*	2,9>4,6,8,10
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,487	8>4
Kontrol (HEMA) ² / Xp Bond ¹⁰	0,068	
AdheSE Bond ³ / AdheSE Primer ⁴	0,046*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Bond ⁵	0,037*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Primer ⁶	0,046*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,050*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,037*	
AdheSE Bond ³ / Xeno V ⁹	0,050*	
AdheSE Bond ³ / Xp Bond ¹⁰	0,046*	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Bond ⁵	0,034*	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Primer ⁶	0,099	

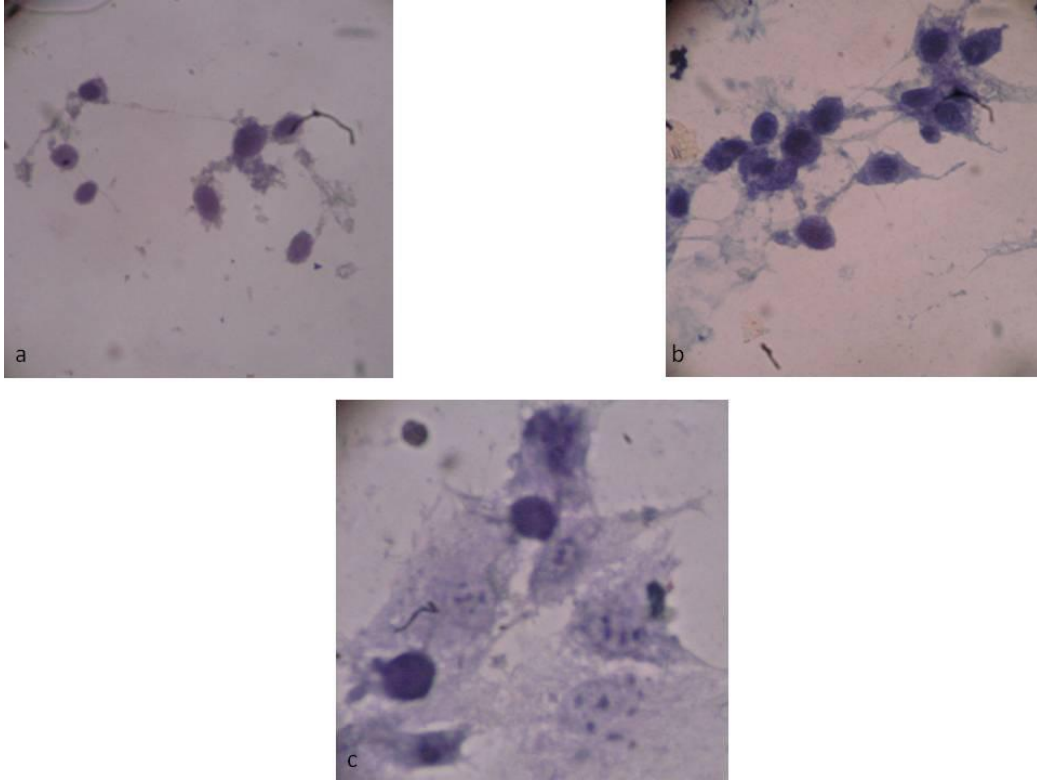
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Primer⁸	0,034*
AdheSE Primer⁴ / Xeno V⁹	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Xp Bond¹⁰	0,043*
Protect Bond Bond⁵ / Protect Bond Primer⁶	0,034*
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Bond⁷	1,000
Protect Bond Bond⁵ / Scotchbond MP Primer⁸	0,025*
Protect Bond Bond⁵ / Xeno V⁹	0,121
Protect Bond Bond⁵ / Xp Bond¹⁰	0,034*
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
Protect Bond Primer⁶ / Scotchbond MP Primer⁸	0,317
Protect Bond Primer⁶ / Xeno V⁹	0,046*
Protect Bond Primer⁶ / Xp Bond¹⁰	0,197
Scotchbond MP Bond⁷ / Scotchbond MP Primer⁸	0,037*
Scotchbond MP Bond⁷ / Xeno V⁹	0,184
Scotchbond MP Bond⁷ / Xp Bond¹⁰	0,046*
Scotchbond MP Primer⁸ / Xeno V⁹	0,037*
Scotchbond MP Primer⁸ / Xp Bond¹⁰	0,317
Xeno V⁹ / Xp Bond¹⁰	0,046*
⁺⁺ Mann Whitney U Test	* $p \leq 0.05$

Tablo 4.31: Hücre kültürü insert testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p < 0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil).

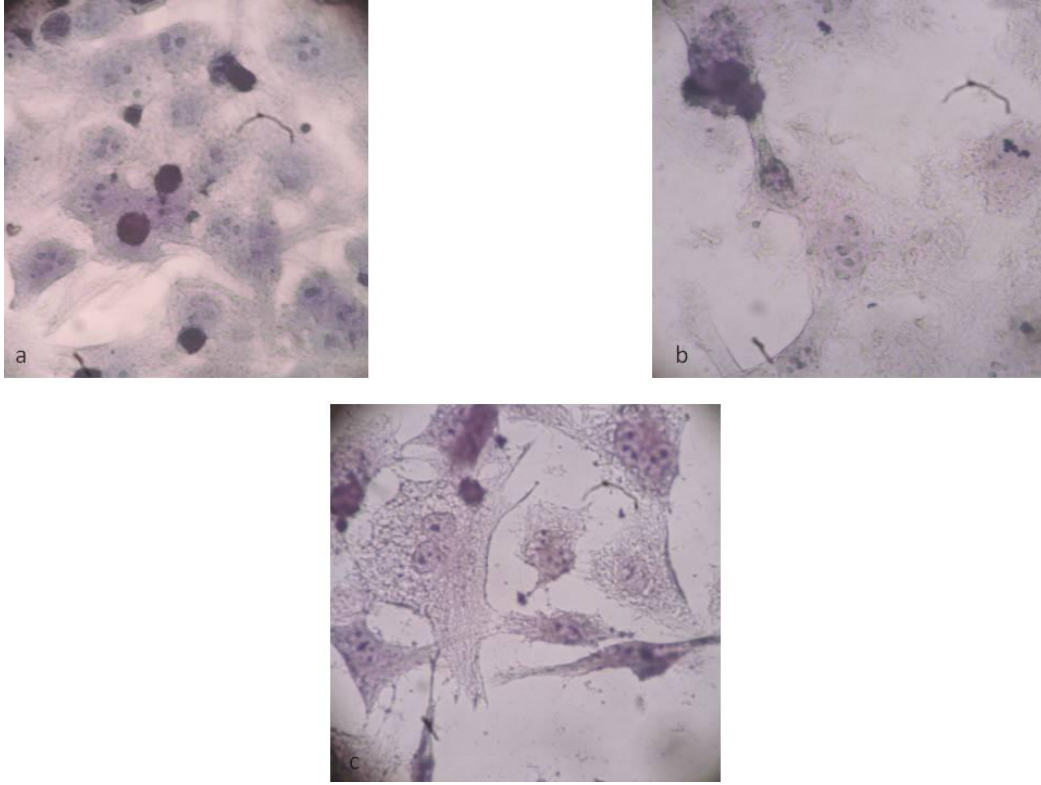
	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		S	S	S	S	S	S	NS	NS
Adhese Bond	S	S		S	S	S	S	S	S	S
Adhese Primer	S	S	S		S	NS	S	S	S	S
Protect Bond Bond	S	S	S	S		S	NS	S	NS	S
Protect Bond Primer	S	S	S	NS	S		S	NS	S	NS
Scotchbond MP Bond	S	S	S	S	NS	S		S	NS	S
Scotchbond MP Primer	S	S	S	S	S	NS	S		S	NS
Xeno V	S	NS	S	S	NS	S	NS	S		S
XP Bond	S	NS	S	S	S	NS	S	NS	S	



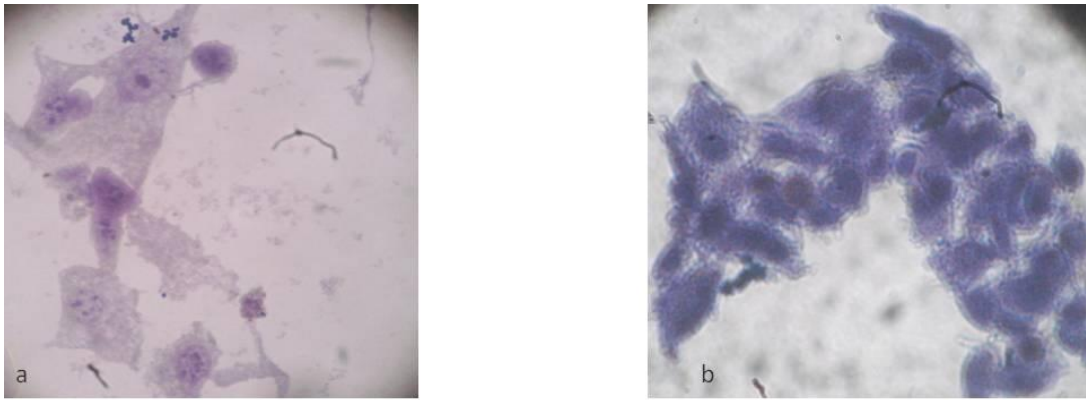
Şekil 4.5: Hücre kültür insert testinde 24. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) HEMA (orjinal büyütme x40) b) pozitif kontrol grubu (orjinal büyütme x40) Nukleusu kırmızı ile işaretli görünen hücreler BRDU-LI pozitif kabul edilmiştir ve ok (→) ile gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları bond kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE bond (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP bond (orjinal büyütme x40).



Şekil 4.7: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları primer kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)AdheSE primer (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond primer (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP primer (orjinal büyütme x40)



Şekil 4.8: Hücre kültür insert testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)Xeno V (orjinal büyütme x40) b)XP Bond (orjinal büyütme x40)

4.3.1.2. 72 Saat Sonunda Hücre Kültür İnsert Testinde BrDU-LI Bulguları

Hücreler ekildikten sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına (AdheSE, Protect Bond, Scotchbond MP), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına (XP Bond, Xeno V), hücre kültür insertin boş olarak hücreler üzerine uygulandığı negatif kontrol grubuna ve hücre kültür insert içine HEMA'nın konularak uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait hücrelerin Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI)'nin immunohistokimyasal teknik ile incelendiği bu yöntemde 72 saat sonunda Sentez fazında bulunan yani DNA sentezi izlenen hücrelerin oranı tablo 4.32'de gösterilmiştir.

Tablo 4.32:Hücre kültürü insert kültür testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi

Insert (72 Saat)	BrDU (%)		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	49,67±0,33	50	0,001**
Kontrol (HEMA)²	17,00±0,00	17	
AdheSE Bond³	13,67±0,33	14	
AdheSE Primer⁴	5,67±0,33	6	
Protect Bond Bond⁵	6,00±0,58	6	
Protect Bond Primer⁶	0,33±0,33	0	
Scotchbond MP Bond⁷	23,33±0,88	23	
Scotchbond MP Primer⁸	3,67±0,33	4	
Xeno V⁹	14,33±0,88	14	
Xp Bond¹⁰	5,67±0,33	6	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Hücre Kültürü insert testinde 72 saat sonunda kontrol grupları ile test materyallerinin BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı (%) düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.33'de görülmektedir.

72 saat sonunda en fazla DNA sentezi Scotchbond MP bond grubunda izlenirken, Protect Bond primer grubunda ise en az oranda DNA sentezi görülmüştür. Tüm test materyalleri, pozitif ve negatif kontrol gruplarına ait DNA sentezi sergileyen hücre oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı

olarak uygulanan dentin bağlayıcılarında (Şekil 4.10, Şekil 4.11), primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarında (Şekil 4.12) ve pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubundan (Şekil 4.9) anlamlı olarak daha az hücrede DNA sentezi belirlenmiştir. ($p<0.05$)

Diğer taraftan HEMA uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu istatistiksel düzeyde anlamlı olarak Scotchbond MP bond grubunda daha fazla gözlenirken diğer tüm dentin bağlayıcı gruplarında anlamlı düzeyde daha az sayıda hücrede proliferasyonu saptanmıştır ($p<0.05$).

72 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait DNA sentezi görülen hücre oranlarının birbirleri ile istatistiksel olarak ikili kıyaslamaları yapıldığında dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarında bu bağlayıcı sistemlerin bonding kısımlarından anlamlı olarak daha az sayıda hücrede DNA sentezi gözlenmiştir. Xeno V grubu, Scotchbond MP bond kısmından anlamlı olarak daha fazla sayıda hücrede DNA sentezini inhibe etmiştir. Diğer yandan Xeno V grubunda AdheSE bond kısmı dışında diğer tüm test materyallerinden ise anlamlı olarak daha fazla sayıda hücrede DNA sentezi belirlenmiştir. Ayrıca XP Bond, Scotchbond primer kısmından ve Protect Bond primer kısmından anlamlı olarak daha fazla sayıda hücrede proliferasyon göstermiştir. Diğer taraftan AdheSE primer ve Protect Bond bond kısmı dışında diğer tüm test materyallerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az sayıda hücrede DNA sentezi sergilemiştir.

Tablo 4.33:Hücre kültürü insert testinde BrDU pozitif hücre oranlarının (%) 72. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları

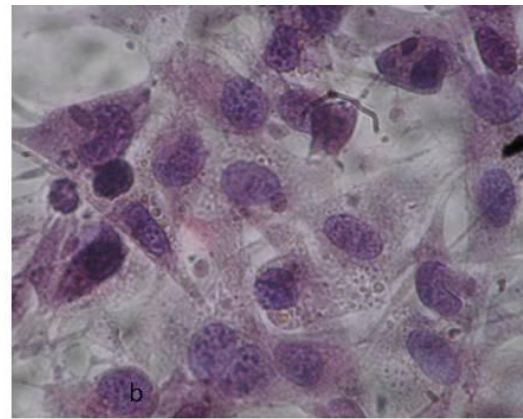
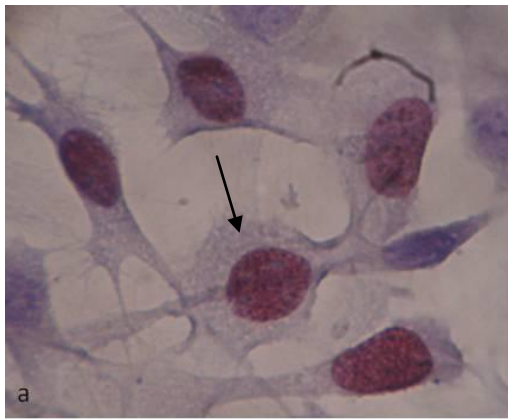
Insert (72 Saat)	BrDU (%)	Açıklama
	⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (HEMA) ²	0,034*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Bond ³	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Bond ⁵	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond Primer ⁶	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁹	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Bond ³	0,034*	
Kontrol (HEMA) ² / AdheSE Primer ⁴	0,034*	1>2,3,4,5,6,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Bond ⁵	0,037*	6<1,2,3,4,5,7,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Protect Bond Primer ⁶	0,034*	7>2,3,4,5,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Bond ⁷	0,037*	2>3,4,5,8,9,10
Kontrol (HEMA) ² / Scotchbond MP Primer ⁸	0,034*	3,9>4,5,8,10
Kontrol (HEMA) ² / Xeno V ⁹	0,037*	8<4,5,10
Kontrol (HEMA) ² / Xp Bond ¹⁰	0,034*	
AdheSE Bond ³ / AdheSE Primer ⁴	0,043*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Bond ⁵	0,046*	
AdheSE Bond ³ / Protect Bond Primer ⁶	0,043*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Bond ⁷	0,046*	
AdheSE Bond ³ / Scotchbond MP Primer ⁸	0,043*	
AdheSE Bond ³ / Xeno V ⁹	0,637	
AdheSE Bond ³ / Xp Bond ¹⁰	0,043*	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Bond ⁵	0,637	
AdheSE Primer ⁴ / Protect Bond Primer ⁶	0,043*	

AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Scotchbond MP Primer⁸	0,043*
AdheSE Primer⁴ / Xeno V⁹	0,046*
AdheSE Primer⁴ / Xp Bond¹⁰	1,000
Protect Bond Bond⁵/ Protect Bond Primer⁶	0,046*
Protect Bond Bond⁵/ Scotchbond MP Bond⁷	0,050*
Protect Bond Bond⁵/ Scotchbond MP Primer⁸	0,046*
Protect Bond Bond⁵/ Xeno V⁹	0,050*
Protect Bond Bond⁵/ Xp Bond¹⁰	0,637
Protect Bond Primer⁶/ Scotchbond MP Bond⁷	0,046*
Protect Bond Primer⁶/ Scotchbond MP Primer⁸	0,043*
Protect Bond Primer⁶/ Xeno V⁹	0,046*
Protect Bond Primer⁶/ Xp Bond¹⁰	0,043*
Scotchbond MP Bond⁷/ Scotchbond MP Primer⁸	0,046*
Scotchbond MP Bond⁷/ Xeno V⁹	0,050*
Scotchbond MP Bond⁷/ Xp Bond¹⁰	0,046*
Scotchbond MP Primer⁸/ Xeno V⁹	0,046*
Scotchbond MP Primer⁸/ Xp Bond¹⁰	0,043*
Xeno V⁹/Xp Bond¹⁰	0,046*

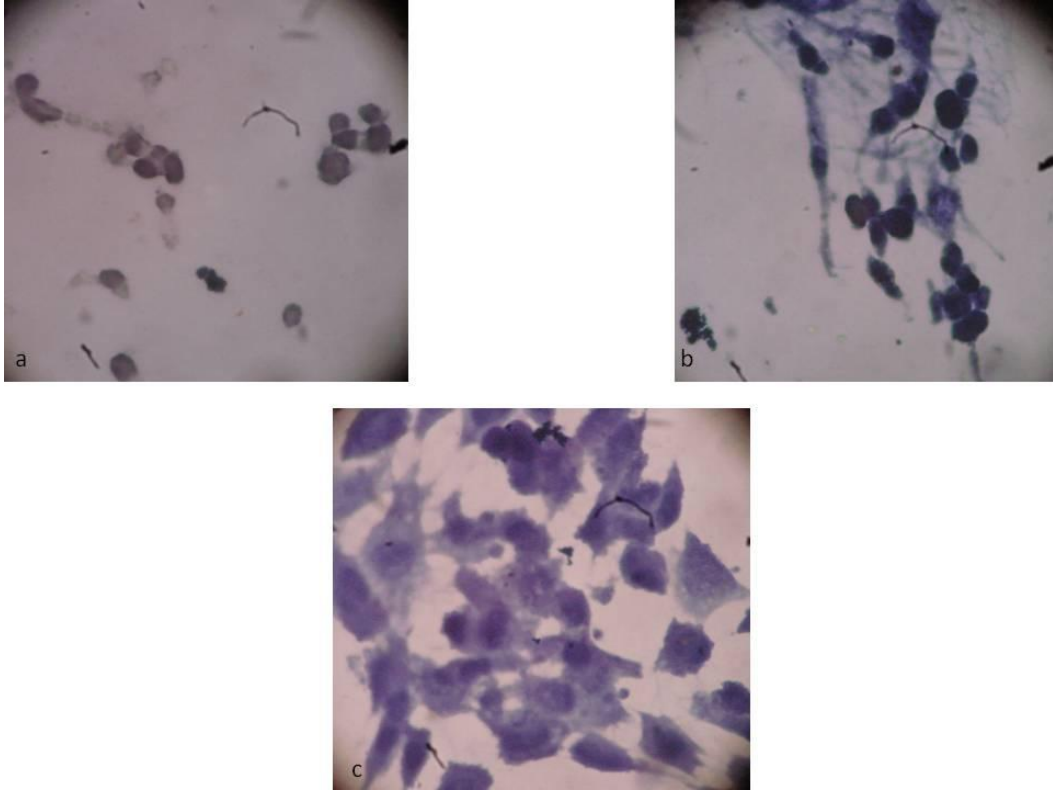
⁺⁺ Mann Whitney U Test * $p \leq 0.05$

Tablo 4.34: Hücre kültürü insert testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p < 0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil).

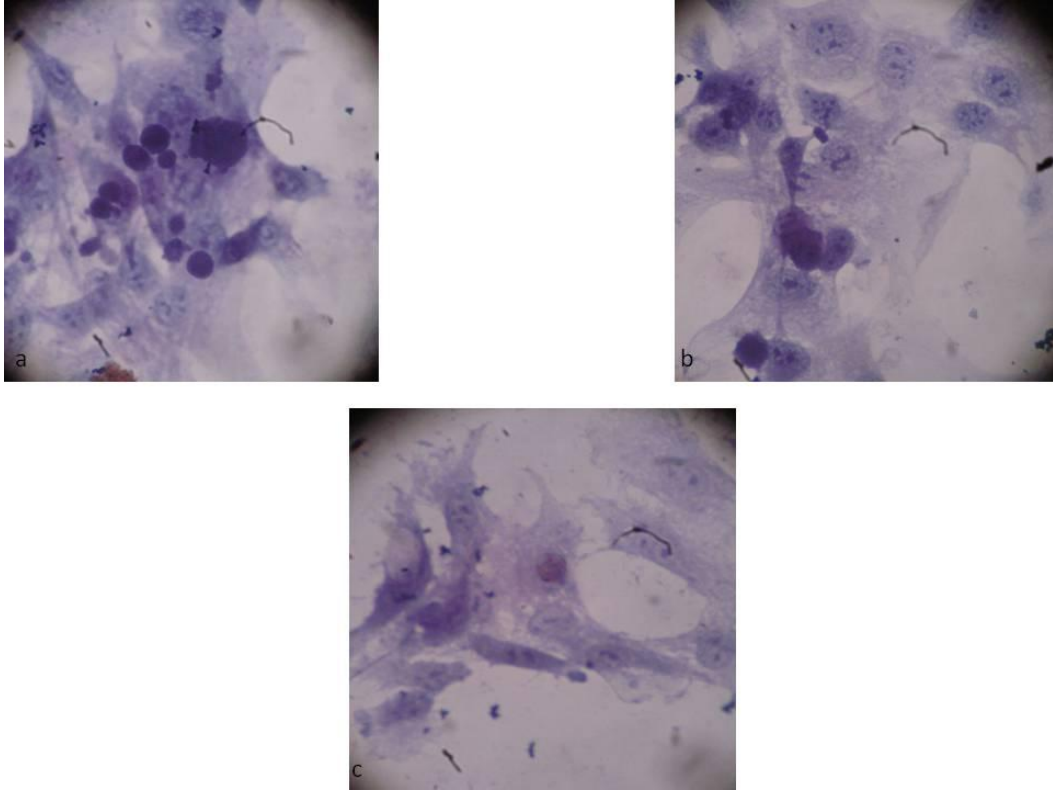
	Kontrol Boş	Kontrol Hema	Adhese Bond	Adhese Primer	Protect Bond Bond	Protect Bond Primer	Scotchbond MP Bond	Scotchbond MP Primer	Xeno V	XP Bond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontrol Hema	S		S	S	S	S	S	S	S	S
Adhese Bond	S	S		S	S	S	S	S	NS	S
Adhese Primer	S	S	S		NS	S	S	S	S	NS
Protect Bond Bond	S	S	S	NS		S	S	S	S	NS
Protect Bond Primer	S	S	S	S	S		S	S	S	S
Scotchbond MP Bond	S	S	S	S	S	S		S	S	S
Scotchbond MP Primer	S	S	S	S	S	S	S		S	S
Xeno V	S	S	NS	S	S	S	S	S		S
XP Bond	S	S	S	NS	NS	S	S	S	S	



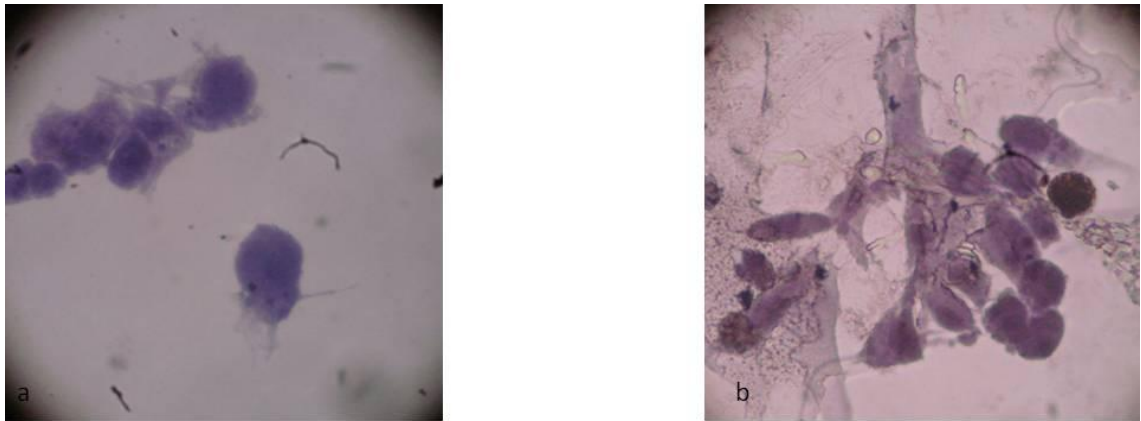
Şekil 4.9: Hücre kültürü insert testinde 72. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol grubu (orjinal büyütme x40) b) HEMA (orjinal büyütme x40) Nukleusu kırmızı ile işaretli görünen hücreler BRDU-LI pozitif kabul edilmiştir ve ok (→) ile gösterilmiştir



Şekil 4.10: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları bond kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE bond (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP bond (orjinal büyütme x40).



Şekil 4.11: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıları primer kısımları BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)AdheSE primer (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond primer (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP primer (orjinal büyütme x40)



Şekil 4.12: Hücre kültür insert testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri a)Xeno V (orjinal büyütme x40) b)XP Bond (orjinal büyütme x40)

4.3.1.3. Hücre Kültürü İncert Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Hücrelerin BrDU ile İşaretlenme Oranlarının (%) Değerlendirilmesi

Hücre kültürü incert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU ile işaretlenme oranları şekil 4.13’de ve 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU ile işaretlenme oranlarının (%) değerlendirilmesi tablo 4.35’de gösterilmiştir.

Tablo 4.35: Hücre kültürü incert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının (%) değerlendirilmesi

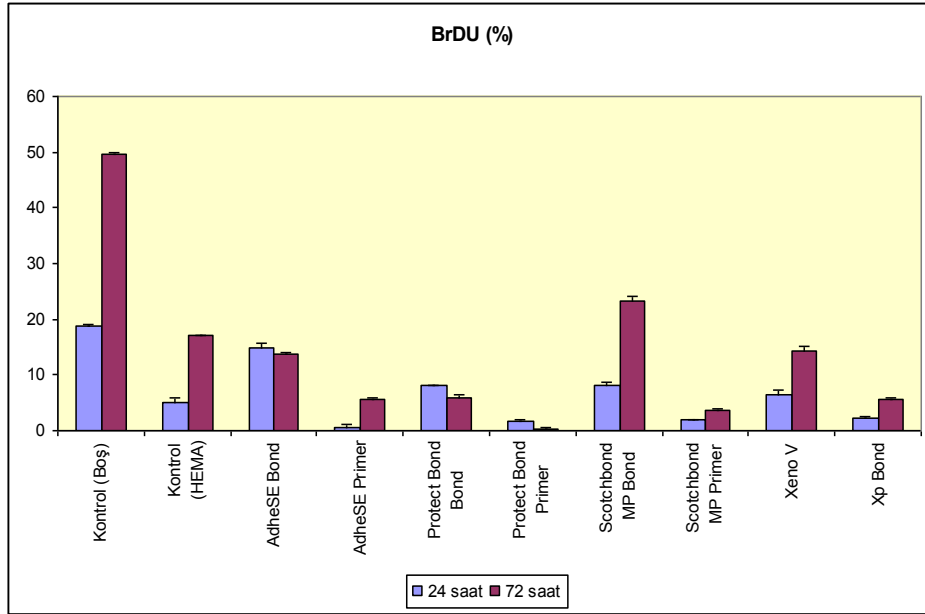
Insert	BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı		⁺⁺ <i>p</i>
	(%)		
	24 saat	72 saat	
	Ort±SE (Medyan)	Ort±SE (Medyan)	
Kontrol (Boş) ¹	18,67±0,33 (19)	49,67±0,33 (50)	0,043*
Kontrol (HEMA) ²	5,00±1,00 (6)	17,00±0,00 (17)	0,034*
AdheSE Bond ³	15,00±0,58 (15)	13,67±0,33 (14)	0,105
AdheSE Primer ⁴	0,67±0,33 (1)	5,67±0,33 (6)	0,043*
Protect Bond Bond ⁵	8,00±0,00 (8)	6,00±0,58 (6)	0,037*
Protect Bond Primer ⁶	1,67±0,33 (2)	0,33±0,33 (0)	0,068
Scotchbond MP Bond ⁷	8,00±0,58 (8)	23,33±0,88 (23)	0,050*
Scotchbond MP Primer ⁸	2,00±0,00 (2)	3,67±0,33 (4)	0,034*
Xeno V ⁹	6,33±0,88 (6)	14,33±0,88 (14)	0,050*
Xp Bond ¹⁰	2,33±0,33 (2)	5,67±0,33 (6)	0,043*

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarına ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarına ait 24 ve 72 saat sonundaki DNA sentezi görülen hücre oranları istatistiksel olarak kıyaslandığında Protect Bond bond kısmında süre artışıyla bağlantılı olarak DNA sentezi görülen hücrelerin sayısında istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Diğer yandan AdheSE primer, Scotchbond MP bond, Scotchbond MP primer ve Xeno V gruplarında

DNA sentezi görülen hücre oranları süre artışıyla bağlantılı olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir.



Şekil 4.13:Hücre kültürü insert testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranları

4.3.2. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları

4.3.2.1. 24 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonomer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait hücrelerin Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI)'nin immunohistokimyasal teknik ile incelendiği bu yöntemde 24 saat sonunda Sentez fazında bulunan yani DNA sentezi izlenen hücrelerin oranı Tablo 4.36'da gösterilmiştir

Tablo 4.36:Dentin bariyer kültür testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (24 Saat)	BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı(%)		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	23,00±1,15	23	0,004**
Kontrol (Vitrebond)²	10,67±0,33	11	
AdheSE³	17,67±0,33	18	
Protect Bond⁴	8,67±0,88	9	
Scotchbond MP⁵	9,33±0,33	9	
Xeno V⁶	14,33±0,33	14	
Xp Bond⁷	11,00±0,00	11	

⁺ *Kruskal Wallis Testi*

****** *p*≤0.01

Dentin bariyer grubunda 24 saat sonunda kontrol grupları ile test materyalleri BrDU ile işaretlenmiş hücre oranları (%) arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.37’de görülmektedir.

24 Saat sonunda dentin bariyer testinde BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezinin görüldüğü hücre oranı (%) AdheSE dentin bağlayıcı grubunda en fazla saptanmış, Protect Bond ve Scotchbond MP dentin bağlayıcı gruplarında (Şekil 4.15) ise en az oranda bulunmuştur. 24 saat sonunda tüm gruplar için BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezinin görüldüğü hücre oranı değerlendirildiğinde tüm dentin bağlayıcı sistemler, test materyali uygulanmadan dentin bariyer test düzeneğinin kullanıldığı negatif kontrol örneklerinden (Şekil 4.14) istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha az sayıda hücrede DNA sentezi sergilemişlerdir ($p<0.05$).

24 saat sonunda Vitrebond uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranı AdheSE ve Xeno V gruplarında anlamlı olarak daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Diğer yandan uygulanan diğer test materyalleri ile Vitrebond arasında DNA sentezi açısından istatistiksel bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 4.38).

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 24 saat sonundaki BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranları birbirleri ile kıyaslandığında

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde AdheSE grubunda en fazla oranda tespit edilmiş, bunu sırasıyla Xeno V ve Xp Bond izlemiştir (Şekil 4.16). Bu dentin bağlayıcılar dışında diğer test materyalleri arasında DNA sentezi izlenen hücre oranları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Tablo 4.37:Dentin bariyer testinde BrDU pozitif işaretlenmiş hücre oranlarının (%) 24. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları

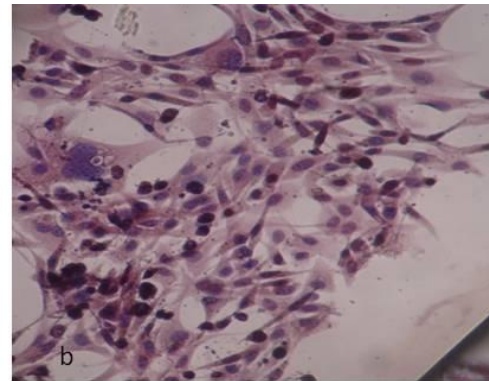
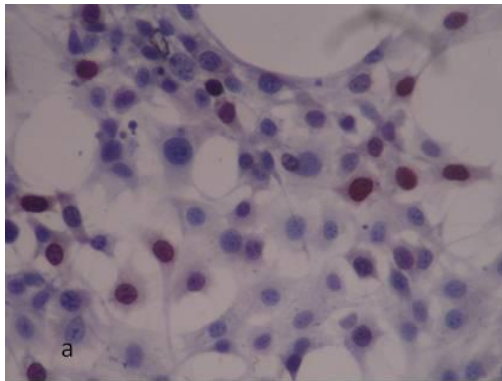
Dentin Bariyer (24 Saat)	BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı (%)	Açıklama
	⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (Vitrebond) ²	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond ⁴	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond MP ⁵	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁶	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ⁷	0,037*	
Kontrol (Vitrebond) ² /AdheSE ³	0,043*	
Kontrol (Vitrebond) ² / Protect Bond ⁴	0,072	
Kontrol (Vitrebond) ² /Scotchbond MP ⁵	0,068	1>2,3,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xeno V ⁶	0,043*	3>2,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷	0,317	6>2,4,5,7
AdheSE ³ / Protect Bond ⁴	0,046*	7>4,5
AdheSE ³ /Scotchbond MP ⁵	0,043*	
AdheSE ³ /Xeno V ⁶	0,043*	
AdheSE ³ /Xp Bond ⁷	0,034*	
Protect Bond ⁴ /Scotchbond MP ⁵	0,637	
Protect Bond ⁴ /Xeno V ⁶	0,046*	
Protect Bond ⁴ /Xp Bond ⁷	0,037*	
Scotchbond MP ⁵ /Xeno V ⁶	0,043*	
Scotchbond MP ⁵ /Xp Bond ⁷	0,034*	
Xeno V ⁶ /Xp Bond ⁷	0,034*	

⁺⁺ Mann Whitney U Test

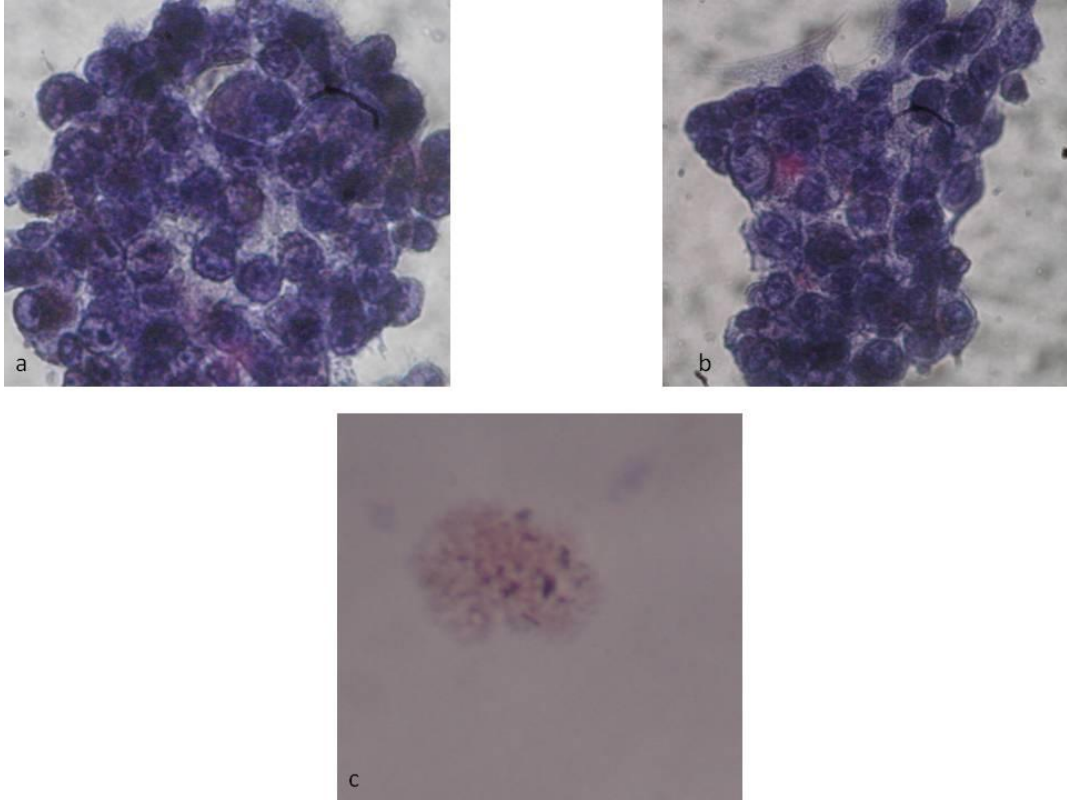
* $p \leq 0.05$

Tablo 4.38: Dentin bariyer testinde 24 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p < 0.05$) ile karşılaştırmaları (*S: Anlamlı $p < 0.05$, NS: Anlamlı değil).

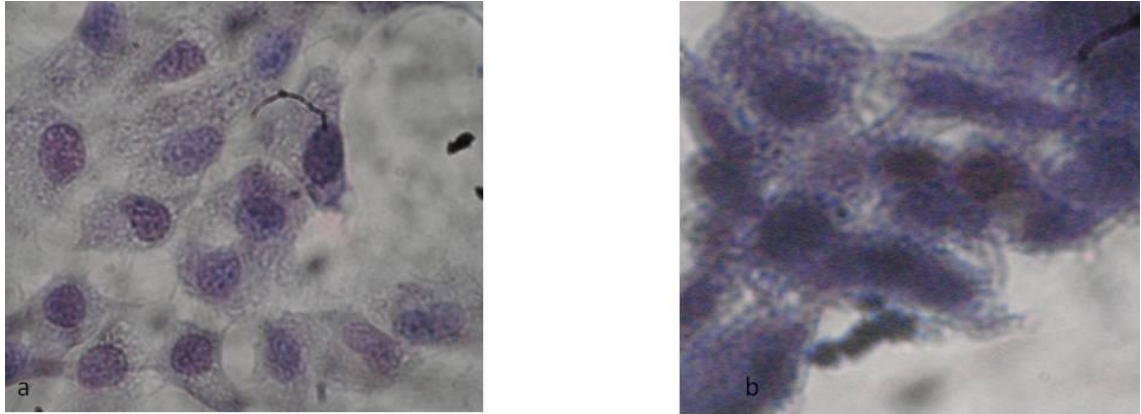
	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XPBond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	NS	NS	S	NS
Adhese	S	S		S	S	S	S
Protect Bond	S	NS	S		NS	S	S
Scotchbond MP	S	NS	S	NS		S	S
Xeno V	S	S	S	S	S		S
XPBond	S	NS	S	S	S	S	



Şekil 4.14: Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol (orjinal büyütme x40) b) negatif kontrol (Vitrebond) (orjinal büyütme x10)



Şekil 4.15:Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond (orjinal büyütme x40) c)Scotchbond MP (orjinal büyütme x40)



Şekil 4.16:Hücre kültür dentin bariyer testinde 24. saatte primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)Xeno V (orjinal büyütme x40)b) XP Bond (orjinal büyütme x40)

4.3.2.2. 72 Saat Sonunda Dentin Bariyer Testinde BrDU-LI Bulguları

Hücreler ekildikten sonra dentin diski üzerine dentin bağlayıcıların uygulanarak hücreler üzerine yerleştirildiği deney gruplarına, dentin disklerinin hücreler üzerine boş olarak uygulandığı negatif kontrol grubuna ve Vitrebond isimli reçine modifiye cam iyonmer kaide materyalinin dentin diski üzerine yerleştirilerek hücreler üzerine uygulandığı pozitif kontrol grubuna ait hücrelerin Bromodeoksiüridin İşaretleme İndeksi (BrDU-LI)'nin immunohistokimyasal teknik ile incelendiği bu yöntemde 24 saat sonunda sentez fazında bulunan yani DNA sentezi izlenen hücrelerin oranı Tablo 4.39'da gösterilmiştir

Tablo 4.39: Dentin bariyer testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının % olarak değerlendirilmesi

Dentin Bariyer (72 Saat)	BrDU (%)		⁺ <i>p</i>
	Ort±SE	Medyan	
Kontrol (Boş)¹	46,00±0,58	46	0,003**
Kontrol (Vitrebond)²	20,00±0,58	20	
AdheSE³	35,33±0,33	35	
Protect Bond⁴	24,33±0,33	24	
Scotchbond MP⁵	17,33±0,88	17	
Xeno V⁶	23,67±0,33	24	
Xp Bond⁷	10,67±1,53	11	

⁺ Kruskal Wallis Testi

** $p \leq 0.01$

Hücre kültürü dentin bariyer testinde kontrol grupları ile test materyallerinde 72 saat sonunda hücrelerin BrDU ile işaretlenme yüzde düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılığa neden olan materyalin tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.40'da görülmektedir.

72 Saat Sonunda dentin bariyer testinde BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezinin görüldüğü hücre oranı (%) AdheSE dentin bağlayıcı grubunda en fazla saptanmış, XP Bond dentin bağlayıcı grubunda ise en az oranda bulunmuştur. 72 saat sonunda tüm gruplar için BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezinin görüldüğü hücre oranı değerlendirildiğinde tüm dentin bağlayıcı sistemler, test materyali uygulanmadan dentin bariyer test düzeneğinin kullanıldığı negatif kontrol örneklerinden (Şekil 4.17)

istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha az sayıda hücrede DNA sentezi sergilemişlerdir ($p<0.05$).

72 saat sonunda Vitrebond uygulanmış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AdheSE, Protect Bond (Şekil 4.18) ve Xeno V gruplarında anlamlı olarak daha fazla sayıda hücrede BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi saptanmıştır. Diğer yandan Xp Bond grubunda ise Vitrebond grubundan anlamlı olarak daha fazla sayıda hücrede DNA sentezi inhibisyonuna neden olmuş ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonu oranı daha az tespit edilmiştir.

Uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere ait 72 saat sonundaki BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranları birbirleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde AdheSE grubunda en fazla oranda tespit edilmiştir. Diğer yandan XP Bond grubunda ise BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranı diğer dentin bağlayıcılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en düşük oranda saptanmıştır. Ayrıca BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranları Protect Bond ve Xeno V gruplarında Scotchbond MP grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.40: Dentin bariyer testinde BrDU pozitif işaretlenmiş hücre oranlarının (%) 72. saatte materyallerin etkilerinin birbirleri ile karşılaştırmaları

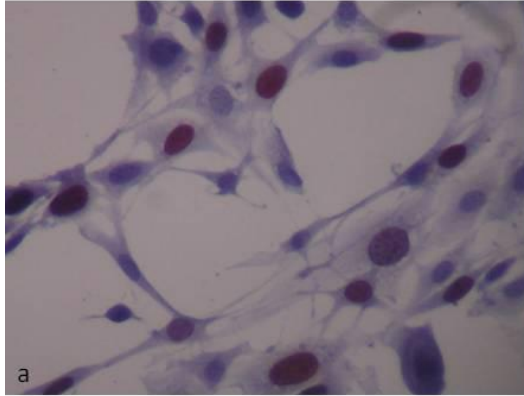
Dentin Bariyer (72 Saat)	BrDU (%)	Açıklama
	⁺⁺ <i>p</i>	
Kontrol (Boş) ¹ / Kontrol (Vitrebond) ²	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Scotchbond ⁵	0,050*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xeno V ⁶	0,046*	
Kontrol (Boş) ¹ / Xp Bond ⁷	0,050*	
Kontrol (Vitrebond) ² /AdheSE ³	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² / Protect Bond ⁴	0,046*	
Kontrol (Vitrebond) ² /Scotchbond ⁵	0,077	1>2,3,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xeno V ⁶	0,046*	3>2,4,5,6,7
Kontrol (Vitrebond) ² /Xp Bond ⁷	0,050*	4,6>2,5,7
AdheSE ³ / Protect Bond ⁴	0,043*	7<2,5
AdheSE ³ /Scotchbond ⁵	0,046*	
AdheSE ³ /Xeno V ⁶	0,043*	
AdheSE ³ /Xp Bond ⁷	0,046*	
Protect Bond ⁴ /Scotchbond ⁵	0,046*	
Protect Bond ⁴ /Xeno V ⁶	0,197	
Protect Bond ⁴ /Xp Bond ⁷	0,046*	
Scotchbond ⁵ /Xeno V ⁶	0,046*	
Scotchbond ⁵ /Xp Bond ⁷	0,050*	
Xeno V ⁶ /Xp Bond ⁷	0,046*	

⁺⁺ Mann Whitney U Test

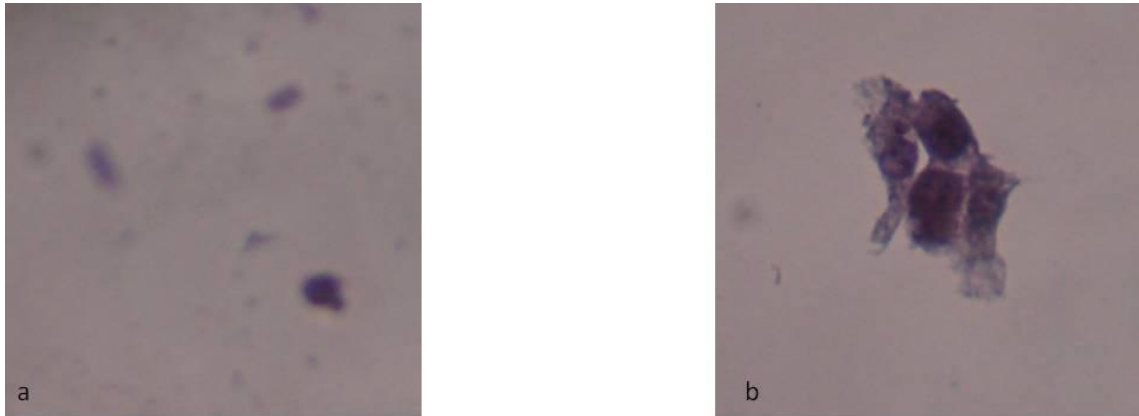
* $p \leq 0.05$

Tablo 4.41: Dentin bariyer kültür testinde 72 saatlik grupta hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının istatistiksel olarak ikili anlamlılıklarının Mann Whitney U testi ($p<0.05$) ile karşılaştırmaları)

	Kontrol Boş	Kontrol Vitrebond	Adhese	Protect Bond	Scotchbond MP	Xeno V	XPBond
Kontrol Boş		S	S	S	S	S	S
Kontrol Vitrebond	S		S	S	NS	S	S
Adhese	S	S		S	S	S	S
Protect Bond	S	S	S		S	NS	S
Scotchbond MP	S	NS	S	S		S	S
Xeno V	S	S	S	NS	S		S
XPBond	S	S	S	S	S	S	



Şekil 4.17:Hücre kültür dentin bariyer testinde 72 saatte kontrol materyallerinde BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) pozitif kontrol (orjinal büyütme x40) Negatif kontrol grubundan hücre görüntüsü elde edilememiştir.



Şekil 4.18:Hücre kültür dentin bariyer testinde 72. saatte primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarda BRDU pozitif işaretlenmiş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. a)AdheSE (orjinal büyütme x40) b)Protect Bond (orjinal büyütme x40). Scotchbond MP ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcıların Xeno V ile XP bond'da hücre görüntüsü elde edilememiştir.

4.3.2.3. Hücre Kültürü Dentin Bariyer Testinde 24 ve 72 Saatlik Gruplarda Hücrelerin BrDU ile İşaretlenme Oranlarının Değerlendirilmesi

Dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin BrDU ile işaretlenmiş hücre oranları şekil 4.19'da ve 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin BrDu (%) değerlendirilmesi tablo 4.42'de gösterilmiştir.

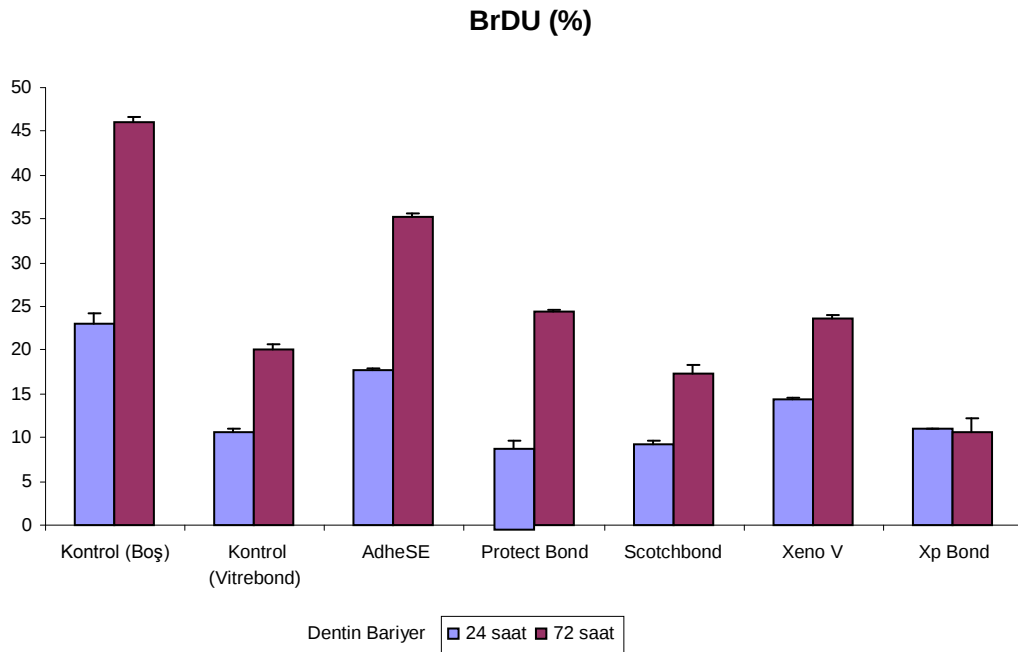
Tablo 4.42:Dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda hücrelerin BrDU pozitif işaretlenme oranlarının (%) değerlendirilmesi

Dentin Bariyer	BrDU (%)		⁺⁺ <i>p</i>
	24 saat	72 saat	
	Ort±SE (Medyan)	Ort±SE (Medyan)	
Kontrol (Boş) ¹	23,00±1,15 (23)	46,00±0,58 (46)	0,050*
Kontrol (Vitrebond) ²	10,67±0,33 (11)	20,00±0,58 (20)	0,046*
AdheSE ³	17,67±0,33 (18)	35,33±0,33 (35)	0,043*
Protect Bond ⁴	8,67±0,88 (9)	24,33±0,33 (24)	0,046*
Scotchbond ⁵	9,33±0,33 (9)	17,33±0,88 (17)	0,046*
Xeno V ⁶	14,33±0,33 (14)	23,67±0,33 (24)	0,043*
Xp Bond ⁷	11,00±0,00 (11)	10,67±1,53 (11)	1,000

⁺⁺ Mann Whitney U Test

* $p \leq 0.05$

Uygulanan dentin bağlayıcılar, pozitif ve negatif kontrol grubuna ait 24 ve 72 saat sonundaki BrDU ile işaretlenmiş DNA sentezi görülen hücre oranları kıyaslandığında, bu oranların XP Bond dışında uygulanan diğer tüm dentin bağlayıcılar için süre artışıyla bağlantılı olarak istatistiksel düzeyde anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. XP Bond’da ise anlamlı bir artış bulunmamıştır.



Şekil 4.19:Dentin bariyer testinde 24 saat ve 72 saatlik gruplarda materyallerin BrDu pozitif işaretlenme oranları

4.4. Test Materyallerinin Hücre Morfolojilerine Etkilerinin Taramalı Elektron Mikroskopu ile Değerlendirilmesi

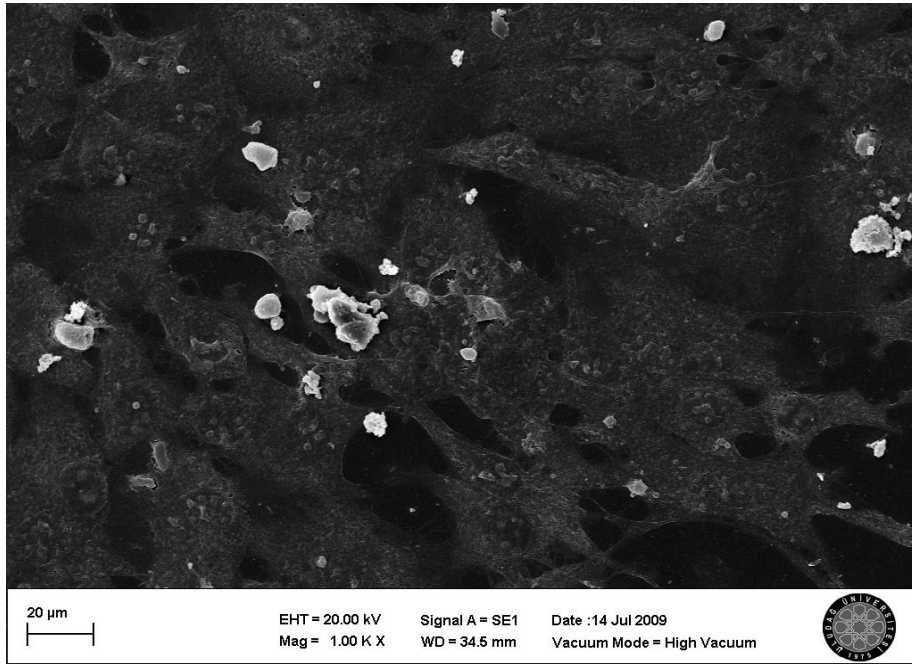
Hücre kültür insert testinde kullanılan dentin bağlayıcı sistemlerin hücreler üzerine etkisinin SEM’de incelenmesi sonucunda (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29) elde edilen bulgular değerlendirildiğinde en fazla sitotoksik etki Protect Bond primer, XP Bond ve Xeno V gruplarında izlenmiştir. 72 saat sonunda uygulanan bu dentin

bağlayıcılarının, hücre morfolojilerini etkilediği, hücre morfolojilerinin bir bütün olarak izlenmediği, hücrelerin parçalanmış bir yapı sergilediği gözlemlenmiştir. Bunun yanında Scotchbond MP primer grubunda ise, Protect Bond primer, XP Bond ve Xeno V ile aynı düzeyde olmasada hücrelerin morfolojileri üzerinde belirgin bir etki meydana getirmiştir. SEM görüntülerinde hücrelerin birbiriyle bağlantısının koptuğu, hücrelerin sitoplazmalarının yer yer bölündüğü ve parçalı bir halde bulunduğu gözlemlenmiştir.

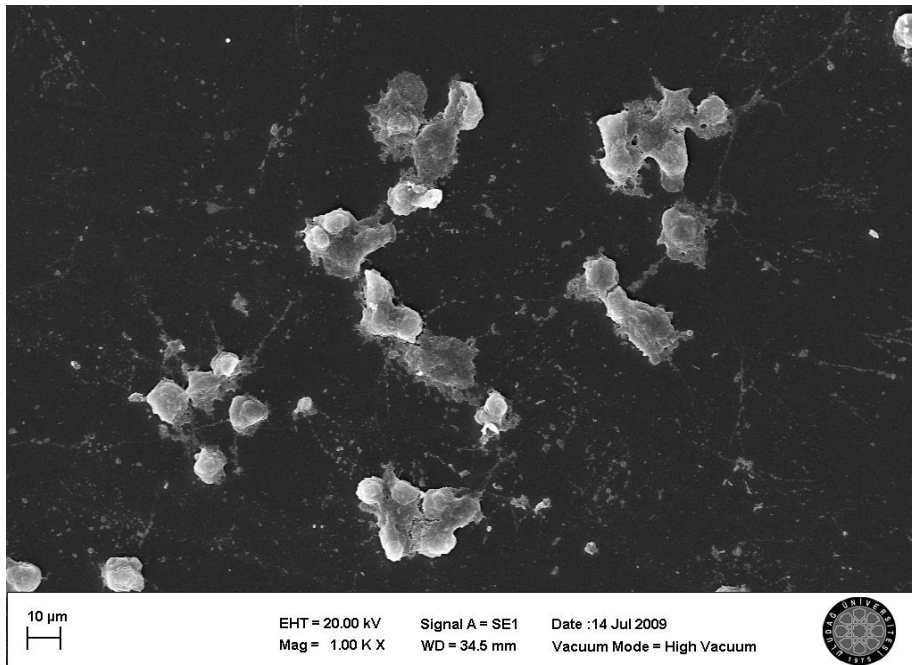
72 saat sonunda diğer dentin bağlayıcı sistemlerde hücreler üzerinde sitotoksik etkiye bağlı çeşitli düzeylerde değişiklikler izlenmiştir. Scotchbond MP bond kısmında SEM görüntülerinde hücrelerin bir kısmının diğer hücrelerle olan bağlantısını kopararak yuvarlak bir şekil gösterdiği, yer yer ise hücreler arası sitoplazmik bağlantıların azaldığı görülmüştür. AdheSE bond'da ise hücre sayısının yer yer azaldığı ve bazı hücrelerde çekirdeğin parçalı bir yapı gösterdiği izlenmiştir. AdheSE primerde hücre sayısının oldukça azaldığı, hücrelerin birbiriyle olan sitoplazmik bağlantılarının tamamen ortadan kalktığı, hücre çekirdeklerinin izlenmediği görülmüştür.

Hücre kültür insert testinde HEMA kullanılan pozitif kontrol grubunda hücre nükleusunda parçalanma, sitoplazmada bölünme izlenirken, hücrelerin bağlantılarının koptuğu ve birbirinden ayrıldıkları gözlenmektedir.

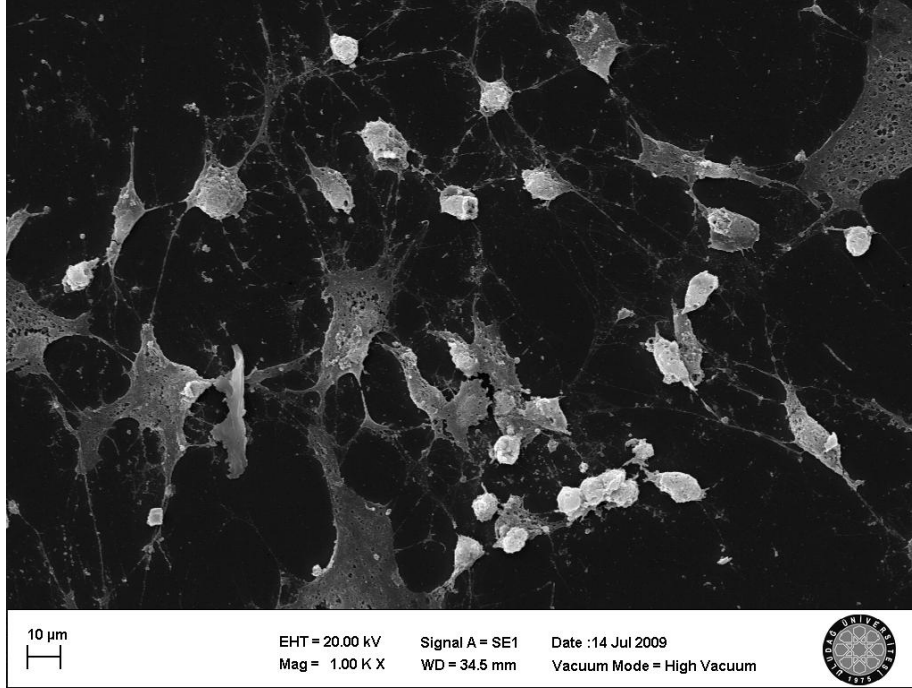
Dentin bariyer testinde dentin bağlayıcılar uygulandıktan 72 saat sonra elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35) uygulanan dentin bağlayıcı sistemlere bağlı olarak hücreler üzerinde çeşitli sitotoksik etkiler gözlemlenmiştir. Vitrebond'da hücre sayısının oldukça azaldığı, hücrelerin sitoplazmalarının parçalandığı izlenmiştir. Diğer yandan Scotchbond MP ve Protect Bond'un oluşturduğu etkilerin birbirine benzerlik gösterdiği görülmüştür. Yer yer hücrelerin yuvarlaklaştığı, birbirleri ile bağlantılarını kopardığı ve yer yer sitoplazmalarının parçalandığı gözlemlenmiştir. AdheSE'de ise hücre sayısının azaldığı hücreler arası sitoplazmik bağlantıların yer yer koptuğu ya da incelindiği, hücrelerin şekil değiştirmeye yöneldiği izlenmiştir. Xeno V'de hücrelerin yer yer şekil değiştirdiği, yuvarlak bir şekle dönüştüğü ve yer yer hücrelerin birbirleri ile sitoplazmik bağlantılarının koptuğu tespit edilmiştir. XP Bond'da ise hücre yoğunluğunun azaldığı, yer yer sitoplazmaların parçalandığı ve sitoplazmik bağlantıların koptuğu gözlenmiştir. Bazı alanlarda ise hücrelerin bir arada kümелendiği ve birbirleri ile sitoplazmik bağlantılarını koparmadığı izlenmiştir.



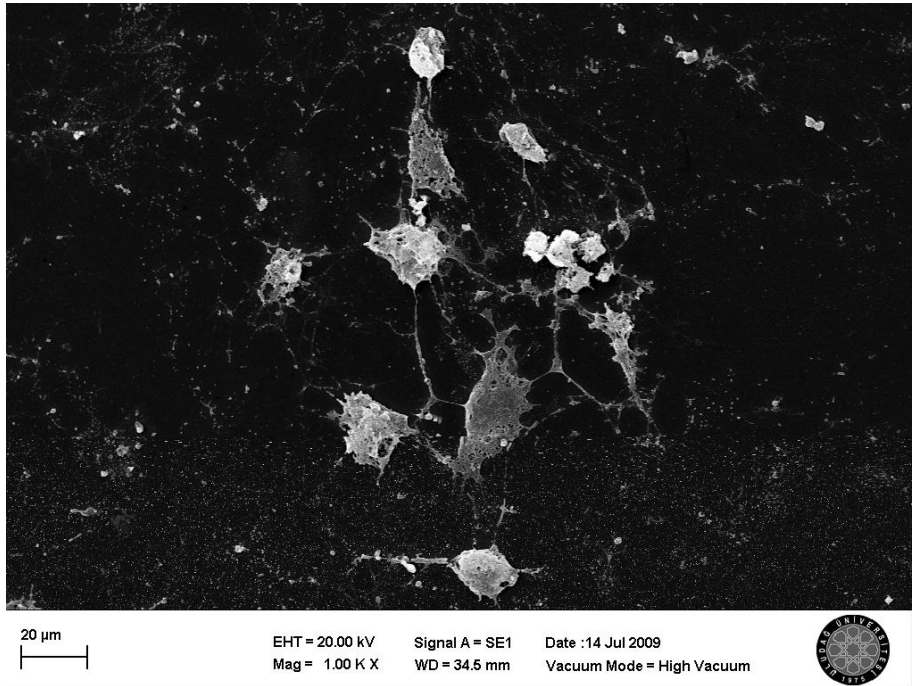
Şekil 4.20: Hücre kültürü insert testi negatif kontrol SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



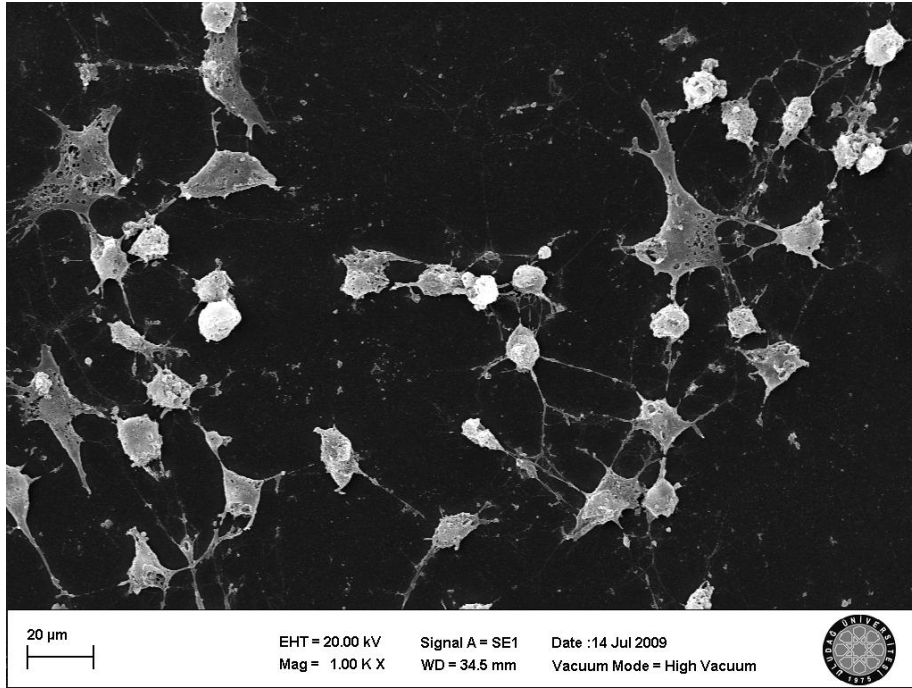
Şekil 4.21:Hücre kültürü insert testi pozitif kontrol (HEMA) SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



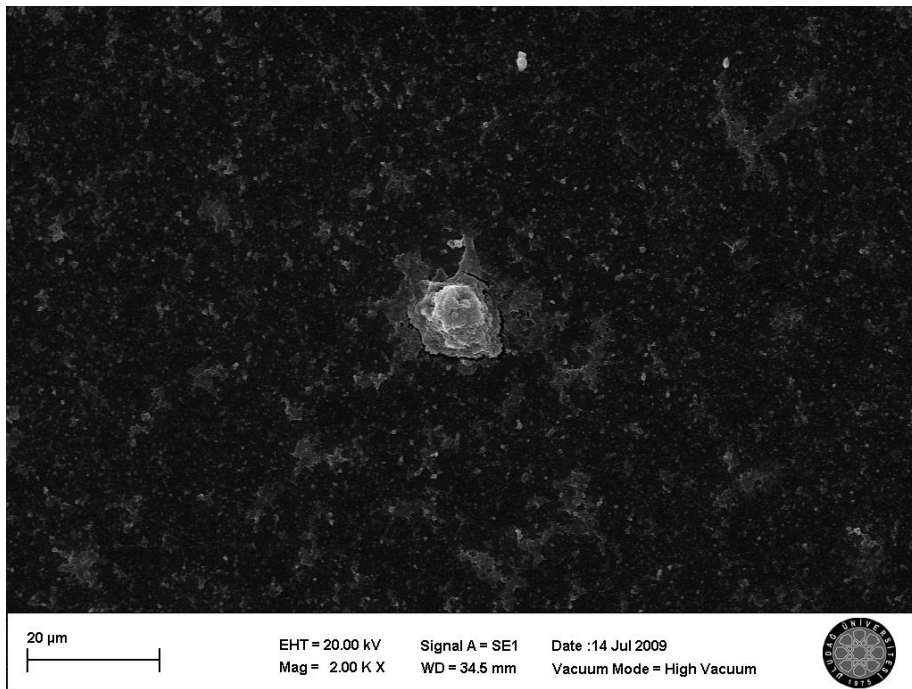
Şekil 4.22: Hücre kültürü insert testi AdheSE bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



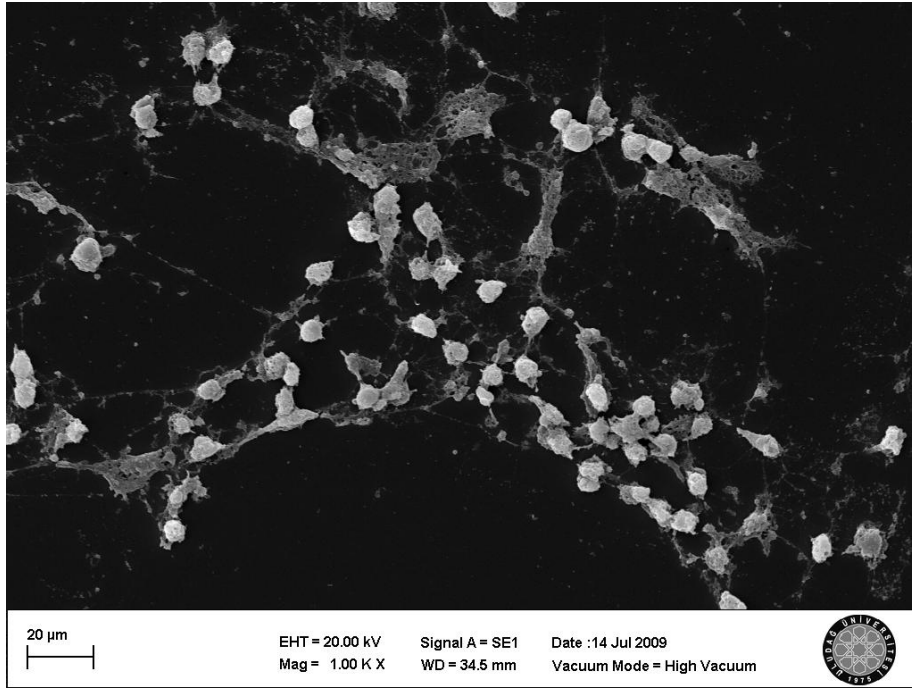
Şekil 4.23: Hücre kültürü insert testi AdheSE primer kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



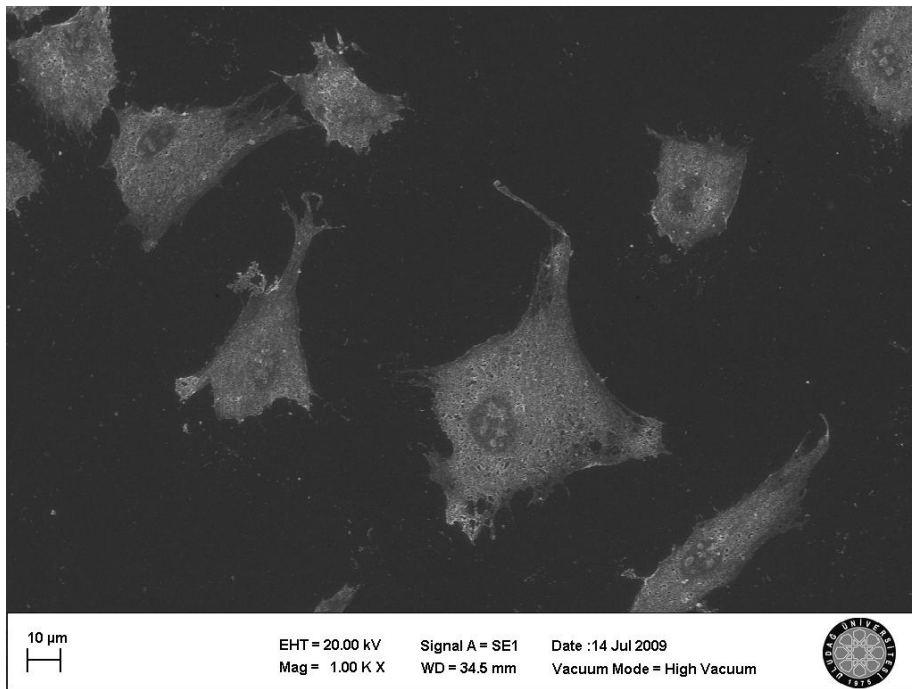
Şekil 4.24: Hücre kültürü insert testi Protect Bond bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



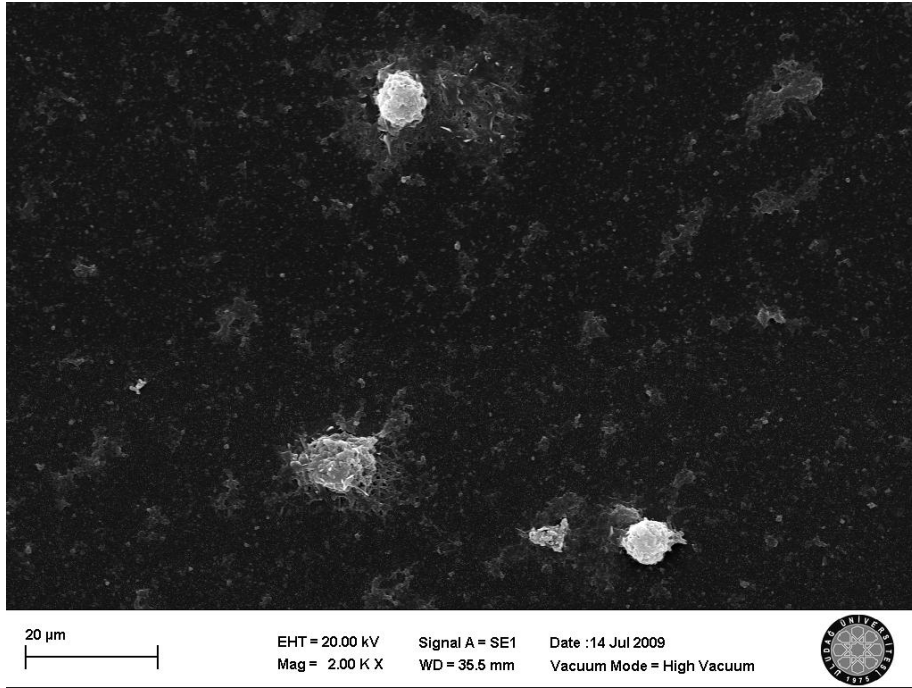
Şekil 4.25: Hücre kültürü insert testi Protect Bond primer kısmı SEM görüntüsü (x2000 büyütme)



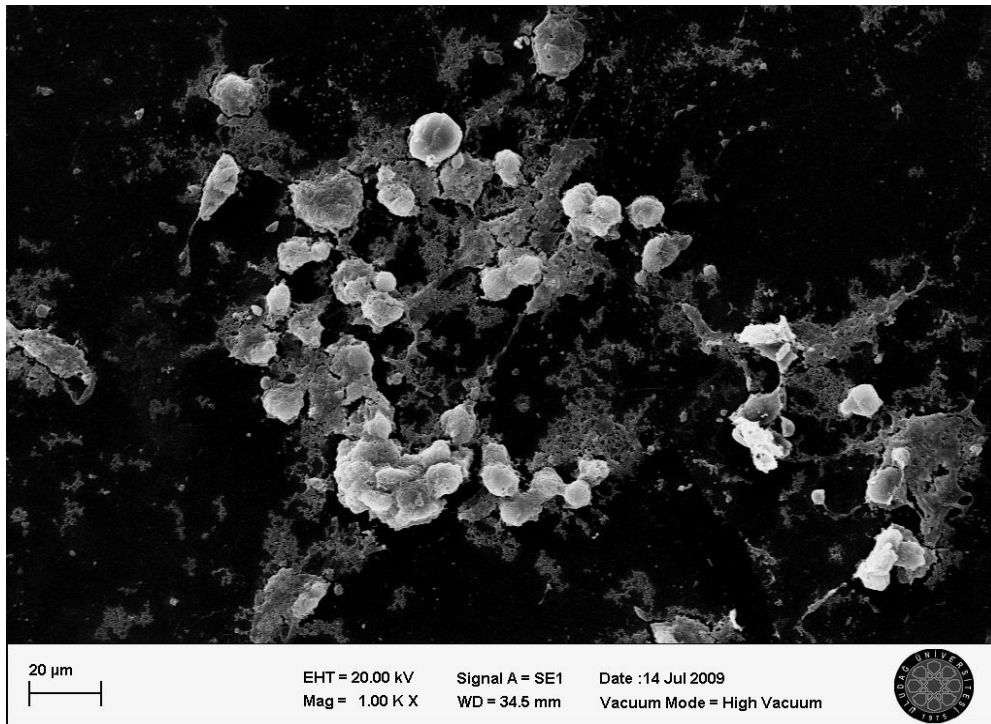
Şekil 4.26: Hücre kültürü insert testi Scotchbond MP bond kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



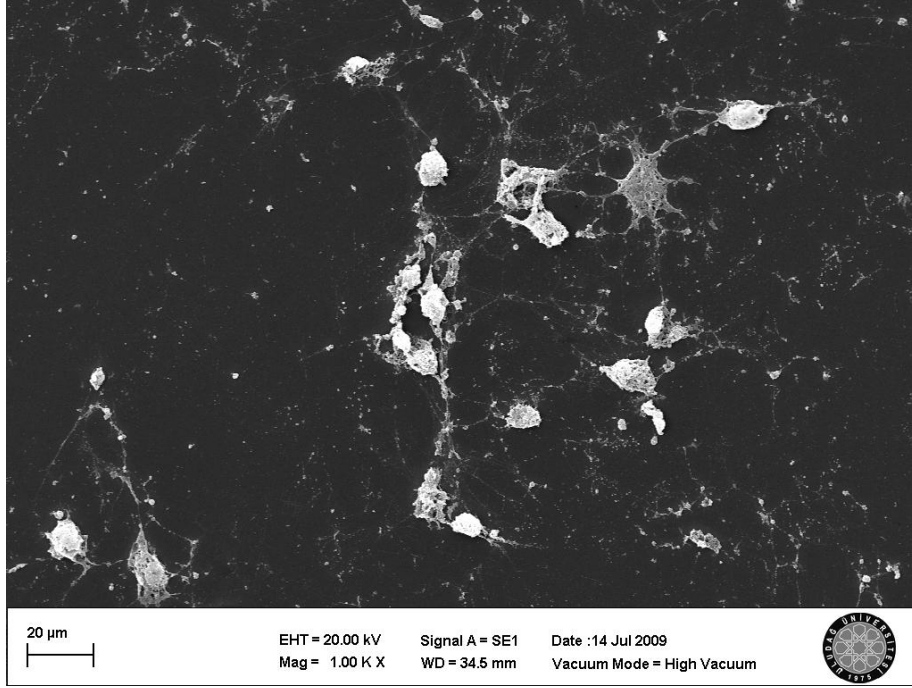
Şekil 4.27: Hücre kültürü insert testi Scotchbond MP primer kısmı SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



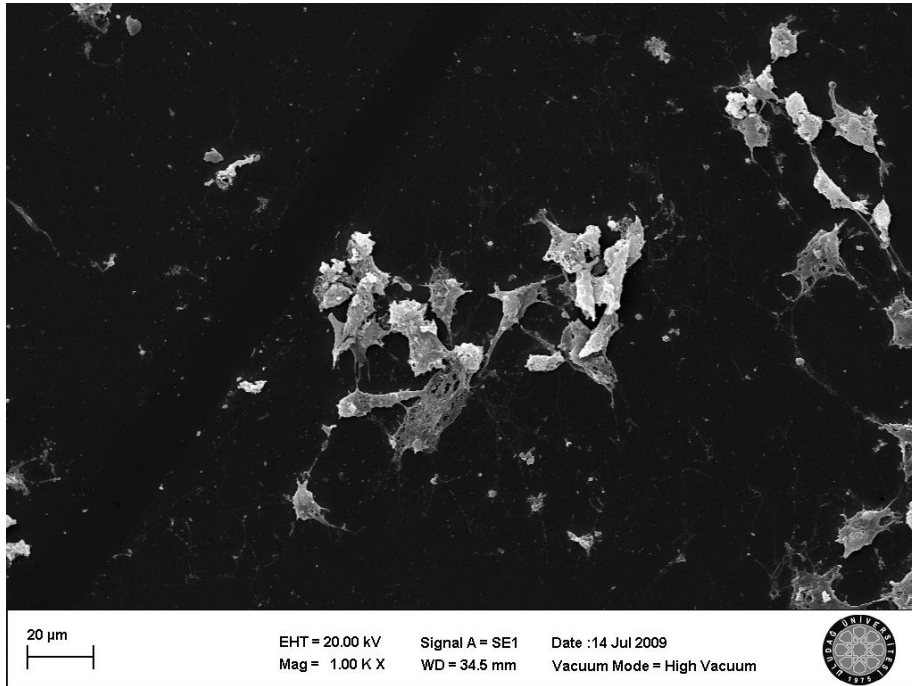
Şekil 4.28: Hücre kültürü insert testi Xeno V SEM görüntüsü (x2000 büyütme)



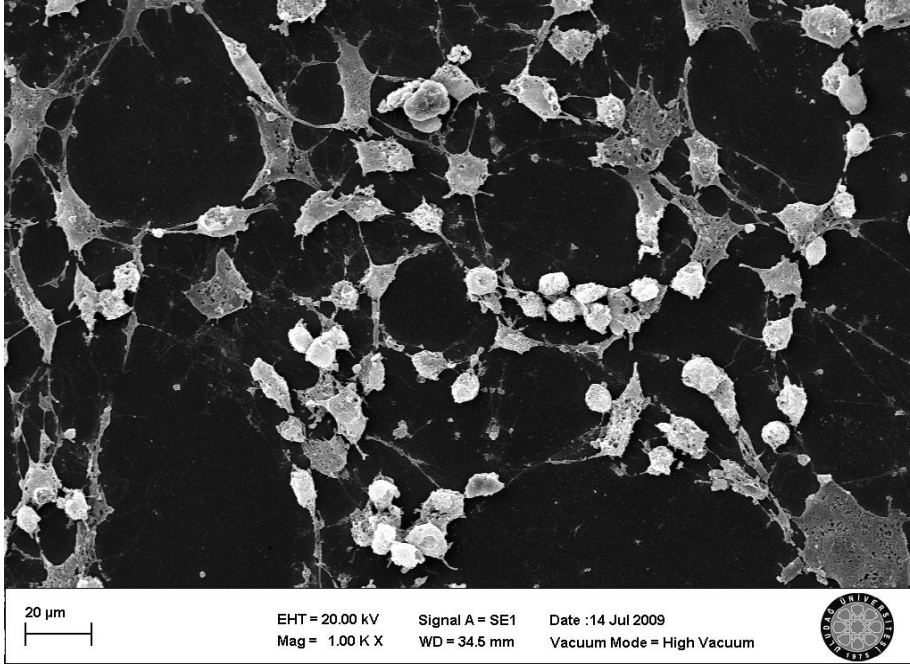
Şekil 4.29:Hücre kültürü insert testi XP Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



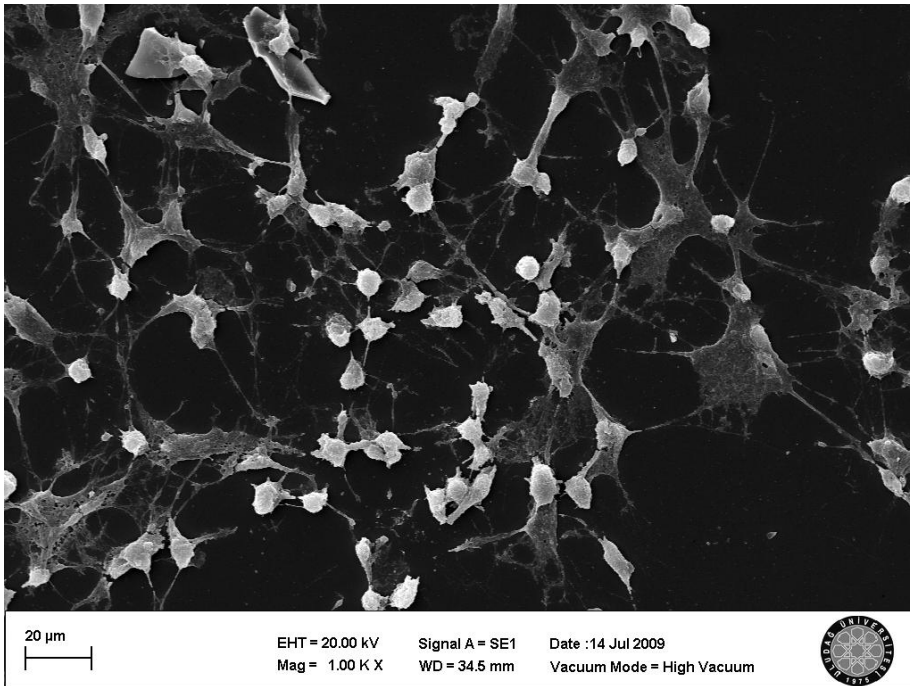
Şekil 4.30:Hücre kültürü dentin bariyer testi Vitrebond SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



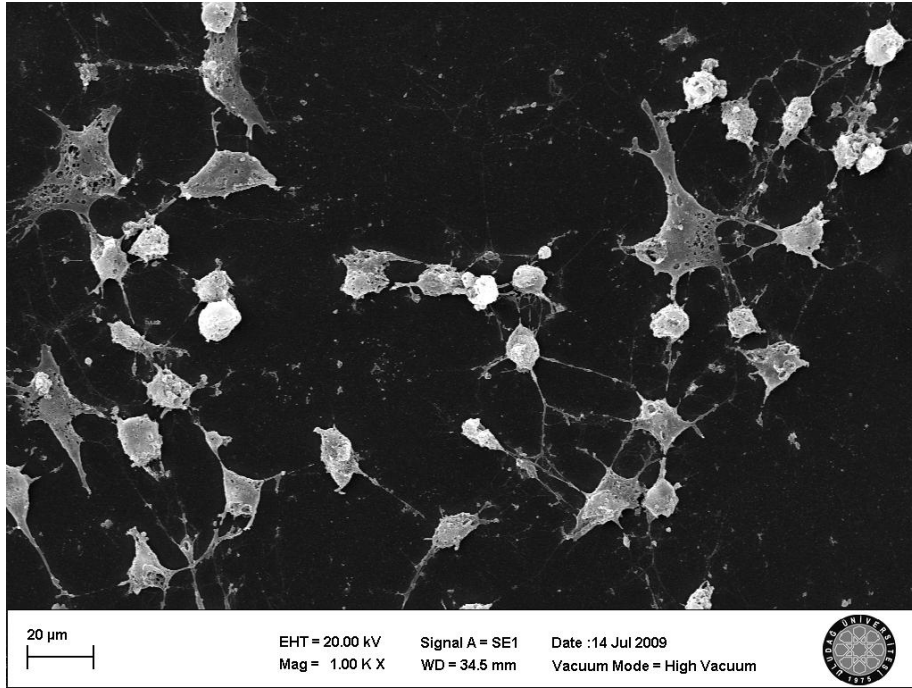
Şekil 4.31:Hücre kültürü dentin bariyer testi AdheSE SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



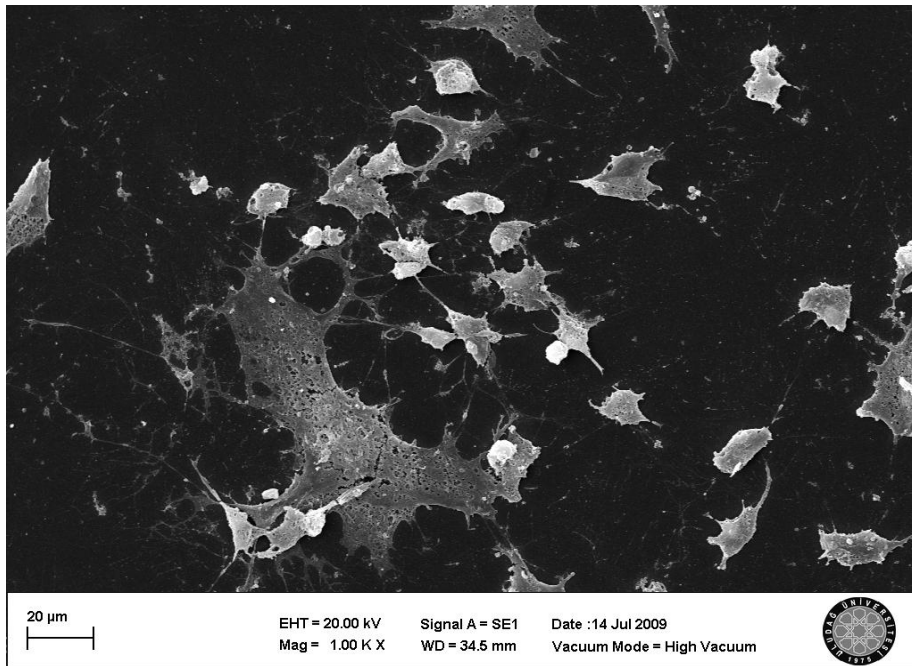
Şekil 4.32: Hücre kültürü dentin bariyer testi Protect Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



Şekil 4.33: Hücre kültürü dentin bariyer testi Scotchbond MP SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



Şekil 4.34: Hücre kültürü dentin bariyer testi Xeno V SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



Şekil 4.35:Hücre kültürü dentin bariyer testi XP Bond SEM görüntüsü (x1000 büyütme)

5. TARTIŞMA

Dentin bağlayıcı sistemler kavite duvarları ile restoratif materyal arasında meydana gelen bağlanmayı sağlar. Ayrıca dentin bağlayıcı sistemler hassasiyet giderici ajanlar olarak da kullanılmaktadır (161,162). Dentin bağlayıcı sistemlerin kullanılması ile; reçine esaslı restoratif materyal ile diş dokusu arası bağlantının artırılması, mikrosızıntının azaltılması ve meydana gelen okluzal streslerin dağıtılması amaçlanır (163). Dentin bağlayıcı sistemler dentin dokusuna bağlanmayı hibrit tabaka oluşumuyla sağlar. Ayrıca dentin kanalları içerisinde reçine uzantıları da gözlemlenir. Meydana gelen bu reçine uzantıları restorasyon materyali ile diş dokusu arası bağlantıyı artırırken açılan dentin kanal ağzlarının kapatılmasını sağlar. Dentin bağlayıcı sistemlerin canlı dentin dokusu ile yakın ve sıkı bir temas halinde olması nedeniyle pulpa dokusunda oluşturacakları etkiler önem kazanmıştır. Bu nedenle dentin bağlayıcı sistemlerin biyolojik açıdan uyumlulukları bu materyallerin klinik performansı açısından önemlidir (22).

Dentin bağlayıcı sistemler ağız içerisinde farklı sıvı ortamlar ile temas halindedir. Kompozit reçinelerle birlikte kullanılan dentin bağlayıcılar dentin sıvısıyla temasta olur ve bağlayıcılarda çözünme meydana gelebilir. Ayrıca hassasiyet giderici olarak kullanılan dentin bağlayıcı sistemler ağız sıvıları ile karşılaşır ve sıvılar tarafından bu bağlayıcılardan da çözünme oluşabilir. Bunun sonucunda açığa çıkan bileşenlerde tükürük yolu ile ağız içerisine taşınır (2,26,162,164)

Reçine esaslı restoratif materyallerden salınan bileşenlerin tipi ve miktarı bu materyallerin biyolojik davranışlarını önemli düzeyde etkiler (26). Dentin bağlayıcı sistemlerin TEGDMA ve HEMA gibi bileşenleri tek başlarına ya da kompozitlerle birlikte dentin aracılığı ile pulpaya ulaşabilir ve belirli konsantrasyona ulaşınca pulpada reaksiyona neden olabilir. Diğer yandan dentin bağlayıcı sistemlerin içerdikleri bileşenler ve bu bileşenlerin birbirleri ile olan etkileşimleri dentin bağlayıcı sistemler ile ilgili bildirilen farklı pulpa reaksiyonlarını açıklayabilir (155). Ayrıca bir çok faktör de dentin bağlayıcı sistemlere bağlı olarak meydana gelen reaksiyonları etkileyebilir. Bunlar; operatif işlemler, kalan dentin kalınlığı, uygun kaide materyali ve dentin geçirgenliğidir (33).

Restoratif materyallerin biyoyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda çeşitli test metotları kullanılmaktadır. Bu metotlardan en yaygın olarak kullanılanları hayvan deneyleri ve hücre kültür testleridir. Dental materyallerin sitotoksitesini değerlendirmek için hayvan deneyleri yapılması uzun zaman almakta, pahalı ve kamuoyunda oldukça tartışma yaratmaktadır. Hayvan deneyleri ile karşılaştırıldığında hücre kültür metotları önemli teknik avantajlara sahiptir. Hücre kültür metotları daha iyi standardize edilebilir ve bu metot ile deneylerin tekrar edilebilirliği kolaydır. Aynı zamanda uygulaması kolay, daha az zaman alan ve daha düşük maliyete sahip testlerdir (165). Bu nedenle çalışmamızda hücre kültür test yöntemleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkileri 3T3 fare fibroblast hücrelerinden elde edilen hücre kültürleri üzerinde yapılmıştır. Dental materyallerin etkisine maruz kalan dokulardan primer hücrelerin izole edilmesinin sitotoksik testlerinde *in vivo* koşulları birebir taklit etmesi açısından daha güvenilir olacağı belirtilmektedir. Ancak bu dokulardan primer hücrelerin izole edilmesi oldukça güç ve zaman alıcıdır. Devamlı hücre hatlarının sınırsız çoğalabilme yetenekleri ile karşılaştırıldığında primer hücrelerin sayısı sınırlı ve daha da önemlisi bu hücrelerin yaşam süreleri devamlı hücre hatlarına göre daha kısadır. Ayrıca primer insan hücreleri izolasyonları sonrası pasaja bağlı olarak bir kimyasal maddeye farklı cevap verebilmektedir. Diğer taraftan L-929 ya da 3T3 fare fibroblastları gibi devamlı hücre hatları geleneksel sitotoksik izleme testlerinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Hücre kültür ortamının şartları kolay kontrol edilebildiğinden dolayı diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyoyumluluk değerlendirmelerinde devamlı hücre hatlarının kullanılması uluslararası standartlar tarafından da önerilmektedir. Ayrıca günümüzde primer hücrelerden kaynaklanan problemleri aşmak amacı ile bu hücreler transforme edilerek sınırsız yaşama özelliğine sahip hücre hatları elde edilmektedir. Primer hücrelerin transformasyona uğratarak sınırsız bir yaşama sahip devamlı hücre elde edilmesi tekniğine sahip olmadığımızdan araştırmalarda yaygın olarak kullanılan sınırlı bir yaşama sahip 3T3 fare fibroblast devamlı hücre hatları üzerinde çalışmamız gerçekleştirilmiştir (119,121,132,166).

Dental materyallerin sitotoksitesinin değerlendirildiği *in vitro* testlerde materyallerin *in vivo* ortamda oluşturduğu temas şekilleri taklit edilmeye çalışılır. *In vitro* direkt hücre materyal temas testlerinde deney materyalleri doğrudan hücre ile

temas eder (167). *In vivo* ortamdaki indirekt teması taklit edebilmek için uygulanan *in vitro* indirekt hücre materyal temas testlerinde ise agar overlay, milipor filtre ve dentin gibi maddeler materyal ile hücre arasına bir bariyer oluşturacak şekilde uygulanmıştır(5,168). ISO *in vitro* hücre kültür testlerinde klinik kullanım için geliştirilen ve pazarlanan materyalleri ya da bu materyallerden özgün sıvılar içerisinde elde edilen ekstraktların kullanılmasını önermektedir. Son yıllarda materyallerden salınan bileşenlerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan indirekt temas yöntemlerinin önem kazandığı bildirilmektedir (132,134).

Tang ve ark., sitotoksite testlerinde hücre kültür insertlerinin direkt kontak testlerine göre daha kolay tekrar edilebilir ve doğru sonuçlar ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında hücre kültür insertlerinin ticari olarak pazarlanmasından dolayı kolayca elde edilebilmesi ve uygulanma biçimlerinin basit olması nedeniyle bu insertler kullanılarak yapılan testlerin daha iyi standardize edilebileceği açıklanmıştır. Ayrıca bu sistemlerin bir diğer avantajı hücrelerin reçine içerikli materyallerin etkilerine sürekli maruz bırakılmasıdır. Böylece bu test yönteminin kullanılması ile materyallerden salınan bileşenlerin sitotoksik etkisi belirlenir (134).

Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızda uygulanan materyallerden salınan bileşenlerin hem sitotoksitesini test etmek hem de *in vivo* ortamı daha iyi taklit etme açısından indirekt bir test metodu kullanılmış ve bu amaçla ticari olarak pazarlanan hücre kültür insertlerinden yararlanılmıştır.

Dental restoratif materyallerin sitotoksitesini test etmek için günümüzde özgün hücre kültür test metotları geliştirilmiştir. Bu metotlardan biri de hücre ile test materyali arasında dentinin bariyer olarak kullanıldığı test metodudur. Bu amaçla iki tür uygulama tanımlanmıştır. Bu uygulamalardan birisinde insan 3. molar dişlerden dentin kesitlerinin elde edilmesi diğer uygulamada ise preslenmiş dentin talaşlarının kullanılmasıdır. Her iki uygulama yöntemine ait çeşitli dezavantajlar bildirilmiştir. Bu dezavantajlar uygun kalınlıkta dentin diskinin sınırlı sayıda elde edilmesi, farklı dentin diskleri arasında geçirgenlik farkının olabilmesi ve preslenmiş dentin talaşlarının normal dentinin anatomik yapısını yansıtmamasıdır (139). Bu dezavantajları aşmak amacıyla Schmalz ve ark. tarafından sığır dentin disklerinin kullanıldığı bir dentin bariyer test yöntemi önerilmiştir. Bu metotta fare fibroblastları direkt olarak dentin diski üzerine ekilerek standardize edilmeye çalışılmış bir uygulama şekli açıklanmıştır. Son yıllarda ticari

olarak pazarlanmakta olan, yapay olarak pulpa odasını taklit eden ve dentin diskinin bariyer olarak kullanıldığı bölümlü oda içeren aygıtlar bu tür testlerde kullanılmaktadır. Ayrıca bu aygıtlar bir perfüzyon cihazına bağlanarak pulpanın kan dolaşımı ve *in vivo* ortam daha gerçeğe yakın olarak taklit edilebilmektedir (138). Diğer taraftan çalışmalarda farklı araştırmacılar tarafından yukarıda belirtilen esaslara dayanan çeşitli dentin bariyer test cihazları tanımlanmıştır. Bu cihazlar sitotoksite değerlendirmesinde standartları karşılayacak şekilde dizayn edilmişlerdir. Çalışmamızda *in vivo* ortamı daha fazla taklit etmesi açısından dentin bariyer testi kullanılmıştır. Benzer şekilde araştırmamızda klinik duruma yakın olması açısından 3. molar dişlerden alınan dentin diskleri kullanılmıştır. Ayrıca dentin kesitleri arasında dentin geçirgenliğindeki farklılıkları önlemek amacıyla tüm kesitler dişin orta bölümünden (ekvator hattının 1mm altından) alınmıştır.

Daha uzun süre dentin bağlayıcı sistemlerin etkisine maruz kalındığında dentin bağlayıcı sistemlerin bileşimini oluşturan monomerlerin birbirlerinin etkisini artırma (sinerjist etki) etkileşimlerinin daha sık görüldüğü belirtilmiştir. Bunun sonucu olarak monomerlerin etkisine maruz kalma süresinin dentin bağlayıcıların toksisitesi üzerinde çok güçlü bir etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir.(155) Dolayısıyla çalışmamızda hem kısa dönemde hem de uzun dönemde ortaya çıkan sitotoksik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla test materyalleri 2 farklı zaman diliminde (24–72 saat) uygulanmış böylece süreye bağlı olarak sitotoksik etkiler incelenmiştir.

Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımları gerçek klinik durumu yansıtması açısından hücre kültür insertlerine uygulanmıştır. Diğer taraftan ise dentin bağlayıcı sistemlerin bond kısımları klinik durumu yansıtması açısından hücre kültür insertlerine uygulanmadan önce polimerize edilmişlerdir. Gerzina ve ark. dentin bondinglerin ışıkla polimerize edildikleri zaman bu materyallerden salınan monomerlerin miktarının sitotoksik etki gösterebilecek dozun çok altında olduklarını belirtmişlerdir (169).

Çalışmamızda hücre kültür insertlerine test materyalleri uygulandıktan 24 saat sonra toplam hücre sayısı bulguları değerlendirildiğinde primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıların primer kısımlarının (AdheSE primer, Protect Bond primer, Scotchbond primer) ve primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcılardan XP Bond'un diğer test materyallerinden istatistiksel

olarak anlamlı düzeyde daha fazla sayıda hücre azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan 24 saat sonunda AdheSE bond kısmı istatistiksel düzeyde anlamlı olarak en az sayıda hücre azalmasına neden olmuştur.

Hücre kültür insertlerine dentin bağlayıcı sistemler uygulandıktan 72 saat sonra toplam hücre sayısına göre değerlendirildiğinde benzer etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Diğer yandan 72 saat sonunda Protect Bond'un bond kısmının hücre sayısı üzerine sitotoksik etkisinin 24 saatlik değerlere göre arttığı, HEMA'nın ise azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca AdheSE bond kısım ve Protect Bond primer kısımlarının sitotoksik etkileri 72 saat sonunda anlamlı düzeyde artmıştır.

Hücre kültür insertlerine test materyalleri uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra toplam hücre sayısına göre primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıların etkileri kıyaslandığında primer kısımlarının sitotoksitesinin bonding kısımlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Grobler ve ark., farklı dentin bağlayıcı sistemlerin (Clearfil Protect Bond, Adper ScotchBond1, Xeno III, Prime & Bond NT) sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında Xeno III isimli dentin bağlayıcının en fazla toksisiteye sahip olduğunu bunu Clearfil Protect Bond'un izlediğini saptamışlardır. Araştırmacılar Clearfil Protect Bond primer kısmının bond kısmından 3 kat daha fazla toksik olduğunu belirtmişler ve primer kısmın MDPB monomeri içermesinin buna neden olabileceğini bildirmişlerdir (41). Çalışmamızda benzer şekilde Clearfil Protect Bond primer kısmı bond kısmından daha toksik bulunmuştur. Wiegand ve ark., dentin hassasiyet giderici ajanların sitotoksik etkisini dentin bariyer test yöntemi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında Clearfil Protect Bond dentin bağlayıcı ajanın diğer test materyallerine oranla anlamlı düzeyde sitotoksik olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar Clearfil Protect Bond'un sitotoksik etkisini bu materyalin içerdiği MDPB monomeriyle açıklamışlardır. MDPB antibakteriyel bir kimyasal madde olduğu belirtilmiştir. Bu maddenin diş hekimliğindeki materyallerde kullanılan diğer monomerlere benzer ya da daha düşük sitotoksik etki potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmüştür (170,171). Diğer yandan çalışmamızda Protect Bond'un primer kısmı dışında bağlayıcı kısımlardan ayrı olarak uygulanan diğer primerlerinde benzer şekilde daha fazla sitotoksite sergilemesi, toksik etkinin sadece MDPB içeriği ile açıklanamayacağını düşündürmektedir. Reçine esaslı

dental materyallerin sitotoksik etkileri bu materyallerin suda çözünebilen bileşenlerinin medyum içerisindeki konsantrasyonu ile ilişkili olabilir. Dentin bonding ajanların sahip olduğu farklı monomer oranları bu materyallerin farklı sitotoksik etkilerini açıklayabilir (33). Kaga ve ark., dentin bağlayıcı sistemlerin primer ve polimerize olmamış bonding kısımlarının ağırlık olarak 10-20 %' sinin kültür medyumunda çözündüğünü diğer taraftan polimerize olmuş bonding kısımların ise kültür medyumunda 1.5-2.5 % oranında çözündüğünü bildirmişlerdir (17).

Çalışmamızda 24 ve 72 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı ayrı uygulanan dentin bağlayıcıların primer kısımların HEMA'dan daha fazla hücre sayısında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Polimerize edilmeyen primerlerin düşük moleküler ağırlıklı hidrofilik reçineleri çözücü bir rol oynayarak bonding ajanlarının hidrofilik reçine kısımlarının pulpaya difüzyonunu arttırabilir. Bundan dolayı primerlerin içerisinde bulunan bu monomerlerin hızlı difüzyon özelliği ve primer bileşenlerinin birbirleri ile etkileşimleri bu materyallerin sitotoksik etkilerini arttırmış olabilir. Diğer yandan dentin bağlayıcıların primer kısımlarının HEMA, TEGDMA ve UDMA gibi monomerler içermesi yanında çözücü nitelikte farklı monomerler solventler içermesi ve bu bileşenlerin birbiri ile olan etkileşimlerinin daha fazla sitotoksik etki oluşturabileceği düşünülmektedir. Ratanasathien ve ark., dentin bağlayıcıların içinde var olan farklı reçinelerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin sitotoksiteyi değiştirebileceğini belirtmişlerdir (24,155). Dentin bağlayıcı sistemlerin bileşimindeki her bir monomerin konsantrasyonu toksisiteyi etkiler. Diğer yandan dentin bağlayıcı sistemlerin bileşimini oluşturan çeşitli monomerler arasında üç tip etkileşim olacağı belirtilmiştir. Bu etkileşimler monomerlerin birbirlerinin etkisini arttırma (sinerjistik etki), her monomerin etkilerinin birbirine eklenmesi (ilave etki) ve monomerlerin birbirlerinin etkisini azaltması (antagonist etki) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu etkilerin bileşimdeki monomerlerin konsantrasyonundan etkileneceği bildirilmiştir. Ratanashien ve ark. 24 saatte tüm farklı monomer bileşimleri arasında antagonist etkinin sinerjistik ve ilave etkiden daha baskın olduğunu diğer yandan 72 saatte antagonist etkinin azaldığını sinerjik etkinin arttığını bu etkinin UDMA ve TEGDMA bileşiminde çok belirgin olduğunu saptamışlardır. HEMA/Bis-GMA ve Bis GMA/TEGDMA bileşimlerin 24 ve 72 saatlik zaman aralıklarında birbirleri arasındaki etkileşimlerinin UDMA ve TEGDMA bileşimine benzer olduğu saptanmıştır.(155). Dental materyallerden salınan bileşenler dokuda bir reaksiyona neden olurlar. Doku reaksiyonunun materyalin

konsantrasyonuna, etki süresine ve dokunun bu bileşene karşı verdiği yanıtı bağlı olduğu bildirilmiştir (172). Hanks ve ark., iki farklı dentin bağlayıcı sistem ve içeriklerinin (Gluma/gluteraldehit, Scotchbond2/HEMA) BALB/3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Yüksek konsantrasyonda bu materyallerin mitokondride matriks enzimlerini değiştirdiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar gluteraldehitin HEMA'dan daha toksik olduğunu fakat iki bağlayıcı sisteminde benzer sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (12). Szep ve ark. yaptıkları çalışmada Bis-GMA ve HEMA içeriğine sahip Optibond Solo dentin bağlayıcı sistemin, Bis-GMA, UDMA ve HEMA içeriğine sahip Scotchbond 1 dentin bağlayıcı sistemden daha az sitotoksik olduğunu açıklamışlardır (28). Çalışmamızda kullanılan tüm dentin bağlayıcı sistemler HEMA içermektedir ancak bu materyaller HEMA'nın dışında da bir çok farklı bileşene sahiptir ve dolayısıyla bu materyaller farklı sitotoksik etkilere sahiptirler.

de Souza Costa ve ark., polimerize edilmeden uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin meydana getirdiği erken sitotoksik etkinin nedenini bu materyallerin içerdikleri asidik ajanlar olduğunu belirtmişlerdir. Test materyallerinin hücre kültürü içerisindeki medyumun rengini kırmızıdan sarıya dönüştürmesini materyallerin asidik içerikleriyle açıklamışlardır (25). Çalışmamızda benzer şekilde özellikle dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımları hücre kültür insert içerisindeki medyumunu kırmızı renkten sarı renge dönüştürmüştür. Çalışmamızda kullandığımız dentin bağlayıcı sistemlerin primer kısımlarının asidik içerikleri (Scotchbond Multi Purpose primer – polialkenoik asit; Protect Bond primer – fosfonik asit akrilat; AdheSE primer – reçine modifiye alkenoik asit) (Tablo1) 24 ve 72 saat sonunda görülen yüksek sitotoksik etkilerin bir nedeni olarak gösterilebilir.

Diğer yandan 24 ve 72 saat sonunda primer ve bonding kısımları birlikte uygulanan dentin bağlayıcıların hücre sayısına göre sitotoksik etkileri primer ve bond kısımları ayrı ayrı uygulanan dentin bağlayıcılar ile kıyaslandığında XP Bond'un anlamlı olarak primer kısımlar ile aynı sayıda hücre azalmasına neden olduğu ve sitotoksitesinin HEMA'dan daha fazla olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın bulgularını destekler şekilde Koulaouzidou ve ark. 3 farklı dentin bağlayıcı ajanın (Clearfil Tri-S, XP Bond, AdheSE) fibroblastlar üzerinde sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında hücre sayılarında en fazla azalmayı XP Bond'un neden olduğunu,

AdheSe dentin bağlayıcı sistemin ise neden olduğu hücre azalmasının çok az düzeyde ortaya çıktığını tespit etmişlerdir (46). Kanımızca XP bond'un daha fazla sitotoksik etki göstermesinde uygulanan diğer dentin bağlayıcılardan farklı olarak UDMA ve TEGDMA içeriğine sahip olması etkili olabilir. Sitotoksitenin reçineyi oluşturan bileşiklerin tipine ve bunların moleküler ağırlıklarına bağlı oldukları açıklanmıştır. HEMA'nın düşük moleküler ağırlığa sahip bir monomer olduğu ve UDMA, TEGDMA, Bis-GMA'dan daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Benzer bir şekilde yapılan bazı çalışmalarda Bis-GMA ve UDMA'nın fibroblastlar üzerinde çok güçlü toksik etki gösterdiği, HEMA ve TEGDMA'nın ise orta derecede toksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (155,173,174). Çalışmamızdaki bulgularla benzer şekilde Geurtsen ve ark., 5 farklı dentin bağlayıcı ajandan (Solobond Plus, Solist, Scotchbond Multipurpose, Syntac SC ve Prime & Bond 2.1) elde ettikleri özütün sitotoksitelerini inceledikleri çalışmalarında Solobond'un en fazla toksisite gösterdiğini ve bunu Scotchbond MP ve Syntac SC'nin izlediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar Solobond'un sitotoksik etkisini bu bondingden büyük miktarda salınan TEGDMA'ya bağlarken, Scotchbond MP ve Syntac SC'nin toksik etkisini de bu iki bondingden oldukça yüksek miktarda salınan HEMA'ya bağlamışlardır (26). Oliva ve ark., reçine modifiye cam iyonomer simanının toksik etkisinin nedeni olarak materyalden salınan HEMA'yı göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar medyum pH'sını 3 günlük materyal inkübasyonu sonunda 5.6 olarak tespit etmişler ve bunun nedeni olarak da materyalden salınan poliakrilik asit olduğunu belirtmişlerdir (175).

24 ve 72 saat sonunda hücre kültür insert testinde canlı hücre sayıları karşılaştırıldığında AdheSe'nin bond kısmının, Protect Bond'un hem bond hem primer kısmının süre artışıyla orantılı olarak anlamlı düzeyde sitotoksitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun dışında diğer materyallerde süre artışıyla orantılı olarak sitotoksik etkilerinde zamana bağlı olarak istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızın bulgularıyla uyum içinde Vahid ve ark polimerize edilmiş iki dentin bağlayıcı sistemin (Single Bond, Prime&Bond) farklı zaman aralıklarında (36-72 saat) insan monosit hücreleri canlılığı üzerinde etkinliğini inceledikleri çalışmalarında hücrelerin canlılığının zamanla bağlantılı olduğunu ve canlılığın zaman içerisinde azaldığını saptamışlardır (176). Diğer taraftan çalışmamızın bulgularından farklı olarak Clearfil Protect Bond'un sulandırılmış konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılık bulunmamıştır

(38). Bunun yanında bu çalışmada Protect Bond'un sulandırma oranı azaldıkça hücreler üzerinde sitotoksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu çalışmadan farklı olarak dentin bağlayıcıların primer kısımları sulandırılmadan, bonding kısımları ise polimerize edilerek uygulanmıştır. Dolayısıyla çalışmamızda örneklerden salınan sitotoksik ajanların yoğunluklarının daha fazla olacağı düşünülebilir. Diğer bir çalışmada çözünerek sulu ortama geçen %5-10 arasında bağlanmamış monomer oranının salındığı reçine bileşiğinin ağırlık olarak %2'sine eşit olduğu bildirilmiştir (177). Koliniotou-Koubia ve ark., dentin bağlayıcı sistemlerin etkisine maruz kalma süresi arttıkça daha güçlü sitotoksik etki gösterdiklerini ve daha uzun sürede toksik etkilerinin görülme sıklığının daha yüksek olduğunu açıklamışlardır (27). Çalışmamızda süre artışına bağlı olarak dentin bağlayıcıların sitotoksik etkilerindeki farklılıklar bu bağlayıcıların bileşimlerinden kaynaklanabilir. Ratanasathien ve ark. dentin bağlayıcı ajanlar içerisindeki farklı bileşenlerin birbirleri ile olan etkileşiminin sitotoksik etkiye değişiklikler meydana getirdiğini açıklamışlardır. Bu etkileşimler sonucu reçinenin tek başına meydana getirdiği sitotoksitenin, reçineyi oluşturan bileşenlerin toplam toksisitesinden daha fazla veya daha az olabileceğini açıklamışlardır. Ancak araştırmacılar dentin bağlayıcıların etkisine maruz kalma süresinin daha artmasıyla uygulanan reçinenin toksisitesindeki artışın daha olası olduğunu ifade etmişlerdir (155).

Diğer yandan Schedle ve ark., bonding ajanlardan salınan bileşenlerin toksik etkilerinin bu bileşenlerin hücreler üzerine uygulanmasından sonra azalmaya başladığı ve 6 hafta sonunda sitotoksik etkilerinde anlamlı bir farklılık gözlemediklerini bildirmişlerdir (178). Çalışmamızda HEMA insert içine sıvı olarak uygulanmasına rağmen 0.4µm porlardan sızarak medyuma yayıldığı ve ilk anda hücrelerde toksik bir etki meydana getirdiği düşünülebilir. Ayrıca materyallerden salınan stabil olmayan toksik bileşenler nedeniyle sitotoksitenin azalmasının göz ardı edilemeyeceği açıklanmıştır (179).

Çalışmamızda 24 saat sonunda dentin bariyer testinden elde edilen toplam hücre sayısı bulguları değerlendirildiğinde AdheSE'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde diğer bağlayıcı sistemlerden daha az sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer yandan Scotchbond MP'un ise Protect Bond dışında diğer dentin bağlayıcılardan anlamlı düzeyde daha fazla sitotoksite sergilediği bulunmuştur. Çalışmamızda 72 saat sonunda yine AdheSE'nin Protect Bond ve Xeno V dışında diğer dentin bağlayıcılardan

anlamalı olarak daha az sayıda hücre azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Diğer yandan XP Bond'un Scotchbond MP dışında diğer dentin bağlayıcılardan anlamalı olarak daha fazla sayıda hücre azalması sergilediği tespit edilmiştir.

Çalışmamız bulguları incelendiğinde bu en fazla etkiyi gösteren iki dentin bağlayıcı sistemin (XP Bond ve Scotchbond MP) etch&rinse dentin bağlayıcılar olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu materyaller dentine uygulanmadan önce üretici firma önerisi doğrultusunda asit uygulaması yapılmıştır. Bu nedenle smear tabakasının kalkması ve dentin kanallarının açığa çıkması dentin geçirgenliğini arttıracığından bu materyallerin yapısından salınan toksik bileşenlerin daha fazla sitotoksik etki göstermesi olasıdır. Smear tabakası dentin geçirgenliğini %86 'ya kadar azaltabilme potansiyeline sahiptir. Smear tabakasının difüzyonu sadece %25-30 oranında azalttığında, uygulanan materyalden salınan ürünlerin difüzyonu için dayanıklı bir bariyer oluşturmadığı gösterilmiştir (180). Diğer yandan her iki materyalin kimyasal yapısı incelendiğinde Scotchbond'un Bis-GMA içerdiği XP bond'un ise hem UDMA, hem de TEGDMA içerdiği bilinmektedir. Galler ve ark., değişen dentin kalınlıklarına göre farklı dentin bağlayıcıların (Syntac Classic, Prompt L-Pop ve Vitrebond) sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında Syntac Classic isimli dentin bağlayıcının hücre aktivitesini dentin kalınlığına bağlı olmadan hücre aktivitesinde anlamalı düzeyde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Vitrebond ve Prompt L pop test materyallerinde dentin kalınlığına bağlı olarak hücrel aktivitenin değiştiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar dentinin bir bariyer rolü oynadığını dentin kalınlığında artışla sitotoksitenin azaldığını ifade etmişler ve bu etkinin materyalle bağlantılı olarak ortaya çıktığını ifade etmişlerdir (36). Çalışmamızın bulgularını destekler şekilde Vajrabhaya ve ark., dentin bariyer test düzeneği kullanarak 4 farklı dentin bağlayıcı ajanı (Syntac Single Component, Prime and Bond 2.1, Single Bond, One Up Bond F) kullandıkları çalışmalarında total etch bağlayıcı sistemlerin self etch bağlayıcı sistemlerden daha toksik olduğunu belirtmişlerdir (34). Demirci ark., uygulanan farklı bonding sistemlerin (Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, AdheSE, Excite) sitotoksik etkilerinin negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamalı bir fark tespit etmemişlerdir (45). Diğer yandan çalışmamızda AdheSE dentin bağlayıcı sistem dışındaki diğer dentin bağlayıcılar negatif kontrol grubundan anlamalı düzeyde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Bu farklılık da çalışmamızda kullanılan hücre tipinin, dentin test düzeneğinin farklı olması ve araştırmamızda sığır dentin diskleri yerine insan üçüncü molar dişlerinden elde

edilen dentin disklerinin kullanılması rol oynayabilir. Bunun yanında self etch dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerinin dentin bariyer test yöntemi ile incelendiği bir çalışmada Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond ve Xeno III dentin bağlayıcı sistemlerin odontoblast benzeri hücrelerde karşılaştırılabilir düzeyde toksik etki oluşturduğu ancak sitotoksik etki açısından aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmediği açıklanmıştır (47). Araştırmacılar adeziv materyallerin toksisitesini bunların kimyasal yapılarına ve pulpaya ulaşan bileşenlerin konsantrasyonlarına bağlı olduğunu açıklamışlardır. Diğer yandan smear tabakasını ve komşu dentini demineralize etme kapasitelerinin sitotoksik etkileriyle bir bağlantılarının olmadığını belirtmişlerdir. Hidrofilik monomer HEMA ve TEGDMA dentinden difüze olarak pulpada milimolar düzeyinde yüksek konsantrasyona ulaşabildiği bildirilmiştir. Bu difüzyon oranı, kalan dentin kalınlığının azalması özellikle 1mm altına inmesi veya dentin dokusunun asitlenmesi ile artabildiği açıklanmıştır (170). Dolayısıyla dentin bağlayıcı sistemlerden salınan HEMA'nın pulpada 1.5-8 mmol/L düzeyine ulaşabildiği belirtilmiştir. Diğer taraftan pulpaya ulaşan TEGDMA konsantrasyonu 4 mmol/L düzeyinde olduğu ve bu konsantrasyonların pulpaya zarar verecek düzeyde olduğu ileri sürülmüştür (16,181,182).

24 ve 72 saat sonunda dentin bariyer hücre kültürü testinde canlı hücre sayıları karşılaştırıldığında uygulanan tüm dentin bağlayıcıların sitotoksitelerinin zamana bağlı olarak arttığı, bu artış Xeno V ve XP Bond isimli bağlayıcılarda istatistiksel anlamlılık göstermişlerdir. Bouillaguet ve ark., *in vitro* 4 farklı dentin bağlayıcı ajanı (Aelitebond, Optibond, Scotchbond Multi Purpose ve Prisma Universal Bond 3) dentin üzerine uygulandıktan sonra 24 saatlik aralıklarla topladıkları medyumların sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında bu test materyallerinin erken zaman aralıklarında sitotoksitelerinin daha yüksek olduğu geç aralıklarda ise sitotoksitenin azaldığı bulunmuş ancak hücre metabolizması üzerinde oluşan baskılayıcı etkinin geç evrelerde dahi (160saat) kalıcı olduğu bulunmuştur (23). Ancak bu çalışmada uygulanan dentin bağlayıcılardan medyuma geçen toksik bileşenler her 24 saatte bir medyumla birlikte alındığı için uzun dönem sonunda medyuma geçen toksik miktar azalmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızın bulgularını destekler şekilde uyguladığımız dentin bağlayıcılardan medyuma geçen toksik bileşenler zaman içinde birikerek sitotoksik etkide artışa neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Yasuda ve ark., tek aşamalı beş dentin bonding ajanının (AQ Bond Plus, Clearfil Tri-S Bond, Absolute, G Bond ve Adper Prompt) insan pulpa hücreleri ve odontoblast benzeri hücrelerinde sitotoksitelerini inceledikleri çalışmalarında polimerize edilerek uygulanan örneklerin polimerize edilmeden uygulanan örneklerden 2%- 65% arasında daha az sitotoksik etki gösterdiklerini saptamışlardır. Araştırmacılar uygulanan bu dentin bonding ajanların sitotoksitelerinin zamana bağlı olarak ortaya çıktığını ve hücre canlılığının 72 saat sonunda 24 saat sonunda görülen canlılık oranlarından 2% ile 46% daha az olduğunu tespit etmişlerdir (43). Reichl ve ark., yaptıkları bir çalışmada 24 ve 48 saat sonunda en fazla sitotoksik etkiyi Bis-GMA'nın gösterdiğini bu etkiyi sırasıyla UDMA ve TEGDMA'nın izlediğini belirtmişlerdir (183).

Hücre kültür insertlerine test materyalleri uygulandıktan 24 saat sonra primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcıların apoptoz oranlarına göre etkileri kıyaslandığında primer kısımlarının sitotoksitesinin bonding kısımlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 72 saat sonunda ise Protect Bond primer dışında diğer primer kısımlarının aynı etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Hücre kültür insert içine primer kısımları sıvı (polimerize edilmeden) ve bond kısımları polimerize edilerek uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin apoptoz oranları (%) incelendiğinde 72 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en fazla apoptozun Scotchbond MP primer ve Protect Bond primer kısmında tespit edilmiştir. 72 saat sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en az apoptoz oranı Scotchbond MP bond kısmında gözlenmiştir. 24 ve 72 saat sonunda hücre kültür insert testinde apoptoz oranları karşılaştırıldığında Scotchbond MP primer dışında tüm test materyallerinin süre artışıyla orantılı olarak apoptoz oranlarının arttığı, XP Bond dışında bu artışın anlamlılık sergilediği bulunmuştur.

Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri farklı iki süreç şeklinde gerçekleşir dolayısıyla bu iki ölüm şekli biyolojik açıdan önemlidir. Eğer apoptoza neden olan herhangi bir biyomateryal dokuda enflamasyon meydana getirmez veya küçük bir iltihabi yanıt oluşturursa bu materyalin doku ile uyumunun daha kolay olabileceği bildirilmiştir. Biyomateryal nekrotik hücre ölümüne neden olur ise daha sonra meydana gelen enflamasyon şiddetli doku reaksiyonuyla sonuçlanabilir (184)

Mantellini ve ark., pulpa hücrelerinin dentin bağlayıcıların bileşenleri ile temas etmesi sonucu hücrelerin yuvarlaklaştığını ve hücre kültür yüzeyinden ayrıldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar hücre ölümünün nekroz yerine apoptozdan kaynaklandığında bu olayın gerçekleştiğini ifade etmişlerdir (147). Polimerize olmamış veya az polimerize olmuş reçine ile ilk birkaç saat içerisinde temas etmiş hücrelerin propidiumiyodid tarafından boyanması bu hücrelerin G₁ fazına geçemediğini ve apoptoza doğru gittiğini göstermektedir. (185). Apoptozun erken evrelerinde fosfatidilserin hücre sitoplazmasından hücre zarının dış yüzeyine doğru yer değiştirir. Anneksin V hücrenin dış yüzeyine yer değiştirmiş olan bu fosfatidilserine yüksek oranda bağlanma eğilimine sahiptir. Bu nedenle apoptoza giden hücrelerin belirlenmesinde kullanılır(147, 158). Vermes ve ark., hücrelerin Anneksin V ve PI ile boyanması sonrası flow sitometri ile yapılan analizde apoptoza uğrayan ve nekroz olan hücreler arasında net bir ayırım yapılabildiğini belirtmişlerdir (157).

Apoptoz sırasında hücre morfolojisindeki meydana gelen ultrastrüktürel değişiklikler DNA kırılmalarını içermektedir. DNA kırılmalarının onarımı mümkün olmadığı için hücrede ölüm gerçekleşir. Bir çok organizmada çekirdek endonukleaza bağlı endojen Ca ve Mg aktivasyonundan dolayı bu DNA kırılmalarının görüldüğü ifade edilmektedir (38).

Mantellini ve ark., yaptıkları çalışmada bir dentin bağlayıcının (Single Bond) apoptoza neden olduğunu ya da hücrelerin yaşam döngüsünü engellediğini, bu olayın dentin üretiminde ve pulpa iyileşmesinde önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar üç farklı polimerizasyon süresinde (0 sn, 10 sn,40 sn) hücre yanıtları arasında belirgin farklılıklar olduğunu, polimerize olmamış ve az polimerize olmuş adeziv reçinenin tüm hücre tiplerinde çok hızlı apoptoza neden olduğunu, tam polimerize edilmiş dentin bağlayıcı ise sadece makrofajlarda apoptoz meydana getirdiğini bildirmişlerdir (147). Ayrıca apoptotik hücre oranının dentin bağlayıcının polimerizasyon derecesi ile bağlantılı olduğunu açıklamıştır. Bulgularımızı destekler şekilde çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin polimerize edilmeden uygulanan primer kısımlarının daha fazla apoptoza neden olduğu görülmekte bu olayda primerlerin sıvı olarak uygulanması yanında, kimyasal yapılarının da birbirinden farklı olması apoptoz sonuçlarındaki farklılıkta rol oynamaktadır. Diğer taraftan çok aşamalı primer adeziv sistemin kültür edilmiş primer insan dişeti hücreleri üzerinde apoptoz etkilerinin

incelendiği çalışmada uygulanan bu dentin bağlayıcıların apoptozu uyarma kapasitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar Clearfil SE Bond'un hafif ya da yavaş apoptoz oluşturan bir adeziv sistem olduğunu, yalnız hücre proliferasyonunun bozulduğunu bu hücrelerin DNA kırılmaları gösterdiğini belirtmişlerdir. Diğer yandan FL Bond'un ise çok güçlü ve hızlı apoptoz oluşturan bir sistem olduğunu hücrelerde apoptoza bağlı morfolik değişikliklerin geç evrelerde ortaya çıkan morfolojik görünümlere (membran şişmesi, yuvarlaklaşması) neden olduğunu, bu değişikliklerin bonding ajanının etkisine maruz kalan hücrelerde 4 saat sonra ortaya çıktığını ve tüm hücrelerin olaydan etkilendiğini ifade etmişlerdir (38). Çalışmamızın bulgularını destekler şekilde XP Bond uygulanan hücrelerde çok erken apoptotik morfoloji gözlemlendiği bildirilmiştir (46)

Pranjpe ve ark., 12-18 saat yüksek konsantrasyonda uygulanan HEMA'nın daha düşük konsantrasyonda uygulanan HEMA gruplarına göre daha fazla sayıda hücrede erken apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar uygulanan HEMA'nın konsantrasyona bağlı apoptoz oranını arttırdığını belirtmişler ve apoptozun nedenini HEMA'nın hücrelerin yüzey yapısını değiştirmesi ya da apoptoz ile ilgili genleri aktive etmesi olarak açıklamışlardır (186). Çalışmamızın bulgularını destekler şekilde 24 saat sonunda HEMA'nın sulandırılmadan uygulanmasına bağlı olarak yüksek oranda apoptoz saptanmasının HEMA'nın konsantrasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Demirci ve ark. farklı dentin bağlayıcıların pulpa hücreleri üzerinde ROS üretimini ölçerek sitotoksitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında uygulanan tüm dentin bağlayıcıların beş kata kadar ROS üretimini arttırdığını ve bu artışın dentin bağlayıcıların konsantrasyonlarının artışıyla bağlantılı olduğunu açıklamışlardır. Bu yolla monomerlerin neden olduğu ROS üretiminin hücrelerde apoptoz aracılığı ile hücre ölümünü uyardığı ve apoptozun hücrelerin dentin bağlayıcılara maruz kaldıktan sonra görüldüğünü açıklanmıştır (45).

Çalışmamızda dentin bariyer test düzeneği kullanılarak test edilen dentin bağlayıcılarına ait 24 ve 72 saat sonunda elde edilen apoptoz oranları incelendiğinde 24 saat sonunda sırasıyla Scotchbond MP, XP Bond en fazla bulunmuştur ancak bu farklılık istatistiksel düzeyde anlamlılık göstermemiştir. Diğer yandan 24 saat sonunda AdheSE hücrelerde diğer tüm dentin bağlayıcı sistemlerden daha az apoptoza neden olmuştur. 72 saat sonunda ise Protect Bond'a ait apoptoz oranı diğer tüm dentin

bağlayıcılardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az bulunmuştur. Çalışmamızda 24 ve 72 saat sonunda apoptoz oranları kıyaslandığında Protect Bond dışında diğer tüm dentin bağlayıcıların hücreler üzerindeki apoptoz etkilerinin zaman artışıyla bağlantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Dentin bonding ajanların toksisitesi spesifik hücre döngü fazında hücrelerin aktivasyonlarında yavaşlamayla bağlantılıdır. Reçine bileşiklerin monomer konsantrasyonuna bağlı olarak genetik materyal üzerinde toksik etki gösterdiği ve hücreleri G0-G1 veya G2-M fazında duraklattığı gösterilmiştir. Hücre döngüsündeki gecikmenin uyarılması DNA hasarının tamir edilmesi için hücreye daha fazla zaman kazandırır ve gen mutasyonunu önleyebilir. Bununla birlikte toksik ajanlara uzun süre maruz kalınması ve hücre döngüsündeki gecikme hücre ölümüne ve apoptoza yol açabilir (181,187) Çalışmamızın bulgularını destekler şekilde araştırmamızda uygulanan dentin bağlayıcılarına ait apoptoz oranının artması yukarıda açıklanan faktörlerin etkisini düşündürebilir.

Dentine asit uygulaması sonrası bağlayıcı sistem uygulanmasını takiben iki olgunun meydana geldiği açıklanmıştır. İlk olarak monomer daha yüksek oranlarda dentin kanallarından difüze olur, ikinci olarak dentinin asitlenmesi dentin lenfi sıvısı nedeniyle ıslak bir ortamda gerçekleşir ve asitleme sonrası dentin kanallarının ağızlarının açılmasına bağlı olarak ortam nemi arttığından bağlayıcı sistemlerin polimerizasyon reaksiyonu azalabilir, polimerize olmamış monomerler çözünebilir ve dentinden diffüze olarak dentin altındaki hücreler etkilenebilir (188). Çalışmamızda iki dentin bağlayıcı sistemin (XP Bond ve Scotchbond) etch&rinse dentin bağlayıcılar olması nedeniyle dentine asit uygulanması nedeniyle dentin geçirgenliğinin artması bu materyallerden kaynaklı apoptoza neden olacağı düşünülebilir.

Yeh ve ark., beş güncel dentin bonding ajanın (Futurabond NR, Single Bond2, Prime&Bond NT, Solobond M, Xeno III) Çin hamster over (CHO-K1) hücre döngüsünün bozulması üzerine etkilerini inceleyerek yaptıkları çalışmalarında tüm dentin bonding ajanların yüksek konsantrasyonlarda apoptoza neden olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar Solobond M'nin 1:4000 (v/v) olarak sulandırılmış solusyonlarında belirgin bir apoptoz (67%) kaydetmişlerdir. Diğer yandan Futurabond NR için 1:2000 (v/v) olarak sulandırılmış solusyonlarında belirgin apoptoz izlemişlerdir. Single Bond 2 ve Prime&Bond NT için apoptoza neden olan sulandırma oranının 1:4000 (v/v) olarak saptamışlardır. Benzer şekilde Xeno III'ün 1:4000 oranında

sulandırılmış solüsyonunun apoptoz oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (49). Bu çalışmanın bulgularıyla uyum içinde çalışmamızda da dentin üzerine uygulanan dentin bağlayıcıların belirgin bir apoptoz sergilemesi bu bağlayıcılardan salınan bileşenlerin dentin kanallarından geçtikten sonra medyuma geçmesi ve medyum içinde sitotoksik bir etki oluşturacak konsantrasyona ulaştığını göstermektedir. Spagnuola ve ark., tek aşamada uygulanan (Optibond Solo, Scotchbond One) iki bağlayıcı sistemin halojen ve LED ışık kaynakları kullanarak polimerize edildikten sonra sitotoksitelerini inceledikleri çalışmalarında LED ışık kaynağı ile polimerizasyonun halojen ışık kaynağına oranla hücrelerde daha fazla ROS üretimine ve dolayısıyla sitotoksik etkiye neden olduğunu açıklamışlardır (35).

Hücre kültür insertler kullanılarak dentin bağlayıcılar uygulandıktan sonra BrDU ile DNA sentezi ve dolayısıyla hücre proliferasyonu işaretlenen hücrelerin % oranları incelendiğinde 24 ve 72 saat sonunda primer ve bonding kısımları ayrı olarak uygulanan dentin bağlayıcılarda primer kısımlarının bonding kısımlarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla hücre proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Diğer yandan 24 saat sonunda AdheSE bond uygulanan insert örneklerinde, 72 saat sonunda ise Scotchbond MP grubunda diğer tüm test materyallerinden anlamlı düzeyde daha fazla hücre proliferasyonu saptanmıştır. 24 ve 72 saat sonunda hücre kültür insert testinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında süreye bağlı olarak uygulanan dentin bağlayıcıların hücre döngüsünün S fazına dolayısıyla hücre proliferasyonuna etkisi incelendiğinde insert testinde Protect Bond'un bond kısmı dışında diğer test materyallerinin proliferasyon olmuş hücre sayısının süre artışıyla anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. 24 saatte HEMA'nın etkisinin primerleri izlediği ancak 72 saat sonunda bu etkinin azaldığı tespit edilmiştir.

Dentin bariyer test düzeneği kullanılarak BrDu ile DNA sentezi ve dolayısıyla hücre proliferasyonu işaretlenen hücrelerin % oranları incelendiğinde 24 saat sonunda Scotchbond MP ve Protect Bond, 72 saat sonunda ise XP Bond ve Protect Bond diğer dentin bağlayıcılardan istatistiksel düzeyde anlamlı olarak daha az Brdu ile işaretlenmiş hücre oranı sergilemişlerdir. 24 ve 72 saat sonunda hücre kültür dentin bariyer testinden elde edilen sonuçlar kıyaslandığında dentin bağlayıcıların hücre döngüsünün S fazına dolayısıyla hücre proliferasyonuna etkisi incelendiğinde XP Bond dışında diğer tüm

dentin bağlayıcılarda proliferen olmuş hücre sayısının süre artışıyla anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.

H^3 Timidin kullanılarak yeni sentezlenmiş DNA'nın radyoaktif işaretlenmesi yerine yeni sentezlenmiş DNA'nın BrDU ile radyoaktif olmayan işaretleme yöntemi de kullanılmaktadır. Çoğalabilen canlı hücreler DNA sentezi yapabilir ve hücre döngüsü sırasında S fazında BrDU ile boyanırlar. Proliferasyona uğrayan hücrelerin BrDU ile boyanması BrDU'nun doku ile temas süresine ve dokunun proliferasyon oranına bağlı olduğu, farklı organizma ve hücre tiplerinde S fazı görülme süresi birkaç dakikadan birkaç saate kadar uzayabildiği açıklanmıştır (156).

Koulaouzidou ve ark., üç farklı dentin bağlayıcı ajanın (XP Bond, AdheSE, Clearfil S3) hücre canlılığı, proliferasyonu ve kültür edilmiş hücrelerin hücre döngüsü üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında total etch bağlayıcı sistemin S fazında DNA hasarına neden olduğu ve hücre döngüsünü durdurduğu diğer yandan self etch bağlayıcı sistemlerin ise hücre döngüsünü etkilemediklerini saptamışlardır. Araştırmacılar uygulanan dentin bağlayıcının hücre döngüsüne olan etkisini konsantrasyonları ile bağlantılı olduğunu ifade etmişlerdir (46). Benzer şekilde çalışmamızda da en az hücre proliferasyon oranı XP Bond uygulanan örneklerde tespit edilmiş ve çalışmamızın bulgularıyla uyumluluk göstermektedir.

Hücre döngüsünün farklı fazlarında hücre döngüsünde meydana gelen duraklamalar DNA hasarının onarılmasını veya programlanmış hücre ölümünün başlatılmasını sağlar. Hücre döngüsündeki her bir fazdaki hücrelerin yüzde oranları hücre döngüsü deney sonuçlarını gösterir. Ancak özellikle DNA sentezi üzerindeki (ör: proliferasyon oranı) etki bilinmiyorsa yalnızca hücre döngüsü deneylerinden bir sonuca varmak zordur. Örneğin S fazı kısmındaki artış hücre proliferasyonundaki artışı veya S fazındaki duraklamayı gösterebilir. Bu nedenle araştırmacılar BrDU yöntemi ile hücresel proliferasyon göstergesi olan DNA sentez oranını tahmin etmektedirler (46).

Reichl ve ark., kompozitlerden salınan monomerleri ve amalgamın civa içeriğini insan fibroblastları üzerinde sitotoksitelerini inceledikleri çalışmalarında TEGDMA ve Bis-GMA uygulanan grupta BrDU ile işaretlenen hücre oranının anlamlı bir şekilde azaldığını bulmuşlardır. Diğer yandan HgCl₂ uygulanan grupta zamanla bağlantılı BrDU ile işaretlenen hücre oranının anlamlı bir şekilde artış saptamışlardır. Araştırmacılar salınan monomerlerin artan toksisitelerini 24 saat sonunda

HEMA<TEGDMA<UDMA<BisGMA<Me-HgCl<HgCL₂, 72 saat sonunda HEMA<TEGDMA<UDMA<BisGMA=HgCL₂<Me-HgCl şeklinde sıralamışlardır (183). HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın yüksek yüksek toksisitesi TEGDMA'nın yüzey aktif madde gibi davranarak hücre membranındaki lipit tabakası ile etkileşime girme potansiyeli ve/veya TEGDMA'nın lipit peroksidasyonuna neden olma potansiyeli ile açıklanmıştır (18). Ayrıca TEGDMA'nın HEMA'ya oranla yağ dokusunda yüksek çözünülebilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir (189). HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın yüksek toksisitesinin diğer bir nedeni de glutatyon ile etkileşime girmesi olarak açıklanmıştır. Çalışmamızda BrDU ile işaretlenmiş hücre oranları incelendiğinde hem insert hem de dentin bariyer testinde XP Bond polimerize edilerek uygulanmasına rağmen polimerize edilmeden uygulanan primerlere benzer sitotoksik etki sergilemiştir. Bu etkinin çalışmamızda uygulanan dentin bağlayıcılar içinde TEGDMA içeriğine sahip tek dentin bonding olmasından kaynaklanabilir. Bunun yanında XP Bond'un içeriğindeki PENTA, UDMA ve HEMA monomerlerinin de BrDU ile işaretlenmiş hücre sayısının daha az olmasında etkileri olabileceği düşünülebilir.

Li ve ark., insan pulpa hücreleri üzerinde flow sitometri kullanarak yaptıkları çalışmalarında 24 saat sonunda HEMA'nın hücre büyümesini inhibe ettiğini ve hücre döngüsünü G₂ fazında durdurduğunu bildirmişlerdir (190)

Dentin bariyer testinde BrDU ile işaretlenmiş hücre oranı sonuçları ile çalışmamızda kullandığımız diğer sitotoksite belirleme yöntemleri ile elde ettiğimiz bulgular arasında uyumluluk görülmektedir. Benzer şekilde en fazla DNA sentezi inhibisyonuna neden olan her iki bağlayıcı sisteminde etch&rinse sistem grubunda yer aldığı görülmektedir.

Çalışmamızda çeşitli dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen bulguları değerlendirildiğinde insert içine uygulanan test materyallerinin etkilerinin dentin bariyerlere uygulanan materyallerin oluşturduğu etkilerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu etkiler hücrelerin birbiri ile olan bağlantılarının kopması, hücrelerin sitoplazmalarının parçalı bir şekilde görülmesi, hücrelerin şekil değiştirerek nodül (yuvarlak) halini alması ve yer yer hücre yoğunluğunun azalması gibi değişen şiddette etkiler izlenmiştir. Benzer şekilde Lanza ve ark. çeşitli bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerini dentin bariyer test düzeneği

kullanarak SEM ile inceledikleri çalışmalarında Adper Promp L Pop bağlayıcı sistemin uygulandığı grupta dentin üzerinde bazı hücrelerin nodül şeklinde bir araya toplandıklarını, yuvarlak şekil aldıklarını, aynı zamanda az sayıda uzantı gösteren sitoplazmik mebrana sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar Clearfil Protect Bond grubunda da hücre sayısında azalma ve şekil değiştirme saptamışlardır. Bu hücrelerden sadece bazılarının belirgin sitoplazmik membran sergiledikleri belirtilmiştir (47). De Souza ve ark., nın 3 dentin bağlayıcı sistemin sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında araştırmamızda kullanılan bağlayıcılardan farklı dentin bondingler kullanmalarına rağmen elde edilen SEM bulgularının çalışmamızın SEM sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği izlenmiştir. Araştırmacılar Syntac Sprint ile temas halindeki hücrelerin az sayıda hücre uzantısı gösterdiklerini, sitoplazmik membranın yer yer yüzeye tutunduğunu belirtmişlerdir. Single Bond veya Prime Bond 2.1'in etkilediği hücrelerin ise yüzeye tutunmak için sitoplazmik membran üzerinde hücresel uzantı göstermediğini ve hücrelerin yüzeyinde var olan uzantıların çok azının yüzeye tutunduğunu göstermişlerdir (25).

Sonuçlar:

1. Çalışmamızda dentin bağlayıcı sistemlerin hücre kültür insertleri içine sıvı olarak (polimerize edilmeden) uygulanan primer kısımları polimerize edilerek uygulanan bonding kısımlarından genellikle daha fazla sitotoksik etki göstermiştir.
2. Dentin bariyer test metodu ile uygulanan dentin bağlayıcıların sitotoksik sonuçlarına göre etch&rinse bağlayıcı sistemlerin self etch sistemlerden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur.
3. Hücrelerin sitotoksik etkiye karşı geliştirdiği farklı yanıtları saptamak amacı ile uygulanan değişik sitotoksik değerlendirme metotları sonuçlarına göre dentin bağlayıcıların toksik etkilerinde çeşitlilik görülebilir.
4. Klinikte uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin içerdiği farklı bileşenler sitotoksik yanıtta çeşitlilik oluşturabilir
5. Çalışmamızda hücre kültür insertlerine test materyalleri uygulandıktan 24 saat sonra toplam hücre sayısı bulgularına göre AdheSE'nin bond kısmının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en az sitotoksik etki gösteren test materyali olduğu tespit edilmiştir.
6. Hücre kültür insert testinde 24 ve 72 saat sonunda test materyallerin neden olduğu apoptotik etkiler incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en az apoptoz oranı Scotchbond MP bond kısmında gözlenmiştir.
7. Dentin bariyer testinde 24 saat sonunda AdheSE, 72 saat sonunda ise Protect Bond istatistiksel olarak anlamlı düzeyde en az apoptotik etkiyi gösteren dentin bağlayıcı sistemler olduğu tespit edilmiştir.
8. Hücre kültür insert testinde BrDU ile işaretlenmiş hücre oranlarına göre 24 saat sonunda AdheSE bond uygulanan insert örneklerinde, 72 saat sonunda ise Scotchbond MP grubunda anlamlı düzeyde daha fazla hücre proliferasyonu saptanmıştır
9. Dentin bariyer test düzeneği kullanılarak BrDU ile işaretlenen hücre oranlarına göre 24 ve 72 saat sonunda AdheSE dentin bağlayıcı sistem istatistiksel düzeyde anlamlı olarak en fazla hücre proliferasyon oranı sergilemiştir.

10. Çalışmamızda uygulanan dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerinin SEM incelemesi sonucu hücrelerin morfolojilerinde değişiklik, birbiriyle bağlantılarında ve sayılarında azalma tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. *Fundamentals of Operative Dentistry. A Contemporary Approach.* Van Meerbeek, B., Inoue, S., Perdigão, J., Lambrechts, P., Vanherle, G. Enamel and dental adhesion. In Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW, Dos Santos JJ. *Illinois, Quintessence Publishing Co, Ltd.. 2001* s: 178–235.
2. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; **25**:441-58.
3. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982;**16**(3):265-73.
4. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 2001;**86**(2):203–9.
5. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater.* 1996;**12**:186–193.
6. Schmalz G, Dörthe Arenholt-Bindslev. *Biocompatibility of Dental Materials.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009 p:13-40
7. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endodon* 1999; **25**:114–7
8. Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998; **11**:55–63.
9. Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the “total etch” technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998; **11**:45–54.
10. Gwinnett AJ, Tay F. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent* 1998; **11**:35–44.
11. Hebling J, Giro EMA, de Souza Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endodon* 1999; **25**:676–82.

12. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin-bonding agents in vitro. *J Endodon* 1992;**18**: 589–96.
13. Lefebvre CA, Schuster GS, Rueggeberg FA, Tamareselvy K, Knoernschild KL Response of oral epithelial cells to dental resin components. *J Biomater Sci Polym Ed* 1996;**7**: 965–976
14. Geurtsen W, Leyhausen G Chemical–biological interaction of the resin monomer triethyleneglycoldimetacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 2001;**80**:2046–205
15. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 1999;**48**:277–288
16. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res* 2002;**81**:265–26
17. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 2001;**17**:333–339
18. Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, Hickel R, Forth W Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 2001;**22**:317–322
19. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W Effects of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Sci* 2002; **63**:746–751
20. Chang H-H, Guo M-K, Kasten FH, Chang M-C, Huang G-F, Wang Y-L, Wang R-S, Jeng J-H Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005;**26**:745–753
21. Dumsha TC, Sydiskis RJ. Cytotoxicity testing of a dentin bonding system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985 Jun;**59**(6):637-41.
22. Meryon SD, Brook AM. In vitro cytotoxicity of three dentine bonding agents. *J Dent*. 1989;**17**(6):279-83.

23. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil*. 1998;**25(1)**:45-51.
24. Hashieh I, Cosset A, Franquin J, Camps J. In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J Endod* 1999; **25**: 89-92
25. Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*. 1999;**15(6)**:434-41.
26. Geurtsen W, Spahl W, Müller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res*. 1999;**48(6)**:772-7.
27. Koliniotou-Koubia E, Dionysopoulos P, Koulaouzidou EA, Kortsaris AH, Papadogiannis Y. In vitro cytotoxicity of six dentin bonding agents. *J Oral Rehabil* 2001;**28(10)**:971-5
28. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives--in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;**63(1)**:53-60
29. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int*. 2001 ;**32(3)**:211-20.
30. Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Hong CY, Hsieh CC, Jeng JH. The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin-bonding agent. *Oper Dent*. 2001;**26(5)**:505-10.
31. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J* 2002;**35(11)**:905-9
32. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 2002;**28(3)**:188-92
33. Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent*. 2003;**31(3)**:223-9
34. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent*. 2003;**28(4)**:440-4.

35. Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Investig.* 2004;**8(2)**:81-5.
36. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod* 2005;**31(5)**:396-9
37. About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin JC. Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dent Mater.* 2005;**21(2)**:156-63.
38. Gürpınar OA, Beklen A, Hukkanen M, Cehreli ZC, Onur MA, Konttinen YT. Effects of two multi-step self-etch primer/adhesives on apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;**79(2)**:435-40.
39. Koulaouzidou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;**84(1)**:271-6
40. Ergün G, Eğilmez F, Uçtaşı MB, Yılmaz S. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *Int Endod J* 2007;**40(3)**:216-23
41. Grobler SR, Oliver A, Moodley D, Van Wyk Kotze TJ. Cytotoxicity of recent dentin bonding agents on mouse fibroblast cells. *Quintessence Int* 2008;**39(6)**:511-6.
42. Wiegand A, Buchholz K, Werner C, Attin T. In vitro cytotoxicity of different desensitizers under simulated pulpal flow conditions. *J Adhes Dent.* 2008;**10(3)**:227-32.
43. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil* 2008;**35(12)**:940-6
44. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Bosl C, Schmalz G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;**107(3)**:e86-90.

45. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008; **24(3)**:362-71.
46. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Yiannaki E, Palaghias G, Helvatjoglou-Antoniades M. Effects of dentin bonding agents on the cell cycle of fibroblasts. *J Endod* 2009; **35(2)**:275-9
47. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; **25(6)**:533-43.
48. Sigusch BW, Pflaum T, Völpe A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater.* 2009; **25(11)**:1446-52.
49. Yeh HW, Chang MC, Lin CP, Tseng WY, Chang HH, Wang TM, Chen YJ, Lin CC, Yang TT, Lin LD, Jeng JH. Comparative cytotoxicity of five current dentin bonding agents: role of cell cycle deregulation. *Acta Biomater.* 2009; **5(9)**:3404-10.
50. Zhou ZR, Zheng J. Tribology of dental materials: a review. *Journal of Applied Physics D: Applied Physics*, 2008; **41(11)**:1-22 (113001).
51. James Avery. *Oral Development and Histology*. 3rd edition. New York, Thieme, 2002, section 3 153-225
52. Sturdevant JR. Clinical Significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology and Occlusion, In: Theodore M. Robertson editor *Art and Science of Operative Dentistry*. 5th edition, St. Louis, Mosby, 2006. pp. 15–63
53. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993; **4**:679–728.
54. Torneck CD. Dentin-pulp complex. In: Ten Cate AR (ed) *Oral Histology. Development, Structure and Function*. 4th edition. Mosby, St. Louis, 1994. pp. 169–217
55. Knutsson G, Jontell M, Bergenholz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. *Arch Oral Biol.* 1994 Mar; **39(3)**:185-90.

56. Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1991;**36(10)**:775-8.
57. Mjör IA. *Pulp-Dentin Biology In Restorative Dentistry*. Quintessence Books, 2002.
58. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Weihs TP. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol.* 1996 Jan; **41(1)**:9-13.
59. Pashley, DH. Dentin: a dynamic substrate- a review. *Scanning Microscopy.* 1989;**3**:161-176
60. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976;**21(6)**:355-62
61. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 2009;**20(1)**:3–16.
62. Ghazali FBC. Permeability of dentin. *Malaysian J Med Sci* 2003;**10(1)**:27–36.
63. Brannström M, Aström A. The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. *Int Dent J.* 1972;**22(2)**:219–27
64. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Homer JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int.* 1993;**24(9)**:618–31
65. Pashley DH, Pashley EL, Carvalho RM, Tay FR. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dent Clin North Am.* 2002; **46**:211–245
66. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil.* 1994;**21(4)**:475–87.
67. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiological overview *J Dent Res.* 1985;**64**:613-20
68. Maroli S, Khea SC, Krell KV. Regional variation in permeability of young dentin. *Oper Dent.* 1992;**17**: 93–100
69. Rauschenbeger CR. Dentin permeability: the clinical ramifications. *Dent Clin North Am.* 1992;**36**: 527–42

70. Fogel HM, Marshall FJ, Pashley DH. Effects of distance from the pulp and thickness on the hydraulic conductance of human radicular dentin. *J Dent Res.*1988;**67**: 1381–85
71. Helal AS. Cavity surface interaction with resin-modified glass ionomer: surface morphology, interface adaptation, tooth demineralization and fluoride uptake. University of Iowa, 2002.
72. O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod.* 2000 Dec;**26**(12):739–43.
73. Pashley DH. Smear layer: Overview and structure. *Proc Finn Dent Soc* 1992;**88**(1): 215–24.
74. Pashley DH, Michelich V, Kehl T. Dentin permeability:effects of smear layer removal. *J Prosthet Dent*,1981; **46**: 531–537.
75. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent.*1984; **3**: 13–29.
76. Trowbridge H, Kim S, Suda H. Structure and functions of the dentin and pulp complex. 8th ed. *Pathways of the Pulp*.(s: 13-40), St.Louis: Mosby,2002.
77. Bayırlı G. Pulpanın Histolojisi ve Fizyolojisi In: *Diş Pulpası ve Ağrı*. İ.Ü. Basımevi ve film merkezi İstanbul. 1999: 41–94.
78. Alaçam T. Pulpa ve periapikal dokuların biyolojisi. *Endodonti* s: 17-44, Ankara: Barış Yayınları 2000
79. Okiji T. Pulp as a connective tissue. *Seltzer and Bender's Dental Pulp*.(s: 95-122), Chicago: Quintessence Pub. Co.2000
80. Ingle I. scitnododnE fo koob elgnI. ekceD .C.B,2002
81. Avery J. Dental pulp. *Essentials of Oral Histology and Embryology*.St. Louis: Mosby,1992
82. Stangel I, Ellis TH, Sacher E. Adhesion to tooth structure mediated by contemporary bonding systems. *Dent Clin North Am.* 2007 ;**51**(3):677-94
83. Dayangaç B. *Kompozit Resin Restorasyonlar*. Güneş Kitabevi 2000
84. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955;**34**(6):849–53.

85. Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res.* 1979;**58**:1364-1370
86. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 ;**88(2)**:558-78.
87. Söderholm KJ. Correlation of in vivo and in vitro performance of adhesive restorative materials: a report of the ASC MD156 Task Group on Test Methods for the Adhesion of Restorative Materials. *Dent Mater.* 1991; **7(2)**:74–83.
88. Schwartz RS, Summit JB, Robbins JW. *Fundamentals of Operative Dentistry.* Quintessence Books, 1996
89. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003 ;**28(3)**:215-35.
90. Di Renzo M, El Feninat F, Jimenez-Esquivel B. Adhesion to dentin: the role of cheical reactions in surface modification. *Can J Chem.* 1998;**76(1)**:1–6
91. Di Renzo M, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. A photoacoustic FTIRS study of the chemical modifications of human dentin surfaces: II. Deproteination. *Biomaterials.* 2001;**22(8)**:793–7.
92. Perdigão J, Swift EJ Jr, Lopes GC Effects of repeated use on bond strengths of one-bottle adhesives. *Quintessence Int.* 1999;**30(12)**:819–23.
93. Nishiyama N, Suzuki K, Takahashi K, Nemoto K The pKa effects of the carboxylic acid in N-methacryloyl-omega-amino acid on the demineralization and bond strengths to the teeth. *Biomaterials.* 2004;**25(23)**:5441–7
94. Duke ES. Adhesion and its application with restorative materials. *Dental Clinics of North America*, 1993;**37(3)**: 329–40
95. Perdigão J. New developments in dental adhesion. *Dent Clin North Am.* 2007;**51(2)**:333–57
96. McLean JW. Historical Overview :The pioneers of enamel and dentin bonding. In: Roulet J-F, Degrange M (eds). *Adhesion-The silent revolution in dentistry.* Chicago: Quintessence, 2000; 13-17.

97. Brudevold F, Buonocore M, Wileman W.A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. *J Dent Res.* 1956 ;**35(6)**:846-51.
98. Söderholm KJ. Dental adhesives how it all started and later evolved. *J Adhes Dent.* 2007;**9** Suppl 2:227-30.
99. Setcos JC, Staninec M, Wilson NH. The development of resin-bonding for amalgam restorations. *Br Dent J.* 1999;10;**186(7)**:328–32.
100. Swift EJ, Perdigao J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: A brief history and state of the art. *Quintessence Int.* 1995; **26(2)**: 95–110.
101. Kugel G, Ferrari M. The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc.* 2000;**131** Suppl:20S-25S.
102. Holderegger C, Paul SJ, Lüthy H, Schärer P. Bond strength of one-bottle dentin bonding agents on human dentin. *Am J Dent.* 1997;**10(2)**:71–6
103. Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, Inoue S, Peumans M, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2005;**84(2)**:183–8.
104. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent.* 2001;**(Suppl 6)**:119–44.
105. Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J.* 2005; **24(1)**:1–13.
106. Jacobsen T, Ma R, Soderholm KJ. Dentin bonding through interpenetrating network formation. *Transactions of the Academy of Dental Materials* 1994;**7**:45-52.
107. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater.* 1992;**8(2)**:125–30.
108. Fong W, Grunwald E. Acid dissociation in acetone-water mixtures: an anomalous medium effect when London dispersion forces are large. *J Phys Chem* 1969;**73(11)**:3909–12
109. Mohan B, Kandaswamy D. A confocal microscopic evaluation of resin-dentin interface using adhesive systems with three different solvents bonded

- to dry and moist dentin in vitro study. *Quintessence Int.* 2005;**36**(7–8):511–21.
110. Abate PF, Rodriguez VI, Maccchi RL. Evaporation of solvent in one bottle adhesives. *J Dent* 2000;**28**(6):437–40.
 111. Pashley DH, Agee KA, Nakajima M. Solvent induced dimensional changes in EDTA- demineralized dentin matrix. *J Biomed Mater Res.* 2001;**56**(2):273–81.
 112. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dent Mater.* 2001;**17**(2):178–83
 113. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005;**84**(2):118–32.
 114. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001;**17**(4):296–308.
 115. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005;**21**(10):895–910.
 116. Yoshida Y., Nagakane K., Fukuda R., Nakayama Y., Okazaki M., Shintani H., Inoue S., Tagawa Y., Suzuki K., J. De Munck, and B. Van Meerbeek. Comparative Study on Adhesive Performance of Functional Monomers. *J Dent Res.* 2004;**83**: 454–458.
 117. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res.* 2000; **79**(2):709–14.
 118. Schmalz G, Dörthe Arenholt-Bindslev. *Biocompatibility of Dental Materials*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009 p:1-11
 119. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials*. Mosby, 2006 p:97-125
 120. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001;**86**(2):203–9
 121. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-- advantages and limitations. *J Dent* 1994;22 Suppl 2:S6–11.

122. R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition*, 2005 John Wiley & Sons, Inc.
123. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*. Third edition. Humana Press
124. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;**12(3)**:E258-66.
125. Nicholson JW. The Chemistry of Medical and Dental Materials. *The Royal Society of Chemistry* 2002, p:186-195
126. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001;**2(1)**:91–95
127. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986;**10(9)**:995–8.
128. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003;**23**:499–508
129. Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol Toxicol*. 2001;**17(4–5)**:213–30
130. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996;**12(3)**:186–93.
131. ISO 7405. Dentistry -- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry -- Test methods for dental materials. 2009
132. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 1999
133. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009; **2(2)**: 514-548
134. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res*. 1999;**45(3)**:214-22
135. Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res* 1974;**53(6)**:1503.
136. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 1977;**56**: 1285–1290

137. **Hume WR.** A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. *J Dent Res* 1985; **64**: 1322–1325
138. Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod* 1996;**22**:249–252
139. Schmalz G., Hiller K., Nunez L., Stoll J., Weis K. Permeability Characteristics of Bovine and Human Dentin under Different Pretreatment Conditions. *J Endod* 2001;**27**:23–30
140. Jenkins N. Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology Totava NJ, Humana Press p:239-252
141. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In Vitro Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol, Toxicol Letter 2000; **114**: 143–53
142. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;**26**:5130–5137
143. Lefeuvre M, Bourd K, Loriot MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A. TEGDMA modulates glutathionetransferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004;**83**:914–9.
144. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; **257**: L163-L173
145. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B. Effects of Bis-GMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004;**25**:4573–4580
146. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002; **63**:746–751
147. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003; **82**: 592–596
148. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Erişim 15.04.2009 [<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>]

149. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü Vet Fak Der* 2008;2:73-78
150. Aral H. Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri. *Sendrom* ,1996 p:38-42
151. Nynke LB, Frank CPH. DNA microarrays: raising the profile. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:48 – 52
152. Soderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: Are they safe? *Am Dent Assoc* 1999;130: 201–209
153. Schmalz G, Dörthe Arenholt-Bindslev. Biocompatibility of dental Materials. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009 p:99-130
154. Schmalz G. Materials science: biological aspects. *J Dent Res.* 2002;81(10):660-3
155. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin-bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995; 74:1602–6
156. Sepet E, Pinar A, İlhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int.* 2009;40(8):e55-61.
157. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. ve ark. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunology Methods*, 1995;184,39-51.
158. Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J. ve ark. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 1995;182,1545-1556
159. Ergüven M, Akev N, Özdemir A, Karabulut E, Bilir A. The inhibitory effect of suramin on telomerase activity and spheroid growth of C6 glioma cells. *Med Sci Monit.* 2008;14(8):BR165-73.
160. Bilir A, Ergüven M, Oktem G, Özdemir A, Uslu A, Aktas E, Bonavida B. Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. *Int J Oncol.* 2008;32(4):829-39.
161. Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Ass* 1994; 125:823– 831.

162. Jain P, Vargas MA, Denehy GE, Boyer DB. Dentin desensitizing agents: SEM and X-ray microanalysis assessment. *Am J Dent* 1997;**10**:21–27.
163. Douglas WH. Clinical status of dentine bonding agents. *J Dent*. 1989;**17**(5):209-15.
164. Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH, Robinson SJ. Current concepts on adhesion to dentin. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; **8**:306 –335
165. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod* 2001;**27**(2):96-102.
166. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 2002;**18**(4):318-23
167. Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: A review. *ATLA*. 1986;**13**:194–202.
168. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest* 1997;**1**:154–162.
169. Gerzina TM, Hume WR. Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res* 1995;**74**(1):369-73
170. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials*. 1999;**20**(9):899-903.
171. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater*. 2006;**22**(6):527-32.
172. Schuster GS, Lefebvre CA, Wataha JC, White SN. Biocompatibility of posterior restorative materials. *J Calif Dent Assoc*. 1996 ;**24**(9):17-31.
173. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*. 1995;**41**(3):474-80.
174. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J Endod*. 1998;**24**(8):528-33
175. Oliva A, Della Ragione F, Salerno A, Riccio V, Tartaro G, Cozzolino A, D'Amato S, Pontoni G, Zappia V. Biocompatibility studies on glass ionomer

- cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials*. 1996;**17(13)**:1351-6.
176. Vahid A, Hadjati J, Kermanshah H, Ghabraei S. Effects of cured dentin bonding materials on human monocyte viability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 ;**98(5)**:619-21.
 177. Ferracane JL Elution of leachable components from composites.. *J Oral Rehabil*. 1994 ;**21(4)**:441-52
 178. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater*. 1998;**14(6)**:429-40
 179. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhäuser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005 ;**26(14)**:1713-9.
 180. Dippel HW, Borggreven JM, Hoppenbrouwers PM. Morphology and permeability of the dentinal smear layer. *J Prosthet Dent*. 1984;**52(5)**:657-62
 181. Schweikl, H.; Spagnuolo, G.; Schmalz, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J. Dent. Res*. 2006, **85**, 870-877
 182. Bouillaguet S.; Wataha, J.C.; Hanks, C.T.; Ciucchi, B.; Holz, J. *In vitro* cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J. Endod*. 1996, **22**, 244-248.
 183. Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol*. 2006;**80(6)**:370-7
 184. Cimpan MR, Matre R, Skaug N, Lie SA, Lygre H. The coinitiator DMABEE induces death by apoptosis and necrosis in human monoblastoid cells. *Clin Oral Investig*. 2005;**9(3)**:168-72.
 185. Pellicciari C, Manfredi AA, Bottone MG, Schaack V, Barni S. A single-step staining procedure for the detection and sorting of unfixed apoptotic thymocytes. *Eur J Histochem* 1993;**37**:381–390

186. Paranjpe A, Bordador LC, Wang MY, Hume WR, Jewett A. Resin monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *J Dent Res*. 2005;**84**:172–177
187. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*. 2000 1;**88**(11):2619-28.
188. White KC, Cox CF, Kanka J 3rd, Dixon DL, Farmer JB, Snuggs HM. Pulpal response to adhesive resin systems applied to acid-etched vital dentin: damp versus dry primer application. *Quintessence Int*. 1994;**25**(4):259-68.
189. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res*. 1997 15;**37**(4):517-24.
190. Li N, Miao X, Takakuwa M, Sato K, Sato A. Effect of dental material HEMA monomer on human dental pulp cells. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1999 ;**27**(1):85-90

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SAFA	Soyadı	TUNCER
Doğ.Yeri	BURDUR	Doğ.Tar.	22/08/1981
Uyruğu	T.C	TC Kim No	13159616350
Email	safatuncer@gmail.com	Tel	+905336342450

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	2004
Lise	ANTALYA ANADOLU LİSESİ	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	2007-2010
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İyi	İyi	İyi	65	