

ARAŞTIRMA
MAKALESİ

İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

Başak Kızıltan Eliaçık¹, Figen Seymen²

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı

² İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı

Özet

Amaç: Bu çalışma, süt ve sürekli dişlerin restorasyonlarında kullanılan kompozit dolgu materyallerinin dentine tutunmasını sağlayan bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yöntem: Tek şişe (one-bottle) sistemler grubu içinde bulunan Single Bond ve kendinden asitlemeli (self-etching) sistemler grubu içinde bulunan Adper Prompt-L-Pop materyallerinin insan pulpası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Her iki ajanın da bir grubu üretici firmaların önerileri doğrultusunda polimerize edilmiş, bir grubu da polimerize edilmeden bırakılmış ve bu grupların pulpa fibroblast hücreleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler hücre proliferasyonu açısından değerlendirilmiştir. İnsan pulpa fibroblastlarının primer hücre kültürü hazırlanmış ve çalışmada üçüncü pasajı kullanılmıştır. Materyaller özel olarak hazırlanmış cam taşıyıcılar içerisinde, hücrelerle doğrudan temas etmesi engellenerek yirmi dördü well-platelerdeki kuyucuklara yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyondan BrdU boyama yöntemi ile hücre proliferasyonları belirlenmiştir. Bağlayıcı ajanların monomer salınımları ise HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografi) cihazı kullanılarak saptanmıştır. Bu iki bulgu arasındaki korelasyon değerlendirilmiştir.

Bulgular: Araştırma sonucunda, Single Bond ve Adper Prompt-L-Pop materyallerinin polimerize edilmiş olan gruplarında, hücre proliferasyon oranlarının polimerize edilmemiş gruplarla karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yüksek olduğu saptanmıştır. **Sonuç:** Günümüzde kullanılan Single Bond ve Adper Prompt-L-Pop materyallerinin üretici firma önerileri doğrultusunda kullanılmasının pulpa dokusu üzerinde olumsuz etki göstermeyeceği, ancak yapılarında bulunan monomerlerin polimerlere dönüşümü sağlanmadığında, gerçekleşen monomer salınımının pulpa üzerinde yüksek oranda sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, bağlayıcı ajanları uygularken gerekli özeni göstermek restorasyonun başarısı açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Sitotoksikite, Proliferasyon, Monomer salınımı, Pulpa hücreleri

Abstract

Aim: The study was performed for investigating the cytotoxic effects of Single Bond and Adper Prompt-L-Pop dentin bonding agents used for restorations of primary and permanent teeth, on the human pulp fibroblasts.

Method: The primary culture of human pulp fibroblast was prepared and the third passage of the fibroblasts were used. The materials used in the study were put into the glass carriers designed for inhibiting the materials' direct contact with the fibroblasts and one group of Single Bond and Adper Prompt-L-Pop were polymerized while the other groups were left unpolymerized. After 24-hour incubation, the cell proliferations were determined respectively by the BrdU assay. The monomer releases of the bonding agents were also determined using HPLC (High performance liquid chromatography) device. The correlation between these values were evaluated.

Results: In the study, the cell proliferation of the polymerized Single Bond and Adper Prompt-L-Pop groups were found significantly higher than the unpolymerized Single Bond and Adper Prompt-L-Pop groups. **Conclusion:** The bonding agents Single Bond and Adper Prompt-L-Pop when used according to the manufacturers' proposal had a minimum cytotoxic effect on the human pulp fibroblasts. However, the results of the study have indicated that degeneration in the monomer-polymer chain caused the monomer release which is cytotoxic on the human pulp. For this reason, dentists have to be careful about the application of the bonding agents for the success of the restorations.

Keywords: Cytotoxicity, Proliferation, Pulp cells, Monomer release

Cite this article as: Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. Medical Research Reports 2021;4(1):11-28

GİRİŞ

Bağlayıcı ajanlar, sağlıklı diş dokusunun korunması, bununla birlikte dentin ve mine dokusu ile hem kimyasal hem de mekanik iyi bir bağlantı sağlaması nedeni ile restoratif diş hekimliğinde son yıllarda tercih edilmektedir (1, 2).

Dentin bağlayıcı sistemlerin diş dokularına bağlanma düzeyinin yüksek olmasının mikro sızıntının azalmasını sağladığı bildirilmektedir (3, 4). İyi bir bağlanmanın olabilmesi için ise dentin-reçine arasında hibrit tabakanın oluşması gerektiği belirtilmektedir. Son zamanlarda kullanıma sunulan sistemlerin içerisinde bulunan monomer ve polimerlerin geliştirilmesi ile bağlayıcı ajanlar ile dentin arasında hibrit tabakasının oluşumunun sağlandığı gözlenmektedir (5-7). Bununla birlikte bağlayıcı ajanların doku uyumluluklarının, mine ve dentin dokusuna bağlanmaları kadar güvenilir olmadığı bildirilmektedir. Ajanların içerisinde bulunan ve bağlanma gücünü artırdığı savunulan monomerlerin pulpa dokusu üzerine toksik etkili olduğu ve hücrel bozulmalara neden olduğu bilinmektedir (8, 9)

Bağlayıcı ajanlar kimyasal yolla ya da görünür ışıkla polimerize edilmektedir. Ancak ışıkla polimerizasyon sırasında monomerlerin tümüyle polimerlere dönüşmesinin sağlanmadığı durumlar bildirilmektedir. Polimerizasyonu sağlanamayan monomerlerin, bulunduğu ortama salındığı ve restorasyonun mekanik yapısını bozduğu, doku uyumunu olumsuz yönde etkilediği, sistemik veya yerel toksisiteye neden olabildiği bildirilmektedir (10-12)

Dentin bağlayıcı sistemler kullanılarak yapılan restorasyonlar sonrasında pulpa dokusu hücrelerinde bozulmalar meydana gelmemesi için restorasyon yapılırken hekimin dikkatli bir şekilde çalışması ve hibrit tabakasının oluşmasını sağlaması gerektiği ileri sürülmektedir. Hibrit tabakası tam anlamıyla oluştuğundaki polimerizasyonun tam olması anlamına da gelmektedir; toksik etkilerin görülmeyeceği bildirilmektedir (6, 13) Polimerizasyonun tam anlamı ile sağlanamayacağı durumlar da söz konusu olabileceği için günümüzde kullanılan bağlayıcı ajanların içerisindeki monomerlerin salınım miktarının ve bu miktarın toksik etkilerinin belirlenmesi gerektiği savunulmaktadır. Bu şekilde yıllar boyunca geliştirilerek istenilen düzeye geldiği inanılan bağlanma gücü gibi bağlayıcı ajanların sitotoksik etkilerinin de en aza indirgenebileceği ve güvenle kullanılacak bağlayıcı ajanlara ulaşılacağı belirtilmektedir (6, 13).

Bağlayıcı ajanların pulpaya yakın restorasyonlarda bazı komplikasyonlara neden olduğu bilinmekte ve bunları gidermek için birçok bağlayıcı ajanlar veya dolgu maddelerinin içerisinde bulunan monomerlerin polimerizasyon aşamasında tümünün polimerlere dönüşümünün sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülen pulpa nekrozu olduğu bildirilmektedir. Kullanılan materyallerin pulpa dokusu üzerindeki sitotoksik etkilerinin bilinmesinin klinik açıdan önem taşıdığı, ancak öncelikle materyallerin toksik etkilerinin in vitro olarak belirlenmesi gerektiği belirtilmektedir.

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

İn vitro olarak sitotoksitesi çok yüksek bulunan materyalin klinik olarak değerlendirilmesine gerek olmadığı savunulmaktadır (14-16).

Günümüzde bağlayıcı sistemlerde çok büyük gelişmeler kaydedildiği, geçmişten bugüne yapılan birçok araştırmanın ışığı altında bu sistemlerin daha kolay kullanılabilir, daha güvenilir ve daha etkili hale getirildiği görülmektedir. Bu sistemler klinik olarak kolaylık getirecek, aynı zamanda dentine bağlanma gücü ve kavite uyumu yüksek olacak, mikro sızıntıya neden olmayacak, pulpaya sitotoksik etki göstermeyecek şekilde geliştirilmeye çalışılmış ve sonuç olarak tek şişe (one-bottle) ve kendiliğinden asitlemeli (self-etching) sistemlere ulaşılmıştır (17, 18).

Bu çalışmanın amacı diş hekimlerine zaman ve uygulama açısından kolaylık sağladığı bilinen biri tek-şişe sistemler, diğeri kendisinden asitlemeli sistemlere dahil olan iki tip bağlayıcı ajanın, insan pulpası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin; hücrelerin proliferasyon yetenekleri ve monomer salınım oranları belirlenerek incelenmesi, kontrol grubu ile karşılaştırılması ve aralarındaki korelasyonun saptanmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

A. ÇALIŞMADA KULLANILAN

BAĞLAYICI AJANLAR

i. Single Bond

Tek şişe adesiv sistemler grubu içinde yer alan ve 2-Hidroksi etil metakrilat (HEMA) içeren Single Bond bağlayıcı sistemleri wet-bonding özelliği taşımaktadır. Bütün kompozit

restorasyonların altında porselen, kompozit ve metal restorasyonların tamirinde, kök yüzeyi hassasiyetlerini gidermek için ve porselen veneerlerin yapıştırılmasında kullanılmaktadır.

ii. Adper Prompt L Pop

Kendinden asitlemeli sistemler grubu içinde yer alan su bazlı Adper Prompt L Pop materyali, kullanılan adesiv sistemlerin basamak sayılarını azaltan ve restorasyon yaparken olabilecek hataları en aza indiren bir sistemdir. Bu sistemde, mine ve dentine asit uygulama basamağı ortadan kaldırılmış ve hekimin zaman kazanmasına ve hastanın diş hekimi koltuğunda daha az zaman geçirmesine olanak sağlanmıştır.

Adper Prompt L Pop materyali bir uygulamalık kullanımdan sonra atılabilen bir aplikatör şeklinde piyasada bulunmaktadır. Bu aplikatörün kırmızı ve sarı bölümleri bulunmaktadır. Kırmızı bölümün sarı bölüm üzerine kıvrılması ve daha sonra bastırılarak ajanın aplikatör ucuna ulaştırılması sağlanmalıdır. Kırmızı bölüm içerisinde metakrilat içeren fosforik esterleri, başlatıcılar (initiator), sabitleyiciler; sarı bölüm içerisinde ise su, florid karışımı ve yine sabitleyiciler bulunmaktadır.

B. HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ

Yaşları 17-28 arasında değişen 32 hastanın ağız ortamıyla temasa geçmemiş, gömük yirmi yaş dişleri, ameliyat bitiminden hemen sonra alınıp, serum fizyolojik ile ıslatılmış steril gaz tamponlara sarıldı. Dişler yarım saat içinde fizyodispenser, steril angldurva ve steril karbon separeler yardımı ile mesio-distal yönde pulpa odasının sınırına kadar boyuna kesildi. Steril elevatör ve büyük azı davyeleri ile dişlerin

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

boyuna kesilen parçaları birbirinden ayrıldı. Steril bistüri ucu ile pulpa dokusu çıkarıldı. +4 °C'ta bekletilen tampon solüsyonlarına aktarıldı. Tampon solüsyonlarına aktarıldıktan sonra bir saat içerisinde 21 no bistüri ile 0.5 mm parçalar haline gelecek şekilde doğrandı.

Bu parçalar 1 µg/ml kollejenaz içeren etilen diaminotetra asetik (EDTA) eklenmiş fosfat çözeltisinde 1 saat 37 °C'ye ayarlanmış karıştırıcı içinde çalkalandı. 1500 devir/dk'da 3 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak pelet %10 fetal dana serum eklenmiş Dulbecco's Modifiye Eagle's Medyumu (DMEM) F-12 medyum ile yıkanarak steril gazlı bezden süzüldü. Elde edilen hücreler 25 cm'lik polistiren kültür şişeleri içerisinde, %10 fetal dana serum (FCS, 7 ml L-Glutamin katılmış DMEM katılarak %5'lik CO² etüv içerisine yerleştirildi. Üç günde bir medyumları değiştirilerek hücreler konfuluen hale gelinceye kadar beklendi. İki hafta sonunda hücrelerin üzerindeki yaşamlarını devam ettirmelerini sağlayan medyumunu döküldü. Hücreler üzerine %5 tripsin ve EDTA ilave edildi ve etüve (37 °C) kaldırıldı. Tripsin etkisi ile hücreler kaldırıldıktan sonra ortama serumlu veya serumsuz medyum eklenerek tripsin etkisi durduruldu. Hücreler santrifüj edildi.

Üst sıvı atılarak tripsin uzaklaştırıldı. Hücreler medyum ile süspanse edildi (üzerlerine medyum eklendi ve pipetaj yapıldı) ve yeni bir kültür şişesine aktararak inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde birinci pasaj elde edilmiş oldu. Birer hafta ara ile aynı işlem tekrarlandı ve ikinci ve üçüncü pasajlar elde edildi. Deney için üçüncü pasaj pulpa fibroblast hücreleri kullanıldı.

C. BAĞLAYICI AJANLARI TAŞIYACAK ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Sitotoksisite testlerinde materyalin yerleştirileceği taşıyıcıları inert bir maddeden yapılmış olması ve standart ölçülerde olması gerekmektedir. Bu şartlara uygun olarak deney için camdan yapılmış taşıyıcılar hazırlatıldı. Bu taşıyıcı 5 mm yüksekliği ve 8 mm çapı olan ufak bir silindire sağ ve solda olmak üzere tek parça olarak bağlanmış 5 mm'lik kollar aracılığıyla petri kutusunun kapağına sıvı parafin yardımıyla tutturuldu. Taşıyıcının ortasında silindir oluşturulurken cam ustası tarafından 3 mm derinliğinde ve 3 mm çapında araştırılan bağlayıcı ajanları yerleştirmek amacı ile boşluk oluşturuldu.

D. ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmada kullanılan bağlayıcı ajanlardan her biri grup kabul edildi. Bu iki grup kendi içlerinde de görünür ışıkla polimerize edilmiş ve polimerize edilmemiş olmak üzere iki gruba ayrıldı. Böylece dört grup elde edilmiş oldu. Her grup yedi örnekten oluşturuldu. Her iki grubunda ışıkla polimerizasyonu Lunar Dental Light Cure Unit ile 20 saniye süre ile gerçekleştirildi. İçlerine hiçbir madde yerleştiremeyen cam taşıyıcılar ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

E. BROMODEOKSİÜRİDİN BOYAMA YÖNTEMİ İLE HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BELİRLENMESİ

Hücrelerin bulunduğu kuuyucuklara 1,9 ml %20 FCS içeren RPMI-1640 medyumunu içinde 0,1 ml stok BrdU çözeltisi konarak 1 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bu medyum boşatılarak hücreler %10 formaledhit

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

ile 1 saat boyunca tespit edildi. Tespit ertesinde fosfat tamponu ile yıkanıp kurutularak 1 gece boyunca +4°C'de saklandı. Ertesi gün distile su ile yıkanan lameller 10 dk süreyle %1,5 H₂O₂ içinde tutuldu ve ardından distike su ile 5 dk çalkalandı. 37°C'de %2 tripsin çözeltisi ilave edilerek 15 dk ve ardından 1,21 gram Tris'in 100 ml saf sudan çözündükten sonra; 0,85 ml HCL'nin 100ml saf suda çözünmesi ile elde edilen Tris tamponunda (TBS) (pH=7,4) 37 °C'de 5 dk bekletildi. Daha sonra 10 dk süreyle 0,1 M Boraks tampon çözeltisi ile oda ısısında bekletildi. Birkaç kez TBS ile yıkandıktan sonra 20 dk NRS (non-reaktif serum) ile bloke edilen hücreler üzerine 1:200 oranında dilüe edilen primer antikor lamellerin kenarından taşmayacak miktarda konarak 1 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Bu işlemin ardından hücrelerin bulunduğu lameller birkaç kere TBS ile yıkandı ve üzerine sekonder antikor damlatılarak 10 dk muamele edildi.

Bu sürenin sonunda TBS ile tekrar yıkanan lamellerin üzerine bu kez streptavidin peroksidaz kompleksi konarak 10 dk bekletildi. Lameller birkaç kere TBS ile yıkandıktan sonra peoksidaz sübstratı olarak kullanılan AEC kromojeni içinde 15 dk bekletildi. Kısa bir süre sonra 5 dk süre ile Mayer hematoksilenle karşıt boyama yapıldı. Basınçla akan çeşme suyunda 10 dk bekletilen lameller kurutularak lamalar üzerine yapıştırıldı ve ışık mikroskopunda sayım yapılarak çekirdekleri boyana hücrelerin boyanmayan hücrelere oranı saptandı.

F. HPLC İLE SALINIM

MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

i. Standart Ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Orijinal standartlar 1/2 oranında metanol ile seyreltilerek tek tek HPLC'ye verilip ana monomerlerin geliş süreçleri saptandı. Her materyal için pikler tanımlanmış oldu. Aynı örneklerden önce 100µg/ml'lik miktarlar hassas terazide tartılarak belirlendi. Ana monomerlerin 1ml'lerinin ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi. Bis-GMA, HEMA ve TEGDMA belirlenen hacimlerde tartılıp Bis-GMA için 25µg/ml, HEMA ve TEGDMA için 2,5 µg/ml'lik standartlar hazırlandı ve aynı HPLC'de çalışıldı. Son konsantrasyonlar Bis-GMA için 2,5µg/ml, HEMA ve TEGDMA için 0,250 µg/ml' olarak belirlendi. Bu oranlarda pikler elde edilerek HPLC cihazının kalibrasyonu yapıldı.

HPLC grade metanol kullanıldığı için herhangi bir saflaştırma yapılmadı.

ii. Örneklerin Analizi

HPLC cihazına ana monomer çözeltileri tanıtıldıktan sonra ve kalibrasyon yapıldıktan sonra daha önce ependorf tüpleri içerisine alınmış olan BrdU örneklerinin üst sıvılarının 5µl'si enjekte edildi. Ölçümü diode array dedektörde 225 nm dalga boyunda yapıldı. Örnekler ilk 5 dakika süresince %70 metanol-su karışımı ile ayrıştırıldı. Daha sonra %70-100 metanol lineer değişimi ile 10 dakika akış devam ettirildi. 10 dakika sonunda %100 metanol ile 5 dakika daha ayrıştırmaya devam edildi. Total analiz süreci 20 dakika olarak ayarlandı. Ayrıştırma süresince akış hızı 1ml/dk olarak belirlendi.

İSTATİKSEL ANALİZ

SPSS programı kullanılarak tanımlayıcı istatistiklerin yanında Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

BULGULAR

BROMODEOKSİ ÜRİDİN TESTİ İLE

BELİRLENEN HÜCRE

PROLİFERASYONUNA İLİŞKİN

BULGULAR

Polimerize edilmiş ve edilmemiş Single Bond materyali ile Polimerize edilmemiş ve edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyalleri ve Cam taşıyıcı içerisinde herhangi bir bağlayıcı ajan uygulanmayan kontrol grubundan elde edilen değerler ise Tablo 1’de belirtilmektedir. Beş grubun birbirleriyle Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 2).

Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; polimerize edilmemiş Single Bond materyali uygulanan grup ile polimerize edilmiş Single Bond uygulanan grup polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan grup ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur (Tablo 3). Polimerize edilmemiş Adper Prompt

L-Pop materyali uygulanan grup ile; polimerize edilmiş Single Bond uygulanan grup, polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan grup ve kontrol grubu karşılaştırıldığında arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte polimerize edilmiş Single Bond materyali uygulanmış grup ve polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanmış grubun birbirleri ve iki grubunda ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırmaları sonucunda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Tablo 3).

Polimerize edilmemiş Single Bond materyali uygulanan grup ve polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan grup birbirleriyle karşılaştırıldıklarında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3).

HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BELİRLENMESİ İÇİN HAZIRLANMIŞ GRUPLARA İLİŞKİN BULGULAR HPLC İLE İNCELENMESİ

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için hazırlanmış örneklerin üst sıvıları HPLC cihazında çalışılarak monomer salınım değerleri elde edilmiştir (Tablo 4).

Beş grubun birbirleriyle Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmasında istatistiksel

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

Tablo 1. Single Bond, Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan gruplarda proliferasyon devam eden hücre oranları

	Single Bond örnekleri		Adper Prompt-L-Pop		Kontrol Grup
	Polimerize edilmemiş	Polimerize edilmiş	Polimerize edilmemiş	Polimerize edilmiş	
Örnek 1	7,60	12,14	6,96	19,29	25,87
Örnek 2	6,80	12,36	8,40	20,36	26,9
Örnek 3	4,09	13,31	7,45	17,13	26,16
Örnek 4	5,27	16,02	7,77	14,53	25,74
Örnek 5	5,18	13,69	6,75	16,89	25,14
Örnek 6	5,33	13,34	7,15	18,11	23,63
Örnek 7	4,83	13,16	7,49	16,2	20,07
Ortalama	5,58	13,43	7,42	17,5	24,78

Tablo 2. Beş grup için yapılan varyans analizi sonuçları

		Vitalite	BrdU	HPLC vitalite	HPLC- BrdU
Polimerize edilmemiş Single Bond	Aritmetik Ortalama	272286	5,6E-02	,2886	,2354
	Standart Sapma	5,92E-02	1,2E-02	,1422	8,03E-02
	Ortalama Skor	6,430000	4,86000	25,0000	25,000000
	n	7	7	7	7
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop	Aritmetik Ortalama	,295086	74E-02	1070 O	6,59E-02
	Standart Sapma	1,70E-02	5,5E-02	2,52E-02	2,39E-02
	Ortalama Skor	8,570000	10,14000	17,640000	15,860000
	n	7	7	7	7
Polimerize edilmiş Single Bond	Aritmetik Ortalama	,726357	,13431	5,44E-02	5,06E-02
	Standart Sapma	9,80E-03	1,3E-02	2,07E-02	1,48E-02
	Ortalama Skor	19,000000	18,14000	10,140000	13,000000
	n	7	7	7	7
Polimerize Adper- Prompt-L-Pop	Aritmetik Ortalama	771609	150İ	3,13E-02	2,56E-02
	Standart Sapma	5218-02	19E-02	127E-02	5,88E-02
	Ortalama Skor	24,000000	25,00000	5,210000	4,140000
	n	7	7	7	7
Kontrol	Aritmetik Ortalama	896186	,24787	0	0
	Standart Sapma	3,768-02	2,3E-02	0	0
	Ortalama Skor	32,000000	31,86000	0	0
	n	7	7	7	7
TOPLAM	Kruskal wallis	30,386	31,801	23,330	22,932
	p	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

	<i>p</i>
Polimerize edilmemiş Single Bond / Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop	0,018
Polimerize edilmemiş Single Bond/ Polimerize edilmiş Single Bond	0,002
Polimerize edilmemiş Single Bond / Polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop	0,002
Polimerize edilmemiş Single Bond / Kontrol	0,002
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-I-Pop / Polimerize edilmiş Single Bond	0,002
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-I-Pop / Polimerize edilmiş Adper Prompt-I-Pop	0,002
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop / Kontrol	0,002
Polimerize edilmiş Single Bond / Polimerize edilmiş Adper Prompt-I-Pop	0,003
Polimerize Edilmiş Single Bond/ Kontrol	0,002
Polimerize edilmiş Adper Prompt-I-Pop / Kontrol	0,003

sonucunda; polimerize edilmemiş Single Bond materyali uygulanan grup ile polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan grup, polimerize edilmiş Single Bond materyali uygulanan grup ve polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali olarak anlamlı farklılıklar olduğu saptanmış ve daha ayrıntılı değerlendirme yapabilmek için ikili karşılaştırmalar yapılmıştır (Tablo 2).

Bonferonni düzeltmeli Mann Whitmey U testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmalar uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 5). Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop uygulanan grup ile polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırken; ancak aynı grubun polimerize edilmiş Single Bond materyali uygulanan grup

ile karşılaştırılması sonucunda aralarında anlamlı fark saptanmıştır (Tablo 5).

Polimerize edilmiş Single Bond materyali uygulanan grup ile polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop materyali uygulanan gruba ait değerler karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 5).

Kontrol grup “0” değer olarak kabul edildiği ve tüm gruplar ile anlamlı sonuç vereceği için istatistiksel analiz yapılmamıştır.

TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik etkilerini belirlemek için yapılan histopatolojik çalışmalarda, insan veya hayvan dişlerinde hazırlanan kaviteler içerisine araştırılacak madde yerleştirilmekte ve daha sonra bu dişler histolojik olarak incelenmektedir.

Yöntemin tekrarlanabilmesinin zor olması, sonuçların net bir şekilde değerlendirilememesi, kavite derinliği ve uygulama yönteminin standardize edilememesi ve günümüzde etik kurallara uymaması gibi dezavantajları olduğu bildirilmektedir (19-21). Bu yönetime alternatif olarak, tekrarlanabilir ve sonuçları net olarak elde edilebilen hücre kültürü çalışmaları gösterilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında araştırılması planlanacak materyalin hücreler ile doğrudan veya salınım yaparak temas etmesi sağlanmaktadır. Daha sonra çeşitli boyama yöntemleri ile hücre canlılıkları saptanmaktadır (16, 22-24).

Costa ve arkadaşları (25), direkt pulpa kuafajında kalsiyum hidroksit ve self-etching sistemler grubu içinde yer alan Clearfil Liner

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

Tablo 4. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için hazırlanan polimerize edilmemiş Single Bond ve Adper Prompt-L-Pop grubununa ait örneklerin üst sıvılarının HPLC 'de incelenmesi sonucunda elde edilen değerler					
HPLC -BrdU	Single Bond		Adper Prompt-L-Pop		Kontrol
	Polimerize edilmemiş (mg/ml)	Polimerize edilmiş (mg/ml)	Polimerize edilmiş	Polimerize edilmemiş	
Örnek 1	0,170	0,0447	0,078	0,034	0
Örnek 2	0,275	0,0445	0,093	0,028	0
Örnek 3	0,354	0,0330	0,100	0,026	0
Örnek 4	0,157	0,0480	0,050	0,027	0
Örnek 5	0,159	0,0519	0,045	0,028	0
Örnek 6	0,217	0,0810	0,049	4616	0
Örnek 7	0,316	0,0514	0,046	0,020	0
Ortalama	0,235	0,0658	0,065	0,050	0

Bond 2 materyallerinin pulpaya etkisini araştırdıkları çalışmalarında ortodontik amaç ile çekilmesi planlanmış otuz üç dişin pulpasının bilinçli bir şekilde açılmasından sonra, bu materyalleri pulpa üzerine uygulanmışlar ve araştırma sonucunda, kalsiyum hidroksitin açığa çıkmış pulpa dokusu üzerinde güvenle kullanılabileceğini, ancak CLB materyalinin; pulpa yenilenmesi ve dentin köprüsü oluşumunu engelleyen monomer salınımı nedeniyle direkt pulpa kuafajı tedavisinde kullanılmasının iyi sonuçlar vermeyeceğini bildirmişlerdir.

Çehreli ve arkadaşları(19), direkt pulpa kuafajında kullanılan Prime& Bond 2.1, Syntac Single Component ve Scotchbond Multipurpose Plus materyallerinin pulpa dokusu üzerindeki etkilerini histopatolojik açıdan inceledikleri çalışmalarında, on bir süt azı dişinin pulpa dokusunu açığa çıkardıktan hemen sonra materyalleri uygulamışlar ve dişleri çekmişlerdir. Histolojik kesitleri odontoblast sayısında azalma, pulpa dokusunda fibrotik değişiklikler ve enflamatuar

infiltrasyon olduğunu saptamışlardır. İltihapsal reaksiyona neden olan faktörün bağlayıcı ajanlardan salınan monomerler olabileceği ve bu ajanların süt dişlerinde direkt pulpa kuafajı tedavisinde kullanılmasının doğru bir uygulama olmadığını bildirmişlerdir.

Tablo 5. Hücre proliferasyonunun (BrdU) belirlenmesi için hazırlanan örneklerin üst sıvılarının HPLC'de incelenmesi ile elde edilen sonuçların Mann Whitney U testi ile ikili karşılaştırılması (5 grup olduğundan Bonferroni düzeltmesi p0,05/ 5- 0,01 olarak kabul edildi)	
	p
Polimerize edilmemiş Single Bond / Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop	0,002
Polimerize edilmiş Single Bond / Polimerize edilmiş Single Bond	0,002
Polimerize edilmemiş Single Bond / Polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop	0,002
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop / Polimerize edilmiş Single Bond	0,225
Polimerize edilmemiş Adper Prompt-L-Pop / Polimerize edilmiş Adper Prompt-L-Pop	0,002
Polimerize edilmiş Single Bond / Polimerize edilmiş Adper Prompt -L-Pop	0,003

Ancak pulpada oluşan değişikliklerin nedeninin kullanılan materyallerin sitotoksik etkileri mi, yoksa pulpanın patolojik

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

immünolojik cevabı mı olduğunu belirleyememişlerdir. Bu çalışmada, materyallerin toksik etkilerinin in vitro olarak saptanmasından sonra, sitotoksosite oranı yüksek çıkarsa in vivo çalışmanın gerekli olmadığı bilindiğinden ve etik kuralların getirdiği kısıtlamalardan, öncelikle bağlayıcı ajanların in vitro sitotoksitesisi, insan pulpası fibroblast hücreleri kullanılarak belirlenmiştir.

Günümüzde diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksitesilerini belirlemek için yapılan hücre kültürü çalışmaları planlanırken, oluşturulacak düzeneğin in vivo koşulları taklit etmesine özen gösterilmektedir. Vücut veya ağız içine yerleştirilecek olan materyal hücreler ile ya direkt ya da indirekt olarak ilişki içindedir. Laboratuvar koşullarında direkt ilişki, kullanılacak hücreler üzerinde araştırılacak olan materyalin doğrudan yerleştirilmesi ile; indirekt ilişki ise materyal ile hücreler arasına yerleştirilen bariyerlerden (milipor filtre (kâğıdı, dentin bariyer agar) salınımı ile gerçekleştirilmektedir (22, 26). Hücre kültür yöntemlerinde sitotoksosite; hücre sayma, proliferasyon, enzim aktivasyonları ve bazı maddelerin sentezlenme oranları araştırılarak belirlenmektedir. Ör; TC₅₀ değeri, hücreleri %50'sinin ölümüne neden olan konsantrasyon olarak tanımlanmakta ve toksisite için bir belirleyici olarak kullanılmaktadır (27).

Spangberg (9), diş hekimliğinde kullanılan materyallerin gelişimi ile birlikte in vitro çalışmaların özellikle de hücre kültürü çalışmalarının tercih edilme oranının arttığını, ancak bu çalışmaları yapacak ve sonuçlarını

değerlendirebilecek kişilerin bu konuda deneyimli olması ve hücre kültürü çalışmalarında diploit hücrelerden, özellikle fibroblastlardan, daha da özen gösterilmesi gerekiyorsa insan pulpa fibroblastlarından yararlanılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini bildirmektedir. İnsan fibroblastlarının daha az pasajlanabildiği ve çalışırken daha fazla dikkat gerektirdiği, hücre kültürlerinin, doku uyumluluğunu belirlemede kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında bazı avantajları olduğu belirtmektedir. Hücre kültürü yöntemlerinde, araştırmacı deney koşullarını kendi kontrol edebilmekte, in vivo yöntemlerde ise araştırmacının kontrolü dışında gelişen olaylar (travma, enfeksiyonlar, doğru konulmamış tanı) deneyin standardizasyonunu bozmaktadır. Diğer bir avantaj ise sonuçların objektif olmasıdır. Hücre kültürü sonuçlarının, histopatoloji çalışmaları sonuçları ile karşılaştırılması sonucunda daha objektif bulgular elde edildiği bilinmektedir. Hücre kültürü çalışmaları yapılarak herhangi bir materyale karşı oluşan doku cevabı değil, materyalin sitotoksitesisi belirlenmektedir. İn vitro araştırmalar sonucunda toksisitesi çok yüksek çıkan bir materyalin in vivo etkisinin araştırılmasına gerek olmadığı, ancak materyal düşük oranda sitotoksik etkili ise in vivo etkisinin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmada, hücre kültürünün avantajları göz önünde bulundurularak ve restoratif materyallerin dentine tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılan bağlayıcı ajanların insan pulpa fibroblastları üzerindeki etkisinin in vivo etkiye daha yakın sonuçlar vereceği düşünülerek,

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

pulpa fibroblast hücreleri primer kültür şeklinde hazırlanmış ve tek tabakalı hücre kültürü olarak kullanılmıştır.

Lepekkin ve arkadaşlarının (28), insan yanak mukozası, periodontal ligamanı ve derisinden elde edilen fibroblastların hareket edebilme yetenekleri ve morfolojilerini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; yanak mukozasından elde edilen fibroblastların diğerlerinden morfoloji ve hareket kapasitesi açısından farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu farklılıkların hücrel aktivite hızı ve yaşam sürelerine bağlı olduğu, hücre dışına salgılanan matriks içerisindeki maddelerin farklı olmasından değil, fibroblast alt grupları arasındaki fenotipik farklılıklardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, fibroblast alt grubundaki hücrelerin fenotipik farklılıkları göz önünde bulundurularak, bağlayıcı ajanların uygulanacağı dokunun içerisinde bulunan hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesinin en doğru sonucu vereceği düşünülerek insan pulpasından elde edilen fibroblast hücrelerinin kullanılması tercih edilmiştir.

Tyas (24), dişhekimliğinde kullanılan çinko fosfat materyalinin sitotoksik etkisini belirlemek için geliştirdiği yöntemde; BHK-21 hücreleri ile materyal arasında, dentin bariyeri ve sellüloz membran filtreleri yerleştirmiş ve lizozomal enzim aktivitesini belirlemek için asit fosfataz, mitokondriyal enzim aktivitesini belirlemek için ise suksinik dehidrogenaz boyama yöntemlerini kullanmıştır. Dentin bariyeri yerleştirilmiş olan grupta çinko fosfatın sitotoksik etkilerinin belirgin bir şekilde az olduğunu saptanmıştır. Bu çalışmada, hücreler

ve materyaller arasında dentin bariyeri yerleştirilmemiş, araştırılacak materyaller özel olarak hazırlanmış cam taşıyıcılar içerisinde yerleştirilmiştir ve hücre proliferasyonu ise BrdU boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Materyallerin salınması sonucunda, pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve Tyas ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi materyaller hücreler üzerine doğrudan uygulanmamıştır.

Schweikl ve arkadaşları (29), bir kompozit, iki cam iyonomer dolgu materyali ve bir çinko fosfat simanın L-929 hücreleri ve insan dişetinden elde edilen fibroblastlar üzerindeki sitotoksik etkilerini; mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin belirlendiği MTT yöntemi, subselüler veziküllerin vezikül içi kompozisyonlarının belirlenmesini sağlayan nötral kırmızı boyama yöntemi, hücre kültürünün total protein içeriğinin boyanması sağlanarak proliferasyon oranını belirleyen yöntem olmak üzere üç değişik yöntemle belirlemişler ve yöntemlerin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. MTT ve nötral kırmızı boyama yöntemlerinin iki hücre tipinde de total protein boyama yöntemine oranla daha hassas sonuçlar verdiğini ve kullanımlarının daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında MTT yöntemi ile cam iyonomer dolgu materyallerinin L-929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi saptanabilirken, insan dişeti fibroblastlarında saptanamadığı, nötral kırmızı ile boyama yönteminin ise kompozit materyalin L-929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin saptanmasında daha güvenilir olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada hücre

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

proliferasyonları BrdU boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Polimerizasyonları tam anlamıyla gerçekleştirilemediğinde dentin bağlayıcı sistemlerden, HEMA (14, 30, 31) ve TEGDMA (10, 14, 32) gibi monomerlerin salındığı bilinmektedir. Günümüzde bu sistemler derin kaviterlerde geniş dentin yüzeyleri üzerine veya direkt pulpa kuafajında açılmış pulpa dokusu üzerine yerleştirilmekte (17, 30, 31, 33) ve yüksek konsantrasyonlarda salınan HEMA ve TEGDMA gibi monomerler pulpa dokuları üzerinde sitotoksik etki gösterebilmektedir (31). Bağlayıcı ajanların doku uyumlulukları ile salınan monomer miktarı arasında ilişki olduğu bildirilmekte ve hücre sel büyüme, hücre ölümü, mitokondriyal aktivite ve protein sentezi yeteneği üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (30, 34).

Sitotoksosite çalışmalarında bu nedenlerle monomer salınım miktarlarının da belirlenmesi gerektiği ve yapılan çalışmaların salınımları belirleyecek yöntemlerle desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir.(16, 35, 36)

Kaga ve arkadaşları (16), cam taşıyıcılar içerisine yerleştirdikleri bağlayıcı ajanların bir grubunu polimerize etmişler, bir grubunu da polimerize etmemişler ve her iki ajan için iki ayrı grup oluşturmuşlardır. Bütün grupları ve kontrol grubunu 24 saat inkübe etmişler ve bu süre sonunda sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforez ve trozin fosforilasyon yöntemleri ile hücrelerin protein içeriğini buna bağlı olarak proliferasyon yeteneklerini belirlemişler ve her grubun monomer salınımlarını HPLC kullanarak

saptamışlardır. Bu çalışmada ise bir cam ustasına 5 mm. yüksekliği ve 8 mm. çapı olan ufak bir silindire sağ ve solda olmak üzere tek parça olarak bağlanmış 5mm'lik kolları bulunan 35 cam taşıyıcı özel olarak hazırlanmış ve petri kutusunun kapağına sıvı parafin yardımıyla tutturulmuştur ve proliferasyon yetenekleri BrdU boyama yöntemi ile saptanmış, üst sıvılarda monomer salınımını belirlemek için ise HPLC cihazından yararlanılmıştır. Kaga ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucuna benzer olarak bu çalışmada da polimerize edilen grubun, proliferasyon oranlarının edilmeyenlere oranla belirgin bir şekilde yüksek ve kontrol grubuna yakın olduğu; monomer salınımı arttıkça bu oranların düştüğü belirlenmiştir.

Chang ve arkadaşları, fındığının içerisinde bulunan arecolinin periodontal dokular üzerindeki sitotoksitesini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında; insan dişeti fibroblastlarını kullanmışlardır. Arecolinin 50 ug/ml üzerindeki dozlarda dişeti fibroblastları için sitotoksik etkili olduğunu, mitokondriyal aktiviteleri engellediğini ve fibroblast fonksiyonlarını zayıflattığını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, vitalite oranlarını belirlemek için canlı kalmış olan hücrelerin DNA'larına bağlanan H33258 floresans boyayı, mitokondriyal aktiviteyi belirlemek için alamar mavi boya yöntemini ve sitotoksik etkiye neden olan maddelerin salınım oranlarını belirlemek için ise HPLC cihazını kullanmışlardır (37). Bu çalışmada, proliferasyonun belirlenmesi için S fazındaki hücreler BrdU boyama yöntemi ile belirlenmiş ve sitotoksitesiteye neden olan

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

maddelerin salınımı ise HPLC cihazı kullanılarak saptanmıştır.

Tang ve arkadaşları, insan ağız mukozası fibroblastları üzerinde bir fissür örtücü materyali, bir dolgu materyali, bir ortodontik braket yapıştırıcısı ve bir bağlayıcı ajanın direkt ve indirekt olarak hücreler üzerine yerleştirilmesi ile oluşan sitotoksik etkilerini belirlemek için iki ayrı yöntemi kullanmış ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, hücrel metabolik aktiviteyi belirlemek için MTT, hücrel sentetik aktiviteyi belirlemek için EH|timidin yöntemlerini kullanmışlardır. Araştırılan (bağlayıcı ajanın (Stochbond Multi Purpose Plus) ağız mukozası fibroblastlar hücreleri üzerine direkt olarak yerleştirilmesinden sonra MTT ile yapılan inceleme sonucunda hücre canlılığının %20'in altında; indirekt yerleştirildikten sonra incelendiğinde ise %40'nin altında olduğu belirlenmiş, aynı koşullarda PHJ timidin yöntemi kullanılarak bu değerler %10'nun altında bulunmuştur. Araştırmacılar, PHJ timidin yönteminin materyallerin içerisindeki monomerlerin sitotoksik etkilerini belirlemede, MTT yöntemine göre hassas olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da Tang ve arkadaşlarının yaptığı araştırmanın indirekt uygulama yöntemine benzer olarak bağlayıcı ajanlar özel olarak hazırlanmış cam taşıyıcılar içerisine yerleştirilmiş ve DNA sentez aktivitesi PHJ timidin yöntemine alternatif olarak gösterilen BrdU boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda proliferasyon aktivitesinin; polimerize edilmiş Single Bond ve polimerize edilmemiş Single

Bond gruplarında sırasıyla 9015 ve 907'nin altında ; polimerize edilmiş Prompt-L-Pop ve polimerize edilmemiş Prompt-L-Pop gruplarında sırasıyla %20'nin ve %69'un altında olduğu bulunmuştur.

Imazato ve arkadaşları, kendinden asitlemeli primer olan Clearfil Liner Bond ve içerisine antibakteriyal etkisi olduğu düşünülen metakrilooksisodesilpiridinium bromid (MDPB) 961 oranında eklenerek hazırlanmış bir bağlayıcı ajanın insan pulpa fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri araştırmalarında, 48 saat inkübasyon sonrasında aktif hücre yüzdelerinin belirlenmesi için PHJ timidin boyama yöntemini kullanmışlar ve monomer salınımlarının belirlenmesi için ise HPLC cihazından yararlanmışlardır. Çalışma sonucunda üreme aktivitesi gösteren hücrelerin Clearfil Liner Bond grubunda % 64.7, Clearfil Liner Bond materyaline 901 MDPB eklenerek özel olarak hazırlanmış bağlayıcı ajan grubunda ise % 67.2 olduğu; monomer salınımının ise Clearfil Liner Bond grubu için 1.52 mg/ml; özel olarak hazırlanmış bağlayıcı ajan grubu için ise 1.22 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise kendinden asitlemeli sistemler içerisinde yer alan Adper Prompt- L-Pop materyali polimerize edilerek uygulandığında proliferasyon oranının ise %17,5 olduğu ve bu grupta monomer salınımının ise, proliferasyonun belirlenmesi için kullanılan örneklerde ise 0.050 mg/ml olduğu saptanmıştır.

Kehe ve arkadaşları tarafından, merkülid klorid, metil merkülid klorid, HEMA ve TEGDMA gibi materyallerin A549 (insan bronkoalveolar karsinomundan elde edilir) ve

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

L2 (sıçan bronkoalveolarından elde edilir) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada TEGDMA'nın HEMA'ya oranla iki hücre tipi üzerinde de daha fazla sitotoksik etkili olduğu bildirilmektedir. HEMA'nın moleküler ağırlığının TEGDMA'dan daha az olması nedeniyle dentine hızlı bir şekilde penetre olduğu belirtilmekte ve HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın sitotoksik etkisinin yüksek olmasının nedeni; hücre membranının iki tabakalı yağ (lipid) katmanı ile etkileşime girmesi veya in vitro koşullarda yağ peroksidasyonuna neden olması olarak açıklanmaktadır. Aynı çalışmanın sonucunda, amalgam dolgu maddelerinin kompozit dolgu materyallerine oranla 200 kat daha fazla sitotoksik etkili olduğu belirtilmektedir (23). Bu çalışmada, incelenen Single Bond ve Adper Prompt-L1-Pop piyasa isimli bağlayıcı ajanlarından salınan HEMA'nın sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. İçeriğinde TEGDMA olduğu düşünülmesine rağmen, HPLC'de bu monomere rastlanılmaması, belirtilen dezavantajları nedeniyle içeriğe katılmadığını veya eser miktarda katıldığını düşündürmektedir.

Kawahara ve arkadaşları, dört tane geçici restorasyon materyalinin (Dura Seal, Fit Seal, Plast Seal Ouick, Poly Seal) içerisindeki kimyasal maddeleri ve oranlarını saptamak için gaz kromatografi (GSCM) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) kullandıkları çalışmalarında, materyallerin uygulanmasından sonraki üç gün boyunca monomer salınımının arttığı ve daha sonra sabit kaldığı bildirilmekte, üçüncü gün sonunda Fit Seal materyalinde

HEMA salınımının 40 µg/mg ve Poly Seal materyalinde ise 20 µg/mg olduğunu ve bu oranların yaklaşık % 50'sinin ilk üç saat içinde gerçekleştiği belirtilmektedir (35). Bu çalışmada, iki tip bağlayıcı ajanın içerisindeki monomerler ve salınım miktarlarını incelemek için HPLC cihazından yararlanılmış ve bağlayıcı ajanlar içerisinde sadece HEMA'ya rastlanmıştır. HEMA salınım oranları mg/ml olarak belirlenmiş ve Kawahara ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki değerlere yakın değerler bulunmuştur.

Inoue ve arkadaşları, Bis- GMA materyalinin salınım oranlarını belirlemek için yaptıkları çalışmalarında, HPLC cihazını kullanmışlar ve çalışmada araştırdıkları bütün materyaller içerisinde Bis-GMA bulunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca materyallerden monomer salınımının, on üçüncü günün sonunda, polimerize edildiği anda saptanan miktarın onda biri olduğu belirlenmiştir (11). Bu çalışmada, günümüzde kullanılan bağlayıcı ajanlarda yüksek oranlarda Bis- GMA kullanılmasından kaçınıldığı bilinmesine karşın yine de materyallerin içerisinde (Bis-GMA bulunup bulunmadığı araştırılmış ancak salınım saptanamamıştır. Ayrıca loune ve arkadaşları araştırmalarında 0.5m x 7.9mm çelik kolon kullanmışken, bu çalışmada, 150 x 7.8mm C kolon kullanılması tercih edilmiştir.

Palmer ve arkadaşlarının, dört farklı cam iyonomer dolgu maddesinden salınan HEMA miktarını HPLC kullanarak saptadıkları çalışma sonucunda, araştırılan materyallerin tümünden HEMA salınımı olduğu, ancak üretici firmanın önerisine göre polimerizasyon

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

yapıldığında materyallerden salınan HEMA miktarının azaldığı bildirilmiştir (36). Bu çalışmada, Palmer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer olarak HPLC cihazı kullanarak belirlenen HEMA salınım miktarının polimerize edilmiş gruplarda belirgin bir şekilde düşük olduğu bulunmuştur.

Hücrelerin vitalitelerinin belirlenmesi yanında, mitotik aktivitelerinin de belirlenmesi gerektiği, her canlı hücrenin çoğalma yeteneği göstermeyeceği bildirilmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda hücrelerin proliferasyon yeteneklerinin belirlenmesi ile daha doğru sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir (21, 38, 39). Maglorie ve arkadaşları, çürük doku temizlendikten sonra, tamir dentini oluşumunu, odontoblast hücrelerinin proliferasyon yeteneklerini (21), Liu ve arkadaşları, MEPE (Dentinoin veya AC-100)'nin insan dişi pulpası kök hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini (40), Melin ve arkadaşları ise pulpada meydana gelen doku hasarlarının iyileşmesini sağlayan TGF β 1'in pulpa hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek (39) için BrdU yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada, mitojenik aktivite gösteren hücrelerin belirlenebilmesi için ise BrdU yöntemi kullanılmıştır.

Casasco ve arkadaşları, vazoaktif bir ajan olan endotelinin (ET) insan dişi pulpasından elde edilmiş fibroblastların DNA sentezi üzerindeki etkilerini flow- sitometre ve BrdU boyama yöntemi ile inceledikleri araştırmalarında, BrdU yöntemiyle belirlenen S fazı geçirmekte olan hücre sayısının endotelin uygulanmış hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde fazla

olduğu, ET 'nin diş gelişiminde, pulpa enflamasyonları ve iyileşme sürecinde görev aldığı ve insan pulpa hücreleri üzerinde mitojenik etkili olduğu sonucuna varılmıştır (38).

Bu çalışmada, S fazı geçirmekte olan hücrelerin oranları da BrdU yöntemi kullanılarak belirlenmiş, ancak Casasco ve arkadaşlarının çalışmasına ters olarak bu çalışmada S fazı geçirmekte olan hücrelerin sayılarının azalıp azalmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak, incelenen biri tek şişe sistemler, diğeri kendinden asitlemeli sistemlere (self- etching) dahil olan bağlayıcı ajanların her ikisinin de polimerizasyonu iyi bir şekilde yapılmadığında insan pulpa fibroblastları üzerinde sitotoksik etkili olduğu bulunmuş, polimerizasyon sağlandığında ise sitotoksik etkinin belirgin bir şekilde düştüğü ve bağlayıcı ajanlar kendi aralarında karşılaştırıldığında Single Bond materyalinin Adper Prompt-L-Pop materyalinden daha fazla sitotoksik olduğu saptanmıştır. Single Bond ve Adper Prompt-L-Pop materyalleri uygulanırken, içerisinde bulunan monomerlerin polimerlere dönüşümünün sağlanabilmesi için polimerizasyon sırasında üretici firmaların önerilerine dikkat edilmesi gerektiği, bu şartlar sağlandığında her iki materyalin de kullanılabilceği, ancak özellikle pulpa dokusunda iyileşmeyi sağlayan enzim ve faktörler üzerindeki etkilerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

İçerisinde asidik monomerler bulundurduğu için pulpa dokusu üzerinde dejeneratif değişiklikler yaratacağına inanılan, Adper Prompt-L-Pop materyalinin Single Bond

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

materyali ile karşılaştırıldığında, daha az sitotoksik etki göstermesi ve pulpa dokusunda daha az dejeneratif değişikliğe neden olması, geleneksel bağlayıcı ajanlara alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Asit uygulamasının ortadan kalkmasıyla tek basamakta uygulanabilir olması uygulama süresinin kısalmasına neden olacağı için ve sitotoksik etkisinin çok düşük olması nedeniyle

çocuklarda kullanımının avantaj olacağı düşünülmektedir. Adper Prompt-L-Pop materyali tek kullanımlık bir aplikatör olduğundan, bir kerede birden fazla dişin yapılmasının malzeme savurganlığını önleyeceği bilinmelidir.

Finansman ilinti beyanı: Yazarlar, bu makalenin araştırılması ve/veya yazarlığı için herhangi bir finansal destek almamıştır.

Çıkar çatışması beyanı: Yazarlar, bu makalenin yayınlanmasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

1. De Munck, J., et al., Microtensile bond strengths of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *Am J Dent*, 2003. 16(6): p. 414-20.
2. Haller, B., Recent developments in dentin bonding. *Am J Dent*, 2000. 13(1): p. 44-50.
3. Hanks, C.T., et al., Modeling bacterial damage to pulpal cells in vitro. *J Endod*, 1991. 17(1): p. 21-5.
4. Hannig, M., et al., Microleakage and SEM evaluation of fissure sealants placed by use of self-etching priming agents. *J Dent*, 2004. 32(1): p. 75-81.
5. Nakabayashi, N., M. Ashizawa, and M. Nakamura, Identification of a resin-dentin hybrid layer in vital human dentin created in vivo: durable bonding to vital dentin. *Quintessence Int*, 1992. 23(2): p. 135-41.
6. Spencer, P., et al., Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res*, 2000. 79(7): p. 1458-63.
7. Wang, Y. and P. Spencer, Effect of acid etching time and technique on interfacial characteristics of the adhesive-dentin bond using differential staining. *Eur J Oral Sci*, 2004. 112(3): p. 293-9.
8. Shimada, Y., et al., Histologic evaluation of adhesive restorations on dentin caries in rat molar teeth. *Quintessence Int*, 2004. 35(3): p. 200-5.
9. Spangberg, L.S., Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endod*, 1978. 4(10): p. 296-9.
10. Elliott, J.E., L.G. Lovell, and C.N. Bowman, Primary cyclization in the polymerization of bis-GMA and TEGDMA: a modeling approach to understanding the cure of dental resins. *Dent Mater*, 2001. 17(3): p. 221-9.
11. Inoue, K., K. Kurosumi, and Z.P. Deng, An improvement of the device for rapid freezing by use of liquid propane and the application of immunocytochemistry to the resin section of rapid-frozen, substitution-fixed anterior pituitary gland. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1982. 31(1): p. 93-7.
12. Itota, T., et al., Cytotoxicity of a trial resin composite liner containing TiK2F6 on rat dental pulp cells. *Dent Mater J*, 1999. 18(3): p. 271-7.
13. Hashimoto, M., et al., The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater*, 2000. 16(6): p. 406-11.
14. Geurtsen, W., et al., Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, 1998. 41(3): p. 474-80.

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

15. Hanks, C.T., et al., Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol*, 1988. 17(8): p. 396-403.
16. Kaga, M., et al., The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater*, 2001. 17(4): p. 333-9.
17. Bouillaguet, S., et al., Bond strength of composite to dentin using conventional, one-step, and self-etching adhesive systems. *J Dent*, 2001. 29(1): p. 55-61.
18. Kugel, G. and M. Ferrari, The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc*, 2000. 131 Suppl: p. 20S-25S.
19. Cehreli, Z.C., et al., Short term human primary pulpal response after direct pulp capping with fourth-generation dentin adhesives. *J Clin Pediatr Dent*, 2000. 25(1): p. 65-71.
20. Kitasako, Y., et al., Monkey pulpal response and microtensile bond strength beneath a one-application resin bonding system in vivo. *J Dent*, 2000. 28(3): p. 193-8.
21. Magloire, H., A. Joffre, and F. Bleicher, An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res*, 1996. 75(12): p. 1971-8.
22. Imazato, S., et al., Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent*, 2000. 28(1): p. 61-7.
23. Kehe, K., et al., Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials*, 2001. 22(4): p. 317-22.
24. Tyas, M.J., A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res*, 1977. 56(10): p. 1285-90.
25. de Souza Costa, C.A., A.B. do Nascimento, and H.M. Teixeira, Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater*, 2002. 18(7): p. 543-51.
26. Tang, A.T., et al., 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): p. 214-22.
27. Pelka, M., et al., A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent*, 2000. 28(5): p. 341-5.
28. Lepekhn, E., et al., Differences in motility pattern between human buccal fibroblasts and periodontal and skin fibroblasts. *Eur J Oral Sci*, 2002. 110(1): p. 13-20.
29. Schweikl, H. and G. Schmalz, Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*, 1996. 104(3): p. 292-9.
30. Bouillaguet, S., et al., Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater*, 2000. 16(3): p. 213-7.
31. Noda, M., et al., 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(4): p. 265-9.
32. Lefeuvre, M., et al., TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 2004. 83(12): p. 914-9.
33. Costa, C.A., et al., Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*, 1999. 15(6): p. 434-41.
34. Yoshii, E., Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res*, 1997. 37(4): p. 517-24.
35. Kawahara, T., et al., Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent*, 2004. 32(4): p. 277-83.
36. Palmer, G., H.M. Anstice, and G.J. Pearson, The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent*, 1999. 27(4): p. 303-11.

Kızıltan Eliaçık B, Seymen F., İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

37. Chang, Y.C., et al., Cytotoxicity and arecoline mechanisms in human gingival fibroblasts in vitro. Clin Oral Investig, 2001. 5(1): p. 51-6.
38. Casasco, A., et al., Stimulation of DNA synthesis by endothelin-1 in primary cultures of human dental pulp. Arch Oral Biol, 1994. 39(3): p. 245-9.
39. Melin, M., et al., Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. J Dent Res, 2000. 79(9): p. 1689-96.
40. Liu, H., et al., Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. J Dent Res, 2004. 83(6): p. 496-9.