



DENTAL MATERYALLERDE BİYUYUMLULUK DEĞERLENDİRMELERİ

THE EVALUATION OF DENTAL MATERIALS BIOCOMPATIBILITY

Dr. Safa TUNCER *

Prof. Dr. Mustafa DEMİRCİ*

Makale Kodu/Article code: 439
Makale Gönderilme tarihi: 21.11.2010
Kabul Tarihi: 11.04.2011

ÖZET

Diş hekimliği uygulamalarında farklı içerik ve özelliklere sahip çok çeşitli materyaller üretilmiş ve klinik kullanıma sunulmuştur. Bu materyallerin çoğu uygulandıklarında diş dokuları, yumuşak doku ve sıvılarla (tükürük, diş eti oluşu sıvısı) temas etmektedir. Böylece yeni bir materyal seçiminde, mekanik ve fiziksel özelliklerin yanında biyolojik özelliklerde göz önüne alınmaktadır. Bir materyalin biyoyumluluğunu saptamak için günümüzde çeşitli testler kullanılmaktadır. Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit *in vitro* test yöntemleri ile başlanır. Değerlendirmelere hayvan testleri ile devam edilir, bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde kullanım testleri (*in vivo* değerlendirme) gibi daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Bu derlemenin amacı dental materyaller için uygulanması gereken biyoyumluluk test yöntemlerini değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Dental Materyal, Biyoyumluluk, Sitotoksiste, Hücre Kültürü,

ABSTRACT

In dentistry materials with different content and features are produced and used in dental practice. During the application, most of these materials are in contact with dental hard tissues, soft tissues and oral liquids (e.g. saliva, gingival crevicular fluid). Thus, in the selection of new material, besides the mechanical and physical properties also biological characteristics must be taken care. Various tests are used to determine the biocompatibility of materials. The common approach when testing the biological behavior of materials is to start with simple *in vitro* tests mostly based on cell cultures. If these experiments and investigations of a material's efficiency deliver promising findings, then more comprehensive studies on experimental animals and usage tests (*in vivo* evaluation) will be performed. The aim of this review was to evaluate the test methods for the biocompatibility of dental materials.

Key Words: Dental Materials, Biocompatibility, Cytotoxicity. Cell Culture

GİRİŞ

Diş hekimliğinde kullanılan bir çok 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 mümkündür¹. Bir materyalin biyoyumluluğu materyalin; tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlıdır². Biyoyumluluk bir materyalin canlı dokular ile temas halinde iken sistemik ve lokal toksiste, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi doku reaksiyonları

oluşturmamasıdır³. Biyoyumlu bir materyal tamamen inert (etkisiz) olmayabilir. Bir materyalin biyolojik uyumluluğu bu maddeden çözünme ya da aşınma sonucu açığa çıkan bileşenlerle belirlenir. Bu bileşenler hücrelerde çeşitli hasarlar oluşturabilir 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

*İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı.



faktörlerden proteinlerin adezyonu (tükrük proteinleri tarafından pelikülün oluşturulması), materyalin fiziksel (ıslatabilirlik, yüzey enerjisi) ve kimyasal özelliklerinden etkilenir^{1,4}.

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 kullanılmaktadır⁵. 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 yapılmalıdır⁴. Uygulanan testlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1' de gösterilmektedir.

Tablo 1. Biyouyumluluk test yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları⁵.

Test	Avantaj	Dezavantaj
İn vitro	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

***In vitro* testler**

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 bileşenin 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 saptanır².

Dental materyallerin *in vitro* olarak sitotoksitesini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir.

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 süspansiyon 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^{6,7}.

Hücre kültürü çalışmalarında iki tip hücre kullanılır. Bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Diş eti ve pulpa fibroblastları, primer kültür hücrelerine örnektir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlere ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültürler sekonder hücre kültürleri denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra hücre hatları elde edilir. Fakat primer kültürlerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması farklıdır. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı *in vivo* özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitelyal

hücreleridir (HeLa). Ayrıca çalışmalarda insan ve hayvan pulpa hücreleri, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatlarında kullanılmaktadır^{4-6,8}.

Sitotoksosite

Uygulanan materyalin hücrenin yaşamına olan etkisi biyoyoumluluğu belirleyici etkindir. Sitotoksosite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır^{9,10}.

Sitotoksosite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in-vitro olarak değerlendirilmektedir. Sitotoksosite testleri¹¹:

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

Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önemlidir. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile gerçekleşebilir.

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için ISO, bazı kriterler belirlemiştir. ISO 7405, diş hekimliğinde kullanılan medikal materyallerin klinik öncesi biyoyoumluluk değerlendirmesi için önerilen test protokollerinden bir tanesidir. Bu protokolda agar difüzyon ve filtre difüzyon metotları detaylı olarak anlatılmaktadır¹². ISO 10993, medikal ürünlerin biyolojik olarak değerlendirilmesi için farklı metotların önerildiği diğer bir test protokolüdür. Bu standardın asıl amacı belirttiği yöntemlerle insanların korunmasıdır. ISO 10993-5 *in vitro* sitotoksosite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür. Kontak süresi uygulanan testler için önemlidir ve ISO 10993 tarafından 24 saatten daha kısa süreler sınırlı kontakt, 24 saat-30 gün arası uzatılmış kontakt ve 30 günden daha uzun olanlar ise sürekli kontakt olarak tanımlanmıştır. İn vitro sitotoksosite değerlendirmelerinde ISO standartlarında geçen test metotları ile birlikte önerilen test metotları şunlardır^{9,13}:

- 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

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 çözünebilir materyaller medyum içerisinde çözünebilirler ve böylece çok iyi bir materyal hücre teması sağlanır. Suda çözünmeyen materyallerde ise birkaç yolla hücreler ile direkt temas sağlanabilir^{14,15}. 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 kabınının 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 sitotoksitesini incelenmektedir. Ekstraksiyon sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı çözücüler serum içeren medyum, serum içermeyen medyum, fizyolojik tuz solusyonu veya diğer uygun çözücülerden biri olabilir^{9,13}.

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^{9,13}:

- 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 kullanılırlar⁹.

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 sağlar¹⁶.

Agar Difüzyon Testi

Agar difüzyon testi, toksisite deneylerinde en uzun süredir kullanılan bariyer test yöntemidir. Bu yöntem ile fare fibroblast (L929) hücrelerinin üzerini örten % 1,5' luk agar besiyerinden 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 çözünmeyen veya difüze olamayan test materyali veya bileşenleri hücreler üzerinde her hangi bir etki gösteremezler^{9,17}.

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 dekolizasyon 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 difüze olmaları gerekmektedir^{5,9,18}.

Dentin Bariyer Testi

Sitotoksosite testlerinde bariyer olarak farklı materyaller kullanılmıştır. Dentin bariyer testlerinin geliştirilmesi sitotoksosite testlerini tamamlayan bir metoddur. 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 atmışlardır¹⁹.

Araştırmacılar geliştirdikleri dentin bariyer test cihazları ile materyallerin biyolojik özelliklerini incelemişlerdir^{20,21}. 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 sitotoksosite değerlendirmelerinde kullanmak için Schmalz ve ark. hücre kültür testlerinde kullanılan perfüzyon cihazında bazı değişiklikler yapmışlardır. Orjinal perfüzyon odasındaki membran yerine dentin diski kullanmışlardır²². Kullanılan dentin diski insan veya sığır dişlerinden kesilerek hazırlanmış farklı kalınlıklardaki dentin disklerinden oluşabilir²³. Bu dentin diskinin pulpaya bakan tarafı asitle dağlanmıştır. 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 ürettildiği 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 bağlıdır²².

Sitotoksosite Değerlendirme Yöntemleri

Sitotoksosite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar²⁴:

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 sitotoksosite değerlendirme testleri:

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 nötral kırmızı gibi boyaların kullanılması ile yapılır²⁴.

➤ Nötral kırmızı testi: Nötral kırmızı vital bir boyadır. Canlı hücrelerin içerisinde birikir ve bu



sayede yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılır. Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu hemositometre adı verilen bölümlenmiş cam üzerine yerleştirilir. Daha sonra optik mikroskop altında hemositometredeki canlı hücrelerin yüzde oranı tespit edilir²⁵.

- **Tripan mavisi testi:** Tripan mavisi non-vital bir boyadır. Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikir. Hemositometre yardımı ile tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin oranı tespit edilir⁵. Vital ve non-vital boyaların kullanıldığı test yöntemlerinde mikrotitrasyon plaka okuyucuları kullanılarak spektrofotometrik olarak test materyallerinin sitotoksik etkileri değerlendirilir²⁵.
- **Floresan metodu:** Diasetil floresan canlı hücre içerisine girebilen bir boyadır. 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 filtrelelere sahip floresan mikroskopu ile değerlendirilirler. Bu değerlendirme floresan görüntü veren hücreler ölü hücre anlamına gelmektedir²⁵.

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 toksite reaksiyonlarda geri dönüşüm olabildiğinden uzun dönem testleri kullanılmaktadır²⁴.

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 yöntemdir²⁴.

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. Bir çok 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) tecihende 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 kullanılmalıdır²⁴. 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^{14,26}.

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 belirlenir²⁴.

Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler²⁵. Metabolizma testlerinde



hücrelerin canlılıkları mikropkara 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 sitotoksitesine 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^{14,24}.
- 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 sağlar¹⁴.
- LDH testi: Kolorimetrik sitotoksitesine değerlendirme yöntemi olan laktat dehidrogenaz (LDH) test yönteminde hücrede membran hasarı veya sitolizis durumunda açığa çıkan sitozolik bir enzim olan laktat dehidrogenazın ölçümü yapılarak sitotoksitesine belirlenir¹⁴.

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 hücrel 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 raksiyona girerek glutasyonun hücrel miktarının tespitine olanak sağlar²⁷⁻³⁰.

Hücrede glutasyon düzeyinin belirlenmesine olanak sağlayan floresan özellikli maddeler hücre içerisindeki GSH ile raksiyona girerler. Monobromobimane insan hücrelerinde GSH'nin ölçümü için kullanılan maddelere bir örnektir¹⁴.

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 apoptotik hücre ölümü meydana gelir³¹.

Mutajenite Testleri:

Biyomateryallerin hücre genetik materyalinde değişiklikler oluşturması genotoksitesine 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 aktarılsa 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 oluşturamazlar ancak mutajenik bir etken ile karşılaşırlarsa çoğalırlar. Oluşan koloni sayısı mutajenite için bir göstergedir^{4,32}.

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 genotoksitesine çalışmalarında vardır^{4,33}.

Östrojenite Testleri

Östrojen moleküllerinin hücredeki östrojen reseptörlerine bağlanması sonucu bu reseptörler aktif bir duruma geçer. Aktif duruma geçen östrojenreseptör 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 bileşiminin gen transkripsiyonunu düzenlemesi östrojenin en önemli biyolojik aktivitesi olarak gösterilir. Ayrıca bu moleküllerin genomdan bağımsız diğer fonksiyonlarında bulunur³⁴. Bazı kimyasal bileşenler östrojen benzeri etki göstererek hücrelerde bulunan östrojen reseptörlerine subtoksik konsantrasyonlarda bağlanırlar. Bisfenol-A bu kimyasal bileşenlerden bir tanesidir. Östrojenitenin 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 yöntemdir³⁵.

Hayvan Testleri

Genellikle memeli hayvanların kullanıldığı bu tür biyoyoumluluk 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^{2,5}. Hayvan testlerinde biyolojik uyumluluğu test edilecek materyalin piyasaya sürülmeden önceki deneysel formu kullanılır bu nedenle hayvan testleri kullanım testlerinden (bazı testlerde hayvanlar da kullanılmaktadır) farklıdır⁵.

Dental materyallerin spesifik olmayan lokal toksik etkilerinin incelenebilmesi için bu materyaller laboratuvar hayvanlarının dokularının içerisine yerleştirilebilir³⁶. 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. Müköz membran irritasyon testinde test edilecek materyalin mukozada veya aşındırılmış deri üzerinde meydana getirdiği iltihap değerlendirilir.^{4,37-39}

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 biyoyoumluluk değerlendirmesinde klinik deney aşamasıdır⁵.

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^{4,5}.

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 değiştirebilir⁵.

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. 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 yöntemleridir⁴.

Sonuç olarak farklı içerik ve özelliklere sahip bir çok dental materyal üretilmiş ve klinik kullanıma sunulmuştur. Bu materyaller diş dokuları, alveol kemiği, yumuşak doku ve sıvılarla (tükürük, diş eti oluşu sıvısı) temas etmektedir. Yeni bir materyal seçiminde, mekanik ve fiziksel özelliklerin yanında biyolojik özelliklerde büyük bir öneme sahiptir. Dental materyallerin hayvanlar üzerinde uygulanması insanlarda kullanım testleri sonucu oluşabilecek muhtemel olumsuz etkiler hakkında fikir verebilir. Bununla birlikte *in vitro* testler ve hayvan testleri ise araştırmacılara bu istenmeyen reaksiyonların oluşum mekanizmaları hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaynaklar:

1. Schmalz G, Dorthe Arenholt-Bindslev. *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer:2009. p.1-10
2. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. 2001;86(2):203-9.



3. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater.* 1996;12:186-193.
4. Schmalz G, Dorthe Arenholt Bindlev. *Biocompatibility of Dental Materials.* 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer:2009. p.13-40
5. Powers JM, Sakaguchi RL. Craig's restorative dental materials. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. p.97-125
6. R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition.* Haboken; John Wiley & Sons: 2005.p.1-216
7. Candan Ç., Bilgiç A., Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2006; 20 (3): 231-241
8. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology.* Third edition. Tatowa; Humana Press:2005. p. 1-12
9. 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.
10. Aldridge WN. The biochemical principles of toxicology. *Exp. Toxicol* 1993;5:56-78
11. Nicholson JW. The Chemistry of Medical and Dental Materials. Cambridge; The Royal Society of Chemistry: 2002. p.186-195
12. ISO 7405. Dentistry -- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry -- Test methods for dental materials. 2009
13. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 1999
14. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials.* 2009; 2(2): 514-548
15. Polyzois, GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater.* 1994, 16, 21-60
16. 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
17. Schmalz, G. The agar overlay method. *Int. Endod. J.* 1988. 21: 59-66.
18. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore filters. *J Biomed Mater Res* 1979;13:109-20.
19. Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res* 1974;53(6):1503.
20. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 1977;56: 1285-1290
21. 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
22. Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod* 1996;22:249-252
23. 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
24. R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition,* John Wiley & Sons 2005, Inc., p:359-373
25. Jenkins N. Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology Totowa NJ, Humana Press p:239-252
26. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In Vitro Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol, *Toxicol Letter* 2000; 114: 143-53
27. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutasyonun Rolü. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(4):442-8.
28. Lefevre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26:5130-5137
29. Lefevre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A. TEGDMA modulates glutathionetransferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004;83:914-9.
30. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; 257: L163-L173
31. 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



32. Maron, D.M., Ames, B.N.: Revised method for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173–215
33. Schweikl, H., Schmalz, G.: Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. Mutat Res 1999; 438: 71–78.
34. Soderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: Are they safe? Am Dent Assoc 1999;130: 201–209
35. Schmalz G, Dorthe Arenholt-Bindslev. Biocompatibility of dental Materials. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer:2009. P.99-130
36. Zorba YO., Yıldız M. Adeziv restoratif materyallerde biyouyumluluk testleri ve kriterleri. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. 2007; ;Suppl.: 2, S: 15-21
37. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. Eur J Oral Sci 1998;106:696-706.
38. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med 2000;11:333-355.
39. Frankild, S., Volund, A., Wahlberg, J.E., Andersen, K.E.: Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. Acta Derm Venereol 2000; 80: 256–262

Yazışma Adresi

Dr. Safa Tuncer
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı
Kat 4 Çapa/Fatih İstanbul
e-mail: tuncers@istanbul.edu.tr

