T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN RESTORASYON MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ceren KAPLAN DİNÇ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özlem Martı AKGÜN

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

ANKARA 2024

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN RESTORASYON MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ceren KAPLAN DİNÇ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özlem Martı AKGÜN

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

ANKARA 2024

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

•Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,

•Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

•Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

•Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

•Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,

•Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ceren KAPLAN DİNÇ

ÖZET

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN RESTORASYON MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Amaç: Bu doktora tez çalışmasında çocuk diş hekimliğinde güncel olarak kullanılan dört farklı restorasyon materyalinin fare fibroblast hücreleri (L929) üzerindeki sitotoksik-genotoksik etkilerinin ve oral mikrobiyatada bulunan bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmanın ilk bölümünde cam iyonomer içerikli üç farklı restoratif materyalin (ChemFil Rock (Dentsply Sirona, Almanya), EQUIA Forte HT Fil GC, Japonya) ve Ruby Liner (Rubydent, Türkiye)) ve bir alkasitin (Cention Forte, (Ivoclar Vivadent, İsviçre)) *in vitro* koşullarda sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Sitotoksisite değerlendirmesi, 24 ve 72 saatlik inkübasyonun ardından MTT yöntemiyle L929 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Genotoksisite değerlendirilmesi ise 72 saatlik inkübasyon sonrasında Comet yöntemiyle yapılmıştır. Materyallerin antibakteriyel etkisi, *Streptococcus mutans (S. mutans)* ve *Enteroccocus faecalis (E. faecalis)* üzerinde agar difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın istatiksel analizi için, GraphPad Prisim Version 5.03 (GraphPad Software, Inc. CA, ABD) programı kullanılmıştır. Gruplar arası farkların önem kontrolleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. İstatiksel bulgular, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Post hoc analizi ise Tukey's HSD testi ile yapılmıştır. Sitotoksisite için istatiksel anlamlılık değeri başlangıcı $p<0,0001$ olarak kabul edilirken, genotoksisite için istatistiksel anlamlılık değeri başlangıcı olarak $p<0,05$ kabul edilmiştir.

Bulgular: MTT test sonuçlarına göre (24 ve 72 saat) bütün restoratif materyallerin sitotoksik özellikte olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Comet testi sonucuna göre ise çalışılan bütün materyallerin genotoksik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır Ayrıca materyallerin antibakteriyel etkinliği değerlendirildiğinde materyallerin etrafında herhangi bir inhibisyon zonu oluşmamıştır.

Sonuçlar: Test edilen tüm restoratif materyallerin yüksek düzeyde sitotoksik olduğu tespit edilmiştir($p<0,0001$). Test edilen materyallerin tümü genotoksik olup, materyallerin genotoksik etkileri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Buna rağmen test edilen restoratif materyallerin herhangi biri *S. mutans* ve *E. faecalis* üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkinlik göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Restoratif materyaller, biyouyumluluk, DNA hasarı, antibakteriyel etki, *in vitro*

ABSTRACT

COMPARISON OF CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF RESTORATION MATERIALS USED IN PEDIATRIC DENTISTRY

Objective: In this doctoral thesis study, it was aimed to compare the cytotoxic-genotoxic effects of four different restoration materials currently used in pediatric dentistry on mouse fibroblast cells (L929) and their antibacterial activity on bacteria found in oral microbiota.

Materials and methods: In the first part of the study, the cytotoxic and genotoxic effects of three different restorative materials containing glass ionomers (ChemFil Rock (Dentsply Sirona, Germany), EQUIA Forte HT Fil GC, Japan) and Ruby Liner (Rubydent, Turkey)) and one alcite (Cention Forte, (Ivoclar Vivadent, Switzerland)) were investigated under *in vitro* conditions. Cytotoxicity evaluation was performed on L929 cell line by MTT method after 24 and 72 hours of incubation. Genotoxicity evaluation was performed by Comet method after 72 hours of incubation. The antibacterial effect of the materials was performed on *Streptococcus mutans (S. mutans)* and *Enteroccocus faecalis (E. faecalis)* by agar diffusion method. GraphPad Prisim Version 5.03 (GraphPad Software, Inc. CA, USA) program was used for statistical analysis of the study. The significance of the differences between groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical findings are given as mean ± standard deviation. Post hoc analysis was performed with Tukey's HSD test. The onset of statistical significance value for cytotoxicity was accepted as $p<0.0001$, while the onset of statistical significance value for genotoxicity was accepted as $p<0.05$.

Results: According to MTT test results (24 and 72 hours), all restorative materials were found to be cytotoxic ($p<0.0001$). According to the Comet test results, it was determined that all the materials studied had genotoxic properties. In addition, when the antibacterial activity of the materials was evaluated, no inhibition zone was formed around the materials.

Conclusion: All restorative materials tested were found to be highly cytotoxic ($p<0.0001$). All tested materials were genotoxic and there was no significant difference

between the genotoxic effects of the materials ($p>0.05$). However, none of the tested restorative materials showed any antibacterial activity on *S. mutans* and *E. faecalis*.

Keywords: Restorative materials, biocompatibility, DNA damage, antibacterial effect, *in vitro*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca üzerimde çok büyük emeği olan, değerli bilgi birikimi ve tecrübesiyle akademik hayatıma yön veren, sabır ve hoşgörüsünün yanı sıra her zaman destek ve sevgisini hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, tezimin tüm aşamalarında yol gösterici olan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Özlem Martı AKGÜN'e,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman istifade ettiğim Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı'nda görev yapan, saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Merve AKSOY ve Dr. Öğr. Üyesi Cenkhan BAL'a,

Doktora tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesi için laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen ve bunun için imkân sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Merve GÜDÜL BACANLI ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Nilgün ÜNAL'a,

Bu çalışmada her daim yardım ve desteklerini hissettiğim, bu süreci çok keyifli ve güzel hale getirmeleriyle birlikte bana kattığı en güzel dostlukları ve arkadaşlık ilişkilerini yaşatan Ecz. Jülide SECERLİ ve Ecz. Merve ŞAVLUK'a,

Bu yolun çok öncesinden yanımda olan, her daim destekçim çok değerli arkadaşım Dt. Elif Büşra Gül'e,

Doktora sürecimin son zamanlarından bu zamana kadar yanımda olduğunu bildiğim, her türlü zorluğu ve sevinci birlikte yaşadığım güzel arkadaşım Dt. Tuğçe Akçora'ya,

Destekleriyle bana hep mutluluk, güç ve neşe veren, sevgilim, yol arkadaşım Ahmet Nur DİNÇ'e,

Hayatım boyunca desteklerini her an hissettiğim, sevgi ve ilgileri ile hep yanımda olan, varlıkları ile beni her durumda mutlu eden; annem Gülsüm, babam Aziz ve kardeşim Berfin KAPLAN'a sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ceren KAPLAN DİNÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

TABLOLAR LİSTESİ xiii

ŞEKİLLER LİSTESİ xiv

RESİMLER LİSTESİ xv

SİMGELER VE KISALTMALAR xvi

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. İŞ ÇÜRÜĞÜ VE ETİYOLOJİSİ 3

2.1.1. Konak 4

2.1.2. Diyet 5

2.1.3. Zaman 5

2.1.4. Mikroorganizmalar 6

2.1.4.1. *Streptococcus mutans* 7

2.1.4.2. *Enterecoccus faecalis* 8

2.2. ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN RESTORATİF MATERYALLER 9

2.2.1. Amalgam 9

2.2.2.Cam İyonomer Simanlar 10

2.2.2.1.Rezin modifiye cam iyonomer simanlar (RMCİS) 11

2.2.2.2.Yüksek viskoziteli cam iyonomer simanlar (YVCİS) 12

2.2.2.3.Nano-iyonomer 13

2.2.2.4.Giomer 14

2.2.2.5. Cam karbomer® 15

2.2.2.6. Zirkonya takviyeli cam iyonomer simanlar (Zirconomer®) . 17

2.2.2.7. Seramik takviyeli cam iyonomer simanlar (Amalgomer CR®) 18

2.2.3. Poliasit Modifiye Kompozit Rezinler (Kompomer) 19

2.2.4. Kompozit Rezinler 20

2.2.5. Ormoserler 22

2.2.6. Alkasit 23

2.3. BİYOUYUMLULUK 24

2.3.1. Sitotoksisite 25

2.3.1.1. Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler . 27

2.3.1.1.1. Canlılık testleri 27

2.3.1.1.2. Yaşam testleri 27

2.3.1.1.3. Proliferasyon testleri 28

2.3.1.1.4. Metabolizma testleri 29

2.3.2. Genotoksisite 30

2.3.2.1. Ames testi (bakteri ters mutasyon testi) 32

2.3.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi 32

2.3.2.3. Kromozom aberasyon (KA) testi 33

2.3.2.4. Mikroçeşirdek (MÇ) testi 34

2.3.2.5. Tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet testi) 35

2.3.3. Hücre Kültürü 36

2.4. ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ 37

2.4.1. Difüzyon Testleri 38

2.4.1.1. Agar difüzyon testi 38

2.4.1.2. Epsilometer (E-Test) 39

2.5.1. Dilüsyon Testleri 39

2.5.1.1. Tüp Dilüsyon Testi 39
2.5.1.2. Agar Dilüsyon Testi 40
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. GEREÇ 41
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Gereçler 41
3.1.2. Hücre Kültürü İncelemesinde Kullanılan Araç ve Gereçler 43
3.1.3.Hücre Kültürü İncelemesinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler 44
3.1.4.Antibakteriyel Etkinlik İncelenmesinde Kullanılan Araç ve Gereçler .. 45
3.2.YÖNTEM 45
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmasında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması 45
3.2.2. L929 Hücrelerinin Çözülmesi 47
3.2.3. L929 Hücrelerinin Pasajlanması 47
3.2.5. Sitotoksisite Değerlendirme Testi 48
3.2.5.1. Sitotoksisite değerlendirmesi için test örneklerinin hazırlanması 48
3.2.4.2. MTT testinin uygulanması 50
3.2.5. Genotoksisite Değerlendirme Testi 53
3.2.5.1. Genotoksisite değerlendirilmesi için test örneklerinin hazırlanması 53
3.2.5.2. Comet testi 53
3.2.6. İstatistiksel Analiz 57
3.2.7.Antibakteriyel Etkinlik Testi 57
3.2.7.1.Test örneklerinin hazırlanması 57
3.2.8.2. Bakteri süspansiyonlarının elde edilmesi 58
3.2.8.3. Agar difüzyon testi 58
4. BULGULAR 61
4.1. SİTOTOKSİSİTE TEST SONUÇLARINA AİT BULGULAR 61

4.2.GENOTOKSİSİTE TEST SONUÇLARINA AİT BULGULAR 66

4.3. ANTİBAKTERİYEL ETKİ TESTİNE AİT BULGULAR 68

5. TARTIŞMA 71

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 85

7. KAYNAKLAR 89

ÖZGEÇMİŞ 105

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller ve üretici firma isimleri 41

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan materyallerin içeriği 42

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılacak materyallerin uygulama şekilleri ve polimerizasyon süreleri 49

Tablo 4.1. ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fill ve Cention Forte restorasyon materyallerinin 24. saatteki canlı hücrelerin absorbans değerleri ve oranları 61

Tablo 4.2. ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte restorasyon materyallerinin 72. saatteki canlı hücrelerin absorbans değerleri ve oranları 62

Tablo 4.3. Mosmann (148)'ın skalasına göre restoratif materyallerin sitotoksisite değerleri 63

Tablo 4.4. Comet yöntemine göre materyallerin ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Çürük etiyolojisi diyagramı (3) 4

Şekil 3.1.Çalışmada kullanılan restorasyon materyalleri A) Chemfil Rock (Dentsply Sirona, Almanya), B) EQUIA Forte HT Fil (GC, Japonya), C) Ruby-Liner (Rubydent, Türkiye), D) Cention Forte (Ivoclar Vivadent, İsviçre)..... 42

Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan amalgamatör ve ışık cihazı 43

Şekil 3.3. 96 kuyucuklu plakada ekstraktların yerleşim şeması..... 52

Şekil 4.1. Materyallerin 24. ve 72. saatteki hücre canlılık oranları..... 62

Şekil 4.2. Restoratif materyallerin 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı ($p<0,0001$) 64

Şekil 4.3. Restoratif materyallerin hücre canlılığına zaman içindeki etkileri ($p<0,0001$) 65

Şekil 4.4. MTT analizine göre 24 saat sonra hücre canlılıkları..... 66

Şekil 4.5. MTT analizine göre 72 saat sonra hücre canlılıkları..... 66

Şekil 4.6. Restoratif materyallerin L929 hücrelerindeki DNA hasarına etkisi ($p<0,005$) 67

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Yatay hücre kültürü şişelerine ekilmiş L929 hücreleri 47

Resim 3.2. Fare fibroblast hücreleri (L929) 48

Resim 3.3. MTT testi için hazırlanan materyal örnekleri 49

Resim 3.4. Hücre kültür süspansiyonlarının uzaklaştırılması 50

Resim 3.5. Çalışmada kullanılan tripan mavisi 51

Resim 3.6. Test örneklerinin 96 kuyucuklu plakalara eklenmesi 51

Resim 3.7. İnkübasyon işleminden sonra çözeltilerin uzaklaştırılması 52

Resim 3.8. 6 kuyucuklu plakalara besiyeri eklenmesi 54

Resim 3.9. 6 kuyucuklu plakada test örneklerinin yerleşimi 54

Resim 3.10. Mikrosantrifüj tüplerindeki hücre süspansiyonlarının agar ile kaplı lam ile lamel arasına yerleştirilmesi 55

Resim 3.11. Hazırlanan lamların soğuk elektroforez tankına yerleştirilmesi 55

Resim 3.12. Elektroforez işlemi için karanlık ortamın hazırlanması 56

Resim 3.13. Comet testinin uygulama basamakları (147) 56

Resim 3.14. Agar difüzyon testi için hazırlanan numuneler 58

Resim 3.15. Bakterilerin besiyerlerine ekimleri 59

Resim 3.16. Hazırlanan örneklerin besiyerine ekimleri 59

Resim 3.17. Hazırlanan petrilerin inkübasyona bırakılması 60

Resim 4.1. Restoratif materyaller ile kültüre edilen L929 hücre kültürünün inkübasyonun 24. saatindeki mikroskobik görüntüsü 63

Resim 4.2. Restoratif materyaller ile kültüre edilen L929 hücre kültürünün inkübasyonun 72. saatindeki mikroskobik görüntüsü 64

Resim 4.3. Kontrol grubu ve restoratif materyallerin DNA hasar görüntüleri 68

Resim 4.4. 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda disklerin görünümü 69

Resim 4.5. 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda disklerin ve siprofloksasin diskinin görünümü 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA : Analysis Of Variance (Varyans Analizi)
ART : Atravmatik restoratif tedavi
BALB/3T3 : Fare embriyo fibroblastı
BHI : Brain Heart Infusion
Bis-GMA : Bisfenol Glisil Metakrilat
BrdU : 5- bromo-2'-deoxyuridine
ca 9.22 : İnsan gingival karsinom hücresi
cfu : Coloni-Forming Units
CHO : Çin fare yumurtalık hücreleri
CİS : Cam iyonomer siman
CO2 : Karbon dioksit
COMET : Tek Hücre Jel Elektroforez
DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMF : Dimetil formamid
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
E. faecalis : Enterecoccus faecalis
EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr : Etidiyum Bromür
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FBS : Fetal Sığır Serum
FISH : Floresan in situ hibridizasyon
F-PRG : Tüm akfif partiküller
H2O2 : Hidrojen peroksit
hDPSC : İnsan dental pulpa kök hücresi
HeLa : İnsan servikal karsinom hücreleri
HEMA : Hidroksil metakrilat
IC50 : İnhibisyon konsantrasyonu
ISO : International Organization for Standardization

ITR : İnterim teröpatik tedavi
KA : Kromozom aberasyonu
KB : İnsan oral karsinom
KKD : Kardeş kromatid değişimi
L929 : Fare fibroblast hücreleri
LMA : Düşük erime noktalı agar
MİK : Minimum inhibitör konsantrasyonu
MH-F : Mueller-Hinton Fastidious
MÇ : Mikroçekirdek
MTS : 2-(2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H)
MTT : 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür
mW/cm2 : Güç yoğunluğu
Na2EDTA : Disodyum Etilendiamin tetraasetik asit
NaCl : Sodyum klorür
NaOH : Sodyum hidroksit
NMA : Normal erime noktalı agar
NR : Nötral kırmızı
PBS : Fosfat tampon solüsyonu
PDSC : Periodonsiyumdan türetilmiş kök hücreler
PEGDMA : Polietilen glikol dimetakrilat
PES : Fenazin etil sülfat
pH : Asit-Baz değeri
PMS : Fenazin metil sülfat
RMCİS : Rezin modifiye cam iyonomer siman
rpm : Rotations per minute
S. mutans : Streptococcus mutans
SiO2 : Silisyum dioksit
S-PRG : Yüzey aktif partiküller
TEGDMA : Trietilen glikol dimetakrilat
TiO2 : Titanyum dioksit
UDMA : Üretan dimetakrilat
V79 : Çin fare akciğer hücreleri

Vero	: Maymun böbrek epitel hücreleri
WST-1	: (2- (2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H)
XTT	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid)
YVCİS	: Yüksek viskoziteli cam iyonomer siman
3T3	: İsviçre fare fibroblastı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, toplumda oldukça yaygın görülen multifaktöriyel etiyolojili, kronik ve progresif dinamikli bir hastalık sürecidir. Diş çürükleri tedavi edilmediklerinde çiğnemede fonksiyon kayıplarına, estetik problemlere, sistemik veya odontojenik enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Çürük oluşumu ve gelişimine üç temel faktör etkilidir. Bunlar; duyarlı konak yapısı, gerekli miktarda besin ve karyojenik mikrobiyata olarak sınıflandırılmaktadır. Bu temel faktörlerin yanı sıra; sosyokültürel düzey, eğitim, bireysel ve çevresel davranışlar da çürük oluşum ve gelişiminde etkilidir (1).

Oral kavite; dişler, dişetleri, dil gibi farklı özelliklere sahip sert ve yumuşak dokulardan oluşmaktadır. Ağız içerisinde 700'den fazla çeşit mikroorganizma bulunmaktadır. Bunlardan sadece karyojenik özellik gösteren mikroorganizmalar çürüğe sebep olmaktadır. Oral kavitedeki mikrobiyal plak bileşenleri, genetik açıdan farklı ve konak yüzeylerinde birlikte yaşayan çok sayıda bakteri kaynaklı biyofilmlerdir. Oral mikrobiyotada bulunan mikroorganizmaların birbirinden farklı ve önemli rolleri mevcut olup, konak ve birbirleriyle farklı şekillerde etkileşime girmektedirler (1,2).

Mikroorganizmalar diş çürüğünün oluşmasında ve ilerlemesinde büyük bir rol oynamaktadır. *Streptococcus mutans (S. mutans),* çürük oluşumundan sorumlu en temel birincil bakteridir. Ayrıca *Lactobacillus, Actinomyces* ve *Streptococcus* gibi farklı mikroorganizma türlerinin çürük oluşumunda ve ilerlemesinde etkin unsurlar olduğu bildirilmektedir (3,4). *Enterococcus faecalis (E. faecalis)* ise gram-pozitif kok olup, oral kavitede ve mikrobiyal dental plakta bulunan bir fırsatçı patojen bakteridir. Bu mikroorganizma daha çok periodontitis, bağışık sistemi baskılanmış bireylerde mukozal lezyonlar ve en önemlisi kök kanal enfeksiyonları ile ilişkilendirilmektedir (5).

Diş çürükleri, oral dokularda fonksiyon kayıplarına ve estetik problemlere neden olmaktadır. Bu kayıpları telafi etmek için geçmişten günümüze pek çok farklı restoratif materyal üretilmiş ve kullanılmıştır. Diş hekimliğinde, teknolojideki gelişmelere paralel olarak piyasaya yeni dental restoratif materyaller sürülmektedir. Bu yeni materyallerin geliştirilmesindeki temel amaç, geçmişte kullanılan

materyallerin en iyi özelliklerini alıp dezavantajlarını elimine etmektir. Dolayısıyla halen dental restoratif materyaller modifiye edilerek amalgamın dayanıklılığını, cam iyonomerin biyolojik özelliklerini ve kompozitin estetik üstünlüklerini barındıran yeni nesil restoratif materyal arayışı devam etmektedir (6–8).

Günümüzde klinik pratikte gerekli ihtiyaçlar dahilinde farklı özelliklere sahip çeşitli restorasyon materyalleri kullanılmaktaysa da çocuk diş hekimliğinde cam iyonomer içerikli materyaller klinik kullanımda sık tercih edilmeleri sebebiyle öne çıkmaktadır. Restoratif materyaller diş dokusuna uygulandığında, pulpanın canlılığını devam ettirebilmesi için uygulanan materyalin toksik olmaması ve bakteri penetrasyonunu engelleyecek şekilde diş dokusuna uzun süreli hermetik bir bağlanma sağlaması gerekmektedir. Bazı cam iyonomer içerikli restoratif materyallerin, yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarı ve hücre ölümü yoluyla sitotoksik ve genotoksik etkilere sebep olduğu bildirilmektedir. Ancak bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (9).

İntraoral bir restorasyonun uzun dönem başarısı ve hücre düzeyindeki etkileri materyal tercihini belirleyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (10). Literatürde farklı ihtiyaçlar dahilinde kullanılan dental materyallerin sitotoksik, genotoksik ve antimikrobiyal özellikleri hakkında birçok sayıda yayın yapılmıştır (11–14). Buna karşın, çocuk diş hekimliğinde güncel olarak kullanılan restoratif materyallerin bu özelliklerini karşılaştırmalı olarak incelendiği *in vitro* çalışma sayısı oldukça azdır. Bu tez çalışmasında amaç, süt dişlerini restore etmek için kullanılan farklı içeriklere ve özelliklere sahip restorasyon materyallerinin sitotoksisitesinin, genotoksisitesinin ve antibakteriyel etkinliklerinin *in vitro* koşullarda incelenmesidir.

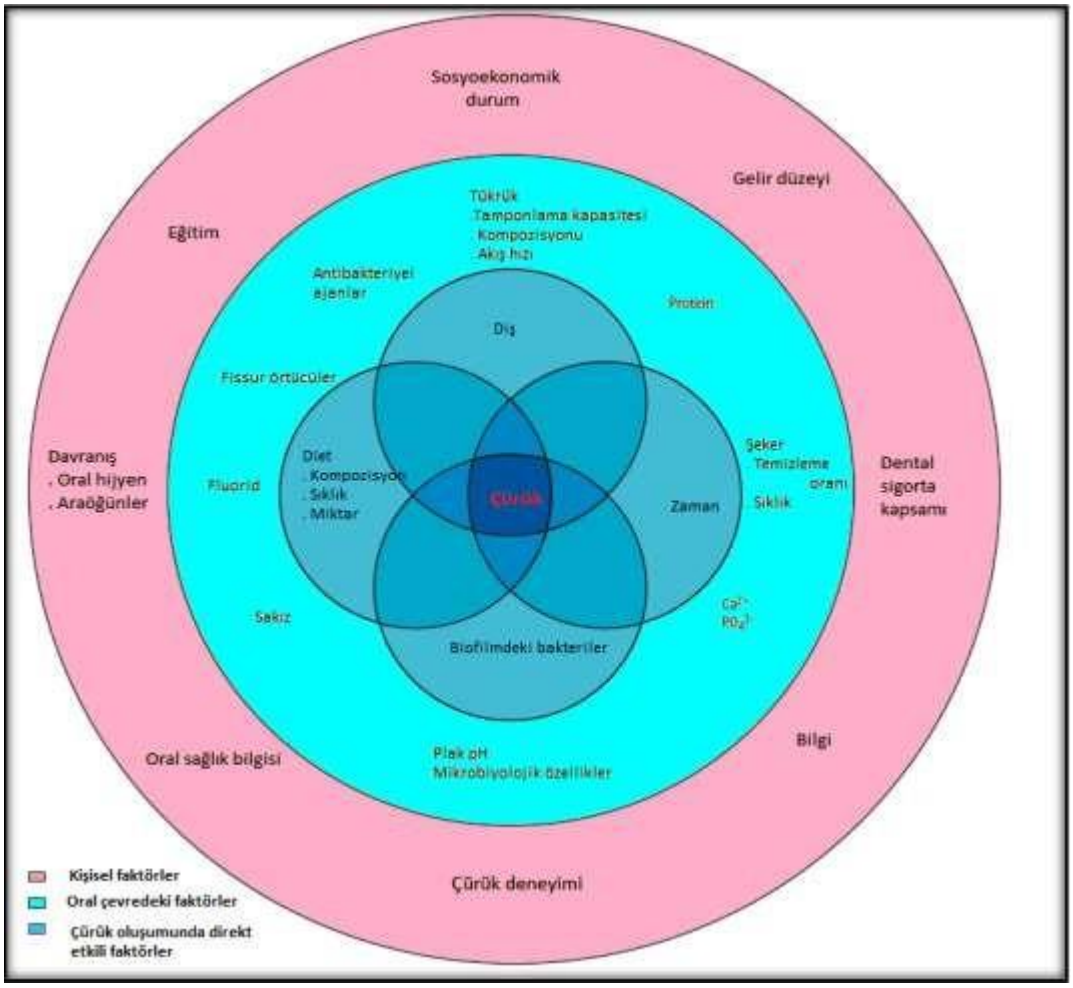
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İŞ ÇÜRÜĞÜ VE ETİYOLOJİSİ

Oral kavite; dil, diş, dişeti, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı gibi sert ve yumuşak dokuları bir arada bulunduran eşsiz bir ekosistemdir ve insan vücudundaki diğer alanlara kıyasla en fazla mikroorganizmanın bulunduğu bölgedir. Bilimsel çalışmalar, ağız florasında 700'den fazla mikroorganizma türünün oral mukozada, periodontal bölgede, diş yüzeylerinde, dilde ve benzeri alanlarda koloni oluşturduğunu ortaya koymuştur (4,15).

Faydalı ve zararlı olmak üzere milyonlarca mikroorganizmanın dengede olduğu bir ağız florası sağlıklı kabul edilmektedir (16). Sağlıklı kabul edilen bir ağız florasında, dengenin zararlı mikroorganizmalar yönünde bozulması ilk olarak ağızda, daha sonra tüm vücutta farklı sorunlar oluşmasına sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalar, oral mikrobiyal dengenin bozulması ile diş çürüğü ve periodontal hastalıklar olmak üzere iki temel rahatsızlığın oluştuğunu ortaya koymuştur (1,4). Oral floradaki mikrobiyal dengenin bozulmasına sebep olan faktörlerin başında; yetersiz ağız hijyeni, kötü ağız alışkanlıkları, ağız hijyen ürünlerinin kontrolsüz kullanımı ve vücuttaki hormon değişimine neden olan bazı ilaçlar gelmektedir (16).

Diş çürüğü dünya çapında en sık görülen ağız hastalığıdır. Fiziksel, sosyal, psikolojik, biyolojik ve ekonomik açıdan etkileri olan diş çürükleri, çocuk ve ergenlerin çoğunu etkilemektedir. Diş çürüğü mikrobiyal, davranışsal, genetik ve çevresel faktörleri içeren çok faktörlü bir hastalıktır (1,4). Ağız ortamındaki karyojenik mikroorganizmaların fermente olabilen karbonhidratları metabolize etmesiyle oluşan asitlerin, diş sert dokularını demineralize etmesi sonucunda diş çürüğü meydana gelmektedir (17). Çürük oluşumunda dört temel etken söz konusudur. Bunlar; mikroorganizma varlığı, fermente olabilen karbonhidratlar (diyet), konak ve zamandır (Şekil 2.1). Multifaktöriyel etiyolojiye sahip olan diş çürüğünün oluşmaması için, bu temel faktörlerden birinin eksik olması yeterlidir (3,4). Çürük oluşumunu dolaylı olarak etkileyen faktörler ise tükürük, sosyoekonomik düzey, immün sistem, beslenme, eğitim seviyesi, fırçalama alışkanlıkları ve ağız hijyeni gibi faktörlerdir (3). Çürük gelişiminde bu faktörler önemli olmasına rağmen mikrobiyal faktörlerin rolü göz ardı edilemez (4).



Şekil 2.1. Çürük etiyolojisi diyagramı (3)

Diş sert dokuları mine, dentin ve sement olmak üzere yoğun mineral içerikli yapılar olup, demineralize olmaları zordur. Ancak bahsedilen temel faktörler ve çeşitli sonucunda dişin bu inorganik yapılarında yumuşama, iyon kayıpları ve demineralizasyon görülmektedir. Diş minesinde demineralizasyonun oluşabilmesi için kritik pH 5,5'tir. Kritik pH'ın altında mine yapısında bozunmalar oluşmaktadır. Çürüğün en erken belirtisi, mine yüzeyindeki madde kayıpları yani opak beyaz nokta lezyonlarıdır. Demineralizasyonun devam ettiği durumlarda kavitasyon oluşumları, müdahale edilmediği takdirde progresif patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (17,18).

2.1.1. Konak

Diş çürüklerinin etiyolojik unsurlarından diş ile ilgili faktörler önemli bir yere sahiptir. Kişinin sağlık durumu, dişlerin pozisyonu, morfolojisi, yüzey yapısı, tükürük pH'ı, akış hızı ve kalitesi çürük oluşum mekanizmasını olumlu veya olumsuz yönde

etkilemektedir (3). Diş minesinin çözünürlüğü, yapısındaki hidroksiapatit kristallerinin yapısı ve sıklığı, çürük oluşumunu etkileyen unsurlar arasındadır. İlk sürdükleri dönemde dişlerin mineralizasyonları tam olarak tamamlanmamıştır. Bu sebeple minenin geçirgenliği oldukça fazla ve çürüğe karşı duyarlıdır. Dişler sürdükten sonraki bir iki yılda, hidroksiapatit yapısındaki magnezyum ve sodyum iyonları ağız ortamındaki kalsiyum ve fosfat iyonları ile yer değiştirmekte ve bu sayede hidroksiapatit kristallerinin yapısındaki kalsiyum ve fosfat iyonlarının artışı ile minenin çözünürlüğü azalmaktadır. Dolayısıyla dişlerin çürüğe karşı dirençleri artmaktadır (3,19).

2.1.2. Diyet

Bireyin diyetindeki besin içeriği ve tüketim sıklığı, çürük oluşumunda etkili unsurlardandır. Şeker tüketim sıklığı, çürük oluşumundaki temel diyet değişkenlerindendir (3). Oral kavitedeki mikroorganizmalar, monosakkarit ve disakkaritleri metabolize ederek asit oluşturmaktadır. Karbonhidratlar metabolize olduktan sonra ortamdaki asidin nötralize olup uzaklaşması 20 ile 40 dakika arasında gerçekleşmektedir. Ortaya çıkan asitler, diş sert dokularında demineralizasyon oluşumunu indüklemektedir. Çürük riskinin en çok arttığı durum; şeker ve türevlerinin ağız içerisinde uzun süre kaldığı ve sık aralıklarla tüketilmesidir. Ayrıca, bir besinin yapışkan olup olmaması, karbonhidrat tipi ve miktarı, içerisinde koruyucu madde bulunup bulunmaması, kimyasal ve fiziksel özellikleri gibi çeşitli unsurlar da diş çürükleriyle ilişkilidir (19,20).

2.1.3. Zaman

Bireye ait unsurlar, uygun ortam, diyetteki besinlerin içeriği ve alım sıklığı gibi faktörlere ek olarak besinlerin ağız ortamında kaldığı süre de çürük oluşumda oldukça önemli bir faktördür. Çürük oluşumu için karbonhidratların karyojenik mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek asit ortaya çıkarması gereklidir. Fakat çürük oluşumu için gerekli olan bütün unsurlar, en az 30 dakika bir arada bulunmalıdır. Bu, çürük oluşumunda etkin olan bir diğer temel faktörün zaman olduğunu vurgulamaktadır (19,20). Konu dahilinde yapılan çalışmalar, şeker alım süresi ve sıklığının çürük oluşma ihtimalini arttırdığını göstermektedir. Özellikle yapışkan

şekerlerin tüketiminde, besinin ağız ortamında kalma süresinin arttığı dolayısıyla çürük oluşma riskinin yükseldiği bildirilmiştir (7,20).

2.1.4. Mikroorganizmalar

Diş çürüğünün mikrobiyolojik açıdan oluşum süreci ile ilgili pek çok teori bulunmaktadır. Ancak diş çürüğünün etiyolojisine yönelik teoriler, moleküler mikrobiyolojinin gelişmesi ve gelişmiş araştırma yöntemlerinin tanıtılmasına paralel olarak hala gelişmektedir (21). Günümüzde diş çürüğü oluşumuna ağız florasında bulunan mikroorganizmaların neden olduğu düşünülmektedir. Ağız mikroflorası ve mikroorganizmalar arasında mikrobiyolojik olarak dinamik bir denge mevcuttur. Bu mikrobiyolojik dengenin bozulduğu durumlarda; diş çürükleri ve periodontal hastalıklar ortaya çıkmaktadır (4,16).

Çürük oluşumunda etkin olan bakteriler, 'karyojenik bakteriler' olarak adlandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalar, sağlıklı bir ağız florasında zararsız bir şekilde bulunurken, çeşitli koşulların değişimiyle hastalık yapıcı özellikler taşıyan fırsatçı patojenlere dönüşmektedir (1). Çeşitli çalışmalar, çürük etiyolojisinde yer alan mikroorganizmaların rolü hakkında farklı bir bakış açısı ortaya koymuştur. Araştırmacılar tarafından "genişletilmiş ekolojik çürük hipotezi" olarak adlandırılan bu yaklaşımda birçok mikroorganizmanın diş çürüğüne sebep olabileceğini vurgulamıştır. Çürük oluşumunda en etkin bakteri türleri; *Streptococcus, Lactobacillus* ve *Actinomyces* gruplarıdır (19,21,22).

Streptococcus mutans, diş çürüklerinin en yaygın nedenlerinden biridir. Özellikle şekerli ve nişastalı gıdalarla beslendiğinde, bu bakteri asit üreterek diş minesine zarar vermektedir. *Streptococcus sobrinus, S.mutans'*a benzer şekilde diş çürüklerine neden olan bir diğer bakteri türüdür. Şeker metabolizması sonucu asit üreterek diş minesini demineralize etmektedir. *Streptococcus salivarius,* ağız boşluğundaki normal mikrobiyota içinde bulunan bir bakteri türüdür. Ancak bazı durumlarda, çürük oluşumuna katkıda bulunmaktadır (23,24).

Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei ve *Lactobacillus fermentum* ağız boşluğunda bulunan ve en sık rastlanan *Lactobacillus* türevleridir. Bu gruptaki bakteriler, özellikle çürük oluşumunun ilerlemiş aşamalarında etkin rol oynamaktadır

ve şeker metabolizması sonucu laktik asit üreterek diş çürüklerinin oluşumunu hızlandırmaktadır (1,22).

Actinomyces türleri, ağız boşluğundaki plakta ve diş minesinde bulunan bakteriyel tabakada çoğalmaktadır. Bu bakteriler, genellikle diş minesinin altındaki dentin tabakasına nüfuz ederek çürük oluşturmaktadır. *Actinomyces*, asit üreterek diş minesini zayıflatabilmekte ve diş çürüklerinin oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Özellikle diş eti hastalıkları veya ağız hijyeninin ihmal edilmesi durumunda *Actinomyces*'in diş çürüklerinde daha etkin bir rol oynaması mümkündür. Ancak diş çürüklerindeki ana etken genellikle *Streptococcus* ve *Lactobacillus* gibi bakteri türleridir (1,2).

Güncel araştırmalar, diş plağında bulunan ve şu ana kadar karyojenik olarak değerlendirilmeyen *E. faecalis, Propionibacterium, Bifidobacterium Streptococcus oralis* ve *Actinomyces viscosus* gibi diğer mikroorganizmaların da çürük oluşumunda etkin olduğunu bildirmektedir (2,4,23).

2.1.4.1. Streptococcus mutans

Streptococcus mutans, Clarke tarafından 1924 yılında insan çürük lezyonlarından izole edilmiş bir mikroorganizmadır (25). *S. mutans*lar, ortalama 0,5-0,75 µm çapında, gram-pozitif koklardır. Bu mikroorganizma türü asidik koşullarda, sıvı veya katı ortamlarda, yaklaşık 1,5-3,0 µm uzunluğunda kısa çubuklar şeklinde gözlenebilmektedir (26). 1950'li yıllarda *S. mutans* ile ilgili bilimsel çalışmalar artış göstermiş, 1960'larda ise *S. mutans'*ın diş çürüğünün temel etiyolojik faktörü olduğu bildirilmiştir. *S. mutans*'ın 3 karyojenik unsuru; asidürik, asidojen ve adezyon özelliklerinden kaynaklanmaktadır (25). 1975 yılında *S. mutans*'ın, düşük veya yüksek çürük prevalansına sahip neredeyse bütün bireylerde bulunabileceği vurgulanmıştır (27).

Oral kavitenin karyojenik mikroorganizmaları arasında yer alan *S. mutans,* çok geniş bir yayılım göstermektedir. Bu mikroorganizma, pit ve fissürlerde, molar aproksimal ve anterior aproksimal yüzeylerde yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca dişlerin düz yüzeylerinde de kolonize olabilmektedir (24). *S. mutans* suda çözünmeyen ekstraselüler glikoz polimerleri üreterek bakterilerin diş yüzeyinde koloni oluşturmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte diyet ile alınan sakkarozu fermente

ederek asit oluşumuna ve minenin çözülmesine neden olmaktadır (22,24). Oral kavitede, *S. mutans* popülasyonunun özellikle yüksek sükroz içerikli besin tüketimiyle arttığı bildirilmektedir. *S. mutans*, sükrozu glikoziltransferaz enzimiyle glikoz ve fruktoza parçalanmaktadır. Glukan glikoz zincirlerinin, fruktan ise fruktoz zincirlerinin oluşturduğu yapı olarak adlandırılmaktadır. Glukan yapışkan bir yapıda olması nedeniyle diş yüzeyine kolaylıkla tutunabilmektedir. Bununla birlikte tükürüğün koruyucu ve tamponlayıcı özelliğini de değiştirmektedir. *S.mutans*'ın ortamda uygun karbonhidrat bulunmamasına karşılık karbonhidrat rezervi gören instrasellüler polisakkarit sentezleme özelliğine de sahip olduğu bildirilmiştir (1,25).

2.1.4.2. Enterecoccus faecalis

Enterococcus faecalis, ilk kez 1899 yılında Theodor Escherich tarafından bağırsak florasında izole edilmiştir. O dönemde, *Streptococcus* grubuna dahil edilmiş ve "*Streptococcus faecalis*" adı verilmiştir. Daha sonra bakterinin *Enterococcus* grubuna ait olduğu anlaşılmış ve günümüzde kullanılan ismini almıştır (28). *E.faecalis*'in ağız ortamında izole edilmesi ise, ilk kez 1935 yılında gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, diş kök kanallarındaki enfeksiyonlarla ilişkilendirilen bakterileri incelerken *E.faecalis*'i ağız ortamında tespit etmişlerdir (29). *E.faecalis*, yaklaşık 0,5-2 µm çapında gram-pozitif, katalaz negatif ve oksidaz negatif bir bakteri türüdür. Glukozu fermente ederek gaz üretimine sebep olan, laktik asit fermantasyonu gibi anaerobik ve aerobik koşullarda yaşayabilen bir bakteridir (23,29). Bu bakteri türü ağız ortamında endodontik, periodontal enfeksiyonlar, diş çürükleri ve periaapikal abse ile ilişkilendirilmektedir (30).

Oral kavitenin olası fırsatçı mikroorganizması olan *E. faecalis*, oral mukozada, diş yüzeylerinde, dişler arasındaki boşluklarda, dişeti cebinde ve dil yüzeyinde yer almaktadır (29). Dental plak içinde ve diş kök kanallarında enfeksiyon durumlarında, *E. faecalis* sıklıkla bulunmaktadır. En yaygın olarak, diş kök kanallarında enfeksiyonlara neden olmaktadır (23,24). *E. faecalis* özellikle glukoz, laktoz, fruktoz ve sakkaroz gibi şekerleri glikoliz yolu ile metabolize etmekte ve asit üretmektedir. Böylelikle diş çürükleri oluştuğunda bu çürük lezyonlarında çoğalarak, çürüklerin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, periodontal doku hastalıklarının oluşumu ve ilerlemesinin etiyolojik unsurları arasında *E. faecalis* yer almaktadır (5,23). Bu

bakteri, diş yüzeylerine ve kök kanallarına yapışabilmekte ve biyofilm tabakası oluşturabilmektedir. Bu biyofilm tabakası bakterilerin korunmasına ve direnç geliştirmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların çevreleriyle etkileşim kurmalarına, antibiyotiklere ve diğer stres faktörlerine karşı direnç geliştirmelerine olanak tanımaktadır (23).

2.2. ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN RESTORATİF MATERYALLER

2.2.1. Amalgam

Amalgam; içerisinde cıva bulunduran bir metal alaşımıdır. Dental amalgam ise; kütlesel olarak eşit miktarda toz metal alaşımı ile sıvı cıvanın karışımı ile elde edilmektedir. Dental amalgam, diş hekimliğinde kullanılan çok yönlü restoratif materyaller arasında yer almaktadır. Bu materyal, 100 yılı aşkın bir süredir diş hekimleri tarafından kullanılmaktadır. Amalgam, klinisyenler tarafından uygulanan restoratif materyallerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır (31). Günümüzde amalgama alternatif daha ekonomik bir materyal henüz keşfedilmemiştir. Bu materyal klinisyenler tarafından hala tercih edilmektedir. Bunun sebebi amalgamın pek çok avantaja sahip olmasıdır. Bunlardan bazıları; mükemmele yakın mekanik özellikler, uygulama kolaylığı ve uzun dönemde restorasyon başarısının yüksek olmasıdır (32). Dental amalgamlar içerdikleri bakır oranlarına göre 2' ye ayrılmaktadır. Bunlar; düşük bakırlı amalgamlar (%5'tan az bakır içerenler), yüksek bakırlı amalgamlar (%10-30 oranında bakır içerenler) olarak sınıflandırılmaktadır (31).

Amalgam; geniş ve büyük kavitelerde, posterior bölgedeki restorasyonlarda, estetik gereksinimin olmadığı bölgelerde ve oral hijyenin yetersiz olduğu hastalarda tercih edilmektedir (32). Daimi dişler ve süt dişlerinin arka grup Sınıf I, II ve V, ön grup dişlerin palatinal/lingual pit restorasyonlarında, küçük ve büyük azı dişlerinin diş etine yakın olan kavitelerinde, kök kanallarının retrograd olarak doldurulmasında ve kor materyali olarak kullanılmaktadır (33).

Amalgam, uygulaması kolay ve teknik hassasiyet gerektirmeyen bir materyaldir. Nemli ortamlarda çalışmaya izin vermektedir, anatomik yapıları korumaktadır, kırılma dayanımı yüksektir ve marjinal sızıntıya daha az neden olmaktadır (33,34). Ayrıca stres kırıcı alanlarda kullanılabilmek ve marjinlerde

meydana gelen korozyon ürünleri ile ara yüzdeki minimal boşlukları doldurmak gibi avantajlara da sahiptir (33).

Amalgamın cıva toksisite riski, diş dokularına mekanik olarak bağlanma, ağız ortamında galvanik akım oluşturma, ısıyı fazla iletmesinden dolayı hassasiyet oluşturma ve estetik açıdan kötü olması gibi çeşitli dezavantajları mevcuttur (31,34). Ayrıca, estetik olarak diş rengiyle uyumsuz olması, korozyon ve galvanik akım meydana getirebilmesi nedeniyle diş ve restorasyon marjinlerinde yıkıma sebep olması, zayıflamış olan diş yapısını korumaya yardım edememesi gibi dezavantajlar amalgam kullanımını kısıtlamaktadır (34).

2.2.2.Cam İyonomer Simanlar

Cam iyonomer simanlar (CİS), Wilson ve Kent tarafından geliştirilerek 1972 yılında diş hekimliğine tanıtılmıştır. Toz likit karışımı ile elde edilen cam iyonomer simanlar; floro-alümino silikat cam tozu ve poliakrilik asidin likidi, tartarik asit, itakonik asit birleşiminden oluşmaktadır (35).

Cam iyonomer siman; florür salınımı yapan, sertleşme reaksiyonu esnasında düşük ısı açığa çıkaran, diş dokularıyla uyumlu genleşme kat sayısına sahip, serbest monomer açığa çıkarmayan biyouyumlu bir materyaldir (36,37). Pozitif özelliklerinden dolayı günümüz çocuk diş hekimliğinde oldukça farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Oklüzal pit ve fissür örtücü olarak, süt dişlerinin restorasyonlarında, lingual yerleşimli olan Sınıf III kavitelerde, çok geniş yerleşimli olmayan Sınıf V kavitelerde, restorasyonların bozulan marjinlerinin onarılmasında, kavite preparasyonu yapılmaksızın erozyon lezyonlarında kullanımları endikedir. Ayrıca, atravmatik restoratif tedavi (ART) ve interim teröpatik tedavi (ITR) uygulamalarında, paslanmaz çelik kuron veya yer tutucu simantasyonunda ve daimi dişlerin geçici restorasyon materyali olarak kullanılmaktadır (36–38).

Cam iyonomer simanların, flor salınımı yapabilmeleri ve biyouyumlu olmaları gibi olumlu özelliklerinden dolayı çocuk diş hekimliğinde önemli bir yeri olsa da kırılma dayanımlarının düşük ve estetik özelliklerinin yetersiz olması nedeniyle bu materyalin kullanımında sınırlamalar mevcuttur (37). Son yıllardaki gelişmeler sayesinde cam iyonomerlerin olumsuz özelliklerinin üstesinden gelebilmek amacıyla materyale yeni özellikler eklenmiştir. Bu özellikler, materyalin yapısına biyoaktif cam

partiküller, metal iyonları, antibakteriyel ajanlar, fiberler ve nanopartiküller eklenerek elde edilmektedir (39,40). Bu şekilde geleneksel cam iyonomer simanların (GCİS) fiziksel, mekanik ve antibakteriyel özellikleri güçlendirilmeye çalışılmıştır (39). Bunun yanında yeni nesil CİS'lerın tüm özelliklerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda incelenmesine ihtiyaç vardır.

2.2.2.1. Rezin modifiye cam iyonomer simanlar (RMCİS)

1980'li yıllarda GCİS'lerin düşük mekanik özelliklerinin ve neme duyarlılığının giderilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu materyal, GCİS'in içerisine, bisfenol glisil metakrilat (Bis-GMA) veya hidroksil metakrilat (HEMA) monomer rezinlerin eklenmesiyle elde edilmiştir (41). RMCİS'lerin likit kısmını poliakrilik asit, tartarik asit, metakrilat grupları, poliakrilik asit ve su oluştururken; toz kısmını ise floroalüminosilikat cam partikülleri oluşturmaktadır (38). RMCİS, %80 cam iyonomer, %20 rezinden oluşmaktadır. Bu materyalin, diş dokularına adezyonu GCİS'la benzerlik göstermektedir (42).

Rezin modifiye cam iyonomerler ilk olarak kaide materyali veya liner olarak kullanılmıştır. Ancak günümüzde, RMCİS'ler süt dişlerinde sınıf I, I, II, III ve V kavitelerin, daimi dişlerde ise minimal boyuttaki Sınıf I, II ve III kavitelerin restorasyonunda da kullanılmaktadır. Ayrıca pit ve fissür örtücü olarak da klinik kullanımları mevcuttur (37).

Rezin modifiye cam iyonomerlerin, GCİS'lara göre çeşitli avantajları vardır. RMCİS'lerin aşınma dirençleri ve kırılma dayanımları GCİS'lerden daha yüksektir. Ayrıca GCİS'lere göre çözünürlükleri daha azdır (37). RMCİS'ler, daha iyi kenar uyumu ve estetik özellik sergilemektedir (43). Buna ek olarak flor salınımı, diş dokularına benzer genleşme, reşarj olma ve fiziko-kimyasal olarak bağlanma özellikleriyle geleneksel cam iyonomerlerin avantajlarına da sahiptir (36,38).

Rezin modifiye CİS'ler, ışıkla da sertleştikleri için polimerizasyon büzülmesine uğramaktadır. Bunun sonucunda; mikrosızıntı, renklenme ve post operatif hassasiyet gibi olumsuz özellikler sergilemektedir. Bu materyalin diğer dezavantajı ise; flor salınımlarının GCİS'lerden daha düşük olmasıdır (42). Ayrıca, RMCİS'ler içerisinde HEMA monomeri bulunması sebebiyle geleneksel cam

iyonomerlerden daha az biyouyumludur. Bunun sebebi ise; artık monomer olarak HEMA salınımı olmasıdır (43).

Literatürde RMCİS'lerin de antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Bu antimikrobiyal aktivite, florür ve metalik iyonlar dahil olmak üzere kimyasal bileşenlerin salınmasından ve düşük başlangıç pH'ından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, RMCİS'lerin içerisindeki stronsiyum iyonlarının salınımı aynı zamanda florür ile sinerjistik bir antibakteriyel etki de gösterdiği bildirilmiştir (44).

2.2.2.2. Yüksek viskoziteli cam iyonomer simanlar (YVCİS)

Yüksek viskoziteli cam iyonomer simanlar (YVCİS), GCİS'lerin zayıf mekanik özelliklerini geliştirmek ve neme karşı hassasiyetlerini azaltmak amacıyla üretilmiştir. Kondanse olabilen cam iyonomer siman olarak da bilinen bu siman, 1990'lı yıllarda tanıtılmıştır (45). Bu materyal, GCİS'lerin aşınma dirençlerini artırmak ve çiğneme stresinin yüksek olduğu bölgelerde kullanılmalarını sağlamak için farklı yeniliklerle geliştirilmiştir (46). Geliştirilen özelliklerden dolayı amalgam ve kompozit rezinin alternatifi olmaları hedeflenmiştir (38,41). YVCİS'lerin partikül boyutları, toz-likit oranı ve dağılımları değiştirilerek mekanik özellikleri ve aşınma dirençleri artırılmıştır. GCİS'ler 3:1 veya 4:1 toz likit oranına sahip iken, bu oran YVCİS'lerde 6:1 veya 7:1'dir (38). YVCİS'lerin cam ve likit içeriğindeki değişimler, toz/likit oranında farklılıklar ve karıştırma yöntemleri materyalin mekanik özelliklerini etkilemektedir. Diş hekimliği pratiğinde; doğru toz/likit oranı belirlenmesi ve el ile karıştırılmasının zorlu olması nedeniyle kapsül formları geliştirilmiştir (37,45).

Atravmatik restoratif tedavi uygulamalarında kullanılmak üzere üretilen yüksek viskoziteli cam iyonomerlerin, klinik başarılarının yüksek olması nedeniyle kullanım alanları genişlemiştir (45). Günümüzde YVGCİS'ler; süt dişlerinde I, II, III ve V kavitelerde, ART tedavilerinde, pit ve fissür örtücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca daimi dişlerde sandviç tekniğinde, sınıf I, V ve küçük boyuttaki sınıf II kavitelerde de kullanım endikasyonları mevcuttur (47).

Yüksek viskoziteli CİS'lerin fiziksel ve mekanik dayanımları geleneksel cam iyonomer ve RMCİS'lere göre daha yüksektir (37). Bunun sebebi, materyalin içeriğindeki cam partiküllerinin küçültülerek simana kondanse olma özelliğinin

kazandırılmasındandır. Sertleşme mekanizması geleneksel simanlarla aynı olmasına rağmen, sertleşme süresi daha kısadır (42). Bu sebeple, nem kontaminasyon ihtimali daha düşük ve geleneksel cam iyonomerlerden daha üstün fiziksel ve mekanik özellik gösteren bir materyaldir (47). Kabul edilebilir estetik özellikler sergileyen bu materyallerin flor salınımlarının geleneksel cam iyonomerlere benzer olduğu bildirilmiştir (48). Ayrıca kapsül formları, kullanım kolaylığı, standart toz/likit oranı, homojen karışım ve ideal kıvam gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (45).

Kondanse olabilen simanlar olarak da bilinen bu materyalin dezavantajları ise; çalışma süresinin kısa olması, cilalamasının 24 saat sonra yapılabilmesi, dehidratasyona bağlı mikro çatlaklar, koheziv dayanımının düşük olması ve son özelliklerine yavaş ulaşması olarak sıralanabilir (38,49). Ayrıca içeriğinde HEMA gibi monomerler bulundurması nedeniyle biyouyumlulukları geleneksel cam iyonomerlerden daha düşüktür (45).

2.2.2.3. Nano-iyonomer

Günümüzde diş hekimliği uygulamalarında kullanılan materyallerde nano-teknolojiden yararlanılmaya başlanmıştır. Nano doldurucu materyaller, kompozit rezinlere ilavesinden sonra cam iyonomer içerikli materyallerin yapısına da eklenmiştir (50). Bu gelişmeyle birlikte nano doldurucu rezin modifiye cam iyonomer simanlar, kısaca nano-iyonomerler diş hekimliğine tanıtılmıştır. Nano iyonomerler, cam iyonomer partiküllerinin nano doldurucu teknolojisi ile birleşerek, süt ve daimi dişlerin restorasyonlarında kullanılmak için üretilmişlerdir (50,51).

Nano iyonomerler; itakonik ve akrilik asidin, florolüminosilikat cam ve su ile gerçekleştirdiği reaksiyon sonucu polimerize olmaktadır. Flor salınımı yüksek ve yüzey pürüzlüğünün daha az olması için rezin modifiye cam iyonomer simanların yapısındaki fluoroaluminosilikat cam tozuna nano partiküllerin eklenmesiyle elde edilmiştir (52). Materyalin yapısında; HEMA, polietilen glikol dimetakrilat (PEGDMA), trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) ve Bis-GMA gibi rezin monomerler de yer almaktadır (50). Nano iyonomerlerin cam iyonomerlerden en büyük farkı, doldurucu içeriğinin büyük bir kısmının nano partiküllerden oluşmasıdır. Nano partiküllerin eklenmesi ile materyalin polimerizasyon büzülme katsayısında azaltmayı; estetik, optik ve mekanik özelliklerini de arttırmayı hedeflemişlerdir. Işıkla

sertleşen ilk nano iyonomer olan restoratif cam iyonomer siman 2007 yılında diş hekimliğine tanıtılmıştır. Bu materyalin flor salınımının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (53).

Nano-iyonomerler; sınıf I-V tüm süt dişi restorasyonlarında, geçici terapötik restorasyonlarda, daimi dişlerde küçük boyutlu sınıf I, III ve V kavitelerde, sandviç tekniğinde ve geçici restorasyon materyali olarak klinik uygulamalarda tercih edilmektedir (51,53).

Nano iyonomerler, GCİS ve RMCİS'lerin avantajlarını birleştiren materyallerdir. Bu materyaller, düşük miktarda polimerizasyon büzülmesi göstermekte ve daha iyi mekanik özellikler sergilemektedir. Bu özelliklerinden dolayı, nano-iyonomerlerin uzun dönem klinik başarısının daha iyi olduğu bildirilmiştir (39).

Cam iyonomerlerin içeriğindeki doldurucu partiküllerin şekil ve boyutları, materyallerin fiziksel dayanımlarını ve mekanik özelliklerini etkilemektedir (39,54). Genellikle daha düşük boyutta ve daha yüksek yoğunlukta doldurucu içeren CİS'lerin sertlikleri, sıkışma dayanımları ve aşınma dirençleri artış göstermektedir (51,53).

Nano-iyonomerin fiziksel ve mekanik özellikleri henüz belirlenmemiştir (55). Dolayısıyla materyalin bazı uygulama alanları henüz kesin değildir (50). Ancak erken dönem takipli klinik çalışmalar, olumlu sonuçlar vermektedir (55). Nanopartiküller, cam iyonomerlerin estetik özelliklerini de artırmaktadır. Bu olumlu özellikler, nano-iyonomerleri çürük riskinin yüksek olduğu hastalarda anterior bölge restorasyonunda tercih edilebilir kılmaktadır (39,51). Ancak konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.2.2.4. Giomer

Cam iyonomer simanların avantajlarının rezin materyallerle birleştirilmesiyle elde edilmiş yeni nesil restorasyon materyalidir. Bu materyalin adı "glass ionomer" ve "polimer" kelimelerinden oluşturulmuştur (56). Giomerler hem kompozit rezinlerin estetik ve mekanik dayanıklılık gibi özelliklerine hem de cam iyonomer simanların flor salınımı ve yeniden yüklenebilme gibi özelliklerine sahip hibrit bir restoratif materyaldir (52,56).

Giomerlerin yapısında; TEGDMA, Bis-GMA, inorganik cam partiküller, silika, alüminyum oksit ve DL-kamforokinon bulunmaktadır (57). Giomerlerin rezin

matriks yapısına önceden reaksiyona girmiş cam iyonomer doldurducular (Pre-Reacted Glass Ionomer Fillers–PRG) eklenmiştir. PRG doldurcular, poliakenoik asit ile floroaluminasilikat cam tozlarının asit-baz tepkimesiyle oluşmaktadır. Bu doldurucuların; tüm partiküllerin aktif (F-PRG) ve yüzey aktif partiküller (S-PRG) olarak iki farklı formları mevcuttur (9,56,57). S-PRG partikülleri içeren giomerlerin, F-PRG partiküllerine sahip giomerlerden klinik açıdan daha başarılı ve mekanik özelliklerinin daha üstün olduğu bildirilmiştir (57). Ayrıca PRG doldurucular sayesinde materyalin flor salınımı, birçok flor salınımı yapan restorasyon materyaline göre daha hızlıdır (58).

Giomerler diş hekimliğinde; süt dişi restorasyonlarında, minimal invaziv restorasyonlarda, daimi dişlerde sınıf I, II, III, IV ve V kavitelerde, kök çürüklerinde kullanılmaktadır. Ayrıca mine defektlerinde, anterior estetik restorasyonlarda ve kompozit rezin tamirlerinde de kullanımları endikedir (9,59).

Giomerler, uygulama kolaylığı, estetik ve cilalanabilme özelliği gibi çeşitli avantajlara sahip restorasyon materyalleridir. Bu materyalin, GCİS, rezin kompozit ve kompomerlere göre biyouyumluluğunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir (9). Bununla birlikte, flor salınımının yüksek olması ve yeniden yüklenebilme özelliği sayesinde çürük aktivitesinin yüksek olduğu çocuklarda süt dişi restorasyonlarında tercih edilen bir materyaldir (57,60). Giomerler kimyasal pulpa irritasyonuna neden olmamaktadır, demineralizasyonu engellemektedir ve mekanik özellikleri RMCİS ve GCİS'lerden yüksektir (61). Ayrıca üstün estetik özellik, farklı renk tonlarına sahip olma, kolay cilalanabilme ve kompozit rezinler kadar mekanik dayanıklılığa sahip olma gibi avantajlara da sahiptir (59).

Giomerlerin RMCİS, GCİS, kompomer ve kompozitlere göre daha yüksek mikrosızıntı gösterdiği bildirilmiştir (59). Bu materyalin dezavantajları arasında, su emiliminin ve renkleşme potansiyelinin yüksek olması da yer almaktadır. Yetersiz özellikler ve kırılganlıklarının yüksek olması nedeniyle yüksek stresli bölgelerde kullanımları sınırlandırılmıştır (60,61).

2.2.2.5. Cam karbomer®

Cam karbomerler; floroapatit, hidroksiapatit içerikli, karbomize nano partiküllerden oluşan bir çeşit cam iyonomer simandır (49). GCİS'lerin farklı bir

modifikasyonudur ancak marka ismiyle literatürde yerini almıştır. Cam karbomerlerin toz yapısında hidroksiapatit ve kalsiyum floroapatit kristalleri bulunmaktadır. Bu kristaller, floroapatit ve remineralizasyon oluşumunu indüklemektedir (47,62). Cam karbomerlerin toz kısmında nano-fluorid/hidroksiapatit ve fluoroalümina silikat cam, likit kısmında ise poliakrilik asit bulunmaktadır (47). Bununla birlikte kuvvetli asitle yıkanmış cam tozu, biyoaktif komponent ve silikon yağı da materyalin diğer bileşenlerini oluşturmaktadır. Cam karbomerlerin yapısında bisfenol-A, rezin, solvent, metal ve monomer bulunmamaktadır (62).

Cam karbomerlerin klinik endikasyonları geleneksel cam iyonomerlere benzerdir. Materyal süt dişlerindeki sınıf I, sınıf II ve sınıf V kavitelerde, daimi dişlerdeki minimal sınıf I ve sınıf II kavitelerin restorasyonunda kullanılmaktadır (49). Bununla birlikte; koruyucu rezin restorasyonlarda, pit ve fissür örütücü uygulamalarında ve paslanmaz çelik kuronların simantasyonunda da klinik kullanımları mevcuttur (63).

Cam karbomerlerin yapısındaki nano partiküller, materyalin mekanik özelliklerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Floroapatit/hidroksiapatit kristalleri materyalin çözünürlüğünü ve aşınma direncini azaltmıştır (47). Geleneksel ve rezin modifiye cam iyonomer simanlar ile kıyaslandığında daha uzun çalışma süresine sahip, daha estetik ve translüsent bir materyaldir. Cam karbomerlerin kırılma kuvveti ve aşınma direnci de daha yüksektir. Özellikle, cam karbomerlerin mineyi makaslama kuvvetinin, geleneksel cam iyonomerlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (64). Ayrıca flor salınımı ve reşarj olma özelliğine sahip materyallerdir (47). Cam karbomerler; rezin, solvent ve metal içermemekte, dentin ve mineye kimyasal olarak bağlanmakta ve diş sert dokularında asitleme gerektirmemektedir. Cam karbomerin diğer önemli avantajları ise; nem hassasiyetinin olmaması ve izolasyonun sağlanmadığı bölgelerde kullanıma uygun olmasıdır (62).

Cam karbomer simanlar umut vadeden bir materyal olmasına rağmen klinik ömrü ile ilgili sonuçlar çelişkilidir (62,64). Bu materyal hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır. Ancak cam karbomer kullanılarak yapılan fissür örtücülerde daha sık çürük lezyonuna rastlandığı bildirilmiştir (63). Ayrıca cam karbomer simanların direkt ve indirekt pulpa kaplamasında kullanımları endike değildir. Derin kavitelerde kavite örtücüleri ile kullanılmaları işlem basamaklarını ve süresini artırmaktadır. Bugüne

kadar cam karbomerin klinik olarak kullanımına ilişkin yalnızca ön raporlar mevcut olup uzun vadeli çalışmalar yayınlanmamıştır (62,63). Dolayısıyla materyalin hasta ağzındaki dayanıklılığı ve remineralizasyon aktivitesi henüz bilinmemektedir.

2.2.2.6. Zirkonya takviyeli cam iyonomer simanlar (Zirconomer®)

Zirkonomerler; cam iyonomer simanların koruyucu özelliği ile amalgamın mekanik dayanıklılığına sahip yeni bir restoratif cam iyonomer sınıfı tanımlamaktadır. 2015 yılında piyasaya sürülen bu materyalin toz içeriğinde zirkonyum oksit ve tozları bulunurken, likit içeriğinde poliakrilik asit (%20-50), tartarik asit (%1-10) ve deiyonize su bulunmaktadır (65). Zirkonyum oksit, bu metaryalin içeriğinde en çok bulunan bileşendir. Beyaz amalgam olarak adlandırılan bu materyalde cıva sitotoksisitesi gözlenmemektedir (66).

Zirkonomer; süt dişi restorasyonlarında, sınıf I ve II kavitelerde, sandviç tekniğinde, amalgam restorasyonların tamirinde, atravmatik restoratif tedavide ve kırık tüberküllerin tamirinde uzun süreli geçici olarak kullanılmaktadır (67,68). Ayrıca, geriatrik hastalarda ve overdenture restorasyonların altındaki kök yüzeylerinde de kullanım endikasyonu mevcuttur (66).

Zirkonomerlerin flor salınımları, aşınma dirençleri ve kırılma dayanımları yüksektir. Bu materyalin kullanımı kolay olup, kısa sürede sertleşmek gibi olumlu özellikleri mevcuttur (65). Materyalin içeriğindeki seramik partikülleri materyale radyoopasite kazandırarak, teşhis etmeyi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, bükülme modülünün yüksek olması, genleşme katsayısının diş dokuları ile benzerlik göstermesi ve mine ve dentine kimyasal olarak bağlanması gibi pek çok avantaja sahiptir (66,67).

Zirkonya takviyeli cam iyonomer simanlar diş hekimliği pratiğinde umut verici özellikler taşımaktadır. Hem GCİS'lere ve modifikasyonlarına hem de dental amalgama en iyi alternatifin zirkonomerler olabileceği değerlendirilmiştir (65–67). Ancak bir sistematik incelemede; diğer cam iyonomer simanlardan daha yüksek mikro sızıntı değerine sahip olduğu bildirilmiştir (67). Bunun nedeni ise, zirkonya partiküllerinin şelasyon reaksiyonlarını etkilemesi olarak açıklanmıştır (68). Günümüzde kullanılan diğer restoratif materyallerin yerini alması için *in vitro* ve *in vivo* araştırma çalışmalarının yakından takip edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte,

in vitro çalışmalardan elde edilen bulguların sağlamlaştırılması için daha ileri *in vivo* çalışmalar ve klinik araştırmalar gereklidir.

2.2.2.7. Seramik takviyeli cam iyonomer simanlar (Amalgomer CR®)

Son yıllarda, diş hekimliği pratiğine, amalgamın mekanik özelliklerine benzer, yeni bir seramik takviyeli cam iyonomer siman (Amalgomer CR) tanıtılmıştır (69,70). Amalgomerlerin sertleşme reaksiyonu, GCİS'ler gibi asit-baz reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Bu materyal, metal içerikli restorasyon materyallerinin mekanik dayanıklılığı ile cam iyonomerlerin avantajlarını birleştirmiştir (70). Amalgomer CR, yalnızca CİS standartlarına değil, amalgam standartlarına da uygun bir materyaldir. Amalgomerin toz bileşeninde fluoro-alüminosilikat cam, poliakrilik asit, tartarik asit ve seramik partikülleri yer alırken likit içeriğinde; poliakrilik asit ve distile su bulunmaktadır (71).

Amalgomerler; süt dişi restorasyonunda, amalgam restorasyon tamirinde, sınıf I ve II kavitelerde, kaide materyali olarak, radyoopasitenin önemli olduğu restorasyonlarda ve ART tekniğinde kullanılmaktadır (72,73). Amalgomerlerin diğer endikasyonları ise; kor yapımı, diş kuron marjinlerinin tamiri ve kırık tüberküllerin geçici restorasyonudur (72).

Seramik takviyeli cam iyonomerler; biyouyumlu, diş sert dokularına kimyasal olarak bağlanabilen, yüksek düzeyde flor salınımı yapan ve minimal kavite preperasyonu gerektiren GCİS'lerin avantajlarını barındıran restoratif materyaldir (70). Amalgomer, dental amalgamdan daha üstün fiziksel ve mekanik özellikler göstermektedir. Ayrıca seramik takviyesi materyalin mukavemetini, radyoopasitesini, aşınma ve erozyon direncini de arttırmaktadır (71,72).

Yeni materyallerin geliştirilmesiyle plak birikim oranını minimalde tutan, yüzey pürüzlülüğü düşük ve estetik özellikleri yüksek olan restorasyonlar elde edilmesi hedeflenmektedir (72). Amalgomer, cam karbomer, giomer ve RMCİS'in yüzey pürüzlülüğünün değerlendirildiği bir çalışmada, cam karbomer ve amalgomerin yüzey pürüzlülüğünün diğer materyallere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (73). Literatürde amalgomer ile ilgili *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar oldukça sınırlıdır (69,73). Bu gelecek vadeden materyal hakkında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.3. Poliasit Modifiye Kompozit Rezinler (Kompomer)

1990'lı yıllarda cam iyonomer simanların flor salınım özellikleri ile kompozit rezinlerin estetiğini birleştiren restoratif materyaller olarak poliasit modifiye kompozit rezinler tanıtılmıştır. Bu materyal, kompozit ve cam iyonomer kelimelerinin birleşimiyle kompomer olarak da isimlendirilmektedir (74). Kompomerler, fiziksel ve mekanik özellikleri iyi olan materyallerdir. Ayrıca kullanımlarının da kolay olması sebebiyle süt dişi restorasyonlarında sıklıkla tercih edilmektedir (75).

Kompomerler; %70 kompozit ve %30 geleneksel cam iyonomer siman karışımından elde edilmişlerdir. Kompomerin içeriğinde, üretan dimetakrilat (UDMA), bütan tetra karboksilik asit, HEMA, asidik monomer alüminyum florosilikat, pigmentler ve reaksiyon başlatıcılar bulunmaktadır. Kompomerler, hem ışıkla hem de kimyasal olarak sertleşme reaksiyonu göstermektedir (42,74). Sertleşme reaksiyonun ilk aşamasında, materyalin rezin yapısı foto polimerize olarak monomerler arasında çapraz bağlar oluşur. İkinci aşamada ise; polimerize olan asidik monomer ağız ortamındaki tükürük ile reaksiyona girerek, kimyasal (asit-baz) sertleşme reaksiyonu gerçekleştirir (52). Kompomerin tükürük ile reaksiyonunda, materyalin içeriğindeki flor iyonları serbestlenir. Flor salınımından dolayı bu materyal; antikaryojenik özellik göstermektedir. Ancak hidrojel ve tuz matriks yapısı oluşmadığı için kompomerlerin florür salınımları sınırlıdır (42). Yapılan çalışmalarda, kompomerlerin florür salınımının rezin modifiye ve GCİS'lerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (42,48,76).

Kompomerler; süt dişlerinde sınıf I, II, III ve V kavitelerde, fissür örtücü olarak, sandviç tekniğinde ve geçici restorasyon olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, daimi dişlerin sınıf III ve V kavitelerinde, ortodontik bantların ve kırık dişlerin yapıştırılmasında, erozyon ve kama defektlerinde kullanım endikasyonları mevcuttur (52,74).

Kompomerlerin adezyon mekanizması genel olarak kompozit rezinlere benzemektedir. Bu sebeple aşınma dirençleri, bağlanma, basınç ve basma dayanımları geleneksel ve rezin modifiye cam iyonomerlerden daha yüksektir (74). Ayrıca kompomerlerin klinik başarısının kompozit rezinlerle benzer olduğu bildirilmiştir. Kompomerlerin mekanik ve fiziksel özellikleri RMCİS ve GCİS'lerden daha iyi olmakla birlikte kompozit rezinlerle benzerdir. Bu materyal, RMCİS ve GCİS'lere

göre daha estetiktir. Bununla birlikte, flor salınımı, sert diş dokularına adezyon, bitim ve cila işlemlerinin kolay olması gibi çeşitli avantajları mevcuttur (37,48).

Kompomerlerin, rezin içeriklerinden dolayı neme karşı toleransları düşüktür. Uygulama esnasında teknik hassasiyet gerektirmektedir (76). Rezin içeriğine bağlı olarak polimerizasyon büzülmesi göstermektedir. Ayrıca yetersiz polimerizasyona bağlı artık monomer riski söz konusudur (37). Adezyon için bonding ajan kullanımı işlem süresini uzatmaktadır (74). Flor salınımı GCİS ve RMCİS'lerden daha düşük olması gibi dezavantajları da vardır (38).

2.2.4. Kompozit Rezinler

Kompozit rezinler, diş sert dokularına adezyon ile bağlanan estetik restoratif materyallerdir. İlk olarak, 1962 yılında Ray Bowen tarafından tanıtılan bu materyal, günümüze kadar çeşitli gelişmeler göstermiştir (77). Kimyasal olarak polimerize olan kompozit rezinler, günümüz diş hekimliğinde restorasyon materyali olarak kullanılmanın yanı sıra; özellikle genç bireylerde protetik restorasyonlarda ve yer tutucu uygulamalarında da tercih edilmektedir (77,78).

Kompozit rezinler, üç ayrı fazdan oluşmaktadır: Organik yapı, inorganik yapı ve ara bağlayıcılar. Kompozit rezinlerin organik yapısı temelde, üretan dimetakrilat (UDMA) veya bisfenol-A-glisidil metakrilat (Bis-GMA)'dan meydana gelmektedir (79). Bu materyallerin inorganik yapısı ise; matriks içerisinde çeşitli boyut ve şekillerde dağılmış olan baryum alüminyum silikat, borosilikat cam, kuartz, stronsiyum, vitriyum cam ve lityum alüminyum silikat gibi çeşitli inorganik partiküllerden oluşmaktadır. Organik ve inorganik faz arasındaki bağlantı ara fazda 3-metakriloksi propil trimetoksi silan ile gerçekleştirilmektedir(80).

Kompozit rezinler pek çok sınıflamaya sahip, farklı içeriklerle geliştirilmeye devam eden materyallerdir. Ancak ilk kez 1983 yılında yapılan sınıflandırma günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (79). Bu sınıflandırmada kompozit rezinler inorganik doldurucu büyüklüklerine göre sınıflandırılmaktadır (78,79). Kompozitlerin inorganik doldurucu partikül boyutu; materyalin fiziksel, mekanik ve estetik özelliklerini etkilemektedir. Küçük partiküllü kompozitler daha iyi estetik özellikler göstermektedir. Büyük partiküllü kompozitler ise daha iyi mekanik özellikler sergilemektedir (79).

Kompozit rezinler; süt ve daimi dişlerde sınıf III, IV ve V kavitelerde, okluzal genişliği tüberküller arası mesafenin 1/3'ünü aşmayan sınıf I, aproksimal sınırı diş eti seviyesinin altında olmayan posterior sınıf II restorasyonlarda, mine defektleri ve hipoplazilerin düzeltilmesinde, erozyon ve abrazyona uğramış servikal lezyonlarda, kırık dişlerin tedavisinde ve ortodontik braketlerin yapıştırılmasında kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu materyal, tetrasiklin ve florozis gibi diş renklenmelerinin tedavisinde, diastemaların kapatılmasında, direkt ve indirekt yöntemle posterior bölgede inley ve onley olarak da kullanılabilmektedir (79,81). Doldurucu partikül oranı az olan akışkan kompozitler genellikle pit ve fissür örtücü olarak; doldurucu partikül oranı fazla olan akışkan kompozitler ise konservatif olarak hazırlanmış olan Sınıf I, II, III ve V restorasyonlarda tercih edilmektedir (82). Akışkan kompozitler enjekte edilebilir olmaları nedeniyle ulaşılması güç bölgelerde, mikropreparasyonlarda ya da çok küçük kavitelerde, kole çürükleri ve aşınmaya uğramış dişlerin restorasyonlarında, sınıf II kavitelerde aproksimal kavitenin ilk tabakası olarak, özellikle posterior bölgede kompozitlerin altında kenarlardaki boşlukları önleyen ve stresi kıran esnek bir tabaka olarak, mine defektlerinin tedavisinde ve koruyucu rezin restorasyon olarak kullanılmaktadır. Ayrıca klinik olarak; dentin hassasiyetinin giderilmesinde, amalgam ve kompozit restorasyonların onarılmasında, ve abfraksiyon lezyonlarında da tercih edilmektedir (55,79).

Kompozit rezinler diş yapısını konservatif olarak koruyabilen estetik restoratif materyallerdir. Bununla birlikte diş dokularına adezyon, düşük termal iletkenlik, galvanik akımı elimine etmek ve radyoopasite gibi pek çok avantaja da sahiptir. Ayrıca klinik pratikte amalgamın alternatifi olarak tercih edilmektedir (82). Kompozit rezinler yüksek estetik özellik sergilemeleri, konservatif kavite preperasyonu ile uygulanabilmeleri, tek seansta restorasyonun bitirilmesi ve tamir edilebilmek gibi olumlu özelliklerinden dolayı diş hekimliği pratiğinde sıklıkla kullanılmaktadır (8).

Kompozit rezinlerin dezavantajları ise; polimerizasyon büzülmesi, post-operatif hassasiyet, mikrosızıntı, yoğun oklüzal stres bölgelerinde aşınma ve kırılma görülmesi, renklenme ve uygulanırken teknik hassasiyet gerektirmesi olarak sıralanabilir. Ayrıca kompozit rezinler, elastikiyet modülü düşük, genleşme katsayısı yüksek, sınırlı restorasyon ömrüne sahip ve biyouyumlulukları tartışmalı olan materyallerdir (82). Kompozit rezinlerin tam polimerize olmadığı durumlarda, polimer

oluşumu azalmakta ve restorasyon içerisinde, reaksiyona girmeyen artık monomerler oluşmaktadır. Bu artık monomerler zaman içerisinde kompozit rezin restorasyonlardan salınarak restorasyonun mekanik dayanımlarının azalmasına ve biyouyumluluğunun etkilenmesine neden olmaktadır (83).

2.2.5. Ormoserler

Geleneksel kompozit rezinlerin olumsuz özelliklerinin üstesinden gelmek için yeni bir restoratif materyal olarak 1998 yılında diş hekimliğine tanıtılmıştır. Bu materyale organik-modifikasyon-seramik sözcüklerinin ilk hecelerinden oluşan ormoser (ormocer) ismi verilmiştir (81). Ormoserler, tioter oligo metakrilat silan ve çok fonksiyonlu üretanın organik inorganik kopolimerlerinden oluşmaktadır. Geleneksel rezin materyallerden farklı olarak SiO_2 yapılı inorganik bir iskelete polimerize olabilen organik yapılar ilave edilmiştir. Silan içeriğindeki alkoksisil grupları, inorganik yapının Si-O-Si ağını oluştururken, metakrilat grupları ise fotokimyasal yolla organik yapının polimerizasyonu gerçekleştirmektedir. Ormoserlerin doldurucu partikül boyutları 1-1,5 μm arasında değişmektedir (6,81).

Ormoserler; sınıf I-V kavitelerde, travma görmüş anterior dişlerde, anterior dişlerdeki veneer uygulamalarında, restorasyon tamirinde ve estetik restorasyonlarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte indirekt inley restorasyonlarda, kor yapımında ve splintleme işlemlerinde de kullanım endikasyonu mevcuttur (81).

Ormoserlerin diş sert dokularına adezyonları oldukça iyi olup, kolay manipüle edilmektedir. Bu materyalin dinamik ve termomekanik özellikleri, bifonksiyonel monomerlerin inorganik ve organik bağlarıyla ilişkilendirilmektedir (84). Organik çapraz bağlarda meydana gelen artış sonucunda termal genleşme katsayısında azalma meydana gelmektedir. Polimerizasyon büzülmesinin düşük, biyouyumlu, aşınma direnci yüksek ve antikaryojenik etkiye sahip olması ormoserlerin avantajları arasındadır. Bununla birlikte, mine ve dentin dokusuna adezyonu oldukça başarılı ve estetik özellikleri yüksek bir materyaldir. Ormoserlerin aşınma dirençleri, birçok restorasyon materyalinden daha yüksektir. Ayrıca yapısındaki dimetakrilat monomer miktarının azaltılması alerjik reaksiyon görülme ihtimalini minimumda tutmaktadır. Materyalin inorganik polimer yapısı ve silan bağları sebebiyle toksik problemlere neden olmayacağı belirtilmektedir. Ancak literatür bu konuda tartışmalıdır (81,84,85).

Ormoserler ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalar materyalin kalitesini incelemiş ve sınıf I ve II restorasyonlarda, diğer kompozitlerle karşılaştırıldığında ormoser bazlı materyaller için önemli ölçüde daha yüksek bir hassasiyet gözlenmiştir (86). Klinik açıdan kullanımı kabul edilebilir bir materyal olmasına rağmen sınıf V kavitlerdeki adezyonları yetersiz bulunmuştur (60). Ayrıca rezin kompozitler ve ormoser restorasyonlar arasında uzun ömürlülük açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ormoserler ile ilgili *in vitro* çalışmalarda ise kompozit rezinlerle benzer bağlanma mukavemetinin olduğu bildirilmiştir (87). Bununla birlikte, 1 yıl tükürük içerisinde bekletilen ormoserin bükülme mukavemetinin diğer kompozit restorasyonlara göre en düşük değeri elde ettiği bildirilmiştir (86).

2.2.6. Alkasit

Son zamanlarda piyasaya rezin esaslı iyon salan ve alkasit adı verilen yeni bir materyal sürülmüştür. Adını, hidroksit (OH -) iyonlarının salınımından dolayı alkalileştirici özelliklerinden almaktadır . Bu sınıftaki tek materyal, 2016 yılında geliştirilmiş ve ticari olarak bu ürüne üreticisi tarafından ‘Cention N’ adı verilmiştir (88). Alkasit sınıfına giren bu restoratif materyal, toz ile likit karışımından oluşmaktadır. İlk versiyonu elle karıştırılan bu materyalin günümüzde kapsül formu da mevcuttur (89).

Alkasit, dual-cure bir restorasyon materyalidir. Bu materyalin içeriğinde üç ana doldurucu partikül türü mevcuttur. Bunlar; silanize inert baryum alüminyum silikat camı, cam iyonomerlere benzer kalsiyum baryum alüminyum florosilikat camı ve kalsiyum florosilikat camı veya "alkasit" camıdır. Cention, rezin esaslı materyaller gibi Bis-GMA, HEMA, TEGDMA monomerlerini içermemektedir. Bu materyalin sıvı kısmında organik monomerler yer almaktadır. Temel monomer ise UDMA’dır. Alkasitin içerdiği inorganik partikül büyüklüğü 0,1 ile 7μm arasında olup materyal sertleştiğinde %24,6 oranında alkalin cam yapısına sahip olmaktadır. Alkalin camı, kalsiyum ve hidroksil iyonlarının salınımını yaparak, demineralizasyon oluşumunu önlemektedir (88,89). Alkasit; süt dişi restorasyonlarında, koruyucu rezin restorasyon uygulamalarında, daimi dişlerin sınıf I, II ve V kavitelerinde kullanılmaktadır (88,90).

Alkasitin mekanik dayanımı cam iyonomer simanlardan daha fazladır. Ayrıca amalgam ve cam iyonomer simana göre daha estetik bir materyaldir. Bu materyal ile

ilgili yapılan bir dizi çalışmada, Cention N'in asitleri nötrleştirme kapasitesine sahip olduğu ve uzun süre laktik asite maruz kaldığında minenin ve dentinin demineralizasyonunu engellediği bildirilmiştir (91,92). Restoratif materyallerin mikro sızıntılarının incelendiği bir *in vitro* çalışmada, en düşük mikro sızdırmazlık değerinin alkasite ait olduğu bildirilmiştir (93). Dört farklı restoratif materyalin mikrosertliğinin karşılaştırıldığı bir *in vitro* çalışmada; Cention N en yüksek mikrosertlik değerini göstermiştir.

Alkasit, diğer materyaller ile karşılaştırıldığında daha iyi mikrosertlik özellikleri sergileyen ve minimal invaziv tedaviler için klinik olarak daha uygun bir seçenek haline gelen gelecek vadeden bir materyaldir (94). Ancak kendi kendine sertleşme veya ışıkla sertleşme modunda kullanılan kapsüllü alkasitin uzun vadeli mekanik davranışı hakkındaki veriler, özellikle önceki versiyonun bileşimsel modifikasyonları göz önüne alındığında hala yeterli değildir (91,92,94).

Alkasitin pulpaya yakın alanlarda kullanımı pulpa reaksiyonlarına ve hassasiyetine neden olabileceği için uygun değildir. Pulpanın olası reaksiyonunu önlemek için, pulpaya yakın alanlarda uygun bir siman ile kullanımı işlem süresini ve basamaklarını artırmaktadır (89). Alkasit restorasyonların katyonik ağız gargaraları, plak açığa çıkarıcı maddeler ve klorheksidin kullanıldığında renk değişikliğine uğradığı bildirilmiştir (95). Ancak alkasitin uzun dönem etkilerini belirten çalışmalar literatürde henüz yer almamaktadır.

2.3. BİYOUYUMLULUK

Biyouyumluluk, 1987 yılında Williams tarafından "bir materyalin canlı bir yapıya uygulanmasından sonra uygun konak yanıtı oluşturma yeteneği" olarak tanımlanmıştır (96). Ancak Williams 2008 yılında bu tanımı "bir materyalin herhangi bir lokal veya sistemik etki yaratmadan istenilen fonksiyonu yerine getirerek, doğru hücresel ve doku yanıtını oluşturma yeteneği" olarak genişletmiştir (97). Bu tanım doğrultusunda biyouyumluluk, bir materyalin vital doku ile temas halinde iken lokal ve sistemik toksisite, alerjik ve karsinojenik özellik göstermemesidir (10,98). Toksisite ise bir materyalin kimyasal olarak biyolojik sistemde hasar oluşturabilme potansiyelini göstermektedir. Genotoksisite, bir materyalin DNA içeriğinde yarattığı değişiklik

iken, bu değişikliğin sonraki kuşaklara aktarımı ise mutajenite olarak tanımlanmaktadır (98).

Güncel olarak geliştirilen materyaller kullanılmadan önce farklı testlerden geçmelidir. Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO), ISO 7405 ve ISO 10993 verileri doğrultusunda dental materyallerin biyolojik olarak değerlendirilmelerini 3 basamak olarak sınıflandırılmıştır (99,100). Bunlar; başlangıç testleri (*in vitro* sitotoksisite, mutajenite-genotoksisite ve östrojenite), ikincil testler (hayvan testleri sensitizasyon, implantasyon ve mukozal irritasyon) ve klinik uygulama çalışmalarıdır (97). Başlangıç testleri, uygulamalarının kontrol edilebilmesi ve kolay standardize edilebilmeleri gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajlarından dolayı ilk tercih edilen testlerdir (97).

2.3.1. Sitotoksisite

Sitotoksisite, moleküler olaylar sonucunda makromolekül sentezinin bozulması ve bunun sonucunda hücre yapı ve fonksiyonlarında meydana gelen hasar oluşumudur. Kısaca, bir materyalin canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade etmektedir. Materyallerin biyouyumluluğunu incelemedeki en önemli parametre hücreler üzerindeki sağ kalım etkisidir (101).

Sitotoksisite deneyleri, bir materyalin hücreler üzerindeki toksisite potansiyelinin belirlenmesi için yapılmaktadır. Hücre temelli sitotoksisite deneyleri, *in vivo* çalışmaların verileriyle uyumlu ve pratik olmalarından dolayı, hayvan çalışmalarına alternatif olarak toksikoloji çalışmalarında tercih edilmeye başlanmıştır (108). Canlı organizma dışında, deney tüpü veya petri kabının içerisinde yapılan *in vitro* testler, sitotoksisite incelemelerinde çoğunlukla kullanılan yöntemlerden biridir (98). *In vitro* çalışmalar, hücre sistemleri üzerinde materyal bileşenlerindeki moleküllerin salınım ve etkilerini inceleme imkanı sunmaktadır (102). Bu testler sayesinde bir materyalin biyolojik sistemle teması sonrasında canlı ve ölü hücre sayısı, hücre büyüme oranları ya da hücresel fonksiyon gibi değerlendirmeler yapılabilmektedir (98).

In vitro olarak tasarlanan sitotoksisite çalışmalarında genellikle hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürleri, canlı bir organizmadan elde edilmiş dokuların laboratuvar koşullarında canlı tutulup çoğaltılması ile oluşturulan biyolojik

sistemlerdir (97). Primer hücreler veya sürekli hücre hattı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Primer hücre kültürü, canlı organizmadan elde edilen doku veya örneklerin uygun koşullarda kültür edilmesiyle oluşturulmaktadır. Diş eti ve pulpa fibroblastları primer hücre kültürüne örnektir (103). Primer hücre hatlarının tekrarlı pasajları ile oluşturulan ve sınırsız çoğalma potansiyeline sahip hücreler ise sürekli hücre hatlarını meydana getirmektedir. L929 ve 3T3 kodlarıyla adlandırılan fare fibroblast hücreleri ve HeLa (insan servikal karsinom) hücreleri sürekli hücre hatlarına örnek gösterilebilir (104).

Sitotoksisite testleri, materyallerin hücrelerin çoğalması, büyümesi ve morfolojisi üzerindeki etkilerinin incelendiği biyolojik değerlendirme yöntemleridir. Bu testler, belirlenen materyale karşı hücresel yanıtın kısa sürede belirlenmesi, detaylı ve hassas sonuçların elde edilmesi ve *in vivo* çalışmalara geçmeden önce toksisitenin tespit edilmesi için uygulanmaktadır (10). ISO standartları doğrultusunda, diş hekimliğinde kullanılan materyaller için uygulanabilecek *in vitro* sitotoksisite test yöntemleri;

1) Direkt hücre kültürü testi
    a. Direkt temas testi
    b. Ekstrat testi
2) Agar difüzyon testi
3) Filtre difüzyon testi
4) Dentin bariyer testi olarak belirlenmiştir (10,99,100).

Sitotoksisite incelenmesinde, hücre kültürüne direkt ya da indirekt temas ettirilen materyal veya materyalden salınan bileşiklerin etkileri değerlendirilmektedir. Direkt temas yönteminde, hücreler materyalin yüzeyinde çoğalmakta ve hücrelerin biyolojik ölümleri incelenmektedir. İndirekt yöntemde, materyal ile hücre arasında dentin, selüloz asetat, agar veya agaroz filtre gibi çeşitli bariyerler kullanılmaktadır. Bu bariyerler, bazı bileşiklerin difüze olmasına izin veren ve dentini taklit eden sistemlerdir (103,105).

Sitotoksisite testlerinin değerlendirilmesinde hücre boyanması, hücre sayımı, membran geçirgenliği ve metabolik bozulma gibi çeşitli parametreler kullanılmaktadır. ISO 7405 ve ISO 10993 protokollerinin önerdiği sitotoksisite değerlendirme yöntemleri;

1) Canlılık testleri

2) Yaşam testleri

3) Proliferasyon testleri

4) Metabolizma testleri olarak belirlenmiştir (10,99,100).

Dental materyallerin sitotoksisitesinin incelenmesiyle beraber genotoksisitelerinin de değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu değerlendirmeler ile, materyalin doku ile etkileşiminin ve uyumunun saptanabilmesi için daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (104).

2.3.1.1. Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler

Dental materyaller uygulandıkları lokasyonda hücre membranında, DNA yapısında ve hücre metabolizmasında çeşitli olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. Materyallerin hücre düzeyinde oluşturdukları etkileri incelemek üzere dinamik ve statik inceleme yöntemleri geliştirilmiştir. Sitotoksisite değerlendirilmesinde yukarıda da bahsedildiği üzere 4 farklı yöntem kullanılmaktadır (10).

2.3.1.1.1. Canlılık testleri

Canlılık testleri, toksik etken sonucu kültürde sağ kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kolorimetrik veya floresans ölçüm yapılmasına imkan sağlayan bu testler, kısa dönemde görülen toksik reaksiyonların etkilerini incelemektedir (103). Hücre membranının geçirgenliğini ölçmek üzere sınırlandırılan bu tesler, sub-lethal hücre değişkenlerini tespit edememektedir. Canlılık değerlendirme testleri; nötral kırmızısı (NR) testi, floresan metodu ve tripan mavisi testidir. Bu testler membran bütünlüğü bozulan hücre yapısına giren eritrosin, naftalin siyahı ya da tripan mavisi gibi çeşitli boyaların kullanılması ile yapılmaktadır. Ayrıca membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin içerisine alınan nötral kırmızı veya diasetil florasan gibi boyalar kullanılarak incelemeler yapılmaktadır (10,103).

2.3.1.1.2.Yaşam testleri

Yaşam değerlendirme testleri, materyal ile hücrelerin teması sonucu uzun dönemde ortaya çıkan toksik etkinin incelenmesi için kullanılmaktadır (103). Hücre ile materyalin temas etmesiyle erken dönemde gözlenen toksik etkilerin bazıları geri

dönüşümlü olurken, bazı toksik etkiler ise daha uzun dönemde ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple canlılık oranlarının tespit edilmesinde, erken dönemde meydana gelen toksik reaksiyonlarda geri dönüşüm görüldüğünden uzun dönem testlerine de başvurulmaktadır. Hücre yaşamı (survival) seyreltilmiş hücre süspansiyonundaki tek tip hücrelerin birbirinden bağımsız koloni oluşturma yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Hücre yaşamının incelenmesinde, hücrelerin düşük konsantrasyonunda koloni oluşturma yeteneği (plating efficiency) araştırılmaktadır (97,103).

2.3.1.1.3. Proliferasyon testleri

Kültür ortamındaki hücrelerin bir materyal ile etkileşiminden birkaç gün sonra sayımı yapılarak çeşitli bileşenlerin hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesinde kullanılmaktadır (103). Fakat test süresi boyunca belirli bir anda hücre sayımı yapılması net bir sonuç vermemektedir. Bu sebeple testin erken aşamalarında en azından bir büyüme eğrisi elde edilmelidir. Büyüme eğrisi analizleri az sayı örnekli çalışmalar için kullanışlı olurken, çok sayı örnekli çalışmalar için kullanışlı değildir. Birçok örnek materyalin incelendiği durumlarda belirli zamandaki hücre sayımları yapılarak, büyüme eğrisi analizleri uygulanmaktadır (101,103). Bu çalışmalarda, gelişme eğrisinden herhangi bir anlamlı sonuç elde edildiği durumlarda, sonucun ikinci bir gelişme eğrisi veya farklı bir değerlendirme yöntemi ile desteklenmesi gereklidir. Bromodeoksiuridin (BrdU) immunohistokimyasal teknik ve 3H-timidin testi, proliferasyon değerlendirme yöntemlerindedir (106).

3H-timidin bir radyoizotop olup, hücre proliferasyonu esnasında hücre içerisine difüze olarak materyalin radyoaktivitesi ölçülebilmektedir. Proliferasyon mekanizmasını indüklemeye yardımcı yeni DNA sentezlenmesi ile proliferasyon değeri ölçülmektedir. DNA sentezinin analiz edilmesinde kullanılan bir diğer test ise, bromodeoksiuridin immünohistokimyasal tekniktir. İşaretlenen antikorların değerlendirildiği bu yöntemde BrdU (5-bromo-2’-deoxyuridine), DNA içine girerek doku ve hücrelerdeki antijenlerin gösterilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde boyama ile değerlendirme yapılabileceği gibi enzimle işaretlenmiş immüosorbent yöntemi (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) kitleri de tercih edilebilmektedir (107).

2.3.1.1.4. Metabolizma testleri

Örnek sayısının fazla olduğu çalışmalarda yaşam değerlendirme testlerinin hazırlık ve analiz aşamaları zahmetli ve zaman alıcıdır. Yeni izole edilmiş düşük yoğunluklu hücre hatlarının koloni oluşturma potansiyellerinin düşük olması nedeniyle alternatif test yöntemleri geliştirilmiştir. Bu test yöntemleri ile doğrudan hücre yaşam (survival) değerlendirilmesi yapılamamaktadır (103). Fakat bu testler sayesinde, hücre sayısındaki çoğalma miktarı, DNA artışı ya da total protein miktarı tespit edilmektedir. Ayrıca metabolizma testleri ile protein veya DNA sentezi ya da tetrazolyum tuzunun formazon kristaline indirgenmesi tespit edilerek hücrelerin devam eden metabolik aktivitesi değerlendirilmektedir (106).

Metabolizma testleri genellikle daha hassas çalışmayı gerektirmektedir. Bu yöntemde, hücrelerin metabolik ya da proliferatif kapasiteleri ve enzim aktive değişimleri, mikroplaka okuyuculu spektrofotometre aracılığıyla ölçülmektedir. Metabolizma testleri ile uzun dönem toksisite değerlendirilmektedir (108). Metabolik aktivitenin değerlendirildiği testlerde, hücre canlılığını tayin etmek için tetrazolyum bileşikleri kullanılmaktadır. En çok kullanılan bileşikler; MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid), WST-1 (2- (2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H) ve MTS (5- (3- karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) tetrazolyum), iken bunlar iki temel sınıfa ayrılmaktadır. İlk sınıflandırmadaki testlerin başında, pozitif yüklü, canlı hücrelere kolayca difüze olabilen ve en sık kullanılan MTT testi yer almaktadır. Negatif yüklü ve hücrelere kolayca difüze olmayan XTT, WST-1 ve MTS testleri ise diğer sınıflandırmada yer almaktadır. XXT, WST-1 ve MTS testlerinde, tetrazolyum bileşiklerinin renkli formazan ürününe dönüşmesini indüklemek için plazma zarı ya da sitoplazmadan elektron aktarımını sağlayan ara bir elektron alıcısı kullanılmaktadır (107).

MTT testi; hücrelerin canlılık ve çoğalmasının, mitokondriyal fonksiyonlar ile değerlendirildiği güvenilir, hassas ve kantitatif bir yöntemdir (109,110). Bu test sağlıklı hücrelerdeki mitokondrilerin, sarı renkli tetrazolyum tuzu olan MTT'nin mavi-mor renkli formazan bileşiğine indirgeyerek dehidrogenaz aktivitesini ölçmektedir. Canlı hücrelerdeki bu reaksiyon mitokondriyal süksinil dehidrogenazlar ile katalize

edilmektedir. Formazan bileşiklerinin oluşumu, canlı hücre sayısı ile doğru olarak değerlendirilmektedir (109). Hücrelerin sitotoksik materyale maruziyeti ile dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği koşullarda formazan bileşikleri oluşmamaktadır. Formazan oluşumu sadece aktif mitokondriye sahip canlı hücrelerde gözlenmekte ve absorbans değerleri kaydedilmeden önce formazan ürünün çözülmesi gerekmektedir. Formazan ürünün çözünmesi ve renk stabilitesi elde etmek için çeşitli çözücüler kullanılmaktadır: asitlendirilmiş izopropanol, dimetilformamid (DMF), dimetil sülfoksit (DMSO) ve organik solvent türevleri. Çözünme sonrası elde edilen mor renkli çözelti spektrofotometrik ölçüm sonucu ortaya çıkan değer materyalin toksisitesini belirlemektedir (109,111).

Toksik bir materyale maruz kalan canlı hücrelerin metabolizmaları etkilenmektedir. Özellikle canlı hücrelerdeki mitokondri metabolizmasını etkileyen bazı kimyasal bileşenler MTT testi ile değerlendirilmektedir. Hücre kültüründe metabolizması aktif olan hücrelerin sayısı ile boyanın konsantrasyon ve absorbans değerleri bağlantılı olarak değişmektedir. MTT testi büyük sayılardaki hücre kültürlerindeki canlılık oranlarının belirlenmesinde kolay, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Hücre canlılık test analiz yöntemlerinden biri olan MTS, MTT'den daha hassas sonuçlar ortaya koymaktadır (111).

Hücre kültüründe direkt çözünebilen formazan ürünlerini üretmek için geliştirilmiş tetrazolyum reaktifleri, vital hücreler tarafından indirgenmektedir. MTS, WST ve XTT kitleri, bu kategori içerisinde bulunan tetrazolyum bileşiklerindendir (112). Geliştirilmiş tetrazolyum reaktifleri sayesinde formazan ürünlerini çözmek için hücre kültürüne eklenmesi gerekli olan diğer bir reaktif materyal gereksinimi ortadan kalkmaktadır. Dolayısıyla test prosedürü daha kolay ve hızlı hale gelmektedir (107). Tetrazolyum reaktanları, tetrazolyum bileşiğini, sitoplazma içerisinde çözünebilen formazana dönüştürmektedir. Hücre membranında indirgenerek membrandan difüze olan fenazin etil sülfat (PES) ya da fenazin metil sülfat (PMS) gibi elektron alıcıları reaktanlarla kombine olarak kullanılmaktadır (112).

2.3.2. Genotoksisite

Genetik toksikoloji (genotoksikoloji), kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkenlere maruziyet sonucunda DNA üzerinde oluşturduğu hasar ve sonuçlarıyla

ilgilenen bilim dalıdır. Biyouyumluluk değerlendirmesinde tedavide kullanılacak bir materyalin veya bir ilacın genetik açıdan toksisitesinin incelenmesi önemli bir parametredir (113).

Genotoksisite, olası bir etken ile DNA, kromozom veya hücre çekirdeğinde meydana gelen hasarlar sonucunda genom devamlılığını ifade eden geniş kapsamlı bir terimdir. Mutajenite terimi ise organizma veya hücrelerin genetik yapısında kalıcı olarak meydana gelen değişimlerin indüklenmesini ifade etmektedir. Bu değişimler tek bir gen veya kromozom segmentini kapsamaktadır (113,114). Kısaca, kimyasal materyallerin DNA üzerinde gösterdikleri etki genotoksisite olarak isimlendirilmektedir. Genotoksik etki sonucu farklılaşan DNA'nın gelecek nesillere aktarılması mutajenite olarak tanımlanmaktadır (114).

Genotoksisite ile karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla mutajenite ile karsinojenite arasında bir bağlantı söz konusudur (113). Bir materyalin genotoksisitesi farklı hastalıkların özellikle kanserin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Kansere sebep olan ve karsinojen olarak adlandırılan pek çok materyalin genotoksik olduğu bilinmektedir. Genotoksisitenin karsinojenitenin tespit edilmesinde önemli ve kullanışlı bir parametre olması yaygın bir şekilde kabul edilmektedir. Genotoksik testler, kanser oluşumunu indükleyen olayların hesaplanmasını mümkün kılmaktadır. Bu testlerin kullanımı potansiyel canlı toksinojenlerinin değerlendirilmesinde gerekli hale gelmiştir. Ayrıca materyallerin karsinojenik potansiyelleri ile mutajenik etkileri arasında kuvvetli bir bağlantı olduğunun da tespit edilmesi, genotoksisite testlerinin çeşitli endüstri kuruluşları için tarama yöntemi olarak kullanılmasına neden olmuştur (115).

Genotoksisite incelemeleri 1960'lı yılların sonlarından beri kullanılmakta olup günümüze kadar çeşitli materyallerin karsinojenik potansiyellerini incelemek için pek çok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, farklı mekanizmalarla direkt ya da dolaylı yollara genetik yapılarda oluşan hasarları tespit etmek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır (116). Genetik toksikoloji testleri, mutajenlerin tespit edilmesi, canlılar için risk tayinin yapılması ve bu materyallere gereksiz maruziyetin önüne geçilmesi için kullanılmaktadır (117). Bir materyalin genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testlerle değerlendirilmesi

tavsiye edilmektedir. Bu testler, hiyerarşik olarak birbirini tamamlar niteliktedir (113). Genetik toksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan *in vitro* testler; Ames Testi (Bakteri Ters Mutasyon Testi), kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, kromozom aberasyon (KA) testi, mikronükleus (MN) testi ve tek hücre jel elektroforez (Comet testi) yöntemidir (116,118).

2.3.2.1. Ames testi (bakteri ters mutasyon testi)

Bakteriyel geri mutasyon testi, Bruce N. Ames tarafından 1970'lerin başında geliştirilmiştir. Bu test, baskteriyel ters mutasyon ya da Ames testi olarak da bilinmektedir. Genellikle kimyasal maddelerin genetik materyale zarar verip vermediğini belirlemek için kullanılan bu testin uygulaması kolay, hızlı ve maaliyeti düşüktür (119). Ames testi, bir materyalin genotoksik potansiyelinin tespit edilmesinde güvenli ve standart bir test yöntemi olarak kabul edilmektedir (120).

Bakteri ters mutasyon testi, canlılarda kanser oluşumunu baskılayan genlerdeki mutasyonun tespit edilmesinde ve karsinojenik-mutajenik ajanların DNA üzerindeki zararlı etkilerini ortadan kaldıran materyallerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (120). Bu yöntemde genetik olarak değiştirilmiş *Salmonella typhimurium* veya *Escherichia coli* suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar normalde histidin sentezleyemez, bu nedenle histidin içermeyen bir besiyerinde çoğalamaz ve hayatta kalamazlar (120,121). Eğer test maddesi mutajenik ise bakterilerin genetik materyalinde mutasyona neden olmuşsa, bakteri histidin üretebilir hale gelir ve besiyerinde çoğalmaya devam etmektedir. Bu yöntem, testin sonucuna göre mutasyona uğrayan bakterilerin tekrardan histidin sentezlemeleri sebebiyle “ters mutation” test olarak da isimlendirilmektedir (119,121). Bakteri ters mutasyon testi, gelişebilmek için histidin amino asidinin gerekli olduğu bakteri suşlarının, potansiyel mutajen olarak görülen test materyalinin oluşturacağı mutasyonlar ile histidin sentezleme özelliği kazanmaları esasına dayanmaktadır (120).

2.3.2.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, genetik materyaldeki kromatitler arasında gerçekleşen değişimleri değerlendiren bir laboratuvar testidir (122). KKD testi, genetik materyaldeki kromatitler arasında gerçekleşen değişimleri

belirlemektedir. Bu değişimler genellikle kromozomların kırılması, parçalanması veya yeniden düzenlenmesi şeklinde olabilmektedir (123). Bu test, genetik materyalin stabilitesini ve bütünlüğünü anlamak, mutasyonları belirlemek ve potansiyel genetik riskleri değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır (124).

Kardeş kromatit değişimi testi, laboratuvar ortamında hücre kültürü ile uygulanmaktadır. Hücreler, belirli bir test materyaline veya belirli bir çevresel koşula maruz bırakılmaktadır. Bu test materyali, potansiyel bir mutajen olabilir veya belirli bir çevresel stresi simüle edebilmektedir (113). Potansiyel mutajen maruziyeti sonrası, kardeş kromatitlerdeki değişimi tespit etmek için BrdU kullanılmaktadır. Bir kromozomun açık boyanan kromatindeki koyu renkli parçaların ya da koyu boyanan kromatindeki açık renkli parçaların sayılması ile hücrelerin genetik materyali analiz edilmektedir. Bu analizde genellikle sitogenetik teknikler, özellikle kromozom boyama veya floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) gibi yöntemler kullanılmaktadır (122,123).

2.3.2.3. Kromozom aberasyon (KA) testi

Kromozom aberasyonu (KA) testi, genetik materyaldeki kromozomlarda meydana gelen yapısal değişiklikleri (aberasyonları) değerlendiren bir yöntemdir. Bu test, genetik materyaldeki kromozomlarda meydana gelen hasarları belirlemek, bu hasarların tipini ve sıklığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Potansiyel karsinojenlerin, mutajenlerin ve diğer genetik materyal hasarına neden olabilecek ajanların tespit edilmesinde önemlidir (125).

Kromozom aberasyon testinin temel amacı memeli hücre kültürlerinde, genetik materyaldeki anomalilere sebep olan bileşeni tespit etmektir (126). Genetik materyaldeki yapısal mutasyonlar kromozomal ya da kromatit olarak iki tipte gözlenmektedir. Kimyasal mutajenlerin oluşturduğu aberasyonların çoğu kromatit tipindedir fakat kromozom tipi anormallikler de görülebilmektedir (125,127). Kromozom aberasyonları, kromozom yapısındaki değişiklikleri ifade eden olayları içermektedir. Bu olaylar arasında kromozom kırıkları, translokasyonlar, delesyonlar ve inversiyonlar bulunabilmektedir. Genetik hastalıkların temelinde kromozomal hasarlar veya sapmaların olduğu bilinmektedir (113).

Kromozom aberasyonu, memeli hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültürlenmesi, kültürlenen hücrelerin bir test materyaline maruz bırakılarak toplanması ve mikroskop altında incelemesi ile kromozom ve kromatit yapılarındaki sapmalarının sıklığının ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir (126). Bu yöntemde, hücre kültürü 1,5 hücre döngüsü süresince test materyaline maruz bırakılmaktadır. Kromozom morfolojisinin en belirgin gözlenebileceği evre metafaz aşaması olduğu için, bu aşamada hücre döngüsünü durduran bir madde uygulanmaktadır (125). Ardından metafaz hücrelerindeki kromozom anormallikleri mikroskop altında incelenerek analiz edilmektedir. Aberasyonların tipi, sıklığı ve genellikle genetik materyaldeki hasarı belirlemek için özel skorlama kriterleri kullanılmaktadır (125,127).

2.3.2.4. Mikroçeşirdek (MÇ) testi

Mikroçekirdek (MÇ) testi, kromozom hasarını ölçmek için kullanılan alternatif bir *in vitro* test tipi olup hücre bölünmesi esnasında meydana gelen MÇ'leri değerlendirmektedir. MÇ'ler, kromozomlardan kopan veya eksik olan kromozom fragmanlarıdır. Bu test, genetik materyaldeki anormallikleri belirleme ve değerlendirme konusunda önemli bir araçtır. MÇ testi çeşitli kimyasal bileşenler ile elektromanyetik alan, X-ışını radyasyonu gibi etkenlere maruz kalması sonucu oluşan mutajeniteyi tespit etmek için kullanılabilen yaygın ve kolay bir testtir (113,128).

Kromozom aberasyon testi ile mikroçekirdek testi arasındaki en temel fark skorlama için toplanan hücrelerin bulunduğu evreden kaynaklanmaktadır. Kromozom aberasyon testinde hücrelerin toplaması için hücreler bölünmelerini tamamlamış olması gerekmezken MÇ testinde hücrelerin bölünmelerini tamamlamış olması gerekmektedir (113,128). Bu sebeple MÇ testi hücre döngüsü aşamasında hasar hangi evrede meydan gelirse gelsin hasarın tespitine olanak sağlamaktadır. Hücrelerin toplamasından sonra boyanan hücrelerin mikroskobik incelemesi yapılarak nükleer bölünme indeksi hesaplanmaktadır (129).

Mikroçekirdek testi, genellikle lenfosit gibi hücrelerin bir kültür edilmesiyle başlamaktadır. Bu hücreler çoğunlukla kan örneklerinden elde edilmektedir. Hücreler, belirli bir süre boyunca bir kimyasal madde veya radyasyon gibi bir mutajene maruz bırakılmaktadır. Bu, genetik materyalde hasar oluşturabilmektedir. Maruz bırakma sonrasında hücreler bölünür ve hücre bölünmesi sırasında oluşan MÇ'ler incelenir

(128,130). Hücreler, genellikle özel bir boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmaktadır. MÇ'ler, mikroskop altında incelenerek sayılmakta ve değerlendirilmektedir. MÇ'ler, normal çekirdekten farklı bir renkte ve yapısız olarak belirmektedir. MÇ'lerin tipi, sayısı ve diğer özellikleri değerlendirilir. Bu değerlendirmeler, genetik materyaldeki kromozom hasarı, kırıkları veya diğer yapısal değişiklikleri belirlemeye yardımcı olmaktadır (113,128,130).

2.3.2.5. Tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet testi)

Tek hücre jel elektroforez yöntemi veya diğer ismiyle Comet testi, ilk olarak 1978 yılında Johanson ve Rydberg tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi için geliştirilmiştir. 1984 yılında Johanson ve Ostling test yönteminin duyarlılığını artırmak için nötral pH lizing ve elektroforez tekniğini geliştirmiştir. Tek hücre jel elektroforezi, çeşitli etkenler sonucunda meydana gelen DNA hasarını hücre düzeyinde tespit edebilen hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (131,132).

Comet testi; çeşitli toksinlere, radyasyona, çevresel etkilere maruz kalmanın genetik hasarını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem genetik toksikoloji çalışmalarında, çevresel etkilerin belirlenmesinde ve genetik hastalıkların araştırılmasında önemli bir araçtır (129). Ayrıca, hücre ölümü ve onarım gibi hücresel tepkilerin değerlendirilmesinde de bu yöntem kullanılabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı Comet testi genetik toksikoloji alanında ve insan biyoizlem çalışmalarında önemli hale gelmiş ve hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır (133).

Tek hücre jel elektroforez yöntemindeki ilk adım, incelenecek hücrelerin jel içine gömülmesidir. Bu genellikle hücrelerin özel bir agaroz jeli içinde sabitlenmesiyle yapılmaktadır. Ardından, hücrelerin çekirdekleri, hücre zarını çözecek bir lizis çözeltisi ile işlenmektedir. Bu, hücre zarının çözülmesini ve çekirdek içindeki DNA'nın jel üzerine serbest bırakılmasını sağlamaktadır. Hasarsız DNA, çekirdek matriks proteinleriyle organize bir halde iken, hasar görmüş DNA'da bu yapı bozulmuştur. Hasarlı DNA sarmalındaki zincir yapıları bozularak jel içindeki boşluklara yayılmaktadır. Spesifik pH'daki jel, elektroforeze tabi tutularak DNA fragmanlarının jel içinde hareket etmesi sağlanmaktadır. Hasar görmüş DNA fragmanları, daha hızlı hareket eder ve jel üzerinde bir "kuyruk" oluştururlar (118,132,133).

Elektroforez işlemi esnasında, farklı elektrik yüklü ve farklı molekül ağırlığına sahip DNA fragmanları pozitif yüklü anota doğru hareket etmektedir. Nötralizasyon aşamasından sonra DNA, etidiyum bromür (EtBr) gibi özel bir floresans boya ile boyanıp mikroskop altında incelenmektedir (134). Hasar görmeyen DNA'larda kuyruk gözlenmezken, hasarlı DNA'lar farklı elektrik yüklü ve molekül ağırlıklarına sahip olmalarından dolayı elektroforetik ortamda farklı hızlarda çekirdek dışına doğru göç ederek kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturmaktadır (129). Alkali koşullarda gerçekleştirilen Comet testi, DNA üzerindeki çift ve tek zincir kırılmalarını, oksidatif DNA baz hasarını, DNA-DNA/DNA-protein/DNA-materyal çapraz geçişlerini ve DNA onarımını ölçmektedir. Nötral Comet testi ise DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının tespit edilmesine yardımcı olmaktadır (133,134).

Comet testinde, mikroskop altında boyanarak incelenen DNA'lar, hasar derecesine göre dairesel bir yapıdan kuyruklu yıldıza benzeyen yapıya kadar çeşitli görüntüler oluşturmaktadır. Bu sebeple, bu yönteme İngilizce'de kuyruklu yıldız anlamına gelen "Comet Assay" ismi verilmiştir. Bu test protokolü, günümüzde küçük değişikliklerle dünya çapında en yaygın kullanılan genotoksisite yöntemidir. Comet testinde DNA hasarı; kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA oranı parametreleri kullanılarak kantitatif olarak tespit edilmektedir (134) .

2.3.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı hücrelerin kontrollü bir laboratuvar ortamında, uygun besin, sıcaklık ve diğer fiziksel parametreler altında çoğaltılması ve büyütülmesi ile elde edilmektedir. Bu süreç, hücrelerin bir canlı organizmadan alınıp bir laboratuvar ortamında üretilmesini sağlamaktadır. Hücreler; uygun besin maddeleri, mineraller, vitaminler ve diğer gerekli bileşenleri içeren bir besiyeri içeren kapta veya plakta kültüre alındıktan sonra çoğaltılmaktadır. Hücrelerin üremesi sonucunda oluşturdukları bu yapı hücre kültürü olarak adlandırılmaktadır (97). Hücre kültürü, biyolojik ve tıbbi araştırmalarda, ilaç geliştirme çalışmalarında, genetik mühendislik uygulamalarında ve diğer birçok bilimsel çalışma alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında, üç farklı hücre kültürü kullanılmaktadır. Bunlar; primer, diploid ve devamlı hücre kültürleridir (135).

Primer hücre kültürü, bir organizmadan alınan canlı hücrelerin, laboratuvar ortamında belirli bir süre boyunca kültüre alınıp çoğaltılması ile elde edilmektedir. Bu kültürler genellikle doğrudan canlı dokudan veya organlardan elde edilen hücrelerden oluşturulmaktadır. Pulpa ve dişeti fibroblastları primer hücre kültürüne örnektir. Primer hücre kültüründeki hücreler, farklı kültürlere ekilerek çoğaltılmaktadır (136). Bu şekilde üretilen ilk alt kültürler diploid hücre kültürleri olarak adlandırılmaktadır. Bir seri hücre kültür işlemleri sonrası hücre hatları elde edilmektedir. Ancak primer hücre kültürleri, genellikle sınırlı bir çoğalma kapasitesine sahiptir. Yani, belirli bir süre sonra hücrelerin çoğalma yetenekleri kaybolur ve kültürün devamı zor hale gelir. Bu durum, hücrelerin doğal durumlarını laboratuvar koşullarında sürdürme yetenekleriyle ilgilidir (106). Ayrıca primer hücre kültürleri, hücrelerin doğal durumlarına daha yakın olmalarına rağmen kültür içinde heterojenlik gösterebilmekte, farklı hücre tipleri ve farklı farklılaşma seviyelerine sahip hücreler içerebilmektedir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan primer hücre hatları şunlardır: Pulpa fibroblastı, gingival epitelyum, insan cilt fibroblastı, domuz fibroblastı, dişeti fibroblastı, sığır pulpa fibroblastı ve kalp fibroblastı (107,108).

Devamlı hücre hatları (immortalize hücre hatları), sınırsız sayıda mitotik bölünme geçirebilen ve dolayısıyla sürekli olarak çoğalabilen hücre hatlarıdır. Bu hücre hatları, süresiz çoğalma özelliği taşıyan farklılaşma geçirmiş primer hücrelerdir. Devamlı hücre hatlarının fenotipleri daha stabildir (107). Bu özelliklerinden dolayı, laboratuvar ortamında uzun süreli ve tekrarlanabilir hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak devamlı hücreler geçirdikleri transformasyon nedeniyle *in vivo* özelliklerinin tamamını koruyamazlar. Çalışmalarda çoğunlukla fare fibroblastları (L929 ve 3T3), insan servikal karsinom hücreleri (HeLa), insan gingival karsinom (ca 9.22) ve insan oral karsinom (KB) hücreleri kullanılmaktadır (106,137).

2.4. ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİK DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Dental patolojide mikroorganizmalar ve ürünleri temel etiyolojik faktörlerdir. Bu sebeple, tedavi esnasında bakterilerin uzaklaştırılması ve ortamda kalan bakterilerin inhibisyonu, başarılı bir tedavide önemli bir faktördür (138). Diş hekimliği pratiğinde kullanılan birçok materyal uzun süre ağız ortamında sızdırmazlık özelliğini devam ettirememektedir. Bu durum, materyal ve diş yüzeyinde boşluk oluşumuna ve

buna bağlı çeşitli bakteriyel kaynaklı patolojilere neden olmaktadır. Bu sebeplerden ötürü, dental materyallerin biyouyumlu olmalarıyla birlikte, belirli düzeyde antibakteriyel özelliklerinin de olması istenmektedir (44) .

Antibakteriyel etkinlik değerlendirme yöntemleri, bir materyalin belirli bir bakteri çeşidine karşı *in vitro* koşullarda etkinliğini tespit etmek amacıyla uygulanan testlerdir. Dental materyallerin antibakteriyel etkinlik değerlendirmelerinde, farklı test yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Antibakteriyel klinik tedavi prosedürleri, *in vitro* testlerin sonuçlarına göre belirlenmektedir. Antibakteriyel etkinlik, "difüzyon" ve "dilüsyon" testleri olarak iki temel yöntemle değerlendirilmektedir (139).

2.4.1. Difüzyon Testleri

2.4.1.1. Agar difüzyon testi

Agar difüzyon testi, antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için temel ve en sık kullanılan yöntemdir. Kirby-Bauer tarafından geliştirilen bu yöntemin maaliyeti düşük ve uygulaması kolaydır (140). Agar difüzyon testinde incelenmek istenen bakteriler, sıvı besiyerinde 24 saat inkübe edildikten sonra en uygun agara yayma yöntemiyle ekimleri yapılmaktadır. Antibakteriyel etkinlikleri incelenmek istenen dental materyallerin ISO standartlarına göre hazırlanan numuneleri, bakterilerin ekildikleri petri kabına yerleştirilmektedir (110). Hazırlanan petri kapları belirlenen süre boyunca etüvde bekletildikten sonra gerekli ölçümler yapılmaktadır. Test edilen materyalin bakteriler üzerindeki toksik etkilerine bağlı olarak, materyalin etrafında bir inhibisyon alanı oluşmaktadır. Materyalin etrafında oluşturduğu inhibisyon alanı ölçülerek antibakteriyel etkinliği değerlendirilmektedir (44,140).

Agar difüzyon testinin önemli avantajları; aynı agar ortamına yerleştirilen materyallerin, farklı manipülasyon ve inoklüsyon büyüklüğü değişkenlerini elimine etmesidir. Bu sebeple, materyaller arasında etkin bir kıyaslama imkanı sağlamaktadır. Ancak bir materyalin bakteriostatik mi yoksa bakterisit mi olduğunu değerlendirmemesi yöntemin dezavantajıdır (138,141).

2.4.1.2. Epsilometer (E-Test)

Materyallerin antibakteriyel etkinliğini doğrudan ölçmeyi sağlamak için geliştirilmiş, maaliyeti düşük bir yöntemdir. Bu test kesin ölçekli değerlere sahip olup, materyalin difüzyonunu ve mikroorganizma üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyonu beraber değerlendirmektedir. Özellikle yavaş üreyen ve anaeorob bakterilere karşı antibakteriyel etkinliğin incelenmesinde kullanılmaktadır (142,143). Test edilecek bakteriler uygun ortamda hazırlanıp, besi yerine ekilmektedir. Daha sonra, artan konsantrasyonlarda incelenmek istenen materyal emdirilmiş E-test şeritleri besiyerine yerleştirilmektedir. Şeritlerin bir yüzeyi materyalin konsantrasyon gradyanını belirtirken, diğer yüzey sayısal bir ölçek içermektedir. Uygun koşullarda inkübasyon yapıldıktan sonra, mikroorganizma üremesinin önlenmesine bağlı olarak elips şekilli inhibisyon zonları meydana gelmektedir. Elipsin test şeritleriyle kesiştiği nokta, mikroorganizma üremesini inhibe eden düşük konsantrasyon değerini göstermektedir (143).

2.5.1. Dilüsyon Testleri

Bir materyalin belirlenen mikroorganizmanın üremesini durdurmak için gereken minimum konsantrasyonu tespit etmek için uygulanan yöntemdir. Dilüsyon testleri; tüp dilüsyon ve agar dilüsyon testleri olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Dilüsyon testleri sonuçlarında tespit edilen minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, patolojiye neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan en düşük materyal konsantrasyonunu belirlemektedir. Dilüsyon testleri "agar dilüsyon" ve "tüp dilüsyon" olarak iki farklı şekilde uygulanmaktadır (142,144).

2.5.1.1. Tüp Dilüsyon Testi

Bu yöntemde, antibakteriyel özelliği incelenecek olan materyallerin bakteriler için özel olarak hazırlanan sıvıları içeren deney tüplerinde sulandırılmaları yapılmaktadır. Ardından tüplere eşit miktarda bakteri süspansiyonları eklenerek, 2-20 dakika arası inkübe olmaları sağlanmaktadır. Farklı konsantrasyonlardaki deney materyali içerikli tüplerdeki bakteriyel canlılık, inkübasyon işleminden sonra steril tüplere ekim yapılarak değerlendirilmektedir (138,144). Ekim yapılıp incelendikten

sonra, bakteriyel büyüme tespit edilmemesi, test materyallerinin antibakteriyel etkinliğini göstermektedir. Bu yöntemin en önemi dezavantajı yalnızca bakteri besi ortamında çözünen materyallerin antibakteriyel etkinliklerinin incelenebilmesidir (138).

2.5.1.2. Agar Dilüsyon Testi

Agar dilüsyon testi, bir mikroorganizmanın bir antimikrobiyal ajanın etkisine karşı duyarlılığını belirlemek için kullanılan mikrobiyolojik bir test yöntemidir. Bu test, mikroorganizmanın belirli bir antimikrobiyal ajana karşı minimum inhibitör konsantrasyonunu tespit etmek için yapılmaktadır. Agar dilüsyon testinin uygulama prensipleri tüp dilüsyon testiyle benzerdir. Bu iki yöntem arasındaki temel fark, agar dilüsyon yönteminde incelenmek istenen ajanının sulandırılarak agar içine konması ve petri plaklarına dökülmesidir (145).

Agar dilüsyon testi, genellikle antibiyotiklerin, antifungallerin veya diğer antimikrobiyal maddelerin etkinlik profillerini belirlemek, antibiyotik direncini değerlendirmek ve uygun tedavi stratejilerini seçmek için kullanılmaktadır. MİK değerleri, bir mikroorganizmanın belirli bir antimikrobiyal ajan karşısındaki duyarlılığını ve ilacın etkinliğini değerlendirmede önemli bir araçtır (142).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında çocuk diş hekimliğinde kullanılan farklı içeriklerdeki restorasyon materyallerinin sitotoksik ve genotoksik incelemeleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvar'ında, antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi ise Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, ticari olarak temin edilebilen hücre kültürü ve bakteri şuşları ile *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup, çalışma etik kurul onayı gerekli değildir.

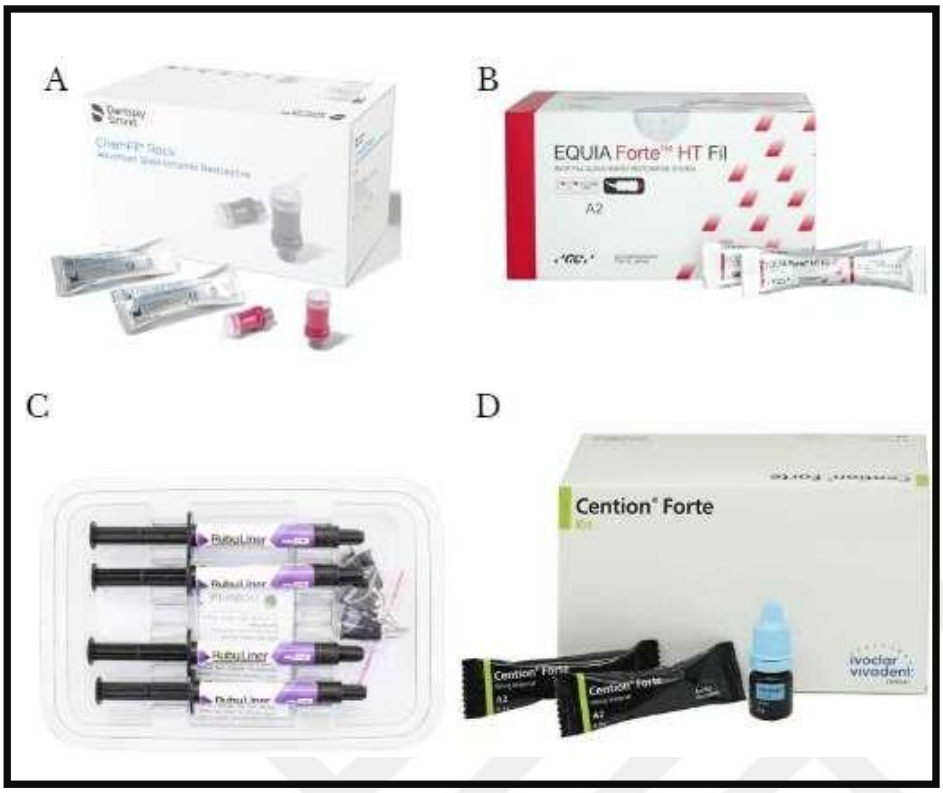
3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Gereçler

Bu tez çalışmasında, 3 farklı cam iyonomer restoratif materyal ve bir alkasit restorasyon materyali karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda; çinko ile güçlendirilmiş yüksek viskoziteli cam iyonomer restoratif materyal olan Chemfil Rock (Dentsply Sirona, Almanya), yüksek viskoziteli cam iyonomer restoratif materyal olan EQUIA Forte HT Fil (GC, Japonya) ve rezin modifiye cam iyonomer restoratif materyal olan Ruby Liner (Rubydent, Türkiye) kullanılmıştır. Diş hekimliğine yaygın olarak kullanılan cam iyonomer içerikli restoratif materyaller ile mukayese etmek için ise yeni tanıtılan ve alkasit bir restoratif materyal Cention Forte (Ivoclar Vivadent, İsviçre) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Kullanılan restoratif materyaller Tablo 3.1'de, çalışmada kullanılacak materyallerin içeriği ise Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller ve üretici firma isimleri

MATERYAL	KATEGORİ	ÜRETİCİ FİRMA
ChemFil Rock	Çinko ile güçlendirilmiş yüksek viskoziteli cam iyonomer	Dentsply Sirona, Almanya
Ruby Liner	Rezin modifiye cam iyonomer	Rubydent, Türkiye
EQUIA Forte HT Fil	Yüksek viskoziteli cam iyonomer	GC, Japonya
Cention Forte	Alkasit	Ivoclar Vivadent, İsviçre



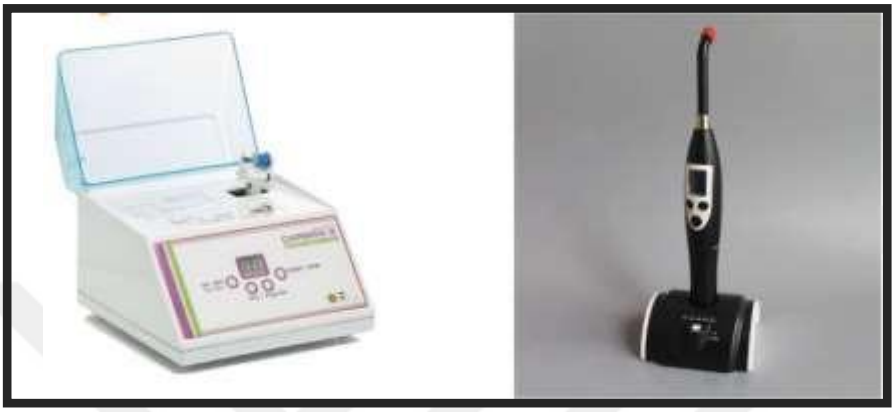
Şekil 3.1.Çalışmada kullanılan restorasyon materyalleri A) Chemfil Rock (Dentsply Sirona, Almanya), B) EQUIA Forte HT Fil (GC, Japonya), C) Ruby-Liner (Rubydent, Türkiye), D) Cention Forte (Ivoclar Vivadent, İsviçre)

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan materyallerin içeriği

MATERYAL	İÇERİK
ChemFil Rock	Toz: Kalsiyum alimuno-çinko-floro-fosfor silikat cam, poliakrilik asit demir oksit, titanyum dioksit pigment Likit: Tartarik asit, Distile su
Ruby Liner	Floro-alüminosilikat cam, poliakrilik asit, metakrilat polikarbonik asit, baryum camı, Bis-GMA
EQUIA Forte HT Fil	Toz: Stronsiyum-alimuno-floro silikat cam, poliakrilik asit, tartarik asit Likit: Poliakrilik asit, polibazik asit ve distile su
Cention Forte	Toz: Kalsiyum florosilikat cam, baryum-alüminyum silikat cam, Kalsiyum-baryum-alüminyum florosilikat cam, iterbiyum triflorür Likit: UDMA, Trisiklodekan-dimetanol dimetakrilat, Aromatik ve alifatik UDMA, PEG-Polietilen glikol-400 dimetakrilat

Çalışmada restorasyon materyal örneklerinin hazırlanmasında kullanılan cihaz ve materyaller şunlardır:

- 1200mW/cm^2 şiddetinde ışık cihazı (Coxo, Çin)
- Amalgamatör (kapsül karıştırıcı) (AHCT, Türkiye)
- Steril tek kullanımlık petri kutusu (3K Lab, Türkiye).



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan amalgamatör ve ışık cihazı

3.1.2. Hücre Kültürü İncelemesinde Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızın sitotoksitite ve genotoksisite testleri L929 hücre (NCTC CLONE 929, ATCC, Almanya) hattı kullanılarak Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü incelemesinde kullanılan araç ve gereçler şunlardır:

- L929 hücre (NCTC CLONE 929, ATCC, Almanya)
- 6 ve 96 Kuyucuklu Plaklar (Costar, Almanya)
- Buzdolabı (Bosch, Almanya)
- Cam pastör pipet (Isolab, Almanya)
- Comet Bilgisayar Yazılımı 4.0 (Leica, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Purelab, ABD)
- Elektroforez (Cleaver Scientific, İngiltere)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Cleaver Scientific nanoPac-300P, İngiltere)
- ELISA Okuyucu (Biotek Instruments, Inc- EPOCH, ABD)
- Hassas Terazi (Shimadzu-Uni Bloc ATX224R, Japonya)
- Mikroskop (Leica, Almanya)

- Karbondioksit (CO_2) İnkübatörü (Sanyo, Japonya)
- Lam (26x76 mm) (Marienfeld Superior, Almanya)
- Lamel (24x60 mm) (Marienfeld Superior, Almanya)
- Laminar Kabin (Bilser, Türkiye)
- Mikropipetler (Socorex Acura 825, İsviçre)
- pH Metre (InoLab pH7310, Almanya)
- Santrifüj cihazı (Nuve NF 1200R, Türrkiye)
- Sayım Lamı (Neubauer Improved) (Marienfeld Superior, Almanya)
- Sekiz Kanallı Mikropipet (50-300 µL) (Isolab, Almanya)
- Steril Pipetler (5 ve 10 ml'lik) (Abdos Life Science, Hindistan)
- Steril Santrifüj Tüpleri (Fischerbrand, ABD)
- Su Banyosu (Microtest WB-15, İtalya)
- Terazi (Mettler Toledo AT201, ABD)
- Ultrasonik Banyo (Alex Machine, Türkiye)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Yatay Hücre Kültürü Şişesi (SPL Life Sciences, Güney Kore)

3.1.3.Hücre Kültürü İncelemesinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) (Biomatik, ABD)
- Dimetil sulfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Türkiye)
- Fosfat Tamponlu Serum Saline (PBS) (Multicell, Kanada)
- Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) (Sigma-Aldrich, Türkiye)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Aldrich Chemistry, ABD)
- Dulbecco's Modification Eagles Medium (DMEM) (Multicell, Kanada)
- Etidiyum Bromür (EtBr) (Sigma-Aldrich,Türkiye)
- Etil Alkol (Etanol) (Isolab, Almanya)
- Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na_2EDTA) (Sigma-Aldrich,Türkiye)
- Fetal Sığır Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Almanya)
- Hidrojen Peroksit (%30) (Sigma-Aldrich, Türkiye)

- Metil Alkol (Metanol) (Sigma-Aldrich, Türkiye)
- N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu (Sigma-Aldrich, Türkiye)
- Normal Erime Noktalı Agar (NMA) (Sigma-Aldrich, Türkiye)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific,Almanya)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya)
- Tripan Mavisi (Biological Industries, İsrail)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail)
- Tris-BASE (ChemCruz, Hollanda)
- Triton X-100 (Amresco, ABD)

3.1.4.Antibakteriyel Etkinlik İncelenmesinde Kullanılan Araç ve Gereçler

- *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) Liyofilize şuş (Microbiologics, ABD)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) Liyofilize şuş (Microbiologics, ABD)
- Hazır dökülmüş steril Mueller-Hinton Fastidious (MH-F) (Defibrine at kanı ilaveli) agar besiyeri (Besimik,Türkiye)
- Mueller-Hinton Agar toz besi yeri (Conda, Singapur)
- CO_2 inkübatör (Nüve, Türkiye)
- Vorteks cihazı (VELP Scientifica, İtalya)
- McFarland Densitometre (BioSan, Letonya)
- İnkübatör (Life Sicence Innovations, ABD)
- Brain Hearth Infusion Agar (Conda, Singapur)
- Tek kullanımlık steril petri kutusu (3K Lab, Türkiye)
- Siprofloksasin diski (Bioanalyse, Türkiye)

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmasında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

Besi ortamı: Yüksek glikoz ve L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi yerine %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin-streptomisin ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklanmıştır. Deney esnasında 37°C'ye getirilerek kullanılmıştır.

MTT Çözeltisi: 5 mg MTT, steril PBS (Multicell, Kanada) içerisinde çözülmüş ve 5 mL'ye tamamlanmıştır. MTT çözeltisi +4 °C'de en fazla 1 ay

saklanmıştır. Hazırlanan MTT çözeltisi kullanılacağı zaman 1 mL alınarak 10 mL'ye tamamlanmıştır (0,5 mg/mL).

Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na_2EDTA) Çözeltisi: 29,78 g Na_2EDTA 400 mL distile suda çözdürülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 10 olarak ayarlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında +25°C'de saklanmıştır.

Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi: 100 mL distile suda, 40 g NaOH çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında +25°C'de saklanmıştır.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi: 25 mL PBS çözeltisi içerisine 250 mg LMA mikrodalga fırın kullanılarak çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti küçük hacimler şeklinde buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agar (NMA) Çözeltisi: Mikrodalga fırın kullanılarak 1 g NMA, 100 mL distile suda çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

Elektroforez Tampon Çözeltisi: 7,5 mL 200 mM EDTA, 44,8 mL 10 N NaOH çözeltisi ve 1447,7 mL soğuk distile su karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.

Etanol Çözeltisi (%50): 250,5 mL mutlak etanol (%99,8) çözeltisi, distile suyla çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde tamamlanmıştır.

Etanol Çözeltisi (%75): 375,7 mL mutlak etanol (%99,8) çözeltisi, distile suyla çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde tamamlanmıştır.

Etanol Çözeltisi (%95): 475,9 mL mutlak etanol (%99,8) çözeltisi, distile suyla çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde tamamlanmıştır.

Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi: 25 mL distile suda 5 mg EtBr çözdürülerek 200 µg/mL EtBr çözeltisi hazırlandı. Boyama esnasında bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'ye distile suyla tamamlanmış, 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında +25°C'de saklanmıştır.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS): 200 mL distile suda, 2 PBS tablet çözdürülmüştür. Çözelti buzdolabında 4°C'de saklanmıştır.

Stok Lizis Çözeltisi: 1,2 g Tris-base, 37,2 g Na_2EDTA ve 146,1 g NaCl 500 mL distile suda çözülerek üzerine 10 g NaOH ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 10 olacak şekilde üzerine 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenmiş distile su ile çözelti 890 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında +25°C'de saklanmıştır.

Lizis Çözeltisi: 2 mL Triton X-100, 20 mL DMSO ve 178 mL stok lizis çözeltisi ile karıştırılmıştır. Deney günü taze hazırlanan çözelti, deney esnasında soğuk olarak kullanılabilmesi için +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. L929 Hücrelerinin Çözülmesi

-80°C'de saklanan L929 hücrelerinin bulunduğu kriyovialler 37°C'lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletilmiştir. Steril çalışma kabinin içerisinde, kriyoviallerdeki hücre süspansiyonu (1,5 mL) konik tüplere aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 4,5 mL PBS ile karıştırılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatan atılmış ve kalan hücreler 7 mL besi yeri ilavesiyle 25 cm^2'lik yatay hücre kültürü şişelerine ekilmiştir (Resim 3.1). Ardından 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin çözünmesinden 24 saat sonra ortamdaki DMSO kalıntılarını uzaklaştırmak için PBS ile bir kez yıkama yapılmıştır.

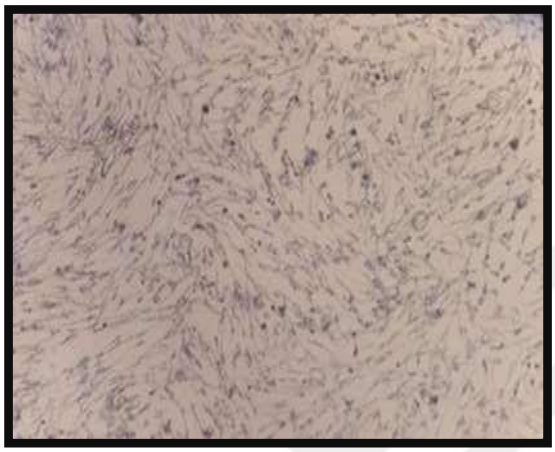


Resim 3.1. Yatay hücre kültürü şişelerine ekilmiş L929 hücreleri

3.2.3. L929 Hücrelerinin Pasajlanması

Çalışma esnasında kullanılacak L929 hücre kültürünün devamının sağlanması ve canlılığının korunması için yatay hücre kültürü şişesinin tabanını %80 oranını kaplayan hücrelerin pasajlaması yapılmıştır. Yatay hücre kültürü şişelerinde bulunan besi yeri aspire edilerek üzerine 2 mL steril PBS (37°C) ile yıkama yapılarak, PBS aspire edilmiştir. Ardından, 2 mL Tripsin/EDTA solüsyonu (%0,05 trypsin + % 0,02 EDTA, Biological Industries, İsrail) yatay hücre kültürü şişelerinin içerisine ilave edilmiştir. Bu işlemlerden sonra hücre kültürü 37°C'de 3 dk inkübatörde bekletilerek yatay hücre kültürü şişelerindeki hücrelerin yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsinin çalışmasını durdurmak için 4 mL besi yeri eklenmiş ve hafifçe

çalkalanmıştır. Hazırlanan süspansiyon oda sıcaklığında 1000 rpm 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu tüp tabanında toplanan hücrelere temas etmeden üst faz pastör pipet yardımı ile süspansiyondan uzaklaştırılmıştır. Santrifüj tüplerine besi yeri ilave edilerek oluşturulan hücre süspansiyonu tekrardan yatay hücre kültürü şişelerine ekilmiştir. Bu işlem tekrarlanarak hücre kültürünün devamlılığı sağlanmıştır.



Resim 3.2. Fare fibroblast hücreleri (L929)

3.2.5. Sitotoksisite Değerlendirme Testi

Çalışmada kullanılan materyallerin sitotoksisite değerlendirmeleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dört farklı restoratif materyalin fare fibroblastları üzerinde 24 ve 72 saat içerisinde meydana getirdikleri sitotoksik etkiler MTT testi ile değerlendirilmiştir.

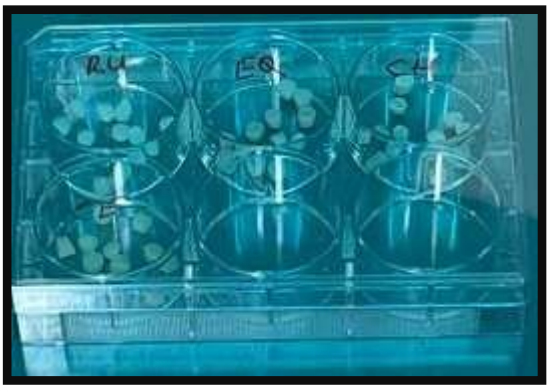
3.2.5.1. Sitotoksisite değerlendirmesi için test örneklerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılacak materyaller, 5 mm çapında ve 2 mm derinliğinde özel olarak üretilmiş steril plastik kalıplar steril çalışma kabini içerisinde üretici firmaların önerileri dikkate alınarak hazırlanmıştır. Kalıplardan fazla materyalin uzaklaştırılması ve örnek içerisinde hava boşluğu oluşmasını önlemek için selofan bant ile cam lamel arasına sıkıştırılmıştır. Örnekler üretici firmaların önerisi doğrultusunda polimerize edilmiştir (Tablo 3.3). Materyallerin polimerizasyon işlemleri için dalga boyu 430-480 nm, yoğunluğu 1200 mW/cm^2 olan ışık cihazı kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılacak materyallerin uygulama şekilleri ve polimerizasyon süreleri

MATERYAL	UYGULAMA ŞEKLİ	POLİMERİZASYON SÜRESİ
ChemFil Rock	Kapsül amalgamatörde 12 sn karıştırıldıktan sonra tabanca ile disklere yerleştirilir.	1200mW/cm^2 şiddetindeki ışık ile 20 sn veya Otopolimerizasyon 4 dk. 30 sn
Ruby Liner	Tek tabaka halinde disklere yerleştirilir.	1200mW/cm^2 şiddetindeki ışık ile 20 sn
EQUIA Forte HT Fill	Kapsül amalgamatörde 10 sn karıştırıldıktan sonra tabanca ile disklere yerleştirilir.	1200mW/cm^2 şiddetindeki ışık ile 20 sn veya Otopolimerizasyon 2 dk. 30 sn
Cention Forte	Kapsül amalgamatörde 10 sn karıştırıldıktan sonra tabanca ile disklere yerleştirilir.	500 – 900 mW/cm^2 şiddetindeki ışık ile 20 sn veya 900 – 1.400 mW/cm^2 şiddetindeki ışık ile 15 sn

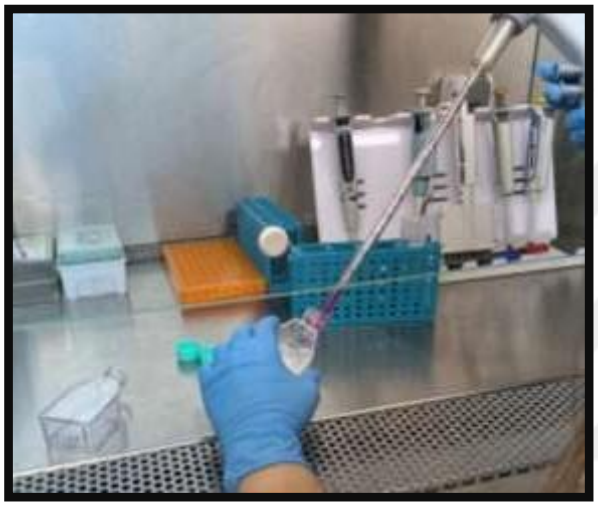
Örneklerin yüzey alanının solüsyon hacmine oranı, ISO standartlarının önerdiği 0.5-6.0 cm^2 / mL aralığına uygun bir biçimde olacak şekilde tasarlanmıştır. Materyallerin örnek boyutları belirlenirken, yüzey/vasat oranının 0.5-6cm^2/mL olması ve salım aşamasında kültür medyumunun örnek yüzeyi ile tamamen teması amaçlanmıştır. Her materyalden 12 tane olmak üzere toplam 48 örnek hazırlanmıştır (Resim 3.3). Her gruptan 12 adet hazırlanan test örneklerinin 24 ve 72 saatlik inkübasyon periyotlarının ardından MTT testi ile sitotoksisitelerinin değerlendirilmesi için materyaller her gruptan 6 adet olacak şekilde 2 alt gruba ayrılmıştır.



Resim 3.3. MTT testi için hazırlanan materyal örnekleri

3.2.4.2. MTT testinin uygulanması

L929 hücreleri 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra yatay hücre kültürü şişeleri mikroskop altında incelenerek hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir. Hücre kültür şişesinin %80'i hücre ile kaplandıktan sonra hücreler 96 kuyucuklu plakalara alınmıştır. Hücre kültür süspansiyonları, steril çalışma kabini içerisinde yatay hücre kültür şişesinden vakum ve cam pastör pipet kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Resim 3.4).



Resim 3.4. Hücre kültür süspansiyonlarının uzaklaştırılması

Yatay hücre kültür şişesindeki hücreler, steril pipet yardımıyla 2 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırılarak şişeye 2 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. Yıkama sonrası, yatay hücre kültürü şişeleri, 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra yatay hücre kültürü şişelerine 4 mL PBS eklenmiştir. Hücre süspansiyonu, hücrelerin çökmesini sağlamak için santrifüj tüpüne alınarak 25°C sıcaklıkta, 1000 devir/dakika olacak şekilde beş dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpünün üzerinde toplanan sıvı, cam pastör pipet ve vakum yardımıyla dipte bulunan pellete temas etmeden uzaklaştırılmıştır. Santrifüj tüpünün dibinde bulunan hücre pelletine, steril pipet ile 5 ml besi yeri ilave edilerek karıştırılmıştır. Santrifüj tüpündeki hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak bir ependorf tüpe aktırılmış ve üzerine 90 µL tripan mavisi ilave edilmiştir (Dilüsyon faktörü:10). Yaklaşık 20 µL tripan mavisi-hücre süspansiyonu karışımı Neubauer sayım lamına aktarılmıştır (Resim 3.5).



Resim 3.5. Çalışmada kullanılan tripan mavisi

Işık mikroskobu altında, sayım lamına aktarılan süspansiyondaki hücreler sayılmıştır. Hücre sayımının kesin ve doğru olması için her işlemde 100 ve üzerinde hücre sayılmıştır.

Canlı hücre sayısını hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanılmıştır:

mL'*deki Yaşayan Hücre Sayısı = (Toplam Hücre Sayısı/4) X 10^4 X 10*

Canlı hücre sayıları hesaplanan hücreler, besi yeri ile seyreltilerek hücre süspansiyonu oluşturulmuştur. Hazırlanan süspansiyon, her kuyucukta 200 µL (10000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekim yapılmıştır. Bu işlemden sonra 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen besiyeri cam pastör pipet ve vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır.



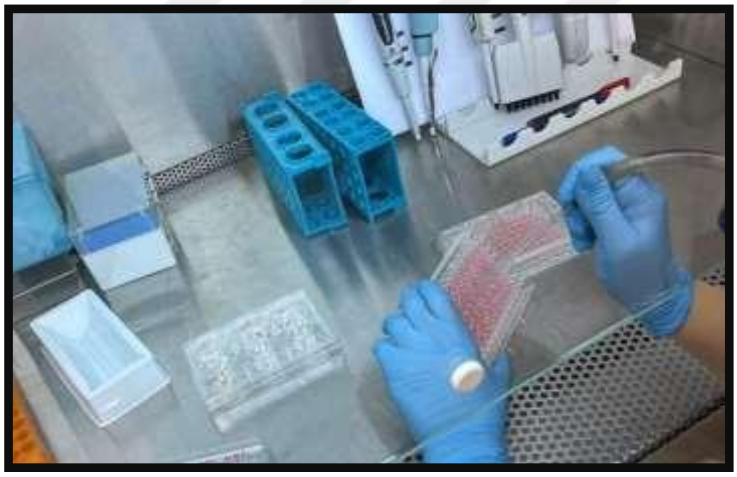
Resim 3.6. Test örneklerinin 96 kuyucuklu plakalara eklenmesi

96 kuyucuklu plakaların üzerine ilk sıra ve sütunları boş bırakılacak şekilde; 2. Sütuna Ruby Liner (RU), 3. Sütuna EQUIA Forte (EQ), 4.sütuna ChemFil Rock (CH) ve 5. Sütuna Cention Forte (CE) dilüsyonları koyulmuştur (Resim 3.6). Kalan sütunların yarısına, negatif kontrol grubu olarak kullanılmak üzere besi yeri (DMEM) içerisinde hücre; diğer yarısına ise sadece besi yeri koyulmuştur (Şekil 3.3).

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
B	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
C	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
D	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
E	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
F	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
G	DMEM	Ruby Liner	EQUIA Forte HT	Chemfil Rock	Cention Forte	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM+hücre	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
H	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM

Şekil 3.3. 96 kuyucuklu plakada ekstraktların yerleşim şeması

Hücreler, 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içerikli inkübatörde 24 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemlerinin ardından madde çözeltileri cam pastör pipet ve vakum ile uzaklaştırılarak kuyucuklara 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki MTT çözeltisinden 100 µL eklenmiştir (Resim 3.7).



Resim 3.7. İnkübasyon işleminden sonra çözeltilerin uzaklaştırılması

Hücreler, 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içerikli inkübatör cihazında 3 saat daha inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra MTT çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µL DMSO çözeltisi, formazan kristallerini çözmek için ilave edilmiş ve 10 dakika yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra oluşan renk şiddeti ELISA okuyucusunda (BioTek, ABD) 570 nm dalga boyunda

ölçülmüştür. Çalışmada elde edilen absorbans değerlerinin, kontrol absorbans değerine oranının 100 ile çarpımı sonucunda her materyalin konsantrasyonu için IC50 ve % hücre canlılık değerleri bulunmuştur.

3.2.5. Genotoksisite Değerlendirme Testi

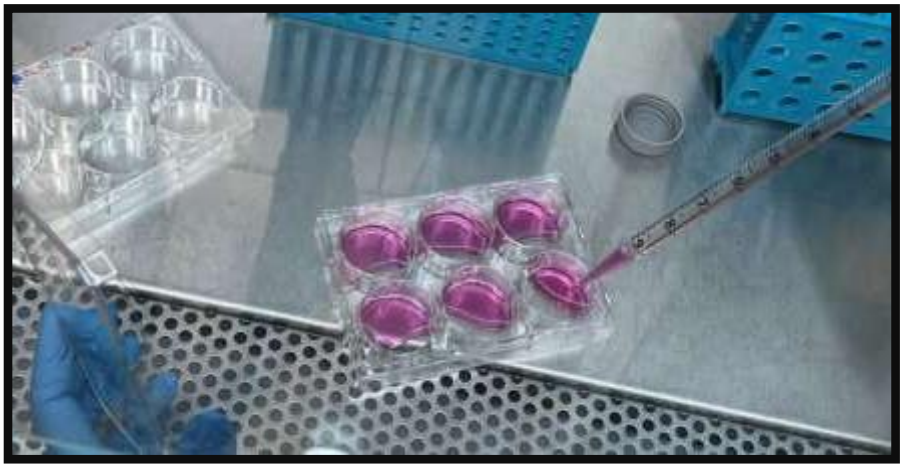
Çalışmada kullanılan materyallerin genotoksisite değerlendirmeleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dört farklı restoratif materyalin fare fibroblastları üzerinde 72 saat içerisinde meydana getirdikleri genotoksik etkilerin, Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.2.5.1. Genotoksisite değerlendirilmesi için test örneklerinin hazırlanması

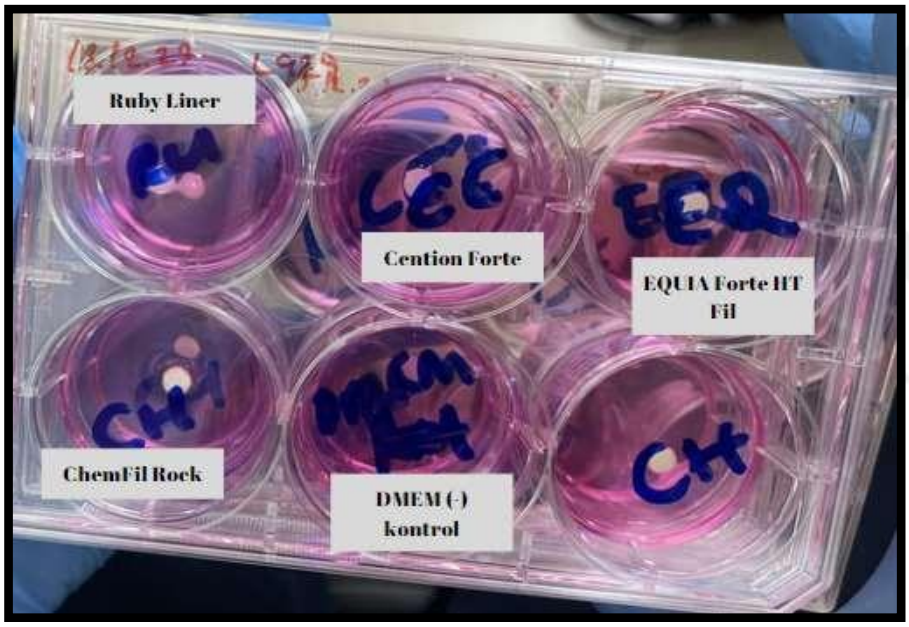
Sitotoksisite incelemesinde anlatıldığı gibi çalışmada kullanılacak materyaller, 5mm çapında ve 2 mm derinliğinde özel olarak üretilmiş steril plastik kalıplar kullanılarak hazırlanmıştır. Örneklerin yüzey alanının solüsyon hacmine oranı, ISO standartlarının önerdiği 0.5-6.0 cm^2 / mL aralığına uygun bir biçimde olacak şekilde tasarlanmıştır. Her materyalden 6 tane olmak üzere toplam 24 örnek hazırlanmıştır. Her gruptan 6 adet hazırlanan test örneklerinin 72 saatlik inkübasyon periyotlarının ardından Comet testi ile genotoksik etkileri incelenmiştir.

3.2.5.2. Comet testi

Hücre kültürü başlığı altında anlatıldığı üzere L929 hücrelerinin kültürü yapılarak ışık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamında hücreler sayılmıştır. Her eppendorf tüpte 50 mL (10000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde hücreler besi yerinde süspanse edilmiştir. Besi yerleri 6 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra, restorasyon materyalleri besi yerlerine 72 saat maruz bırakılmıştır (Resim 3.8 ve Resim 3.9).



Resim 3.8. 6 kuyucuklu plakalara besiyeri eklenmesi



Resim 3.9. 6 kuyucuklu plakada test örneklerinin yerleşimi

Materyallere maruz bırakılan hücreler, 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içerikli inkübatörde 3 saat olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi uygulanan hücreler, buzun üstünde bekletilmiştir**.** Hücre süspansiyonları 75 µL mikrosantrifüj tüplerine alınmış, 150 µL %1'lik LMA (37°C ± 0,5°C'de eritilmiş) çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Önceden %1'lik NMA çözeltisine daldırılarak hazırlanan agar ile kaplanmış lamlara yayılarak üzerleri lamel ile kapatılmıştır (Resim 3.10). +4°C sıcaklıkta, 2-10 dakika kadar bekletilen agarın katılaşması sağlanmıştır.



Resim 3.10. Mikrosantrifüj tüplerindeki hücre süspansiyonlarının agar ile kaplı lam ile lamel arasına yerleştirilmesi

Lam ile lameller birbirinden ayrılarak şalelere yerleştirilmiştir. Önceden hazırlanan ve +4°C'de saklanan soğuk lizis çözeltisi üzerlerine dökülüp +4°C sıcaklıkta, en az 1 saat kadar bekletilmiştir. Lizis çözeltisiyle maruz bırakılan lamlar, işlem sonrasında şalelerde distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan lamlar, agarla kaplı kısımları üstte olacak şekilde elektroforez küvetine aralık bırakılmayacak şekilde yerleştirilmiş ve soğuk elektroforez çözeltisi ile tankın içi doldurulmuştur (Resim 3.11).



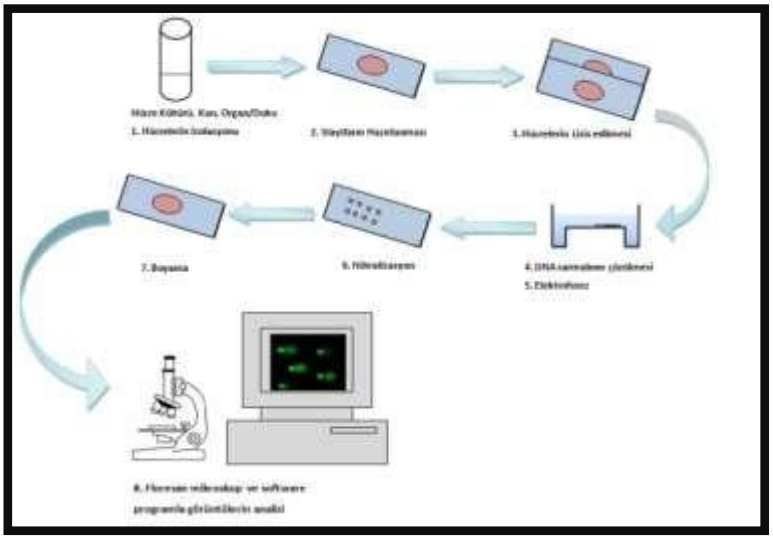
Resim 3.11. Hazırlanan lamların soğuk elektroforez tankına yerleştirilmesi

Lamlar, herhangi bir akım uygulanmadan karanlık ortamda 20 dakika boyunca elektroforez küvetinin içerisinde bekletilmiştir. Ardından 25V ve 300 mA akım ile 20 dakika boyunca elektroforez işlemi uygulanmıştır (Resim 3.12).



Resim 3.12. Elektroforez işlemi için karanlık ortamın hazırlanması

Elektroforez işleminden sonra lamlar şalelere tekrar yerleştirilerek tekrar distile su ile yıkanmıştır. Lamların üzerine fosfatla tamponlanmış çözelti (PBS) ilave edilerek +4°C sıcaklıkta 10 dakika boyunca bekletilmiştir. PBS çözeltisi şalelerden alınarak, lamlar şalelerde distile su ile son defa yıkanmıştır. Lamların yıkanmasından sonra lamlar üzerine sırasıyla hazırlanmış %50, %75 ve %95'lik etanol çözeltileri ilave edilerek ağzı kapalı olacak şekilde 5'er dakika bekletilmiştir. İşlem sonrası lamlar şalelerden çıkartılarak kurumaları için 24 saat bekletilmiştir. Lamların okunması esnasında, 40 µL etidiyum bromür çözeltisi lamların üzerine ilave edilmiş ve lamlar lamel ile kapatılmıştır. Floresan mikroskobu atında, 100 hücre, "Perceptive Instruments COMET Assay IV Analysis System" yazılım programı ile DNA hasar miktarı kuyruk yoğunluğu parametresi kullanılarak ölçülmüştür (146).



Resim 3.13. Comet testinin uygulama basamakları (147)

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sitotoksisite ve genotoksisite testi için istatiksel değerlendirilmesi, GraphPad Prisim® Version 5.03 (GraphPad Software, Inc. CA, ABD) programı ile yapılmıştır. Gruplar arası farkların önem kontrolleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. İstatiksel bulgular, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Post hoc analizi ise Tukey's HSD testi ile yapılmıştır. Sitotoksisite için istatiksel anlamlılık değeri başlangıcı $p<0,0001$ olarak kabul edilmiştir. Genotoksisite için ise; istatistiksel anlamlılık değeri başlangıcı olarak $p<0,05$ kabul edilmiştir.

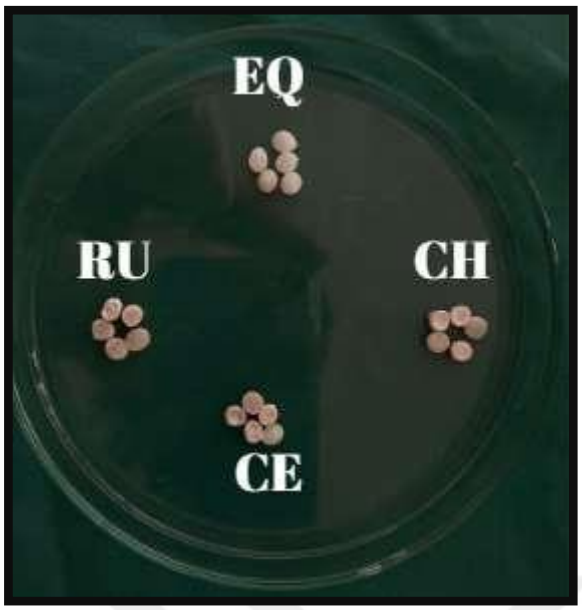
3.2.7.Antibakteriyel Etkinlik Testi

Çalışmada kullanılan materyallerin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirmeleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dört farklı restoratif materyalin *S.mutans* ve *E.faecalis* şuşları üzerindeki antibakteriyel etkinliklerinin agar difüzyon testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.2.7.1.Test örneklerinin hazırlanması

Sitotoksisite ve genotoksisite çalışmalarında anlatıldığı gibi antibakteriyel etkinlik incelenmesi için kullanılacak materyaller, 5mm çapında ve 2 mm derinliğinde özel olarak üretilmiş steril plastik kalıplar kullanılarak hazırlanmıştır. Plastik kalıplar 1 mm kalınlığındaki düz yüzeyli steril bir camın üzerine yerleştirilmiştir. Materyaller üretici firmaların talimatlarına göre karıştırıldıktan sonra plastik kalıpların içine yüzeyi düzeltilerek yerleştirilmiştir. Materyalin polimerizasyonu esnasında oksijen inhibisyonunu en aza indirebilmek için yüzey üzerine steril cam yerleştirilmiştir. Materyalin fazlasının taşmasını sağlamak ve yüzeyde porozite oluşumunu engellemek cam yüzeyine parmak basısı uygulanmıştır.

Antibakteriyel etkinlik incelenmesi için hazırlanan test örnekleri, üretici firmaların önerisi doğrultusunda polimerize edilmiştir. Her bir materyalden 5 adet olmak üzere, iki mikroorganizma için toplam 40 adet örnek disk hazırlanmıştır. Elde edilen örnekler steril bir ortamda muhafaza edilmiştir (Resim 3.13).



Resim 3.14. Agar difüzyon testi için hazırlanan numuneler

3.2.8.2. Bakteri süspansiyonlarının elde edilmesi

Antibakteriyel etkinliğin incelenmesi için *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ve *Enterecoccus faecalis* ATTC 29212 liyofilize şuşları temin edilmiştir. *E. faecalis* ve *S.mutans* suşları için BHI (Brain-Heart Infusion) sıvı besiyerine ekim yapılacak ve 37°C'de, CO_2'li etüvde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Liyofilize bakteri şuşları, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) standartları doğrultusunda belirlenen materyallere karşı duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile incelenmek üzere hazırlanmıştır.

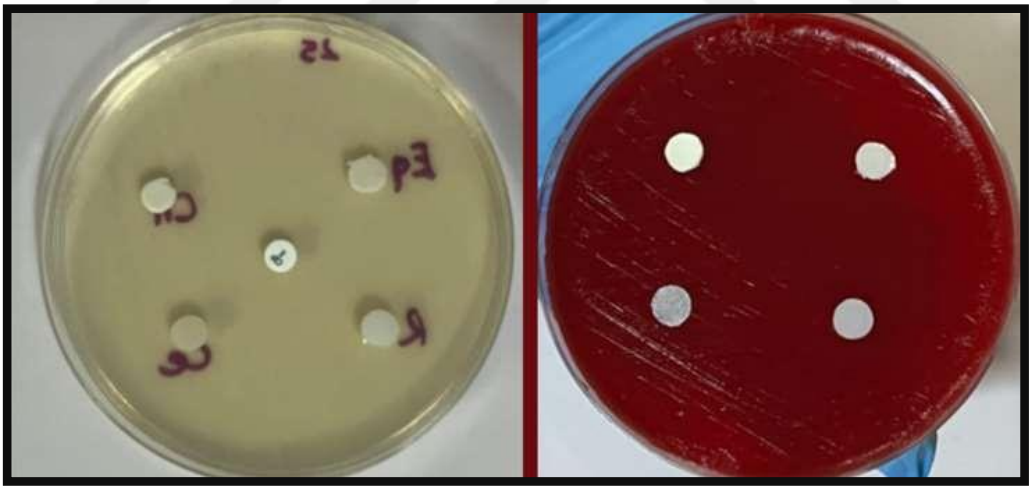
3.2.8.3. Agar difüzyon testi

Agar difüzyon testinde kullanılmak üzere hazırlanan diskler steril ortamda muhafaza edilmiştir. Deneylerde siproflokasasin diski pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Koloniler, *S. mutans* ve *E. faecalis* için Brain Heart Infusion (BHI) sıvı besiyerine transfer edilerek McFarland'ın 0.5 bulanıklığında (yaklaşık $1.5x10^8$ bakteri/mL) bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Bu süspansiyonlar steril pamuk uçlu eküvyonlar ile bakteriler için hazır dökülmüş steril agar besiyerlerine yaygın ekim yapılmıştır (Resim 3.14).



Resim 3.15. Bakterilerin besiyerlerine ekimleri

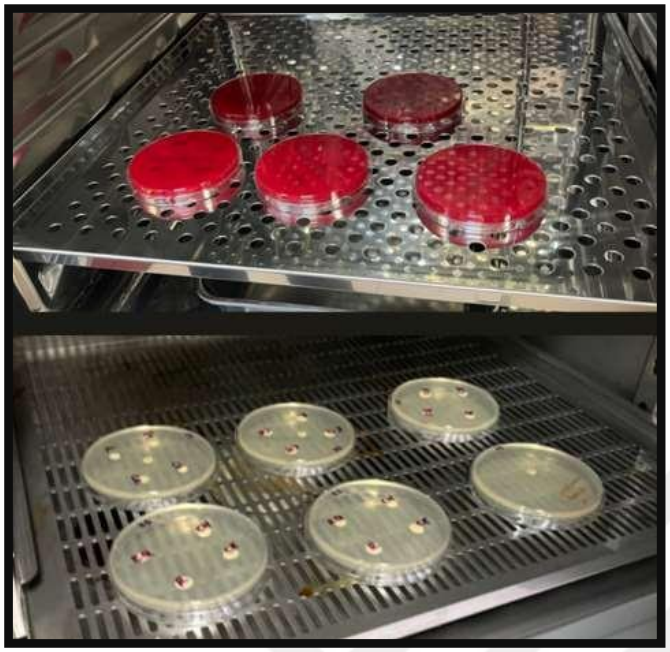
S.mutans süspansiyonu hazır dökülmüş steril Mueller-Hinton Fastidious (MH-F) (Defibrine at kanı ilaveli) agar besiyerine yayılırken, *E.faecalis* Brain Hearth Infusion (BHI) agar besiyerine diskler ortalama 2.5 cm aralıklarla olacak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 3.15).



Resim 3.16. Hazırlanan örneklerin besiyerine ekimleri

Besi yerleri hazırlanmadan önce bulunduğu petri kaplarına, hazırlanan disklerin karışmaması için materyallerin ticari isimlerinin baş harfleri yazılmıştır. *S.mutans'*a ait petri kapları %5 CO_2 içeren etüvde 35±1°C'de 18 ve 24 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.16). *E.faecalis*'e ait petri kapları ise, aerobik şartlarda 35±1°C'de 18 ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra disklerin etrafında oluşan

inhibisyon zon çaplarının EUCAST standartlarına göre değerlendirilerek ölçülmesi planlanmıştır.



Resim 3.17. Hazırlanan petrilerin inkübasyona bırakılması

4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİSİTE TEST SONUÇLARINA AİT BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil, Cention Forte steril ortamda üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Materyaller, polimerizasyon reaksiyonlarının tamamlanmasından sonra 24 saat boyunca medyumda ekstraksiyona maruz bırakılmıştır. Materyallerin sitotoksisitesi, MTT yöntemi ile analiz edilerek, hücrelerin canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Materyallerin sitotoksisitesinin 24. ve 72. saatlerdeki incelenmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin, kontrol grubunun absorbans değerlerine oranı hücre canlılığı olarak tanımlanmıştır. Kültüre edilmiş L929 hücrelerinin canlılığı ile inkübasyon süresi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller ile kültüre edilen fare fibroblast hücrelerinin MTT testine göre hücre 24. saat sonundaki canlılık oranları ve ortalama absorbans değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fill ve Cention Forte restorasyon materyallerinin 24. saatteki canlı hücrelerin absorbans değerleri ve oranları

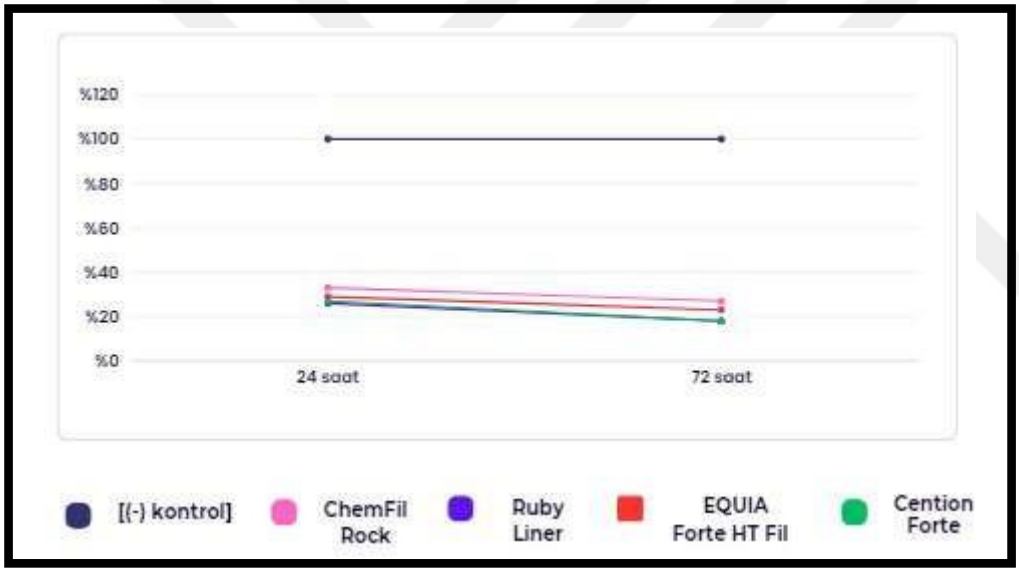
Gruplar	**Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)**	**Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)**
DMEM [(-) kontrol]	0,4195 (±0,031659)	%100
ChemFil Rock	0,13775 (±0,07107962)	%32,84
Ruby Liner	0,106333 (±0,00667499)	%25,35
EQUIA Forte HT Fil	0,124833 (±0,01350823)	%29,76
Cention Forte	0,110833 (±0,01149517)	%26,42

Çalışmada kullanılan materyaller ile kültüre edilen fare fibroblast hücrelerinin MTT testine göre 72. saat sonundaki canlılık oranları ve ortalama absorbans değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte restorasyon materyallerinin 72. saatteki canlı hücrelerin absorbans değerleri ve oranları

Gruplar	Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
DMEM [(-) kontrol]	0,67016667 (±0,024506)	%100
ChemFil Rock	0,178166667 (±0,06245109)	%26,59
Ruby Liner	0,11933333 (±0,01213352)	%17,81
EQUIA Forte HT Fil	0,15133333 (±0,02014668)	%22,58
Cention Forte	0,11766667 (±0,00912262)	%17,56

Çalışmamızdaki gruplara ait 24. ve 72. saatteki hücre canlılık oranlarının grafiksel ifadesi ise Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Materyallerin 24. ve 72. saatteki hücre canlılık oranları

1983 yılında Mossman (148) tarafından geliştirilen MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi genellikle hücre canlılığını değerlendirmek ve sitotoksik etkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Sitotoksisite derecesini belirlemede aşağıdaki skala ile derecelendirmiştir:

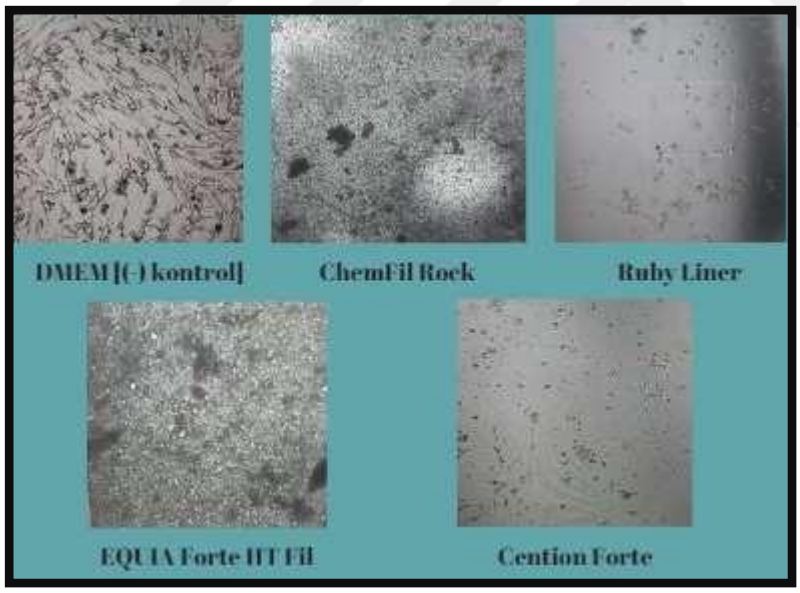
1. **Yüksek Canlılık (%90 ve üzer**i) → sitotoksik değil
2. **Orta Canlılık (%60-90)** → hafif derecede sitotoksik
3. **Düşük Canlılık (%30-59)** → orta derecede sitotoksik
4. **Çok Düşük Canlılık (%30 ve altı)** → şiddetli derecede sitotoksik

Çalışmamızda bu sınıflama temel alınarak elde edilen hücre canlılık oranlarına göre sitotoksik etki dereceleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

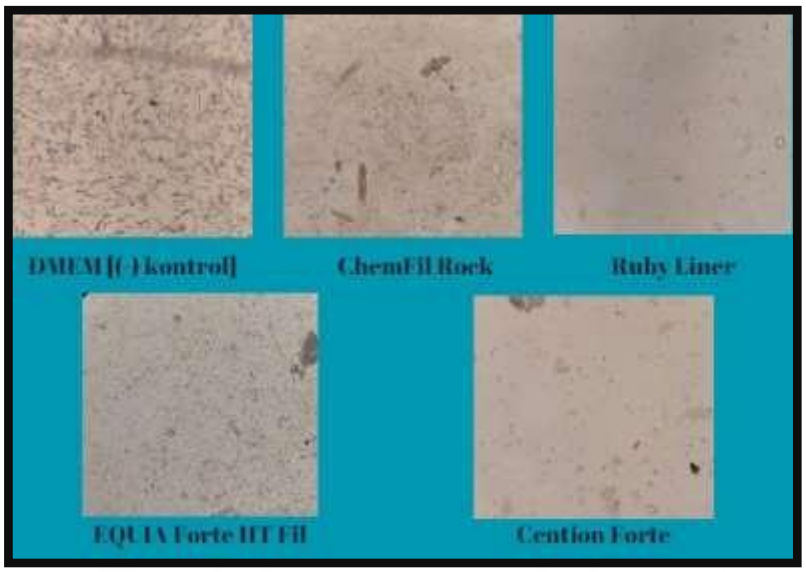
Buna göre; 24 saatlik değerlendirmede ChemFil Rock, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte'un orta derecede, Ruby Liner'ın ise şiddetli derecede sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. 72 saatlik değerlendirmede ise ChemFil Rock, EQUIA Forte HT Fil, Cention Forte ve Ruby Liner'ın şiddetli derecede sitotoksik olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Mosmann (148)'ın skalasına göre restoratif materyallerin sitotoksisite değerleri

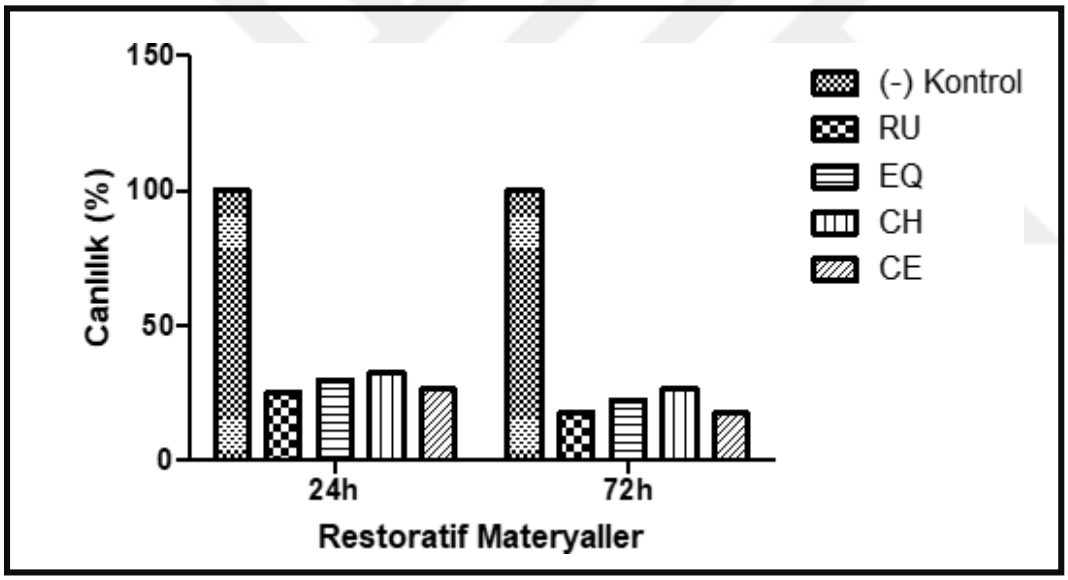
Gruplar	**24 saat**	**72 saat**
ChemFil Rock	Orta	Toksik
Ruby Liner	Toksik	Toksik
EQUIA Forte HT Fil	Toksik	Toksik
Cention Forte	Toksik	Toksik



Resim 4.1. Restoratif materyaller ile kültüre edilen L929 hücre kültürünün inkübasyonun 24. saatindeki mikroskobik görüntüsü



Resim 4.2. Restoratif materyaller ile kültüre edilen L929 hücre kültürünün inkübasyonun 72. saatindeki mikroskobik görüntüsü



Şekil 4.2. Restoratif materyallerin 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı ($p<0,0001$)

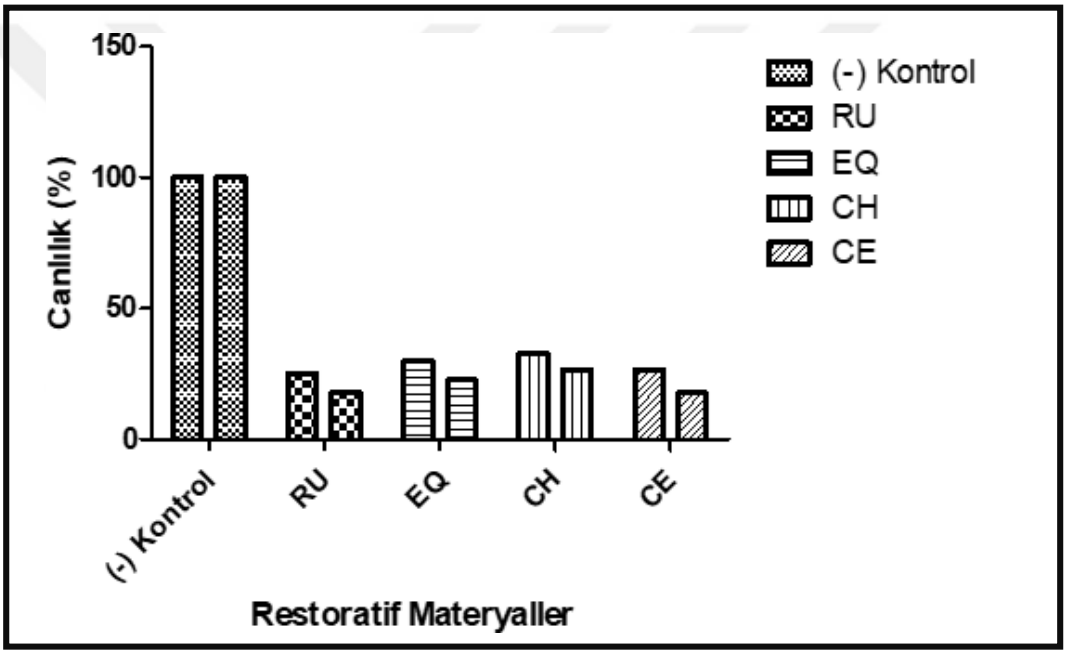
Şekil 4.2'de MTT testi sonuçlarına göre restoratif materyallerin farklı zaman dilimlerindeki sitotoksik değerleri kıyaslanmıştır.

24 saatlik inkübasyon sonucunda ChemFil Rock'ın orta düzeyde sitotoksik iken, 72 saatlik inkübasyon sonucunda yüksek düzeyde sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. Bu materyalin 24 ve 72 saatlik sitotoksisite değeri, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir ($p<0,0001$).

Ruby Liner, 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonuçlarına göre yüksek düzeyde sitotoksik bulunmuştur. Bu materyalin her iki zaman dilimindeki sitotoksisite değeri, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir (p<0,0001).

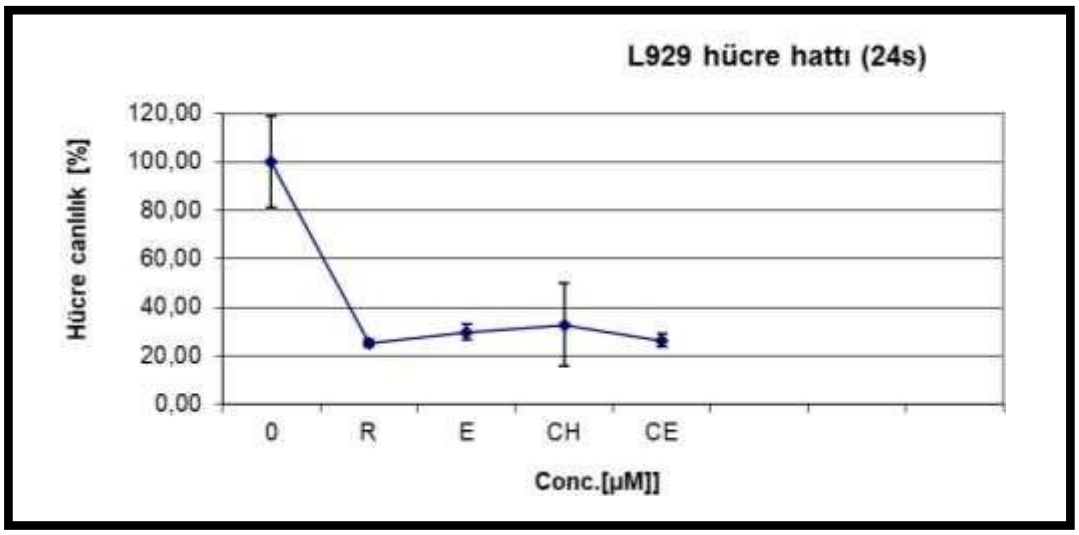
EQUIA Forte HT Fil'in, her iki zamanda dilimindeki inkübasyon sonucuna göre yüksek düzeyde sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. Bu materyalin her iki zaman dilimindeki sitotoksisite değeri, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir (p<0,0001).

Cention Forte, 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonuçlarına göre yüksek düzeyde sitotoksik olduğu gözlenmiştir. Bu materyalin 24 ve 72 saatlik sitotoksisite değeri, negatif kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir (p<0,0001).

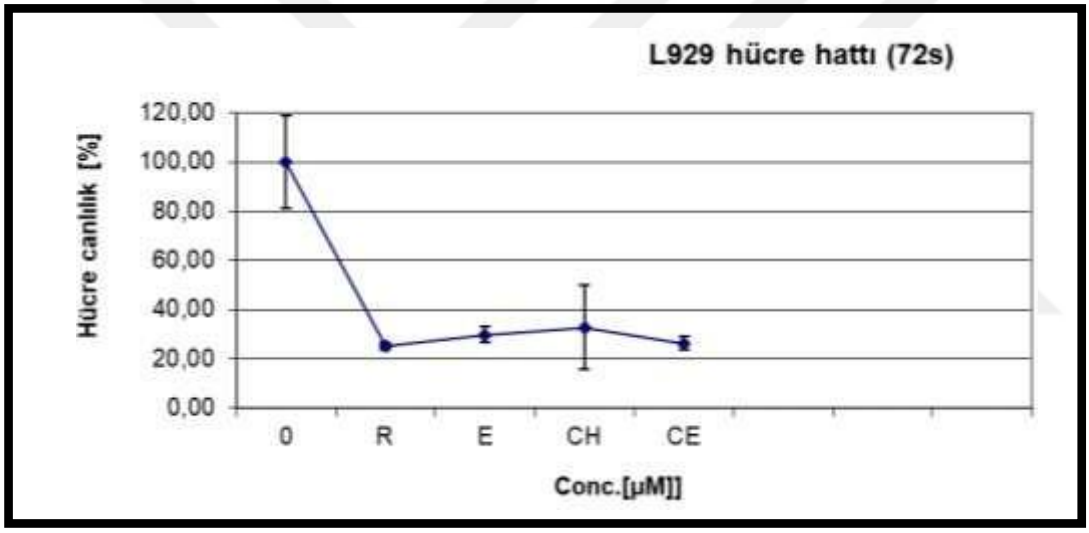


Şekil 4.3. Restoratif materyallerin hücre canlılığına zaman içindeki etkileri (p<0,0001)

Çalışmada kullanılan tüm restoratif materyallerin hücre canlılığı zaman içerisinde azalmaya devam etmiştir (Şekil 4.3). Bütün materyallerin sitotoksik değerleri, negatif kontrol grubuna anlamlı derecede yüksektir (p<0,0001).



Şekil 4.4. MTT analizine göre 24 saat sonra hücre canlılıkları



Şekil 4.5. MTT analizine göre 72 saat sonra hücre canlılıkları

4.2.GENOTOKSİSİTE TEST SONUÇLARINA AİT BULGULAR

Fare fibroblast hücre hattı üzerinde 4 farklı restorasyon materyali uygulanarak genetoksisite değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmamızda, tek hücre jel elektroforez (COMET) yönteminde genotoksik hasarı belirten parametre olarak; kuyruk yoğunluğu bulguları dikkate alınmıştır. Restoratif materyaller arasında anlamlı bir farklılık olmadığını tespit edebilmek için ANOVA varyans analiz testi kullanılmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre, *in vitro* şartlarda test maddeleri ve negatif kontrol grubu ile 72 saatlik maruziyetten sonra fare fibroblastlarındaki, kuyruk yoğunluğu değerlerinin ortalaması (± standart hata, SDE) Tablo 4.4 ve Şekil 4.6'de verilmiştir.

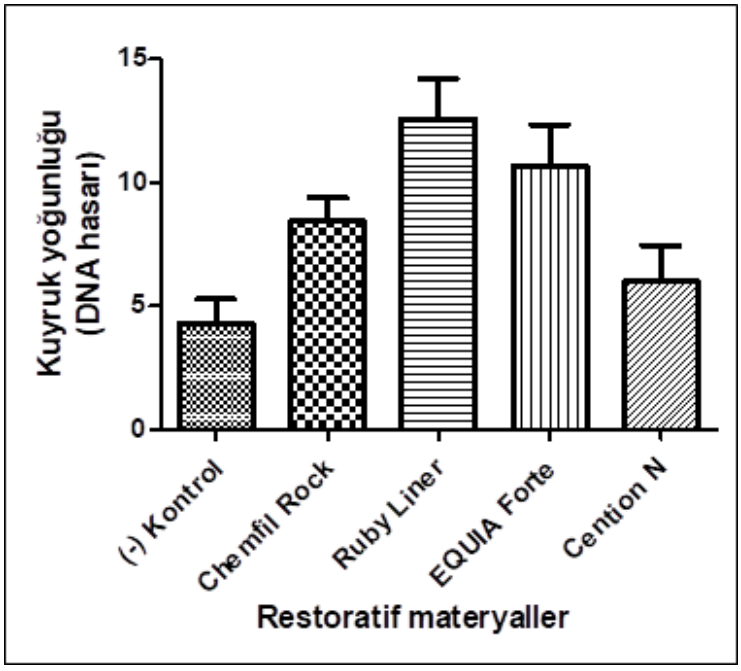
ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil, Cention Forte restorasyon ve kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu değerlerinin ortalamaları alınarak Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Comet yöntemine göre materyallerin ortalama kuyruk yoğunluğu değerleri

Materyaller	Kuyruk Yoğunluğu
DMEM [(-) kontrol]	4,293549 (± 1,378023)
ChemFil Rock	8,431286667 (± 1,330984)
Ruby Liner	14,00908 (± 2,30788)
EQUIA Forte HT Fil	10,68416167 (± 2,342802)
Cention Forte	5,991247667 (± 2,08745)

Tek hücre jel elektroforez (Comet) testi uygulanarak ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil, Cention Forte'un 72 saatlik maruziyetleri ile elde edilen kuyruk yoğunluklarının ortalama değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Restorasyon materyallerinin elde edilen kuyruk yoğunluğu değerleri ile; negatif kontrol grubunun ile elde edilen kuyruk yoğunluğu değerleri; Repeated Measures ANOVA SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) paket programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

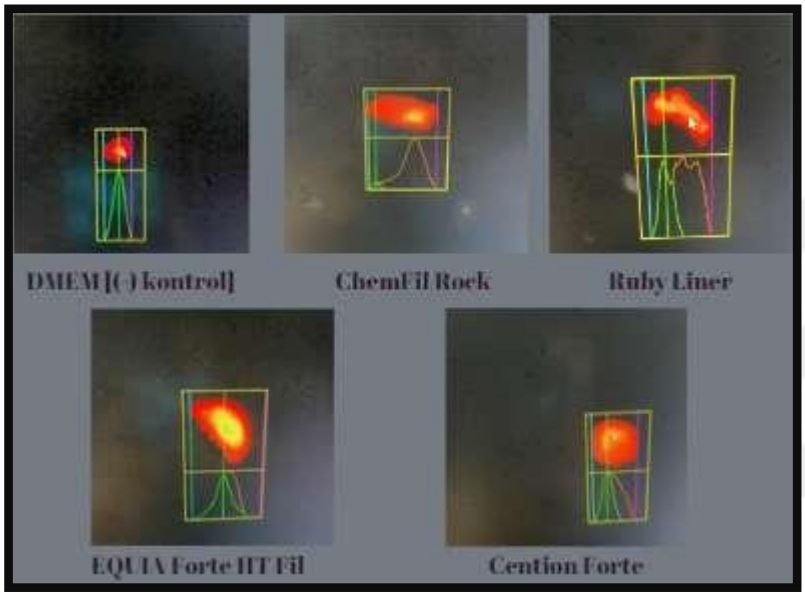
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, restoratif materyallerin fare fibroblast hücrelerine maruziyetleri negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde DNA hasarı yaratmadığı bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Restoratif materyallerin L929 hücrelerindeki DNA hasarına etkisi ($p<0,005$)

Şekil 4.6'da Comet testinin genel sonuçları görülmektedir. Buna göre, seçilen restoratif materyallerin 72 saatlik maruziyet sonucunda DNA hasarı yarattığı tespit edilmiştir. Ancak, materyallerin oluşturduğu DNA hasarları arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki söz konusu değildir.

Çalışmada, Comet testinde elde edilen ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fill, Cention Forte'un oluşturduğu DNA hasar görüntüleri Resim 4.3'te gösterilmiştir.

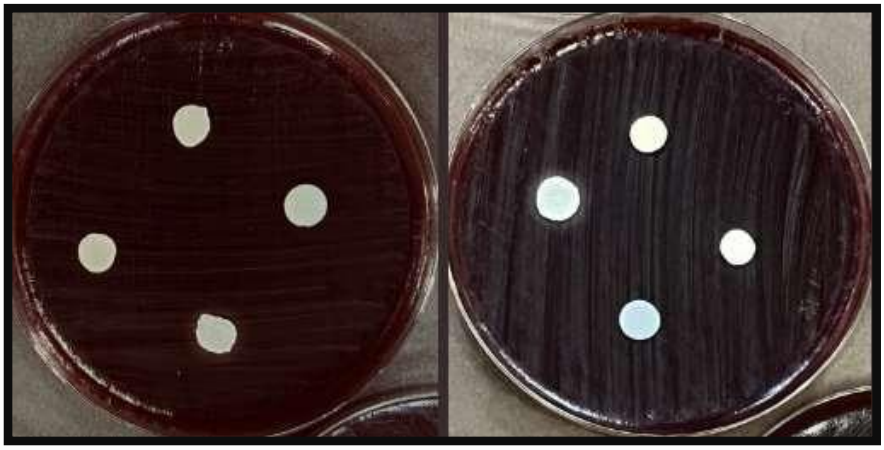


Resim 4.3. Kontrol grubu ve restoratif materyallerin DNA hasar görüntüleri

4.3. ANTİBAKTERİYEL ETKİ TESTİNE AİT BULGULAR

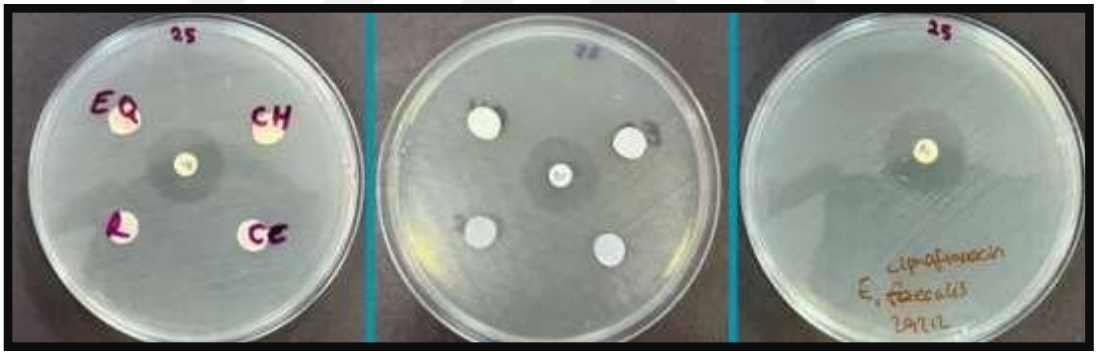
ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil, Cention Forte restoratif materyallerin *S. mutans* ve *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri, agar difüzyon testi kullanarak incelenmiştir.

Restoratif materyallerin *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri incelendiğinde 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda, siprofloksasin diskinin etrafında inhibisyon zonu oluşurken, materyal örneklerinin etrafında inhibisyon zonunun oluşmadığı gözlenmiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4. 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda disklerin görünümü

Restoratif materyallerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri incelendiğinde 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda, siprofloksasin diskinin etrafında inhibisyon zonunun oluştuğu, materyal örneklerinin etrafında inhibisyon zonu oluşmadığı gözlenmiştir (Resim 4.5).



Resim 4.5. 18 ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda disklerin ve siprofloksasin diskinin görünümü

Agar disk difüzyon testi sonuçlarına göre hiçbir restoratif materyal antibakteriyel özellik göstermemiştir. Bu sebeple çalışmada istatiksel analiz yöntemi kullanılmamıştır.

5. TARTIŞMA

Diş çürüğü, karyojenik mikroorganizmaların fermente olma özelliğine sahip karbonhidratları metabolize etmesi ile oluşan asitlerin, diş sert dokularında yıkıma neden olmasıyla gelişen multifaktöriyel, kronik, enfeksiyöz bir sert doku hastalığıdır (1). Çeşitli besin kaynaklarına ulaşımın artması ve özellikle işlenmiş şekerin mevcudiyetiyle birlikte, sanayi sonrası toplumlarda çürük görülme sıklığı dramatik bir şekilde artmıştır. Diş çürük lezyonları çocukların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyebilecek sık görülen bir problem olmaya devam etmektedir. Bu sebeple genç bireylerin dental tedavi ihtiyaçlarında artış meydana gelmektedir (149).

Restoratif tedaviler, çürük dokunun uzaklaştırılmasından sonra kaybedilen diş dokusunun tamamlanması ve diş fonksiyonunun tekrardan kazandırılması için çeşitli özellikteki materyallerin uygulanması ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde çocuk diş hekimliğinde restoratif amaçlı pek çok materyal kullanılmaktadır (150). Günümüzde çürük dişlerin daha estetik ve uzun ömürlü restorasyonları için mekanik ve kimyasal özellikleri daha iyi olan restoratif materyaller geliştirilmektedir. Dental materyallerin iyi mekanik, kimyasal ve estetik özelliklere sahip olmasının yanı sıra, sertleşme sırasında ve sonrasında saldıkları maddeler aracılığıyla çevredeki yapıları doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilmeleri nedeniyle uygun biyouyumluluk da sergilemeleri gerekmektedir (98). Bununla birlikte, diş hekimliğinde kullanılan restorasyon materyallerinin antibakteriyel etkinliğe sahip olması, istenen önemli özellikler arasındadır (42).

Bu çalışmanın amacı, ChemFil Rock, EQUIA Forte HT Fil (yüksek viskoziteli cam iyonomer), Ruby Liner (rezin modifiye cam iyonomer) ve Cention Forte (alkasit) restorasyon materyallerinin sitotoksik, genotoksik ve antibakteriyel etkinliklerini değerlendirmektir. Çalışmanın ilk bölümünde; farklı içeriğe sahip restoratif materyallerin L929 hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik hasarı *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada sitotoksisite için MTT, genotoksisite için Comet testi kullanılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise; restoratif materyallerin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi *in vitro* koşullarda *S. mutans* ve *E. faecalis* suşları ile gerçekleştirilmiştir. Materyallerin antibakteriyel etkinlikleri agar difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Bilindiği kadarıyla bu çalışma, farklı kategorilerdeki cam iyonomerlerin

ve alkasitin sitotoksik, genotoksik ve antibakteriyel etkilerinin bir arada incelendiği ilk *in vitro* çalışmadır.

Günümüzde dişlerin restore edilebilmesi için pek çok yeni materyal geliştirilmiştir. Bu materyaller ile ilgili yapılan ilk çalışmalar biyolojik dokular üzerinde çeşitli etkilere neden olduklarını ve materyallerden çeşitli bileşenlerin salındığını göstermektedir (151). Sitotoksisite değerlendirmesi, insanlar üzerinde kullanılması gereken malzemelerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için kullanılan temel testlerden biridir. Genotoksisite ve karsinojenite değerlendirilmeleri de dental restoratif materyallerin biyolojik uyumluluğunun belirlenmesinde kullanılan önemli parametreler haline gelmiştir. Dental restoratif materyallerin tartışılmamış popülaritesine rağmen, bu materyallerin bileşenlerinin potansiyel sitotoksisitesi ve genotoksisitesi hakkında artan endişeler söz konusudur (151,152).

Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin biyouyumluluğunu değerlendiren araştırmalarda çeşitli test yöntemleri olmasına rağmen, hücre kültürü çalışmaları ve hayvan deneyleri en sık tercih edilenlerdir (10). Hücre kültür testleri hayvan deneylerine kıyasla daha kolay, hızlı ve ekonomiktir. Ayrıca hücre kültür çalışmaları daha iyi standardize edilebilir ve tekrarlanabilirdir (106). Bu nedenle hücre kültürü çalışmaları daha yaygın olarak kullanılmaktadır. ISO 10993-12: 2021, dental materyallerin sitotoksisitesini değerlendirmek için çeşitli hücre kültürü test modelleri önermiştir. Bunlar; direkt temas, indirekt temas ve ekstrakt dilüsyon yöntemleridir (153).

Ekstrakt dilüsyon testleri genellikle materyal ve çok çeşitli tıbbi cihazların *in vitro* sitotoksisite değerlendirmesi için uygulanmaktadır. Temel amaç, sitotoksik maddeleri test etmek için çok çeşitli test malzemesi ekstraksiyon çözeltisi ile maruz kalan yüzeylerden sızan toksinleri tespit etmektir (154). Ekstraktların sitotoksisitesinin değerlendirilmesi, hücresel bileşenlerin normal görünüm ve işlevlerinde bozulmayı içeren hücrelerin morfolojik değişikliklerine dayanmaktadır (154,155). Lim ve ark. (156) kompozit rezinlerin sitotoksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* test modellerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, tek bir test modeli kullanılması halinde daha yüksek hassasiyete sahip olması nedeniyle ekstrakt dilüsyon yöntemlerinin tercih edilmesini önermişlerdir (156). Ekstrakt dilüsyon testi için kullanılan tetrazolyum tuzu bazlı test; MTT, MTS ve WST testinin yanı sıra nötral

kırmızı (NR) testi gibi çeşitli yöntemler vardır. Genel olarak, MTT ve NR testi kimyasal sitotoksisitenin değerlendirilmesinde benzer performans göstererek iyi bir korelasyon sağlamaktadır (102,157).

Hücre canlılığını, çoğalmasını ve aktivasyonunu ölçen MTT testi; hassas, niceliksel ve güvenilir bir kolorimetrik analizdir. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri sarı, suda çözünür MTT'yi koyu mavi formazana indirger ve üretilen formazan miktarı mevcut canlı hücrelerin sayısıyla doğru orantılıdır. Dolayısıyla MTT tahlili, üretilen formazan miktarını ve mevcut canlı hücrelerin sayısını belirlemek için optik yoğunluğu ölçmektedir (158). Bu tez çalışmasında, çocuk diş hekimliğinde kulanılan farklı içeriğe sahip dört restoratif materyallerin iki farklı zaman diliminde (24 ve 72 saat) L-929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, ISO 10993-12: 2021 standartlarına göre MTT testi ile incelenmiştir (153). Bildiğimiz kadarıyla bu, farklı kategorilerdeki cam iyonomer simanların ve alkasit grubu restoratif materyallerin sitotoksik etkilerinin *in vitro* MTT testiyle gösterildiği ilk çalışmadır.

Önceki çalışmalar, kullanılan hücre tipinin, kültüre edilen hücrelerin çeşitli restoratif materyallere verdiği reaksiyonu etkilediğini göstermektedir (159–161). Bu durum, uygun hücre hattının seçimini *in vitro* sitotoksisite değerlendirmelerinin çok önemli bir parçası haline getirmektedir. Ancak araştırmacıların bu konudaki görüşleri farklılık göstermektedir (162,163). Çalışma seçenekleri arasında kalıcı hücre hatları, standart hücre hatları ve dişeti, periodonsiyum veya pulpadan toplanan primer hücreler yer almaktadır. Kalıcı hücre hatları morfolojik ve fizyolojik olarak tek tiptir ve stabil bir fenotipe sahip, morfolojik ve fizyolojik olarak tekdüze olan hücrelerden oluşmaktadır. Bu nedenle birincil hücre kültürlerinin yanıtını etkileyebilecek donörün yaşı, metabolizması ve hormonal koşulları gibi karıştırıcı faktörlerden bağımsız olarak değişikliklerin doğru bir şekilde değerlendirilmesine izin vermektedir (10,164). Ayrıca, *in vitro* çalışmalar için ISO 10993 standardı kalıcı hücre hatlarının kullanımını desteklemektedir (100,153). Hücre kültürü deneylerinde L929 fare fibroblast hücre hattı, dental materyallerin sitotoksisitesinin değerlendirilmesi için en yaygın kullanılan hücre hattıdır. L929 hücre hatlarının en büyük avantajları kullanımının kolay olması, tek tip hücre içermesi ve başarılı toksik yanıtlara sahip olmasıdır (165). ISO 10993–5 standardına göre; *in vitro* çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin

araştırılmasında, standart olarak L929 veya BALB/3T3 hücre kültürlerinin kullanılması önerilmektedir (100). Bu nedenle çalışmamızda L929 fare fibroblastları bağ dokusunun restoratif materyallerle doğrudan temasa verdiği tepkiyi araştırmak için seçilmiştir.

Restoratif materyallerin klinik kullanımlarından dolayı meydana gelebilecek istenmeyen doku reaksiyonlarını önlemek için bunların biyolojik dokular ile uyumları değerlendirmelidir. Monomer salınımı, biyolojik dokular için zararlı etkiler sergilemesinden dolayı yalnızca mekanik özellikler değil, materyallerin biyolojik uyumluluğu da araştırılmalıdır. Bu sebeple, ISO tarafından belirlenen *in vitro* sitotoksisite çalışmaları, düşük maaliyet, kolay uygulaması ve kısa dönem sonuçlarından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (100,166). Literatürde birçok çalışma, erken dönem sitotoksisite bulgularını incelemeye odaklanmıştır (167,168). Ancak rezin esaslı restoratif materyallerden monomer salınımının 24 saat sonra devam etmesi nedeniyle bu durumun zaman içerisinde hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (169,170). Bu sebeple, bu çalışmada restoratif materyallerin sitotoksik etkileri 24 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir.

ISO 10993-5'e göre, bir malzemenin hücre canlılığı %70'in altında olduğunda, bu malzemenin sitotoksik potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir (100). Çalışmada kullanılan ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte'un 24 saat ve 72 saat sonundaki hücre canlılıkları %70'in altındadır. Mevcut *in vitro* çalışma, cam iyonomer içerikli ve alkasit grubunda bulunan restoratif materyallerin kültürlenmiş hücreler üzerinde yoğun toksikolojik etkilere neden olduğunu, hücre metabolizmasını önemli ölçüde azalttığını ve aynı zamanda dikkate değer hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir.

Bolgül ve ark. (171) farklı cam iyonomer içerikli restoratif materyallerin (Argion, Zirconomer, EQUIA Forte, Fuji IX GP ve Fuji II LG) sitotoksisitesini Vero hücreleri kullanılarak MTT yöntemi ile değerlendirmiştir. 72 saatlik inkübasyon periyodundan sonra tüm gruplarda hücre canlılığında önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir (171).

Collado-González ve ark. (172) iki farklı cam iyonomer içerikli restoratif materyalin (EQUIA Forte ve Ionostar Molar) insan diş pulpası kök hücreleri (hDPSC'ler) üzerindeki *in vitro* sitotoksisitesini değerlendirmiştir. Çalışmada EQUIA

Forte ve Ionostar Molar arasında hücre apoptozu açısından anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (172).

Günay ve ark. (110) dört farklı cam iyonomer esaslı restoratif materyalin (Riva Silver, EQUIA Forte HT, ChemFil Rock ve Ketac Molar Easymix) sitotoksisite analizini, L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak WST-1 testi ile gerçekleştirmişlerdir. 72 saatlik inkübasyon sonunda Riva Silver kullanan grubun en az toksik materyal olduğunu, ChemFil Rock kullanan grubun ise 24 saatten sonra canlı hücrelere sahip olmadığını bildirmişlerdir (110).

Park ve Lee (173) insan periodonsiyumdan türetilmiş kök hücrelerinde (PDSC'ler) iki farklı RMCİS ve bir cam iyonomer simanın sitotoksisitesini WST-1 testi ile incelemişlerdir. Çalışmada CİS'lerde sitotoksik etkiye rastlanmazken, RMCİS'lerin sitotoksik olduğunu ortaya koyarak, rezin bazlı materyallerin PDSC'ler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olabileceğini bildirmişlerdir (173).

Botsali ve ark. (174) RMCİS (Ketac N100) ve iki kompomerin (Dyract Extra, Twinkystar) fare fibroblastları üzerindeki sitotoksisitesini MTT yöntemiyle incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan bütün restoratif materyallerin hücrelerin canlılığını önemli şekilde azalttığını bildirmişlerdir (174).

Tamilsevam ve ark. (9) geleneksel CİS (Fuji Tip II), seramikle güçlendirilmiş CİS (Amalgomer), giomer (Beautifl II) ve rezin kompozitin (Filtek Z350) üç farklı zaman diliminde (24, 48 ve 72 saat) sitotoksisitesini L929 hücre hattını kullanarak MTT analizi ile değerlendirmişlerdir. Giomerlerin, geleneksel ve seramikle güçlendirilmiş CİS'lere ve rezin kompozitlere göre daha yüksek hücre canlılığı gösterdiğini ve seramik takviyeli CİS'in, geleneksel CİS'e kıyasla yüksek hücre canlılığına sahip olduğunu bildirilmişlerdir (9).

Koohpeima ve ark. (175) bir nanohibrit kompozit, giomer, geleneksel, rezin modifiye ve gümüşle güçlendirilmiş cam iyonomer simanların dişeti fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT testi ile değerlendirmişlerdir. *In vitro* çalışma sonuçlarına göre; gümüşle güçlendirilmiş cam iyonomerin anlamlı derecede daha fazla sitotoksisite gösterdiğini, nanohibrit kompozitin ise hafif sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (175).

Çapan ve ark. (176) bir kompozitin (Gradia Direct), yüksek viskoziteli bir cam iyonomer simanın (EQUIA Forte) ve bir alkasit restoratif materyalin (Cention N)

DPSC'ler üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT yöntemiyle incelemişlerdir. Alkasit en yüksek sitotoksisiteyi sergilediğini, YVCİS ve kompozitin ise kontrole göre anlamlı bir fark göstermediğini bildirilmişlerdir. Alkasit, kompozit ve YVCİS ile karşılaştırıldığında daha yüksek sitotoksisite sergilemesine rağmen, tüm materyaller DPSC'ler üzerinde hafif sitotoksik etkiler (%60 hücre canlılığı) göstermiştir. Bu durum sitotoksisite incelemesinde dental pulpa kök hücrelerinin kullanılmasına atfedilebilir (176).

Awad ve ark. (177) bir bulk-fil kompozit ve bir alkasitin diş eti fibroblastları üzerindeki 7 günlük sitotoksisitesini *in vitro* koşullarda Alamar mavisi testiyle inceledikleri çalışmalarında; her iki materyalin yüksek düzeyde sitotoksik olduğunu bildirmiştir (177).

Son yıllarda genotoksisite testleri dental materyal araştırmalarında biyouyumluluğun değerlendirilmesinde büyük önem kazanmıştır (98). Genotoksik analizler, biyouyumluluk ve karsinojenitenin önemli çalışma parametreleri arasındadır (113). Tek hücre jel elektroforez veya Comet testi, ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını inceleyen, basit ve güvenilir bir teknik olduğu için genotoksisite testlerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (134). Comet testi Ostling ve ark.(131) tarafından tanıtılmış ve sonra çeşitli bilim insanları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem çok yönlü olması nedeniyle sürekli gelişim göstererek toksikoloji, biyoloji, tıp gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. İlk olarak radyasyon biyolojisinde kullanılan bu test yöntemi, günümüzde daha fazla kullanım alanına sahip olmuştur (131).

Bu çalışma, üç farklı cam iyonomer içerikli restoratif materyalin (ChemFil Rock, EQUIA Forte HT Fil ve Ruby Liner) ve bir alkasitin (Cention Forte) genotoksisite değerlendirmesinin sonuçlarını sunmaktadır. Restoratif materyallerin bileşimindeki farklılıklar nedeniyle ortaya çıkabilecek genotoksisite mekanizmalarındaki olası farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu değerlendirmede tek bir sitogenetik teknik olarak Comet testi kullanılmıştır. Bu yöntem monomerlerin veya restoratif materyallerden sızan diğer bileşenlerin genomik DNA ile doğrudan etkileşiminden kaynaklanabilecek birincil DNA hasarını tespit etmektedir. Bu tür bir hasarın ifade edilmesi ve değerlendirilmesi için hücre bölünmesi gerekmemektedir (178). Comet testinin avantajları arasında çeşitli dokulara veya özel hücre tiplerine uygulanabilirliği, düşük seviyelerde DNA hasarını tespit etme

hassasiyeti, numune başına az sayıda hücre gerektirmesi, bir çalışmayı tamamlamak için gereken kısa süre ve nispeten düşük maliyeti yer almaktadır (179). Son çalışmalar, Comet testinin diş hekimliği pratiğinde kullanılan bileşiklerin genotoksisitesini araştırmak için uygun bir araç olduğunu göstermiştir (151,180,181). Comet testinin bütün bu avantajları göz önünde bulundurularak, bu çalışmada materyallerin genotoksisiteleri, *in vitro* koşullarda L929 hücre hattındaki DNA hasar tespitiyle incelenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, hem cam iyonomer içerikli restoratif materyallerin hem de alkasitin bir arada Comet testi ile *in vitro* olarak incelendiği ilk çalışmadır. Bu çalışma, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar değişen toksikoloji alanlarında kritik önem taşımaktadır.

In vitro çalışmalar önemli bilgiler edinilmesini sağlayan, kontrollü, basit ve gerçekleştirilmesi ucuz yöntemlerdir. Hücre kültürü çalışmaları genotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* olarak gözlemlenen bu deneylerden elde edilen sonuçlar, *in vivo* olarak gözlemlenen etkilerin göstergesi olmaktadır (182). Çalışmamızda sürekli hücre hattı seçimimiz L929 sürekli hücre kültürü olmuştur. Bunun sebebi, birincil hücre kültüründe hücreyi etkileyebilecek donörün yaşı, metabolik ve hormonal durumları gibi faktörlerden bağımsız olarak değişikliklerin doğru bir şekilde değerlendirilmesine izin vermesidir. L929 hücreleri nispeten büyük kromozoma sahip, hızlı büyüyebilen ve hücrelerin stoklanması durumunda aynı hücre kaynağından tekrarlanabilir hücre elde edilmesini sağlamaktadır (137).

Restoratif materyallerin genotoksisitesi üzerine ilk çalışmalar, Kleinsasser ve ark. (183) tarafından yayınlamışlardır. Çalışmalarda rezin esaslı restoratif materyallerden salınan TEGDMA, UDMA, HEMA ve Bis-GMA insan tükürük bezi ve lenfosit hücrelerindeki genotoksik etkisini *in vitro* koşullarda Comet yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları restoratif materyallerden salınan monomerlerin DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir (180,183). Comet testi, DNA'daki tek ve çift sarmal kırıkları, DNA eklentileri ve tamamlanmamış onarım bölgeleri gibi tüm DNA lezyonları spektrumunu tespit etme özelliğine sahiptir (134). Bu tür bulgular biyolojik olarak önemlidir ve test sonuçlarına göre incelenen restoratif materyaller biyolojik dokulara uygulanırken dikkate alınmalıdır.

Stea ve ark. (184) diş hekimliğinin farklı alanlarında kullanılan üç cam iyonomer simanın (Ketac Cem, Vitrebond ve Fuji I) genotoksisitesini KKD yöntemi ile insan periferal lenfositleri kullanarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda Vitrebond'un doğrudan genotoksik olduğu bildirmişlerdir (184).

Ribeiro ve ark. (185) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada ise; üç farklı cam iyonomer simanın (Ketac Cem, Ketac Molar ve Vitrebond) Çin fare yumurtalık hücrelerindeki (CHO) genotoksik etkileri Comet yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada Ketac Molar'ın CHO hücreleri üzerinde genotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir (185).

Poplawski ve ark. (186) Bis-GMA'nın *in vitro* koşullarda insan periferal kan lenfositlerindeki DNA iplik kırılmalarını da indüklediğini ortaya koymuştur (186).

Benzer şekilde *in vitro* koşullarda UDMA ve Bis-GMA'nın, Comet yöntemiyle CHO ve insan lenfositlerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda da UDMA ve Bis-GMA'nın genotoksik bir ajan olduğu bildirilmiştir (187,188).

Schweikl ve ark. (189) restoratif materyallerden salınan TEGDMA ve HEMA monomerlerinin genotoksisitesini V79 hücre hattı hücre hattı üzerinde MÇ testi ile incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre TEGDMA ve HEMA'nın indüklediği V79 hücrelerinde mikronükleus sayısındaki doza bağlı artış, her iki kimyasalın da genotoksik olduğunu göstermiştir (189).

Bahsedilen çalışmalara benzer şekilde literatürde restoratif materyallerden salınan monomerlerin insan lenfositleri, dişeti fibroblastları, ağız kanseri hücreleri, fare fibroblastları ve insan keratinositleri üzerindeki genotoksik etkilerinin Comet yöntemi ve MÇ testi ile değerlendirildiği çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmalar, bu tür materyallerin ökaryotik hücrelerde genotoksisite ve mutajenite riski oluşturduğunu doğrulamaktadır (190–193).

Yapılan bir çalışmada üç akışkan (Filtek Supreme XT Flow, Tetric EvoFlow, Gradia Direct Flo) ve üç akışkan olmayan (Filtek Z250, Tetric EvoCeram, Gradia Direct Posterior) dental kompozit materyal, *in vitro* insan periferal kan lökositlerinde Comet testi kullanılarak genotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Test edilen materyaller, lökositlerin 1 saat boyunca maruz kalmasından sonra genotoksik bir etki

göstermemiştir. Ancak uzun dönemde genotoksik etiklerinin oluştuğu bildirilmiştir (194).

Park ve Lee (173) iki farklı RMCİS ve bir adet CİS'ın genotoksisitesini inceledikleri *in vitro* çalışmada, rezin modifiye cam iyonomerlerin PDSC'ler üzerinde genotoksik etkilere sahip olabileceğini bildirmiştir (173).

Tauböck ve ark. (195) üç farklı akışkan bulk-fil kompozit rezinin (SDR, Venus Bulk Fill ve X-tra Base) ve bir akışkan kompozit rezinin (Tetric EvoFlow) genotoksisitesini Comet yöntemiyle değerlendirdikleri *in vitro* bir araştırma gerçekleştirmiştir. Çalışmada kullanılan restoratif materyallerin insan lökositleri üzerinde genotoksik etkilere neden olduğunu bildirmişlerdir (195).

Junqueira ve ark. (196) bulk-fil kompozit rezinlerin (Coltene Fill-Up, Tetric Evoceram, Bulk Fill, Filtek ve One Bulk Fill) genotoksisitesini MÇ testi ile 3T3 hücre hattını kullanarak değerlendirdikleri *in vitro* bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada incelenen tüm restoratif materyallerin genetik açıdan toksik olduğu bildirilmiştir (196).

Angelieri ve ark. (197) üç farklı cam iyonomer, rezin modifiye CİS ve kompomerin genotoksisitesini Comet yöntemiyle 3T3 hücre hattını kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada ortodontik simantasyon amaçlı kullanılan RMCİS ve kompomerin memeli hücrelerinde *in vitro* koşullarda genetik hasara neden olduğu bildirilmiştir (197).

Marovic ve ark. (198) dental kompozitlerin genotoksisitesini, kompozit renk tonunun etkisine göre sitogenetik bir analiz kullanarak *in vitro* olarak eş zamanlı olarak değerlendirdikleri bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Genotoksisite değerlendirmesi, Comet testi kullanılarak insan periferik kan lökositlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada dört materyal A1 ve A3.5 tonlarında iki mikro hibrit ve bir nano hibrit olmak üzere üç rezin kompozit malzemesi kullanılmıştır. Çalışmada bütün restoratif materyallerin genotoksik olduğu ancak kompozitlerin daha koyu tonlarıyla malzeme kombinasyonlarında artan DNA hasarı yönünde net bir eğilim olmadığı bildirilmiştir (198).

Dental restoratif materyaller, çeşitli hücrelerle uzun süre temas halinde olduğundan uzun vadeli etkilerini anlamak önemlidir. Hücreler apoptoz gibi kontrollü bir süreçle ölürse insan vücudu, hücre değişimini tetiklemek için moleküler

mekanizmaları aktive ederek tepki verir ve bu da onarıma yol açar. Ancak insan hücreleri hem sitotoksik hem de genotoksik bir malzemeye maruz kalırsa, o zaman bir risk değerlendirmesi yapılması şarttır. Genotoksik materyallerin neden olduğu DNA lezyonları hücrenin yavrularına aktarılırsa bu lezyonlar hücre popülasyonunda kalıcı olarak kalacaktır. Ağız kanseri her yıl binlerce insanı etkilediğinden, diş malzemelerinin potansiyel genotoksik riskleri açısından titizlikle değerlendirilmesi gerekmektedir (199).

Dental materyallerin *in vitro* çalışmaları, *in vivo* çalışma modellerini gerçekleştirmeden önce biyolojik olarak olumsuz etkilerin taranmasında önemli bir adımdır. RMCİS'lerin genotoksisitesine ilişkin literatürde çok az veri mevcut olmasına rağmen, YVCİS ve alkasitlerin genotoksisitesine ilişkin veriye rastlanmamıştır. Mevcut çalışma, klinik diş hekimliği uygulamalarında rutin olarak kullanılan cam iyonomer içerikli restoratif materyallerin ve güncel alkasitin biyouyumluluklarıyla ilgili bazı endişe verici sorunlara sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışmada sunulan toksisitenin, klinik uygulama açısından *in vitro* sonuçların bilinen sınırlamaları nedeniyle bir miktar dikkatle yorumlanması gerekir. Bununla birlikte, bu çalışma özellikle çocuk diş hekimliği alanında kullanılan restoratif materyallerin biyolojik açıdan güvenliğinin arttırılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Teknolojinin gelişmesi diş hekimliğine yeni materyaller kazandırırken, var olan ürünlerin de olumsuz özelliklerinin giderilmesine imkan tanımaktadır. Bu alan en çok, konservatif diş hekimliği anlayışının yükselişiyle birlikte, bir yandan diş dokularını korumak, diğer yandan çürüklerle mücadele etmek için her geçen gün yeni tip restoratif materyaller geliştirilmektedir (8). Bu restoratif materyallerin hem toz-likit hem de rezin esaslı formları bulunmaktadır. Toz-likit formunda olup iyon salabilen bir materyal olan alkasit, amalgama alternatif olarak tanıtılmıştır (88). Bununla birlikte, cam iyonomer simanların bilinen olumlu özellikleri yanı sıra, yüksek aşınma direnci ve mikrosızıntı gibi olumsuz özellikleri de mevcuttur. Bu olumsuz etkilerinin yok edilebilmesi için yapının rezin ilavesi ile güçlendirilmesi düşünülmüştür. Bu fikir rezin modifiye cam iyonomer ve yüksek viskoziteli cam iyonomerlerin üretilmesine neden olmuştur (59,200).

Restoratif materyallerin antimikrobiyal özellik göstermesi, restorasyonun olası bir mikro çatlak veya çürük dokunun kaldırılmasından sonra dentin tübülleri içinde kalabilecek mikroorganizmaların inhibe edilmesi için oldukça önemlidir (44). Cam iyonomer simanlar çeşitli özelliklere sahip olmakla birlikte, içeriklerinin değiştirilmesi bir takım olumlu ve olumsuz özellikleri beraberinde getirecektir. Bu durumdan yola çıkılarak çalışmamızda, bir rezin modifiye cam iyonomer (Ruby Liner), iki farklı özellikteki yüksek viskoziteli cam iyonomer (ChemFil Rock, EQUIA Forte HT Fil) ve bir alkasitin (Cention Forte) 18 ve 24 saatlik inkübasyon ile *S. mutans* ve *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkileri agar difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Agar difüzyon testi, restorasyon materyallerinin antimikrobiyal etkilerinin incelenmesinde en sık başvurulan, tekrarlanabilen sonuçlar ortaya koyan ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntemde, antibakteriyel etkinliği incelenecek olan materyaller katı haldeki agarın üzerine ya da agar üzerine açılan boşluklara yerleştirilmektedir. İncelenmek üzere seçilen materyaller, agarda difüze oldukları uzaklık kadar agar üzerinde bulunan mikroorganizmaları inhibe ederek çevrelerinde inhibisyon zonu meydana getirmektedir. Bu inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek, materyallerin antibakteriyel açıdan etkinliğine karar verilmektedir (201). Agar difüzyon testi, restoratif materyallerin antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İncelenen materyaldeki antibakteriyel aktivitenin belirli sürelerde devam edip etmediği bu yöntemle saptanabilmektedir. Ayrıca incelenen materyallerin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerini objektif olarak kıyaslama imkanı sunmaktadır (138).

Bu çalışmada kullanılan restoratif materyallerin, ağız ortamında izole edilebilen *S. mutans* ve *E. faecalis* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinleri agar difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmada bakteri seçiminde şu kriterler ele alınmıştır: Özellikle *S. mutans* ağız florasında oldukça yaygın olarak bulunan ve diş çürüklerinden birinci derecede sorumlu mikroorganizmadır (2). *E. faecalis* ise enfekte diş dokularında en sık izole edilen mikroorganizma olduğu için çalışmamıza dahil edilmiştir (29).

Yapılan değerlendirmeler sonunda; ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte ile hazırlanan test örneklerinin etrafında herhangi bir inhibisyon bölgesi oluşmadığı gözlenmiştir. Literatür göz önünde bulundurulduğunda restoratif materyallerin antibakteriyel etkinliğinin agar difüzyon yöntemi ile tespit edilebilediği ve edilemediği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Materyallerin antimikrobiyal özellik gösteren bileşenlerinin agar yüzeyine yeterince difüze olması durumunda bu yöntemin antibakteriyel etkinliği değerlendirebildiğini, aksi durumlarda ise yöntemin yetersiz kaldığını vurgulayan çalışmalar mevcuttur (202–204).

Botelho (205) diş çürüğü mikrobiyatasından elde ettiği *S. mutans, Streptococcus salivarius, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Actinomyces odontolyticus* ve *Actinomyces naeslundii* bakterilerini kullanarak geleneksel RMCİS ve geleneksel CİS'lerin antibakteriyel etkinliklerini agar difüzyon yöntemi ile incelediği *in vitro* çalışmada agarlar üzerinde herhangi bir inhibisyonu oluşmadığını bildirmiştir (205).

Beldüz ve ark. (206) RMCİS, giomer, geleneksel CİS, amalgam, kompomer ve nanohibrit kompozit restoratif materyallerinin *Candida albicans* üzerindeki etkilerini agar difüzyon yöntemi ile incelemişlerdir. Bu materyallerin agar üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadıklarını bildirmişlerdir (206).

Topçuoğlu ve ark. (202) geleneksel CİS ile farklı oranlarda propolis ilave edilmiş geleneksel CİS'in *S.mutans* üzerindeki antibakteriyel etkinliklerini agar difüzyon yöntemiyle incelemiştir. Çalışmada propolis içerikli cam iyonomer simanların çevresinde inhibisyon zonu oluşurken, geleneksel CİS'lerin çevresinde inhibisyon zonu oluşmadığını bildirilmişlerdir (202).

Benzer şekilde Tüzüner ve ark. (207) tarafından yapılan iki farklı geleneksel CİS'in ve bunların klorheksidin ile modifiye formlarının *S. mutans* ve *Lactobacillus* üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin agar difüzyon yöntemi ile değerlendirildiği çalışmada, klorheksidin içermeyen grupların inhibisyon zonu oluşturmadığı bildirilmiştir (207).

Bolgül ve ark. (171) 5 farklı restoratif materyalin (Zirconomer, EQUIA Forte HT, Fuji II LC, Fuji IX GP ve Argion) *Lactobacillus casei* ve *S.mutans* bakteri suşlarının farklı konsantrasyonları ile hazırlanan agarlardaki antibakteriyel

etkinliklerini kıyaslamışlardır. 1×10^6 cfu/ml bakteri konsantrasyonu ile hazırlanan agar plaklarında örneklerin etrafında inhibisyon zonu oluşumu gözlemlemediklerini bildirmişlerdir (171).

Farklı bir çalışmada ise, üç adet RMCİS (Ketac N100, Fuji II LC, Vitremer), iki CİS (Fuji IX GP, Ketac Molar), bir kompozit (Filtek Z250) ve kompomer (Compoglass F) kullanılarak hazırlanan örneklerin, su soğutması altında bitim işlemleri gerçekleştirilerek *S.mutans* ekili agar plakalarda 48 saat antibakteriyel etkileri kıyaslanmıştır. Çalışma sonunda sadece Vitremer *S. mutans'*a karşı istatistiksel olarak anlamlı antibakteriyel aktivite göstermiştir ($p<0,005$). Ancak diğer restoratif materyallerin etrafında inhibisyon zonu oluşmadığı bildirilmiştir. Bu durum, Vitremer'in sertleşme reaksiyonu esnasında düşük pH göstermesi ile açıklanmıştır (204).

Günay ve ark. (110). 4 farklı cam iynomer esaslı restoratif materyalin (ChemFil Rock, Equia Forte HT Fil, Riva Silver ve Ketac Molar Easymix) agar difüzyon yöntemi ile *S. mutans, Lactobacillus acidophilus* ve *Actinomyces naeslundii*'ye karşı antibakteriyel aktivitesini değerlendirmişlerdir. Test örneklerinin 2, 4 ve 6 günlük inkübasyonlarından sonra, materyallerin etrafında inhibisyon zonlarının oluştuğu bildirilmiştir. Ancak oluşan zon çaplarının kontrol grubundan oldukça küçük olduğu bulunmuştur. Ayrıca her ölçüm gününde tüm gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken, ChemFil Rock ve Equia Forte HT arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir (110). Bu durum, çalışmadaki inkübasyon süresinin uzun olmasına atfedilebilir.

Davidovich ve ark. (208) üç farklı tip CİS'in antibakteriyel etkinliklerini direkt kontakt test yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda bu CİS'lerin *S. mutans, Actinomyces Viscosus ve E. faecalis'*e karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak araştırmacılar bu bulgulardan sonra daha çok araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (208).

Alkasit, asidik pH'a maruz kaldığında florür ve hidroksil iyonları saldığı düşünülen alkalin partiküllerinden oluşan, bazik, rezin esaslı, kendiliğinden sertleşen veya ışıkla sertleşen alkasit restoratif bir materyaldir. Bu çalışmada Cention Forte'un antimikrobiyal etkinliği *S. mutans* ve *E. faecalis*'e karşı değerlendirilmiştir. Bildiğimiz

kadarıyla bu çalışma Cention Forte'un bu iki bakteri türüyle kıyaslandığı ilk çalışmadır.

Alkasit, nano-iyonomer ve cam iyonomer restoratif materyallerinin *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin karşılaştırmalı değerlendirildiği bir *in vitro* çalışmada 24 ve 48 saatlik süreyle materyallerin inhibisyon zonları değerlendirilmiştir. Sadece nano-iyonomer *S. mutans'*a karşı anlamlı bir antibakteriyel etkinlik göstermiştir (200).

Alsamolly ve ark. (209) üç farklı restoratif materyalin (Cention N, Activa BioACTIVE ve Zirconomer) antibakteriyel etkisini 48 saat süresince *S. mutans'*a karşı agar difüzyon yöntemi ile değerlendirmiştir. Çalışmada kullanılan bütün restoratif materyallerin etrafında inhibisyon zonu oluştuğu ve en yüksek antibakteriyel aktiveyi Cention N'in gösterdiği bildirilmiştir (209). Bu farklılığın sebebinin test süresinin ve kullanılan alkasit grubundaki materyalin kapsül formunda olması nedeniyle standart toz/likit oranının sabit kalması olarak değerlendirilmiştir.

Aref ve ark. (203) alkasit restoratif materyal ile TiO_2 (titanyum dioksit) nanopartiküllerinin ilave edildiği alkasitin *S.mutans, Staphylococcus aureus ve Escherichia coli* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinliklerini kıyaslamıştır. Çalışmada alkasitlerin herhangi bir bakterinin ekili olduğu agar üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığını ancak TiO_2 nanopartiküllerinin ilave edildiği alkasitin üç bakterinin de ekili olduğu agarlarda inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu durumu nanopartiküllerin restoratif materyallerin fiziksel, mekanik ve antibakteriyel etkinliklerinde değişime sebep olması olarak açıklamışlardır (203).

Çalışmamız literatürdeki bulguları destekleyen niteliklerde olup, 0,5 McFarland bakteri yoğunluğundaki agar plaklara yerleştirilen test örneklerinin herhangi birinin etrafında inhibisyon zon oluşumu tespit edilmemiştir. Ancak literatürdeki farklı çalışmalarda kullanılan restoratif materyallerin antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu düşünülen bir ajan ile modifiye edilmesi durumunda, test örneklerinin etrafında inhibisyon zonu oluştuğu tespit edilmiştir (202,203).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çocuk diş hekimliğinde kullanılan ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte restorasyon materyallerinin L929 hücre hattı üzerinde *in vitro* koşullarda sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği, bununla birlikte antibakteriyel etkinliklerinin kıyaslandığı bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmada kullanılan tüm restoratif materyallerin L929 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri mevcuttur.

2. MTT testi kullanılarak değerlendirilen hücre canlılığı sonuçlarına göre; 24. saatin sonunda ChemFil Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte'un sitotoksik olduğu görülmüştür ($p<0,0001$).

3. Bu çalışmada kullanılan tüm restoratif materyallerin *in vitro* MTT testinin sonuçlarına göre hücre canlılığının 72.saatin sonunda azalmaya devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca sonuçlar, materyallerin 72 saat sonrasında bile monomer salınımı yaptığını ortaya koymaktadır. Ancak bu tez çalışmasında yer alan restoratif materyallerin uzun dönem sitotoksik etkilerini de inceleyebilmek ve karşılaştırma yapabilmek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.

4. MTT testinde kullanılan test örneklerinin toksisitesi L929 hücrelerinin canlılığına göre şu şekilde sıralanabilir: Ruby Liner < Cention Forte <EQUIA Forte HT Fil < ChemFil Rock.

5. Çalışmamızın diğer bölümünde materyallerin L929 hücre hattı kullanılarak Comet testi ile genotoksik etkileri incelenmiştir. Materyallerin genotoksisitesi değerlendirilirken meydana getirdikleri DNA hasarı temel alınmıştır. DNA hasarının belirlenmesinde ise; Comet yöntemine göre ortalama kuyruk yoğunlukları değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre materyallerin ortalama kuyruk yoğunlukları şu şekilde bulunmuştur: Cention Forte<ChemFil Rock<EQUIA Forte HT Fil< Ruby Liner.

6. ChemFill Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte 72 saatlik maruziyetlerde hücrelerde yüksek düzeyde DNA hasarı oluşturmuşlardır. Ancak istatiksel olarak aralarında anlamlı fark söz konusu değildir ($p>0,05$).

7. ChemFill Rock, Ruby Liner, EQUIA Forte HT Fil ve Cention Forte'un hem sitotoksik hem genotoksik materyaller olduğu tespit edilmiş olup, bu materyallerin biyo-güvenilirliğini sorgulayan daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

8. Bu çalışmadan yola çıkılarak *in vitro* çalışmaların sınırlılıkları düşünüldüğünde, bu çalışmalardan elde edilen sonuçların *in vivo* koşullara uygulanamayabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca bir restoratif materyalin ömür boyu insan vücudunda kalabileceği göz önüne alındığında, ilgili malzemelerin laboratuvar çalışmalarında çok sınırlı bir süre boyunca test edildiği sonucuna varılmaktadır. Ağız ortamının son derece değişken koşulları göz önüne alındığında, restoratif materyaller zamanla çeşitli değişimlere uğrayabilmekte, bu değişimler kişiye zarar verebilmektedir. Ayrıca bir materyal tüm uygulamalar için biyouyumlu olmayabilmektedir. Bunlara ek olarak bölgesel toksisitenin yanı sıra restoratif materyallerin etkileri sistemik toksisite, alerji veya genotoksik özelliklere de sahip olabilmektedir. Dolayısıyla kapsamlı testler yapılmadan, çeşitli çalışmaların sonuçları elde edilmeden bir restoratif materyalin biyouyumlu olup olmadığını söylemek mümkün olmayabilir.

9. Düşük sitotoksisite, yüksek biyouyumluluk ve mükemmel antibakteriyel özellikler ideal restoratif materyallerin temellerini oluşturmaktadır. Bu çalışmada, seçilen tüm restoratif materyallerin yüksek düzeyde sitotoksik ve genotoksik olduğunu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, diş hekimlerinin, hastalarda lokal ve sistemik hasara neden olabilecek dental materyallerin biyouyumluluğu ve olası toksisitesi konusunda bilinçli olmalarını sağlamanın önemini güçlendirmektedir. Bu nedenle diş hekimleri, diş hekimliği malzemelerinin risklerini ve faydalarını değerlendirmeli ve karar verme süreçlerinde biyouyumluluğun göz ardı edilmemesini sağlamalıdır.

10. Özellikle çocuk diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin antibakteriyel açıdan etkin olması, güçlü antimikrobiyal özelliğe sahip olması önemlidir. Ayrıca bazı çocuklarda iş birliği eksikliği nedeniyle, iyi antimikrobiyal özelliğe sahip olan restorasyon materyalleri daha etkili sonuçlar ortaya

koyabilmektedir. Bunun sebebi, kalan çürük lezyonundaki bakterilerin azaltılmasına ve böylece ikincil çürüklerin durdurulmasına yardımcı olmalarıdır.

11. Agar disk difüzyon testi sonuçlarına göre bu çalışmada kullanılan restorasyon materyalleri *S. mutans* ve *E. faecalis* bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etkinlik göstermemiştir. Ancak izole edilmiş bakterilerle antimikrobiyal etkinliğin *in vitro* değerlendirmesine dayanarak net bir sonuca varmak zordur. Çünkü ağız boşluğu çeşitli mikroorganizmalar içerir ve test edilen restoratif materyallerin tek bir bakteri türüne karşı etkisi diğer bakteri türlerine karşı aynı olmayabilir. Bu sebeple, karışık ağız florası ve restoratif materyallerin yapay ortamlarla etkileşimi, mikrobiyal büyüme üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir.

12. Bu çalışmadan yola çıkılarak, diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi için çok çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulduğu söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Microbiological Approach. J Clin Infect Dis Pract. 2017;02(01).

2. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008;46(4).

3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet [Internet]. 2007 Jan;369(9555):51–9. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607600312

4. Zhang JS, Chu CH, Yu OY. Oral Microbiome and Dental Caries Development. Vol. 10, Dentistry Journal. 2022.

5. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic Enterococcus faecalis. J Endod. 2007;33(7).

6. Sakaguchi RL, Ferracane JL, Powers JM. Craig's restorative dental materials. Craig's Restorative Dental Materials. 2018.

7. Harris R, Nicoll AD, Adair PM, Pine CM. Risk factors for dental caries in young children: A systematic review of the literature. Vol. 21, Community Dental Health. 2004.

8. Ritter A V., Boushell LW, Walter R. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry. 2018.

9. Tamilselvam S, Divyanand MJ, Neelakantan P. Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: In vitro study. J Clin Pediatr Dent. 2013;37(4).

10. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibilty of dental biomaterials evaluated? Vol. 12, Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. 2007.

11. Çimen C, Demirsoy FF, Özdemir A, Ark M, Özalp N. Effect of Finishing-Polishing Procedures on Cytotoxicity of Resin-Based Restorative Materials via Real-Time Cell Analysis. J Clin Pediatr Dent. 2022;46(1).

12. Septiwidyati TR, Auerkari EI. Genotoxin Effect of Composite Resin. Indones J Leg Forensic Sci. 2019;9(1).

13. Nilchian F, Mosayebi N, Tarrahi MJ, Feiz A, Sadr O, Forozande Y. The effect of antibacterial agents of composite resin materials in dental caries prevention and reduction of flexural strength of the material: Systematic review and meta-analysis. J Oral Heal Oral Epidemiol. 2022;11(4).

14. Siqueira PC, Magalhães APR, Pires WC, Pereira FC, Silveira-Lacerda EP, Carrião MS, et al. Cytotoxicity of glass ionomer cements containing silver nanoparticles. J Clin Exp Dent. 2015;7(5).

15. Chen Z, Chu Z, Jiang Y, Xu L, Qian H, Wang Y, et al. Recent advances on nanomaterials for antibacterial treatment of oral diseases. Vol. 20, Materials Today Bio. 2023.

16. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Vol. 7, Clinical oral investigations. 2003.

17. Çiğdem Ç. Diş Çürüklerinin Önlenmesinde Güncel Yaklaşımlar. dergipark.org.tr. 2012;6(3).

18. Urquhart O, Tampi MP, Pilcher L, Slayton RL, Araujo MWB, Fontana M, et al. Nonrestorative Treatments for Caries: Systematic Review and Network Meta-analysis. Vol. 98, Journal of Dental Research. 2019.

19. Zero DT. Dental caries process. Vol. 43, Dental clinics of North America. 1999.

20. Tinanoff N, Palmer CA. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. J Public Health Dent. 2000;60(3).

21. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. In: Caries Research. 2004.

22. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. Vol. 90, Journal of Dental Research. 2011.

23. Blancas B, Lanzagorta M de L, Jiménez-Garcia LF, Lara R, Molinari JL, Fernández AM. Study of the ultrastructure of Enterococcus faecalis and Streptococcus mutans incubated with salivary antimicrobial peptides. Clin Exp Dent Res. 2021;7(3).

24. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. Vol. 125, APMIS. 2017.

25. Rosa RT, Napimoga MH, Höfling JF, Gonçalves RB, Rosa EAR. CLONAL DIVERSITY OF STREPTOCOCCUS MUTANS CLARKE (1924) IN CARIES-FREE ADULTS. Estud Biol. 2005;27(58).

26. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of streptococcus mutans. In: Gram-Positive Pathogens. 2019.

27. Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. Caries Res. 1975;9(5).

28. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1984;34(1).

29. Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editors. The Enterococci [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2002. Available from: http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817923

30. Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int J Oral Sci. 2012;4(1).

31. Wahl MJ, Swift EJ. Dental amalgam update - Part II: Biological effects. Vol. 25, Journal of Esthetic and Restorative Dentistry. 2013.

32. Gallusi G, Libonati A, Piro M, Di Taranto V, Montemurro E, Campanella V. Is dental amalgam a higher risk factor rather than resin-based restorations for systemic conditions? A systematic review. Vol. 14, Materials. 2021.

33. Bharti R, Wadhwani KK, Tikku AP, Chandra A. Dental amalgam: An update. J Conserv Dent [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 Sep 4];13(4):204. Available from: /pmc/articles/PMC3010024/

34. Wahl MJ, Swift EJ. Critical appraisal: dental amalgam update—part I: clinical efficacy. J Esthet Restor Dent. 2013;25(5).

35. Wilson AD, Kent BE, Clinton D, Miller RP. The formation and microstructure of dental silicate cements. J Mater Sci. 1972;7(2).

36. Markovic DL, Petrovic BB, Peric TO. Fluoride content and recharge ability of five glassionomer dental materials. BMC Oral Health. 2008;8(1).

37. Croll TP, Nicholson JW. Glass ionomer cements in pediatric dentistry: Review of the literature. Vol. 24, Pediatric Dentistry. 2002.

38. Eichmiller FC, Marjenhoff WA. Fluoride-releasing dental restorative materials. Vol. 23, Operative Dentistry. 1998.

39. Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Khan AS, Zohaib S, Martí JMN, et al. Modifications in glass ionomer cements: Nano-sized fillers and bioactive nanoceramics. Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. 2016.

40. Mount GJ. Longevity in glass-ionomer restorations: review of a successful technique. Quintessence Int. 1997;28(10).

41. Sidhu SK. Glass-ionomer cement restorative materials: A sticky subject? Aust Dent J. 2011;56(SUPPL. 1).

42. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. Vol. 23, Dental Materials. 2007.

43. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. Dent Mater. 2008;24(12).

44. Hotwani K, Thosar N, Baliga S, Bundale S, Sharma K. Antibacterial effects of hybrid tooth colored restorative materials against Streptococcus mutans: An in vitro analysis. J Conserv Dent. 2013;16(4).

45. Berg JH, Croll TP. Glass ionomer restorative cement systems: an update. Vol. 37, Pediatric dentistry. 2015.

46. Guggenberger R, May R, Stefan KP. New trends in glass-ionomer chemistry. In: Biomaterials. 1998.

47. Olegário IC, Malagrana APVFP, Kim SSH, Hesse D, Tedesco TK, Calvo AFB, et al. Mechanical properties of high-viscosity glass ionomer cement and nanoparticle glass carbomer. J Nanomater. 2015;2015.

48. Attar N, Turgut MD. Fluoride release and uptake capacities of fluoride-releasing restorative materials. Oper Dent. 2003;28(4).

49. Koenraads H, Van der Kroon G, Frencken JE. Compressive strength of two newly developed glass-ionomer materials for use with the Atraumatic Restorative Treatment (ART) approach in class II cavities. Dent Mater. 2009;25(4).

50. Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, AbuReqaiba A. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. Vol. 8, Materials. 2015.

51. Chen M-H. Update on Dental Nanocomposites. J Dent Res. 2010;89(6).

52. Neelakantan P, John S, Anand S, Sureshbabu N, Subbarao C. Fluoride release from a new glass-ionomer cement. Oper Dent. 2011;36(1).

53. Killian CM, Croll TP. Nano-ionomer tooth repair in pediatric dentistry. Pediatr Dent. 2010;32(7).

54. Xu X, Burgess JO. Compressive strength, fluoride release and recharge of fluoride-releasing materials. Biomaterials. 2003;24(14).

55. Nassar AM, Abdalla AI, Shalaby ME. One year clinical follow up of nano filled glass ionomer and composite resin restorations. Tanta Dent J. 2014;11(1).

56. Coutinho E, Cardoso M V., De Munck J, Neves AA, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Bonding effectiveness and interfacial characterization of a nano-filled resin-modified glass-ionomer. Dent Mater. 2009;25(11).

57. Sesiliana M, Riyanti E. Giomer s-prg technology as an alternative restoration in early childhood caries. World J Dent. 2021;12(3).

58. Vaidya S, Mangat P, Ajaz Raina A, Bhattacharya A, Tomer AK. Evaluation and comparison of physical properties and fluoride release of newly introduced ceramic reinforced glass-ionomer restorative material with other glass ionomer cements-An in vitro study. ~ 486 ~ Int J Appl Dent Sci. 2017;3(4).

59. Lazaridou D, Belli R, Krämer N, Petschelt A, Lohbauer U. Dental materials for primary dentition: are they suitable for occlusal restorations? A two-body wear study. Eur Arch Paediatr Dent. 2015;16(2).

60. Yadav G, Rehani U. A Comparative Evaluation of Marginal Leakage of Different Restorative Materials in Deciduous Molars: An in vitro Study . Int J Clin Pediatr Dent. 2012;5(2).

61. Gönülol N, Özer S, Demirel N. Giomer yapıdaki akışkan kompozit ve adeziv sistemin Sınıf V kavitelerde mikrosızıntı açısından değerlendirilmesi. Acta Odontol Turc. 2014;31(1).

62. De Caluwe T, Vercruysse C, Martens L. Mechanical and Bioactive Properties of a Commercial Glass Carbomer: GCP Glass Fill. Avicenna J Dent Res. 2017;9(4).

63. Gorseta K, Glavina D, Borzabadi-Farahani A, Van Duinen RN, Skrinjaric I, Hill RG, et al. One-year clinical evaluation of a Glass Carbomer fissure sealant, a preliminary study. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2014;22(2).

64. Domagoj Glavina, Gorseta Kristina SI. Enamel shear-bond strength of glass carbomer after heating with three polymerization unit. Int J Paediatr Dent. 2009;(19).

65. Abdulsamee N, Elkhadem AH. Zirconomer and Zirconomer Improved (White Amalgams): Restorative Materialsfor the Future. Review. EC Dent Sci. 2017;15(4).

66. Arefein H, Alzuhairi A, Alowid A, Khier S. It’s not amalgam, it is white amalgam. Saudi Dent J. 2019;31.

67. Manisha S, Shetty SS, Mehta V, SA R, Meto A. A Comprehensive Evaluation of Zirconia-Reinforced Glass Ionomer Cement’s Effectiveness in Dental Caries: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. Vol. 11, Dentistry Journal. 2023.

68. Albeshti R, Shahid S. Evaluation of microleakage in Zirconomer®: A Zirconia reinforced glass ionomer cement. Acta Stomatol Croat. 2018;52(2).

69. Bariker RH, Mandroli PS. An in-vitro evaluation of antibacterial effect of Amalgomer CR and Fuji VII against bacteria causing severe early childhood caries. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2016;34(1).

70. Nigam AG, Murthy R, Pandey R. Estimation of Fluoride Release from Various Dental Materials in Different Media—An In Vitro Study. Int J Clin Pediatr Dent. 2009;2(1).

71. Wang Y, Darvell BW. Hertzian load-bearing capacity of a ceramic-reinforced glass ionomer cement stored wet and dry. Dent Mater. 2009;25(8).

72. Bhattacharya A, Vaidya S, TomerAK RA. GIC at It's best–A review on ceramic reinforced GIC. Int J Appl Dent Sci. 2017;3:405–8.

73. KAM HEPDENİZ Ö, SEÇKİN KELTEN Ö, GÜRDAL O. Cam İyonomer İçerikli Dört Farklı Restoratif Materyalin Yüzey Pürüzlülüklerinin Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilim Derg. 2019;10(1).

74. Nicholson JW. Polyacid-modified composite resins ("compomers") and their use in clinical dentistry. Vol. 23, Dental Materials. 2007.

75. Çapan, B. Ş., & Akyüz S. Çocuk Diş Hekimliğinde Fluorid Salınımı Yapan Güncel Restoratif Materyaller. Clin Exp Heal Sci. 2016;6(3).

76. Dionysopoulos P, Kotsanos N, Pataridou A. Fluoride release and uptake by four new fluoride releasing restorative materials. J Oral Rehabil. 2003;30(9).

77. Opdam NJM, Bronkhorst EM, Loomans BAC, Huysmans MCDNJM. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. J Dent Res. 2010;89(10).

78. Ülkü SG, Ünlü N. Son 10 Yılda Kompozit Rezin Restorasyonlar: İn Vivo ve İn Vitro Çalışmalarla Bir Derleme. Necmettin Erbakan Univ Dis Hekim Derg (NEU Dent J), Necmettin Erbakan. 2020;2(3).

79. Lutz F, Phillips RW. A classification and evaluation of composite resin systems. J Prosthet Dent. 1983;50(4).

80. Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg2+ in human gingival fibroblasts. Arch Toxicol. 2006;80(8).

81. Tagtekin DA, Yanikoglu FC, Bozkurt FO, Kologlu B, Sur H. Selected characteristics of an Ormocer and a conventional hybrid resin composite. Dent Mater. 2004;20(5).

82. Moraschini V, Fai CK, Alto RM, Dos Santos GO. Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. Vol. 43, Journal of Dentistry. 2015.

83. Alrahlah A, Silikas N, Watts DC. Post-cure depth of cure of bulk fill dental resin-composites. Dent Mater. 2014;30(2).

84. Abreu NMr, Sousa FB, Dantas RV, Leite PKbS, Batista AU, Montenegro R V. Longevity of bulk fill and ormocer composites in permanent posterior teeth: Systematic review and meta-analysis. Am J Dent. 2022;35(2).

85. Oltramare RS, Odermatt R, Burrer P, Attin T, Tauböck TT. Depth-related curing potential of ormocer-and dimethacrylate-based bulk-fill composites. Materials (Basel). 2021;14(22).

86. Monsarrat P, Garnier S, Vergnes JN, Nasr K, Grosgogeat B, Joniot S. Survival of directly placed ormocer-based restorative materials: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Dent Mater. 2017;33(5).

87. Kalra S, Singh A, Gupta M, Chadha V. Ormocer: An aesthetic direct restorative material; An in vitro study comparing the marginal sealing ability of organically modified ceramics and a hybrid composite using an ormocer-based bonding agent and a conventional fifth-generation bonding agent. Contemp Clin Dent. 2012;3(1).

88. Todd J. Scientific Documantation: Cention N. Ivoclar Vivadent AG. 2016.

89. Kaul S, Rawal S, Kansal V. Introduction of alkasite restorative in pediatric dentistry: Will it perish or purge? Int J Oral Heal Sci. 2022;12(2).

90. Sunyaruri E, Nainggolan TR, Angelia P, Sumantadireja YH, Gartika M. PRR Using Cention N ® in Children ' s Teeth. J Appl Dent Med Sci. 2019;5(2).

91. Kasraei S, Haghi S, Valizadeh S, Panahandeh N, Nejadkarimi S. Phosphate Ion Release and Alkalizing Potential of Three Bioactive Dental Materials in Comparison with Composite Resin. Int J Dent. 2021;2021.

92. Theerarath T, Sriarj W. An alkasite restorative material effectively remineralized artificial interproximal enamel caries in vitro. Clin Oral Investig. 2022;26(6).

93. Venugopal K, Krishnaprasad L, Singh V, Ravi A, Haridas K, Soman D. A comparative evaluation of microleakage between resin-modified glass ionomer, flowable composite, and cention-N in Class V restorations: A confocal laser scanning microscope study. J Pharm Bioallied Sci. 2021;13(5).

94. Sujith R, Yadav TG, Pitalia D, Babaji P, Apoorva K, Sharma A. Comparative evaluation of mechanical and microleakage properties of cention-n, composite, and glass ionomer cement restorative materials. Vol. 21, Journal of Contemporary Dental Practice. 2020.

95. Kishore RNA, Ganesh SB, Jayalakshmi S. Effect of Thermocycling on Colour Stability of Alkasite Restorative Material (Cention N) - An In Vitro Study. J Pharm Res Int. 2022;

96. Donaruma LG. Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp. J Polym Sci Polym Lett Ed. 1988;26(9).

97. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008;29(20).

98. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. J Prosthet Dent. 2001;86(2).

99. ISO 7405. International Organization for Standardization. Dentistry- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. 1996.

100. ISO 10993-5. International Organization for Standardization. Dentistry-Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

101. Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. Principles of Biochemical Toxicology. 2008.

102. LI W, ZHOU J, XU Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. Biomed Reports. 2015;3(5).

103. Wang F. CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE, FIFTH EDITION. Vitr Cell Dev Biol - Anim. 2006;42(5).

104. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: A review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Vol. 36, International Endodontic Journal. 2003.

105. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. J Appl Toxicol. 2005;25(2).

106. Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology. Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology. 2001.

107. Riss TL, Niles AL, Minor L, Moravec RA, Benink HA, Worzella TJ. Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays. In: Assay Guidance Manual. 2013.

108. Gerin P. Animal cell biotechnology: methods and protocols. Biofutur. 1999;1999(191).

109. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89(2).

110. Gunay A, Celenk S, Adiguzel O, Cangul S, Ozcan N, Cakmakoglu EE. Comparison of Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and Fluoride Release of Glass Ionomer Restorative Dental Cements in Dentistry. Med Sci Monit. 2022;28.

111. American Type Culture Collection. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. Components. 2011;6597.

112. Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Vol. 11, Biotechnology Annual Review. 2005.

113. Choy WN. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. 2001.

114. Brasileiro-Vidal AC. Genotoxicity and Mutagenicity Assays for Selection of Chemical Compounds with Therapeutic Potential: A Short Commentary. Biochem Anal Biochem. 2015;04(04).

115. Food. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. Fed Regist. 2012;77(110).

116. Kluwe WM. The complementary roles of in vitro and in vivo tests in genetic toxicology assessment. Regul Toxicol Pharmacol. 1995;22(3).

117. Wallace Hayes A, Dixon D, Wang T. Loomis's essentials of toxicology. Loomis's Essentials of Toxicology. 2019.

118. Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, et al. ICH-Harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: Evolution, reasoning and impact. Mutat Res - Rev Mutat Res. 1999;436(3).

119. Ames BN. The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: Chemical Mutagens. 1971.

120. Gao M, Cao C, Wang G, Ma H, Ying Y. Comparison and analysis of Ames test for genotoxicity evaluation. Drug Eval Res. 2021;44(3).

121. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res Mutagen Relat Subj. 1975;31(6).

122. Salawu A, Wright K, Al-Kathiri A, Wyld L, Reed M, Sisley K. Sister Chromatid Exchange and Genomic Instability in Soft Tissue Sarcomas: Potential Implications for Response to DNA-Damaging Treatments. Sarcoma. 2018;2018.

123. Conrad S, Künzel J, Löbrich M. Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. Cell Cycle. 2011;10(2).

124. Schvartzman JB, Cortés F. Sister chromatid exchanges in Allium cepa. Chromosoma. 1977;62(2).

125. Registre M, Proudlock R. The In Vitro Chromosome Aberration Test. In: Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual. 2016.

126. Ishidate M, Miura KF, Sofuni T. Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro. In: Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1998.

127. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutat Res - Rev Mutat Res. 2000;462(2–3).

128. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Vol. 26, Mutagenesis. 2011.

129. Üstündağ A, Behm C, Föllmann W, Duydu Y, Degen GH. Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. Arch Toxicol. 2014;88(6).

130. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res Mutagen Relat Subj. 1985;147(1–2).

131. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123(1).

132. Rydberg B, Johanson KJ. ESTIMATION OF DNA STRAND BREAKS IN SINGLE MAMMALIAN CELLS. In: DNA Repair Mechanisms. 1978.

133. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988;175(1).

134. Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. Vol. 10, Toxicology Research. 2021.

135. Zhang S, Kuhn JR. Cell isolation and culture. WormBook : the online review of C. elegans biology. 2013.

136. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. J Endod. 2001;27(1).

137. Gruber-Bzura BM, Bubko I, Sztybor P, Piechocińska J, Drozd E. Quality and Purity of L929 Cell Cultures: Isoenzyme Profiles As a Sensitive Marker of Cross-Contamination. Biopreserv Biobank. 2023;21(1).

138. TOBIAS RS, RIPPIN JW, BROWNE RM, WILSON CA. A further study of the antibacterial properties of dental restorative materials. Int Endod J. 1988;21(6).

139. Le Page S, Raoult D, Rolain JM. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: A paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β-lactamases. Int J Antimicrob Agents. 2015;45(1).

140. Greenwood D, Barer MR, Slack RCB, Irving WL. Medical Microbiology: Eighteenth Edition. Medical Microbiology: Eighteenth Edition. 2012.

141. Fraga RC, Siqueira JF, De Uzeda M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. J Prosthet Dent. 1996;76(5).

142. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Vol. 6, Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016.

143. Joyce LF, Downes J, Stockman K, Andrew JH. Comparison of five methods, including the PDM Epsilometer test (E test), for antimicrobial susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 1992;30(10).

144. Ørstavik D. Antibacterial properties of endodontic materials. Int Endod J. 1988;21(2).

145. Griffin SG, Markham JL, Leach DN. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Essent Oil Res. 2000;12(2).

146. Secerli J, Adatepe Ş, Altuntas S, Topal GR, Erdem O, Bacanlı M. In vitro toxicity of naringin and berberine alone, and encapsulated within PMMA nanoparticles. Toxicol Vitr [Internet]. 2023 Jun;89:105580. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233323000292

147. Comet Assay and Applications. Int J Sci Technol Res [Internet]. 2019 May; Available from: https://www.iiste.org/Journals/index.php/JSTR/article/view/47845

148. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1–2).

149. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management. Vol. 54, Caries Research. S. Karger AG; 2020. p. 7–14.

150. Mahoney E, Kilpatrick N, Hibbert S, Johnston T. Restorative paediatric dentistry. In: Handbook of Pediatric Dentistry: Fourth Edition. 2013.

151. Wawrzynkiewicz A, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Lukomska-Szymanska M, Lapinska B, Sokolowski J, et al. The cytotoxicity and genotoxicity of three dental universal adhesives—an in vitro study. Int J Mol Sci. 2020;21(11).

152. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(3).

153. ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials. Int Organ Stand. 2021;

154. Liu X, Rodeheaver DP, White JC, Wright AM, Walker LM, Zhang F, et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. Vol. 97, Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2018.

155. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. Sci Rep. 2018;8(1).

156. Lim SM, Yap AUJ, Loo CSL, Ng J, Goh CY, Hong CHL, et al. Comparison of cytotoxicity test models for evaluating resin-based composites. Hum Exp Toxicol. 2017;36(4).

157. Vajrabhaya L ongthong, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. J Anal Sci Technol. 2018;9(1).

158. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. Proc West Pharmacol Soc. 2011;54.

159. Vale FM, Castro M, Monteiro J, Couto FS, Pinto R, Rico JMGT. Acrylic bone cement induces the production of free radicals by cultured human fibroblasts. Biomaterials. 1997;18(16).

160. De Souza 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).

161. Mohamed Aly Ahmed H, Omar NS, Luddin N, Saini R, Saini D. Cytotoxicity evaluation of a new fast set highly viscous conventional glass ionomer cement with L929 fibroblast cell line. J Conserv Dent. 2011;14(4).

162. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. Dent Mater. 1996;12(3).

163. Kumar H, Kawatra B. REVIEW OF BIOCOMPATIBILITY OF DENTAL MATERIALS -GENERAL INFORMATION AND KEY CONCEPTS. Guident. 2017;10(4).

164. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. Vol. 1, Clinical oral investigations. 1998.

165. Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. Toxicol Vitr. 2005;19(1).

166. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, Van Horn JR. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. Biomaterials. 1997;18(16).

167. Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE. Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. Dent Mater. 2008;24(9).

168. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. Dent Mater. 2004;20(1).

169. Selimović-Dragaš M, Huseinbegović A, Kobašlija S, Hatibović-Kofman Š. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. Bosn J Basic Med Sci. 2012;12(4).

170. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. Int Endod J. 2002;35(1).

171. Bolgül B, Duran N, Coşgun A. In vitro investigation of antimicrobial effects, nanohardness, and cytotoxicity of different glass ionomer restorative materials in dentistry. Niger J Clin Pract. 2019;22(3).

172. Collado-González M, Pecci-Lloret MR, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Llena C, et al. Thermo-setting glass ionomer cements promote variable biological responses of human dental pulp stem cells. Dent Mater. 2018;34(6).

173. Park SY, Lee KH. Comparison of Cytotoxicity and Genotoxicity in Three Types of Indirect Restorative Materials on Human Periodontal Stem Cells. Oral Health Prev Dent [Internet]. 2023 Jul 13;21(1):243–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37439802

174. Botsali MS, Kuşgöz A, Altintaş SH, Ülker HE, Tanriver M, Kiliç S, et al. Residual HEMA and TEGDMA release and cytotoxicity evaluation of resin-modified glass ionomer cement and compomers cured with different light sources. ScientificWorldJournal [Internet]. 2014;2014:218295. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24592149

175. Koohpeima F, Mokhtari MJ, Doozandeh M, Jowkar Z, Yazdanshenas F. Comparison of Cytotoxicity of New Nanohybrid Composite, Giomer, Glass Ionomer and Silver Reinforced Glass Ionomer using Human Gingival Fibroblast Cell Line. J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2017;41(5):368–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28872994

176. Capan BS , Duman C , Ordueri NE ET. In Vitro Examination of The Cytotoxicity of Alkasite Restorative Material on Dental Pulp Stem Cells. 2022;

177. Awad MM, Alshehri T, Alqarni AM, Magdy NM, Alhalabi F, Alotaibi D, et al. Evaluation of the bond strength and cytotoxicity of alkasite restorative material. Appl Sci. 2020;10(18).

178. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. Vol. 26, Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology. 2004.

179. Kunert M, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Sauro S, Bourgi R, Hardan L, et al. The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. Cells. 2022;11(20).

180. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. Biomaterials. 2006;27(9).

181. Mary SJ, Girish KL, Joseph TI, Sathyan P. Genotoxic effects of silver amalgam and composite restorations: Micronuclei-Based cohort and case-control study in oral exfoliated cells. Contemp Clin Dent. 2018;9(2).

182. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Sci. 1998;106(2).

183. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. J Dent. 2004;32(3).

184. Stea S, Visentin M, Cervellati M, Verri E, Cenni E, Savarino L, et al. In vitro sister chromatid exchange induced by glass ionomer cements. J Biomed Mater Res. 1998;40(4).

185. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. J Mater Sci Mater Med. 2006;17(6).

186. Poplawski T, Pawlowska E, Wisniewska-Jarosinska M, Ksiazek D, Wozniak K, Szczepanska J, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. Chem Biol Interact. 2009;180(1).

187. Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen. 2010;696(2).

188. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, et al. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. Mol Biol Rep. 2011;38(7).

189. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. Dent Mater. 2007;23(6).

190. Huang FM, Chang YC, Lee SS, Yeh CH, Lee KG, Huang YC, et al. BisGMA-induced cytotoxicity and genotoxicity in macrophages are attenuated by wogonin via reduction of intrinsic caspase pathway activation. Environ Toxicol. 2016;31(2).

191. Shehata M, Durner J, Eldenez A, Van Landuyt K, Styllou P, Rothmund L, et al. Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. Dent Mater. 2013;29(9).

192. Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2012;100 B(2).

193. de Araújo AM, Alves GR, Avanço GT, Parizi JLS, Nai GA. Assessment of methyl methacrylate genotoxicity by the micronucleus test. Braz Oral Res. 2013;27(1).

194. Tadin A, Marovic D, Galic N, Milevoj A, Medvedec Mikic I, Zeljezic D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. Acta Odontol Scand. 2013;71(3–4).

195. Tauböck TT, Marovic D, Zeljezic D, Steingruber AD, Attin T, Tarle Z. Genotoxic potential of dental bulk-fill resin composites. Dent Mater. 2017;33(7).

196. Junqueira C, Mascarenhas P, Avelar M, Ribeiro AC, Barahona I. Biocompatibility of bulk-fill resins in vitro. Clin Oral Investig [Internet]. 2023 Nov 15;27(12):7851–8. Available from: https://link.springer.com/10.1007/s00784-023-05376-6

197. Angelieri F, da Silva YS, Ribeiro DA. Genotoxicity and cytotoxicity induced by eluates from orthodontic glass ionomer cements in vitro. Saudi Dent J. 2018;30(1).

198. Marovic D, Tadin A, Mladinic M, Juric-Kacunic D, Galic N. In vitro detection of DNA damage in human leukocytes induced by combined effect of resin composites and adhesive systems. Am J Dent [Internet]. 2014 Feb;27(1):35–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24902403

199. Bandarra S, Neves J, Paraíso A, Mascarenhas P, Ribeiro AC, Barahona I. Biocompatibility of self-adhesive resin cement with fibroblast cells. J Prosthet Dent. 2021;125(4).

200. Aparajitha R, Selvan P, Ahamed A, Bhavani S, Nagarajan V. Comparative evaluation of long-term fluoride release and antibacterial activity of an alkasite, nanoionomer, and glass ionomer restorative material - An in vitro study. J Conserv Dent. 2021;24(5).

201. JEDRYCHOWSKI JR, CAPUTO AA, KERPER S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. J Oral Rehabil. 1983;10(5).

202. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M, Kulekci G. In vitro antibacterial effects of glassionomer cement containing ethanolic extract of propolis on Streptococcus mutans. Eur J Dent. 2012;6(4).

203. Aref NS, Abdallah RM. Evaluation of Mechanical Properties and Antibacterial Activity of Nano Titania-Enriched Alkasite Restorative Material: An In Vitro Study. Open Dent J. 2022;16(1).

204. Sungurtekin-Ekci E, Ozdemir-Ozenen D, Duman S, Acuner IC, Sandalli N. Antibacterial surface properties of various fluoride-releasing restorative materials in vitro. J Appl Biomater Funct Mater. 2015;13(2).

205. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. Caries Res. 2003;37(2).

206. Beldüz N, Kamburoğlu A, Yilmaz Y, Tosun I, Beldüz M, Kara C. Evaluation of candida albicans biofilm formation on various dental restorative material surfaces. Niger J Clin Pract. 2017;20(3).

207. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. J Esthet Restor Dent. 2011;23(1).

208. Davidovich E, Weiss E, Fuks AB, Beyth N. Surface antibacterial properties of glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. J Am Dent Assoc. 2007;138(10).

209. Alsamolly W, Sadek GED. Comparative assessment of antibacterial activity and fluoride release potential of Cention-N and different bioactive restorative materials: An in vitro study. Egypt Dent J. 2021;67(3).