T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

ÜÇ FARKLI DOLGU MATERYALİNİN FİBROBLAST ATAŞMANINA ETKİSİNİN *İn Vitro* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Proje No:TSD-08-591

DOKTORA

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Servet KESİM
Preiodontoloji A.D.

Araştırmacı:
Dr. Dt. Duygu KILIÇ
Periodontoloji A.D.

Şubat 2011
KAYSERİ

Yrd. Doç. Dr. Servet KESİM danışmanlığında **Duygu KILIÇ** tarafından hazırlanan "**Üç Farklı Doğu Materyalinin Fibroblast Ataşmanına Etkisinin *In Vitro* Olarak Değerlendirilmesi**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Periodontoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

14/02/2011

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Tamer ATAOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Servet KESİM (DANIŞMAN)

Üye : Doç. Dr. Banu Arzu ALKAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Osman ÖZÖZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şükrü ÖNÖRS

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 17/3/2011 tarih ve 499 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

18/3/2011

Enstitü Müdürü
Prof.Dr.Naim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Servet KESİM'e,

Tez çalışmamı gerçekleştirmemi sağlayan, hafta sonu tatillerini bile deney aşamaları ile ilgilenerek geçiren Sayın Prof. Dr. Zeynep SÜMER'e,

Bana hem hocalık hem ablalık yapan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim Sayın Doç. Dr. Arzu ALKAN'a,

Değerli fikirleriyle bana ışık tutan hocam Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a,

SEM incelemesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN, Sayın İhsan AKŞİT ve Sayın Altınay BOYRAZ'a,

İstatistik değerlendirmelerindeki katkılarından dolayı Sayın Öğr. Gör. Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmamın deney aşamalarında bana yardımcı olan arkadaşlarım Sayın Mehmet KARA ve Sayın Akın Erdem YAĞAN'a

Her zaman yanımda yer alan, acı ve tatlı pek çok anıyı paylaştığım Periodontoloji Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma, görevlerini son derece basarıyla yapan bölümümüzün bütün personeline,

Bana her zaman güvendiklerini bildiğim, sonsuz sevgi ve destekleri ile beslendiğim canım anneciğim Ülkü TAŞKIN ve babacığım Yılmaz TAŞKIN'a,

Biricik kardeşim Mehmet Cengiz TAŞKIN'a,

Beni olduğumdan daha iyi, daha güzel, daha başarılı yapan, kısacası her konuda beni çoğaltan, sevgi ve desteğini her zaman hissettiğim canım eşim Kerem KILIÇ'a

Ve son olarak hayatımın anlamı, biricik kızım ADA KILIÇ'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÜÇ FARKLI DOLGU MATERYALİNİN FİBROBLAST ATAŞMANINA ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Bu *in vitro* çalışmada, klinikte yaygın olarak kullanılan cam iyonomer simanlar ve rezin kompozitlerin gingival fibroblast ataşmanına etkisi ve bu materyallerin sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

MTT [3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] hücre proliferasyon testi için, üç farklı dolgu materyali (Cam iyonomer siman, Rezin modifiye cam iyonomer siman ve Poliasit modifiye rezin kompozit) gingival fibroblast hücreleri ile 1 ve 3 gün süre ile inkübe edilmiştir.

Agar difüzyon testi ile üç dolgu materyalinin sitotoksisitesi incelenmiş ve agar tabakası bariyer olarak kullanılarak dolgu materyallerinden açığa çıkan sızıntı ürünlerinin, indirekt olarak oluşturabilecekleri toksik etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fibroblast ataşmanının değerlendirilmesi için ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır.

MTT test sonuçlarına göre, 1. günde Poliasit modifiye rezin kompozit yüzeyinde fibroblast ataşmanının fazla olduğu ancak 3. günde fibroblast ataşmanın azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Üçüncü günde rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyindeki fibroblast ataşmanının diğer dolgu maddelerine göre anlamlı ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Tüm dolgu materyalleri 1. gün ve 3. günde kontro (cam)l grubu (% 100) ile hücre proliferasyon yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Agar difüzyon testi sonuçlarına göre rezin modifiye cam iyonomer simanın hafif sitotoksik olduğu belirlense de gruplar arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

SEM incelemesinde tüm dolgu materyalleri üzerinde yoğunluk farkı bulunmasına rağmen fibroblast morfolojilerinde belirgin farklılıklar gözlenmemiştir. Yüzey özellikleri nedeni ile pürüzlülüğü az olan kontrol (cam) grubunda daha fazla fibroblast ataşmanı gözlenirken, pürüzlü yüzeyi nedeni ile de rezin modifiye cam iyonomer siman yüzeyinde ise daha az fibroblast ataşmanı gözlenmiştir.

Yaptığımız in vitro araştırma sonuçlarına ek olarak kimyasal yüzey analiz teknikleri, element salınımının ölçülmesi ve fiziksel yüzey karakterizasyonu ile mikroyapı ve pörözitenin incelenmesi dolgu materyallerinin biyolojik yanıtının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Gingival fibroblast, MTT, SEM, Cam iyonomer siman

EFFECT OF THREE DIFFERENT FILLING MATERIALS ON FIBROBLAST ATTACHMENT: *IN VITRO* EVALUATION

ABSTRACT

In this *in vitro* study, the effects of glass ionomer cement, resin modified glass ionomer cement and polyacid modified resin composite intensively used in clinical practice on gingival fibroblast cells and cytotoxicity of these materials were investigated.

For MTT cell proliferation test, three different filling materials' substructures (glass ionomer cement, resin modified glass ionomer cementand polyacid modified resin composite) were incubated with gingival fibroblast cells for 1 and 3 day.

Cytotoxicity of three filling materials were examined using Agar diffusion test and it was aimed to determine the toxic effect of leakage products released from filling materials can be indirectly built. Scanning electron microscope was used to evaluate fibroblast attachment.

In MTT test analysis, fibroblast attachment on poliacid modified resin composite filling material was excessive on day 1 but it decreased on day 3 ($p<0,05$). Fibroblast attachment on resin modified glass ionomer cement was lower than other filling materials on day 3. When cell proliferation percentages of all filling materials were compared with control group(% 100) on day 1 and 3, it was observed that difference was statistically significant. Despite resin modified glass ionomer cement was determined slightly cytotoxic according to the results of agar diffusion test, difference between the groups was not significant ($p>0,05$).

Significant difference in morphology of fibroblasts was not observed even though density of fibroblasts on all filling materials was different on the SEM samples. Maximum fibroblast attachment was observed on the glass control group because of the smooth surface. Minimum fibroblast attachment was observed on resin modified glass ionomer cement surface because of roughness.

In addition to our *in vitro* research results, the chemical surface analysis techniques, measurement of release of elements and physical surface characterization and analysis of microstructure and porosity can provide a better understanding of the biological response of filling materials.

Key words: Gingival fibroblast, MTT, SEM, glass ionomer cement

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

KAPAK……

BOŞ SAYFA……..

KABUL ONAY SAYFASI.....

TEŞEKKÜR.....

ÖZET.....

ABSTRACT.....

İÇİNDEKİLER.....

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....

KISALTMALAR .....

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. DİŞETİ ÇEKİLMESİ 3
2.1.1 Dişeti Çekilmesi Prevalansı, Sebepleri ve Oluşum Mekanizması 4
2.1.2. Dişeti Çekilmesinin Klinik Önemi 5
2.1.3. Dişeti Çekilmesinin Sınıflandırılması 6
2.1.4. Dişeti Çekilmesinin Tedavisi 8
2.1.4.1. Saplı Greftler (Saplı Flepler) 9
2.1.4.1.1. Laterale Pozisyone Flep (LPF) 9
2.1.4.1.2. Koronale Pozisyone Flep (KPF) 10
2.1.4.1.3. Semilunar Koronale Pozisyone Flep (SKPF) 10
2.1.4.1.4. Çift Papilla Flep (ÇPF) 10
2.1.4.2. Serbest Greftler 11
2.1.4.2.1. Serbest Dişeti Grefti (SDG) 11
2.1.4.2.2. Bağ Dokusu Grefti (BDG) 11
2.1.4.2.3. Aselüler Dermal Matriks Allografti (ADMA) 12
2.1.4.3. Saplı ve Serbest Greftlerin Kombine Uygulamaları 13
2.1.4.4. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR) 13

2.1.4.5. İlave Tedaviler 13
2.1.4.5.1. Kök Yüzeyi Demineralizasyonu 14
2.1.4.5.2. Fibrin-Fibronektin Sistemleri 14
2.1.4.5.3. Mine Matriks Proteinleri (EMD) 14
2.2. KÖK ÇÜRÜKLERİ 15
2.3. ÇÜRÜKSÜZ SERVİKAL LEZYONLAR 16
2.3.1. Atrizyon 16
2.3.1.1. Atrizyon Lezyonlarının Etyolojisi 16
2.3.1.2. Atrizyon Lezyonlarının Klinik Görünümü 16
2.3.2. Erozyon 17
2.3.2.1. Erozyon Lezyonlarının Etyolojisi 17

2.3.2.2. Erozyon Lezyonlarının Klinik Görünümü 18
2.3.3. Abrazyon 18
2.3.3.1. Abrazyon Lezyonlarının Etyolojisi 18
2.3.4. Abfraksiyon 18
2.3.4.1. Abfraksiyon Lezyonlarının Etyolojisi 19
2.3.4.2. Abfraksiyon Lezyonlarının Klinik Görünümü 19
2.4. DİS ASINMALARININ VE KÖK ÇÜRÜKLERİNİN TEDAVİLERİNDE KULLANILAN RESTORATİF MATERYALLER 19
2.4.1. Geleneksel Cam İyonomer Simanlar (GCİS) 20
2.4.2. Rezin Modifiye Cam İyonomer Simanlar (RMCİ) 21
2.4.3. Poliasit Modifiye Kompozit Rezinler (PMKR) 21
2.4.4. Kompozit Rezinler 22
2.5. BİYOUYUMLULUK 22
2.5.1. Hücre Kültürü 23
2.5.1.1. Hücre Kültürlerinin Avantajları 25
2.5.1.2. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları 25
2.5.1.3. Hücre Kültürü Test Yöntemleri 26

Sayfa no

2.5.1.3.1.Agar Difüzyon Test Yöntemi 26
2.5.1.3.2.Agarose Test Yöntemi 28
2.5.1.3.3.Milipore Filtre Test Yöntemi 28
2.5.1.3.4.Krom Salınım Yöntemi 28
2.5.1.3.5.Model Kavite Test Yöntemi 29
2.5.1.3.6. Diş Kavite Test Yöntemi 29
2.5.1.3.7.MTT Test Yöntemi 29
2.5.1.3.8. XTT Test Yöntemi 30
25.1.3.9. WST-1 Test Yöntemi 30
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER 32
3.1. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI 33
3.1.1. Cam İyonomer Siman Örneklerin Hazırlanması 34
3.1.2. Rezin Modifiye Cam İyonomer Siman Örneklerin Hazırlanması 35
3.1.3. Poliasit Modifiye Rezin Kompozit Örneklerin Hazırlanması 35
3.1.4. Cam Örneklerin Hazırlanması 36

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ 37
3.3. MİKROPLATELERİN HAZIRLANMASI 40
3.4. MTT TESTİ İLE FİBROBLAST PROLİFERASYONUNUN .....
DEĞERLENDİRİLMESİ 41
3.4.1. MTT Solüsyonunun Hazırlanması 41
3.5. SİTOTOKSİSİTE TESTİNİN YAPILMASI 43
3.6. SEM İNCELEMESİ 47
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME……47
4.BULGULAR 48
4.1. MTT TESTİ SONUÇLARI 50
4.2. AGAR DİFÜZYON TESTİ SONUÇLARI 52
4.3. SEM İNCELEMESİ SONUÇLARI 55
4.3.1. Bir Günlük İnkübasyon Sonrası SEM Görüntüleri …… .55
4.3.2. Üç Günlük İnkübasyon Sonrası SEM Görüntüleri…… 60
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 66
6.KAYNAKLAR 76

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1: Kök örtümü yöntemleri 9
Tablo 2.2: Hücre erime indeksi 27
Tablo 2.3: Hücre erime indeksi skorlarına göre sitotoksik etkinin şiddetinin belirlenmesi 27
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan dolgu materyalleri 33
Tablo 3.2: Hücre kültür ortamının oluşturulmasında kullanılan malzemeler 38
Tablo 3.3: Deney materyalinin sitotoksik etkisinden zarar gören hücrelerin yüzdesi ve lizis indeks değerleri 47
Tablo 4.1: Üç farklı dolgu materyalinin gingival fibroblast ataşmanı ortanca ve ortalama değerleri (%) (Optik Yoğunluk Değerleri) 49
Tablo 4.2: Üç farklı dolgu materyalinin agar difüzyon testine ait sitotoksisite ortanca değerleri 49
Tablo 4.3: 1. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortanca ölçüm değerlerinin karşılaştırması 50
Tablo 4.4: 3. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması 51

Tablo 4.5: 1. ve 3. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması 51

Tablo 4.6: Dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortanca değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması 52

Tablo 4.7: Üç farklı dolgu materyalinin sitotoksisite değerlerinin karşılaştırılması 53

Şekil 2.1: Miller'a ait marjinal doku çekilmesi sınıflaması 7

Sayfa no

Resim 3.1: Çalışmada kullanılan teflon kalıp 34

Resim 3.2: Ketac Molar Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya) Cam iyonomer siman dolgu materyali 34

Resim 3.3: Photac Fil Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya) Rezin modifiye cam iyonomer siman dolgu materyali 35

Resim 3.4: Dyract Extra (Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) Poliasit modifiye rezin kompozit dolgu materyali 36

Resim 3.5: Örnek diskler 36

Resim 3.6: Cam kontrol örnekleri 37

Resim 3.7: L929 fibroblast hücrelerinin inverted ışık mikroskobunda görünümleri 37

Resim 3.8: Hücre kültür ortamının oluşturulmasında kullanılan malzemeler 38

Resim 3.9: Flask'ta besiyeri ortamı ile fibroblast hücreleri 39

Resim 3.10: Inverted ışık mikroskopu 39

Resim 3.11: Tripsin/EDTA solüsyonu 40

Resim 3.12: İnkübatör 40

Resim 3.13: Mikroplatelerde üzerlerine hücre kültürü ekilmiş örnekler ile MTT solüsyonu 41

Resim 3.14: MTT solüsyonu 41

Resim 3.15: Formazan kristalleri 42

Resim 3.16: ELISA okuyucusuna yerleştirilen mikroplate 42

Resim 3.17: Mikroplatelerde üzerlerine hücre kültürü ekilmiş örnekler ile MTT solüsyonu 44
Resim 3.18: Mikroplatelere agar tabakası döküldükten 30dk. sonraki görünüm (x10). 44
Resim 3.19: Mikroplatelere nötral kırmızı konulduktan hemen sonraki görünüm. (x10). ... 45
Resim 3.20: Mikroplatelerdeki agar çözeltisi ve örnek diskler 46
Resim 4.1: Lizis indeks değeri 0 (sitotoksik değil) olarak belirlenen K grubunun mikroskobik görüntüsü ……..53
Resim 4.2: Lizis indeks değeri 1 (hafif sitotoksik) olarak belirlenen P grubunun mikroskobik görüntüsü 54

Sayfa no

Resim 4.3: Lizis indeks değeri 0 (sitotoksik değil) olarak belirlenen D grubunun mikroskobik görüntüsü……..54
Resim4.4: Cam yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×300)..... 55
Resim 4.5: Cam yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×2500)..... 56
Resim 4.6: K grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)…….56
Resim 4.7: K grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500)……...57
Resim 4.8: P grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)…….58
Resim4.9: P grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4000)……...58
Resim 4.10: D grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)…….59
Resim 4.11: D grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500)…….59
Resim 4.12: Cam yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×300)……..60
Resim 4.13: Cam yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×2500)……60
Resim 4.14: K grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)……..62
Resim 4.15: K grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası

SEM görüntüleri (×4500)……62
Resim 4.16: P grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)……..63
Resim 4.17: P grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500)……63
Resim 4.18: D grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310)…….64
Resim 4.19: D grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500)……..65

KISALTMALAR

LPF	: Laterale Pozisyone Flep
KPF	: Koronale Pozisyone Flep
SKPF	:Semilunar Koronale Pozisyone Flep
ÇPF	:Çift Papilla Flep
SDG	:Serbest Dişeti Grefti
BDG	:Bağ Dokusu Grefti
ADMA	:Aselüler Dermal Matriks Allografti
YDR	:Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu
EMD	: Mine Matriks Proteinleri
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit
GCİS	:Geleneksel Cam İyonomer Siman
RMCİ	:Rezin Modifiye Cam İyonomer Siman
PMRK	:Poliasit Modifiye Rezin Kompozit
HEMA	: Hidroksietil metakrilat
MTT	: [3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
DMEM	: Dulbeco’s Modified Eagles Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
L929	: Fare fibroblast hücresi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dişeti çekilmesi, serbest dişeti kenarının apikale migrasyonu ile kök yüzeyinin klinik olarak açığa çıkmasıdır. Etiyolojisinde yaşlanma, yanlış diş fırçalama tekniği, diş malpozisyonu, dişeti inflamasyonu, periodontitis, yüksek frenilum ataşmanı, yanlış yapılan ortodontik diş hareketi, hatalı yerleştirilen protez kroşeleri, uzun ve kalın kenarlı sabit restorasyonlar, yetersiz yapışık dişeti genişliği, cerrahi periodontal tedavi, kök ve kemik anatomisi ve bruksizmden söz edilir. Dişeti çekilmesi sonucu, organik içeriği fazla olan sementle kaplı kök yüzeyi açığa çıkar. Bu durum, kök yüzeyi üzerinde çürüksüz servikal defektlerin, kök çürüklerinin oluşmasına ve kök hassasiyetine yol açabilir. Çürüğün oluşmasında Sharpey fibrillerinin semente girdiği bölgelerin çekilme sonucunda boşluk oluşturması etkilidir. Sement ince bir tabaka olduğu için çürük hızla dentin ve pulpaya ilerleyebilir. Bu nedenle çürüksüz servikal defektlerin ve kök çürüklerinin restoratif dolgu materyalleri ile restore edilmesi gerekmektedir.

Periodontal tedavinin amacı, hastanın yaşamı boyunca optimal estetikle birlikte sağlıklı, rahat ve fonksiyonel dentisyon ile periodonsiyumu oluşturmak ve sürdürmektir. Anterior bölgede meydana gelen dişeti çekilmelerinin estetiği olumsuz yönde etkilediği, yapışık dişeti

genişliğinin yetersiz olduğu mukogingival strese maruz kalan dişeti çekilmesi bölgelerinde ve aşırı kök hassasiyeti durumlarında periodontal plastik cerrahi işlemlerle yapışık dişeti genişliği arttırılarak açık kök yüzeyinin örtülmesi gerektiği bilinmektedir.

Kök yüzeyinde oluşan defektlerin ve çürüklerin restorasyonu amacıyla cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman, poliasit modifiye kompozit ve mikrofil kompozit gibi dolgu materyalleri kullanılmaktadır. Bu materyallerle restore edilen kök yüzeylerinin periodontal plastik cerrahi işlemlerle örtülmesi sonrası dolgu materyalleri ile dişeti dokusunun biyouyumluluğu ve dişeti fibroblastlarının bu materyallere ataşmanı oldukça önemlidir. Bunun dışında restoratif materyallerden salınan komponentler ve restorasyonlar üzerindeki plak birikimi, restorasyonların stabilitesini ve biyouyumluluğunu etkileyebilir.

Bu çalışmanın amacı, cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman ve poliasit modifiye rezin kompozitten oluşan üç ayrı dolgu materyalinin fibroblast proliferasyonuna etkisinin ve sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesi, bu dolgu materyallerine gingival fibroblast ataşmanının ne şekilde olduğunun incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİŞETİ ÇEKİLMESİ

Dişeti çekilmesi, serbest dişeti kenarının apikalde konumlanması ile kök yüzeyinin klinik olarak açığa çıkması olarak tanımlanmaktadır (1). Çekilme dişetinin pozisyonunda meydana gelen bir değişikliktir ve dişeti çekilmesinin net biçimde tanımlanabilmesi için dişetinin görünen pozisyonu ve gerçek pozisyonunun belirlenmesi gereklidir. Birleşim epitelinin kök yüzeyi üzerindeki lokalizasyonu dişetinin gerçek pozisyonunu belirtirken, görünen dişeti pozisyonu serbest dişeti kenarının yeri olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlar göz önünde bulundurularak dişeti çekilmesi görünen ve gizli dişeti çekilmesi olarak iki biçimde tanımlanmaktadır. Görünen dişeti çekilmesi mine sement birleşimi ile serbest dişeti kenarı arasındaki mesafedir ve inspeksiyon ile tespit edilebilmektedir. Gizli dişeti çekilmesi ise birleşim epitelinin mine sement birleşimine olan uzaklığı kadardır ve tespiti ancak periodontal sondun cep içerisine yerleştirilmesi ile mümkündür. Ancak klinik uygulamada birleşim epitelinin mine sement birleşimine göre yeri klinik ataşman seviyesi parametresi ile ifade edilmektedir ve dişeti çekilmesi terimi ile de klinisyenler dişetinin görünen pozisyonunu kastetmektedirler (2). Dişeti çekilmesi dişetinin durumunu değil lokalizasyonunu belirten bir terimdir ve tek ya da bir grup dişin labial ya da lingual yüzeyinde görülebilir. Nadiren diş kayıplarıyla sonuçlanan dişeti çekilmeleri hem hasta, hem de hekim için klinik açıdan oldukça önemli sonuçlar doğurmaktadır (3).

2.1.1. Dişeti Çekilmesi Prevalansı, Sebepleri ve Oluşum Mekanizması

1999 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir araştırmada 9869 kişilik bir topluluktaki bir bireyde dişeti çekilmesine sahip diş oranı %22.3, toplam dişeti çekilmesi prevalansı ise %58 olarak tespit edilmiştir (4). Dişeti çekilmesinin şiddeti ve prevelansı yaşa bağlı olarak artış göstermektedir. Dişeti çekilmesi miktarının her 10 yıl için % 3,16 arttığı rapor edilmiştir (5).

Dişeti çekilmesi genelde iyi ağız hijyenine sahip popülasyonlarda görülen bir problemdir (6). Yapılan incelemeler üst 1. molar ve alt santral kesici dişlerin en fazla dişeti çekilmesi görülen dişler olduğunu göstermektedir. Ayrıca bukkal yüzeyler proksimal yüzeylerden daha fazla etkilenmektedir.

Dişeti çekilmesi sebepleri şöyle sıralanabilir (7);

1) Yaş

2) İltihabi periodontal hastalık

3) Diştaşı irritasyonu

4) Periodontal tedavi

5) Alveol kemiğindeki anatomik malformasyonlar

6) Hatalı ortodontik diş hareketi

7) Parafonksiyonel alışkanlıklar

8) Hatalı hijyen alışkanlıkları

9) Hareketli veya sabit restorasyonların periodonsiyuma baskısı

10) Malokluzyon

11) Kimyasal travma

12) Keratinize dişetinin ince olması ve/veya genişliğinin yetersizliği

13) Yüksek frenilum ve kas ataşmanları

14) Sigara kullanımı

15) Piercing kullanımı

Dişeti çekilmesi oluşumu ile ilgili mekanizmalar nedene göre farklılık göstermektedir. İlerleyen yaşla beraber oluşan dişeti çekilmesi vücuttaki birçok organdakine benzer bir fizyolojik atrofi olayı olarak nitelendirilebilir. Ancak başta iltihabi periodontal hastalık nedeniyle olmak üzere birçok dişeti çekilmesi vakasının lokal iltihabi mekanizmalar sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (2).

Dişeti çekilmesinin patogenezinde iltihabi olayların rolü olduğu, ilk olarak Novaes ve arkadaşları (1975) tarafından gösterilmiştir (8). Baker ve Seymour (1976) da dişeti çekilmesinin patogenezini açıklamak amacıyla ratlarda yaptıkları deneysel histolojik çalışma sonucunda somut sonuçlar ortaya koymuşlardır (9). Araştırıcılar, başlangıçta ancak histolojik olarak saptanabilecek, oldukça lokalize bir iltihabi durum meydana geldiğini belirtmişler, aşırı kuvvetle diş fırçalamanın fiziksel hasar ya da epitelyal geçirgenlik artışına yol açması sonucunda iltihabi bir durumun ortaya çıkabileceğini vurgulamışlardır (8,9).

Sonuç olarak dişeti çekilmesinin nedeni birleşim epiteli civarında plak birikimini arttıran ve bölgede iltihabi olayı indükleyerek birleşim epiteli ve serbest dişeti kenarının daha apikalde konumlanmasına yol açan faktörlerdir. Bundan farklı olarak periodontal tedavi sonucu oluşan dişeti çekilmesi serbest dişeti kenarının eksize edilmesi ya da apikalde konumlandırılması sonucu ya da tedavi sonrası meydana gelen doku büzülmesiyle oluşmaktadır (2)

2.1.2. Dişeti Çekilmesinin Klinik Önemi

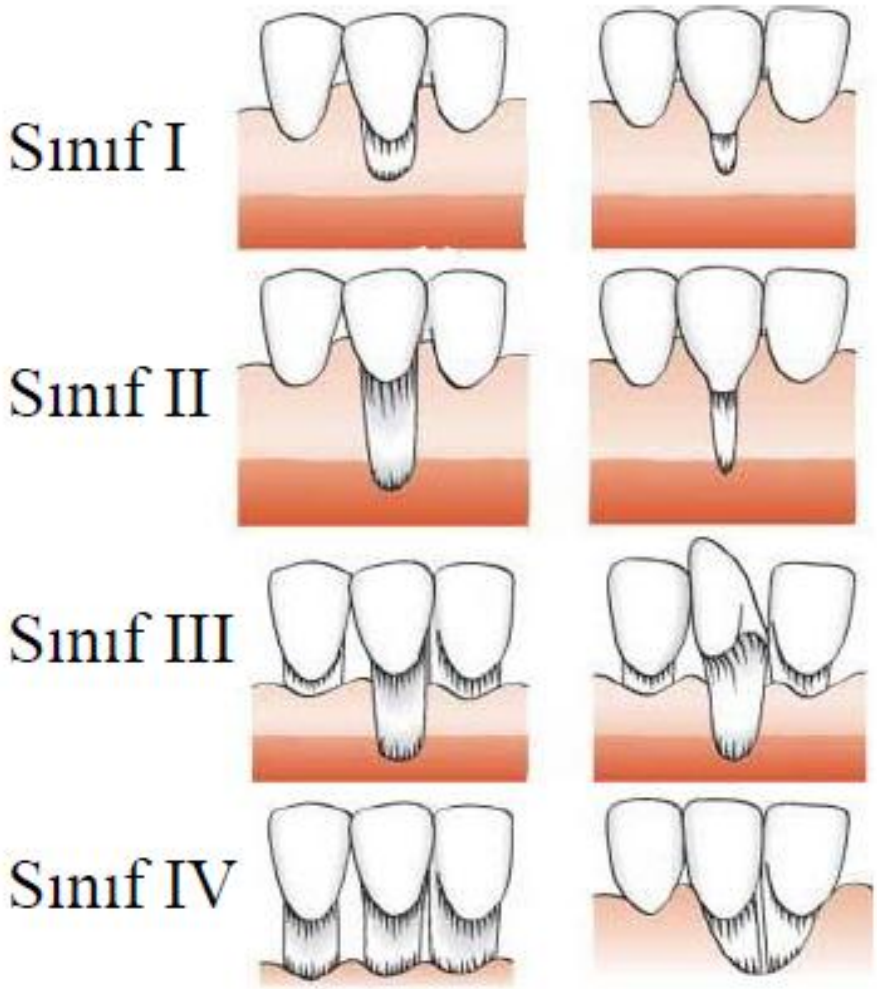
Klinik olarak açığa çıkmış kök yüzeyleri, diş minesine göre çürük oluşumuna daha yatkındır. Açığa çıkan kök yüzeyindeki sement zamanla ortadan kalkar ve kök yüzeyi demineralizasyon ve hipermineralizasyon gibi farklı mineral yapılanmaları gösterebilir ya da mineral yapıda herhangi bir değişiklik olmayabilir. Demineralizasyon oluştuğu takdirde, uzun dönemde kök çürüğüne yatkın hale gelir (10). Dişeti çekilmesi sonucunda demineralize olan, çürüksüz servikal lezyon meydana gelen kök yüzeylerinde ortaya çıkan diğer problemler de dokunma ve termal değişimlere karşı oluşan kök hassasiyetidir (11, 12). Diğer yandan, bu tip dişlerde pulpal hiperemi ve buna bağlı komplikasyonlar (13), estetik restorasyonların yapımında güçlük (14) gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Dişeti çekilmesi bulunan hastalar kötü estetikten şikayetçidirler ve dişlerini kaybetme korkusu içindedirler (15). Özellikle pulpal hiperemi ve kök hassasiyeti bulguları hastaların ağız hijyenlerini sürdürmelerini engelleyerek daha fazla plak birikimine ve buna bağlı periodontal ve pulpal sorunlara yol açması açısından önemlidir (16).

Günümüzde dişeti çekilmelerinin şikâyete sebep olan önemli bir komplikasyonu da estetiğin bozulmasıdır. Hastaların estetik dişhekimliğine karşı ilgi ve taleplerinin artması dişeti çekilmesi tedavilerinde farklı periodontal plastik cerrahi işlemlerin gelişmesine öncülük etmiştir. Estetik dişeti görünümünün sağlanmasında açık kök yüzeylerinin kapatılması kritik bir öneme sahiptir. Özellikle yüksek gülme çizgisine sahip bireylerin üst anterior bölgelerinde estetik şikâyetler ile karşılaşılması kaçınılmazdır. Bu tip defektlerin kapatılması estetiğe olan katkısının yanı sıra keratinize ve yapışık dişeti miktarının da artmasını sağlamaktadır (2).

2.1.3. Dişeti Çekilmesinin Sınıflandırılması

Dişeti çekilmelerinin sınıflandırılması ilk olarak 1960 yılında Sullivan ve Atkins tarafından yapılmıştır (17). Bu sınıflamada araştırıcılar dişeti çekilmelerini sığ-dar, sığ-geniş, derin-dar ve derin-geniş olmak üzere 4 morfolojik gruba ayırmışlardır.

Miller ise, marjinal doku çekilmesi teriminin, dişeti çekilmesi teriminden daha doğru olduğunu, marjinal dokunun anlam olarak dişeti ile birlikte alveol kemiğini de içerdiğini belirtmiştir. Miller'in yaptığı marjinal doku çekilmesi sınıflandırması, çevre dokularla birlikte kök örtümü oranlarının da tahminine dayanan bir sınıflamadır. Bu sınıflamada dişeti çekilmesinin mukogingival birleşimle ilişkisi, interproksimal kemik seviyesi, dişin dental arktaki konumu göz önüne alınmıştır. Miller, marjinal doku çekilmelerini 4 sınıfta toplamıştır (18):



Şekil 2.1. Miller'a ait marjinal doku çekilmesi sınıflaması

Sınıf I: Mukogingival birleşime kadar uzanmayan marjinal doku çekilmesidir. İnterdental bölgelerde kemik veya yumuşak doku kaybı yoktur. % 100 kök örtümü beklenebilir.

Sınıf II: Mukogingival birleşime veya daha ötesine kadar uzanan marjinal doku çekilmesidir. İnterdental bölgelerde kemik veya yumuşak dokuda periodontal kayıp yoktur. Bu tip dişeti çekilmelerinde de % 100 kök örtümü beklenebilir.

Sınıf III: Mukogingival birleşime veya daha ötesine kadar uzanan marjinal doku çekilmesidir. İnterdental bölgelerde kemik veya yumuşak dokuda periodontal doku kaybı vardır, dişlerde malpozisyon görülebilir. Bu durumda ancak kısmi kök örtümü beklenebilir.

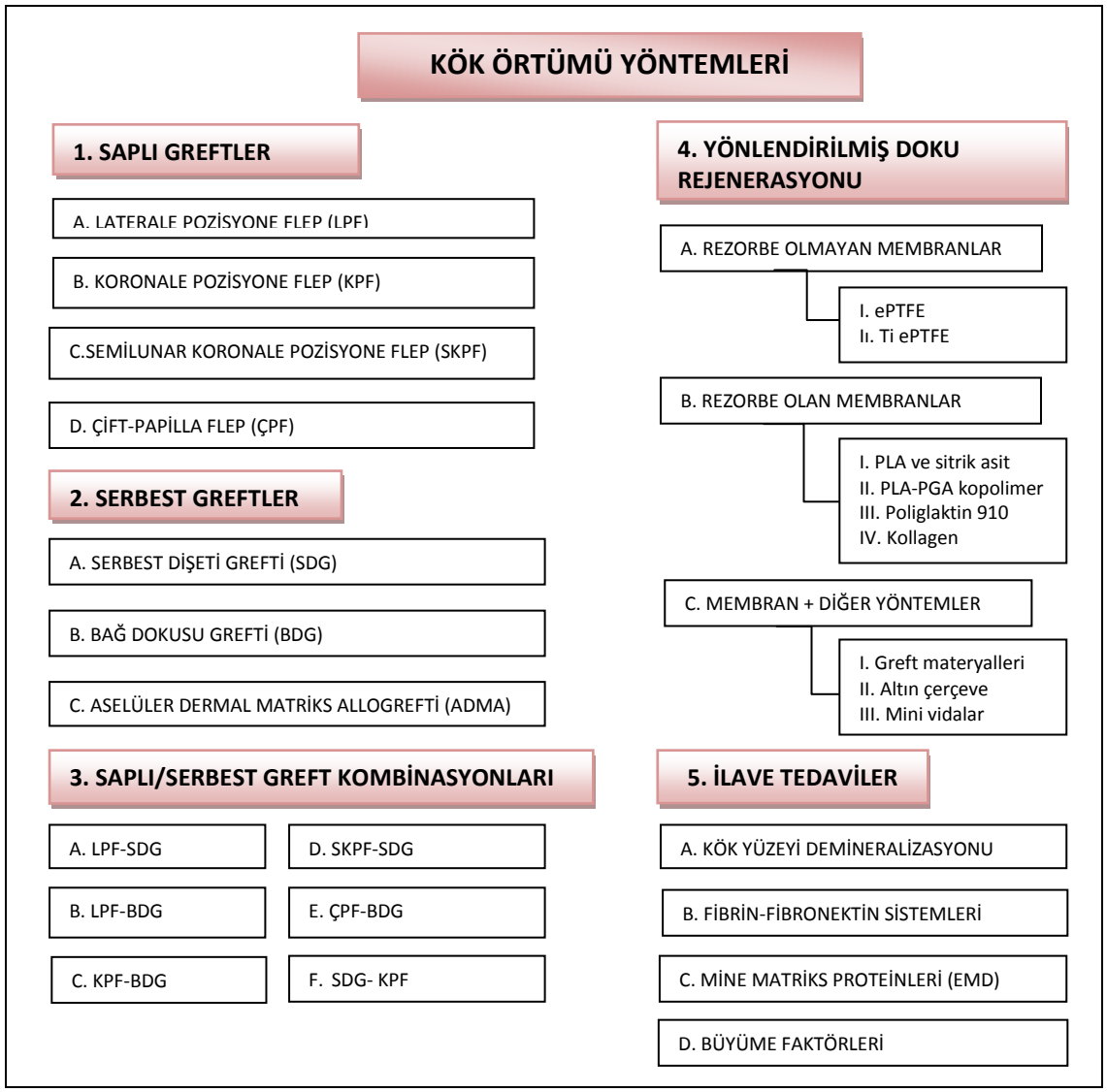
Sınıf IV: Mukogingival birleşime veya daha ötesine kadar uzanan marjinal doku çekilmesidir. İnterdental bölgelerde kemik veya yumuşak doku yıkımı ve/veya dişlerdeki malpozisyon çok şiddetli olup, yapılacak tedavi sonucunda kök örtümü beklenmez.

2.1.4. Dişeti Çekilmesinin Tedavisi

Periodontal tedavinin temel amacı dişetindeki iltihabi durumun ve kanamanın ortadan kaldırılmasıdır. Böylece periodontal doku yıkımının engellenmesi, optimal fonksiyonun sağlanması, yıkıma uğramış dokuların restorasyonu ve rejenerasyonu, periodontal sağlığın korunması için gerekli fizyolojik dişeti formunun yeniden oluşturulması, hastalık tekrarının engellenmesi, diş kaybının azaltılması ve estetiğin sağlanması amaçlanır. Ayrıca dentogingival ünitenin, mine-sement birleşiminde ya da çok yakınında konumlandırılıp, korunması da yukarıda belirtilen amaçlara hizmet eder (15).

Dişeti çekilmesinde birçok nedenle tedaviye ihtiyaç duyulmasına rağmen senelerce herhangi bir problem olmadan, tedavi yapılmaksızın da durumun idame ettirilebileceği unutulmamalıdır. Diğer bir ifade ile her dişeti çekilmesi durumunda tedavi zorunluluğu bulunmamaktadır. Klinisyenler genellikle dişeti çekilmesine estetik problem, klasik tedaviler ile giderilemeyen hassasiyet, çürük ve çürüksüz servikal lezyonlar veya plak kontrolünün zorlaştığı durumlar eşlik ettiğinde, yani mukogingival problemin görüldüğü koşullarda cerrahi uygulamaya karar vermektedirler (20,21). Mukogingival problem, dişeti ve alveol mukozasının, bazen de alveol kemiğinin şekil ve fonksiyonunda oluşan belirgin kayıplar olarak tarif edilmektedir (22). Çok az yapışık dişetinin olduğu veya hiç olmadığı bölgelerde, dişeti iltihabı ve dişeti çekilmesinin varlığı bir mukogingival problem olduğunun işareti olabilmektedir. Bu değişkenlerin tek tek değil çoğunlukla üçünün bir arada bulunduğu durumlar, gerçek ve tedaviye ihtiyaç duyulan bir mukogingival durumu ifade etmektedir. Açık kök yüzeylerinin örtülmesinde pek çok teknik kullanılmıştır. Bu teknikler genel olarak 5 grupta incelenmektedir (23) (Tablo 2.1):

Tablo 2.1. Kök örtümü yöntemleri



2.1.4.1. Saplı Greftler (Saplı Flepler)

2.1.4.1.1. Laterale Pozisyone Flep (LPF)

Kök kapatma işlemi olarak, ilk defa 1956'da Gruppe ve Warren tarafından, laterale pozisyone flep operasyonu tanıtılmıştır (24). Araştırıcılar bu teknik ile dişeti çekilmelerinin tedavi edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Günümüze kadar farklı modifikasyonları (25, 26) tanıtılan LPF, küçük değişikliklerle farklı isimler altında uygulanabilmektedir. Özellikle Çift Papilla Flep (ÇPF) (27), oblik pozisyonlandırılan flepten (28) söz edilmektedir. Bu yöntemde önce açık kök yüzeyine ait serbest dişeti kenarı kaldırılıp kök yüzeyi düzleştirmesi işlemi yapılmaktadır. Sonrasında komşu dişe ait verici dişeti vertikal insizyon ve yarım kalınlık fleple kaldırılıp açık kök yüzeyi üzerinde sabitlenmektedir (29). Çekilmenin lateralinde

yetersiz dişeti, sığ vestibül, verici bölgede ikincil frenal ataşmanlar, yan yana çok sayıda dişeti çekilmesi gibi durumlar yaklaşık 25 yıl boyunca kök kapatmada en güvenilir teknik gözüyle bakılan LPF'nin kullanımını sınırlayan kontrendikasyonlardandır (30). Önemli bir avantajı ise ideal bir doku renk uyumu sağlaması ve ikinci bir cerrahi saha gerektirmemesidir.

2.1.4.1.2. Koronale Pozisyone Flep (KPF)

KPF özellikle dişeti çekilmesinin apikalinde yeterli dişetinin bulunduğu koşullarda tercih edilen bir tekniktir. Yöntem 1926 yılında tarif edilmesine karşın popüler olması ve yeni bir formda ilk kez tarifi 1973 yılında Bernimoulin'e aittir (31, 32). Teknik olarak kök yüzeyi düzleştirmesini takiben, dişeti çekilmesinin meziyal ve distalinden yapılan vertikal insizyonlar sonrası serbestleştirilen dişeti koronal yönde çekilerek açıkta kalan kök yüzeyini örtecek biçimde sabitlenmektedir. KPF de ikinci cerrahi saha gerektirmez. Ancak vestibül derinliğini azaltan bir yöntemdir. Teknik 2000 yılında Zucchelli tarafından vertikal insizyonlar kullanılmaksızın modifiye edilmiştir (33). Özellikle çoklu çekilmelerin tedavisinde bu modifikasyon başarı ile uygulanabilmektedir. Ancak derin çekilmeler varlığında genellikle klasik yöntem yani vertikal insizyonlar tercih edilmektedir.

2.1.4.1.3. Semilunar Koronale Pozisyone Flep (SKPF)

SKPF Tarnow tarafından 1986 yılında tanımlanan modifiye bir koronale kaydırma flep yöntemidir (34). Bu yöntem, mukogingival birleşimde yarım ay biçiminde yapılan bir insizyonun dişeti altından sulkustaki bir diğer insizyonla birleştirilmesiyle aralanan flebin, periodontal pat yardımıyla koronal yönde pozisyonlandırılmasıyla uygulanır. Bir avantaj olarak mukogingival birleşimden uygulanan insizyon vestibül derinliğinin azalmasını önlemektedir. Ancak aralanan flebin beslenmesinde problem yaşanabilmektedir.

2.1.4.1.4. Çift Papilla Flep (ÇPF)

Çift papilla flep ilk olarak Cohen ve Ross tarafından 1968 yılında tanımlanmıştır (27). Klasik KPF tekniğindeki gibi yapılan vertikal insizyonları takiben açık kök yüzeyinin meziyal ve distalindeki dokuların kök yüzeyi üzerinde birleştirilmesinden oluşmaktadır. İnterdental alanda keratinize dişeti genişliğinin fazla olması nedeniyle uygulanabilirliği mevcut olsa da dikiş bölgesinin avasküler saha üzerinde kalması önemli bir dezavantajdır ve birçok vakada rekürens oluşabilmektedir.

Pozisyone flepler ile SDG'ye göre daha estetik sonuçlar alınmasına, operasyon sonrası oluşan verici bölge hassasiyetinin elimine edilmesine ve tedavi süresinin kısalmasına karşın defekte komşu alanda yetersiz dişeti varlığı uygulama alanlarını bir hayli kısıtlamaktadır (35).

2.1.4.2. Serbest Greftler

2.1.4.2.1. Serbest Dişeti Grefti

Temel bir periodontal cerrahi teknik olan serbest dişeti grefti, 1963'de Bjorn tarafından yapışık dişeti genişliğinin arttırılmasında kullanılmıştır. King ve Pennel (1967), ilk olarak bir gingival ogmentasyon işlemi olarak tanıttıkları SDG'nin amaçlarını, keratinize dişetinden oluşan bir yumuşak doku kenarı elde etmek, daha fazla dişeti çekilmesi oluşmasının önüne geçmek, yüksek frenulum ataşmanının etkisini yok etmek, hastanın yumuşak dokuyu zedelemeden plak uzaklaştırabilmesini mümkün kılan yumuşak doku kenarı oluşturmak, restorasyon sınırlarının dişeti cebi içinde konumlandığı durumlarda ilave tedavi olarak belirtmişlerdir (36).

Yöntem olarak kök düzeltmesi işlemini takiben papillere yapılan horizontal ve vertikal insizyonları içermektedir. Daha sonra defekte komşu dişetleri vertikal insizyonlara kadar deepitelize edilmektedir. Defektin apikalindeki mukoza ise yarım kalınlık diseksiyon ile bölgeden uzaklaştırılarak alıcı saha hazırlanmaktadır. Uygun verici sahadan alınan greft ise bölgeye açık kök yüzeyini de kapatacak biçimde süture edilmektedir. SDG'nin kök örtümü amacıyla uygulanmasında özellikle kök yüzeyi üzerinde kalan greftin beslenmesinde sorun yaşanabilmektedir. Bu yüzden bu bölgede greftin kalın olması önerilmektedir. Bu teknikle tedavi sonrası tatminkâr kök örtümü ve yapışık dişeti elde edilmesine karşın operasyon sonrası verici ve alıcı sahalarda greft ile çevre doku arasında renk farkının meydana gelmesi, greftin beslenmesi ile ilgili güçlükler ve greftte oluşan boyutsal değişiklikler, keloid benzeri doku oluşumu ve donör sahada operasyon sonrası meydana gelen hassasiyet bu tekniğin bazı dezavantajları olarak bilinmektedir (37, 38).

2.1.4.2.2. Bağ Dokusu Grefti (BDG)

I. Langer tekniği: Langer tekniği ilk olarak 1985 yılında Langer ve Langer tarafından ortaya konmuştur (39). Yöntem olarak alıcı sahanın hazırlanması KPF tekniğinde olduğu gibi vertikal insizyonlar ve bu insizyonları birleştiren sulkuler insizyonlardan oluşmaktadır. Yarım

kalınlık flep kaldırılması sonrası uygun verici sahadan alınan BDG alıcı sahaya yerleştirilip sabitlendikten sonra flep repoze edilerek bölge kapatılmaktadır. Yöntem vertikal insizyonlardan doğabilecek komplikasyonların önlenmesi amacıyla vertikal insizyonsuz olarak da modifiye edilmiştir (40). Ancak derin defektlerin eliminasyonu için vertikal insizyonlar gerekmektedir. BDG yöntemi başlangıçta greftin açıkta bırakılacak kısmının epitel tabakasını da taşıyacak şekilde alınması biçiminde tavsiye edilse de estetik, verici sahada sekonder iyileşen bölge bulunması ve teknik zorluklar gibi dezavantajlar nedeniyle artık epitelsiz olarak uygulanmaktadır.

II. Zarf tekniği: 1985 yılında Raetzke tarafından rapor edilen BDG'ye ait zarf tekniği serbest dişetinin eksizyonunu takiben kök yüzeyi düzleştirmesi ve sulkus içerisinden mukogingival birleşime doğru uzanan aralayıcı insizyonu içerir. Vertikal insizyon kullanılmaz (41). Flebin mektup zarfı gibi aralanmasının ardından BDG bu zarfın içine yerleştirilmektedir. Tekniğin avantajı lateral ve apikal kan dolaşımının korunmasıdır. Ancak derin dişeti çekilmelerinde istenen sonuçlar alınamayabilmektedir. Zarf tekniği Müller tarafından 1999 yılında vertikal insizyon da kullanılarak modifiye edilmiştir (42).

III. Tünel tekniği: BDG'ye ait bu uygulama 1994 yılında Allen tarafından rapor edilmiştir (43). Zabalegui ve arkadaşları da yöntemi tünel tekniği olarak tanımlamış ve bugünkü durumuna getirmişlerdir (44). Yöntem zarf tekniğindeki gibi vertikal insizyonlar kullanılmaksızın iki dişe ait fleplerin aralanması ve bir tünel ile sulkuslardan başlayan insizyonların birleştirilmesinden oluşmaktadır. Daha sonra, oluşturulan boşluğa elde edilen BDG uygun sütur tekniği ile yerleştirilip sabitlenmektedir. Bu yöntem de zarf tekniğinde olduğu gibi lateral dolaşımın korunmasını sağlamaktadır. Ancak derin dişeti çekilmelerinde istenen sonuçlar alınamayabilmektedir.

2.1.4.2.3. Aselüler Dermal Matriks Allografti (ADMA)

ADMA'nın dişeti çekilmesi tedavisi için kullanımı ilk olarak Dodge ve ark. tarafından 1998 yılında ortaya konmuştur (45). Uygulamasının BDG'den tek farkı greft materyalindeki farklılıktır. ADMA sınırsız verici dokuya sahip olması ve ikinci cerrahi saha gerektirmeme gibi avantajlara sahiptir. Ancak verici kaynağı ile ilgili olası komplikasyonlar ve güvenlik sınırının bilinmemesi ile BDG'ye göre dokuya entegrasyonunun geç olması ve daha başarısız estetik sonuçlar sunması klinik kullanımda az tercih edilmesine sebep olmaktadır.

2.1.4.3. Saplı ve Serbest Greftlerin Kombine Uygulamaları

Pozisyone fleplerin yalnız uygulamaları verici sahada dişeti çekilmesi ve kemik kaybı meydana gelmesi ve istenen oranda dişeti miktarı elde edilememesi gibi sorunlara yol açabilmektedir (35). Anlatılan yöntemlere ait dezavantajların giderilebilmesi amacıyla saplı ve serbest greftlerin kombine uygulamaları ve modifiye yöntemler de denenmiştir. LPF-SDG, LPF-BDG, KPF-BDG, çift papilla flep-BDG, SDG-KPF, semilunar KPF-SDG prosedürleri bu kombinasyonlar arasında yer almaktadır (46-51).

2.1.4.4. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)

Pini Prato ve arkadaşları, 1992 yılında dişeti çekilmesi tedavisinde yönlendirilmiş doku rejenerasyonunu, verici sahada meydana gelebilecek komplikasyonları azaltmak ve çekilme bölgesinde rejenerasyon elde edebilmek amacıyla kullanmışlardır (52). Yöntem Langer tekniğine benzer şekilde alıcı sahanın açılması ve BDG yerine bariyer membran uygulamasından oluşmaktadır. Ancak membranın ağız içerisine açığa çıkmasının sakıncaları olacağından teknik pozisyone fleple kombine edilmektedir. Literatürdeki çalışmalar, rejenerasyon prensiplerinden biri olan boşluk oluşturulmasının sağlanması amacıyla kök yüzeyinin aşındırılmasına, dişeti çekilmesi için rezorbe olmayan expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) membranların (52, 53), titanyum destekli membranların veya membranlarla birlikte greft materyallerinin, altın çerçevenin ya da mini vidaların kullanımına işaret etmektedir (53-56). Fakat rezorbe olmayan membranların bölgeden alınması için ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi araştırıcıları rezorbe olan membranların kullanımına yönlendirmiştir. YDR'de amaç kök kapatılmasının yanı sıra kaybedilmiş orijinal ataşman aparatının da yeniden elde edilmesidir. Bugün her iki grup membran da çekilme tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak YDR yöntemleri diğer çekilme tedavileri ile kıyaslandığında teknik olarak uygulanmasının güç ve zaman alıcı olması ve uzun dönemli kök örtümü başarısının öngörülememesi gibi dezavantajlara sahiptir (57).

2.1.4.5. İlave Tedaviler

İlave tedaviler içerisinde yakın döneme kadar yalnız kök yüzeyini modifiye eden ajanlar sayılsa da artık birçok yöntem literatürde yer almaktadır. İlave tedavilerin amacı başlangıçta kök yüzeyi ile üzerini örten veya örtecek olan yumuşak doku arasındaki bağlantıyı güçlendirmek olarak ifade edilmiştir. Bilindiği üzere tüm çekilme tedavilerinin

uygulanmasında, greft veya flebin kök yüzeyine yerleştirilmesinden önce kök yüzeyinin ideal biçimde hazırlanmış olması kritik bir öneme sahiptir. Bu amaçla kök yüzeyi düzleştirmesi işlemi artık vazgeçilmez bir uygulama olarak yerini almıştır. Ancak bazı klinisyenler ilave olarak kimyasal ajanlarla kök yüzeyi koşullandırması yapmayı da tercih etmektedirler. Kök yüzeyi koşullandırmanın biyolojik amacı sement içerisindeki kollagen lifleri açığa çıkararak getirerek greft veya flep ile kök yüzeyi arasındaki fibrin bağlantısının (fibrin linkage) arttırılmasını sağlamaktır. Bununla birlikte çekilme ile beraber kök yüzeyi üzerine birikmiş olan smear tabakası da ortadan kaldırılabilmektedir. Birçok araştırma kök koşullandırıcıları ile rejeneratif etkinin arttırıldığını ortaya koysa da kontrollü klinik çalışmalar bu ajanların kök örtümüne ilave katkı yapmadığını göstermiştir (18,58).

2.1.4.5.1. Kök Yüzeyi Demineralizasyonu

Kök yüzeyini modifiye eden ajanlar içerisinde, üzerinde en çok çalışılmış olanlar sitrik asit ve tetrasiklin hidrokloriddir (18,58). Bu ajanlardan pH'ı 1 olan sitrik asit kök yüzeyinin cerrahi olarak açılmasını takiben üç dakika, 50–125 mg/ml tetrasiklin ise üç ila beş dakika süre ile tatbik edilmektedir. Bir diğer kök yüzeyi pürüzlendirici ajan da Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) olarak bilinmektedir. EDTA'nın çekilme tedavisi ile kombine kullanımı çok sık tercih edilmese de %24'lük jelin iki dakika süreyle uygulandığı rapor edilmiştir (59).

2.1.4.5.2. Fibrin-Fibronektin Sistemleri

Fibronektin, fibroblastların kök yüzeyine tutunmak için ihtiyaç duydukları bir proteindir. Kök yüzeyi üzerine fibronektin uygulanmasının yeni ataşman oluşumunu arttırabileceği düşünülmektedir (60). Ancak fibronektin konsantrasyonlarının plazmada artmasını ek avantaj sağlamadığı gösterilmiştir (61). Fibronektinin periodontal yara iyileşmesi ve rejenerasyonu üzerindeki rolünü araştıran çalışmalar, bu materyalin, iyileşmenin erken döneminde flebin ayrılmasını engelleyerek, hemostaz sağlayarak ve bağ dokusu rejenerasyonuna katkıda bulunarak faydalı olduğunu ortaya koymaktadır. Bunula birlikte literatürde fibronektinin çekilme tedavisi üzerine etkilerine dair yeterli klinik çalışma bulunmamaktadır (62).

2.1.4.5.3. Mine Matriks Proteinleri (EMD)

EMD ilk olarak 2000 yılında Rasperini ve arkadaşları (63) tarafından dişeti çekilmesi tedavisinde KPF ile beraber uygulanmıştır. Yöntem KPF ile beraber kök yüzeyinin iki dakika süre ile %24'lük EDTA jel ile koşullandırılması ve mine matriks proteininin üretici firma

tarafından önerilen biçimde tatbikini içermektedir. Yapılan çalışmalarda bu materyalin, kök örtümü tedavisine olumlu katkı yaptığı da, fark yaratmadığı da rapor edilmiştir (63,64).

2.2. KÖK ÇÜRÜKLERİ

Kök ucunu örten sement dokusu oldukça kalın (1,5–2,0 mm) olmasına rağmen, dişin servikali civarındaki kalınlık (0,5 mm) çok azdır. Bu nedenle, üzerindeki dişeti dokusunu kaybetmiş sement dokusu kolayca aşınabilir. Sement dokusunun inorganik yapısı % 46'dır ve hidroksilapatitden meydana gelmiştir. Bu oran kemik (% 70), dentin (% 69) ve mine (% 96) dekinden daha azdır (65).

Periodontal hastalıklar, cerrahi operasyonlar, mekanik travmalar veya bütün bunların kombinasyonu sonucu dişeti çekilir ve dişin kök yüzeyi ağız ortamına açılır. Açığa çıkan kök yüzeyi çok hızlı şekilde mikroorganizmaların kolonizasyonuna maruz kalır ve çürük oluşabilir (66). Dişeti çekilmiş kök yüzeylerinin %15-20'sinde kök çürükleri oluşabilmektedir (67).

Kök yüzeyi çürükleri yeni bilinen bir olgu değildir. Antropolojik incelemeler bunu desteklemektedir. Corbett ve Moore, M.S. 600 yıllarına ait Anglo-Saxon kafatasları üzerinde yaptıkları incelemede, yüksek oranda sement çürüklerine rastlamışlardır (68). Yeni Gine'de ilkel toplumlar üzerinde inceleme yapan Schamschula (1972) antropolojik çalışmalardakine benzer sonuçlar bulmuş ve kök yüzeyi çürüklerinin mine çürüklerinden daha fazla görüldüğünü tespit etmiştir (69).

Bu kadar eski bir olgu olmasına ragmen, kök yüzeyi çürüğü ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle son yıllarda kök çürüğü lezyonlarının prevalansı, insidansı, etyolojisi, tedavisi ve önlenmesi konusunda pek çok araştırma yapılmıştır (70-72). Epidemiyolojik çalışmalar, yaş artışına paralel olarak kök çürüklerinde artış olduğunu göstermektedir.

Yaşlılarda çok yaygın bir sorun olan periodontal doku kaybı, kök çürüklerinin ortaya çıkması için zemin hazırlar (73). Epidemiyolojik çalışmalar kök yüzeyi çürük prevalansının hayli yüksek olduğunu da göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1988 ile 1991 yılları arasında yapılan saha taraması çalışmasında erişkin bireylerde %25 olan kök çürüğü prevalansının yaşla birlikte arttığı ve 75 yaş ve yukarısında %56'ya çıktığı rapor edilmiştir (74). Kök yüzeyi çürükleri yetişkin hastalar arasında çok sık rastlanan bir durum olup 5-6 ülkede yapılan uluslararası çalışmada yetişkinlerde %60-90 oranında olduğu gösterilmiştir (75-77).

Diş kökleri, sement ve dentinin yapısal özellikleri ve kimyasal kompozisyonları nedeniyle, diş kronlarına kıyasla, mekanik etkilere daha az dirençlidir. Kök yüzeyini örten sement tabakası, mineden daha fazla organik yapıya sahiptir ve bu da sementi mineye oranla asit ataklarına karşı daha zayıf kılmaktadır (78).

2.3. ÇÜRÜKSÜZ SERVİKAL LEZYONLAR

Ağız içinde, çürük dışında farklı kronik yıkıcı olaylar dişleri etkilemektedir. Bu yıkımlar klinikte aşınmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Aşınmaların oluşumunda pek çok etken rol oynamaktadır. Diş aşınmaları, oluşumunda rol oynayan etkenlere bağlı olarak, atrizyon, erozyon, abrazyon ve abfraksiyon olarak isimlendirilmektedir (79, 80). Servikal bölgedeki çürüksüz lezyonların gelişiminden abrazyon, erozyon (korozyon) ve abfraksiyon sorumlu tutulmaktadır (81).

2.3.1. ATRİZYON

Atrizyon; Latince 'herhangi bir şey karşısında sürtünme hareketi' anlamına gelen *attere, attrivi, attritum* kelimelerinden türemiştir. Dental atrizyon klinik terimi; yabancı bir cisim olmaksızın diş dişe kontağın bir sonucu olarak diş sert dokularının fizyolojik aşınması olarak tanımlanır (82).

2.3.1.1. Atrizyon Lezyonlarının Etyolojisi

Atrizyon; büyük oranda yaşlanma ile ilgilidir. Normal çiğneme fonksiyonunun etkisiyle yavaş ve düzenli olarak meydana gelirse, fizyolojik atrizyon olarak tanımlanır. Eğer hastada yaşına göre normalden daha fazla bir miktarda aşınma varsa, patolojiden bahsedilebilir. Diş malpozisyonları ve okluzyon bozukluğu olan hastalarda, prematür kontakların varlığında patolojik atrizyon görülebilir. Bazı parafonksiyonel alışkanlıklar da patolojik atrizyona yol açabilir. Çiğneme fonksiyonu dışında dişlerin temasa gelmesi bruksizm olarak isimlendirilmekte ve bu durum patolojik atrizyonun ana nedeni sayılmaktadır (83).

2.3.1.2. Atrizyon Lezyonlarının Klinik Görünümü

Atrizyon; dişlerin insizal, okluzal ve proksimal yüzeylerinde yaşlanmaya bağlı olarak gelişir. Atrizyonun erken safhalarında aşınma anterior dişlerin insizal kenarları ve posterior dişlerin okluzal yüzeylerinde parlak alanlar olarak görülmektedir. Şiddetli vakalarda dentin dokusu açığa çıkabilir ki bu, aşınmanın hızını artırır (84).

2.3.2. EROZYON

Erozyon; Latince çürümek, yenmek anlamına gelen *erodore, erosi, erosum* kelimelerinden türemiştir. Genellikle elektrolitik veya kimyasal yollarla bir maddenin yüzeyinin kademeli olarak yıkılması olayını tanımlamaktadır. Dental erozyon; bakteri içermeyen kimyasal bir olay sonucu diş dokusunda meydana gelen kayıp olarak tanımlanabilir (82). Ağız pH'sı diş minesini etkileyen kritik pH değeri olan 5.5'in altına düşerse, asit ataklarının süresi ve sıklığına bağlı olarak erozyon gerçekleşir (85).

2.3.2.1. Erozyon Lezyonlarının Etyolojisi

Erozyon, etyolojisine göre üç bölümde incelenmektedir. Bunlar;

I. Dış kaynaklı(Ekstrinsik)

II. İç kaynaklı(İntrinsik)

III. İdiopatik erozyonlardır (82).

I. Dış Kaynaklı Erozyon Lezyonları

Dış kaynaklı erozyon lezyonları; kişinin diyetine, kullandığı ilaçlara, çevresel faktörlere ve yaşam biçimine bağlı olarak meydana gelebilir (86). Yiyecek ve içeceklerin erozyon yapma potansiyeli, o maddenin asiditesine bağlıdır. Bununla birlikte, diş minesinin mikrosertlik derecesi ve iyon geçirgenliği de bu lezyonların oluşumunda önem taşır (82). Bireylerin kendi başlarına uyguladıkları dental ürünler nedeniyle ve bazı ilaçların etkisiyle gelişen erozyon olguları rapor edilmiştir. Diş beyazlatma ajanlarının da erozyona eğilimi kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (86).

II. İç Kaynaklı Erozyon Lezyonları

İç kaynaklı erozyon lezyonlarının en sık görülme nedeni mide asidinin sık aralıklarla ağıza gelmesi ve dişlere temas etmesidir. Bu durum, özellikle gastroözofajial reflü, anoreksia ve bulimia nervosa gibi hastalıklarda görülür (82). Bu bireylerde gastroözofajiyal sfinkter tam olarak işlev görmediği için, karın içi basınçta ve mide içeriğinde yükselme olduğunda, mide sıvısı pasif olarak ağza gelmektedir. Mide sıvısının pH'sı çok düşük olduğundan diş yüzeylerinde yıkıma neden olur. Bu hastalıklardan başka alkol bağımlılarında ve kronik bulantı şikayeti olan bireylerde de aynı belirtiler görülmektedir (86).

2.3.2.2. Erozyon Lezyonlarının Klinik Görünümü

Erozyon lezyonlarından diyete bağlı olarak gelişenler, alt ve üst anterior dişlerin labial yüzeylerinde görülür (82). Bu lezyonlar erken dönemde pürüzsüz görünümlü olup yüzey konturu kaybedilmemiştir. Dişteki kayıp arttıkça daha az mineralize dentin dokusu açığa çıkmaktadır. Bu tür vakalarda dişlerde hassasiyet gelişmektedir (86). Çok ciddi erozyon vakalarında dişin pulpa dokusu açığa çıkabilmekte ya da üzerinde çok ince bir koruyucu dentin tabakası kalmaktadır. Pulpa dokusu genellikle canlılığını muhafaza etmekte; çok ender durumlarda diş devital duruma gelmektedir (82).

2.3.3. ABRAZYON

Abrazyon; Latince *abradere, abrasi, abrasum* kelimelerinden türemis 'kazımak' anlamına gelmektedir. Öğütme, silme veya kazıma gibi mekanik olaylarla dokunun veya yapının aşınmasını tarif eder. Dental abrazyon veya *abrasio dentium* ise; ağızda dişlerle temas eden yabancı cisimlerin yarattığı aşırı mekanik yük ile oluşan diş sert dokularının patolojik kaybıdır (82). Abrazyonu, dişlerin birbirine temas etmesi dışındaki faktörler nedeniyle diş yapısında ve restorasyonlarda meydana gelen aşınma olarak da tanımlayabiliriz (87).

2.3.3.1. Abrazyon Lezyonlarının Etyolojisi

Dental abrazyon bazı alışkanlıklara ve mesleki özeliklere bağlı olarak gelişebilir. Örneğin pipo içenlerin, dişleriyle kuruyemiş veya fındık kıranların, tırnak yeme alışkanlığı olan kişilerin dişlerinde insizal kenarlarda aşınma görülebilir (82). Dental abrazyonun servikal bölgelerde en sık görülme nedeni hatalı diş fırçalama ve bununla ilişkili faktörlerdir. Diş fırçalama en sık kullanılan oral hijyen yöntemidir. Gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların %80-90'ı dişlerini günde bir ya da iki kez fırçalamaktadır (87). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da, servikal abrazyon lezyonlarının oluşumu diş fırçalama ve bununla ilgili faktörlere bağlanmaktadır (88,89). Ayrıca, diş ara yüzeylerinde meydana gelen aşınmanın diş ipi, kürdan ve arayüz fırçası gibi aletlerin sık ve hatalı kullanımına bağlı olabileceği öne sürülmektedir (82).

2.3.4. ABFRAKSİYON

Abfraksiyon terimi, Latince'de kırmak anlamına gelen *frangere, fregi, fractum* kelimelerinden türemiştir. Dişlerde kasplar arası esneme hareketine bağlı olarak gelişen servikal lezyonlar abfraksiyon terimi ile isimlendirilmiştir. Abfraksiyon lezyonları dişlerin biyomekanik

kuvvetlerden etkilenmeleri sonucu özellikle servikal bölgelerde meydana gelen aşınmalardır (80).

2.3.4.1. Abfraksiyon Lezyonlarının Etyolojisi

Çürüksüz servikal lezyonlar; mine-sement birleşimindeki sert dokunun kaybı ile karakterizedir. Bu lezyonların abrazyon ve/veya erozyonun etkileri sonucu oluştuğu bilinmektedir. Son yıllarda araştırmacılar kasplar arası esneme hareketinin bu tür lezyonlarla ilişkisini gösteren yeni bir teori ortaya atmışlardır (80). Diş esnekliği; okluzal kuvvetler altında lateral veya aksiyel bükülme olarak tanımlanmaktadır. Dişlerde meydana gelen bu esneme, mine ve onu destekleyen dentin dokusunda çatlakların oluşmasına ve doku kaybıyla sonuçlanan hidroksiapatit kristalleri arasındaki bağların yıkılmasına neden olan çekme ve sıkıştırma kuvvetleri meydana getirir (90). Dişlerde görülen abfraksiyon lezyonlarının dişin uzun aksına yüklenen okluzal kuvvetlerin eksentrik olarak yayılmasının bir sonucu olduğu düşüncesi (*tooth flexure theory)* vardır. Bu teoriye göre parafonksiyonel kuvvetler, bir veya birkaç dişi güçlü gerilme, sıkıştırma ve kesme tipi kuvvetlere maruz bırakmaktadır. Okluzal kuvvetlere bağlı deformasyonlar servikal bölgelerde gerilme ve sıkıştırma kuvvetleri oluştururlar (80). Lee ve Eakle'a göre bu gerilme kuvvetleri çürüksüz servikal lezyonların etyolojisinde primer rol oynamaktadır (91).

2.3.4.2. Abfraksiyon Lezyonlarının Klinik Görünümü

Abfraksiyon lezyonları genellikle keskin kenarlı, pürüzsüz ve kama seklinde yüzeyler olarak görülürler. Bu lezyonlar tek bir dişte oluşabildiği gibi bazen birkaç dişte de gözlenebilir (90).

2.4. DİŞ AŞINMALARININ VE KÖK ÇÜRÜKLERİNİN TEDAVİLERİNDE KULLANILAN RESTORATİF MATERYALLER

Diş aşınmalarının restorasyonunda pek çok farklı materyal ve teknik kullanılmaktadır. Yapılan restorasyon ile dişin dayanıklılığının arttırılması, servikal bölgede oluşan stresin azaltılması, hassasiyetin engellenmesi, pulpanın korunması ve estetiğin sağlanması amaçlanmaktadır (92).

Servikal lezyonların tedavisinde restoratif materyal olarak geleneksel tipte cam iyonomer simanlar, rezin modifiye cam iyonomer simanlar, poliasit modifiye kompozit rezinler (kompomer) ve farklı türde ve oranda doldurucu partikül içeren kompozit rezinler tercih edilmektedir (81).

2.4.1. Geleneksel Cam İyonomer Simanlar (GCİS)

Wilson ve Kent tarafından 1969 yılında formüle edilen ve diş hekimliğine yeni bir materyal olarak sunulan cam iyonomer siman 1970'lerde McLean ve Wilson tarafından geliştirilmiştir (93). Cam iyonomer siman, yapısında flor içeren ve dişlere fizikokimyasal olarak bağlanabilen bir materyaldir. Yüksek düzeyde flor iyonu salabilme özelliğine sahip bu materyal, diş hekimliğinin birçok alanında (kaide materyali, yapıştırıcı siman, restorasyon materyali olarak) kullanılmaktadır. Bu materyal o günün şartlarında silikat simanın dişle gösterdiği renk uyumu ve florid salımı, polikarboksilat simanın dişlere bağlanabilme (şelasyon) özelliğinin birleştirilmesi düşüncesiyle üretilmiştir (94).

Cam iyonomer simanlar genellikle toz ve likitten oluşan iki komponentli sistemler olup, likitindeki poliakrilik asit ile tozunda bulunan aliminyum fluorosilikat camı arasındaki kimyasal reaksiyon sonucu ‘‘tuz’’ formasyonu ile oluşmaktadır (93). Polimerizasyon olayı, poliakrilik asitle siman tozunun karıştırılması sonrası tipik bir asit baz reaksiyonu şeklinde gerçekleşir. Sertleşme esnasında poliakrilik asitin hidratize protonları, cam partiküllerinin yüzeyine girerler. Burada katyonlar (Al^{+3}, Ca^{+2}) yer değiştirir ve kitle bir hidratize silikat-jel' e dönüşür. Katyonlar basit ya da flor kompleksleri halinde ortamda çözünürler ve bu iyonlar sulu polielektrolit fazına geçerek, poliakrilik asit zincirlerinin karboksilat iyonları arasında köprüler oluştururlar. Bu poliakrilik asit zincirleri bir ağ yapısı halini alır ve sulu fazın jel şekline dönüşmesini sağlarlar. Bunun sonucunda çözünmeyen bir jel-matriks oluşur. Gerçek bir cam iyonomer simanda, bu reaksiyon birkaç dakika gibi klinik olarak kabul edilebilir bir sürede oluşmaktadır. Bu simanlar neme hassas olmaları nedeniyle sertleşmeleri sırasında mutlaka hava ve tükürükten izole edilmelidirler (95).

Cam iyonomer siman diş yapısına doğrudan kimyasal bağlar ile tutunabilen tek restoratif materyaldir. Bağlanma olayı, poliakrilik asitin diş yüzeyini yumuşatması ve poliasit zincirlerinin mine ve dentin yüzeyinde bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarıyla yer değiştirmesi sonrası gerçekleşir. Materyal içerisine kalsiyum ve fosfat iyonlarının geçmesiyle asit tamponlanır, pH yükselir ve böylece diş ve materyal arasında iyon etkileşimli yeni bir yüzey oluşur (94).

Cam iyonomer simanların *in vitro* bağlanma kuvveti diğer materyallere oranla düşük bulunmakla birlikte klinik uygulamada ağız içi retansiyonlarının iyi olduğu gözlenmiştir (95). Bazı çalışmalarda geleneksel cam iyonomerin, rezin modifiye cam iyonomer ve kompozit dolgu materyaline göre daha fazla mikrosızıntı gösterdiği bildirilmiştir (96). Ayrıca rezin

modifiye cam iyonomer (RMCİ) ile kıyaslandığında, klinik performans (marjinal adaptasyon, anotomik form ve sekonder çürük) açısından daha az başarılı olduğu vurgulanmıştır (97). Kırılma ve abrazyona direncinin yetersiz ve estetik özelliklerinin zayıf olması nedeniyle kullanım alanı sınırlıdır (96).

2.4.2. Rezin Modifiye Cam İyonomer Simanlar (PMCİ)

Cam iyonomer simanların yapısına kompozit rezinlerin bazı özelliklerinin katılmasıyla rezinle modifiye cam iyonomer simanlar geliştirilmiştir (98).

Rezin-modifiye cam iyonomer simanlar, geliştirilmiş adeziv özellikleri, radyoopak oluşu, florid salım özelliği, diş dokuları ile biyolojik uyumu ve kimyasal bağlantı yapabilmesi, kolay hazırlanması gibi özelliklerinden dolayı yaygın kullanım alanı bulmaktadır (90). Fiziksel özellikleri açısından geleneksel cam iyonomer simanlar ile kompozit rezin materyallerin arasında yer aldıkları bildirilmektedir (99). Rezin iyonomer ya da hibrid iyonomer olarak isimlendirilen bu simanlar toz/likit veya kapsül formlarında kullanıma sunulmuştur. Kimyasal olarak ve ışıkla polimerize olan tipleri vardır. Diş dokusuna adezyon, hem kimyasal hem de mikromekanik olarak gerçekleşmektedir. Geleneksel cam iyonomer simanlarda olduğu gibi simanın karıştırılmasından hemen sonra asit-baz reaksiyonu başlar ve ışık uygulanmasından sonra da yaklaşık 24 saat devam eder. Buna ilave olarak, bu materyaller, açığa çıkmış kollajen ağına ve/veya mineye Hidroksietil metakrilat (HEMA) gibi monomerlerin penetre olmasıyla mikromekanik olarak bağlanırlar (95).

2.4.3. Poliasit Modifiye Kompozit Rezinler (PMKR)

Kompozit rezin materyallerden flor iyonu salınımının gerçekleşmesi oldukça güçtür. Bunu mümkün hale getirmek için kompozit rezinler poliasitle modifiye edilmişlerdir. Kısaca kompomer olarak da adlandırılan poliasit modifiye kompozit rezinler yapılarında 2 karboksil gruplu dimetakrilat monomerler ve geleneksel cam iyonomer simanlardaki iyon salabilen cama benzer doldurucular içerirler. Işıkla polimerize edilebilmeleri ve uygulama kolaylıkları nedeniyle tercih edilmektedirler. Poliasit modifiye kompozit rezinlerin fiziksel ve mekanik özellikleri, geleneksel ve rezin modifiye cam iyonomer simanlardan daha güçlü, ancak hibrid veya mikrofil kompozit materyallerden daha zayıftır. Ayrıca, kompomerlerin florür salma yetenekleri oldukça sınırlıdır (80).

2.4.4. Kompozit Rezinler

Estetik dolgu maddesi olan kompozit rezinler silikat cam partiküllerin polimerize olabilen bir akrilik monomer ile karışımından oluşur ve bu materyallerin ortak özelliklerine sahip bir yapı meydana gelir. Silikat partiküller karışımın mekanik gücünü sağlar ve materyalde mine benzeri translüsensi sağlayan ışık geçirgenliği ve ışık saçılmasına neden olur. Akrilik monomerler ise materyalin kaviteye yerleştirilebilmesini ve şekillendirilebilmesini sağlar (80, 98).

Bu materyallerin avantajları, civa içermedikleri için toksik olmamaları, diş dokularına bağlanabilme yeteneklerinin olması, kenar sızıntılarının azalmış olması, çürük temizlendikten sonra geriye kalan diş dokularını desteklemeleri ve restorasyonun tek seansta tamamlanmasıdır. Bununla birlikte, en çok kullanılan estetik restoratif materyallerden biri olan kompozit rezinlerin en büyük dezavantajı polimerizasyon esnasında gösterdikleri büzülmedir (100).

2.5. BİYOUYUMLULUK

Biyouyumluluk, canlı dokularla temasta olan herhangi bir materyalin antijenik, allerjik, toksik, mutajenik veya karsinojenik etki yapmaması (inert), vücudun yumuşak ve sert dokularında olumlu yönde doku reaksiyonları oluşturması (biyoaktif etki) olarak ifade edilir. Biyouyumlu maddelere genel olarak biyomateryal denir (101).

Biyouyumluluk için; malzemenin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku ile temasının şekli, yeri ve dokunun özellikleri gibi pek çok faktörün bir arada uyum içinde olması gerekmektedir. Biyolojik uyumu olmayan malzemeler değişik doku reaksiyonlarına neden olurlar (102,103).

Materyallerin dokularla etkileşimi normal metabolizmayı ve fizyolojik süreçleri değiştirebilir. Bu etkileşimler fiziksel veya kimyasal olabilir, hücrelerde yıkımın ilerlemesi ile ölüm ve nekroza yol açabilir. Herhangi bir ajan tarafından hücrelere ve dokulara olan hasarın üç aşaması vardır. Kronolojik olarak sıralandığında bunlar (1) biyokimyasal lezyon, (2) fonksiyonel lezyon ve (3) morfolojik lezyondur. Hasarın bir örneği iskemi (dolaşımın ve oksijenin akut kaybı) sonucu oluşan doku enfarktüsüdür. Hücrelere sağlanan O_2 ‘de azalma, oksidatif fosforilasyonun ve adenozin trifosfat (ATP) üretiminin saniyeler ve dakikalar içinde baskılanmasıyla sonuçlanır (biyokimyasal lezyon), ardından hücre membranının sodyum pompasının fonksiyonu azalır. Pompanın başarısızlığı su ve sodyum retansiyonu ile hücresel

şişme ve fonksiyonda azalma ile sonuçlanır (örnek olarak azalan protein sentezi veya mobilite [fonksiyonel lezyon]). Sonuç olarak hücre ve çekirdek membranlarının bütünlüğü kaybolur ve lizozomal enzimler açığa çıkar (morfolojik lezyon ve nekroz). Bu kimyasal ve fiziksel hasarlar inflamatuar reaksiyonlar, immunolojik reaksiyonlar ve tamir olarak sınıflandırılan bir dizi bağ dokusu değişikliklerine yol açar (101).

2.5.1. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besi yeri ile cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir (104).

Hücre ve doku kültürlerinin kullanılması ile son yıllarda moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi, teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, hücre metabolizmasının organizmanın ölümünden sonra bir süre daha devam ettiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (105).

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretilmesini ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik konumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır. Besleyici sıvılar, hayvan embriyo ekstratları, plazma ve serum, amino asit, mineraller, şeker, tuz, vitamin ve antibiyotikleri içermektedir (106).

Hücre ve doku kültürü üretmek için kullanılan vasatlarda, hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması bazı belli maddelerin varlığı ile sağlanabilmektedir. Hücre, bu maddeleri diğer moleküllerden kendi sentezleyememekte ve bu gerekli maddeler ortama ilave edilen vasatlardan sağlanmaktadır. Vasatlar, doğal ve sentetik materyallerin çeşitli kombinasyonlarını kapsamaktadır. Hücre üretme vasatları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta, genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltılabilmelerinin koşulu, oluşturulacak ortamın *in vivo* ortamdakine benzerliğine bağlıdır (104). Hücreler günümüzde rutin olarak kültüre edilmektedirler. Vasat içerisinde; enerji kaynağı olarak glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır (104, 105).

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi, deneylerde kullanılacak hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir (106). Buna karşın, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksisite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir (107).

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri üç grupta toplanır (108):

1. Primer hücre kültürleri,
2. Devamlı hücre kültürleri,
3. Diploid hücre kültürleri.

Primer hücre kültürleri, orijinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücreleri içerir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşır. Ancak; bu hücrelerin deneysel çoğalmaları sınırlıdır. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınırlar. Bu işleme subkültür adı verilir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluştururlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişmek şartıyla, değişen oranlarda subkültüre izin verirler.

Devamlı hücre kültürleri, subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Diploid hücre kültürleri, primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilir. Ancak; bu kültürdeki bütün hücreler alındıkları dokunun karyotipini %85 oranında korurlar. Diploid kültürlerde bazı hücrelerde kromozom tipleri kaybolabilir (106).

Primer hücrelerin, devamlı hücrelere oranla sitotoksisitesinin değerlendirilmesinde daha etkili olacağı görülmektedir. Ancak; primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevapta bazı farklılıklar olmaktadır. Devamlı hücre kültürlerinin genetik ve metabolik stabiliteleri nedeniyle test sonuçlarının standardizasyonunda kolaylık sağlanmaktadır.

Dental malzemelerin biyolojik uyumunun saptanmasında kullanılan hücre kültürü teknikleri organ veya doku bağlantısını temsil etmez. Dental dokulara ait kültürler, bağımsız üniteler

olarak morfolojileri, deoksiribonükleik asit (DNA) ve protein sentezleri ile tek tek hücreler olarak değerlendirmede kullanılırlar (103, 106).

L929 ve Balb3T3 devamlı hücre kültür hatları; dental malzemelerin sitotoksisite testlerinde standart olarak kullanılan fibroblast hücre kültürleridir (106).

2.5.1.1. Hücre Kültürlerinin Avantajları

1. Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak bir takım testleri yapmak daha zordur.

2. Örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelmektedirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da çalışan kişilerin standardizasyonu ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır.

3. Hücre kültürleri ekonomiktir. *İn vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak % 10'una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90'lara çıkabilmektedir.

4. Hücre kültürleri ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilmektedir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu daha kolay hale gelmiştir (104, 105).

2.5.1.2. Hücre Kültürlerinin Dezavantajları

1. Primer kültür ile başlandığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.

2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.

3. Deneyim çok önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskobik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.

4. Hücre kültürleri, *in vivo* yöntemlere oranla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece pahalıdırlar. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (104, 105).

2.5.1.3. Hücre Kültürü Test Yöntemleri

Dental malzemelerin sitotoksisitesi, *in vitro* koşullarda genel olarak beş şekilde belirlenmektedir (103, 106):

1. Hücre sayısı ve büyüme testleri,
2. Mitotik aktivite (koloni oluşturma etkinliği) testleri,
3. Oksijen alımında ve glikoz metabolizmasındaki değişikliklerin saptanması,
4. Membran bütünlük testleri,
5. Enzim aktivitesi testleri.

Hücre kültürleri kullanılarak dental malzemelerin biyolojik uyumlarının belirlenmesi için çok sayıda *in vitro* test yöntemi kullanılmaktadır. Ancak; FDI ve ISO teknik raporlarında önerilen *in vitro* test yöntemleri şunlardır(109);

a) Agar difüzyon test yöntemi,
b) Agarose test yöntemi,
c) Milipore filtre test yöntemi,
d) Krom salınım test yöntemi,
e) Model kavite test yöntemi,
f) Diş kavite test yöntemi,
g) MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Test Yöntemi
h) XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) Test Yöntemi
i) WST-1 (Suda Çözünen Tetrazolyum Tuzları) Test Yöntemi olarak belirtilmiştir.

2.5.1.3.1.Agar Difüzyon Test Yöntemi

Agar difüzyon testi katı malzemelerin ve katı malzemelerden sızan komponentlerin ya da filtre kağıdına emdirilmiş sıvı örneklerin akut sitotoksisitesinin 24 saat süreyle belirlenmesinde kullanılır. Bir tabakalı hücrelere %1 agar ve vital boya ilave edilip test örneği agar tabakasının yüzeyine temasta olacak şekilde yerleştirilir. Agar hücreler ve materyal

arasında, agarın en üstte yer aldığı bir bariyer şekillendirir. Besinler, gaz ve çözülebilen toksik maddeler agar içine diffüze olabilirler (110).

Agar difüzyon testinde sitotoksisitenin etkinliği toksik maddelerin difüzyon bölgelerindeki hücrelerde yol açtığı boya kaybıyla gösterilebilmektedir. Hücrelerin erimesi (lizis), difüze olan toksik maddelerin konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgelerde izlenebilir (109, 110).

Sitotoksik cevap, renk değiştiren bölgedeki difüzyon büyüklüğüne bağlı olarak eriyen bölgedeki hücrelerin yüzdesinin belirlenmesine yönelik, hücre erime indeksi (Lizis indeks) ile değerlendirilmektedir. Mikroskobik olarak yapılan bu değerlendirmede faz-kontrast mikroskobunda hücre erimesi olan bölgelerin çapları belirlenir (106, 109).

Tablo 2.2: Hücre erime indeksi(106)

Hücre erime indeksi	
0	Görülebilir bir erime yok
1	Alan çapının %20'sinde erime var
2	Alan çapının %20 - 40'ında erime var
3	Alan çapının %40 - 60'ında erime var
4	Alan çapının %60 - 80'inde erime var
5	Alan çapının %80 ve fazlasında erime var

Tablo 2.3:Hücre erime indeksi skorlarına göre sitotoksik etkinin şiddetinin belirlenmesi (106):

0 - 0,5:	Sitotoksik değil
0,6 - 1,9:	Hafif sitotoksik
2,0 - 3,9:	Orta derecede sitotoksik
4,0 - 5,0:	Şiddetli sitotoksik

Agar difüzyon testleri ve mitokondrial aktiviteyi gösteren MTT testleri malzemelerin sitotoksisitesini belirlemeye yönelik en güvenilir testlerdir (110).

2.5.1.3.2.Agarose Test Yöntemi

Hensten-Pettersen, 1973 yılında Wilsnack ve arkadaşları tarafından agar difüzyon test yöntemine benzer olan agarose test yönteminin tanıtıldığını belirtmişlerdir. Araştırıcılar materyallerin agarosedaki difüzyon yeteneğinin daha yüksek olduğunu bildirerek, agar difüzyon test yönteminin daha hassas şekilde uygulanabilmesi için, agar yerine agarose kullanılması gerektiğini öne sürmüşlerdir (111).

2.5.1.3.3.Milipore Filtre Test Yöntemi

İn vivo ortamda hücreler ve test edilecek malzeme arasında, genellikle direkt temas bulunmamaktadır. Keratinize epitel, dentin veya ekstraselüler matriks direkt teması engellemektedir. Bu durumda *in vivo* koşulları tam anlamıyla oluşturabilmek için bazı *in vitro* bariyer testleri geliştirilmiştir. Böylece materyallerden açığa çıkan herhangi bir maddenin hücreler üzerinde toksik etki oluşturabilmesi için 0,45 ml' lik filtre porlarının içine difüze olması gerekmektedir (111, 112).

Selüloz esterlerinden yapılmış filtre üzerine hücrelerin tek tabaka halinde yapışması sağlandıktan sonra hücre kültür ortamı % 1 agar içeren ortam ile değiştirilmekte ve bu ortamın hücreler üzerinde jel haline gelmesi beklenmektedir. Ardından filtre-hücre tabakası-agardan oluşan üçlü yapı ters çevrilerek filtrenin üstte kalması sağlanmaktadır. Katı veya çözülebilen test örneği filtre üzerine yerleştirilerek belirlenen test süresi boyunca beklenmektedir. Bu test yönteminde değerlendirme; hücre ve materyalin temas bölgesinde ve boyanan alanın koyuluk değeri, çapı ve genişliği göz önüne alınarak yapılmaktadır (106, 111).

Milipore filtre test yöntemi, özellikle katı ve pat yapısındaki materyallerin test edilmesinde kullanılmakta, likitler de bu yöntemle değerlendirilebilmektedir. Sıvı materyallerin test edilmesi için materyalin 0,1 ml'si selüloz bir diske emdirilerek milipore filtre üzerine yerleştirilmelidir (105, 111).

2.5.1.3.4.Krom Salınım Yöntemi

Bu yöntemle likit ve katı yapıdaki materyallerin sitotoksisitesi değerlendirilmektedir. Bu amaçla hücreler sodyum kromat ($Na_2Cr^{51}O_{4)}$ ile işaretlenmektedirler.

$Na_2Cr^{51}O_4$ içerisindeki hekzavalent kromiyum (Cr^{51}), hücrelerin içine girdikten sonra hücre proteinleri ile hücresel yapılara tutunmakta ve trivalent forma dönüşmektedir. Hücrelerin işaretlenmesinden sonra, hücre ve materyaller direkt temas halinde 4-24 saat süreyle inkübe edilmektedir. Hücrelerin ölümü, hücre zarı geçirgenliğini değiştirdiğinden trivalent formdaki

Cr^{51} hücre dışına çıkmaktadır. Hücre dışına çıkan Cr^{51}' in radyoaktivitesinin ölçülmesiyle hücre ölümü konusunda net ve kesin bir sayı elde edinilmekte, ancak bu yöntemle hücre ölümünü takiben gelişen subletal değişiklikler ölçülememektedir. Aynı test yöntemi, hücreler ^{3}H-Thymidine ile işaretlenerek de gerçekleştirilmektedir (111, 113).

2.5.1.3.5.Model Kavite Test Yöntemi

Bu yöntemde, polimetil metakrilattan hazırlanmış kavite modelinde, kavite tabanına bir filtre ya da dentin tabakası yerleştirilmekte ve hücre kültürleri bu tabakanın altında üretilmektedir. Materyalin toksisitesi, sırasıyla lizozomal ve mitokondrial enzim işaretleyicileri olan asit fosfataz ve süksinat dehidrogenaz analizi ile yapılmaktadır (105, 111).

2.5.1.3.6. Diş Kavite Test Yöntemi

Restoratif materyallerin kimyasal toksisitesini saptamak amacıyla kullanılmaktadır. İlk basamakta, dentine uygulanan materyallerden toksik maddelerin difüzyonu belirlenmektedir. Genellikle 3. molar dişlerin çekimini takiben dişler fosfat tamponlu salinde 3–4 saat bekletilmektedir. Normal kavite ya da kron preparasyonundan sonra sistem dentin duvarına penetre olabilen solüsyonlarla uygulanmaktadır. Bu yöntemin *in vivo* verilerle uyumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir (105, 111).

2.5.1.3.7.MTT Test Yöntemi

Sitotoksisite çalışmalarında en sık kullanılan in vitro enzimatik test MTT' dir. MTT testini ilk Mosmann kullanmıştır. MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu test mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçer. MTT'nin ana bileşeni 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromid'dir. Çözdürülen MTT sarı renklidir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri MTT' nin tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristallerini oluştururlar (114). Bu kristaller asitlendirilmiş izopropanol içinde çözünürler. Sonuçta elde edilen mor solüsyon spektrofotometrik olarak ölçülür. Hücre sayısındaki artma veya azalma, hücre sayısıyla bağlantılı olarak oluşan formazan miktarında değişmeye neden olur (115). Spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen değer test edilen malzemenin toksisitesini belirler. Bu yöntem diğer sitotoksisite test yöntemlerine göre çok daha hassastır ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Ayrıca uygulaması kolay ve hızlı bir metottur (116).

2.5.1.3.8. XTT Test Yöntemi

Sitotoksisitenin değerlendirilmesi için XTT içeren tetrazolyum tuzlarının kullanımından, radyoaktivitenin engellenmesi, hızlı ve hassas bir yöntem olması, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi ve pratik bir yöntem olması nedeniyle, birçok araştırma merkezinde yararlanılmaktadır. Tetrazolyum tuzlarının formazana dönüşümü metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi aracılığıyla meydana gelmektedir. Reaksiyon temel olarak mitokondrial enzimler ve elektron taşıyıcılar tarafından yönlendirilmektedir. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT, reaksiyon sonrası suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm' de ELİSA okuyucuda değerlendirilir. XTT'nin etkin bir şekilde indirgenmesi ve doğru, pratik bir değerlendirme yapılabilmesi için bir elektron transfer ajanı gereklidir. MTT gibi çözünme safhaları içermeyen bu test, günümüzde hücre proliferasyon ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksisite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (117, 118).

2.5.1.3.9. WST-1 Test Yöntemi

Sitotoksik ve sitostatik bileşiklerin analizinde ve hücre büyümesini inhibe eden antikor ve fizyolojik mediatörlerin değerlendirilmesinde kullanılan bu prosedürde WST-1 tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondrial respiratuar zincirde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilen formazan boyasına dönüştürülmektedir. Bu yöntemde bir örnekteki bu mitokondrial dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla yükselmektedir. Enzimin aktivitesinin artması, kültür medyumundaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısıyla direkt ilişkili olarak formazan boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden olmaktadır. Bu dönüşüm esnasında ise ELİSA okuyucu kullanılarak absorbsiyon sayılabilir hale gelmektedir (117, 118).

Hücre kültürü test yöntemleri laboratuar koşullarında kesin kurallar dahilinde gerçekleştirilebilmektedir. Bu nedenle kontrol edilebilme olanakları yüksektir ve tekrarlanabilme özellikleri vardır. Ayrıca sonuçlar daha kısa sürede alınabilmektedir. Ancak sitotoksisite testleri, ilk 12-24 saat içerisinde toksik madde ile temasa bağlı olarak oluşan sınırlı etkileri belirleyebilir. Konak hücreler ya iyileşirler ya da kimyasal yaralanmaya bağlı olarak ölürler. Buna karşın *in vivo* biyolojik reaksiyonların çoğu basit bir sitotoksisite değildir ve 24 saat boyunca yayılırlar, enflamatuar ve immun reaksiyonlar gelişir (103). Bu nedenle malzemeye olan öncül tepkiler belirlendikten sonra malzemenin uzun dönem kullanımı

sonrasında oluşacak enflamasyon, immun cevaplar, mutagenez ve karsinogenez gibi subakut toksisite değerlerini yansıtan ikincil testler denenmelidir (119).

Hücre kültür metotları farklı dental materyallerin toksisitelerini karşılaştırmada kullanılabilirler. Ancak, gözlemlenen toksisitenin nedenini belirleyemezler (110).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada üç farklı dolgu materyaline fare fibroblastlarının ataşmanı ve proliferasyonunun incelenmesi ve bu dolgu materyallerinin sitotoksisite özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Fibroblast ataşmanı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), fibroblast proliferasyonu MTT yöntemi ve sitotoksisite de Agar difüzyon test yöntemi ile değerlendirildi. Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuarları'nda, Cumhuriyet Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuarları'nda, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'nde ve Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütüldü. Hücre kültürü ortamının hazırlanmasında, Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) tarafından hazırlanan 10993–5 no'lu 'Sitotoksisite Testleri-*İn Vitro* Yöntemler' bölümü rehber alındı. Bu çalışmada üç farklı dolgu materyalinin yüzey ataşmanının ve sitotoksisitelerinin değerlendirilmesinde şu işlemler takip edilmiştir:

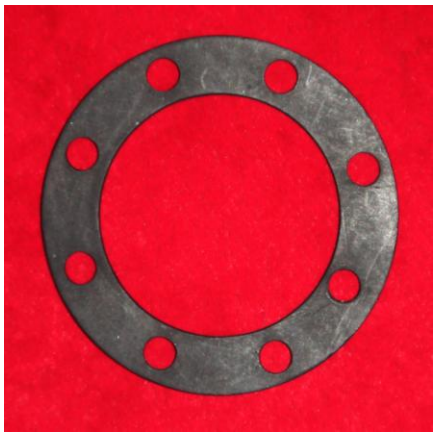
- Örneklerin hazırlanması,
- Hücre kültürü,
- Mikroplatelerin hazırlanması,
- MTT testi ile fibroblast proliferasyonunun değerlendirilmesi,
- Sitotoksisite testinin yapılması,
- SEM incelemesidir.

3.1. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Çalışmada kullanılan dolgu materyalleri ve üretici firmalar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Kullanılan dolgu materyallerinden (MTT testi için 10, sitotoksisite testi için 10 ve SEM incelemesi için 3 adet) 23'erli 3 grup olmak üzere toplam 69 adet örnek, üretici firma talimatlarına uygun olarak 6 × 2 mm boyutlarında hazırlandı. Uygulanacak testlerde standardizasyonun sağlanması amacıyla, çalışmada kullanılan dolgu materyallerinden disklerin hazırlanmasında ISO 10993-5 standardına uygun olarak bir adet silindirik teflon kalıp iki cam tabakası arasına sıkıştırılarak kullanıldı. Teflon kalıpların üzerinde dolgu materyalinden her seferinde 8 adet disk hazırlayabilmek için 6 × 2 mm boyutlarında boşluklar bulunmaktadır (Resim 3.1).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan dolgu materyalleri

Dolgu Materyali	**Simanların İçerikleri**	**Üretici Firma**
Ketac Molar Quick Aplicap	Al-Ca-La florosilikat cam, % 5 kopolimerasit(Akrilik ve maleik asit), polialkenoikasit, tartarikasit, su.	3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya
Photac Quick	Na-Ca-Al-La-florosilikat-cam, Aktivatör (Amin), Cam iyonomer monomerler ve oligomerler, Copolimer asitler (akrilik ve maleik asitler), Kamforokinon, Stabilizörler, Su	3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya
Dyract Extra	Bisfenol-A,dimetakrilat, üretan rezin, Tetraetileneglikol Dimetakrilat (TEGDMA), Trimetilolpropan trimetakrilat (TMPTMA), kamforokinon, dimetilaminbenzoik asit etil	Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan teflon kalıp

3.1.1. Cam İyonomer Siman Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada cam iyonomer siman olarak Ketac Molar Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya) kullanıldı (Resim 3.2.). Kapsül formundaki cam iyonomer siman oda sıcaklığında üreticinin talimatına göre hazırlandı. Elde edilen karışım 6 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde teflon kalıplara yerleştirildi. Daha sonra bu örnekler yüzeyin düzgün olması için iki siman camı arasında sıkıştırıldı. Teflon kalıplardan taşan fazla cam iyonomer siman uzaklaştırıldı ve kimyasal olarak sertleşen materyal kalıplar içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra çıkartıldı. Örnek diskler tamamlandıktan sonra fazlalıklar, mikromotor kullanılarak elmas frezlerle alındı ve konturlar düzeltildi. Daha sonra Sof-Lex (3M-Espe, Amerika) diskleri ile düşük devirde mikromotor yardımıyla hafif basınç altında 30 sn süreyle polisaj yapıldı. Hazırlanan bu örnekler CIS grubu ismi altında kullanıldı.



Resim 3.2. Ketac Molar Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya)
Cam iyonomer siman dolgu materyali

3.1.2. Rezin Modifiye Cam İyonomer Siman Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada rezin modifiye cam iyonomer siman olarak Photac Fil Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya) kullanıldı (Resim 3.3.). Kapsül formundaki rezin modifiye cam iyonomer siman oda sıcaklığında üreticinin talimatına göre hazırlandı. Elde edilen karışım 6 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde teflon kalıplara yerleştirildi. Daha sonra bu örnekler yüzeyin düzgün olması için iki siman camı arasında sıkıştırıldı. Teflon kalıplardan taşan fazla poliasit modifiye rezin kompozit uzaklaştırıldı ve 10 sn süreyle ışıkla (Monitex Fomed Bluelex LD-105, Tayvan, >800mW/cm^2) sertleştirildi. Örnek disklerin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra fazlalıklar, mikromotor kullanılarak elmas frezlerle alındı ve konturlar düzeltildi. Daha sonra Sof-Lex (3M-Espe, Amerika) diskleri ile düşük devirde mikromotor yardımıyla hafif basınç altında 30 sn süreyle polisaj yapıldı. Hazırlanan bu örnekler RMCIS grubu ismi altında kullanıldı.



Resim 3.3. Photac Fil Quick Aplicap (3M/ESPE GmbH, Seefeld, Almanya)
Rezin modifiye cam iyonomer siman dolgu materyali

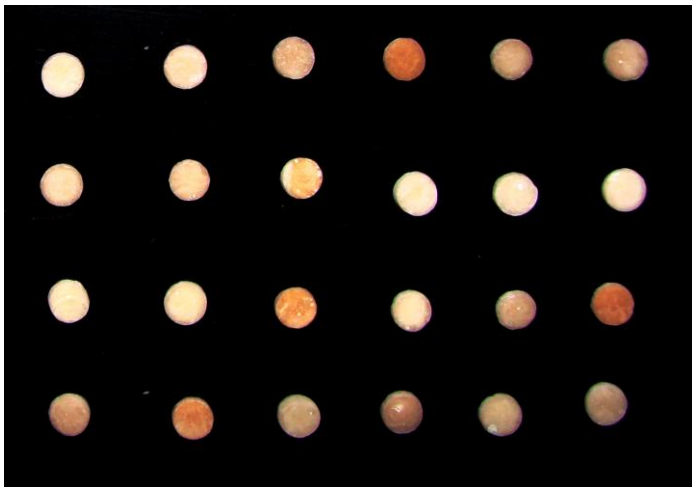
3.1.3. Poliasit Modifiye Rezin Kompozit Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada poliasit modifiye rezin kompozit olarak Dyract Extra (Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) kullanıldı (Resim 3.4.). Kapsül formundaki poliasit modifiye rezin kompozit oda sıcaklığında üreticinin talimatına göre hazırlandı. Elde edilen karışım 6 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde teflon kalıplara yerleştirildi. Daha sonra bu örnekler yüzeyin düzgün olması için iki siman camı arasında sıkıştırıldı. Teflon kalıplardan taşan fazla poliasit modifiye rezin kompozit uzaklaştırıldı ve 10 sn süreyle ışıkla (Monitex Fomed Bluelex LD-105, Tayvan, >800mW/cm^2) sertleştirildi. Örnek disklerin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra

fazlalıklar, mikromotor kullanılarak elmas frezlerle alındı ve konturlar düzeltildi. Daha sonra Sof-Lex (3M-Espe, Amerika) diskleri ile düşük devirde mikromotor yardımıyla hafif basınç altında 30 sn süreyle polisaj yapıldı. Hazırlanan bu örnekler PMKR grubu ismi altında kullanıldı.



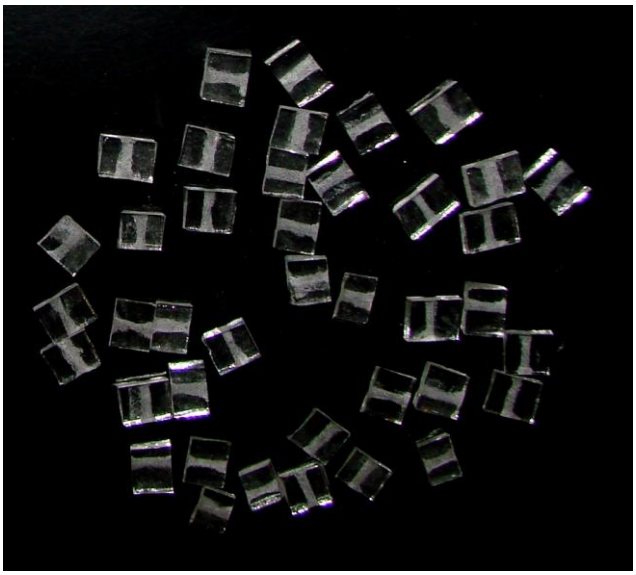
Resim 3.4 Dyract Extra (Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) Poliasit modifiye rezin kompozit dolgu materyali



Resim 3.5. Örnek diskler

3.1.4. Cam Örneklerin Hazırlanması

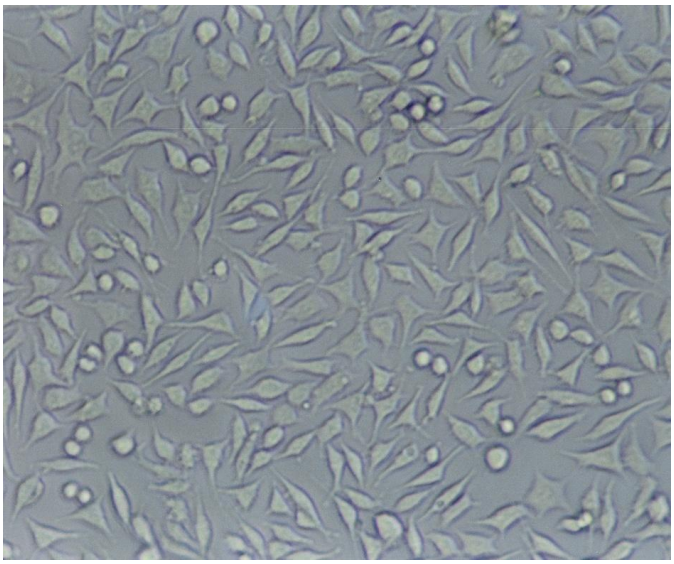
Cam örnekler 2 mm kalınlığındaki cam plakalar 6×5 mm boyutlarında diktörtgen parçalara bölünerek hazırlandı. Çalışılan yüzeyin karıştırılmaması için bir yüzeye elmas round frez ile çentik açıldı (Resim 3.6). Hazırlanan bu örnekler kontrol grubu olarak kullanıldı.



Resim 3.6. Cam kontrol örnekleri

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Araştırmada hücre kültürünün oluşturulmasında L929 fare fibroblast hücre serisi (ŞAP Enstitüsü) kullanıldı (Resim 3.7). Hücreler saklama ortamı olan -80° C' den çıkartılarak 37° C' deki su banyosunda kısa sürede çözdürüldü.



Resim 3.7. L929 fibroblast hücrelerinin inverted ışık mikroskobunda görünümleri

Hücre kültüründe kullanılacak besi yeri, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine penicilin-streptomycin, L-glutamin ve Fetal bovine serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı (Tablo 3.2, Resim 3.8). Çözdürülen hücreler besi yeri ortamı ile hücre kültürü üretme kaplarına (flask) alındı (Resim 3.9).

Tablo 3.2. Hücre kültür ortamının oluşturulmasında kullanılan malzemeler

Hücre kültür ortamı	**Kullanılan miktar**	**Firma**	**Lot. No.**
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	100 ml.	Biological Industries, Israel	843064
Penicilin – Streptomycin (1000 U/10000 Mg/ml)	1 ml	Sigma Aldrich, Germany	028K2400
L-glutamin	1 ml	Biological Industries, Israel	709682
Fetal Bovine Serum (FBS)	4 ml	Biological Industries, Israel	316724



Resim 3.8. Hücre kültür ortamının oluşturulmasında kullanılan malzemeler



Resim 3.9. Flask'ta besiyeri ortamı ile fibroblast hücreleri

Hücrelerin üremeleri ve flask yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları inverted ışık mikroskobu (Nikon ECLIPSE TS 100, Japonya) (Resim 3.10) kullanılarak kontrol edildi ve yüzeyi tamamen kapladıklarında kültür kabındaki besi ortamı aspire edildi. FBS içermeyen DMEM ile hücreler yıkandıktan sonra Tripsin / etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (%0,05 trypsin + % 0,02 EDTA, Biochrom KG, Berlin, Almanya) ile çalkalandı. Daha sonra tripsin aspire edildi ve hücreler 37 °C'deki inkübatörde (Heracell, Almanya) 5 dakika inkübasyona bırakıldı ve tripsinizasyon işlemi tamamlandı (Resim 3.11, Resim 3.12).



Resim 3.10. Inverted ışık mikroskopu



Resim 3.11. Tripsin/EDTA solüsyonu



Resim 3.12. İnkübatör

Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları görüldü. DMEM ilave edilerek hücre süspansiyonu oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonu flasklara bölünerek pasajlandı. Hücre kültür kaplarındaki hücre çoğalması izlenerek bu işlem tekrarlandı ve hücre kültür serisinin devamlılığı sağlandı.

Çalışmada L929 fibroblast hücre serisinin 6 ile 11. pasajlar arasındaki hücreleri kullanıldı.

3.3. MİKROPLATELERİN HAZIRLANMASI

Üç farklı dolgu materyalinden hazırlanan disk şeklindeki örnekler ve kontrol grubu örnekleri iki farklı zaman dilimine ait her örnek grubu için 10 kuyucuk kullanılarak mikroplate kuyucuklarına yerleştirildi.

Logaritmik üreme tarzında olan, aktif ve yüzeyi % 90–95 oranında kaplamış L929 hücreleri, pasajlama işleminde olduğu gibi tripsinizasyonla flask yüzeyinden kaldırıldı ve DMEM ilave edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 24 kuyucuklu hücre üretme kaplarına (mikroplate) her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu (~2×10^5 hücre/ml) olacak şekilde taksim edildi (Resim 3.13.).

Mikroplateler, 37°C'de % 5 CO_2'li inkübatörde hücrelerin disk yüzeylerine yapışması için 24 ve 72 saat inkübe edildi. 24 ve 72 saat sonunda her kuyucuktaki solüsyon aspire edildi ve tutunmamış hücrelerin uzaklaştırılması için fazla basınç uygulanmadan disk yüzeyleri 100 µl PBS ile yıkandı. Kuyucuklardaki PBS uzaklaştırıldıktan sonra MTT solüsyonu eklendi.

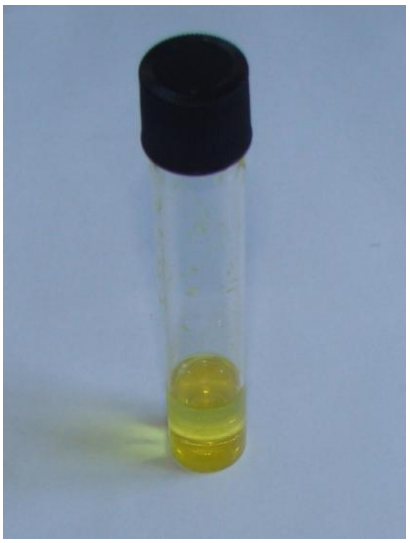


Resim 3.13. Mikroplatelerde üzerlerine hücre kültürü ekilmiş örnekler ile MTT solüsyonu

3.4. MTT TESTİ İLE FİBROBLAST PROLİFERASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

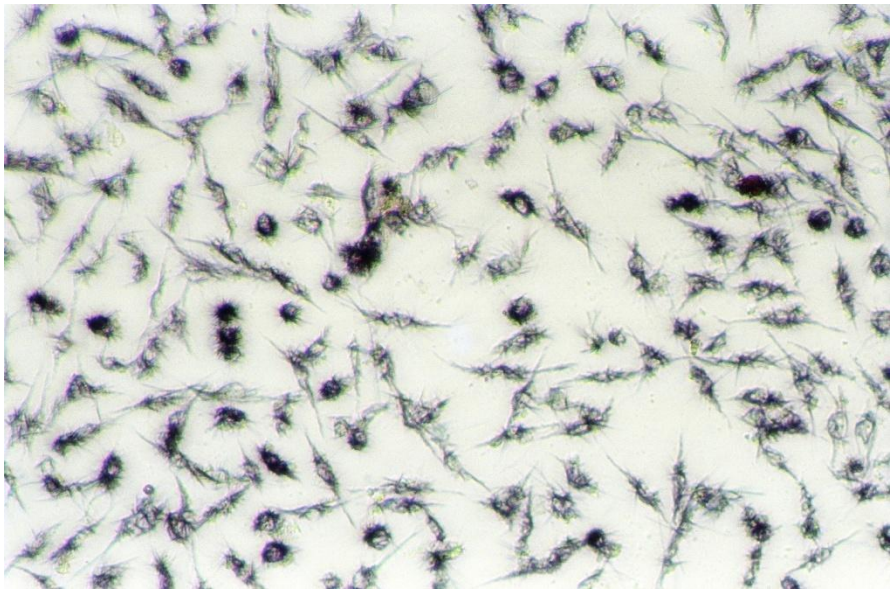
3.4.1. MTT solüsyonunun hazırlanması:

MTT (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, USA) fenol red içermeyen DMEM ile karıştırılarak homojenize edildi ve 5 mg/ml konsantrasyonunda MTT solüsyonu hazırlandı (Resim 3.14).



Resim 3.14. MTT solüsyonu.

Mikroplate üzerindeki her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edildi. Mikroplate kuyucuklarındaki hücreler karanlık bir ortamda, 37° C' de 4 saat süreyle inkübe edildi.



Resim 3.15. Formazan kristalleri.



Resim 3.16. ELISA okuyucusuna yerleştirilen mikroplate.

İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu içeren sıvılar aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa oda ısısında 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildi. Formazan kristallerinin (Resim 3.15) tamamen çözünmesi ile mavi/mor renge dönüşümünü takiben, kuyucukların içerisindeki diskler çıkartıldı. Daha sonra plateler ELISA okuyucusuna (Bio-tek EL 312, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA) yerleştirildi. Oluşan formazanın optik yoğunluğu 450 nanometrede okunarak belirlendi (Resim 3.16).

Optik okuyucudan elde edilen değerler aşağıdaki formüle konularak, test materyallerinin ayrı ayrı hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplandı.

$$\textbf{Hücre Proliferasyon Yüzdesi} = \frac{\textbf{A} - \textbf{B}}{\textbf{C} - \textbf{B}} \textbf{ X 100}$$

A: Test örneklerine ait kuyucuklardaki optik değerlerin ortalaması

B: Kör olarak kullanılan kuyucuklardaki optik değerlerin ortalaması

C: Pozitif kontrol grubuna ait değerlerin optik değerlerin ortalaması

3.5. SİTOTOKSİSİTE TESTİNİN YAPILMASI

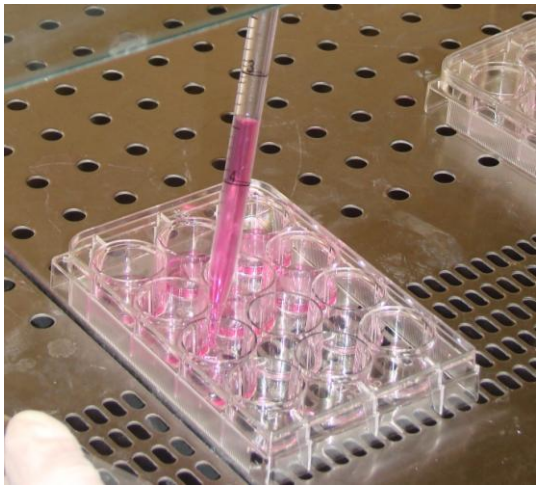
Bu çalışmada sitotoksisitenin değerlendirilmesi için Agar difüzyon testi kullanıldı. Agar difüzyon testinde agar tabakası bariyer olarak kullanılarak dolgu materyallerinden açığa çıkan sızıntı ürünlerinin, indirekt olarak oluşturabilecekleri toksik etkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Agar difüzyon yöntemi kullanılarak sitotoksisitenin belirlenmesinde ISO 10993-5 numaralı protokol takip edildi (106).

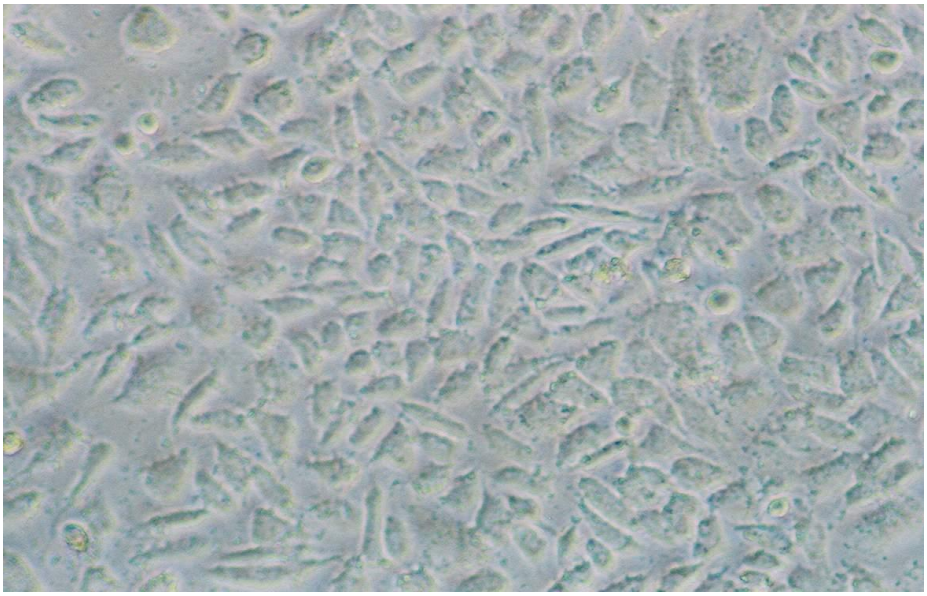
Her dolgu materyalinden hazırlanan 6×2 mm. boyutlarında 10 adet örnek ile çalışıldı. L929 hücreleri tripsinlenerek yapışık oldukları hücre kültür kabından kaldırıldı ve hücre süspansiyonu hazırlandı. Çapı 3,5cm olan hücre kültür petrilerine ortalama $2{,}5x10^5$ hücre/ml içeren hücre süspansiyonundan 1ml ilave edildi.

Logaritmik üreme fazının sonunda bulunan L929 hücrelerine 5ml tripsin çözeltisi (100ml % 2.5'luk tripsin ve 90ml 10 kez konsantre kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu

tuzlu su) konuldu ve bir dakika süreyle beklendi. Bu sürenin sonunda tripsin ortamdan uzaklaştırıldı ve kültür petrilerinin tabanında bulunan hücreler besi yeri ile yıkanarak ortama geçmeleri sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu bir erlenmayer kabına aktarıldı ve hücreler neubauer lamı ile ışık mikroskobunda sayıldı. Bu hücre süspansiyonu 250.000 hücre/ml olacak şekilde besi yeri ile seyreltildi ve pipet ile 12'li mikroplatelerin her bir kuyucuğuna 10'ar ml aktarıldı (Resim 3.17). Mikroplate içerisindeki hücreler 37° C' de ve %5 CO_2 içeren etüvde 24 saat bekletildi. Bekleme sırasında diğer taraftan % 3'lük agar çözeltisi hazırlandı ve 120° C' de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra bu çözelti su banyosunda 48° C' de soğumaya bırakıldı. Bu çözelti aynı su banyosunda 48° C' de ısıtılan çift konsantre besi yeri ile 1:1 oranında karıştırıldı. 24 saat sonunda mikroplateler etüvden alındı, içerdikleri besi yeri uzaklaştırıldı ve hazırlanmış karışımdan 10'ar ml her bir kuyucuğa aktarıldı. Hücrelerin üzerini kaplayan agar tabakasının soğuması için 30 dakika beklendi (Resim 3.18).

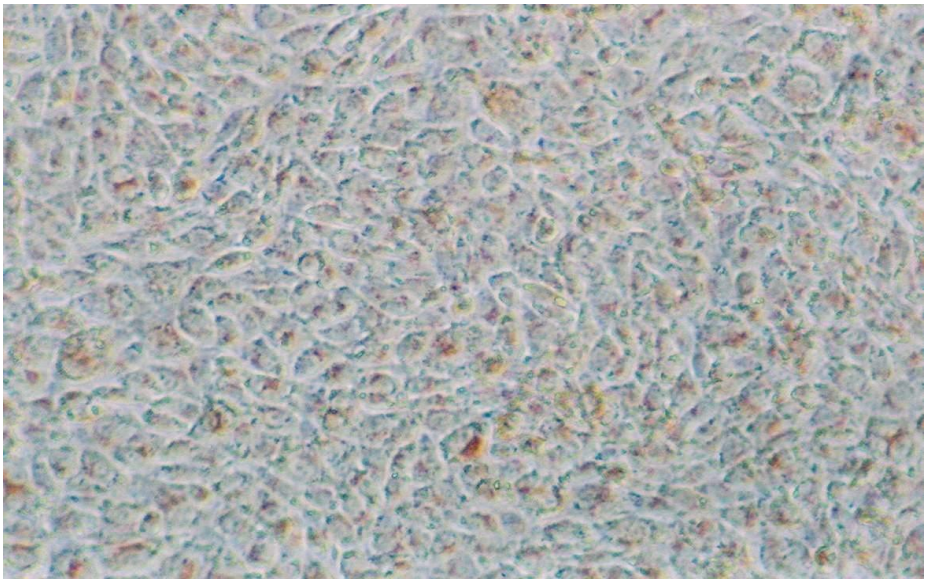


Resim 3.17. Mikroplatelere hücre süspansiyonu konulması



Resim 3.18. Mikroplatelere agar tabakası döküldükten 30dk. sonraki görünüm (x10).

Bu süre sonunda 1:100 oranında kalsiyum-magnezyum bulunmayan fosfat tamponlu salin (CMF-PBS) ile seyreltilen %1'lik nötral kırmızı çözeltisinden 10'ar ml mikroplateteki her bir kuyucuğa agar tabakasının üzerine pipet ile aktarıldı ve mikroplateler karanlıkta 20 dakika bekletildi (Resim 3.19). Bu süre sonunda fazla nötral kırmızısı uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa bir disk yerleştirildi (Resim 3.20).



Resim 3.19: Mikroplatelere nötral kırmızı konulduktan hemen sonraki görünüm. (x10).



Resim 3.20. Mikroplatelerdeki agar çözeltisi ve örnek diskler

Pozitif kontrol (toksik) olarak fenol emdirilmiş steril kurutma kağıdı diski kullanılırken, negatif kontrol (non-toksik) amacıyla DMEM emdirilmiş steril kurutma kağıdı diski kullanıldı. Mikroplateler 24 saat süreyle 37° C' de ve %5 CO_2 içeren etüvde bekletildi. Deneylerde kullanılan maddelerin agar difüzyon testindeki sitotoksisiteleri ISO 10993-15 kriterlerine göre ışık mikroskobu altında değerlendirildi ve fotoğraflandı (Nikon, FDX-35, Japan). Bu değerlendirmede sitotoksisite derecesi Lizis-indeks (Tablo 3.3) yardımıyla saptandı.

Tablo 3.3: Deney materyalinin sitotoksik etkisinden zarar gören hücrelerin yüzdesi ve lizis indeks değerleri.

LİZİS İNDEKS	ZARAR GÖREN HÜCRELERİN YÜZDESİ
0	Açık renk bölge içinde zarar görmüş hücre saptanmadı.
1	Açık renk bölge içindeki hücrelerin %20'sinden azı zarar gördü.
2	Açık renk bölge içindeki hücrelerin %20-40'ı zarar gördü.
3	Açık renk bölge içindeki hücrelerin %40-60'ı zarar gördü.
4	Açık renk bölge içindeki hücrelerin %60-80'i zarar gördü.
5	Açık renk bölge içindeki hücrelerin %80'inden fazlası zarar gördü.

3.6. SEM İNCELEMESİ

SEM incelemesi için kontrol grubu ve 3 farklı dolgu materyalinden 2'şer örnek disk kullanıldı. Diskler, 12'li mikroplate'deki her bir kuyucuğa yerleştirildi ve kuyucuklara 3×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğundaki fibroblast kültürü eklendi. Hücre kültürü eklenmiş mikroplateler, 37 °C'de ve % 100 nemli ortamda 24 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon periodu boyunca besiyeri değiştirilmedi. 24 ve 72 saatlik inkübasyon periodları sonunda örnek diskler % 0.1 gluteraldehit ile 5 dakika ön fiksasyona tabi tutuldular. Medium aspire edildikten sonra örnek diskler, % 4'lük gluteraldehit ile 6 saat fikse edildi. Bunu takiben, fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak, % 50, % 60, % 70, % 80, % 90, % 95 etil alkol serileriyle birer kez, saf etil alkol ile de ikişer kez her seferinde 10'ar dakika beklenilerek dehidrate edildi. Daha sonra örnek diskler CO_2'li kritik sıcaklıkta kurutma işlemine tabi tutuldu ve altın-palladyum alaşımı ile kaplanarak SEM'de incelendi.

3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA) yazılımı kullanılarak, Kruskal-Wallis varyans analizi, tek yönlü ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma testi, Duncan çoklu karşılaştırma testi ve eşleştirilmiş t testi ve Mann Whitney U yöntemleri ile yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan üç farklı dolgu materyalinin MTT testine ait hücre proliferasyonu ortanca ve ortalama değerleri Tablo 4.1.'de ve agar difüzyon testine ait sitotoksisite ortanca ve ortalama değerleri Tablo 4.2.'de verilmektedir.

Tablo 4.1.'de gösterilen o*ptik yoğunluk değerleri*, pozitif kontrol grubunun değeri % 100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen yüzde değeridir ve canlı hücre oranını simgelemektedir.

Tablo 4.1 Üç farklı dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortanca ve ortalama değerleri (%) (Optik Yoğunluk Değerleri)

Test Grupları	**Zaman**	$\overline{X} \pm S.S$ **Ort(%25-%75)**
CIS Grubu	**1. gün**	53.8±5.07 53(49-58)
	3. gün	56±11.3 56.5(48.75-63)
RMCIS Grubu	**1. gün**	43±9.92 42(32.75-50.5)
	3. gün	45.7±6.14 47.5(40-50.25)
PMKR Grubu	**1. gün**	80.3±23.7 77.50(61-91.75)
	3. gün	58.3±6.41 58(52-63.75)
Kontrol Grubu	**1. gün**	100
	3. gün	100

Tablo 4.2. Üç farklı dolgu materyalinin agar difüzyon testine ait sitotoksisite ortanca değerleri

Test Grupları	**Ort(%25-%75)**
CIS Grubu	0.0(0.0-0.25)
RMCIS Grubu	1.0(1.0-2.0)
PMKR Grubu	0.0(0.0-0.5)

4.1. MTT TESTİ SONUÇLARI

1. günde;

Gruplar arasında hücre proliferasyonu bakımından farklılığın istatistiksel değerlendirmesinde Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına ise Tukey çoklu karşılaştırma testi ile bakıldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. 1. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortanca ölçüm değerlerinin karşılaştırması

Test Grupları	**1. gün Ort(%25-%75)**
CIS Grubu	53(49-58)[a]
RMCIS Grubu	42(32.75-50.5)[a]
PMKR Grubu	77.50(61-91.75)[b]

[a] ve [b] harfleri gruplar arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05)

1. günde çalışmada kullanılan üç dolgu materyalinin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü (P = <0,001).

- PMKR grubunun hücre proliferasyon düzeyinin CIS ve RMCIS gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu (P<0.05),
- Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlendi (P>0.05).

3. günde;

Gruplar arasında hücre proliferasyonu bakımından farklılığın istatistiksel değerlendirmesinde tek yönlü ANOVA kullanıldı, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına ise Duncan Methodu ile bakıldı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. 3. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması

Test grupları	**3. gün** $\overline{X} \pm S.S$
CIS Grubu	56±11.3[a]
RMCIS Grubu	45.7±6.14[b]
PMKR Grubu	58.3±6.41[a]

[a] ve [b] harfleri gruplar arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05)

3. günde çalışmada kullanılan üç dolgu materyalinin hücre proliferasyon yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan belirgin farklılık görüldü (P = <0,001).

- RMCIS grubunun hücre proliferasyon düzeyinin CIS ve PMKR gruplarının hücre proliferasyon düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu (P<0.05),
- Diğer grupların hücre proliferasyon düzeylerinin istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı olmadığı gözlendi (P>0.05).

CIS, RMCIS ve PMKR gruplarının 1. ve 3. gündeki hücre proliferasyonu ortalama değerlerinin karşılaştırılması için eşleştirilmiş t testi kullanıldı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. 1. ve 3. gün için test gruplarının hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerlerinin karşılaştırması

Zaman	**CIS Grubu** $\overline{X} \pm S.S$	**RMCIS Grubu** $\overline{X} \pm S.S$	**PMKR Grubu** $\overline{X} \pm S.S$
1. gün	53.8±5.07	43±9.92	80.3±23.7
3. gün	56±11.3	45.7±6.14	58.3±6.41
P	0.597	0.506	0.02*

***** Gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir (P<0.05)

- CIS grubu için, 1. ve 3. gün hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05).
- RMCIS grubu için, 1. ve 3. gün hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05).
- PMKR grubu için, 1. ve 3. gün hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir (P<0.05).

Çalışmada kullanılan her bir dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortalama değerleri ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Dolgu materyalinin hücre proliferasyonu ortanca değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

Test Grupları	**1. gün Ort(%25-%75)**	**3. gün Ort(%25-%75)**
CIS Grubu	53(49-58)*	56.5(48.75-63)*
RMCIS Grubu	42(32.75-50.5)*	58(52-50.25)*
PMKR Grubu	77.50(61-91.75)*	47.5(40-63.75)*

* (P<0.05)'i ifade eder.

- Tüm dolgu materyalleri 1. gün ve 3. günde kontrol grubu (% 100) ile hücre proliferasyon yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (P<0.05).

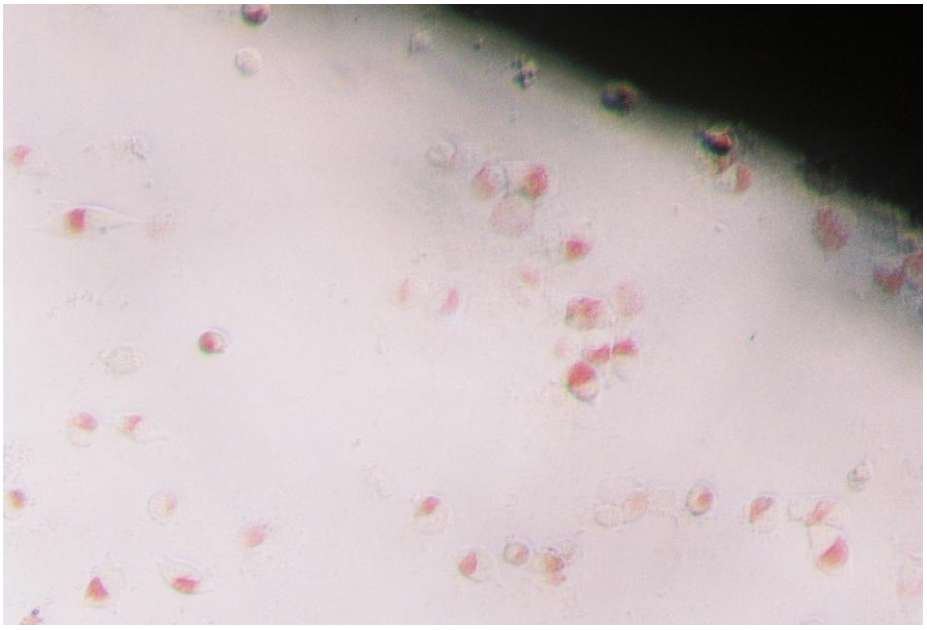
4.2. AGAR DİFÜZYON TESTİ SONUÇLARI

Gruplar arasında sitotoksik etki bakımından farklılığın istatistiksel değerlendirmesinde Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına ise Tukey çoklu karşılaştırma testi ile bakıldı (Tablo 4.7).

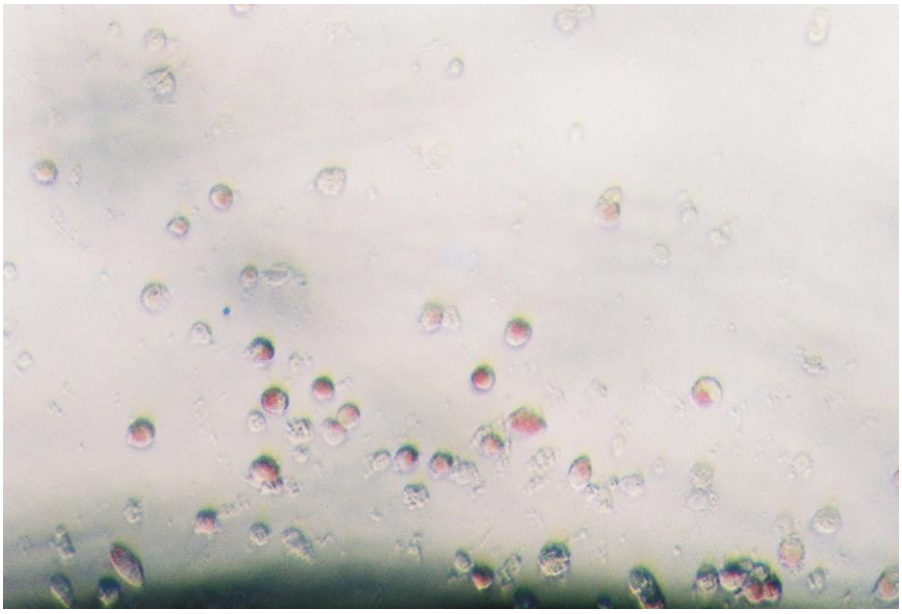
Üç farklı dolgu materyalinin Lizis İndeks değerleri ve gösterdikleri sitotoksik etkilerinin dereceleri Tablo 4.7.'de belirtilmiştir. Lizis indeks değeri pozitif kontrol grubunda 5, negatif kontrol grubunda 0 bulunmuştur. CIS ve PMRK gruplarında sitotoksik etki gözlenmezken RMCIS grubunun hafif sitotoksik olduğu görüldü (Resim 4.1, 4.2, 4.3). Gruplara göre sitotoksisite değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (P>0.05).

Tablo 4.7. Üç farklı dolgu materyalinin sitotoksisite değerlerinin karşılaştırılması

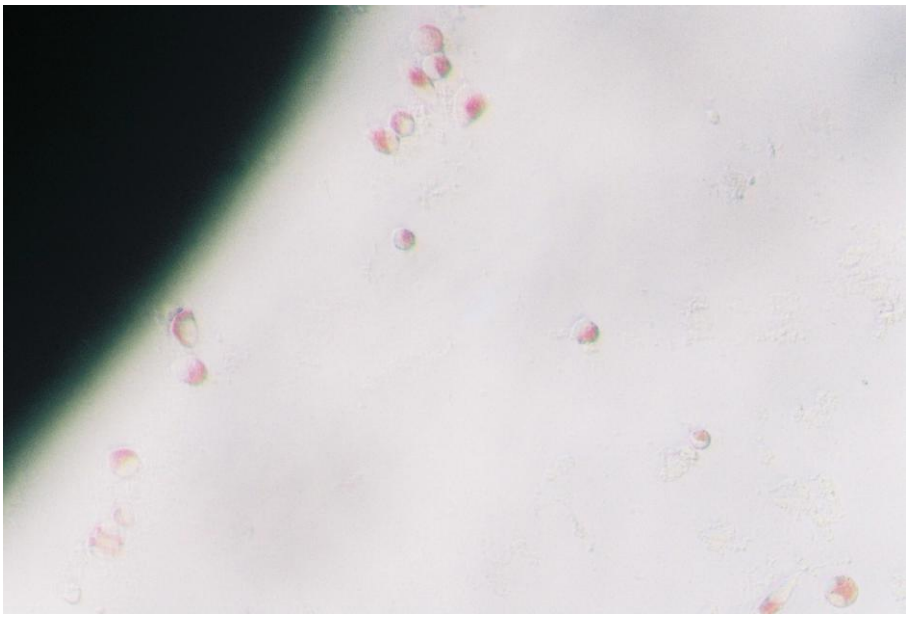
Test Grubu	**Lizis İndeks**	**Sitotoksik Etki**
Pozitif kontrol grubu	5	Şiddetli sitotoksik
CIS Grubu	0	Sitotoksik değil
RMCIS Grubu	1	Hafif sitotoksik
PMKR Grubu	0	Sitotoksik değil
Negatif kontrol grubu	0	Sitotoksik değil



Resim 4.1. Lizis indeks değeri 0 (sitotoksik değil) olarak belirlenen K grubunun mikroskobik görüntüsü



Resim 4.2. Lizis indeks değeri 1 (hafif sitotoksik) olarak belirlenen P grubunun mikroskobik görüntüsü



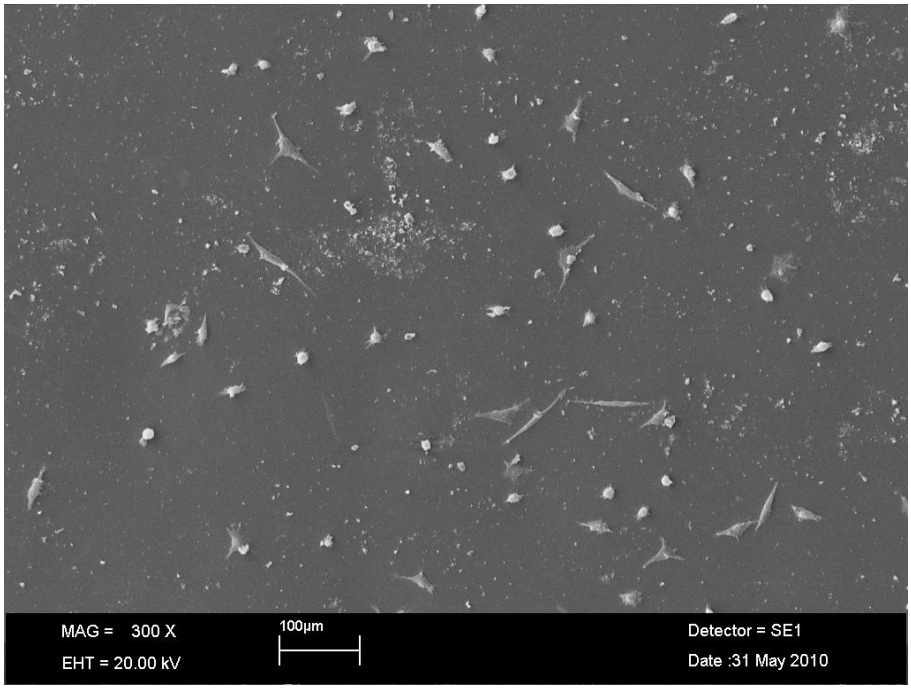
Resim 4.3. Lizis indeks değeri 0 (sitotoksik değil) olarak belirlenen D grubunun mikroskobik görüntüsü

4.3. SEM İNCELEMESİ SONUÇLARI

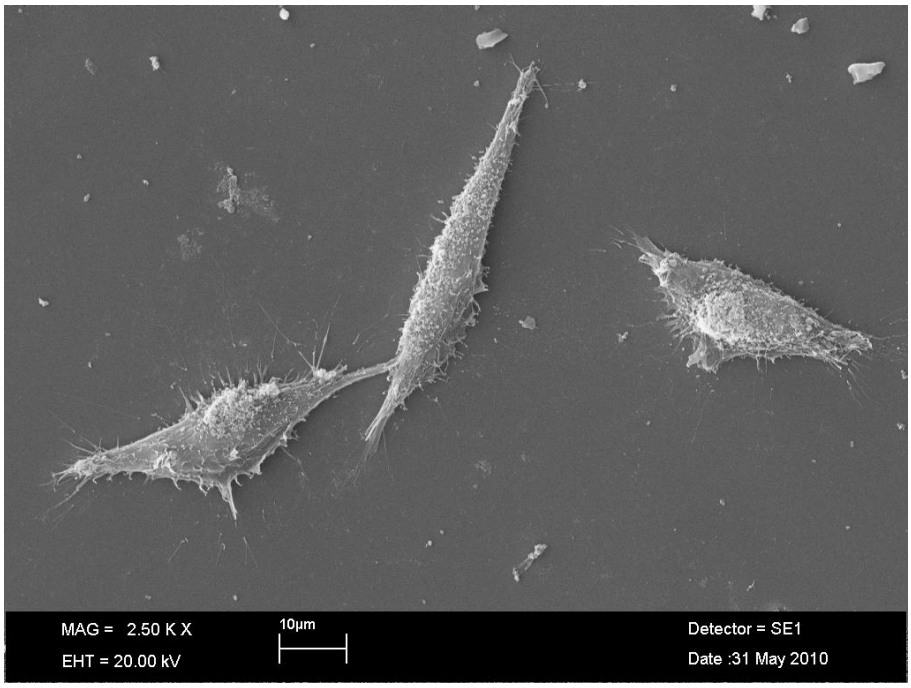
4.3.1. Bir Günlük İnkübasyon Sonrası SEM Görüntüleri

Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası ×300 büyütmede alınan SEM görüntülerinde iğ şekilli matür fibroblastların yanında yuvarlak şekilli immatür fibroblastlar gözlenmektedir (Resim 4.4.). Daha büyük büyütmede (×2500) filopodialar ve lamallipodialar aracılığı ile yüzeye tutunan, normal fibroblast morfolojisine uygun, iğ şekilli fibroblastlar gözlenmektedir (Resim 4.5.).

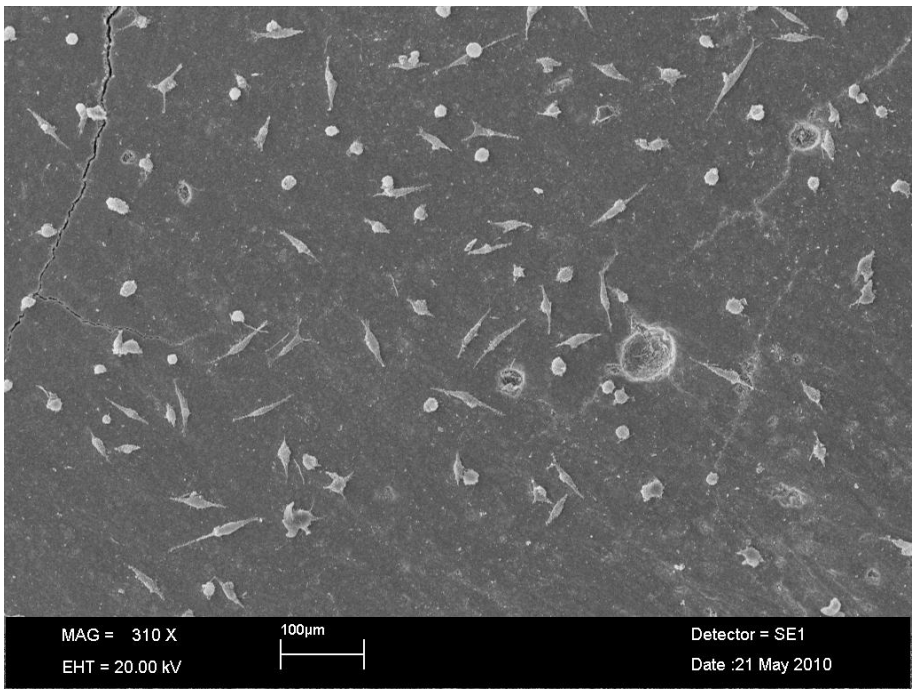
CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası ×310 büyütmede alınan SEM görüntülerinde iğ şekilli matür fibroblastların yanında yuvarlak şekilli immatür fibroblastlar yoğun olarak gözlenmektedir (Resim 4.6.). Daha büyük büyütmede (×4500) yüzeyinde dalgalanmalar ve küçük kabarcıklar bulunan fibroblastın yüzeye mikrovilluslar ve lamellipodialar ile tutunduğu gözlenmektedir (Resim 4.7.).



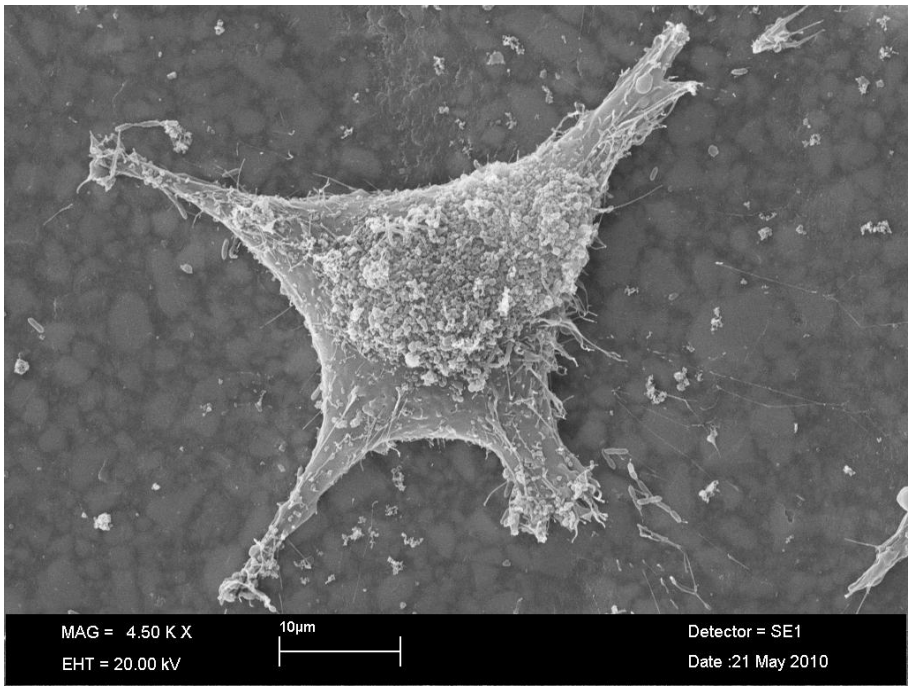
Resim 4.4. Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×300).



Resim 4.5. Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×2500).



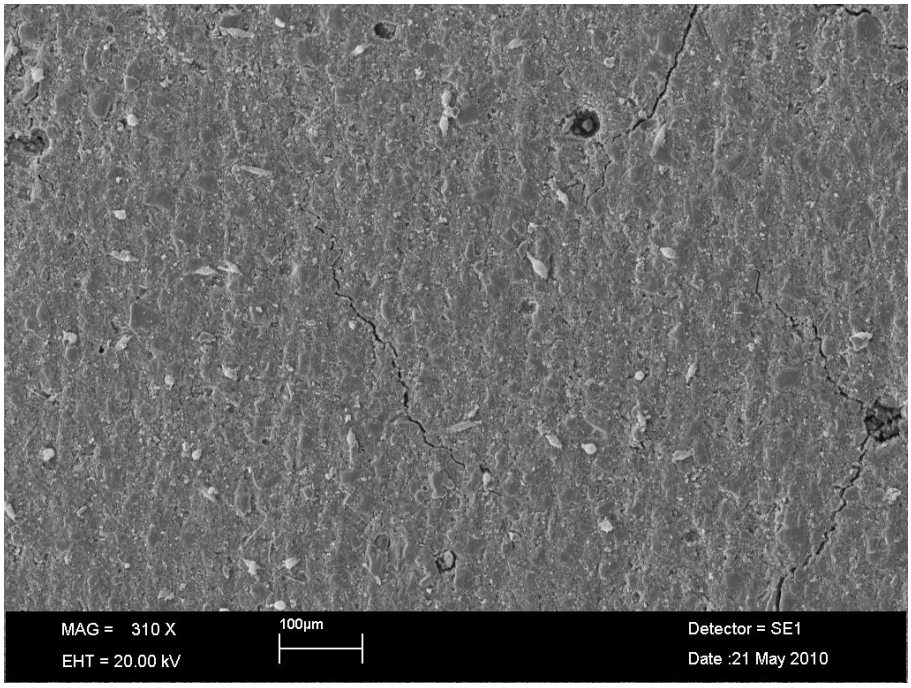
Resim 4.6. CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).



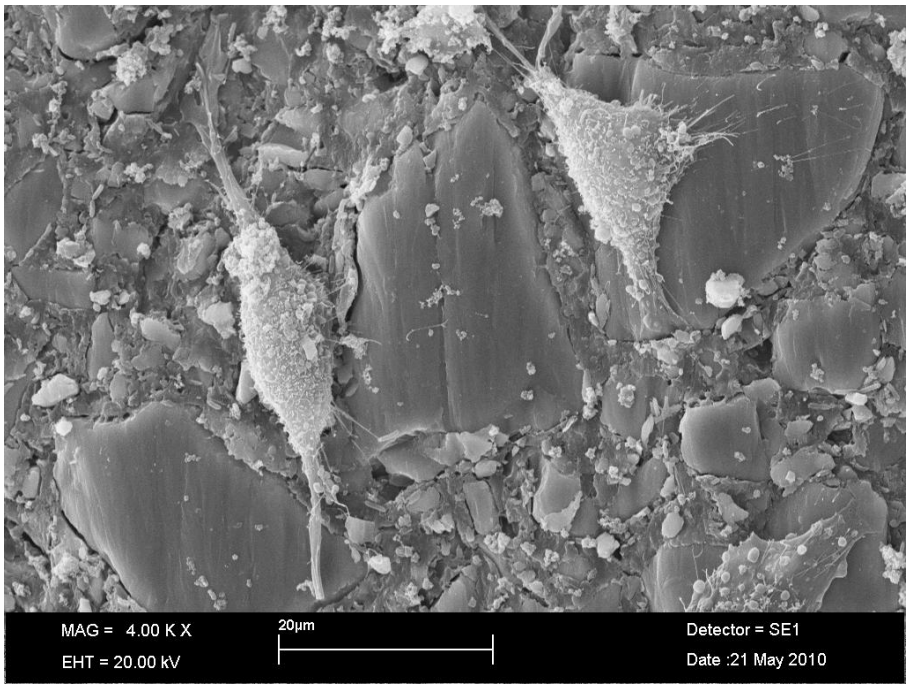
Resim 4.7. CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500).

RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntülerinde (×310) CIS, PMKR ve kontrol gruplarına göre sayıca daha az ve morfolojik olarak immatür fibroblast formuna uygun yuvarlak şekilli fibroblastlar görülmektedir (Resim 4.8.). Büyütme ×4000 iken dolgu maddesinin pürüzlü yüzeyine filopodiaları ile tutunan ve yüzeylerinde küçük kabarcıklar bulunan fibroblastlar gözlenmektedir (Resim 4.9.).

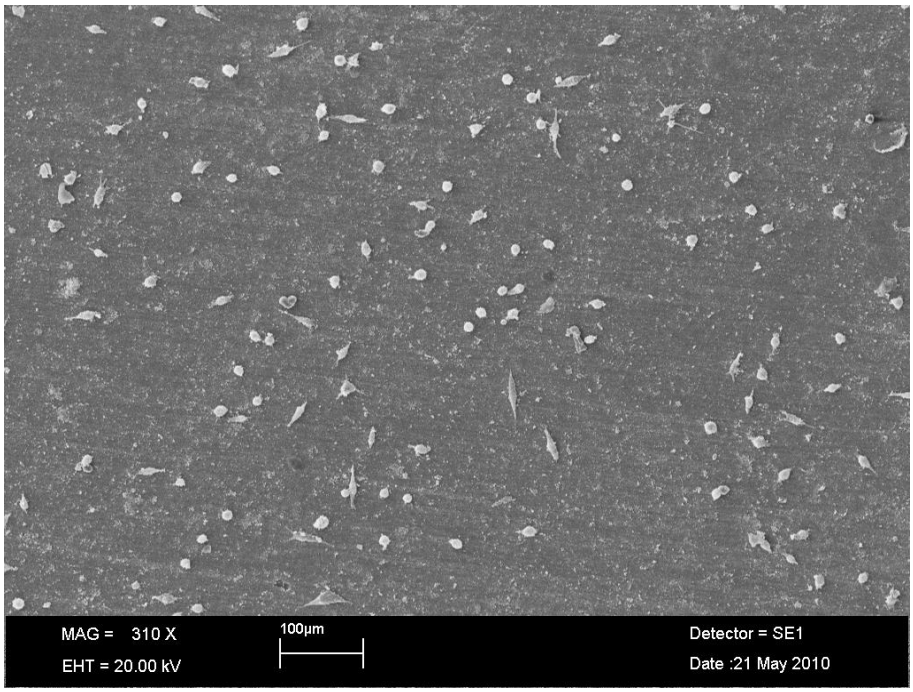
PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntülerinde (×310) iğ şekilli matür fibroblastların yanında yuvarlak şekilli immatür fibroblastlar yoğun olarak gözlenmektedir (Resim 4.10.) Daha büyük büyütmede (×4500) dolgu yüzeyine filopodialar ile tutunan yıldız şekilli fibroblast görülmektedir (Resim 4.11.).



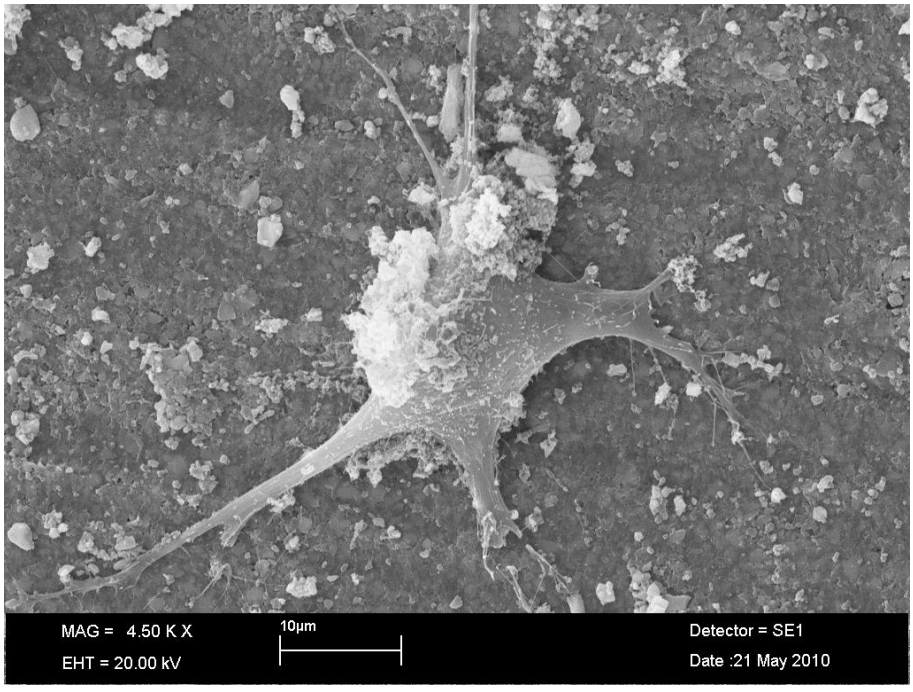
Resim 4.8. RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).



Resim 4.9. RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4000).



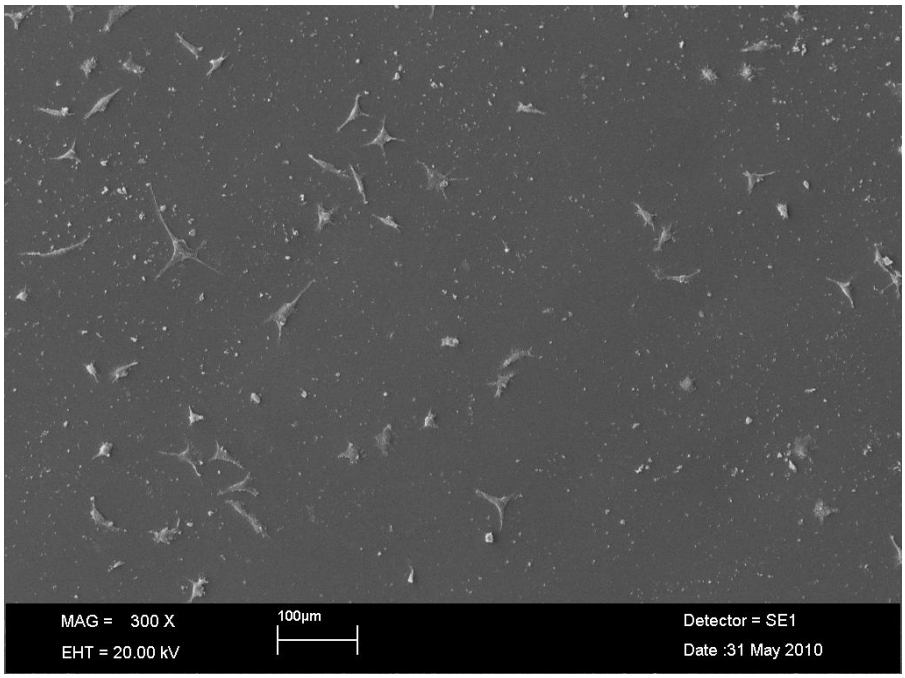
Resim 4.10. PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).



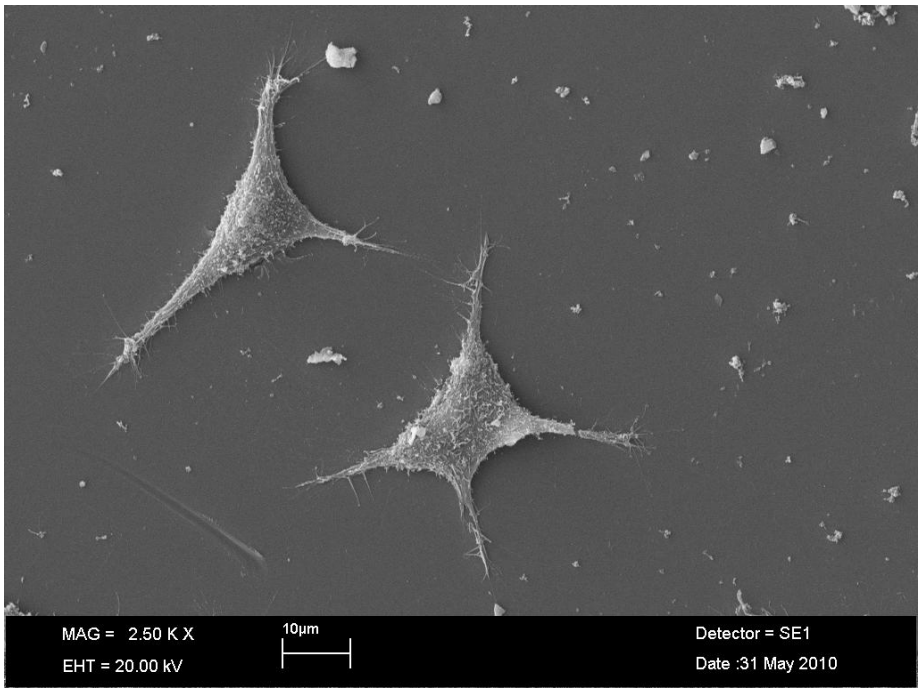
Resim 4.11. PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 1 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500).

4.3.2. Üç Günlük İnkübasyon Sonrası SEM Görüntüleri

Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntülerinde (×300) bir günlük inkübasyon sonrası elde edilen SEM görüntülerine göre daha fazla fibroblast hücresi gözlenmektedir (Resim 4.12.). Daha büyük büyütmede (×2500) fibroblastlar, normal fibroblast morfolojisine uygun, yıldız şekillidir. 1 günlük inkübasyon görüntülerine göre 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntülerinde fibroblastların yüzeye yayıldığı ve lamellipodialar aracılığı ile daha iyi tutunduğu görülmektedir (Resim 4.13.).



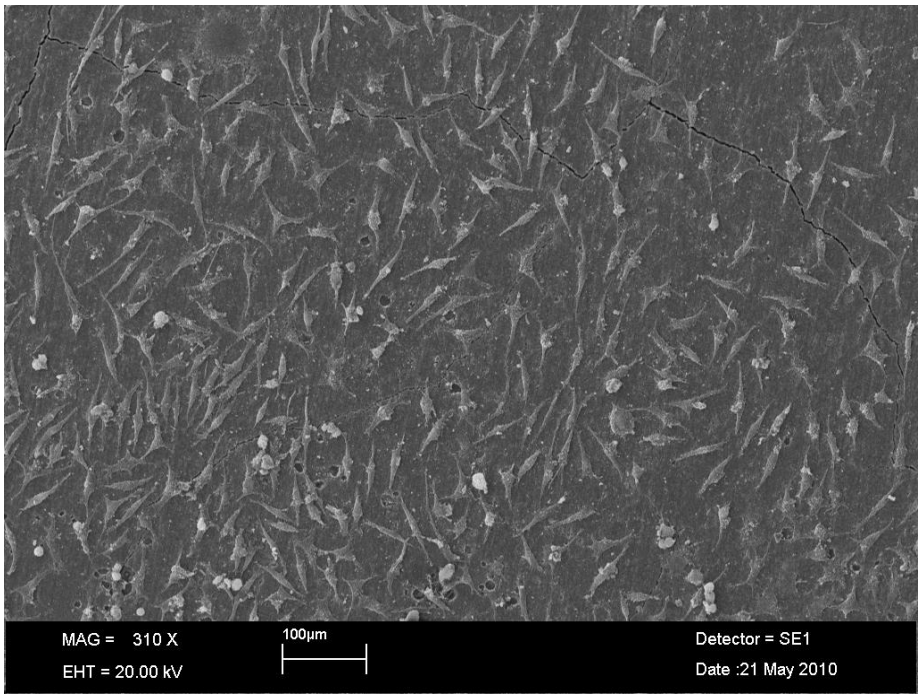
Resim 4.12. Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×300).



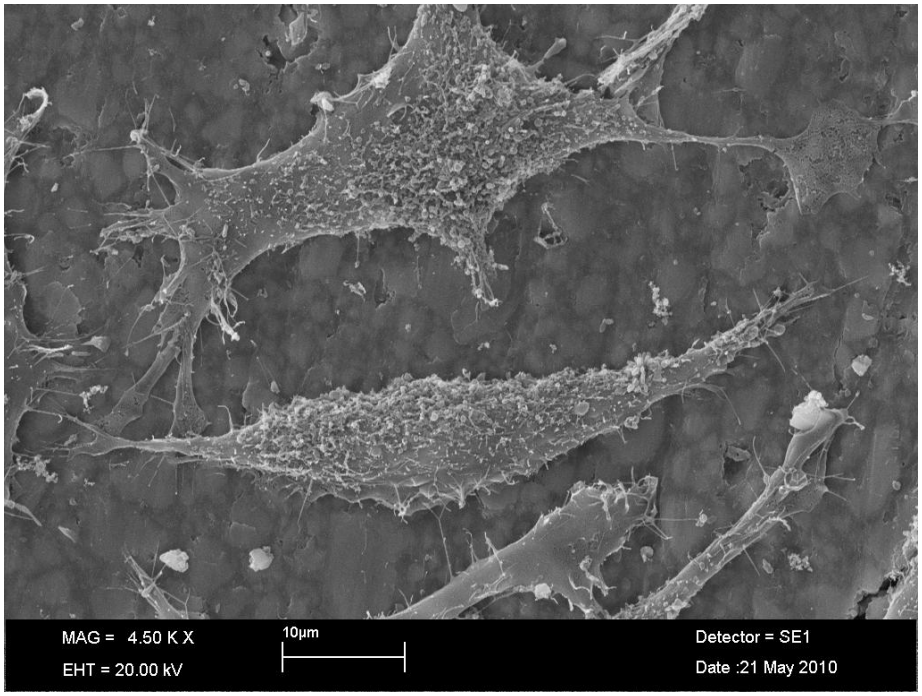
Resim 4.13. Cam (kontrol grubu) yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×2500).

CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası ×310 büyütmede alınan SEM görüntülerinde fibroblast yoğunluğunun arttığı ve yıldız şeklindeki fibroblastların sayıca fazla olduğu gözlenmektedir (Resim 4.14.). Daha büyük büyütmede (×4500) dolgu maddesi ile fibroblast hücrelerinin temas sürelerinin uzatılmasının hücre yüzeyinde birçok vakuol ve kabarcık oluşumuna neden olduğu görülmektedir (Resim 4.15.).

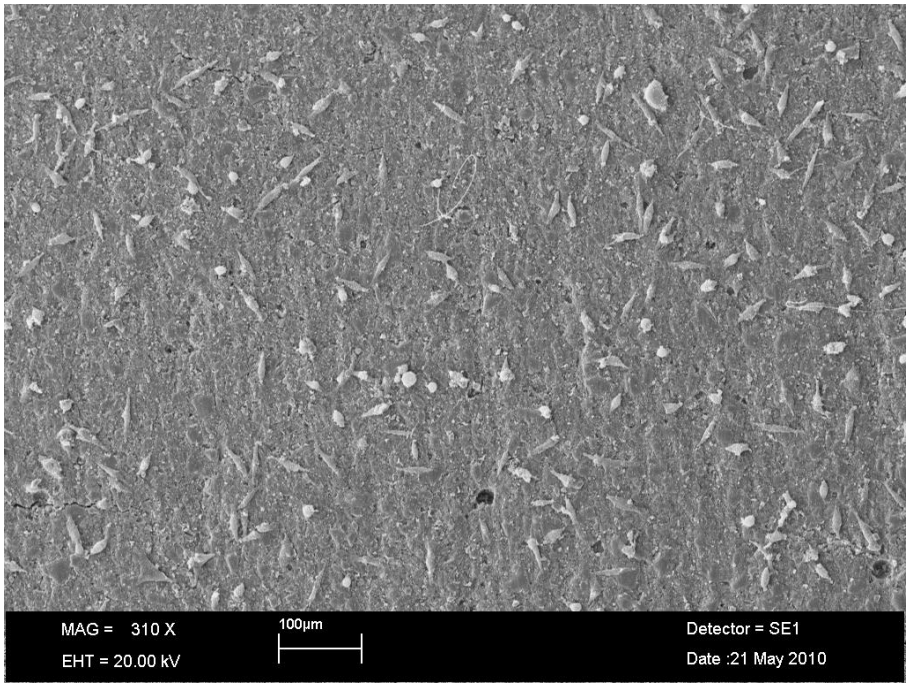
RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntülerinde (×310) fibroblast yoğunluğunun arttığı ve iğ şeklinde fibroblastların sayıca fazla olduğu gözlenmektedir (Resim 4.16). Büyütme ×4500 iken iğ şeklindeki fibroblastların dolgu yüzeyine lamellipodialar aracılığı ile tutunduğu gözlenmektedir (Resim 4.17.).



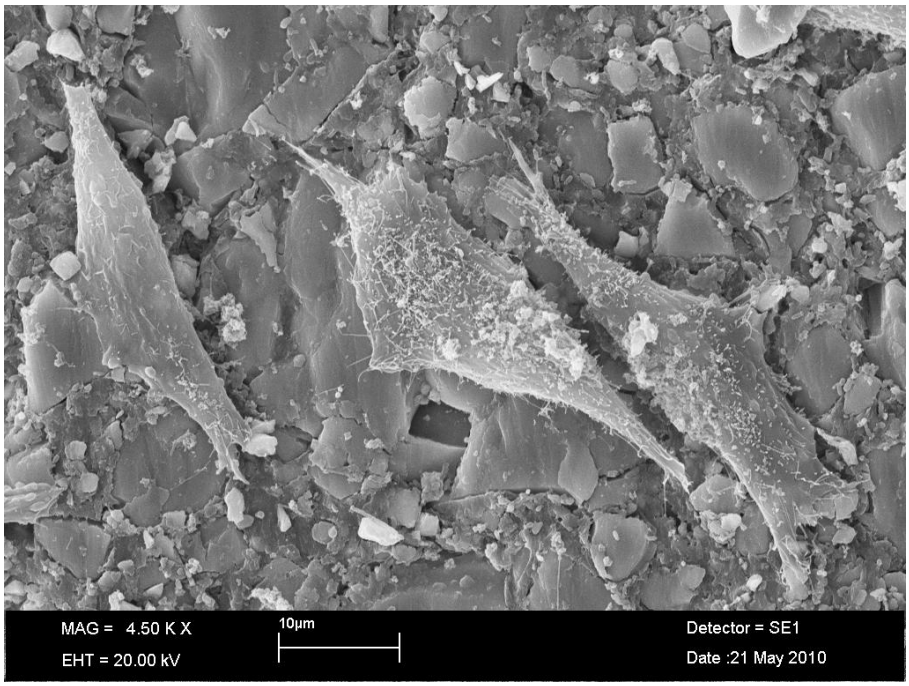
Resim 4.14. CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).



Resim 4.15. CIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500).

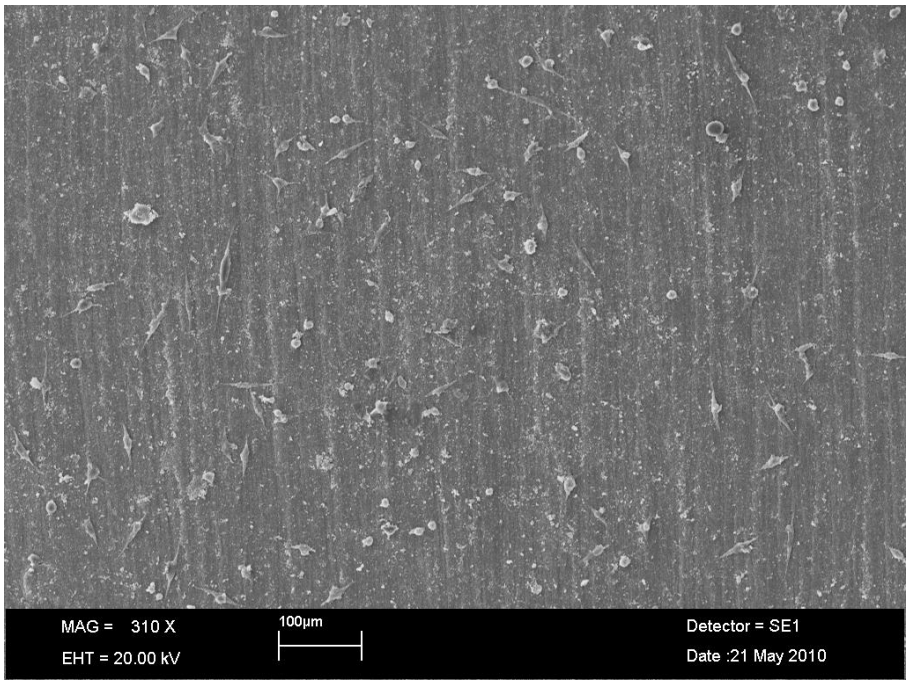


Resim 4.16. RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).

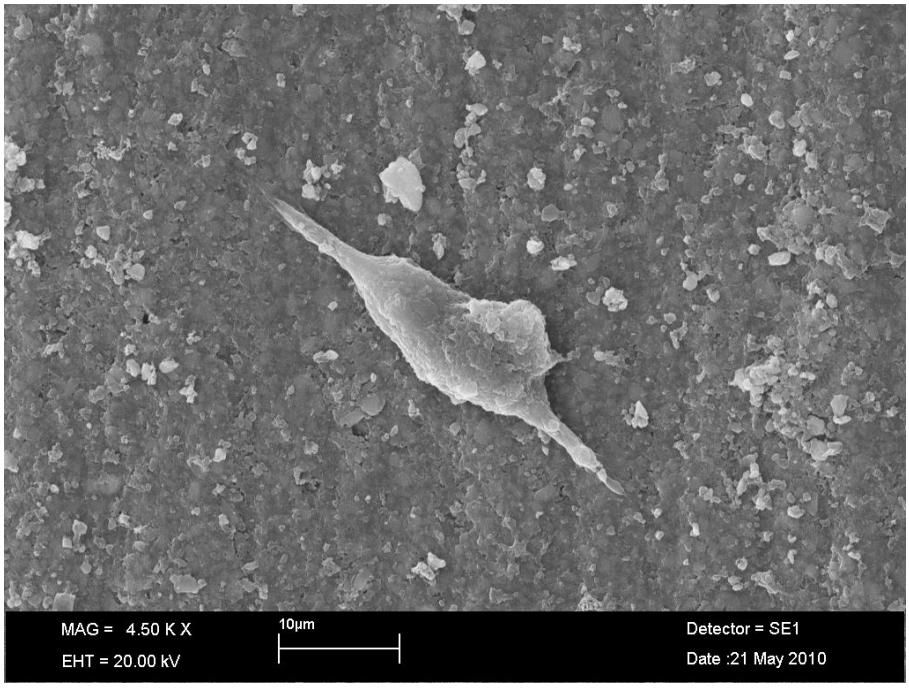


Resim 4.17. RMCIS grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500).

PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası ×310 büyütmede alınan SEM görüntülerinde üç günlük inkübasyon sonrası fibroblast yoğunluğunun 1. gündeküne benzer olduğu ve iğ şeklinde fibroblastların sayıca fazla olduğu gözlenmektedir (Resim 4.18.). Daha büyük büyütmede (×4500) yüzeye lamellipodialar aracılığı ile tutunan iğ şekilli fibroblastlar gözlenmektedir. Filopodia ve vakuol sayısının azaldığı görülmektedir (Resim 4.19.).



Resim 4.18. PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×310).



Resim 4.19. PMKR grubu yüzeyindeki L929 fare fibroblastlarının 3 günlük inkübasyon sonrası SEM görüntüleri (×4500).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dişeti çekilmesi ile kök çürüğü ya da restorasyon gerektiren çürüksüz servikal lezyonların bir arada gözlendiği komplike vakalarda, tedavi amacıyla restoratif ve periodontal cerrahi işlemlerin birlikte uygulanması gerekebilir (120). Kök çürükleri ya da çürüksüz servikal lezyonların restoratif tedavisi ile servikal dentin hipersensitivitesi ortadan kaldırılabilir, uygun diş formu ve konturu sağlanabilir, diş dokusunda daha fazla kayıp meydana gelmesi engellenebilir, plak birikimi önlenerek dişeti sağlığı korunabilir ve estetik görünüm düzeltilebilir (121).

Kök çürüklerinin ya da çürüksüz servikal lezyonların restoratif tedavisi için, altın inleyler, silikat simanlar, amalgam, altın kronlar, seramik kronlar, seramik inleyler, geleneksel cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman, kompomer, akışkan kompozitler, mikrofil kompozitler ve hibrit kompozitler direkt ya da indirekt yöntemler uygulanarak kullanılabilir (121). Bu restoratif materyallerden periodontal cerrahi işlem öncesi hangisinin kullanılacağı birçok çalışmaya konu olmuştur (121-123). Rafaelli ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada seramik yüzeyine fibroblast ataşmanının düşük düzeyde olduğunu göstermişlerdir (122). Martins ve arkadaşları (2007), amalgamın kompozite göre daha az plak birikimine sebep olduğunu belirtmelerine rağmen, biyouyumluluğunun iyi olmaması, fibroblast ataşmanının azlığı ve estetik problemler nedeniyle kullanımını uygun

bulmamışlardır (123). Douglas ve arkadaşları (2003), çürüksüz servikal lezyonların restorasyonunda cam iyonomer, rezin iyonomer ve kompomer gibi flor salınımı yapan materyallerin kullanımını önermişlerdir (121).

Geleneksel cam iyonomer simanlar aluminoflorosilikat cam ve poliakrilik asit içermektedir ve asit-baz reaksiyonu ile sertleşmektedir. Bu materyaller, biyouyumludur, diş rengindedir, mine ve dentine bağlanır, demineralizasyonu önleyecek ve remineralizasyonu arttıracak şekilde flor salar ve ısısal genleşme katsayısı dentininkine benzerdir (81). Ancak cam iyonomerler, ilk sertleşme sırasında neme hassastır, sertleşme zamanı uzundur, bitirme ve polisaj işlemleri için ikinci bir randevu gerektirir, yüzeyi pürüzlüdür, translusent değildir ve dehidratasyona yatkındır (94).

Rezin modifiye cam iyonomer simanlar, hem asit-baz reaksiyonuyla hem de metakrilat polimerizasyonu ile sertleşir. Bu materyaller, geleneksel cam iyonomerlere göre gelişmiş fiziksel ve mekanik özellikler, mineralize dokuya daha fazla bağlanma, polisaj işleminin hemen yapılabilmesi, translusensi, flor salınımının daha fazla olması, neme hassasiyetinin daha az olması gibi bir takım avantajlar sağlar (97).

Kompomer ya da poliasit modifiye rezin kompozitler cam iyonomerler ve ışıkla sertleşen kompozitlerin özelliklerine sahiptir. Sertleşme reaksiyonları metakrilat polimerizasyonu ile olur, ancak su absorbsiyonundan sonra ikinci bir asit-baz reaksiyonu oluşur. Bu materyaller, cam iyonomerlere göre daha az flor salarlar ve fiziksel özellikler bakımından cam iyonomerlerden ziyade kompozit rezinlere benzerler (121).

Bu çalışmada, diş renginde estetik materyaller oldukları ve flor salınımı yaptıkları için restoratif materyal olarak, geleneksel cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman ve poliasit modifiye rezin kompozit tercih edildi.

Cam iyonomer simanların, rezin modifiye cam iyonomer simanların ve poliasit modifiye rezin kompozitlerin fiziksel ve mekanik özellikleri ve kimyasal yapıları ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (124-128). Bununla birlikte, kök çürüklerinin ve çürüksüz servikal lezyonların tedavisinde kullanılan bu materyallerin dişeti dokusu ile ilişkisini ve fibroblast ataşmanına etkisini inceleyen çalışma sayısı sınırlıdır (129, 130).

Dental materyaller değerlendirilirken çoğunlukla fiziksel ve mekanik özellikler hedeflenmekte, biyolojik özellikler ise geri planda kalmaktadır. Ancak son yıllarda yeni

geliştirilen materyallerin klinik uygulamaları öncesinde biyouyumluluklarının değerlendirilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır (131).

İki temel risk, toksisite ve allerjidir. Her iki durumun da ortaya çıkabilmesi için malzemeden biyolojik olarak aktif komponentlerin salınması gerekmektedir. Sıklıkla kullanılan bu materyallerin sistemik toksisite oluşturma olasılıkları oldukça azdır. Çünkü sızıntı ürünlerinin miktarı vücutta yaygın reaksiyon oluşturacak kadar fazla değildir. Ancak bu miktar diş pulpası, periodontal ve periapikal dokular ve ağız mukozasında toksisite oluşturabilecek potansiyele sahip olabilir. Çünkü başta restoratif materyaller olmak üzere, pek çok dental materyal bu dokularla uzun süre temasta kalabilir (132).

Bu nedenle çalışmamızda, cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman ve poliasit modifiye rezin kompozit olmak üzere üç farklı dolgu materyalinin, SEM incelemesi ve MTT testi ile fibroblast ataşmanına etkisi ve agar difüzyon testi ile biyouyumlulukları değerlendirildi.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, sitotoksisitenin belirlenmesinde ve fibroblast ataşmanının değerlendirilmesinde, genellikle hücre kültürü test yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir (133-135). Hücre kültürü test yöntemleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri ve çalışma koşullarının standardize edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedirler (136, 137). Bu nedenle, sunulan çalışmada da üç farklı dolgu materyalinin sitotoksisiteleri ve fibroblast ataşmanına etkisi, hücre kültürü yöntemi ile *in vitro* koşullarda değerlendirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, hangi hücre tipinin seçilmesi gerektiğiyle ilgili kesin bir cevap bulunmamaktadır. Diploid hücrelerin kullanılması, laboratuarlar arası karşılaştırmaların yapılmasında güçlükler çıkartmaktadır. Bu karşılaştırmaların yapılması, bütün dünyada kullanılabilecek devamlı hücre hatlarının kullanılması ile daha kolay hale gelmektedir. Devamlı hücre hatları aneuploid kromozoma sahiptirler, hızlı üremektedirler ve doğru pasajlandıklarında çok uzun süreyle yaşatılmaları mümkündür. Elde edilmeleri de primer hücre kültürüne oranla daha kolaydır. Fenotipik özelliklerinde kayıp uzun süre söz konusu değildir. Devamlı hücre hatları ile primer hücre kültürlerinden daha hızlı sonuç elde edilmektedir (105,138). Bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında da devamlı hücre hatları kullanılmıştır.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin çeşitli özelliklerinin araştırılmasında farklı yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen bulguların değerlendirilmesinde ve birbiri ile

karşılaştırılmasında problemler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, dental materyallerin biyouyumlarının değerlendirilmesinde standart uygulamaların önemi üzerinde durulmaktadır (136). Çünkü çok sayıda test yöntemi ile bazen aynı materyal için farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Standart test yöntemlerini kullanmanın başlıca avantajı tekrarlanabilirliği ve farklı laboratuar koşullarında elde edilen verilerin karşılaştırılabilmesine olanak sağlamasıdır. Ancak standart uygulamalar daha fazla zaman alıcıdır. Ayrıca aynı standartlarda yeni geliştirilen test yöntemleri bulunmayabilir (132, 136). Çünkü teknoloji standartlardan daha hızlı ilerlemektedir, bu durum standartların sürekli olarak uygulanmasını güçleştirmektedir (103). Bununla birlikte koşullar uygunsa standart test yöntemlerinin uygulanması ve bu testlerin kullanılmadığı durumlarda açıklayıcı nedenlerin ortaya konulması gerektiği vurgulanmaktadır (136).

Dental materyallerin özelliklerinin incelendiği özel raporlar hazırlanması, standardizasyonlar ile ilgili bu zorlukların büyük oranda ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bu nedenle çalışmamızda, hücre kültürünün hazırlanmasında, ISO tarafından hazırlanan 10993–5 no'lu protokolün 'Sitotoksisite Testleri-*İn Vitro* Yöntemler' bölümü rehber alınmıştır (106).

ISO 10993–5 'Sitotoksisite Testleri-*In Vitro* Yöntemler' standardına göre; *in vitro* çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında ve fibroblast ataşmanının değerlendirilmesinde, standart olarak L929 ya da Balbc3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılması önerilmektedir (106). Schedle ve arkadaşları (1995), metal alaşımlarının toksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla, materyalleri 7 gün süre ile L929 hücreleri, dişeti fibroblast hücreleri ve mast hücreleri ile inkübe ederek, direkt temas yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişiklikleri değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda, *in vitro* sitotoksisite testlerinde L929 fibroblastlarının, primer dişeti fibroblast ve mast hücre kültürlerine oranla, üreme yeteneklerinin gelişmiş olması nedeniyle kullanımlarının daha uygun olacağını belirtmişlerdir (139). Taira ve arkadaşları (2000), yaptıkları çalışmada dört farklı fibroblast kültürü kullanmışlar ve kullanılan hücre kültürlerini, hassasiyet derecelerine göre değerlendirmişlerdir. Hücre hatları içerisinde en duyarlı ve güvenilir hücre kültür ortamının L929 fare fibroblastları olduğu sonucuna varmışlardır (140). Thonemann ve arkadaşları (2002), primer sığır dental papilla hücreleri (CPC), SV40T antijeniyle transforme edilen CPC hücreleri (tCPC B), E6/E7 onkojeni ile transforme edilen CPC hücreleri (tCPC E) ve L929 fare fibroblast hücrelerini 24 saat süreyle dental rezin bileşikleri ile temasta bırakarak, MTT analizi ile sitotoksisite değerlendirmesi yaptıkları

çalışmalarında, bu hücrelerden hangisi ile daha hassas sonuçlar elde edilebileceğinin tespitini amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda kullanılan hücrelerin hassasiyetlerini CPC = tCPC B < tCPC E < L929 şeklinde sıralayarak, en iyi sonuçların L929 fare fibroblastları ile elde edildiğini belirtmişlerdir (141).

Bu çalışmada da, yukarıda belirtilen sonuçların ışığında ve ISO 10993–5 numaralı standarda uygun olması amacıyla, üç farklı dolgu materyalinin sitotoksisiteleri ve fibroblast ataşmanına etkisi L929 fare fibroblast hücre kültürü kullanılarak değerlendirilmiştir (106).

Mevcut çalışmada üç farklı dolgu materyalinin fibroblast ataşmanı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile SEM incelemesi yapılmıştır. Ayrıca, daha önceki çalışmalara benzer şekilde fibroblast hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde MTT test yöntemi kullanılmıştır (120, 122).

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Çözündürülen MTT sarı renklidir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri MTT'nin tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristallerini oluştururlar (114). Sonuçta elde edilen mor solüsyon spektrofotometrik olarak ölçülür. Hücre sayısındaki artma veya azalma, hücre sayısıyla bağlantılı olarak oluşan formazan miktarında değişmeye neden olur (115). MTT yönteminin hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanımının histolojik, ışık ve elektron mikroskobik yöntemlere göre önemli avantajları vardır. MTT yöntemiyle, materyal yüzeyine tutunan hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılmasına gerek kalmadan doğrudan ve kısa sürede sayımları yapılabilmektedir. Bu sayede hazırlanan örneklerin yüzeylerinden hücrelerin tripsin kullanılarak kaldırılmasına gerek kalmaz. MTT yöntemi sadece metabolik olarak aktif hücrelerin sayısının belirlenmesini sağlar. Işık mikroskobu incelemelerindeki hücre kayıpları bu test yöntemi ile elimine edilebilmektedir. Işık mikroskobunda ve SEM'de sınırlı, 0.02 mm^2 gibi oldukça küçük alanlara düşen hücre sayısı belirlenirken, MTT yönteminde tüm yüzeye tutunan hücre sayısı belirlenebilmektedir. Ayrıca mikroskop incelemelerinde hücrelerin üst üste konumlanması sayımı zorlaştırmakta ve yanıltıcı olmaktadır; MTT yönteminde ise bu durum fark yaratmaz. Radyo izotopla hücrelerin işaretlenip sayılması ise bu çalışmaların özel izin ve laboratuar gerektirmesi, çok pahalı olması ve çevre için taşıdığı riskler nedeniyle MTT yöntemine oranla daha az avantajlı bulunmuştur (142). Dolayısıyla MTT yöntemi hassas bir yöntemdir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir, ayrıca uygulaması kolay ve hızlı bir

metottur (115). Bahsedilen avantajlarında ötürü, MTT yöntemi, L929 fibroblastlarının dolgu materyallerinin yüzeyine tutunmasının değerlendirilmesinde tercih edilmiştir.

Çeşitli dolgu materyalleri üzerine fibroblast ataşmanı olup olmadığı klinik ve histolojik olarak bazı çalışmalarla değerlendirilmiştir. Alkan ve arkadaşları (2006) rezin modifiye cam iyonomer siman ile restore edilmiş kök rezorpsiyonu bölgesinin subepiteliyal bağ dokusu grefti ile başarı bir şekilde örtüldüğünü göstermişlerdir (129).

Lucchesi ve arkadaşları (2007) çürüksüz servikal lezyonların rezin modifiye cam iyonomer siman ve mikrofil kompozit rezinler ile restore edildikten sonra koronale pozisyone flep ile örtümlerini karşılaştırmış ve her iki grubun da 6 aylık periyot sonunda başarılı olduğunu göstermiştir (143).

Rezin modifiye cam iyonomer siman ile kompozit rezinlerin karşılaştırıldığı bir histomorfometrik çalışmada ise her iki restorasyon üzerinde epitel doku migrasyonu olduğu gösterilmiştir (123).

Dragoo (1997), yara iyileşmesi sürecinde histolojik olarak rezin iyonomer materyallere epitel ve bağ dokusu ataşmanının olduğunu göstermiştir (144).

Bir taramalı elektron mikroskobu çalışmasında Oliva ve arkadaşları (1996) çeşitli cam iyonomer dolgu materyalleri üzerine osteoblastik hücre adherensini göstermişlerdir (125).

Al-Qathami ve arkadaşları (2004), yaptıkları çalışmada rezin modifiye cam iyonomer simanın kök yüzeyine iyi adapte olduğunu ancak yüzeyinin pürüzlü olması nedeniyle kompozit rezine oranla daha az sayıda fibroblast ataşmanı meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca kompozit rezinin, semente adaptasyonunun iyi olduğunu ve 4 saatlik inkübasyon sonunda yoğun olan fibroblast ataşmanının 24 saatlik inkübasyon sonunda azaldığını belirtmişlerdir (145).

Bu çalışmada, 1 günlük inkübasyon periyodundan sonra poliasit modifiye kompozit rezin (PMKR) grubunun hücre proliferasyon düzeyinin rezin modifiye (RMCIS) ve geleneksel cam iyonumer siman (CIS) gruplarınınkinden daha yüksek olduğu bulundu. 3 günlük inkübasyon periodundan sonra rezin modifiye cam iyonomer siman grubunun hücre proliferasyon düzeyinin cam iyonomer siman ve poliasit modifiye kompozit rezin gruplarınınkinden düşük olduğu gözlendi, aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Al-Qathami ve arkadaşlarının(2004) sonuçlarına benzer şekilde, rezin modifiye ve geleneksel cam iyonomer siman yüzeyinde, poliasit modifiye kompozit rezine oranla daha az sayıda fibroblast

proliferasyonu meydana gelmesi, cam iyonomer siman yüzeyinin kompozit yüzeyine oranla daha pürüzlü olmasına bağlanabilir.

Rezin modifiye ve geleneksel cam iyonomer siman grupları için, 1. ve 3. gün hücre proliferasyonu ortalama ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken, poliasit modifiye kompozit rezin grubu için, 1. güne oranla 3. günde anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu durum inkübasyon periodunun uzaması ile materyalden besiyerine artık madde salınımının artmasıyla açıklanabilir. Bu sonuçlar da Al-Qathami ve arkadaşlarının (2004) sonuçlarıyla uyumludur.

Tüm dolgu materyalleri 1. ve 3. günde kontrol grubu ile hücre proliferasyon yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında, kontrol grubu yüzeyinde gözlenen hücre proliferasyonunun anlamlı oranda yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Bu sonuçlar kontrol grubunun yüzey karakterizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Bu çalışmada kontrol grubu olarak cam kullanılmıştır. Cam yüzeyi, üç dolgu materyalinden de daha düzgün yüzeye sahiptir. Dolayısıyla cam yüzeyine fibroblast ataşmanı daha fazla olmuştur.

Bu çalışmanın sonuçları materyallerin yüzey özelliklerinin ve kimyasal içeriğinin fibroblast ataşmanının niteliğini ve niceliğini etkilediğini göstermektedir. Fibroblastların materyal yüzeyine adezyonu ve yayılması hücresel fonksiyonun ilk fazıdır. Alanezi ve arkadaşları (2010), dolgu materyalinin yüzeyine hücre adezyonunun ve yayılmasının, materyalin biyouyumluluğu hakkında bilgi verebileceğini belirtmiştir (146). Bu çalışmada da, dolgu materyallerinin üzerine hücre adezyonu, yayılması ve morfolojisi SEM görüntüleri alınarak değerlendirildi.

Kontrol grubunun ve dolgu materyallerinin SEM görüntüleri, fibroblast hücrelerinin 1 günlük inkübasyon sonrası yuvarlak formda ve mikrovilluslarla yüzeye tutunduğunu göstermektedir. Üç günlük inkübasyon sonrası ise bu hücrelerin yüzeye yayıldığını ve lamellipodialar aracılığı ile daha iyi tutunduğunu göstermektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde rezin modifiye cam iyonomer siman materyaline az sayıda fibroblast ataşmanının olduğu gözlenmektedir. Bunun sebebinin materyalin yüzeyinin pürüzlülüğünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte hücrelerin morfolojilerinin kontrol grubundakilere benzer şekilde normal olduğu görülmektedir. Bunun sebebi ise, materyalin biyouyumluluğunun iyi olmasına bağlanabilir. Öte yandan, geleneksel cam iyonomer ve poliasit modifiye kompozit rezin materyallerine fibroblast ataşmanının iyi olduğu ve yüzeye hücrelerin yayıldığı SEM

görüntüleri ile de desteklendi. Bu durum materyallerin hem biyouyumluluklarının iyi olması hem de yüzeylerinin düzgün olması ile açıklanabilir.

Sitotoksisite birçok metot ile belirlenebilmektedir. Bunlar hücre sayımı, proliferasyon oranlarının belirlenmesi, farklı hücre ürünlerinin sentezi veya enzim aktivitelerinin saptanması ve membran bütünlüğünün belirlenmesi şeklinde olabilmektedir (107).

In vitro testlerde seçilen test yönteminin uygunluğu, hücrelerin tipi, hücrelerin maruz bırakıldığı ortam ve beklenen/alınan cevabın tipi önem taşımaktadır (118).

Agar difüzyon testi dişhekimliğinde sıklıkla kullanılan bir test metodudur (107, 147, 148). Pek çok araştırmacının tercih etmesi verilerin karşılaştırılabildiği bir yöntem olmasını sağlamaktadır. İndirekt metotun dolgu materyalleri için uygun olması nedeniyle, çalışmamızda ISO protokolünde belirtilen agar difüzyon testi seçilmiştir. Bu yöntemde toksisite, malzemelerin hücre zarı geçirgenliği üzerine yaptıkları etki ile değerlendirilmektedir. Hücreler ile malzeme arasında, malzemeden ayrışabilen maddelerin içerisine diffuze olabildiği geçirgen bir agar tabakası vardır. Canlı hücrelerin vital boya ile boyanması yoluyla toksik etki belirlenebilmektedir (149).

Agar difüzyon testi materyaller arasındaki, erken dönem sitotoksik aktiviteyi ayırt etmek için kabul edilmiş bir metottur. Bununla beraber, gözlenen sitotoksik etkinin ne kadar süreyle devam edeceği konusunda bir bilgi vermez. Elde edilen veriler ancak örneklerin karşılaştırılmasında kullanılabilir (147).

Çalışmamızda klinik koşullara benzer şartları oluşturmak için bariyer olarak agar tabakası kullanılmıştır. Mukozal membran ve epitelin fonksiyonu agar tabakası ile sağlanmıştır. Bariyer tabakanın kalınlığına bağlı olarak kompozit malzemeden sızan maddelerin hücre tabakasına difüzyonu farklılık gösterebilmektedir. Bariyer tabaka miktarının malzemenin potansiyel toksik etkisini maskelemesini önlemek ve difüzyon aralığının eşit olmasını sağlamak amacıyla agar tabakasının miktarı 10ml olarak belirlenmiştir.

Farklı canlılık testlerinden elde edilen sonuçlar her zaman birbirleri ile ilişkili olmamaktadır. Çünkü kullanılan canlılık testlerinin hedef noktaları farklıdır. Örneğin, nötral kırmızı testi hücrelerin membran bütünlüğünü hedef alırken MTT testi mitokondriyal aktiviteyi hedef alır (150). Bu çalışmada canlı-ölü hücre ayrımının tespitinde nötral kırmızı kullanıldı. Nötral kırmızı plazmadan ve organel membranlarından kolaylıkla geçip lizozomlarda biriken hafif

katyonik bir boyadır. Test ajanlarının neden olduğu membran bütünlüğünün bozulması nötral kırmızının retansiyonunda azalmaya neden olur. Hasarlı veya ölü hücreler sağlıklı kontrol hücrelerine göre renksiz görülürler. Renksiz bölge inhibisyon bölgesi (İB) olarak adlandırılır ve bölgenin genişliği de materyalin toksisitesinin şiddetini belirler (150, 151). Birçok araştırmacı duyarlı ve sayısal bir test metodu olan nötral kırmızı kullanımını tercih etmiştir (150-153).

Franz ve ark. (2003) tepilebilir ve geleneksel kompozitlerin sitotoksisitelerini inceledikleri çalışmada 5mm'lik tabakalar halinde polimerize edilen kompozitlerin toksisitelerinin 2,5mm'liklerden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (154). Bu çalışmanın sonuçları altında mevcut çalışmanın örnekleri 2mm kalınlığında hazırlandı.

Bu çalışmada toksik etkileri araştırılan dolgu materyallerinin hücre kültür ortamına L929 fibroblast kültür hücrelerinin canlılığını olumsuz yönde etkileyecek atık maddenin ortaya çıkmadığı, agar difüzyon testinde yer alan erime indeksi verileri ile saptanmıştır. Rezin modifiye cam iyonomer dolgu materyalinde hafif şiddette sitotoksisite saptanmasına rağmen bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Mohsen ve ark. (1998) polisajlama işlemlerinin kompozitlerin biyouyumluluğunu arttırdığını gözlemlemişlerdir (155). Bizim çalışmamızda da, polisaj işlemi ile yüzeyleri daha düzgün hale getirilebilen poliasit modifiye rezin kompozit ve geleneksel cam iyonomer simanda sitotoksik etki hiç gözlenmezken, polisaj işlemine rağmen yüzeyi pürüzlü olan rezin modifiye cam iyonomer simanda hafif şiddetde sitotoksik etki gözlenmiştir.

Periodontal plastik cerrahi işlemler ile restoratif işlemlerin bir arada başarıyla kullanılmaları için gelecekteki çalışmalar, dolgu materyallerinin karakterizasyonuna odaklanmalıdır. Kimyasal yüzey analiz teknikleri, element salınımının ölçülmesi ve fiziksel yüzey karakterizasyonu ile mikroyapı ve pörözitenin incelenmesi dolgu materyallerinin biyolojik yanıtının anlaşılabilmesini sağlayabilir. Sonuçta çok daha iyi biyolojik özelliklere sahip dolgu materyallerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Üç adet dolgu materyalinin fibroblast ataşmanına etkisinin ve sitotoksik özelliklerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi kullanılarak MTT, SEM analizi ve agar difüzyon yöntemiyle değerlendirildiği bu tez çalışmasından şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. 1. günde hücre proliferasyon düzeyinin poliasit modifiye kompozit rezin dolgu materyali için en yüksek olduğu, hücre proliferasyon düzeyi daha düşük olan cam iyonomer siman ve rezin modifiye cam iyonomer siman dolgu materyalleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlendi (P>0.05).

2. 3. günde poliasit modifiye cam iyonomer siman dolgu materyali için hücre proliferasyonu ortalama değerlerinin 1. güne oranla düştüğü gözlendi. Bu düşüşün nedeninin inkübasyon periodunun uzaması ile materyalden besiyerine artık madde salımının artması olabileceği düşünülmektedir.

3. Cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman ve poliasit modifiye kompozit rezin dolgu materyallerinin sitotoksisite değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (P>0.05).

4. Dolgu materyallerinin 3. gündeki SEM görüntüleri incelendiğinde tüm gruplarda yüzeye tutunan fibroblast yoğunluğunun benzer olduğu gözlendi. Bu durum çalışmamızda incelenen dolgu maddelerinin üzerine yumuşak doku ataşmanının olabileceğinin *in vitro* ortamdaki kanıtıdır.

6. KAYNAKLAR

1. American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontology Terms. (3th ed), Chicago; 2001
2. Keçeli H. G. Estetik periodontal cerrahide bağ dokusu grefti ile trombositten zengin plazmanın bir arada kullanımı. Doktora Tezi, H. Ü. Saglık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007
3. Matter J. Free gingival grafts for the treatment of gingival recession. A review of some techniques. J Clin Periodontol 1982; 9(2): 103-14.
4. Albandar, J. M, Kingman, A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. J Periodontol 1999; 70(1): 30–43.
5. Khocht A, Simon G, Person P, Denepitiya JL. Gingival recession in relation to history of hard toothbrush use. J Periodontol 1993; 64(9): 900-5.
6. Serino G, Wennstrom J. L, Lindhe J, Eneroth, L. The prevalence and distribution of gingival recession in subjects with a high standard of oral hygiene. J Clin Periodontol 1994; 21(1): 57–63.
7. Tugnait, A. ve Clerehugh, V. Gingival recession-its significance and management. J Dent 2001; 29: 381–394.
8. Novaes AB, Ruben MP, Kon S, et al. The development of the periodontal cleft. A clinical and histopathologic study. J Periodontol 1975; 46(12):701-9.
9. Baker DL, Seymour GJ. The possible pathogenesis of gingival recession. A histological study of induced recession in the rat. J Clin Periodontol 1976; 3(4): 208-19.
10. Seichter U. Root surface caries: a critical literature review. J Am Dent Assoc 1987; 115(2): 305-10.
11. Addy M, Mostafa P, Newcombe RG. Dentine hypersensitivity: the distribution of recession, sensitivity and plaque. J Dent. 1987; 15(6): 242-8.
12. Orchardson R, Collins WJ. Clinical features of hypersensitive teeth. Br Dent J. 1987; 162(7): 253-6.
13. Mjör IA, Kvam E. Dental pulp reactions following the exposure of coronal dentine in vivo. Acta Odontol Scand. 1969; 27(2): 145-51.

14. Sandholm L, Niemi ML, Ainamo J. Identification of soft tissue brushing lesions. A clinical and scanning electron microscopic study. J Clin Periodontol. 1982; 9(5): 397-401.

15. Maynard JG Jr, Ochsenbein C. Mucogingival problems, prevalence and therapy in children. J Periodontol. 1975; 46(9): 543-52.

16. Oruç M. Kuronale repozisyone flep tekniği ile tedavi edilen dişeti çekilmesi vakalarında mukogingival hat konumunun uzun dönem klinik değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001

17. Sullivan H. C. ve Atkins J. H. Free autogenous gingival grafts. 3. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. Periodontics 1968; 6: 152–160.

18. Miller PD Jr. A classification of marginal tissue recession. Int J Periodontics Restorative Dent 1985; 5(2): 8-13.

19. Nordland W. P, Tarnow D. P. A classification system for loss of papillary height. J Periodontol 1998; 69: 1124–1126.

20. Dowell, P. ve Addy, M. Dentine hypersensitivity--a review. Aetiology, symptoms and theories of pain production. J Clin Periodontol 1983; 10: 341–350.

21. Reiker J, Van der Velden U, Barendregt D. S, Loos B. G. A cross-sectional study into the prevalence of root caries in periodontal maintenance patients. J Clin Periodontol 1999; 26: 26–32.

22. Novak, M. J. Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. In: Newman, M., Takei, H. ve Carranza, F. A. (eds), Clinical Periodontology WB Saunders, Philedelphia. 2002; pp 64-73

23. Takei, H. H. ve Azzi, R. R. Periodontal plastic and esthetic surgery. . In: Newman M, Takei H, Carranza F. A. (eds), Clinical Periodontology WB Saunders, Philedelphia. 2002; pp 851-75.

24. Gruppe H. E, Warren R. F. Jr. Repair of gingival defects by a sliding flap operation. J. Periodontol 1956; 290-295.

25. Robinson R. E. Utilizing an edentulous area as a donor site in the lateral repositioned flap. Periodontics 1964; 2: 79-85.

26. Gruppe H. E. Modified technique for the sliding flap oparetion. J. Periodontol 1966; 37: 491-494.

27. Cohen D. W, Ross S.E. The double papillae repositioned flap in periodontal therapy. J. Periodontol 1968; 39: 65.

28. Pennel B. M, Higgason J. D, Towner J. D, et al. Oblique rotated flap. J. Periodontol 1965; 36: 3034-309.

29. Bahat O, Handelsman M, Gordon J. The transpositioned flap in mucogingival surgery. Int J Periodontics Restorative Dent. 1990; 10: 472–482.

30. Miller PD Jr. Root coverage grafting for regeneration and aesthetics. Periodontol 2000. 1993; 1: 118-27.

31. Ramfjord S. P. Mucogingival surgery. Ramfjord, S. P. ve Major, M. A. (eds), Periodontology and Periodontics. Modern Theory and Practices. St. Louis, Ishiyaku. 1989; pp 305–25

32. Bernimoulin J. P.Covering of gingival recessions by means of coronal transfer surgery. Deutsche zahnärztliche Zeitschrift 1973; 28: 1222–1226.

33. Zucchelli G, De Sanctis M. Treatment of multiple recessiontype defects in patients with esthetic demands. J Periodontol 2000; 71: 1506–1514.

34. Tarnow D. P. Semilunar coronally repositioned flap. J Clin Periodontol, 1986; 13: 182–185.

35. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. J Periodontol, 1985; 56: 715–720.

36. King K, Pennel B. Photo-Interpretation. J. Periodontol 1967; 38: 684-685.

37. Sedon C. L, Breault L. G, Covington L. L, Bishop B. G. The subepithelial connective tissue graft: part I. Patient selection and surgical techniques. J Contemp Dent Pract 2005; 6: 146–162.

38. Hatipoğlu H, Keçeli HG, Güncü GN, Sengün D, Tözüm TF. Vertical and horizontal dimensional evaluation of free gingival grafts in the anterior mandible: a case report series. Clin Oral Invest 2007; 11: 107–113.

39. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. J Periodontol 1985; 56: 715–720.

40. Harris R. J. A comparison of 2 root coverage techniques: guided tissue regeneration with a bioabsorbable matrix style membrane versus a connective tissue graft combined with a coronally positioned pedicle graft without vertical incisions. results of a series of consecutive cases. J Periodontol 1998; 69: 1426–1434.

41. Raetzke P. B. Covering localized areas of root exposure employing the "envelope" technique. J Periodontol 1985; 56: 397–402.

42. Muller H. P, Stah, M, Eger T. Root coverage employing an envelope technique or guided tissue regeneration with a bioabsorbable membrane. J Periodontol 1999; 70: 743–751.

43. Allen A. L. Use of the supraperiosteal envelope in soft tissue grafting for root coverage. I. Rationale and technique. Int J Periodontics Restorative Dent 1994; 14: 216–227.

44. Zabalegui I, Sicilia A, Cambra J, Gil J, Sanz M. Treatment of multiple adjacent gingival recessions with the tunnel subepithelial connective tissue graft: a clinical report. Int J Periodontics Restorative Dent 1999; 19: 199–206.

45. Dodge J. R, Henderson R. D, Greenwell H. Root coverage without a palatal donor site, using an acellular dermal graft. Periodontal Insights 1998; 5(4): 5–9.

46. Irwin R. K. Combined use of the gingival graft and rotated pedicle procedures: case reports. J Periodontol 1977; 48(1): 38–40.

47. Nelson S. W. The subpedicle connective tissue graft. A bilaminar reconstructive procedure for the coverage of denuded root surfaces. J Periodontol 1958; 58: 95–102.

48. Tözüm TF, Keçeli HG, Güncü GN, Hatipoğlu H, Sengün D. Treatment of gingival recession: comparison of two techniques of subepithelial connective tissue graft. J Periodontol 2005; 76: 1842– 1848.

49. Harris R. J. The connective tissue with partial thickness double pedicle graft: the results of 100 consecutively-treated defects. J Periodontol 1994; 65: 448–461.

50. Bernimoulin J. P, Lusche, B, Muhlemann H. R. Coronally repositioned periodontal flap. Clinical evaluation after one year. J Clin Periodontol 1975; 2: 1–13.

51. Glover M. E. Periodontal plastic and reconstructive surgery. Rose L. F, Mealey B. L, Genco R. J, Cohen D. W. (eds), Periodontics: Medicine, Surgery and Implants. St. Louis: CV Mosby. pp 405-87

52. Pini Prato G, Tinti C, Vincenzi G, et al. Guided tissue regeneration versus mucogingival surgery in the treatment of human buccal gingival recession. J Periodontol, 1992; 63: 919–928.

53. Tinti C, Vincenzi G, Cocchetto R. Guided tissue regeneration in mucogingival surgery J Periodontol 1993; 64: 1184– 1191.

54. Tinti C, Vincenzi G, Cortellini P, Pini Prato G, Clauser C. Guided tissue regeneration in the treatment of human facial recession. A 12- case report. J Periodontol 1992; 63: 554–560.

55. Tinti C, Vincenzi G. P. Expanded polytetrafluoroethylene titanium-reinforced membranes for regeneration of mucogingival recession defects. A 12-case report. J Periodontol 1994; 65: 1088–1094.

56. Paolantonio, M. Treatment of gingival recessions by combined periodontal regenerative technique, guided tissue regeneration, and subpedicle connective tissue graft. A comparative clinical study. J Periodontol 2002; 73: 53–62.

57. Harris R. J. GTR for root coverage: a long-term follow-up. Int J Periodontics Restorative Dent 2002; 22: 55–61.

58. Oles R. D, Ibbott C. G, Laverty, W. H. Effects of citric acid treatment on pedicle flap coverage of localized recession. J Periodontol 1985; 56: 259–261.

59. Kassab MM, Cohen RE, Andreana S, Dentino AR. The effect of EDTA in attachment gain and root coverage. Compendium of Continuing Education in Dentistry, 2006; 27: 353–361.

60. Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE, Lopatin DE. Cell proliferation after flap surgery, root conditioning and fibronectin application. J Periodontol 1987; 58: 661–666.

61. Caffesse R. G, Nasjleti C. E, Anderson G. B, et al. Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. J Periodontol 1991; 62: 21–29.

62. Trombelli L, Scabbia A, Wikesjö UM, Calura G. Fibrin glue application in conjunction with tetracycline root conditioning and coronally positioned flap procedure in the treatment of human gingival recession defects. J Clin Periodontol 1996; 23: 861–867.

63. Rasperini G, Silvestri M, Schenk RK, Nevins ML. Clinical and histologic evaluation of human gingival recession treated with a subepithelial connective tissue graft and enamel matrix derivative (Emdogain): a case report. Int J Periodontics Restorative Dent 2000; 20: 269–275.

64. Trabulsi M, Oh TJ, Eber R, Weber D, Wang HL. Effect of enamel matrix derivative on collagen guided tissue regeneration-based root coverage procedure. J Periodontol 2004; 75: 1446–1457.

65. Sandallı P.(Yazar) Kitap: Periodontoloji. Erler Matbaa, İstanbul, 1981

66. Schüpbach P, Osterwalder V, Guggenheim B. Human root caries: Microbiota of a limited number of root caries lesions. Caries Res 1996; 30: 52-64.

67. Fure S, Zickert I. Prevalence of root surface caries in 55, 65, and 75-year-old Swedish individuals. Community Dent. Oral Epidemiol 1990; 18: 100-105.

68. Corbett M.E, Moore W.J. Distribution of caries in ancient British populations. J. Dent. Res 1971; 50(3): 663

69. Schamschula R.G, Keyes P.H, Hornabrook R.W. Root surface caries in Lufa, New Guinea. I. Clinical observations. J. Am. Dental Assoc1972; 85: 603-608

70. Pine C.M, ten Bosch J.J. Dynamics of and diagnostic methods for detecting small caries lesions. Caries Res 1996; 30: 381-388

71. Ravald N, Birkhed D. Factors associated with active and inactive root caries in patients with periodontal disease. Caries Res1991; 25: 377-384

72. Nyvad B, Kilian M. Microflora associated with experimental root surface caries in human. Inefect. Immun 1990; 58: 1628-1633

73. Uzun H. Yaslıda oral periodontal ve dental yapının klinik histopatolojik ve immünohistolojik incelenmesi. Doktora Tezi, H. Ü. Saglık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1996

74. Sumney D.L, Jordan H.V, Englander H.R. The prevalance of root surface caries in selected populations. J. Periodontol 1983; 44(8): 500-504

75. Fejerskov O, Luan W-M, Nyvad B, Budtz-Jörgensen E, Holm-Pedersen P. Active and inactive root caries lesions in a selected group of 60-to 80-year-old Danes. Caries Res 1991; 25: 385-391.

76. Fure S, Zickert I. Prevalence of root surface caries in 55, 65, and 75-year-old Swedish individuals. Community Dent. Oral Epidemiol 1990; 18: 100-105.

77. Hellyer P.H, Beighton D, Heath M.R, Lynch E. J. Root caries in older people attending a general dental practice in East Sussex. Br. Dent. J 1990; 169: 201-206.

78. Durmuşoğlu Ö. Kök yüzeyi baslangıç lezyonlarının demineralizasyon ve remineralizasyonunun incelenmesi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007

79. Bartlett D, Smith B.G.N. Definition, classification and clinical assesment of attrition, erosion and abrasion of enamel and dentine, 'Tooth Wear and Sensitivity' (Ed. M. Addy, G. Emberry, W.M. Edgar, R. Orchardson), Martin Dunitz Ltd, London 2000; pp 87-92

80. Grippo J.O, Abfraction: A new classification of hard tissue lesion of the teeth, J. Esthet. Dent 1991; 3: 14-19.

81. Çelik Ç. Çürüksüz servikal lezyonlara uygulanan akışkan restoratif materyallerin iki yıllık klinik degerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005

82. Imfeld T. Dental erosion. Definitions, classification and links. Eur. J. Oral Sci 1996; 104: 151-155.

83. Dahl B.L, Krogstad O, Karlsen, K. An alternative treatment in cases with advanced localized attrition, J. Oral Rehabil 1975; 2: 209- 214.

84. Molnar S, Mckee J.K, Molnar I.M, Przybeck T.R, Tooth wear rates among contemporary Australian Aborigines, J. Dent. Res 1983; 62: 562-565.

85. Litonjua L.A, Andreana S, Bush P.J, Cohen R.E, Tooth wear: Attrition, erosion and abrasion, Quintessence Int 2003; 34: 435-446.

86. Zero, D.T., Etiology of dental erosion-extrinsic factors, Eur. J. Oral Sci 1996; 104: 162-177.

87. Watson, I.B., Tulloch, E.N., Clinical assessment of cases of tooth surface loss, Br. Dent. J 1985; 159: 144-148.

88. Akgül, H.M., Akgül, N., Karaoglanoglu, S., Özdabak, N., A survey of the correspondence between abrasions and toothbrushing habits in Erzurum, Turkey, Int. Dent. J 2003; 53: 491-495.

89. Bergström J, Lavestedt S, An epidemiologic approach to toothbrushing and dental abrasion, Commun. Dent. Oral Epid, 7, 57- 64, 1979.

90. Bayne S.C, Thompson J.Y, Taylor D.F, Dental materials, 'Sturdevant's,The art and science of operative dentistry' (4th ed) Mosby Inc.,Missouri, 2002; pp 133-234

91. Lee, W.C., Eakle, W.S., Stress-induced cervical lesions: Review of advances in the past 10 years, J. Prosthet. Dentistry, 75, 487-499, 1996.

92. Osborne-Smith K.L, Burke F.J.T, Wilson N.H.F, The aetiology of the non-carious cervical lesion, Int. Dent. J., 49, 139-143, 1999.

93. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. Br Dent J. 1972 15;132(4):133–135.

94. Mount G.J: Clinical placement of modern glass ionomer cements. Quintessence Int. 1993; 2: 99–107.

95. Mc Lean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. Quintessence Int. 1994; 25: 587–589.

96. Castro A, Feigal FR. Microleakage of a new improved glass ionomer restorative material in primary and permanent teeth. Pediat Dent 2002;24(1):23–28.

97. Hübel S, Mejàre I. Conventional versus resin-modified glass-ionomer cement for Class II restorations in primary molars. A 3 year clinical study. Int J Paediatr Dent. 2003;13(1):2–8.

98. Belli S, Özer F, Bulucu B, Urabe I. Mikrosızıntı tespitinde boya penetrasyon yönteminin, mikroskobik mikroaralık tespiti yöntemi ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi. Selçuk Üniv Diş Hek Fak Derg. 1998;8(2): 113–118.

99. Yoshida K, Atsuta M. Properties of fluoride-releasing light-activated resin cement. Dent Mater. 1999;15: 337–341.

100. Burgess JO, Walker R, Davidson JM. Posterior resin-based composite: review of the literature. Pediatr Dent. 2002; 24(5): 465–479.

101. Smith D.C. Tissue Reaction to Noble and Base Metal Alloys. In: Biocompatibility of Dental Materials. CRC Press, Inc., 1982; pp 51-77

102. Edgerton M, Levine JM. Biocompatibility: It's future in prosthodontic research. J Prosthet Dent 1993; 69: 406-415

103. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996; 12: 186-193

104. Freshney RI. Animal Cell Culture: A Practical Approach. IRL Pres Limited, Oxford, 1986

105. Özdemir G.K. Farklı yumuşak astar mataryellerinin sitotoksisitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007

106. ISO 10993 part 5, 1999. International Standard 10993 "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods." International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999

107. Schmalz G. Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations. J Dent 1994; 22(2): 6-11.

108. Edgerton M, Levine JM. Biocompatibility: It's future in prosthodontic research. J Prosthet Dent 1993;69: 406-415.

109. Deliağa N. Farklı Estetik Materyallerle Hazırlanan Protetik Restorasyonların Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2002

110. Tunçel A. Sabit protetik restorasyonlarda kullanılan farklı fiberle güçlendirilmiş kompozit yapıların yüzey sertliği, yüzey pürüzlülüğü ve sittoksisitelerinin karşılaştırmalı olaral incelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2005

111. Hensten-Pettersen A. Comparison of the Methods Available for Assessing Cytotoxicity. Int Endod J 1988; 21: 89-99.

112. Wennberg A. In Vitro Assessment of the Biocompatibility of Dental Materials-the Millipore Filter Method. Int Endod J 1988; 21: 67-71.

113. Spangberg LS, Al-Nazhan SA. The Radiochromium Release Method for Evaluation of Cytotoxicity In Vitro. Int Endod J 1988; 21: 72-78.

114. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M Jr. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. Int Dent J 1968; 18: 443-467.

115. Kehe K, Reichl FX, Durner J, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. Biomaterials 2001; 22: 317-322.

116. Kildal KK, Ruyter L. How different curing methods affect the degree of conversion of resin based inlay/onlay materials. Acta Odontol Scand 1994; 52: 315-322.

117. Smith DC, Williams DF. Biocompatibility of Dental Materials. Vol II, Boca Raton Crc, Florida, 2001

118. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. J Prosthet Dent 2001; 86: 203-209

119. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. J Oral Rehabil 1994; 21: 441-452

120. Pourabbas R, Chitsazi MT, Kosarieh E, Olyaee P. Coronally advanced flap in combination with acellular dermal matrix with or without enamel matrix derivatives for root coverage. Indian J Dent Res. 2009; 20(3): 320-5.

121. Douglas A.T, Micheal K.M, Edward, M, et al. Perioesthetic approach to the diagnosis and treatment of carious and noncarious cervical lesions: Part 2. J Esthet Restor Dent, 2003; 15: 284-296.

122. Raffaelli L, Rossi Iommetti P, Piccioni E,et al. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspatic ceramics in vitro. J Biomed Mater Res A. 2008; 86(4): 959-68.

123. Martins TM, Bosco AF, Nóbrega FJ, et al. Periodontal tissue response to coverage of root cavities restored with resin materials: a histomorphometric study in dogs. J Periodontol. 2007; 78(6): 1075-82.

124. Sasanaluckit P, Albustany KR, Doherty PJ, Williams DF. Biocompatibility of glass ionomer cements. Biomaterials. 1993;14(12):906-16.

125. Oliva A, Della Ragione F, Salerno A, et al. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. Biomaterials. 1996; 17(13): 1351-6.

126. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick A, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. Biomaterials. 1998;19(6):559-64.

127. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. Eur J Oral Sci. 1996;104(3):292-9.

128. Lan WH, Lan WC, Wang TM,et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. Oper Dent. 2003; 28(3): 251-9.

129. Alkan A, Keskiner I, Yuzbasioglu E. Connective tissue grafting on resin ionomer in localized gingival recession. J Periodontol. 2006; 77(8): 1446-51.

130. Deliberador TM, Bosco AF, Martins TM, Nagata MJ. Treatment of gingival recessions associated to cervical abrasion lesions with subepithelial connective tissue graft: a case report. Eur J Dent. 2009;3(4):318-23.

131. Kılıç K. Tam seramik alt yapı materyallerinin sitotoksisitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2010

132. Browne RM. The In Vitro Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials. Does It Have a Role? Int Endod J 1988; 21: 50-58.

133. Wennberg A. In Vitro Assessment of the Biocompatibility of Dental Materials-the Millipore Filter Method. Int Endod J 1988; 21: 67-71.

134. Al RH, Dahl JE, Morisbak E, Polyzois GL. Irritation and Cytotoxic Potential of Denture Adhesives. Gerodontology 2005; 22: 177-183.

135. Nishijima M, Hashimoto Y, Nakamura M. Cytocompatibility of New Phthalate Ester-Free Tissue Conditioners In Vitro. Dent Mater J 2002; 21: 118-132.

136. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. Clin Oral Investig 1997; 1: 154-162.

137. Nahid M, Bottenberg P. Importance of Cell Cultures in Biocompatible Dental Materials Research. Rev Belge Med Dent 2003; 58: 189–196.

138. Spangberg LSW. The Study of Biological Properties of Endodontic Biomaterials in Experimental Endodontics, Spangberg LSW, CRC Pres, Baco Raton, Florida, 1990

139. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. J Dent Res 1995; 74(8): 1513-20.

140. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic Effect of Methyl Methacrylate on 4 Cultured Fibroblasts. Int J Prosthodont 2000; 13: 311–315.

141. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 Mouse Fibroblasts, Primary and Immortalized Bovine Dental Papilla-Derived Cell Lines to Dental Resin Components. Dent Mater 2002; 18: 318–323.

142. Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of Candida albicans to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96(2): 201-6.

143. Lucchesi JA, Santos VR, Amaral CM, Peruzzo DC, Duarte PM. Coronally positioned flap for treatment of restored root surfaces: a 6-month clinical evaluation. J Periodontol. 2007;78(4): 615-23.

144. Dragoo MR. Resin-ionomer and hybrid-ionomer cements: part II, human clinical and histologic wound healing responses in specific periodontal lesions. Int J Periodontics Restorative Dent. 1997; 17(1): 75-87.

145. Al-Qathami H, Balto H, Al-Nazhan S, Siddiqui Y. Effect of root perforation repair materials on morphology and attachment behaviour of human PDL fibroblasts invitro. Saudi Dental Journal, 2004; 16: 113-117.

146. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(3): 22-5.

147. Karanika-Kouma A, Dionysopoulos P, Koliniotou-Koubia E, Kolokotronis A. Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins. J Oral Rehabil 2001; 28: 157-160.

148. Larsson KS. Screening tests for systemic effects of dental materials. J Dent 1994;22:12-15.

149. Tunçel A. Sabit protetik restorasyonlarda kullanılan farklı fiberle güçlendirilmiş kompozit yapıların yüzey sertliği, yüzey pürüzlülüğü ve sittoksisitelerinin karşılaştırmalı olaral incelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2005

150. Cao T, Saw TY, Heng BC, et al. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. J Appl Toxicol 2005, 25:101-108.

151. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Milipore fitle, agar difüzyon, and MTT tests. J Prosthet Dent 2000; 84: 229-236.

152. Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. Toxicol In Vitro 2005; 19: 145-154.

153. Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. Acta Odontol Scand 1999; 57: 316-322.

154. Franz A, König F, Anglmayer M, et al. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. Dent Mater 2003; 19: 382-392.

155. Mohsen NM, Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of urethane dimethacrylate components before and after aging and leaching J Biomed Mater Res 1998; 39: 252-260.