

Kompozit Materyallerin Gingival Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Investigation of the Cytotoxic Effect of Composite Materials on Gingival Fibroblast Cells

^aAli TAGHIZADEHGHALEHJOUGHİ^a,
^bElif OK^b,
^cHakan KAMALAK^c

^aTıbbi Genetik ABD,
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Erzurum, TÜRKİYE

^bÇocuk Diş Hekimliği ABD,
Fırat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Elazığ, TÜRKİYE

^cRestoratif Diş Tedavisi ABD,
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi,
Kahramanmaraş, TÜRKİYE

Received: 12 Oct 2018

Received in revised form: 30 Jan 2019

Accepted: 03 Feb 2019

Available online: 18 Feb 2019

Correspondence:

Elif OK

Fırat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,

Çocuk Diş Hekimliği ABD, Elazığ,

TÜRKİYE/TURKEY

eok@firat.edu.tr

ÖZET Amaç: Oral dokularla temas eden restoratif materyaller bu dokularda inflamatuvar, alerjik, toksik, mutajenik ve karsinojenik reaksiyonlara neden olabilmektedirler. Bu nedenle biyouyumlu-
luk restoratif materyallerde ön planda tutulması gereken bir faktördür. Bu çalışmada rezin içerikli
dolgu materyallerinin, dişeti fibroblast kök hücrelerine sitotoksik etkilerinin 3-(4,5-dimetiltiyazol-
2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. **Gereç ve**
Yöntemler: Çalışmada, yeni nesil (bir adet bulk fill, bir adet supra-nanohibrid, iki adet nanohibrid,
iki adet mikrohibrid) altı farklı kompozit materyal kullanıldı. Çalışma grupları; XF: X-tra Fill (Voco-
Almanya), GA: G-ænial Posterior (GC Tokyo Japonya), ES: Estelite Sigma Quick (Tokuyama-Ja-
ponya), GO: Grandio (Voco-Almanya), AB: Arabesk (Voco-Almanya) ve PS: Polofil Supra
(Voco-Almanya) olarak hazırlandı. Her materyal için örnek sayısı 12 olarak belirlendi (n=12). Ör-
nekler teflon kalıplar kullanılarak hazırlandı. GFBCs'lerin 72 saat süreyle örneklerle teması sonucu
hücre canlılık oranları MTT analiziyle değerlendirildi. **Bulgular:** Grupların hücre canlılık oranları
(%) sırasıyla; PS>AB>GO>ES>XF>GA olarak saptanmıştır. **Sonuç:** Bir materyalin sitotoksitesinde;
materyalin yapısı, içerdiği (doldurucu) oranı, monomer tipi, doldurucu içeriği gibi faktörlerin bir
bütün olarak etkili olduğu, trietilen glikol dimetakrilat, etilen glikol dimetakrilat monomer varlı-
ğının materyalin potansiyel toksisite olasılığını artıran monomerler olduğu, doldurucu içeriğine
eklenen parçacıkların (Fluro-alüminosilikat partikülleri, iterium trifluoride parçacıkları vb.) sito-
toksositeyi etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kompozit rezin; kök hücre; hücre canlılığı; sitotoksosite; MTT analizi

ABSTRACT Objective: Restorative materials in contact with oral tissues may cause inflammatory,
allergic, toxic, mutagenic and carcinogenic reactions in these tissues. Therefore, biocompatibility
factor is a factor that must be kept in foreground in restorative materials. The aim of this study was
to evaluate the cytotoxic effects of resin-containing filler materials on gingival fibroblast stem cells
by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analysis. **Material and**
Methods: Six different composite materials of the new generation (one bulk fill, one supra-nanohy-
brid, two nanohybrid, two micro-hybrid) were used in the study. The study groups were prepared
as XF: X-tra Fill (Voco-Germany), GA: G-ænial Posterior (GC Tokyo Japan), ES: Estelite Sigma
Quick (Tokuyama-Japan), GO: Grandio (Voco-Germany), AB: Arabesque (Voco-Germany) and PS:
Polofil Supra (Voco-Germany). The number of samples for each material was determined as 12
(n=12). Samples were prepared by using teflon molds, and cell viability rates were evaluated by
MTT analysis as a result of contact of the GFBCs with the samples for 72 hours. **Results:** Cell vi-
ability rates of the groups were as follows; PS> AB> GO> ES> XF> GA. **Conclusion:** The structure of
the material, the rate of the monomer, the type of monomer and the content of the filler are ef-
fective for the cytotoxicity of a material as a whole. The presence of triethylene glycol dimethacry-
late and ethylene glycol dimethylacrylate monomers which increase the potential for toxicity of the
material, and the contents of the filler (Fluroalümino silicate particles, iterium trifluoride particles,
etc.) can affect the cytotoxicity.

Keywords: Composite resin; stem cell; cell viability; cytotoxicity; MTT assay

Restoratif diş hekimliğinin hedefi; diş dokularının bütünlüğünün ve devamlılığının korunması, kaybedilmiş olan estetik ve fonksiyonun geri kazandırılmasıdır. Bir taraftan kaybedilen dokuların devamlı-

lığı sağlanır iken, diğer yandan var olan dokulara zarar vermemek temel ilke olmalıdır.¹ Rezin esaslı kompozitlerin restoratif diş hekimliğinde yer edinmesi, geçtiğimiz yüzyılın diş hekimliğindeki en önemli gelişmelerinden olmuştur. Günümüzde kullanılan kompozit materyaller; farklı rezin monomerler, inorganik doldurucular ve ara bağlayıcı ajanlardan oluşmaktadır. Son yıllarda rezin kompozitlerde meydana gelen yeni gelişmelerde, temelde polimerizasyon bütülmesini azaltmaya; aşınma dayanımı, renk stabilitesi gibi kullanım özelliklerini ve biyouyumluluğu artırmaya odaklandı. Gözlenmektedir.²

Oral dokularla temas eden restoratif materyaller bu dokularda alerjik, toksik, mutajenik, karsinogenik ve inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilmektedirler.³ Kompozitlerin dezavantajlarından olan yetersiz polimerizasyon; kompozitin mekanik özelliklerini negatif yönde etkileyeceği gibi uygulama sonrasında pulpada ve oral kavitede temas ettiği yumuşak dokularda sitotoksikiteye neden olabilecek serbest rezin monomerlerin salınmasına yol açmaktadır. Bu nedenlerden dolayı biyouyumluluk, restoratif materyallerde ön planda tutulması gereken bir faktördür.⁴⁻¹⁰

Sitotoksik maddelere maruz kalan hücreler, stostazis sebebiyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilmekte veya apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucunda ölebilmektedirler.¹¹ Deneysel olarak biyolojik, kimyasal ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, sitotoksikite çalışmalarının en önemli basamağıdır.¹² Hücrelerin canlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılan çeşitli metotlar mevcuttur. Sitotoksikite çalışmasının metodu ne olursa olsun, çalışmanın sonundaki canlı/ölü hücre miktarı belirleyici etkidir.¹³ Sitotoksikite belirleme metotları; kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler olarak sıralanmaktadır.¹⁴⁻¹⁶ Kolorimetrik metotlar; tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği esasına veya kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayanan yöntemlerdir.^{13,17-19} Heterosiklik organik yapıda bileşikler olan tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenerek, sonucunda formazan isimli ya-

şıya dönüşmeleri sağlanmakta ve renk değişikliği meydana gelmektedir. Oluşan renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçümü sonucunda canlı/ölü hücre oranları saptanmaktadır. Tetrazolyum halkasının aktif mitokondriler tarafından kırılabilmesi, renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücrelerin meydana getirebilmesi demektir; dolayısıyla cansız hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini yitirmişlerdir ve herhangi bir renk değişikliği meydana getiremezler. İn vitro bu mekanizma, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik açıdan önemli hâle getirmiştir.²⁰⁻²² Tetrazolyum bileşiklerinden olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) pozitif yüklü bir bileşiktir. Hücre membranını kolaylıkla aşarak hücre içinde indirgenerek suda çözünmez nitelikte formazan kristallerine dönüşmekte ve ortamda çökelerek kendini göstermektedir.²³

Bu çalışmada, rezin içerikli dolgu materyallerinin [X-tra Fill (Voco-Almanya), G-ænial Posterior (GC Tokyo-Japonya), Estelite Sigma Quick (Tokuyama-Japonya), Grandio (Voco-Almanya), Arabesk (Voco-Almanya) Polofil Supra (Voco-Almanya)], diş eti fibroblast kök hücrelerine sitotoksik etkisinin metabolik aktivite temelli proliferasyon testi (MTT analizi) ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın etik kurul onayı, Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınmıştır (2016/Toplantı No: 03-Karar No: 02).

ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Çalışmada, yeni nesil altı farklı kompozit materyali [X-tra Fill (Voco-Almanya), G-ænial Posterior (GC Tokyo-Japonya), Estelite Sigma Quick (Tokuyama-Japonya), Grandio (Voco-Almanya), Arabesk (Voco-Almanya), Polofil Supra (Voco-Almanya)] kullanıldı. Kullanılan materyallere ait bilgiler ve çalışma grupları **Tablo 1**'de görülmektedir. Power analizi sonucunda örneklem sayısı her materyal için 12 olarak belirlendi (n=12). Kaviteye 2 mm kalınlığında uygulanabilen kompozitler için 2x6 mm'lik, 4 mm uygulanabilen bulk fill kompozit için ise 4x6 mm'lik

TABLO 1: Çalışmada kullanılan kompozit rezinlerin bilgileri.

Materyal adı	Üretici firma	Materyal tipi	Matris tipi	Doldurucu içeriği	Doldurucu yüzdesi	
					ağırlık/hacim	Renk
X-tra Fill (XF)	Voco-Almanya	Bulk fill kompozit	BisGMA, UDMA, TEGDMA	Zirkonya, silika parçacıkları iterium trifluoride	86	A1
G-ænial Posterior (GA)	GC Tokyo-Japonya	Nanohibrid kompozit	UDMA, dimetakrilat ko-monomerleri	Fluroalümino silikat partikülleri	65	A1
Estelite Sigma Quick (ES)	Tokuyama-Japonya	Supra-nanohibrid kompozit	BisGMA,TEGDMA	Küresel silika, zirkonyum partikülleri	82	A1
Grandio (GO)	Voco-Almanya	Nanohibrid kompozit	BisGMA, TEGDMA	Cam seramik partikülleri	87	A 1
Arabesk (AB)	Voco-Almanya	Mikrohibrid kompozit	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, EGDMA	Cam seramik partikülleri	76,5	A1
Polofil Supra (PS)	Voco-Almanya	Mikrohibrid kompozit	Bis-GMA, Di ürethan dimetakrilat, BHT, HEMA, UDMA	Silika cam partikülleri	76,5	A1

standart teflon kalıplar kullanıldı. Kalıpların içerisine materyaller yerleştirildikten sonra alt ve üst yüzeyler strip bantlar ve cam lamalar kullanılarak düzleştirildi. Örnekler, LED ışık cihazıyla (Elipar Freelight II, 3M-ESPE, St. Paul, MN, ABD) 20/40 sn (430-480 nm, ışık yoğunluğu 1.000 mW/cm²) süreyle üretici firmaların talimatlarında belirtildiği şekillerde polimerize edildi. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra kenarlar ve yüzeyler polisaj diskleri ile düzeltildi (Soft-Lex; 3M ESPE, St. Paul, MN, ABD).

HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

Jinjival Fibroblast Kök Hücrelerin Hazırlanması

GFBCs'ler ATCC firmasından (katalog numarası: PCS-201-018) temin edildi. Krayo falkonlarda gelen hücreler seri şekilde normal oda sıcaklığında çözdürüldü. Hücreler çözüldükten sonra 25 cm² yüzey alanına sahip kültür kapları (flask) içine besi yeri (low glucose DMEM/f12 (Dulbecco's Modified Eagle's), %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 anti-biyotik (pensilin-streptomisin-amfoterisin B içeren) ile birlikte ekildi. Her üç günde bir medyum (besi ortamı) değişikliği uygulandı. Kültürler günlük olarak kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu ve morfolojisi inverted ışık mikroskopu kullanılarak gözlemlendi. Hücreler flaskın %80'ini kaplayınca pasaj işlemi yapıldı. Bunun için hücrelerin medyumunu atılarak uzaklaştırıldı. Flask, steril PBS (Phosphate Buffered Saline) (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen)

yen) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²lik flaska 0,4 cc Tripsin/etilendiamin tetraasetik asit eklendi ve hücrelerin tabandan ayrılması için hücre kapları 5 dk inkübatörde bekletildi. Inkübatörden alınan hücre kabında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopla kontrol edilerek, flaska 1:1 oranında FBS (FBS, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Almanya) ilave edildi ve flaskın solüsyonunda yüzen hücreler steril tüpe alarak 1.200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Pellet oluşturan hücrelerin üst serum sıvısı atıldıktan sonra, taze medyum ilave edildi ve kuyucuklu plakalara 100 µL gelecek şekilde hücre ekimi işlemi yapıldı ve hücre dağılımının homojen olmasına özen gösterildi. Her kuyucuk başına 1×10⁵ hücrenin gelmesi sağlandı. Plakalar 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübatörde bekletildi.

Hücre Üretme Kaplarının Hazırlanması

Yüzeyi %90-95 oranında kaplayan aktif logaritmik üreme tarzındaki hücreler, pasajlama işlemine benzer biçimde flask tabanından ayrıldı ve taze besi ortamıyla hücre süspansiyonu hazırlandı. Materyallerin yerleştirileceği kuyucuklu plakaların tüm bölmelerine, hazırlanmış olan 200 mL hücre süspansiyonu eşit şekilde dağıtıldı. Kültür ortamındaki DMEM medyumunu beşinci günde aspire edilerek uzaklaştırıldı. Taze medyum ilavesinin ardından örnekler tekrar inkübasyona bırakıldı. %5 CO₂'li ve 37°C'de nemli ısıdaki yedi günlük inkü-

basyonun ardından, hücrelerin plakların gözlerini tamamen doldurup doldurmadığı ve fibroblastların iğsi karakteristik yapısı mikroskop ile incelendi. Ultraviyole (UV) ışık altında 2 saat boyunca sterilize edilen kompozit örnekler; tek tek, steril presel yardımıyla, steril kabinde hücrelerle doğrudan temas edecek biçimde hücre üretme kaplarına taşındı. 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda analizler yapıldı.

MTT Analizi

MTT analizi, hücresel metabolik aktivitenin hassas ve güvenilir bir göstergesidir. Analiz, sarı suda çözünür tetrazolyum tuzu olan MTT'nin azalması esasına dayanmaktadır. MTT testi 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat inkübasyon periyodu sonunda uygulandı. Dört saatlik MTT inkübasyonundan sonra, mavi formazan kristalleri (optik mikroskopta hücre içinde görülebilir) dimetil sülfoksit (sigma, ABD) ilave edilerek çözündürüldü. Aktif metabolizması olan canlı hücreler, MTT'yi 550 nm dalga boyuna yakın bir absorban ile mor renkli bir formazan ürününe dönüştürdü. Absorbans değeri bir spektrofotometre cihazı (µQuant, BadFriedrichshall, Biotek) ile okundu ve canlı hücre sayısı elde edildi. Canlı hücre seviyelerini belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\% \text{ Canlılık oranı} = (\text{Örnek absorban değeri}) / (\text{Kontrol grubu absorban değeri}) \times 100.$$

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde power analizinden yararlanıldı (n=12). Çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirmesinde istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Verilerin analizinde, değişkenlerin kontrol grubu ile olan etkileşimlerini saptamak için tek yönlü ve iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 ve p<0,001 seviyelerinde değerlendirildi.

BULGULAR

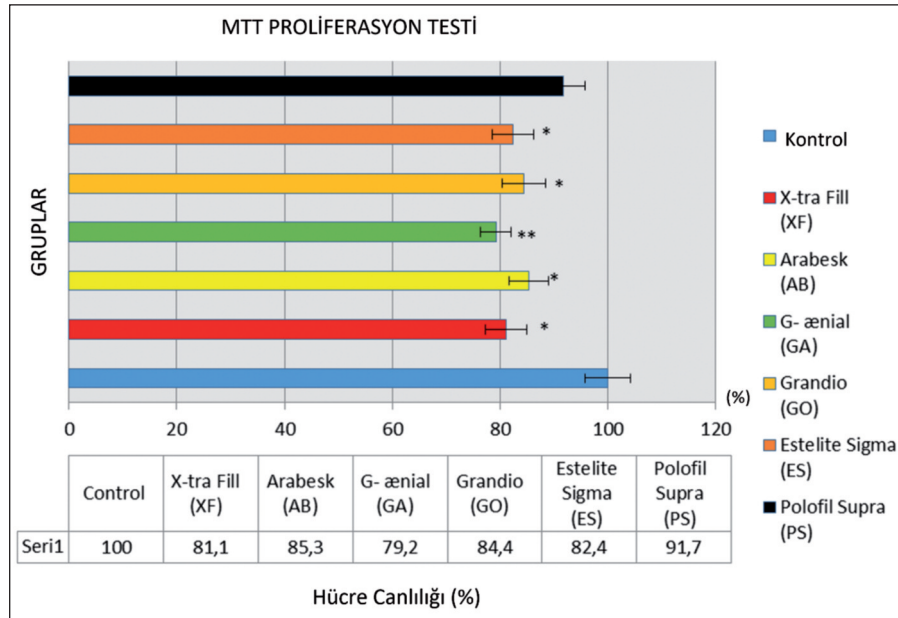
Farklı kompozit rezinlere maruz kalan jinjival fibroblast kök hücrelerindeki % canlılık değerlerinin 72 saat sonundaki MTT analizi sonuçları ve istatis-

tiksel sonuçları Şekil 1'de görülmektedir. Değerler % ortalama olarak ifade edildi (n=12).

Buna göre; AB, GO, ES, XF ve GA gruplarındaki hücre canlılığında azalma oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05*/p<0,01**). Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir materyal uygulanmadığından hücreleri 100'e oranlandı. Şekil 1 incelendiği zaman, PS grubunda hücre canlılığının %91,7 olarak en yüksek seviyede olduğu ve canlı hücre %'sinde kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı gözlemlendi. GO, ES, XF ve GA gruplarında ise hücre canlılığında azalma olduğu saptandı. Grupların hücre canlılık oranları sırasıyla; PS>AB>GO>ES>XF>GA olarak belirlendi.

TARTIŞMA

Biyouyumluluk, hücrelerin hasara uğramadan materyallerle bir arada varlığını devam ettirebilmesidir.²⁴ Rezin esaslı materyallerin biyouyumluluğunun; materyalden salınan organik maddelerin miktarı, doldurucu içeriği, doldurucu yapısı ve yüzdesiyle ilişkili olduğu; yetersiz polimerizasyona ve çözünmelere bağlı olarak rezin matriksten salınan içeriğin sitotoksositeye yol açabileceği belirtilmiştir.²⁴⁻²⁶ Kompozit rezinler, restorasyon yıkım ürünlerinin uzun süreli; polimerize olmamış monomerlerin kısa süreli salınımına yol açan hidrolitik ve hidroskobik etkilere çeşitli derecelerde duyarlı polimer ağları içermektedirler.^{24,27-29} Monomer-polimer dönüşümünün yetersiz olması, aynı zamanda kompozitlerden salınan artık monomerlerin ağız ortamına salınarak komşu oral dokuları etkilemesiyle sonuçlanmaktadır.³⁰ Bu durumun; lokal veya sistemik toksisite, alerjik ve östrojenik etkiler gibi biyolojik reaksiyonlara sebep olabileceği belirtilmiştir.^{24,31-34} Oral dokular ile restorasyonlar arasındaki direkt etkileşim biyouyumluluğu etkileyebilmektedir. Plak ve jinjival indekslerde olduğu gibi sondlanabilen cep derinliğinin de beş-altı yıllık direkt kompozit rezin restorasyonlara komşu bölgelerde yüksek bulunduğu bildirilmiştir.³⁵ Bu bilgilerden hareketle, bu çalışmada, farklı doldurucu oranları ve içeriklerindeki yeni nesil kompozit materyallerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Materyallerin sitotoksik etki-



ŞEKİL 1: Farklı kompozit materyallerine maruz kalan hücrelerin % canlılık oranları ($p < 0,05^*$ / $p < 0,01^{**}$).

lerini araştırırken farklı teknik ve metotların araştırmacılar tarafından kullanıldığı gözlenmektedir. İn vitro testler, diğer biyoyumluluk testlerine kıyasla; kısa sürede sonuçlandırılabilir olmaları, hayvan deneyleri veya klinik kullanım testlerinden daha az masraflı olmaları, kontrol ve standardize edilebilirliği, geniş çapta taramaya iyi uyum sağlamaları gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu nedenle, çalışmamızda da jinvial fibroblast kök hücrelerinde oluşan sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde in vitro MTT analizi kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan Led ışık cihazının gücü ve kompozit örneklerin 2 saat UV steril edilmesi, kompozitlerin polimerizasyon derecesini ve kompozitlerin hücre canlılığını değiştirmemektedir. Kamalak ve ark., dolgu materyallerinin yapısal özellikleri, ısıl iletkenliği, diferansiyel termal analizi, termo-gravimetrik analizi, yüzey homojenliğini, mikro sertliğini inceledikleri çalışmada, rezin materyallerini 30-850°C arasında ısıya maruz bırakmışlardır.^{31,36} Kompozitlerin metalik ve organik bağlayıcı gibi çok fazlı bileşenlere sahip olduğunu, yapısal bütünlüğünün 700°C'den sonra bozulduğunu saptamışlardır. UV ile sterilizasyonda bu oranda yüksek ısının çıkması söz konusu olmadığından, materyallerin yapısında bir değişiklik görülmesi söz konusu değildir.

Bazı çalışmalarda, temas sürelerinin materyallerin sitotoksitesisi üzerinde etkili bir faktör olduğu rapor edilmiştir. Kompozit materyallerinin uygulandıkları ilk 24 saat içerisinde meydana gelen toksik etkide zamanla artış görülmüştür.³⁷ Yapılan bir in vitro çalışmada, hemen kullanılan materyallerin, 48 saat süreyle yapay tükürükte bekletilen materyallerden daha yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir.^{37,38} Çalışmamızda, materyallerin 72 saat sonra gözlemlenen sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve PS grubu dışındaki gruplarda meydana gelen canlılık oranlarındaki azalmanın ve dolayısıyla sitotoksik etkinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür.

Caugman ve ark.nın çalışmasında, kompozitlerdeki yüksek doldurucu oranının, organik materyals yüzdesini azaltmasının biyoyumluluğu olumlu yönde etkileyeceği bildirilmiştir.³⁹ Longo ve ark., metakrilat bazlı nanohibrid yapıda (doldurucu oranı: %82) ve siloran bazlı mikrohibrid yapıda iki kompozitin (doldurucu oranı %76) hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında ise monomer yüzdesi daha düşük olmasına rağmen nanohibrid yapıdaki metakrilat bazlı kompozitte daha düşük hücre canlılığı oranlarına rastlandığını bildirmişlerdir.⁴⁰ Gonçalves ve ark., farklı yapılarıdaki konvansiyonel ve bulk-fill kom-

pozitlerin insan fibroblastları üzerindeki sitotoksitesini inceledikleri bir çalışmada; en yüksek hücre canlılık oranı, en yüksek oranda doldurucu, en düşük oranda monomer içeren bulk-fill kompozitten elde edilmiş olup, monomer oranının doğrudan sitotoksitesite üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.⁴¹ Bununla birlikte, benzer monomer oranlarındaki konvansiyonel kompozitler ve bulk-fill kompozitlerin eşit kalınlıkta polimerizasyonu sonucunda (4 mm) bulk-fill kompozitlerde daha yüksek hücre canlılığı elde edildiği saptanarak, konvansiyonel kompozitlerin 2 mm'den fazla kalınlıkta uygulanmaması gerektiğinin biyoyumluluk açısından da oldukça önem arz ettiği bilgisi doğrulanmıştır.

Çalışmamızda, kompozit rezin materyalinin hücre canlılık oranlarına bakıldığı zaman doldurucu içeriği ve yüzdesi daha fazla olan XF grubunda, doldurucu yüzdesi ve içeriği daha az olan PS grubuna göre hücre canlılığı daha az bulunmuştur. Bunun sebebi olarak, kompozit materyallerinin doldurucu içeriğinin azalmasının daha fazla monomerin polimerize olması sonucunda artık monomer miktarının azalması olabileceği düşünülmektedir. XF grubunda doldurucu yüzdesinin fazla olmasının yanında doldurucu içeriğinin de fazla olması, artık monomer miktarının artmasına ve bu materyalin daha fazla toksik etki göstermesine neden olmuştur.

Çalışmamızda, GA grubunda hücre canlılığının daha az olmasının sebebi; bu gruba uygulanan kompozit materyalin doldurucu yüzdesinin düşük, monomer yüzdesinin ise yüksek olmasına bağlanmıştır. Mikrohibrid yapıdaki kompozitlerin uygulandığı PS ve AB gruplarından elde edilen hücre canlılık değerlerinin; nanohibrid (GO, ES, GA) ve bulk-fill yapıdaki kompozitin uygulandığı (XF) gruplardan elde edilen canlılık değerlerinden daha yüksek gözlenmesi; materyalin hibrid yapısının da sitotoksitesite üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bisfenol-A glisidil metakrilat (Bis-GMA), trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) ve üretan dimetakrilat (UDMA) gibi hidrofobik ve hidroksi etilmetakrilat (HEMA) gibi hidrofilik monomerler, polimerize rezinlerden salınarak hücrelerde olumsuz yan etkilere neden olabilmektedir. HEMA monomerinin TEGDMA, BIS-GMA ve UDMA'dan

daha az sitotoksik olduğu bildirilmiştir.⁴² Kompozit rezinlerin monomer tipi ve boyutunun artık monomer salınımında etkili bir faktör olduğu, küçük moleküllerin büyüklerden daha hızlı ve anlamlı derecede daha yüksek oranda salınımına uğradığı bildirilmiştir.⁴³ TEGDMA'nın, Bis-GMA'ya oranla daha düşük moleküler ağırlığa sahip ve daha hareketli bir molekül olduğu, artık monomer olarak da ortama daha hızlı salındığı saptanmıştır.⁴⁴ Yapılan araştırmalarda, sıvı ortamda hidrofilik monomerlerin daha yüksek oranda salındığı gözlenmiştir.⁴⁵⁻⁵⁰

Kanjevac ve ark., flor salınımı yapan dental materyallerin sitotoksik etkilerini inceledikleri bir çalışmada; flor salınım oranının artmasıyla hücre canlılığında meydana gelen azalmanın daha yüksek olduğunu saptayarak flor salınımını sitotoksitesite ile ilişkilendirmişlerdir.⁵¹ Botsalı ve ark., farklı yapılarıdaki restoratif materyallerin monomer salınımlarını ve fibroblast hücreleri üzerinde meydana getirdikleri sitotoksik etkileri değerlendirdikleri çalışmada; salınan monomer türüne ve miktarına ek olarak; materyallerin organik ve kimyasal yapısının, doldurucuların miktarı, büyüklüğü ve dağılımının da elde ettikleri sitotoksik sonuçlarda etkili olabileceğini bildirmişlerdir.⁵² Çalışmamızda, GA ve XF gruplarında diğer çalışma gruplarına göre hücre canlılığın daha düşük oranlarda bulunması; direkt olarak flor salınımı ile öne çıkan materyaller olmasa da bu gruplara uygulanan kompozit rezinlerin doldurucu içeriğindeki florit bileşenlerinin (iterium trifluorid, fluoro-alüminosilikat partikülleri) diğer faktörlerle birlikte sitotoksitesiteyi etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Attik ve ark., farklı içerik ve yapılarıdaki kompozit materyallerin jinvial fibroblastlar üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirdikleri kapsamlı bir çalışmada; rezin monomer oranıyla sitotoksitesite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu, rezin monomer içeriğinin de oranı kadar etkin rol oynadığını, ayrıca inorganik doldurucu yapısının da kompozitlerin biyoyumluluğu üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır.⁵⁰ Ek olarak, TEGDMA varlığının BiSGMA'ya oranla sitotoksitede daha etkili olduğu bildirilmiştir. TEGDMA içeren tüm kompozitlerde canlılık oranının anlamlı derece düştüğü gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda, aynı markaya ait, her ikisi de mikrohübrid yapıda olup doldurucu ve monomer oranları aynı olan iki farklı kompozitin uygulandığı PS ve AB gruplarında hücre canlılığının farklı oranlarda bulunmasının; matriks tipindeki farklı monomer içerikleri nedeni ile olduğu düşünülmektedir. AB grubunda, PS grubundan farklı olarak TEGDMA ve EGDMA monomerlerinin varlığının, materyalin sitotoksitesinde doğrudan etkili potansiyel toksite olasılığını artırdığı düşünülmektedir. Buna paralel olarak da doldurucu yüzdeleri daha yüksek olmasına karşın daha sitotoksik sonuçların bulunduğu GO, ES, XF gruplarındaki hücre canlılığında (%18, %18, %19) gözlenen azalmanın; matriks monomerlerinin yapısıyla, materyalin hibrid tipiyle ve doldurucu içeriğindeki farklı parçacıkların (küresel silika, zirkonyum partikülleri, iterium trifluorid, fluoro-alüminosilikat partikülleri) varlığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bulk-fill kompozit rezinler, konvansiyonel kompozit rezinlere oranla polimerizasyon derinliğini artırmak için farklı oranlarda doldurucu içeriğine sahiptirler. Bulk-fill kompozit rezinlerin doldurucu boyutu büyütülmüş ve böylece total hacmi azaltılmıştır. Konvansiyonel kompozit rezinlerle karşılaştırıldığında, bulk-fill kompozit rezinlerde hacimce büyük doldurucular (>20 µ) gözlenmektedir. Canan'ın çalışmasında, üç farklı bulk-fill kompozitin biyoyumluluğu değerlendirilmiş ve çalışmalar neticesinde kullanılan bulk-fill kompozit rezinlerin hepsinin içeriğinde Bis-GMA materyalinin yer aldığı, aynı zamanda bu materyallerin tSPH, L929 hücrelerine karşı toksik etkiye neden olduğu kanıtlanmıştır (Canan TÇ. *Bulk fill kompozitlerin biyoyumluluğunun değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Selçuk Üni Diş Hek Fak; 2017. p.54-5*). Literatür bilgileri ışığında ve yapılan çalışmalar doğrultusunda gerek, bulk-fill kompozitlerin gerekse konvansiyonel kompozitlerin sitotoksik etkiye neden olduğu görülmüştür. Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında zaman da bulk-fill kompozit olan XF grubunun, konvansiyonel olan kompozitlerden daha fazla toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır. Bunun sebebi olarak kullanılan kompozit materyalinin bulk-fill ya da konvansiyonel olup olmamasından ziyade, yapısında rezin içerip içermediğinin değerlendirilmesinin, ayrıca

materyallerin doldurucu yüzdesinden ziyade doldurucu içeriğinin değerlendirilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, bir materyalin sitotoksitesinde; materyalin yapısı, içerdiği monomer oranı, monomer tipi, doldurucu içeriği gibi faktörlerin bir bütün olarak etkili olduğu gözlenmiştir. TEGDMA ve EGDMA monomer varlığının, materyalin sitotoksitesinde doğrudan etkili olduğu, doldurucu içeriğine eklenen parçacıkların (Fluro-alüminosilikat partikülleri, iterium trifluoride parçacıkları) da sitotoksitesiyi etkileyebileceği sonucuna varılmıştır. Yaygın ve etkin kullanım alanına sahip rezin bazlı dental materyallerin biyoyumluluklarına ilişkin çalışmalar, sitotoksitesiyi azaltmaya yönelik yenilikçi yaklaşımları da beraberinde getirmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma DHF 16.03 numaralı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Hakan Kamalak, Elif Ok; **Tasarım:** Elif Ok, Hakan Kamalak; **Denetleme/Danışmanlık:** Ali Taghizadehghalehjoughi; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Ali Taghizadehghalehjoughi; **Analiz ve/veya Yorum:** Elif Ok, Hakan Kamalak; **Kaynak Taraması:** Elif Ok, Hakan Kamalak; **Makalenin Yazımı:** Elif Ok, Hakan Kamalak; **Eleştirel İnceleme:** Elif Ok, Hakan Kamalak; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Ali Taghizadehghalehjoughi, Hakan Kamalak; **Malzemeler:** Hakan Kamalak, Ali Taghizadehghalehjoughi.

KAYNAKLAR

1. St-Georges AJ, Sturdevant JR, Swift EJ Jr, Thompson JY. Fracture resistance of prepared teeth restored with bonded inlay restorations. *J Prosthet Dent.* 2003;89(6):551-7. [[Crossref](#)]
2. Ünlü N, Çetin ÇA. [New developments in ingredient of composite resin materials: review]. *Türkiye Klinikleri J Dental Sci.* 2008;14(3):156-67.
3. Babakhin AA, Volozhin AI, Dubova LV, Lebedenko Iu, Babakhina IuA, Zhuravleva AA, et al. [Histamine releasing activity of dental materials as the indicator of their biocompatibility]. *Stomatologiya (Mosk).* 2008;87(1):8-17.
4. Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):463-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Ortengren U, Wellendorf H, Karlsson S, Ruyter IE. Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *J Oral Rehabil.* 2001;28(12):1106-15. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-biological interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res.* 2001;80(12):2046-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(1):133-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002;18(4):318-23. [[Crossref](#)]
9. Engemann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. *J Dent Res.* 2001;80(3):869-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
10. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2003;82(10):814-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16(8):1093-107. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
12. Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem.* 2007;366(2):197-206. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. Temple L, Kawabata TT, Munson AE, White KL Jr. Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundam Appl Toxicol.* 1993;21(4):412-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1993;160(1):81-8. [[Crossref](#)]
15. Fan F, Wood KV. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2007;5(1):127-36. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Mandecki W, Ardel B, Coradetti T, Davidowitz H, AFlint JA, Huang Z, et al. Microtransponders, the miniature RFID electronic chips, as platforms for cell growth in cytotoxicity assays. *Cytometry A.* 2006;69(11):1097-105. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3):119-24. [[Crossref](#)]
18. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;(4):pdb.prot087379. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
19. Mjor IA. A comparison of in vivo and in vitro methods for toxicity testing of dental materials. *Int Endod J.* 1980;13(3):139-42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem.* 1976;9(3):1-56. [[Crossref](#)]
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. [[Crossref](#)]
22. Shimmura H, Tanabe K, Habiro K, Abe R, Toma H. Combination effect of mycophenolate mofetil with mizoribine on cell proliferation assays and in a mouse heart transplantation model. *Transplantation.* 2006;82(2):175-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays, in Assay Guidance Manual; 2004. Online Book; 2013. [[Link](#)]
24. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):333-55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990;6(4):282-7. [[Crossref](#)]
26. Trichaiyapon V, Torrungruang K, Panitvisai P. Cytotoxicity of flowable resin composite on cultured human periodontal ligament cells compared with mineral trioxide aggregate. *J Investig Clin Dent.* 2012;3(3):215-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17(2):103-14. [[Crossref](#)]
28. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(2):172-9. [[Crossref](#)]
29. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Durner J, Spahl W, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX. Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater.* 2010;26(1):91-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):47-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85(10):870-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
33. Schedle A, Ortengren U, Eidler N, Gabauer M, Hensten A. Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clin Oral Implants Res.* 2007;18 Suppl 3:232-56. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Anagnostou M, Chatzigianni E, Doucoudakis S, Potamianou A, Tesseromatis C. Biocompatibility of resin composites subcutaneously implanted in rats with experimentally induced arthritis. *Dent Mater.* 2009;25(7):863-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Peumans M, Van Meerbeek B, Lambrechts P, Vanherle G, Quirynen M. The influence of direct composite additions for the correction of tooth form and/or position on periodontal health. A retrospective study. *J Periodontol.* 1998;69(4):422-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Kamalak H, Canan AC, Altin S. The mechanical properties of nanohybrid and bulk fill posterior composites. *Biomed Res.* 2018;29:2179-86. [[Crossref](#)]
37. Franz A, König F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, et al. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater.* 2003;19(5):382-92. [[Crossref](#)]

38. Yildirim-Bicer AZ, Ergun G, Egilmez F, Demirkoprulu H. In vitro cytotoxicity of indirect composite resins: effect of storing in artificial saliva. *Indian J Dent Res.* 2013;24(1):81-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials.* 1991;12(8):737-40. [[Crossref](#)]
40. Longo DL, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, Queiroz AM, Silva LA. Cytotoxicity and cytokine expression induced by silorane and methacrylate-based composite resins. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(4):338-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Gonçalves F, Campos LMP, Rodrigues-Júnior EC, Costa FV, Marques PA, Francci CE, et al. A comparative study of bulk-fill composites: degree of conversion, post-gel shrinkage and cytotoxicity. *Braz Oral Res.* 2018;32:e17. [[Crossref](#)]
42. Banava S, Najibfard K, Garcia-Godoy F, Saghiri MA, Ghahremani MH, Ostad N. Impact of dilution and polymerization on cytotoxicity of dentin adhesives to human gingival fibroblasts: early exposure time. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2015;9(3):151-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
43. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):441-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil.* 1991;18(4):353-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Inoue K, Hayashi I. Residual monomer (Bis-GMA) of composite resins. *J Oral Rehabil.* 1982;9(6):493-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent.* 1998;26(2):137-45. [[Crossref](#)]
47. Yap AU, Han VT, Soh MS, Siow KS. Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. *Oper Dent.* 2004;29(4):448-53.
48. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig.* 1997;1(4):154-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Tabatabaee MH, Mahdavi H, Zandi S, Kharrazi MJ. HPLC analysis of eluted monomers from two composite resins cured with LED and halogen curing lights. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(1):191-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
50. Attik N, Hallay F, Bois L, Brioude A, Grosgeat B, Colon P. Mesoporous silica fillers and resin composition effect on dental composites cytocompatibility. *Dent Mater.* 2017;33(2):166-74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
51. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem.* 2012;8(1):40-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
52. Botsali MS, Kuşgöz A, Altıntaş SH, Ülker HE, Tanriver M, Kiliç S, et al. Residual HEMA and TEGDMA release and cytotoxicity evaluation of resin-modified glass ionomer cement and compomers cured with different light sources. *ScientificWorld Journal.* 2014;28:218295. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]