

Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri

Zehra Süsgün Yıldırım^a, Elif Pınar Bakır^a, Şehmus Bakır^a, Mehmet Salih Aydın^a

Selcuk Dent J, 2017; 4: 162-169 (Doi: 10.15311/selcukdentj.302915)

Başvuru Tarihi: 30 Mart 2017
Yayına Kabul Tarihi: 09 Temmuz 2017

ÖZ

Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri

Dental materyallerin biyouyumluluğu; oral dokular üzerine zararlı etkilerinin en az seviyede olması şeklinde tarif edilmektedir. Bu etkinin derecesi; hastaya, materyalin fonksiyonuna, gücüne, yerleştirildiği koşullara ve zamana bağlı olarak değişir. Kullanıma sunulacak materyallerin güvenilirliğinin değerlendirilmesi önemlidir. Dental materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmede genellikle; *in vitro* testler → hayvan deneyleri → klinik kullanım testleri şeklinde, sıralı klasik bir paradigma kullanılmaktadır.

Diş hekimi yeni bir materyali kullanmaya karar verirken, farklı araştırma sonuçlarını incelemeli ve hastanın taleplerinin yanı sıra, risk-yarar analizi de yapmalıdır.

ANAHTAR KELİMELELER

Biyoyumluluk, dental materyal, *in vitro* testler

ABSTRACT

Biocompatibility and assessment methods in dentistry

Biocompatibility of dental materials has been described as to be minimum harmful effects on oral tissues. The degree of this effect changes based on patient, material, function, strength, placement conditions and time. It is important to evaluate the reliability of the materials to be used. For the evaluation of dental materials' biocompatibility; a classic paradigm in the form of *in vitro* tests → animal experiments → clinical usage tests is often used.

While deciding to use a new material, dentist should examine different research results and make a risk-benefit analysis as well as patient's request.

KEYWORDS

Biocompatibility, dental material, *in vitro* tests

Canlı bir dokunun kaybettiği fonksiyonların geri kazandırılması amacıyla kullanılan materyallerin seçiminde, önemli faktörlerden biri de biyouyumluluktur. Biyouyumluluk veya doku uyumluluğu kavramı; canlı dokuya yerleştirilen bir materyalin, organizmayla temas halinde sergilediği biyolojik performansı ifade etmek amacıyla kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle; hasta, kullanılan materyal ve materyalin beklenen fonksiyonu arasındaki uyum olarak da tarif edilebilir. Materyalin canlı dokuya yerleştirilmesi durumunda, vücudun yumuşak veya sert dokularıyla etkileşimi neticesinde, birtakım biyolojik doku reaksiyonları oluşabilmektedir. Bu etkileşimin derecesi; hastaya, materyalin gücüne, fonksiyonuna ve yerleştirildiği koşullara bağlıdır. Materyalin konağı etkilemesinin yanı sıra, konağın da materyali etkilemesi söz konusudur. Materyal vücutta bir etki meydana getirirken, vücut da materyalde bir tepki oluşturmaktadır.^{1,2}

Kullanılan materyalin beklenmedik riskler taşımaması ve uygulandığı doku içinde beklenen cevabı vermesi arzu edilir. Biyouyumluluk; zamana ve şartlara bağlı olarak değişebilen dinamik bir süreçtir. Zaman içerisinde vücutta, hastalık veya yaşlanmaya bağlı değişiklikler meydana gelmektedir. Bununla birlikte materyalde de korozyon, yorgunluk, yük, oklüzyon veya beslenme kaynaklı değişimler görülebilir. Böylece, başlangıçta verilen biyolojik yanıt zamanla değişebilir.

Sözgelimi; başlangıçta biyouyumlu olan bir materyal, şartların değişmesiyle beraber uyumsuz hale gelebilmektedir. Materyal ve biyolojik dokularda meydana gelen değişimler aynı zamanda, diğer değişiklikleri uyarabilmektedir.¹⁻³

Herhangi bir biyolojik cevaba neden olmayan yabancı maddeler, saf olarak kabul edilirler. Bununla birlikte, canlı dokular üzerinde olumsuz etki göstermeyen materyal yok denecek kadar azdır. Herhangi bir materyal, yerleşim ve fonksiyonu tanımlanmadan biyouyumlu olarak kabul edilemez. Kullanılan materyale vücudun biyolojik yanıtını belirlemede, hastanın sağlığı ve çevresini de değerlendirmek gerekmektedir. Son yıllarda, vücudun değişik bölümlerinin onarımı ve yenilenmesinde oldukça sık kullanılan metal, seramik ve polimerlere bağlı sorunlar henüz aşılamamıştır. Günümüzde; nanoteknoloji, genetik mühendisliği, bilişim teknolojileri ve fabrikasyon yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte, biyouyumluluğu daha yüksek materyallerin üretilmesi hedeflenmektedir.^{3,4}

^a Dicle Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

Diş hekimliğinde biyoyumluluk

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin seçiminde; estetik, dayanıklılık ve kullanım kolaylığı gibi özelliklerin yanı sıra, biyoyumluluğun da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Biyoyumlu materyaller çevre dokuların değişimine engel olmaz ve dokuda arzu edilmeyen reaksiyonlar meydana getirmezler. Günümüz diş hekimliğinde biyoyumlu materyallerin geliştirilmesine yönelik çalışmaların hedefi, yabancı cisim reaksiyonlarından kaçınmak ya da sınırlamak olmuştur. Dental materyaller; mine, dentin, pulpa ve periodonsiyum haricinde dişeti, dil, dudak ve yanak gibi çeşitli dokularla da direkt temas halindedir. Bu temas neticesinde; alerjik, toksik, mutajenik, karsinojenik veya iltihabi reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Dental materyallerin biyoyumluluğu; tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlıdır. Materyal ve doku ara yüzünde, başlangıçta var olan denge zamanla değişime uğrayabilmektedir. Bununla birlikte, belirli bir çevre içerisinde materyal-doku arasındaki uygun biyolojik yanıt, diğer çevreler için farklı sonuçlar sergileyebilmektedir.^{1,2,4-6}

Dental materyaller biyolojik çevre içerisinde; madde birikimi, bozulma, kimyasal modifikasyon veya korozyon gibi farklı mekanizmalarla birtakım değişikliklere uğramaktadır. Sözelimi; kompozit rezinlerden ağız sıvılarının etkisiyle artık monomer, doldurucu partikül ve diğer bileşenler çözünmekte ve materyalin yapısı kolayca bozulabilmektedir. Materyalin çözünmesi ya da korozyonuyla salınan çeşitli bileşenler, uygulanan bölgeye komşu dokularda lokal veya sistemik toksisiteye neden olabilmektedir. Hücre yapısında çeşitli hasara neden olabilen bu bileşenlerin yüksek konsantrasyonları, farklı zaman dilimlerinde çeşitli organ fonksiyonlarını etkileyebilmekte ve bazı proteinlerin sentezlenmesine ya da iltihabi reaksiyonlara yol açmaktadır. Örneğin; 24 saat içerisinde akut sistemik toksisite gösteren bir materyal, 3 ay sonra subakut ve daha uzun sürede kronik sistemik toksisite sergileyebilmektedir.⁶⁻⁹

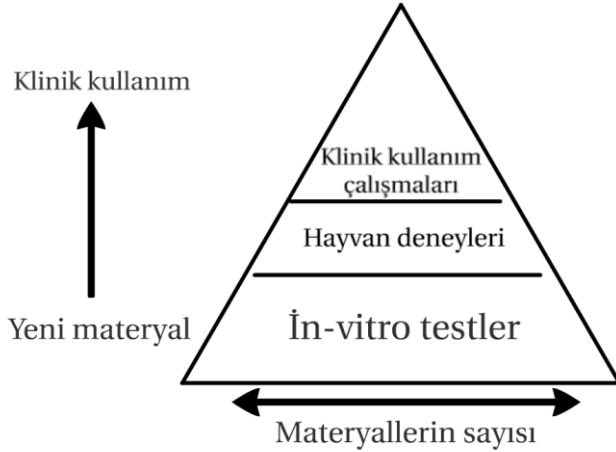
Dental materyallerin biyoyumluluğunun değerlendirilmesi; hasta ve sağlık ekibinin güvenliğini sağlamaya yönelik bir çaba olup, çeşitli biyolojik ve fiziksel özellik testleri ile risk-fayda analizi konularını kapsar. Yapılacak analizlerin, materyallerden salınan bileşenlerin canlı dokularla her türlü ilişkisini ortaya koyması oldukça önemlidir. Biyoyumluluğun hasta güvenliğiyle ilgili kısmı, dental materyallere karşı aşırı duyarlılık konusudur. Dental materyallerin yan etki potansiyeli yüksek olmamasına rağmen, kullanım öncesindeki alerjik bulgular ve riskler çok iyi değerlendirilmelidir. Yapılan araştırmalar, nikel ve metakrilatlara karşı alerji üzerine yoğunlaşmıştır. Nikel alerjisinin görülme oranı %10-20 arasında olup, kadınlarda daha sıktır. Rezin bazlı materyallere ve latekse karşı aşırı duyarlılığın, oldukça ciddi reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Dental materyaller ve gıdaların çocuklarda oluşturduğu aşırı duyarlılığın oranı %49 olarak tespit edilmiştir. Diş hekimliği ve yardımcı sağlık personelinin

dental materyallerden zarar görme potansiyeli, hastalara oranla çok daha yüksektir. Bu tür sorunlar genel irritasyondan, alerjik yanıtlara kadar değişen riskler şeklindedir. Amalgam, döküm alaşımlar, rezinler ve protetik dental materyallere karşı gerçekleşen reaksiyonlar nadiren hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir. Özellikle HEMA, TEGDMA ve kamforokinon gibi bazı rezin komponentler, immün hücreleri doğrudan aktive edebilmektedir.⁹⁻¹²

Yapılan birçok çalışma, materyallerden korozyon yoluyla salınan maddelerin yan etki potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Dental materyallerin kullanımı sırasında, hasta ve yardımcı sağlık personelinin etkileyecek risklerden yasal olarak diş hekimini sorumludur. Günümüzde, dental materyallerin hastaya verebileceği zararlarla ilgili başlatılan hukuksal işlem sayısı fazla değildir. Ancak, bu tür problemlerin ortaya çıkması diş hekimini duygusal ve maddi anlamda olumsuz etkileyebilmektedir.¹³

Biyoyumluluk değerlendirme yöntemleri

Piyasaya sürülecek her yeni dental materyalin, klinik kullanım öncesinde mutlaka biyolojik riskler yönünden araştırılması ve biyoyumluluğunun değişik yöntemlerle değerlendirilmesi gerekmektedir. Biyoyumluluk testlerinin temel prensibi; materyal ve biyolojik sistem arasında meydana gelebilecek reaksiyonların, canlıdaki fonksiyonel ve yapısal değişiminin niteliği ve niceliğinin önceden belirlenmesidir. Başka bir ifadeyle; materyalin etkisiyle biyolojik sistemin yapısında değişiklik meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi ve bu etkinin geri dönüşümlü olup olmadığının açığa çıkarılmasıdır. Dental materyallerin biyolojik performanslarını belirlemek amacıyla, günümüze kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiş ve başarıyla kullanılmıştır. Uygulanan test programları, hiyerarşik düzende ilerleyen farklı prosedürlerden oluşmaktadır. Son yıllarda, farklı standardizasyon kuruluşları ve bazı uluslararası organizasyonlar tarafından; *in vitro* (birincil) testler, hayvan deneyleri (ikincil testler) ve insanlarda yapılan klinik çalışmalar (kullanım testleri) aşamalarını içeren bir prosedür onaylanmıştır (Şekil 1). Etkin ve verimli değerlendirme işlemlerine sahip, etik yönden sağlam ve finansal olarak uygulanabilir olan bu prosedürlerin temel ilkesi; her bir test aşamasında uygun olmayan yüksek riskli materyallerin tespit edilmesi ve daha fazla kullanılmadan değerlendirme dışı bırakılmasıdır. Bu sayede, insan ve hayvanlar acı çekme potansiyeline karşı korunmuş olmakla birlikte, zaman ve para tasarrufu da sağlanmaktadır.^{4,5,14,15}



Şekil 1.

Yeni materyallerin biyoyumluluk değerlendirme prosedürü

A. *In vitro* (birincil) testler

Bu testler; dental materyallere biyolojik yanıtın ölçülmesinde kullanılan en temel deney yöntemlerinden biridir. *In vitro* testlerde; canlı organizma dışında çeşitli hücre veya doku üzerine ya da içine yerleştirilen bir materyalin teması sonucunda ortaya çıkan biyolojik reaksiyonlar incelenmektedir. Bu yöntemde genellikle; bakteri veya hücrelerle kontak halinde bulunan dental materyalin, belirlenen bir bakteri türü üzerinde mutasyona neden olan özellikleri belirlenmektedir. *In vitro* testler; *in vivo* durumları taklit etmek üzere, özel kültür ortamı ve şartları kullanılarak laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir. Bu testler; diğer yöntemlere kıyasla daha ucuz, kolay uygulanabilir, deneysel olarak kontrol edilebilir ve tekrarlanabilirler. Bu testlerde başarılı olan materyallerin, hayvan deneyi ve klinik kullanım test yöntemleriyle değerlendirilmesi aşamasına geçilir. Ancak, materyallerin *in vitro* koşullarda biyoyumluluk açısından riskli olduğunun belirlenmesi, *in vivo* koşullarda da toksik etki sergileyeceğini göstermez.¹⁴⁻¹⁷

Çoğunlukla hücre ve bileşenlerinin kültürlerinin kullanıldığı bu testlerde; materyale maruz kalan hücre sayısı, büyüme oranı, gelişim hızı, metabolik veya hücre fonksiyonları ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu testlerin temel özelliği; hücre yanıtını hassas ve detaylı bir şekilde ölçebilmesidir. *In vivo* yöntemler ile karşılaştırıldığında, bu testlerin en önemli dezavantajı; sağlıklı bir organizma dışında uygulanan materyale karşı oluşan biyolojik cevapla ilgili araştırmacıyı yanıltan sonuçlar verebilmesidir. *In vitro* testler (sitotoksosite, sistemik toksisite, inhalasyon toksisitesi, hemolizis, teratojenite, karsinojenite testleri, Ames mutajenite testi, Styles hücre transformasyon testi) sayesinde; gen ekspresyonu, sinyal aktivasyonu, hücre döngüsü ve bölünmesi, inflamasyon aktivasyonu, protein ekspresyonu ve oksidatif stres benzeri hücre fonksiyonları değerlendirilebilmektedir.

Yapılan araştırmalar sonucunda; dental materyallere ilişkin reaksiyonların 3, 7, 14, 30 ve 60 günlük zaman dilimlerinde test edilmesi tavsiye edilmektedir.¹⁶⁻²¹

Biyolojik sistemin, uygulanan materyalin olası zararlı etkilerinden korunabilmesi için öncelikle sitotoksosite mekanizmasının anlaşılması gerekmektedir. Toksikite; kullanılan materyalin biyolojik sistemde kimyasal yolla hasar oluşturabilme potansiyeli olarak kabul edilmektedir. Dental materyaller ve onlardan salınan bileşiklerin oral dokular üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin laboratuvar ortamında belirlenmesi amacıyla, sitotoksosite testleri kullanılmaktadır. Bu testlerde; hücre canlılığı ve morfolojisi, hücre gelişimi, bölünmesi ve sayısı, hücre metabolizması ve organelleri, hücre membran geçirgenliği ve hasarı, çeşitli enzim aktiviteleri, DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu değerlendirilmektedir. İnsan, maymun, fare, tavşan gibi canlıların böbrek, akciğer amniyon zarı gibi dokularından alınan parçaların *in vitro* ortamda yaşaması ve üremesi değerlendirilmektedir. Çeşitli sıvılarda süspansiyon edilerek steril tüpler içerisinde üretilen hücre kültürlerinden, süresiz çoğalabilme özelliğine sahip devamlı hücre hatları elde edilmektedir.^{15,16,22-28}

Sitotoksosite testinde; dental materyalin kendisi veya yapısından salınan bileşenlerin hücre kültürü ile direkt veya indirekt kontak söz konusudur. Direkt temas yönteminde, hücreler materyalin yanında veya üzerinde büyümekte ve biyolojik hücre ölümleri değerlendirilmektedir. Suda çözünebilir materyallerde materyal ile hücrenin direkt teması çok iyi sağlanır. Suda çözünmeyen materyal bileşenleri ekstrakt yoluyla hücrelerle temas ettirilerek incelenir. İndirekt temas yönteminde; dental materyal ile hücre arasında agar, agaroz, dentin veya selüloz asetat filtre gibi bariyerler kullanılır. İndirekt yöntemde, dentini taklit eden ve bazı bileşenlerin difüzyonuna izin veren insert sistemler kullanılmaktadır.^{14,16,18,23}

In vitro sitotoksosite değerlendirmelerinde en yaygın kullanılan yöntemler; hücre kültür testleri, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, dentin bariyer testi, hemoliz testi ve Ames mutajenite testidir.

1. Hücre kültür testleri

Dental materyallerin sitotoksitesisi genellikle, hücre kültürü testleriyle incelenmektedir. Bu yöntem sayesinde, *in vivo* şartlarda kısa sürede incelenmesi mümkün olmayan bir materyalin fiziksel ve kimyasal etkileri, mutajen faktörleri, neden olduğu yapısal ve kromozomal bozukluklar belirlenmektedir. Yöntemin esası; dental materyalleri oluşturan bileşenlerin kültürdeki

hücreler üzerine doğrudan yerleştirilmesi ve doz-cevap eğrisi sayesinde potansiyel sitotoksitenin belirlenmesi prensibine dayanır. Hücre kültürü testleri; hücreler üzerindeki etkilerin direkt gözlelenebilmesi, kısa süreli etkileşimlerin incelenebilmesi ve uygulamaların tekrarlanabilmesi avantajlarına sahiptir. Bununla birlikte; hijyenik koşullardan etkilenmesi, pahalı olması, primer kültür sonrası birbirini takip eden pasajlarda hücrelerin farklılaşması veya ölmesi gibi dezavantajlar içermektedir.^{27,29-34}

Sitotoksisite testlerinde en çok kullanılan hücre hatları; primer hücreler veya devamlı hücre hatları (L-929 fare fibroblast hücresi, BALB/3T3 fare embriyo fibroblastları, MDPC-23 fare odontoblast hücresi, WI-38 insan embriyonik akciğer hücreleri, HeLa insan epiteliyal hücresi, ECV-304 insan endotelial hücresi)'dir. Primer hücreler; belirli bir doku veya organdan izole edilerek kültür içerisine 24 saatten daha uzun bir süre yerleştirilirler ve *in vivo* koşullara benzer deneysel ortam sağlarlar. Devamlı hücre hatları ise, transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve süresiz çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Bununla birlikte, *in vivo* koşulları tam olarak sağlayamazlar. Hücre kültürlerinin oluşturulmasında genellikle, 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamlar tercih edilmekte, kültür içerisine birtakım antioksidatif maddeler ve antibiyotikler ilave edilmektedir. Kültür hücrelerindeki fiziksel ve patolojik değişiklikler, ışık ya da elektron mikroskobu altında incelenmektedir. Elde edilen bulgular materyale bağlı olası sitotoksisite hakkında fikir vermesine rağmen, bu verilerin klinik koşullarla doğrudan ilişkilendirilmemesi gerekir. Çünkü *in vivo* koşullarda gerçekleşen biyolojik ve immünolojik reaksiyonların, sitotoksisiteyi etkilemesi söz konusu olabilmektedir.^{15,22,23}

2. Agar difüzyon test yöntemi

Uygulanması kolay ve ucuz olan bu yöntemde, hücrelerin üzerini örten %1,5'lük agar besiyerinden difüze olabilen bileşenlerin sitotoksisitesi 24 saat süreyle incelenir. Hücre aktivitesi; ölü hücreleri boyayabilen tripan mavisi veya canlı hücrelerde lizozomal matrikste birikerek membran hasar gördüğünde dışarı salınabilen nötral kırmızı boyası sayesinde değerlendirilmektedir. Bu yöntemde, hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı verilen yanıtlar belirlenebilir. Materyalden çözünen sitotoksik bileşenlerin, agar boyunca diffüze olamaması, hücre hasarına yol açamayacaktır. Bu nedenle, agarda çözünemeyen veya difüze olamayan bileşenlerin etkinliği bu yöntemle belirlenemez.^{26,29}

3. Filtre difüzyon test yöntemi

Bu testlerde, fibroblastlar veya epitelyal hücreler kullanılmaktadır. Restoratif tedavide kullanılan birçok materyalin, hücrelerle direkt temas halinde olmaması nedeniyle, materyal ve hücre kültürü arasına bir filtre konulmasının daha objektif olacağı düşünülmektedir.

Filtre olarak selüloz asetatın (milipor filtre) kullanıldığı bu yöntemde, toksik olduğu düşünülen materyal filtrenin karşı yüzeyiyle temas halinde yerleştirilmektedir. Bununla birlikte, materyalin hücre üzerinde sitotoksik etki gösterebilmesi için, 0.45 µm'lik filtre boyunca difüze olması gerekmektedir. Ağız içi temas durumunu tanımlayan bu yöntemde, nötral kırmızı ile yapılan boyama sonucunda filtreden difüze olabilen bileşenlerin sitotoksik etki sonucu hücrelerde meydana getirdiği hasar belirlenmektedir.^{5,23,29}

4. Dentin bariyer test yöntemi

Dental materyaller diş dokusuna uygulanırken, dentin dokusu pulpayı koruyucu bir bariyer olarak görev yapmaktadır. Dentin dokusunun bu özelliğini taklit etmek üzere geliştirilen bu yöntemde, test edilen materyalin difüze olma kabiliyeti ölçülmektedir. Diğer testlerden farklı olarak, oral çevreyi daha fazla taklit eden bu yöntemde; dental materyalden salınan monomerler ile hedef hücre arasında bariyer olarak, insan dentin dokusu ya da sığır dentin diskleri kullanılmaktadır. *In vivo* dokuyu taklit etmesi bakımından, insan dentini kullanılması daha avantajlıdır. Sığır dişi kullanılması ise; istenilen miktarda elde edilebilmesi ve geçirgenlik bakımından insan dentinine kıyasla daha az çeşitlilik göstermesi açısından faydalı olmaktadır.^{16,35,36}

5. Hemoliz test yöntemi

Bu yöntemde; dokularla uzun süre temasta bulunacak materyallerin akut hemolitik aktiviteleri ölçülmektedir. Gerek çözünebilir ve gerekse biyolojik ortama iyon salılabilen materyallerin test edilebildiği bu yöntemde, tavşan kanında bekletilen materyalin yol açtığı hemolitik aktivite değerlendirilmektedir. Tavşan dışındaki farklı türlerin eritrositleri kullanılarak da yapılabilen bu çalışmalarda; hemolitik aktivitenin belirlenmesi esnasında, eritrositlerin aglutinasyonu veya hemoglobinlerin presipitasyonuna neden olabilen bazı iyonlar nedeniyle, test sonuçlarının hatalı çıkma olasılığı mevcuttur.^{37,38}

6. Ames mutajenite test yöntemi

Materyallerin sistemik uyumluluğunu değerlendirmede kullanılan yöntemler; genotoksisite ve karsinojenite çalışmalarıdır. Genotoksik hasar (hücre genetiğinde meydana gelen değişiklikler ve DNA dizilerindeki kırılmalar), AFE testi (Alkaline Filter Elution) sayesinde belirlenebilmekte ve hücrelerin sahip olduğu bazı mekanizmalarla onarılabilmektedir. Genetik hasarın bir sonraki nesle aktarılmasıyla oluşan etki, mutajenite olarak adlandırılmaktadır ve bu etkinin görülebilmesi için daha yüksek doza ihtiyaç vardır. Uygulanan materyalin hücre DNA'sına olan etkisini inceleyen yöntemlerden en sık kullanılanı AMES testidir. Genetik yapısı değiştirilmiş, özel agar

kültüründe çoğalmayan, histidin içermeyen ortamlarda koloni oluşturmayan bakterilerin (salmonella typhimurium) kullanıldığı bu test sayesinde, hücredeki mutasyon farklılıkları gözlenmektedir.³⁸⁻⁴¹

Dental materyaller uygulandığı bölgede metabolik faaliyetler, hücre membranı ve kromozom yapısında yapısında birtakım olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Bu etkileri incelemek üzere statik ve dinamik test yöntemleri oluşturulmuştur. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde dört farklı test yöntemi kullanılmaktadır.^{22,42,43}

a. Canlılık testleri

Kolorimetrik ya da floresans ölçüm yapmaya izin veren bu testler, kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesi amacıyla uygulanmaktadır. Membran geçirgenliğini ölçmek üzere sınırlandırılmış olan bu yöntemler, sub-lethal hücre değişikliklerini ölçemez. Bu testlerde; membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan veya nötral kırmızı boyası ya da membran bütünlüğü bozulan hücre yapısına giren tripan mavisi, eritrosin veya naftalin siyahı gibi boyalar kullanılmakta ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir.²²

b. Yaşam testleri

Sadece ölü hücreleri değerlendiren bu testlerde, hücrelerin maruz kaldığı toksik etkiler ilk birkaç gün veya sonrasında görülebilmektedir. Hücre yaşamının belirlenmesinde, düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma kabiliyeti değerlendirilmektedir.²²

c. Proliferasyon testleri

3H-timidin ve Bromodeoksiuridin immuno-histokimyasal tekniklerin kullanıldığı bu yöntem az sayıda örnek olduğu durumlarda uygulanmaktadır. Materyal bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisini belirlemek amacıyla, kültür içerisindeki hücrelerin birkaç gün sonraki sayımından elde edilen büyüme eğrisinden yararlanılmaktadır.^{18,22,44}

d. Metabolizma testleri

Genellikle daha hassas çalışmayı gerektiren bu yöntemde, hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasiteleri ve enzim aktivite bozulması, mikropilaka okuyuculu spektrofotometre yardımı ile ölçülerek değerlendirilir. Uzun dönemde oluşacak toksitenin değerlendirildiği bu yöntemlerin en önemlileri; MTT, LDH ve Alamar mavisi testidir.²²

B. Hayvan deneyleri (ikincil testler)

Hayvan deneyleri, insanlarda karşılaşılabilecek olası toksik tehlikeleri önceden tahmin etmeye yardımcıdır. Bu testler; dental materyallerin klinik kullanımı sonucunda oluşabilecek reaksiyonlar ve mekanizmaları hakkında fikir vermektedir. İnsanların farklı yaşam dönemlerinde (embriyonal ya da çocukluk gibi) yapılması mümkün olmayan araştırmalarda kullanılan hayvanlar, bazı materyallerin etik olmayan dozlarına veya metabolize ürünlerine maruz bırakılabilmektedir. Hayvan deneylerinde genellikle; fare, rat, maymun, kedi, köpek, tavşan gibi memeliler kullanılmaktadır. Bu deneylerde; hayvanların türü, yaşı, cinsiyeti, hayvanın kullanılacak materyale maruz bırakılma şekli, temas süresi ve biyolojik yanıtı değerlendirilme yöntemi gibi bazı değişkenlerin kontrol altında tutulması gerekmektedir. Uzun zaman gerektiren, ekonomik olmayan bu testler; uygulama esnasındaki etik sorunlar ve alınması gerek özel deney hayvanları sertifikaları gibi nedenlerle daha az tercih edilirler.^{27,45-47}

İkincil testlerde kullanılan yöntemlerden bazıları; ağız içi ve karın içi testi, soluma testi, dominant letal test, irritasyon ve sensitizasyon testleri, kas ve kemik içi ya da deri altı implantasyon testidir. Ağız içi ve karın içi testinde; kullanılacak materyal ya ağız yoluyla verilmekte veya abdominal bölgeye enjekte edilmektedir. Ölüm ya da toksik etki için, iki hafta boyunca her gün gözlem yapılmaktadır. Oda koşullarında buharlaşma yeteneğine sahip dental materyallerin test edilmesinde yararlanılan soluma testinde, genellikle albino ratlar kullanılmaktadır. Dominant letal test ise, materyalden kaynaklanan dominant ölümcül veya mutajenik olayları ölçmeye yarayan bir yöntemdir. Irritasyon ve sensitizasyon testlerinde; alerjen olduğu düşünülen materyalin oral mukoza, göz veya deri üzerine uygulanması sonrasında oluşacak reaksiyonun şiddeti belirlenmektedir. Diş hekimliğinde özellikle implant materyallerinin spesifik olmayan lokal toksik etkileri değerlendirilmek istendiğinde, test materyali doğrudan ya da teflon, silikon veya polietilen tüpler içerisinde rat ve tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının kas veya kemik dokuları içerisine veya deri altına implante edilmektedir. Bu dokular, bir hafta - birkaç ay süreyle makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajı, çok sayıda hayvan kullanmaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Yapılan bazı hayvan deneyleri sonucunda, polimerize edilmemiş dental materyallerin daha fazla toksik reaksiyon sergilediği belirlenmiştir. Kompozit rezinler ile amalgamın deri altı doku reaksiyonlarını karşılaştıran birçok çalışmada, kompozit rezine karşı daha fazla reaksiyon (8 haftayı aşkın inflamasyon) tespit edilmiştir.^{37,48-51}

C. Klinik çalışmalar (kullanım testleri)

Kullanım testleri, klinik tabloyu yansıtmaya potansiyeline sahiptir. Laboratuvar ve hayvan deneyleri sonucunda güvenilir olduğu belirlenen bir materyalin, gönüllü insanlar üzerinde kullanılarak oluşan yanıtın gözlenmesi (klinik deneme) esasına dayanan bu yöntemde, biyouyumluluk bakımından daha doğru sonuçlar elde edilmektedir. Kullanım testlerinin büyük çoğunluğu restoratif diş hekimliği ve endodontiyle ilgilidir. Dental materyallerin genellikle; diş, yumuşak dokular, alveol kemiği veya tükürük gibi bazı sıvılarla temas etmesi söz konusudur. Bu nedenle dental materyallerle ilgili yapılacak klinik çalışmalarda; pulpal ve periodontal reaksiyonlar (akut ve kronik iltihaplar), dişeti ve oral mukoza irritasyonları gibi biyolojik parametreler değerlendirilmektedir. Kemik içi implantasyon testlerini de bu gruba dahil etmek mümkündür. Bu testlerde, sağlıklı ve gönüllü insanlar veya diğer primatlar kullanılmaktadır. Primatlar arasında en çok fareler, tavşanlar, bazı köpek ve maymun türleri kullanılmaktadır. Köpek veya maymun gibi büyük deney hayvanları üzerinde uygulanan deri hassasiyet testleri sayesinde, materyallerin klinik öncesi alerjik reaksiyon potansiyelleri belirlenmektedir. Resmi kurumların onayıyla birlikte, materyaller son aşamada onam formuyla aydınlatılmış gönüllü insanlar üzerinde denenmektedir. Kontrolü ve değerlendirmesi zor olan kullanım testleri, oldukça pahalı ve zaman alıcıdır. Muhtemel komplikasyonlar ya da yasal ve etik açıdan sorun oluşturabilecek olan bu testler, ilk üç fazını başarılı bir şekilde geçmiş materyallere uygulanmaktadır.^{23,46,52-54}

SONUÇ

Restoratif diş hekimliğinde kullanılan materyaller canlı dokularla uzun süre yakın temas halindedir. Hiçbir materyal %100 güvenli olmamakla birlikte, taşıdığı potansiyel risk ve faydaların dengelenmesi, ağız içinde kullanım kararını etkilemektedir. Gereksiz risk alınması, hastaya zarar vermenin yanı sıra diş hekimini de yasalar karşısında zor durumda bırakacaktır. Biyouyumluluğu belirleme ve değerlendirmede kullanılan mevcut sistemler, dental materyallerin güvenli kullanımı konusunda diş hekimine rehber olmuştur. Bununla birlikte, *in vitro* sitotoksitesite testleri klinik uygulamalara kıyasla yetersiz kalmaktadır.

Restoratif materyallerin biyouyumluluğunu belirlemede kullanılan standartlar sürekli olarak güncellenmektedir. Son yıllarda, kamuoyu baskısı neticesinde hayvan deneylerinin yasaklanması veya azaltılması gündeme gelmiştir. Ancak, insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararları en aza indirmek bakımından, klinik çalışmaların hayati öneme sahip olduğu unutulmamalıdır. Dental materyallere biyolojik yanıtlar genellikle sonradan değerlendirilmektedir. Oysa yapılması gereken, biyolojik testlerin materyallerin geliştirilmesiyle eş zamanlı olmasıdır. Bunun yanı sıra klinik testler (ilaçlarda olduğu gibi); önce güvenlik, sonra etkinlik değerlendirmesi şeklinde planlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosth Dent* 2001; 86: 203-9.
2. Uzun İH, Bayındır F. [Testing procedures for biocompatibility of dental materials]. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011; 28: 115-22.
3. Mallineni SK, Nuvvula S, Matinlinna JP, Yiu CK, King NM. Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2013; 4: 9-19.
4. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of dental materials*. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer: 2009.
5. Powers JM, Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials*. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. p.97-125.
6. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29: 2941-53.
7. Ratner BD, Bryant SJ. *Biomaterials: where we have been and where we are going*. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 41-75.
8. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Sci* 2001; 31: 81-110.
9. Schmalz G. Strategies to improve biocompatibility of dental materials. *Curr Oral Health Rep* 2014;1: 222-31.
10. Ratner BD. Replacing and renewing: synthetic materials, biomimetics, and tissue engineering in implant dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 1340-7.
11. Pagoria D, Lee A, Geurtsen W. The effect of camphorquinone (CQ) and CQ-related photosensitizers on the generation of reactive oxygen species and the production of oxidative DNA damage. *Biomaterials* 2005; 26: 4091-9.
12. Vamnes JS, Morken T, Helland S, Gjerdet NR. Dental gold alloys and contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 128-33.
13. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent* 2000; 83: 223-34.
14. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology* 2005; 25: 101-8.
15. Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assesment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 145-54.
16. Annunziata M, Aversa R, Apicella A, Annunziata A, Apicella D, Buonaiuto C, et al. *In vitro* biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dent Materials* 2006; 22: 1081-5.
17. Sengün A, Buyukbas S, Hakki SS. Cytotoxic effects of dental desensitizers on human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 78: 131-7.
18. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009; 2: 514-48.
19. Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M, Bouillaguet S. Ag, Cu, Hg, and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 133-9.
20. Maxwell P, Salnikow K. HIF: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 29-35.
21. Wataha JC, Lewis JB, Volkmann KR, Lockwood PE, Messer RLW, Bouillaguet S. Sublethal concentrations of Au(III), Pd(II), and Ni(II) differentially alter inflammatory cytokine secretion from activated monocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 69: 11-7.
22. Freshney Ian R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition. Hoboken; John Wiley & Sons: 2005. p.1-216.
23. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12: 258-66.
24. Nicholson JW. *The chemistry of medical and dental materials*. Cambridge; The Royal Society of Chemistry: 2002. p.186-195.
25. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 2005; 26: 1713-9.
26. Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assesment of dental materials. *Biomaterials* 2000; 21: 1711-21.
27. Tuncer S, Demirci M. [The evaluation of dental materials biocompatibility]. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011;21(2):141-149.
28. Erdemir EO, Şengün A, Ülker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. *European Journal of Dentistry* 2007;1(2):80-5.
29. Ergün G, Sağsen LM, Doğan A, Özkul A, Demirel E. [Examination of cytotoxicity of denture base resins, by agar diffusion and filter diffusion test methods]. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2006; 23: 31-7.
30. Ulu KG, Kirzioğlu Z. [Dentin permeability and effecting factors of dentin permeability: a review]. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2012; 6: 60-5.
31. Ülker HE, Ülker M, Özcan E. [Cytotoxicity evaluation of a new self-adhering flowable composite by dentin barrier test]. *Acta Odontologica Turcica* 2013;30(3):140-4.

32. About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler W, Franquin JC. Polymerized bonding agents and the differentiation *in vitro* of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dent Mater* 2005; 21: 156-63.
33. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metz C. Cytotoxicity testing with three dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod* 2001; 27: 259-65.
34. Çiçek C, Bilgiç A. [Cell culture training programme for specialist residents in virology laboratory: A model]. *İnfeksiyon Dergisi*, 2006; 20(3): 231-41.
35. Schmalz G, Hiller K, Nunez L, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001; 27: 23-30.
36. Schmalz G, Schuster U, Thonemann B, Barth M, Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod* 2001; 27: 96-102.
37. Thom DC, Davies JE, Santerre JP, Friedman S. The hemolytic and cytotoxic properties of a zeolite-containing root filling material *in vitro*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2003; 95: 101-8.
38. Pişkin B, Avsever H, Gündüz K. [Evaluation techniques of biocompatibility of materials in dentistry]. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2009; 10(2): 41-9.
39. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. *Oral Oncol* 2007; 43: 933-9.
40. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001; 80: 1615-20.
41. Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. Mutagenic activity of structurally related oxiranes and siloranes in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 2002; 521: 19-27.
42. Keiser K, Johnson C, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000; 26: 288-91.
43. Dufrane D, Cornu O, Verraes T, Schecroun N, Banse X, Schneider YJ, et al. *In vitro* evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *European Cells and Materials* 2001; 1: 52-8.
44. Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. *In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Letter* 2000; 114: 143-53.
45. Zorba YO, Yıldız M. [The Biocompatibility Tests and Criteria for Adhesive Restorative Materials]. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2007; 2: 15-21.
46. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 333-55.
47. Frankild, S, Volund A, Wahlberg JE, Andersen KE. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 256-62.
48. About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Pulpal inflammatory responses following non-carious class V restorations. *Oper Dent* 2001; 26: 336-42.
49. Tan iC, Finger WJ. Effect of smear layer thickness on bond strength mediated by three All-in-one self-etching priming adhesives. *J Adhes Dent* 2002; 4: 283-9.
50. Murray PE, Windsor LJ, Symth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Bio Med* 2002; 13: 509-20.
51. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review, part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endodon J*. 2003; 36: 75-85.
52. Costa CS, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mat* 2006; 22: 954-62.
53. Mjör IA. Minimum requirement for new dental materials. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 907-12.
54. Bayne SC. Dental restoration for oral rehabilitation-testing of laboratory properties versus clinical performance for clinical decision making. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 921-32.

Yazışma Adresi:

Uzm.Dt. Zehra SÜSGÜN YILDIRIM
Dicle Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi AD, Diyarbakır
Tel : + 90 553 454 11 23
E-mail: susgunzehra@gmail.com