

Kompozit materyallerin gingival fibroblast hücrelerindeki oksidan ve antioksidan değerlerine etkisinin incelenmesi

Investigation of the effect of composite materials on oxidant and antioxidant values in the gingival fibroblast cells

Dr. Öğr. Üyesi Elif Ok

Fırat Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,
Çocuk Diş Hekimliği A.D., Elazığ
Orcid ID: 0000-0002-8574-9883

Dr. Öğr. Üyesi Ali Taghizadehghalehjoughi

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji A.D., Erzurum
Orcid ID: 0000-0002-3506-0324

Doç. Dr. Hakan Kamalak

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi,
Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi A.D.,
Kahramanmaraş
Orcid ID: 0000-0002-1497-2009

Geliş tarihi: 19 Kasım 2018

Kabul tarihi: 9 Mayıs 2020

doi: 10.5505/yeditepe.2020.75547

Yazışma adresi:

Dr. Elif Ok
Fırat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Çocuk Diş Hekimliği A.D. Üniversite Mah. 23000
Elazığ
Tel: +905357449547
E-posta: elifok@outlook.com

ÖZET

Amaç: Oral dokular ile dental restorasyonlar arasındaki direkt etkileşimler serbest radikallerin hücrede birikmesi ile oksidatif strese ve hücre hasarına neden olmaktadır. Oksidatif strese dayalı ölçüm yöntemleri bir materyalin biyouyumluluğunun belirlenmesinde önemli bir yer edinmektedir. Bu çalışmada farklı kompozit materyallerin gingival fibroblast hücrelerinde meydana getirdiği oksidatif stresin TAS (total antioksidan kapasite) ve TOS (total oksidan kapasite) analizleriyle değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 6 yeni nesil kompozit materyal kullanıldı. (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) Her materyal için örnek sayısı 12 olarak belirlendi (n=12). Örnekler teflon kalıplar kullanılarak hazırlandı. GFBCs'lerin 72 saat süreyle örneklerle teması sonucu hücrelerde meydana gelen oksidatif stres durumu TAS ve TOS analizleriyle değerlendirildi.

Bulgular: Gruplardan elde edilen TAS değerleri sırasıyla; PS>AB>GO>ES>XF>GA olarak; TOS değerleri GA>XF>ES>GO>AB>PS olarak tespit edildi.

Sonuç: Bir materyalin sitotoksitesinde; materyalin yapısı, içerdiği monomer oranı, monomer tipi, doldurucu içeriği gibi faktörlerin bir bütün olarak etkili olduğu, monomer yüzdesindeki artışın antioksidan sistem üzerine doğrudan etki ettiği, doldurucu içeriğine eklenen parçacıkların da oksidatif strese etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Kompozit rezin, gingival fibroblast, sitotoksitesite, oksidan, antioksidan

SUMMARY

Aim: Direct interactions between oral tissues and dental restorations cause oxidative stress and cellular damage by accumulation of free radicals in the cell. Oxidative stress-based measurement methods have an important role in determining biocompatibility of a material. In this study, it was aimed to evaluate the oxidative stress caused by different composite materials in gingival fibroblast cells by TAS (total antioxidant capacity) and TOS (total oxidant capacity) analysis.

Materials and Methods: Six different composite materials were used in the study. (X-tra Fill (Voco-Germany), G-ænial Posterior (GC Tokyo Japan), Estelite Sigma Quick (Tokuyama-Japan), Grandio (Voco-Germany), Arabesque (Voco-Germany) 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 oxidative stress status of the cells were evaluated by TAS-TOS (total antioxidant-total oxidant status) analysis as a result of contact of the GFBCs with the samples for 72 hours.

Results: TAS values obtained from the groups are as follows; PS> EU> GO> ES> XF> GA; TOS values were determined as GA> XF> ES> GO> AB> PS.

Conclusion: In the cytotoxicity of a material; It was conclu-

ded that factors such as the structure of the material, the ratio of the monomer it contains, the type of monomer, the filler content are effective as a whole, the increase in the monomer percentages directly affects the antioxidant system, and the particles added to the filler content are also effective in the oxidative stress.

Key words: Composite resin, gingival fibroblast, cytotoxicity, oxidant, antioxidant

GİRİŞ

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin klinik başarısı materyalin mekanik, kimyasal ve estetik özelliklerinin yanında biyolojik güvenilirliği ve doku uyumluluğu ile de ilişkilidir. Materyalin yapısından salınan organik bileşenlerin hücresel düzeyde meydana getirdiği etkiler biyolojik hasarlara neden olmaktadır. Biyolojik olarak güvenilir bir materyal canlı dokularla temas halinde iken lokal veya sistemik reaksiyonlara (toksik, alerjik, immünolojik, mutajenik, karsinojenik vb.) neden olmayan materyal olarak ifade edilmektedir.^{1,2}

Diş hekimliği alanında yaygın kullanım alanına sahip olan rezin içerikli kompozit materyaller yapılarında farklı özelliklerde ve konsantrasyonlarda çeşitli monomerler içermektedir. Bu monomerler yaygın olarak; visköz yapıdaki Bis-GMA (2,2-bis (4-(2 hidroksi-3metakriloksi-profan) fenil)profan) ve UDMA (üretan dimetakrilat); visköz olmayan yapıdaki TEGDMA(trietilen glikol dimetakrilat) ve HEMA(2-hidroksietilmetakrilat) monomerleridir.

Monomerlerin kimyasal ve fiziksel yapıları materyalin sitotoksitesisi üzerinde etkiye sahiptir. Resin esaslı materyallerin içerdikleri monomerlerin toksik yapılarından ötürü uzun zamandır bu materyallerin biyoyumlulukları sorgulanmaktadır.³⁻⁶ Hücrelerde çevresel stres etkeni olarak gösterilen rezin monomerlerin hücre sinyal iletim yolağını ve kompleks hücresel iletişimini bozduğunu bildirilmiştir.⁷ Hücrelerde oksidatif strese neden olan oksidanlar (hidrojen peroksit, süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri) antioksidanlar ile normal hücresel şartlarda denge içerisinde. Fakat rezin monomerlerin hücrelerde reaktif oksijen radikalleri (ROS) üretimine yol açması sonucunda hücre içindeki enzimatik olan ve olmayan antioksidan sistemlerin kapasitesi aşılırsa hücrelerde oksidatif stres meydana gelmektedir.⁸

Oksidatif stres, özellikle vücut için patolojik olan durumlarda oksidan düzeyinin artması ve antioksidan düzeyinin azalması sonucu oksidatif metabolizmadaki dengenin oksidatif yöne kayması olarak tanımlanabilir. ROS artışı, hücreler için sıklıkla mitokondri, çekirdek ve membranlar üzerinde hasar oluşturuca etkiye sahiptir. Hücrelerin lipid, protein ve karbonhidrat gibi yapısal bileşenlerinde oksidatif hasarların meydana gelmesiyle hücrelerin apoptoza uğraması mümkündür. Özellikle DNA'nın etkilendiği durumlarda organizmada geri dönüşümsüz mutajenik hasarlar meydana gelebilmektedir.⁹⁻¹¹

Bu çalışmada rezin içerikli farklı dolgu materyallerinin, dişeti fibroblast kök hücrelerinde (GFBCS) meydana getirdiği oksidatif stresin, total oksidan ve total antioksidan analizleriyle değerlendirilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin hazırlanması

Çalışmada 6 farklı yeni nesil kompozit materyal kullanıldı. Çalışmada kullanılan materyallere ait bilgiler Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kompozit materyaller

Materyal adı	Üretici firma	Materyal tipi	Matris tipi	Doldurucu içeriği	Doldurucu yüzdesi
X-tra Fill (XF)	Voco Almanya	Bulk Fill Kompozit	BisGMA, UDMA, TEGDMA	Zirkonya, silika parçacıkları İterium trifluoride	86
G-enial Posterior (GA)	GC Tokyo Japonya	Nanohibrit kompozit	UDMA, Dimetakrilat ko-monomerleri	Fluroalümino silikat partikülleri	65
Estelite Sigma Quick (ES)	Tokuyama Japonya	Supra-Nanohibrit kompozit	BisGMA, TEGDMA	Küresel silika, zirkonyum partikülleri	82
Grandio (GO)	Voco Almanya	Nanohibrit kompozit	BisGMA, TEGDMA	Cam seramik partükülleri	87
Arabesk (AB)	Voco Almanya	Mikrohibrit kompozit	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, EGDMA	Cam seramik partükülleri	76,5
Polofil Supra (PS)	Voco Almanya	Mikrohibrit kompozit	Bis-GMA, Di ürethan di metakrilat, BHT, HEMA, UDMA	Silika cam partükülleri	76,5

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 kalınlığında uygulanabilen bulkfill kompozitler içinse 4x6 mm lik standart teflon kalıplar kullanıldı. Kalıpların içerisine kompozit materyalleri yerleştirildikten sonra kalıpların alt ve üst yüzeylerine strip bantlar yerleştirildi ve cam lamalar ile preslendikten sonra numuneler LED ışık cihazıyla (Eli-par Freelight II, 3M-ESPE, St.Paul,MN,ABD) 20sn süreyle polimerize edildi. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra kenarlar ve yüzeyler polisaj diskleri ile düzeltildi (Soft-Lex; 3M ESPE, St. Paul, MN, ABD).

Hücre Kültürünün Hazırlanması

Gingival Fibroblast Kök Hücrelerin (GFBCs) Hazırlanması

GFBCs'ler ATCC firmasından (katalog numarası: PCS-201-018) temin edildi. Krayo falkonlarda gelen hücreler 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 antibiyotik (pensilin-streptomisin-amfotrisin B içeren) ile birlikte ekildi. Her 3 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) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²'lik flaska 0,4 cc Trypsin/EDTA eklendi ve hücrelerin tabandan ayrılması için hücre kapları 5 dakika

inkübatörde bekletildi. İnkübatörden 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 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet oluşturan hücrelerin, üst serum sıvısı atıldıktan sonra taze medyum ilave edildi ve kuyucuklu plakalara 100 µl gelecek figur de 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 Üretim 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 dağıtıldı. Kültür ortamındaki DMEM medyum 5. günde aspire edilerek uzaklaştırıldı. Taze medyum ilavesinin ardından örnekler tekrar inkübasyona bırakıldı. %5 CO₂'li ve 37° C' de nemli ısıdaki 7 günlük inkübasyonun ardından hücrelerin plakaların gözlerini tamamen doldurup doldurmadığı ve fibroblastların iğsi karakteristik yapısı mikroskop ile incelendi. UV ışık altında 2 saat boyunca sterilize edilen kompozit örnekleri tek tek; steril presel yardımıyla, steril kabinde hücrelerle doğrudan temas edecek biçimde hücre üretim kaplarına taşındı. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat inkübasyon süresi sonunda analizler yapıldı.

Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümün prensibi

Toplam oksidan analizinde kolorimetrik yöntem kullanıldı. Bu yöntem, ortamdaki ferroz iyonunun yapısını ferrik iyonuna oksitleyen oksidan mekanizmasından yola çıkılarak asidik ortamda ferrik iyonlarının ksenol rengi ile kompleks meydana getirmesi temeline dayanmaktadır. Örneklerdeki oksidan miktarıyla bağlantılı olan renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak ölçüldü. İşlem için Rel Assay Diagnostics® firmasının ticari TOS kitleri kullanıldı. Kit bileşenleri içeriğinde; reaktif 1 solüsyonu, reaktif 2 solüsyonu, standart 1 solüsyonu, standart 2 solüsyonu yer almaktadır. TOS seviyesini belirlemek için 75 µl plazma örneğinin olduğu kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonu eklenerek 530 nm'de ilk absorbans değeri okundu. Ardından aynı kuyucuk içerisine 25 µl Reaktif 2 solüsyonu eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekletme süresinin sonunda 530 nm' de ikinci absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen değerler aşağıdaki formül kullanılarak 'mmol H₂O₂ Equiv./ L' cinsinden belirtildi.

$$TOS = \frac{\Delta \text{Örnek absorbans değeri}}{\Delta \text{ST2 absorbans değeri}} \times 20$$

Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümün prensibi

TAS düzeyinin tespitinde; 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat= ABTS+) olarak ifade edilen radikalın ortamdaki antioksidanların toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolarize olmasını temel almaktadır. Bu işlem için Real AssayDiagnostics® (Turkey) ticari kiti kullanıldı. Kit bileşenleri içeriğinde; reaktif 1 solüsyonu, reaktif 2 solüsyonu, standart 1 solüsyonu, standart 2 solüsyonu yer almaktadır.

TAS seviyesini belirlemek için 30 µl örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonu ilave edilerek 660 nm'de ilk absorbans değeri okundu. Ardından aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekletme süresinin sonunda 660 nm'de ikinci absorbans değeri okundu. Ölçülen absorbans değerleri aşağıda görülen formüde uygun figur de yerlerine konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAS düzeyleri tespit edildi.

TAS (mmol Trolox Equiv./L) = ((ΔStandart 1 absorbans değeri - Δörnek absorbans değeri) / ((ΔStandart 1 absorbans değeri - ΔStandart 2 absorbans değeri)))

İstatistiksel analiz

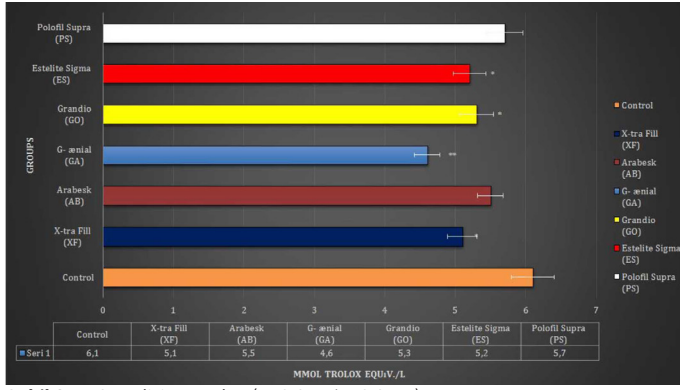
Örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde power analizinden yararlanıldı (n=12). Çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Verilerin analizinde, değişkenlerin kontrol grubu ile olan etkileşimlerini tespit etmek için tek yönlü ve iki yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 ve p<0.001 seviyelerinde değerlendirildi.

BULGULAR

6 farklı kompozit materyalin uygulandığı gruplarda ve kontrol grubunda 72 saat sonunda belirlenen TOS bulgularının grup ortalama değerleri ve istatistik sonuçları şekil 1'de; TAS bulgularının grup ortalama değerleri ve istatistik sonuçları ise şekil 2'de görüldüğü gibidir.



Şekil 1. TOS analizi sonuçları (p<0,05* /p<0,01**)



Şekil 2. TAS analizi sonuçları ($p < 0,05$ */ $p < 0,01$ ***)

Elde edilen TOS değerleri sırasıyla GA>XF>ES>GO>A-B>PS; TAS değerleri sırasıyla GA<XF<ES<GO<AB<PS şeklindedir. Herhangi bir materyalin uygulanmadığı kontrol grubundaki TOS değeri en düşük dolayısıyla TAS değeri en yüksek bulunmuştur. PS ve AB gruplarından elde edilen TOS değerlerinin kontrol grubundan daha yüksek; TAS değerlerinin daha düşük olduğu gözlenmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. GA, XF, ES, GO gruplarından elde edilen TOS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı figür de kontrol grubundan daha yüksek; TAS değerlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı figür de kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Ağız içi dokularla doğrudan veya dolaylı olarak temas halinde bulunan dental materyallerin güçlü mekanik özelliklerine ek olarak yüksek oranda biyouyumlu olması büyük önem taşımaktadır¹². Oral dokular ile restorasyonlar arasındaki direkt etkileşimler biyouyumluluğu etkileyebilmektedir. Plak ve gingival indekslerde olduğu gibi sonda lanabilen cep derinliğinin de 5-6 yıllık direkt restorasyonlara komşu bölgelerde yüksek oranda toksik bulunduğu bildirilmiştir.¹³ Bu nedenle çalışmamızda dişeti fibroblast hücreleri tercih edildi.

Materyallerin sitotoksik etkilerini araştırırken farklı teknik ve metotların araştırmacılar tarafından kullanıldığı gözlenmektedir. İn-vitro testler, diğer biyouyumluluk 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 avantajlara¹⁴ sahip olmaları nedeniyle bu çalışmada da in vitro testler kullanıldı.

Hücrelerde gerçekleşen normal aerobik metabolizma reaksiyonları neticesinde ortaya çıkan hidroksil, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi reaktif radikallerinin yüksek seviyelerde ortamda bulunması hücre ve dokularda oksidatif stresin artmasına ve hücresel hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres, metabolik prooksidan üretiminin antioksidan kapasiteyi aştığında meydana gelen durumdur.^{15,16} Oksidatif strese dayalı ölçüm yöntemlerinin bir materyalin biyouyumluluğunun belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir.¹⁷ Bu nedenle çalışmamızda oksidatif

strese dayalı ölçüm yöntemleri olan TAS ve TOS analizleri ile rezin esaslı kompozit materyallerin gingival fibroblastlarda meydana getirdiği oksidatif hasarın değerlendirilmesi amaçlandı.

Rezin esaslı materyallerin biyouyumluluğu materyalden salınan organik maddelerin miktarı, doldurucu içeriği, doldurucu yapısı ve yüzdesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Materyallerin yetersiz polimerizasyonu ve çözünmelerine bağlı olarak materyallerden salınan rezin içeriğinin sitotoksitesiyeye yol açabileceği belirtilmiştir.¹⁸⁻²⁰

Kompozitlerin yetersiz polimerizasyonu sonucunda veya polimerizasyondan sonra kimyasal, fiziksel ve mekaniksel erozyonlara bağlı olarak materyallerden kısa sürede ve uzun sürede salınan monomerlerin, pulpa, gingival ve pulpanöron hücrelerinde apoptoza sebebiyet veren serbest oksijen radikallerinin üretilmesine, redoks dengesinin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir.^{8,21-24}

İnsan gingival fibroblast hücreleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, salınan HEMA, UDMA, TEGDMA gibi monomerlerin, hücrelerde antioksidan mekanizmasında önemli rol oynayan glutatyonun erken dönemde tükenmesine sebep olduğu tespit edilmiştir.^{22,25,26}

Volk ve ark.²⁶'nın farklı rezin monomerlerin hücrelerde meydana getirdiği oksidatif stresi değerlendirdikleri bir çalışmada glutatyon tükenme hızı monomere göre sırasıyla küçükten büyüğe doğru UDMA, TEGDMA, Bis GMA ve HEMA olarak belirlenmiştir. Engelmann ve ark.²⁷'nin yaptığı bir çalışmada ise Bis-GMA'nın dişeti fibroblastlarında TEGDMA' a kıyasla çok daha düşük konsantrasyonlarda bile daha fazla antioksidan metabolizmada önemli rol oynayan glutatyon havuzunda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Moharamzadeh ve ark.³² yaptıkları çalışmalarında TEGDMA monomeri içeren kompozit rezinlerin oral dokular üzerindeki sitotoksik etkisini vurgulayarak; monomerlerin toksisitesini sırasıyla büyükten küçüğe doğru Bis-GMA, TEGDMA, UDMA olarak belirtmişlerdir.

Rezinlerden salınan artık monomer miktarının ve hücrelerde oluşturduğu oksidatif stresin polimerizasyon derecesi, materyalin monomer kimyasal yapısına, çözücünün yapısına, matrikste moleküller arası oluşan çapraz bağlara ve çevresel faktörlere bağlı olduğu tespit edilmiştir.²⁸⁻³¹

Bir materyalin toksisite potansiyeli materyalin lipofilik, hidrofilik ya da hidrofobik olmasıyla da yakından ilişkilidir. Ayrıca düşük moleküler ağırlığa sahip monomerlerin yüksek molekül ağırlıklı monomerlerden; dallanmış zincir yapısına sahip rezin monomerlerin ise düz zincir yapısına sahip olanlardan daha toksik potansiyelde olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.^{33,34} Yapılan çalışmalarda rezin esaslı materyallerden düşük molekül ağırlığına sahip lipofilik bileşenlerin salındığı ve bu bileşenlerin hücre membranlarıyla etkileşime girerek membranlarda birikimi sonucunda hücrelerde toksik reaksiyonların meydana getirdiği bildirilmiştir.^{28,35,36}

Hücrelerde sıcaklık ve biyoaktif kimyasallar gibi stres faktörleriyle karşılaşılarda koruma amaçlı hücreler tarafından ısı şok proteinleri üretilmektedir. Noda ve ark.³⁷'nin insan monositlerinde yaptığı çalışmada HEMA ve TEDGMA'nın ısı şok proteini olan HSP 72'yi baskıladığını ve hücrelerin savunma mekanizmasını azalttığı tespit edilmiştir.

Janke ve ark. Yaptıkları çalışmalarında TEDGMA'nın hücrelerde apoptoza ve nekroze sebep olabileceği sonucuna varmışlardır.³⁸ Isaa ve ark.³⁹ rezin monomerlerin insan dişeti fibroblastları üzerindeki sitotoksitesisini inceledikleri çalışmalarında, rezinlerden salınan monomerlerin tamamının hücrelerin mitokondriyal aktivitesini azalttığını; sitotoksitesisi en az olan monomerin HEMA; en fazla olan monomerin Bis-GMA olduğunu tespit etmişlerdir.

Chang ve ark.⁴⁰ çalışmalarında; UDMA monomerinin doza bağlı olarak hamster ovaryum hücrelerinde reaktif oksijen radikalleri üretimine ve hücre döngülerinde negatif değişikliklere sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Demirci ve ark.⁴¹'nin çalışmasında 1,5 mmol/L TEDGMA monomerinin reaktif oksijen radikallerini pulpa hücrelerinde yaklaşık üç katına çıkardığını tespit edilmiştir.

Samuelsen ve ark.⁴²'nin yapmış oldukları bir çalışmada TEDGMA ve HEMA monomerlerinin serbest oksijen radikalleri oluşturarak hücrelerde apoptozisin tetiklenmesine neden olduğunu tespit edilmiştir. Lefeuvre ve ark.⁴³ TEDGMA monomerinin insan fibroblast hücrelerinde mitokondriyal hasara neden olduğunu ve hücrelerde oksidatif stres meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalara bakıldığında rezin bazlı materyallerin oksidatif hasara neden olarak hücrelerde sitotoksik etki meydana getirdikleri açıkça gözlenmektedir.

Bu çalışmada 72 saat sonunda ölçülen TAS ve TOS değerleri incelendiğinde; PS ve AB grubu dışındaki gruplardan (GO, ES, XF, GA) elde edilen değerlerle kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. PS ve AB gruplarının TOS değerlerinin kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemesi, bu gruplara uygulanan materyallerin diğer kompozit rezinlere oranla gingival fibroblast hücrelerinde daha az oksidatif hasara neden olabileceğini düşündürdü.

Bis-GMA monomeri içermemesine rağmen monomer oranı en yüksek olan kompozitin uygulandığı GA grubuyla bulk fill yapıda bir kompozitin uygulandığı XF grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Çalışmamızda aynı markaya ait, her ikisi de mikrohibrit yapıda olan doldurucu ve monomer oranları aynı olan iki farklı kompozitin uygulandığı PS ve AB gruplarından elde edilen TAS ve TOS değerlerinin farklı olmasının, farklı monomer içeriklerinden kaynaklı olduğunu; AB grubunda, PS grubundan farklı olarak TEDGMA ve EGDMA monomerlerinin varlığının hücrelerde daha fazla serbest oksijen radikali oluşmasına sebep olabileceği sonucunu ortaya koydu.

Mikrohibrit yapıdaki kompozitlerin uygulandığı PS ve AB gruplarından elde edilen TOS değerlerinin; nanohibrit (GO,ES,GA) ve bulk fill yapıdaki kompozitin uygulandığı (XF) gruplarından elde edilen TOS değerlerinden daha düşük gözlenmesi; materyalin hibrit yapısının hücrelerde açığa çıkan serbest oksijen radikalleri üzerinde etkili olabileceğini düşündürdü.

Bu çalışmada doldurucu yüzdesi en düşük olan ve monomer yüzdesi en fazla olan GA grubunda en düşük TAS değerleri tespit edildi. Monomer yapısında UDMA ve dimetakrilat monomerlerini içeren bu materyalin uygulandığı grupta; monomer içeriğine dikkat edilmediğinde monomer yüzdesinin artmasıyla hücrelerde meydana gelen oksidatif hasarın direkt olarak artacağı sonucuna varıldı. Bunun yanı sıra doldurucu yüzdesi daha yüksek olan ve monomer yüzdesi daha düşük olan GO, ES, XF gruplarına maruz kalan hücrelerde meydana gelen oksidatif stresin fazla olduğu; bu durumun matris monomerlerinin yapısıyla, materyalin hibrit tipiyle ve doldurucu içeriğindeki farklı parçacıkların (küresel silika, zirkonyum partikülleri, fluoroalüminasilikat partikülleri) varlığı ile ilişkili bir durum olduğu düşünüldü.

SONUÇ

Bu çalışmada, bir materyalin sitotoksitesisinde ve hücrelerde meydana getirdiği oksidatif hasarda; materyalin yapısı, içerdiği monomer oranı, monomer tipi, doldurucu içeriği gibi faktörlerin bir bütün olarak etkili olduğu gözlemlendi. Bu çalışma sonucunda yaygın kullanım alanına sahip rezin bazlı kompozit materyallerin tamamının oksidatif strese neden olduğu görüldü. Böylece materyallerin biyoyumluluğa dair yapılacak olan çalışmalarda, rezin içermeyen materyallerinde çalışma grubuna dahil edilmesinin çalışmanın niteliğini arttıracığı düşünüldü. Bu çalışmada kullanılan materyallerin klinik olarak kullanımları göz önünde bulundurulduğunda özellikle derin çürüklü dişlerin restorasyonlarında daha az hücre hasara neden olan PS grubunun tercih edilmesi önerilebilir. Kliniktenlere bu çalışmada kullanılan materyallerin PS, AB, GO, ES, XF, GA sırasıyla tercih edilmesi önerilir. Hücresel stresi arttıran materyallerin kullanımında oksidatif stres en çok arttıran GA gibi materyallerin kullanımda derin çürüklü dişlerin restorasyonunda biyoaktif kaide materyallerinin kullanılması tavsiye edilebilir. Dental materyallerde biyoyumluluğa dair yapılan çalışmalar, sitotoksik özellikleri azaltmaya yönelik yenilikçi yaklaşımları da beraberinde getirmeli ve materyallerin etki düzeyleri uzun takip sürelerinde incelenen farklı çalışmalarla desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996; 12: 186-193.
2. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. Eur J Oral Sci 1998; 106: 696-706.
3. Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent advan-

ces and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res* 2011; 90: 402-416.

4. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 97-116.

5. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28: 3757-3785.

6. St John KR. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 747-760.

7. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 2013; 34: 4555-4563.

8. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85: 870-877.

9. Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Investig* 2004; 8: 81-85.

10. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater* 2006; 22: 1086-1092.

11. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 157-170.

12. Demirci T GT, Şengül F. . Dental Rezin Kompozitlerin Sitotoksitesisi: Bir in Vitro Çalışma. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2014; 24: 10-15.

13. 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: 422-427.

14. AA KS. Dental döküm alaşımlarının genotoksitate, mutajenitesite ve karsinojenitesini. *SÜ Diş Hek Fak Derg* 1994; 16: 73-78.

15. Gutteridge JM, Quinlan GJ, Mumby S, Heath A, Evans TW. Primary plasma antioxidants in adult respiratory distress syndrome patients: changes in iron-oxidizing, iron-binding, and free radical-scavenging proteins. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 263-273.

16. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.

17. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg* 2004; 15: 91-96.

18. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 333-355.

19. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachab-

le components from composite. *Dent Mater* 1990; 6: 282-287.

20. 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: 215-220.

21. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 2008; 12: 1-8.

22. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66: 476-482.

23. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005; 26: 745-753.

24. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S. NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 2004; 83: 837-842.

25. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002; 63: 746-751.

26. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2006; 22: 499-505.

27. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004; 25: 4573-4580.

28. Lygre H, Høl PJ, Solheim E, Moe G. Organic leachables from polymer-based dental filling materials. *European journal of oral sciences* 1999; 107: 378-383.

29. Munksgaard EC, Peutzfeldt A, Asmussen E. Elution of TEGDMA and BisGMA from a resin and a resin composite cured with halogen or plasma light. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 341-345.

30. 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: 1106-1115.

31. 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 Rehab* 1991; 18: 353-362.

32. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM.

Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater* 2007; 23: 40-44.

33. Dillingham EO, Lawrence WH, Autian J, Schmalz G. Acrylate and methacrylate esters: relationship of hemolytic activity and in vivo toxicity. *J Biomed Mater Res* 1983; 17: 945-957.

34. Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 2001; 80: 2046-2050.

35. 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: 137-145.

36. Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 263-271.

37. Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkman KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res* 2002; 81: 265-269.

38. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82: 814-818.

39. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 2004; 20: 12-20.

40. Chang HH, Chang MC, Lin LD, Lee JJ, Wang TM, Huang CH, Yang TT, Lin HJ, Jeng JH. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 2010; 31: 6917-6925.

41. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008; 24: 362-371.

42. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases. *Dent Mater* 2007; 23: 34-39.

43. Lefeuvre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, Stanislawski L. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004; 83: 914-919.