

Farklı Kompozit Materyallerinin Sitotoksitelerinin İki Farklı Hücre Kültürü Test Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Evaluation of The Cytotoxicity of Different Composite Materials by Two Different Cell Culture Test

Bilge Turhan Bal*, Nalan Ayhan Sönmez**, Barkın Bavbek*, Cihan Akçaboy***

Özet

Dental materyallerin toksisitesi geçmiş yıllardan beri genel bir endişeye neden olmuştur. Bu çalışmanın amacı 3 farklı kompozit materyalinin sitotoksitelerinin, 2 farklı hücre kültürü test yöntemiyle değerlendirilmesidir. Çalışmada MTT ve hücre tutunma testleri kullanılmıştır. Sonuçlar, iki yönlü varyans analizi tekniği ve Duncan testiyle değerlendirilmiş ve her iki grupta 2. günde materyaller ve kontrol grubu arasında önemli bir farklılık gözlenmezken, 5. ve 7. günde kompozit materyallerinin sitotoksik etki gösterdiği ve materyaller arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu bulunmuştur. Çalışmada MTT ve hücre tutunma testinden elde edilen sonuçların da farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: kompozit rezinler, sitotoksiteler, hücre kültürü testleri

Abstract

Toxicity of dental materials has caused public concern over the past years. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of the 3 different resin composites with 2 different cell culture test models. MTT and cell attachment assay were used in the present study. Results were evaluated by two-way analysis of variance and Duncan's test and in each group, no significant difference was found between the materials and control on the 2nd day whereas on the 5th and 7th day, it was found that the composite resin materials showed cytotoxic effect and the differences between the materials were statistically significant. In this study it was determined that the results of each cell culture test (MTT and Cell attachment test) were different.

Key words: Resin composites, cytotoxicity, cell culture tests

* Araştırma Görevlisi, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi A.D., Ankara

** Serbest Dişhekimisi, Sano Klinik, Ümitköy

*** Prof, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi A.D., Ankara

Restoratif diş hekimliğinde kullanılan kompozit rezinler, estetik taleplerin ön plana çıkması ve amalgam restorasyonlardan salınan cıvanın yan etkilerinden kaynaklanan kaygıların artması nedeniyle günümüzde anterior ve posterior restorasyonlarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.¹ Kompozit rezinler, dolgu materyali, yapıştırıcı ajan, direkt ve indirekt restoratif materyal ve kor uygulamalarında kullanılmaktadırlar.² Kompozit rezinler kayıp diş dokusunu, konturunu, rengini ve fasiyal estetiği oldukça başarılı olarak sağlarlar. Kompozit rezinler, organik polimer matrix, inorganik doldurucu partikül, birleştirici, başlatıcı ve hızlandırıcı ajan olmak üzere 4 ana bileşenden oluşmaktadırlar.³ Kompozit rezinlerin özelliklerini, içerdikleri monomerlerin kimyasal yapıları etkilemektedir. Bis-fenol A glisidil di metakrilat (Bis-GMA) bir çok kompozit rezinin ana monomeri olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda daha iyi mekanik özellikler sağlamları açısından üretilen dimetakrilat (UDMA) ve Bis-etilen glikol dimetakrilat rezin matrisine eklenmiştir.^{4,5} Ayrıca matrix içerisinde trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) gibi dilue edici ko-monomerler bulunmaktadır.⁵ Kompozit materyallerinden monomerlerin salındığı ve salınan bu maddelerin pulpa üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu vurgulanmaktadır.⁶⁻⁹ Yapılarının zamanla bozulmasıyla ve tamamlanmamış ya da yetersiz polimerizasyon nedeniyle, kompozit rezin materyallerinden ağız ortamına sızan içeriklerin sitotoksik olduğu bir çok çalışmada belirtilmiştir.^{6,10-13} Herhangi bir restoratif materyalin üretilmesinde, estetik dayanıklılık ve manuplasyon kolaylığının yanı sıra materyallerin biyouyumlu olması da gerekliliklerden biridir.¹⁴ Klinik olarak kullanılan dental materyallerin biyolojik ve toksikolojik özelliklerini değerlendirebilmek önemlidir.¹⁵ İnsanlarda kullanılmadan önce dental materyallerin başlangıç olarak in-vitro çalışmalarının yapılması gereklidir. İn-vitro çalışmalar in-vivo çalışmalarda çıkabilecek problemlere karşı deney faktörlerinin kontrol altına alınmasından dolayı avantajlıdır. İn-vitro metodlar; basittir, tekrarlanabilir, ucuzdur ve dental materyallerin temel biyolojik özelliklerini değerlendir-

mek için uygundur.¹⁶ Bugün biyomateryallerin sitotoksitelerini belirleyen bir çok farklı in-vitro test modeli vardır.¹⁷

Bu araştırmanın amacı 3 farklı kompozit materyalinin sitotoksitelerinin 2 farklı hücre kültürü test yöntemiyle karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücrelerin hazırlanması

Çalışmada L929 fare fibroblast hücre kültürü kullanıldı. Hücreler saklama ortamından çıkartıldıktan sonra 37°C deki su banyosunda çözdürüldü ve 5 dk 800 devirde santrifüje edildi. Yüzeydeki süpernatant kısım atılarak, hücreler içinde %10 fetal sıgır serumu (FBS;Biochrom, Berlin, Almanya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12(DMEM/F12) besi ortamı ile T-25 hücre üretme kabına alındı. Hücreler haftada 3 kez 37°C de, % 5 CO₂ li ve%100 nemli ortamda pasajlandı ve 3 seri pasaj yapıldı. Logaritmik fazda üreyen adherent hücreler % 0.025 tripsin (Sigma) ve % 0.02 EDTA (Sigma) solusyonu ile yıkandı ve ayrıldı ve 37°C deki inkübatörde 2-3 dk inkübasyona bırakıldı.

Örneklerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan materyaller tablo 1 de görülmektedir. Örnekler, ISO standartlarına (ISO 10993-12:1996)¹⁸ göre, üretici firmaların önerileri doğrultusunda, 6mm çapında ve 1mm derinlikte olacak şekilde, teflon kalıplar kullanılarak hazırlandı. Işıkla sertleşen kompozit rezin materyallerin sertleşmesinde standart serleştirme cihazı kullanıldı.(Optilux 401; Demetron, Kerr, Danbury, USA). Her bir materyalden MTT testi için 36, hücre tutunması testi için ise 9 adet örnek hazırlandı.

MTT testi

Örneklerin yüzey alanının besiyeri hacmine oranı ISO standartlarında belirtildiği gibi 0.5 cm² dir. Tüm örnekler 45 dk UV ışını ile sterilizasyon işlemi uygulandıktan sonra 6 gözlü hücre üretme kaplarına yerleştirildi ve

Table 1 Araştırmada kullanılan kompozit rezin materyalleri

Materyal	Polimerizasyon şekli	Üretici Firma	Matrix
Quadrant Universal LC	ışıkla polimerize	Haarlem, Cavex Holland B.V.	BIS-GMA, TEGDMA
Filtek Z250	ışıkla polimerize	3M Dental Products, St Paul, MN,USA	BIS-GMA, UDMA, BIS-EMA
Alpha-Dent	Kimyasal polimerize	Dental Technologies, Inc. Hamlin Ave, Lincolnwood, USA	BIS-GMA

üzerine besi ortamı konularak % 5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde 2, 5, 7 günlük periodlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda salınım besi ortamları steril kabin içerisinde steril doku kültürü santrifüj tüplerine alındı. L 929 hücre süspansiyonu 90000 hücre/ mL⁻¹ konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı ve sonra 96 gözlü hücre üretme kaplarına 100µl/göz (kuyucuk) olacak şekilde taksim edilerek % 5 CO₂ li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kültür ortamındaki besi yeri aspre edilerek uzaklaştırıldı ve önceden hazırlanmış salınım besi ortamları 100µl/göz olarak taksim edilerek % 5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde 24 saat inkübe edildi. MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] den final konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde MTT solusyonu hazırlandı. 24 saat inkübasyona bırakılan 96 gözlü hücre üretme kaplarındaki salınım besi ortamları uzaklaştırıldı ve hücre üretme kaplarına 100µl/göz olacak şekilde taze besi ortamı ve 12.5 µl MTT solusyonu konularak 37°C 'de karanlık ortamda 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT solusyonu içeren ortam aspire edilerek uzaklaştırıldı. 96 gözlü hücre üretme kaplarına izopropil alkol 100µl/göz olarak konulup absorbans 570 nm de optik okuyucuda okunup çıkan değerler kontrol gözleriyle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı. Kontrol gözleri işleme sokulmamış hücre kültürlerinden oluşturuldu. Deneyler 3 kez tekrarlandı.

Hücre tutunma testi

24 gözlü kültür kaplarının yüzeyi 1.5 cm çapında hazırlanan parafin ile kaplanmış ve parafin yüzeye sabitlendikten sonra UV ile yüzey sterilizasyonu yapıldı. L929 fare fibroblast hücreleri, %10 fetal sıçır serumu (FBS; Biochrom, Berlin, Almanya) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) içinde başlangıç hücre sayısı 90.000 hücre/ mL⁻¹ olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 24 gözlü hücre üretme kaplarının içine yerleştirdi ve ml'de 90.000 hücre/ mL⁻¹ olacak şekilde 2ml hücre süspansiyonu eklendi. Hücreler 7 gün inkübasyona bırakıldı. 2, 5, 7. günlerde diskler ortamdaki hücre tutunmaları incelendi. Bunun için disklerin üzerine 1ml % 0.25 Trypsin-10µM EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler, tripan mavisi kullanılarak canlı hücre sayımları yapıldı. Bu şekilde malzeme yüzeyine tutunan hücre sayısı belirlendi.

İstatistiksel Değerlendirme

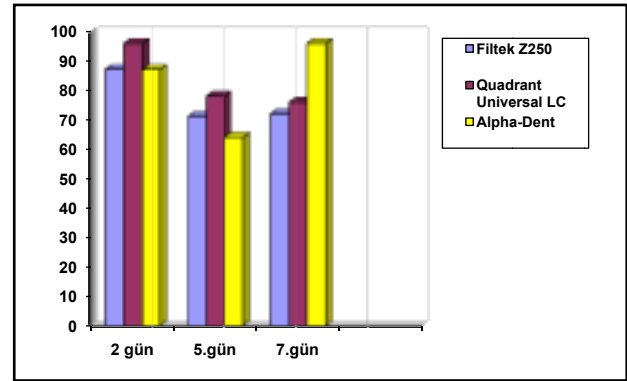
Sonuçlar iki yönlü varyans analizi tekniğiyle değerlendirildi. Varyans analiz tekniğine ilişkin hesaplamalardan sonra 'materyal-gün' interaksyonunun istatistik olarak önemli olduğu saptandı (p<0.01). Bundan dolayı materyallerin ortalamaları arasındaki farkların istatistik

olarak önemli olup olmadığı her gün için ayrı ayrı olmak üzere Duncan testiyle değerlendirildi (p<0.05).

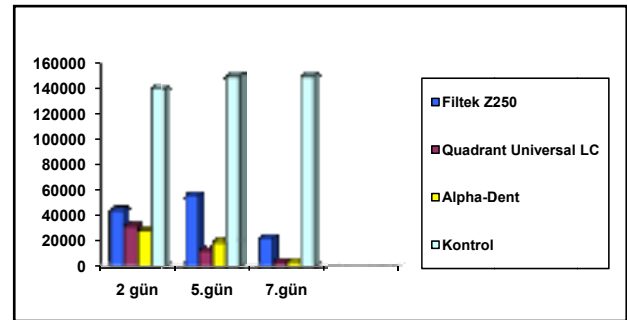
SONUÇLAR

MTT testi

Çalışmada ilk olarak, 3 farklı kompozit materyalinin, 3 farklı zaman periyodunda hücre canlılığı üzerine etkileri, MTT test yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kompozit materyallerinin kontrol grubuna göre hücre sayısında belirli oranlarda azalmalara neden olduğunu göstermektedir. Şekil 1 de kompozit materyallerin hücre canlılığına etkileri yüzde oranlarıyla gösterilmektedir.



Şekil 1. Kompozit rezin materyallerinin 3 farklı zamanda hücre canlılığı oranları (%) (MTT).



Şekil 2. Kompozit rezin materyallerine 3 farklı zamanda tutunan hücre sayısının ortalama değerleri.

Çalışmada 2. günde Quadrant Universal LC materyalinin hücre canlılığını daha az etkilediği ancak tüm kompozit materyallerinin ve kontrol grubu arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olmadığı saptanmıştır (p>0.05). 5. günde en az sitotoksik olan materyal Quadrant Universal LC olarak bulunmuştur. Bunu sırasıyla Filtek Z250 ve Alpha-Dent kompozit materyali takip etmektedir. 5. günde materyaller arası farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır (p<0.05). 7. günde en sitotoksik materyalin Filtek Z250 olduğu ve bunu sırasıyla Quadrant Universal LC ve Alpha-Dent kompozit materyalinin takip ettiği görülmüştür. Tüm

kompozit materyalleri ve kontrol grubu arasındaki farklılıkların da istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu çalışmada Quadrant Universal LC ve Filtek Z250 materyalleri 5. ve 7. günde 2. güne oranla daha fazla sitotoksosite gösterirken Alpha-Dent kimyasal kompozit materyali 7. günde daha az sitotoksosite göstermiştir. Tüm materyaller kıyaslandığında 2. günle, 5 ve 7. günler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Hücre tutunma testi

Çalışmada, 3 farklı kompozit materyalinin sitotoksiteleri, 3 farklı zaman periyodunda Hücre tutunma testiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde tüm kompozit materyallerine, kontrol grubuna göre çok daha az sayıda hücre tutunduğu saptanmıştır. Şekil 2 de kompozit materyallerine 3 farklı zaman periyodunda tutunan hücre sayılarının ortalamaları gösterilmektedir. 2. günde en fazla hücre tutunması Filtek Z250 materyalinde görülürken en az tutunma Alpha-Dent kimyasal kompozit materyalinde olmuştur. Ancak materyaller arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). 5. ve 7. günlerde en fazla tutunma Filtek Z250 materyalinde görülmüştür. Alpha-Dent ve Quadrant Universal LC materyali arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmazken, Alpha-Dent ve Quadrant Universal LC materyalleriyle Filtek Z250 materyali arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Tüm kompozit materyallerinde hücre tutunması zamanla azalırken Filtek Z250 materyalinde 5. artış olmuş ve bu artma 7. günde azalmıştır. Quadrant Universal LC ve Filtek Z250 materyalinde günler arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur. Alpha-Dent kompozit materyalinde ise 2. ve 5. gün arasında görülen farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmazken ($p>0.05$), 7. günle 2.ve 5. günler arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Kompozit rezinlerin yapılarında meydana gelen gelişmelere, yapıştırma işlemlerindeki kolaylıklara ve estetik taleplerindeki artışa bağlı olarak, kompozit rezin materyallerinin klinik olarak kullanımları son yıllarda oldukça artmıştır.¹⁹ Restoratif diş hekimliğinde yeni kompozit rezin materyallerinin de artmasıyla, klinik olarak uygun ve güvenilir sitotoksosite testlerinin geliştirilmesi zorunluluk kazanmıştır.²⁰

Bugün biyomateryallerin sitotoksitesini belirleyen bir çok farklı in-vitro test modeli vardır. Hücre kültürleri bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının stan-

dardize edilebilmesinden dolayı tercih edilmektedir.^{21,22} Ancak hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları hakkında bilgi edinilebilmekte, materyallerin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksosite düzeyleri konusunda bilgi elde edilememektedir.²² Çalışmada, 3 farklı kompozit materyalinin 3 farklı zaman periyodunda L 929 fare fibroblastlarına etkileri MTT ve hücre tutunma test yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri, MTT (tetrazolium salt 3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. Fibroblast hücrelerin kullanıldığı ve mitokondrial aktiviteyi gösteren MTT yöntemi, biyoyumluluk testleri içerisinde, hızlı sonuç alınması ve çok hassas olmasının yanı sıra materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin dahi değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir.^{23,24}

Schedle ve ark,²⁵ Taira ve ark²⁶ dental materyallerin sitotoksitelerinin belirlenmesinde hücre hatları içerisinde en duyarlı ve güvenilir şekilde kullanılabilecek hücre kültürü ortamının L-929 fare fibroblastları olduğunu belirtmişlerdir. ISO 10993-5 sitotoksosite testleri, in-vitro yöntemler standartlarına göre; in-vitro çalışmalarda dental malzemelerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında standart olarak L-929 ya da Balbc 3T3 fibroblast kültürlerinin kullanılması önerilmektedir.²⁷ Çalışmada kompozit materyallerinin L-929 fare fibroblastlarına etkileri incelenmiştir.

Çalışmada kompozit materyallerinin sitotoksitelerinin incelenmesinde MTT ve hücre tutunma testi olmak üzere iki farklı hücre kültürü test yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan hücre türü ve zaman periodları standartize edilmiş olsa da, sonuçlar değerlendirildiğinde, iki yöntem arasında farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür. Çalışmamıza benzer olarak, Cao ve ark¹⁷ kompozit materyallerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde, direkt, indirekt kontak testi ve ekstrat testi olmak üzere 3 farklı test yöntemi kullanmışlar ve araştırmacılar, direkt ve indirekt kontak testlerinin sonuçlarının birbiriyle uyum gösterdiğini ancak diğer testen elde edilen sonuçların farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, uygun test metodunun dikkatlice seçilmesinin gerekliliğini ve yine uygun hücrelerin kullanılmasının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada uygulanan MTT testinin, materyallerin sitotoksitelerinin belirlenmesinde son yıllarda kullanılan en güvenilir test yöntemlerinden biri olduğu belirtilmiştir.^{23,24}

Bir çok çalışmada yapılan kompozit rezin restorasyonlardan ağız ortamına çeşitli içeriklerin salındığı belirtilmektedir.^{28,29} Kompozit rezinlerden sızan bu içerikler materyallerin biyoyumluluğunu etkileyebilir.

Kompozit rezinlerin sitotoksik olduğu ve sitotoksik etkilerin başlıca sebebinin de salınan monomerler olduğu bir çok çalışmada belirtilmiştir.^{6,11-13,29} Çalışmamızda kullandığımız kompozit materyallerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin farklılıklar göstermesi, materyallerin matrix yapılarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Farklı test modelleri sitotoksitesinin belirlenmesinde farklılıklara neden olabilir.¹⁷ Bunun yanında hücre modellerindeki farklılıklar, farklı hücre türlerinin kullanılması, parametrelerdeki ve kullanılan kompozit rezin materyallerindeki yapısal farklılıklar sitotoksikite testlerinde değişik sonuçlar alınmasına neden olabilir²⁹⁻³¹ ve bu da farklı hücre kültürlerinden elde edilen sonuçların kıyaslanmasında zorluklara neden olmaktadır. Huang ve ark¹⁶ Tetric (Dentsply Ltd, Konstanz, Germany) ve Superfil (Dentsply Ltd, Konstanz, Germany) kompozit materyalinin insan pulpa hücrelerine olan sitotoksik etkilerini incelemişler ve kompozitlerden salınan maddelerin sitotoksik olduğunu ve en fazla sitotoksik etki gösteren materyalin Superfil kompozit rezin materyali olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar rezin bazlı restoratif materyallerin sitotoksitesilerinin

test edilen ürüne ve özellikle içerisinde sızan komponentlere bağlı olarak değişebildiğini belirtmişlerdir. Nalçacı ve ark³² kompozit rezinlerin 2 günlük inkübasyondan sonra sitotoksik olduğunu ve 7 günlük inkübasyondan sonra sitotoksitesilerinin kaybolduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda 2. günde materyaller ve kontrol grubu arasında bir farklılık gözlenmezken Nalçacı ve ark²⁹ dan farklı olarak 5. ve 7 günde kompozit materyallerinin sitotoksik etki gösterdiği ve materyaller arasında da farklılıkların olduğu bulunmuştur. Materyaller arası farklılıklar Huang ve ark¹⁶ da belirttiği gibi materyallerin kimyasal yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Üç farklı kompozit materyalinin sitotoksitesilerinin, iki farklı hücre kültürü test yöntemiyle değerlendirildiği çalışmada her iki grupta 2. günde materyaller arasında önemli bir farklılık gözlenmezken 5. ve 7. günde kompozit materyallerinin sitotoksik etki gösterdiği ve materyaller arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olduğu bulunmuştur. Çalışmada MTT ve hücre tutunma testinden elde edilen sonuçların farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Sweeney M, Creanor SL, Smith RA, Foye RH. The release of mercury from dental amalgam and potential neurotoxicological effects. *J Dent* 30: 243-50, 2002.
2. Van Noort R. Introduction to dental materials. Hong Kong: Mosby Co, 2nd ed, 2002, 96.
3. Beun S, Glorieux T, Devaux J, Vreven J, Leloup G. Characterization of nanofilled compared to universal and microfilled composites. *Dent Mater* 23: 51-9, 2007.
4. Craig RG. Chemistry, composition, and properties of composite resins. *Dent Clin North Am* 25:219-39,1981.
5. Pain WM, Fleming GJ. Low-shrink monomers for dental restorations. *Dent Update* 30:118-22,2003.
6. Caughman WE, Caughman GB, Shifflet RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials* 12:737-40, 1991.
7. Stanley HR, Bowen RL, Folio J. Compatibility of various materials with oral tissues, II: pulp responses to composite ingredients. *J Dent Res* 58:1507-17, 1979.
8. Stanley HR, Swerdlow H, Buoncore MG. Pulp responses to anterior restorative materials. *J Am Dent Assoc* 73: 132-41, 1967.
9. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 14: 429-40,1998.
10. Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching inorganic solvents. *J Biomed Mater Res* 25: 443-57, 1991.
11. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70: 1450-5, 1991.
12. Bouillaguet S, Shaw L, Gonzales L, Wataha JC, Krejci I. Long term cytotoxicity of resin based dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 29: 7-13, 2002.
13. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KE, Sullivan IO. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endodont J* 35: 47-55, 2002.
14. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12: 186-193, 1996.
15. Mjor IA. Biologic assessment of biologic and technologic properties. *Oper Dent* 3: 9-13, 1978.
16. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94: 361-5, 2002.
17. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol* 25: 101-108, 2005.

18. International Standard ISO 10993-12:1996 (E) Biological Evaluation of Medical Devices. Part 12:Sample Preparation and Reference Materials.
19. Yap AU, Yap SH, Teo CK, Ng JJ. Finishing/polishing of composite and compomer restoratives: effectiveness of one step systems. *Oper Dent* 29: 275-9, 2004.
20. Spangberg LSW. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endodont* 4: 296-299, 1978.
21. Schmalz G. Concepts in Biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1: 154-162, 1997.
22. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-Advantages and limitations. *J Dent* 22: 6-11, 1994.
23. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater* 8: 65-70, 1992.
24. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods* 131: 165-172, 1990.
25. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 74: 1513-1520, 1995.
26. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont* 13: 311-315, 2000.
27. International Standard ISO 10993-5:1999. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5:Tests for invitro cytotoxicity.
28. Geurtsen W. Substances released from dental composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 106: 687-95, 1998.
29. Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 21: 453-462, 1994.
30. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblasts cultures. *J Biomed Mater Res* 41: 474-480, 1998.
31. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papillae-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18: 318-323, 2002.
32. Nalçacı A, Öztan MD, Yılmaz Ş. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. *Int Endodont J* 37: 151-156, 2004.

Yazışma Adresi:

Dr. Dt. Bilge Turhan Bal
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi,
Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Emek / Ankara
Tel : +90 312 203 41 92
Fax : +90 312 223 92 26
e-mail : bturhan@gazi.edu.tr