

**DENTAL MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUK TEST YÖNTEMLERİ****TESTING PROCEDURES FOR BIOCOMPATIBILITY OF DENTAL MATERIALS****İsmail Hakkı UZUN<sup>1</sup>****Funda BAYINDIR<sup>2</sup>****ÖZET**

Uzun dış hekimliği tarihi boyunca protetik tedavilerde birçok farklı materyal kullanılmıştır. Günümüzde, yeni materyallerin geliştirilmesinde fiziksel ve mekanik özelliklerle birlikte biyolojik özellikler de belirleyici hale gelmiştir. Biyouyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi olarak tanımlanır. Uygun doku cevabı, canlı bir sistem üzerinde bir materyalin yan etki göstermemesi anlamına gelir. Yan etki dental materyalin toksisitesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle dental materyalin biyouyumlu olmaması toksik olmasının bir nedeni olabilir. Biyouyumluluk, vücut içinde kullanılacak her materyal için önemli bir özelliktir. Biyolojik uyum, materyal, hasta ve fonksiyon arasındaki etkileşimin bir sonucudur ve süreklilik göstermektedir. Bir materyalin biyouyumluluğu *in vitro* testler, hayvan testleri ve kullanım testleri ile ölçülmektedir. Dental materyallerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi için *in vitro* hücre kültürlerinin kullanılması daha yaygın hale gelmektedir ve çeşitli hücre kültürü metodları dental materyallerin sitotoksitesinin belirlenmesi için geliştirilmiştir. *In vitro* testler, hayvan ve kullanım testlerine göre daha basittir. Tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir şartlarda yapılan ve karşılaştırılabilir sonuçlar veren bu testler, materyalin ilk kullanımı hakkında bilgi vermektedir. Hücre ve doku kültürleri maksimum standardizasyon sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Daha güvenli dental uygulamalar için gelecekteki çalışmalar materyallerin biyouyumluluğuna yönelecektir. Bu makale dental materyallerin biyouyumluluk değerlendirme metodları hakkında genel bilgi veren bir literatür taramasıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Dental materyal, biyouyumluluk

**SUMMARY**

Many different materials have been used in prosthetic treatment throughout dentistry's long history. Currently, in the development of new materials, biological properties have become markedly important, along with physical and mechanical properties. Biocompatibility has been described as the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application. Appropriate host response means no adverse reaction of a living system to the presence of such a material. An adverse reaction may be due to the toxicity of a dental material. Therefore toxicity may be regarded as one reason for non biocompatibility of a dental material. Biocompatibility is an important feature of any material designed for use within the body. Biocompatibility is the result of interactions between the material, patient and function, and is an ongoing process. Materials' biocompatibility is evaluated with *in vitro* tests, animal tests and usage tests. In the evaluation of the biologic effects of dental materials, *in vitro* testing methods using cell cultures have become more common, and several cell culture methods have been developed to assess the cytotoxicity of dental materials. *In vitro* tests are simpler than animal and usage tests. These tests, performed under repeatable and controllable conditions and presenting comparable results, give information about a material's first usage. Cell or tissue cultures play an important role because they allow a maximum standardization. Future efforts may be directed toward development of materials biocompatibility for safety application. This article presents a review of the literature about evaluation methods of biocompatibility of dental materials.

**Key Words:** Dental materials, biocompatibility

**Makale Gönderiliş Tarihi : 09.12.2009**

**Yayına Kabul Tarihi : 02.03.2010**

<sup>1</sup> Serbest Dış Hekimi, Dr.

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Protetik Dış Tedavisi Anabilim Dalı, Prof. Dr.

## GİRİŞ

Biyouyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi olarak tanımlanır<sup>30</sup>. Biyouyumluluk konusundaki geleneksel yaklaşım, materyalin ağız dokuları üzerinde önemli yan etkiler oluşturmaması olarak ifade edilebilir. Daha doğru yaklaşım ise “çevreleyen biyolojik ortamla uyumlu bir etkileşim sergileyecek kimyasal yapıdaki materyallerin seçilmesi veya üretilmesidir<sup>9,32</sup>.

Biyouyumluluk terimi, bir materyalin doku veya fizyolojik sistem üzerindeki yan etkilerini, aynı zamanda fizyolojik çevrenin de materyal üzerindeki etkileriyle birlikte her iki yöndeki etkileşimi de içermektedir. Bir materyal canlı dokulara yerleştirildiğinde karmaşık biyolojik sistemle materyal arasında bir etkileşim oluşmaktadır. Materyal konağı etkilerken aynı zamanda konak da materyali etkilemektedir. Bir materyalin “biyolojik inert” olması demek bu tip etkileşimlerin olmaması demektir ki bu anlamda, “inert biyomateriyal” yoktur<sup>32</sup>. Şüphe yok ki bugün kullanımda olan birçok dental materyal, sistemik olarak değerlendirilmesi gereken şekilde belli oranlarda doku cevabı oluşturmaktadır<sup>9</sup>. Herhangi bir materyalin biyouyumluluğu, materyalin türüne, yerleştirildiği bölgeye ve kendisinden beklenen fonksiyona bağlıdır<sup>17,31</sup>.

Biyouyumluluk statik olmayan, dinamik ve devam eden bir durumdur. Vücut, hastalık veya yaşlanmanın etkisiyle, materyal de korozyon, yorulma ve çigneme kuvvetlerinin etkisiyle sürekli değişmektedir. Bu değişim, vücut ve materyal arasındaki cevaba da dinamizm kazandırmaktadır. Yukarıdaki şartların değişmesiyle başlangıçta biyouyumlu olan bir materyal, zamanla uyumsuz hale gelebilmektedir. Materyal, vücut ve fonksiyon arasındaki etkileşim sürekli olduğundan materyale karşı oluşan cevap da süreklilik göstermektedir<sup>31</sup>.

Biyouyumluluk, yalnızca materyalin değil aynı zamanda materyalle çevresi arasındaki etkileşimin de bir özelliğidir<sup>31</sup>. Örneğin, titanyum osseointegrasyonu başarılı, uygun bir dental implant materyalidir. Aynı konak, aynı yöntem ve aynı yükleme şartları altında titanyum yerine kobalt-krom alaşımı kullanıldığında ise osseointegrasyon oluşmamaktadır. Aksine, kalça

eklemi protezi olarak kullanıldığında titanyum, korozyona yatkınlığı nedeniyle başarısız olmakta, kobalt-krom alaşımı ise titanyuma göre daha az aşındığından daha başarılı olmaktadır. Bu nedenle titanyumu biyouyumlu, kobalt-krom alaşımını ise biyolojik olarak uyumsuz şekilde tanımlamak doğru bir yaklaşım değildir. Fonksiyon ve yerleşimini tanımlamadan herhangi bir materyali biyouyumlu olarak tanımlamak mümkün değildir<sup>31</sup>.

Canlı dokulara implante edilen materyallere karşı oluşan en iyi huylu doku cevabı genelde materyal çevresinde, materyali fizyolojik çevreden izole eden fibröz doku formasyonudur. Fibröz kapsülün kalınlığı, bazen materyalin biyouyumluluğunu gösteren bir indikatör olarak da kullanılmaktadır. Kapsülün giderek kalınlaşması, devam eden uyarılara karşı vücudun ilave fibröz doku üretmeye devam ettiğini gösterir. Bu durumun bir istisnası, materyal üzerinde kemiğin herhangi bir kapsül olmadan şekillenebilmesidir ki soy metaller ve seramikler de bu karakteristiği sergilemektedir<sup>17</sup>.

## Dental Materyallerin Biyouyumluluğunu Etkileyen Faktörler

Biyouyumluluk, herhangi bir dental restoratif materyalin temel gereksinimlerinden birisidir. Dental materyallerin biyouyumlulukları, biyolojik faktörleri, hasta risk faktörlerini, klinik deneyimleri ve mühendislik konularını içeren karmaşık bir konudur. Biyouyumluluk tanımı, vücut ve materyal arasında bir etkileşimi ifade etmektedir. Vücuda yerleştirilen bir materyal normalde var olmayan yeni ara yüzler oluşturmaktadır. Bu ara yüzler, statik olmayan dahası vücudun materyali, materyalin de vücudu etkilemesi yönüyle oldukça dinamik olan alanlardır. Bu etkileşimlerin dinamizmi, hem materyale karşı oluşacak biyolojik cevabı hem de materyalin bu etkileşimler karşısındaki aşınma ve korozyon direncini belirlemektedir. Tüm ara yüzler, biyolojik yönden aktiftir ve bundan dolayı herhangi bir materyalin biyolojik açıdan inert olması söz konusu değildir. Biyolojik ara yüzlerin aktivitesi, materyalin lokasyonuna, vücutta kalma süresine, materyalin özelliklerine ve konağın sağlık durumuna bağlıdır<sup>32</sup>.

Biyolojik cevabı ölçerken göz önünde bulundurulması gereken birçok faktör vardır. İlk olarak, ma-

teryalin lokasyonu, biyolojik cevabın tümü üzerinde etkilidir. Materyalin yumuşak veya mineralize dokuya yerleştirilmesi, oral epitel ile doğrudan veya dental implantlar gibi kısıtlı temasta olması, kemik, doku sıvıları, kan ve tükürük ile doğrudan ya da dentin ve mine bariyeri gibi herhangi bir bariyer yoluyla temasa gelmesi gibi birçok faktör, materyale karşı gelişen biyolojik cevapta etkin rol oynamaktadır<sup>32</sup>.

Materyalin vücutta kalma süresi de biyolojik cevabı yakından etkilemektedir. Ölçü maddeleri gibi ağızda kısa süre kalan materyallerin biyolojik etkileri, ağızda çok daha uzun kalanlara göre farklılık göstermektedir. Ölçü maddeleri, ağızda kaldıkları kısa süre içinde alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Oysa bu kısa süre, toksik ve mutajenik etkilerin görülmesi için yeterli değildir. Kullanım süresi aynı zamanda vücutla materyal arasındaki karşılıklı etkileşimlerin ortaya çıkmasını da doğrudan etkilemektedir. Uzun kullanım süreleri, karmaşık yollarla materyalin vücutta, aynı zamanda da vücudun materyali etkilemesi için gerekli zamanı sağlamaktadır. Dental materyaller, fiziksel, kimyasal ve termal kuvvetlerin etkisi altındadır. Yapısal olarak zayıf materyaller, okluzal kuvvetler altında aşınabildikleri gibi kuvvetli materyaller de karşıt dişlerde aşınma oluşturabilmektedir. Materyalin biyolojik etkileri üzerine, kuvvetlerin etkisinin değerlendirilebilmesi için kısa ve uzun süreli kuvvetlerle, yorulma kuvvetleri göz önünde bulundurulmalıdır<sup>32</sup>.

Oral ve maksillofasiyal bölge karmaşık ve değişken bir yapıya sahiptir. Protetik materyaller, doku içine yerleştirilen materyallerden farklı olarak tükürük, yiyecek, bakteriler ve aynı zamanda bunlarla çevresel elemanlar arasında gelişen reaksiyon ürünleriyle de etkileşim halindedir. Bu etkileşimlerin tümü, materyal ve/veya protez üzerinde ciddi etkilere sahiptir ve bu etkiler oral bölgeye has bir durum sergilemektedir. Ağızdan farklı vücut bölgelerine yerleştirilen biyomateryaller, uygun sıcaklık ve sabit kimyasal yapıda kaldığı halde ağız ortamı, aşırı sıcaklık ve pH değişmelerine ve farklı kimyasal yapıdaki besinlere maruz kalmaktadır. Bir dondurmada (0 °C), sıcak bir kahveye (90 °C) aşırı sıcaklık değişmeleri ısısal genleşme, mekanik özelliklerde değişme veya bağlanmada başarısızlık gibi uyumluluk problemlerine yol açabilmektedir<sup>17</sup>.

Diş çürüğüne neden olan bakterilerin etrafındaki ortamda, pH değeri 2,2 ye kadar düşebilmektedir. Gastrik salgıların pH değeri, 1,0-3,5 mide asitlerinin ise 0,8' dir. Diş protezlerinin reflü ve kusma gibi rahatsızlıklar sonucu gastrik içeriğe maruz kalması, rutin fizyolojik koşullarda olmayan özel biyouyumluluk yaklaşımını gerekli kılmaktadır<sup>17</sup>.

Diş çürüğünün uzaklaştırılmasıyla ortaya çıkan kavite, dental materyallerin kimyasal bileşenlerinin veya aşınma ürünlerinin, pulpa odasına migrasyonu için bir yol haline gelmektedir. Bu durum materyalin kan, kapiller dokular ve nöronlar üzerindeki ve diğer ağız dokuları ile ilgili muhtemel toksik etkisinin oluşmasıyla alakalıdır. Eğer belli materyallerin pulpa odası ile temas etmesinde sakınca varsa bu durumda materyal uygulanmadan önce mutlaka kavite liner gibi restorasyon materyalini izole edecek önlemler alınmalıdır<sup>17</sup>.

### Biyolojik Uyum Testleri İçin Standartlar

Günümüzde biyouyumluluğu test etmek için kullanılan metodlar, uluslararası standartlar tarafından belirlenmiştir<sup>21,31</sup>. Bu standartlardan bazıları özel olarak dental materyallerle (ISO 7405)<sup>1,2,28</sup> ilgilien diğerleri, dental materyallerle diğer tıbbi malzeme ve cihazların test yöntemleri (ISO 10993)<sup>3</sup> hakkındadır. Diş hekimliği maddeleri, özel olarak diş hekimliğinde kullanılmak için imal edilmiş ve/veya geliştirilmiş maddeler veya değişik maddelerin kombinasyonudur<sup>1</sup>.

ISO 7405 standardı: Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından "TS 8227: Diş Hekimliğinde Kullanılan Malzemeler İçin Biyolojik Deney Metodları" olarak Türkçeye çevrilmiştir. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin preklirik testleri ve ISO 10993 ilaveleriyle ilgilidir. ISO 10993 standardı: "Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi" başlığını taşıyan bu standart, ulusal ve uluslararası standartların kombinasyonu ve harmanlanmasından oluşmuştur. Ana hedefi, insanların korunmasıdır. Sürekli güncellenmekte olan bu doküman, cihaz güvenliği ve dental/tıbbi materyallere karşı oluşacak biyolojik cevabı değerlendirmede kullanılacak test yönteminin seçimi hakkında kapsamlı bir rehberlik sunmaktadır<sup>21</sup>.

ISO 7405 ve ISO 10993 standartlarında, dental materyallerin biyolojik değerlendirilmesi için standart uygulamalar tavsiye edilmektedir. Bunlar kısaca;

• Dental materyal üreticilerine, materyalin kullanılması düşünülen alanda materyalin kendisi veya komponentleri hakkında bilinen veya öngörülen toksisite profiline uygun test yöntemlerinin seçimiyle ilgili sorumluluklar yükler.

• Üretici maliyet, deneyim ve başka nedenlerden dolayı sitotoksosite testlerinden birisini tercih edebilir.

• Test prosedürü, dört aşamadan oluşur. Yeni bir materyal önce başlangıç toksisite deneylerine ve ardından doku reaksiyonu testlerine tabi tutulmalıdır. Büyük hayvanlar üzerinde yapılacak denemelerin ardından klinik denemeler yapılmalıdır.

• Test sonuçları değerlendirilmeli ve materyalin üreticilerin belirlediği kullanım alanındaki sonuçları açıklığa kavuşturulmalıdır<sup>21</sup>.

### **Dental Materyaller İçin Biyolojik Uyum Testleri**

Dental materyallerin biyolojik olarak değerlendirilme ihtiyacı günümüze kadar tam olarak sorgulanmamıştır. Birçok materyal özellikle de restoratif materyaller dentin, pulpa, periodontal ve periapikal dokular ve oral mukoza gibi canlı dokularla uzun süre sıklıkla da yıllarca temasta kalmaktadır. Bu nedenle yaygın klinik kullanıma geçilmeden önce bu materyallerin ve/veya komponentlerinin ağız dokuları üzerindeki potansiyel zararlı etkilerinin değerlendirilmesi şarttır<sup>6,21,23</sup>.

Biyolojik testler için farklı basamaklar ve bunlara uygun test yöntemleri tanımlanmıştır. Başlangıç deneyleri, hemoliz, hücresel ve sistemik toksisite yöntemleriyle materyalin toksik profilini ortaya koymaktadır. İkincil testler, in vivo implantasyon çalışmaları, oral muköz membran iritasyon veya sensitizasyon testlerini içermektedir. Son aşamada materyalin asıl kullanım alanındaki klinik performansı değerlendirilmektedir<sup>2,9,28</sup>.

Diş hekimliğinde kullanılan malzemeler, biyolojik uyumla ilgili olarak beş grupta incelenirler:<sup>1,4,8,13,24,28</sup>

1. Ağız dışında vücudun diğer bölümleri ile yutma, soluma veya dokunma yoluyla temasta olan malzemeler,

2. Ağız içindeki yumuşak dokuyla temas eden malzemeler,

3. Pulpanın sağlığını etkileyebilecek malzemeler,

4. Kanal dolgu malzemeleri,

5. Diş sert dokularının sağlığını etkileyebilecek malzemeler.

Bu sınıflandırmaya dayalı olarak biyolojik uyumun belirlenmesinde kullanılacak testler, malzemenin uygulandığı bölgeye ve beklenen zararlı etkilere göre farklılık göstermektedir<sup>1,4,13</sup>. Biyoyumluluğun belirlenmesinde en önemli aşama, uygun test yönteminin seçilmesidir<sup>13,24</sup>.

Biyolojik testler genel olarak üç grupta sınıflandırılmıştır:<sup>1,4,13,14,24,28,31</sup>

1. Başlangıç testleri

2. İkincil testler

3. Kullanım testleri

### **Başlangıç testleri**

Başlangıç testleri, materyalin toksik profilini ortaya koymaktadır<sup>12</sup>. Bu testlerin çoğu ilaçları değerlendirmek için kullanılan testlerden seçilmiştir. Hücre kültürü test metodları hariç tutulursa bu testlerden ancak birkaçıyla dental materyaller test edilebilmiştir. Bu metodlar sitotoksosite, hemoliz, sistemik toksisite, karsinogenezis ve teratojeniteyi araştıran bir dizi testten (dominant letal test, ames testi, styles testi) oluşmaktadır<sup>14,28</sup>.

### **In vitro Sitotoksosite Testleri**

Yeni bir materyalin biyoyumluluğunu değerlendirmek için ilk geliştirilen test yöntemidir. Test malzemesinin, hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisinin kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir<sup>1,4</sup>.

*In vitro* testler, organizmanın dışında yapılan testlerdir<sup>31</sup>. Bu tür testler, test tüpleri, hücre kültür kapları, flask veya diğer taşıyıcı kaplarda yapılabilir. Memeli hücreleri, organeller, dokular, bakteri veya bazı enzim türleri, biyolojik sistem olarak kullanılabilir. Test edilecek materyal veya bu materyalden elde edilen özüt, biyolojik sistemle temas edecek şekilde test kabına yerleştirilir<sup>31,32</sup>.

Biyolojik sistemle materyal arasındaki temas, direkt veya indirekt olabilmektedir. Direkt temasta biyolojik sistem, materyal veya özüt ile doğrudan temas halinde iken indirekt temasta biyolojik sistemle materyal veya özüt arasındaki etkileşim agar, filtre membranlar veya dentin gibi bariyer sistemleri sayesinde olmaktadır<sup>4,23,31,32</sup>.

*In vitro* biyouyumluluk testleriyle, vücuda yerleştirildiklerinde malzemelere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonların test ortamında oluşturulması hedeflenmektedir. Öncül laboratuvar testleri yapılmadan hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi çok zaman alıcı ve masraflı olmaktadır<sup>7,10,13,23</sup>. *In vitro* deneylerle, daha karmaşık hayvan deneylerine geçilmeden önce materyalin toksik profili hakkında ön bilgi sağlanmaktadır<sup>15,23</sup>.

*In vitro* biyouyumluluk testlerinin uygulanmasında karşılaşılan temel problemler; bu testlerle araştırılmak istenen biyolojik reaksiyonların *in vivo* sistem mekanizmasından bağımsız olarak değerlendirilmesi ve uygulanan test yöntemleri için standardizasyonun sağlanmasıdır. Ancak teknoloji, standardizasyondan daha hızlı gelişmektedir ki bu da standart geliştirme sürecini zorlaştırmakta ve neredeyse sürekli hale getirmektedir<sup>4,13</sup>.

*In vitro* ve *in vivo* testler arasında iyi bir korelasyonun varlığını ortaya koyan deneysel çalışmalar, *in vitro* testlerin materyal seçimi için faydalı bir sistem olduğunu göstermiştir<sup>7</sup>.

#### ***In Vitro* Sitotoksosite Testlerinin Avantajları**

*In vitro* sitotoksosite testlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir;<sup>6,7,14,23,24,31,32</sup>

1. Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
5. Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,

6. Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkân tanınmaları,

7. Hayvan ve kullanım testlerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmalarıdır.

#### ***In Vitro* Sitotoksosite Testlerinin Dezavantajları**

*In vitro* testlerin dezavantajları şunlardır: <sup>6,10,24,31,32</sup>

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. *In vitro* ortamın organizmada bulunan immün sistem, inflamatuvar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık koordinasyon mekanizmalarına sahip olmaması. Birçok *in vitro* sistemde tek tür hücre kullanılması bu tür etkileşimlerin oluşmasını engellemektedir. Bu durum, *in vitro* test sonuçlarının *in vivo* şartlarla uyumluluğunu tartışmalı hale getirmektedir.

Tüm sitotoksosite testlerinde, test sisteminin toksik olmayan bir ortam, steril ve tekrarlanabilir olması önemlidir.

#### **İkincil Testler**

Test edilecek materyal, fare, rat, koyun, kedi, köpek ve domuz gibi bazı deney hayvanlarına implante edilmektedir<sup>31,32</sup>. Bu şekilde materyalle biyolojik çevre arasında oluşabilecek karmaşık ilişkilerin gözlemlenmesi hedeflenmektedir. Test materyali klinik kullanıma en yakın şekilde deney hayvanına yerleştirilir. Biyolojik cevap, kısa (7+/-2 gün) veya uzun (70 ±5 gün) takip süreleri sonunda alınmaktadır. Elde edilen veriler *in vitro* testlere oranla daha kapsamlıdır. Fakat biyolojik cevabın karmaşık yollarla oluşması, sonuçların kantitatif olarak değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Hayvan testlerinde değişkenlerin kontrolü genellikle zordur. Etik ilkeler ve hayvan hakları gibi konuların önem kazanması bu testlerin kullanılmasını giderek azaltmaktadır. Zaman alıcı ve pahalı olmaları da bu testlerin diğer bir dezavantajıdır. Son olarak uygulayıcı için önemli bir nokta da hayvan türlerinin insanlardaki cevabı aynı şekilde vermesinin şüpheli olmasıdır<sup>21,24,31</sup>.

Bu testler, kemik içi veya deri altı implantasyon testlerini, oral müköz membran iritasyon testlerini ve alerji testlerini içermektedir<sup>14,28</sup>.

## Kullanım Testleri

Bu test yöntemi, materyalin klinik kullanıma geçildiğinde ortaya çıkacak durumu tanımlama esasına dayanmaktadır. İkincil testler içerisinde yer alan kemik içi implantasyon testleri de bu gruba dâhil edilebilir. Diğer kullanım testlerinin çoğunluğu operatif diş hekimliği ve endodonti ile ilgilidir<sup>14,28</sup>.

Kullanım testleri, hayvan veya insanlar üzerinde yapılabilmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan testlere “klinik deneme” denmektedir. Kullanım testlerinin yapılabilmesi için bir materyalin klinik uygulamaya geçebilecek düzeye gelmesi gerekmektedir. Bu testlerin klinik tabloyu yansıtmaya potansiyeli oldukça yüksektir. İnsanlar üzerinde yapılan klinik denemeler ise kullanım testlerinin altın standardını belirlemektedir. Materyal son kullanılacak haliyle gönüllü bir insana yerleştirilir<sup>21,31</sup>.

Kullanım testlerinin en önemli dezavantajı, bu testlerin oldukça karmaşık olması, deney kontrolünde ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yaşanan güçlüktür. Bu testler, diğer biyoyumluluk testlerine göre oldukça pahalıdır. Materyalin uzun dönem etkileri araştırılmak isteniyorsa aylar veya yıllar süren uzun zaman dilimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan klinik denemeler resmi kurumların onayını ve hastanın aydınlatılmış onamını gerektirmektedir. Bu denemelerin yapılması, *in vitro* ve hayvan deneylerinde gerekli olmayan birçok yasal sorumluluğu gerekli kılmaktadır<sup>31,32</sup>.

## Farklı Biyoyumluluk Testlerinin Birlikte Kullanılması

Yukarıda anlatılan her test yönteminin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır ve yeni bir materyal genel kullanıma geçmeden önce bu testler, belli oranlarda kullanılmaktadır. Herhangi bir materyale karşı oluşabilecek biyolojik cevabı tam ve kesin olarak tespit edebilen tek bir test yöntemi henüz olmamakla birlikte üç temel test türünün uygun karışımı hakkında da tam bir fikir birliği yoktur<sup>13,24,32</sup>.

İlk araştırmacılar spesifik olmayan, spesifik ve klinik kullanım basamaklarından oluşan üç aşamalı piramit modeli oluşturmuşlardır<sup>24,31</sup>. Spesifik olmayan testlerin, materyalin klinik kullanımıyla ilgili olması zorunlu değildir. Spesifik testler ise materyalin klinik denemeleriyle ilgili durumunu yansıtmaktadır<sup>31</sup>.

Bu ilk modelden kısa süre sonra primer, sekonder ve kullanım testlerinden oluşan farklı bir piramit modeli ortaya konulmuştur<sup>25</sup>. Primer testler, genel hücre toksisitesini, hayvanlardaki sistemik toksisiteyi, bakteriyel mutajenite testlerini ve diğer *in vitro* testleri kapsamaktadır. Sekonder testler ise alerji, mukozal iritasyon ve enflamasyonu belirlemek için yapılan hayvan testlerini içermektedir. Kullanım testleri ise klinik denemelerdir<sup>31</sup>.

Her iki modelde de görüntüleme prosedürü için piramidal yapı kullanılmıştır. Piramidin en alt basamağını başarıyla geçen materyaller bir üst kademe teste tabi tutulmaktadır. Ancak ikinci basamağı da başarıyla geçen materyal için klinik deneme süreci başlamaktadır. Başlangıç testleri yanlış biçimde bazen pozitif, bazen de yanlış negatif sonuçlar verebildiği için, zaman ve maliyet açısından avantajlı olan bu modeller, gerçeği tam yansıtamamaktadır<sup>31</sup>.

Bir materyalin biyoyumluluğunun karmaşık yapısını daha iyi yansıtmak için yeni modeller geliştirilmiştir<sup>13,25,30</sup>. Bu testlere göre bir materyalin biyoyumluluğu, klinik denemeleri de içeren dinamik bir süreçtir. Tek bir testle herhangi bir materyalin biyoyumluluğunu değerlendirmek mümkün değildir<sup>13,31</sup>.

Bir dental materyal, her üç basamağa da tabi tutulmalıdır. Bu işlemler sırasıyla basit testlerden daha karmaşık olanlarına, *in vitro* testlerden *in vivo* testlere, prelinik testlerden klinik testlere doğru olacak şekilde gerçekleştirilmelidir. Yeni geliştirilen birçok materyal, ilk testi geçtikten sonra sırasıyla ikinci ve üçüncü testlere tabi tutulmalıdır<sup>24</sup>.

Dental materyallerin biyolojik değerlendirilmesi için uygulanan test programı, dört aşamadan oluşmaktadır. Başlangıç aşaması (Faz 1 ve 2), kısa süreli, basit ve az maliyetlidir. Bu basamağı başarılı olarak geçen materyaller, test hiyerarşisinde bir sonraki aşama olan hayvan deneylerine (Faz 3) tabi tutulur. En son aşama ise sınırlı sayıda hasta üzerinde yapılan klinik denemelerdir (Faz 4)<sup>21</sup>.

## Biyosentez veya Enzimatik Aktivite Testleri

DNA sentezi ya da protein sentezi ölçümleri bu test türünün yaygın örnekleridir. DNA veya protein sentezi analizlerinde genellikle, hücre kültür ortamına işaretleyici radyoizotop ilave edilmesini taki-

ben DNA veya protein ile birleşip birleşmediği değerlendirilir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test ise MTT testidir. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır<sup>5,11,18,20,22,29,33,34</sup>. Optik yoğunluk ölçülerek formazan oluşumu saptanabilir. Alternatif olarak test örneği çevresindeki formazan, ışık veya elektron mikroskopuyla da belirlenebilir<sup>12,16,27</sup>.

Hücre ölümüyle ilgili diğer bir parametre, hücre zarı bütünlüğünün, ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin ölçülmesiyle değerlendirilmesidir. Laktat dehidrogenaz (LDH) tüm hücrelerde bulunan sabit sitoplazmik bir enzimdir. Hücre plazma membranı hasar gördüğünde hücre kültürü süpernatantına kolaylıkla salınabilmektedir. LDH, NAD<sup>+</sup>'nin indirgenme reaksiyonlarında görev almaktadır. Sonuç, kolorimetrik ölçüm yöntemleriyle değerlendirilmektedir<sup>5,19,33</sup>.

### Membran Geçirgenliği Testleri

Materyallerin sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem de hücre membran geçirgenliğinin ölçülmesidir. Hücre zarı geçirgenliği, zarı geçebilen bir boya ile oldukça kolay belirlenebilir. Bu yöntem, ölmeye yakın olan bir hücrenin, hücre zarındaki geçirgenliğinin de artmış olması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan bu boyaların hücre zarını geçip geçememesine göre zar geçirgenliği dolayısıyla da canlı ve ölü hücreler tespit edilmektedir. Bu test yöntemi için iki tip boya kullanılmaktadır. Vital boyalar, aktif transport ile canlı hücre içine taşınır ve hücrenin lizozomlarında birikirler. Sitotoksik etkiyle hücre zarı geçirgenliği artmadığı sürece hücre içinde tutulurlar. Pek çok tip vital boya vardır, ancak en çok kullanılanlar, nötral kırmızı ve Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>'tür. Non-vital boyalar, sitotoksik etki ile hücre ölümü gerçekleştiğinde zarı geçerek hücre içine taşınabilmektedir. Non-vital boyalara örnek, tripan mavisi ve propidium iodid'dir<sup>10-12,14,21,22,26,28,33</sup>.

### Hücre Sayısı ve Büyüme Testleri

Malzeme ile temas sonrasında hücre sayısının veya büyümesinin ölçülmesi ile sitotoksiteyi belirler<sup>10</sup>. Hücreler kültür kaplarına ekilerek yapışmaları sağlanır, daha sonra test malzemesi yerleştirilir. Test edilen malzeme sitotoksik değilse hücreler kültür kabında yapışık kalacak ve zamanla çoğalacaktır. Ancak malzeme toksik ise hücreler çoğalmayacak, ya sitopatik oluşumlar sergileyeceklerdir ya da kültür kabından ayrılacaklardır. Test malzemesi katı madde ise, malzeme çevresindeki hücre yoğunluğu (birim alandaki hücre sayısı) farklılık gösterebilir ve hücre büyümesinin bozulduğu bir alan (zone) tanımlanır. Hücre yoğunluğu kalitatif, semikantitatif ve kantitatif olarak belirtilebilir. Malzeme çevresindeki hücrelerin canlılığı, DNA içeriğinin biyokimyasal yollarla ölçülmesi gibi yöntemlerle belirlenmektedir<sup>10,26</sup>.

### SONUÇ

Birçok materyal özellikle de restoratif materyaller dentin, pulpa, periodontal ve periapikal dokular ve oral mukoza gibi canlı dokularla uzun süre temasta kalmaktadır. Bu nedenle yaygın klinik kullanıma geçilmeden önce bu materyallerin ağız dokuları üzerindeki zararlı etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. İnsan vücudunda kullanılacak tüm restoratif materyallerin fiziksel ve mekanik özellikleri yanında biyouyumluluk yönünden de değerlendirilmesi ve güvenilir materyallerin seçimine dikkat edilmesi yapılan dental tedavilerin uzun dönem başarısını arttıracaktır.

### KAYNAKLAR

1. International Standard 7405. "Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-test methods for dental materials." International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 1997.
2. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Council on Dental Materials and Devices. JADA 84: 382-387, 1972.
3. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices. International Standards Organization. Geneva, Switzerland, 1997.
4. International Standard 10993 "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods." International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.

5. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 8: 8, 2008.
6. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials--does it have a role? *Int Endod J* 21: 50-58, 1988.
7. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola CR, Savarino L, Stea S, Montanaro L, Pizzoferrato A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicol In Vitro* 13: 801-810, 1999.
8. Deliağa N. [The evaluation of cytotoxicity of prosthetic restorations which are prepare different esthetic materials in cell culture]. [Doktora tezi] Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, İzmir, 2002.
9. Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent* 69: 406-415, 1993.
10. Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. Bourdeau P: John Wiley & Sons, 1990, 75-97
11. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160: 171-177, 2006.
12. Freshney RI. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 1992, 17-168
13. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12: 186-193, 1996.
14. Hensten-Petersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 21: 89-99, 1988.
15. Hornez JC, Lefevre A, Joly D, Hildebrand HF. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomol Eng* 19: 103-117, 2002.
16. 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* 20: 12-20, 2004.
17. Kenneth RSJ. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am* 51: 747-760, 2007.
18. Khattak SF, Spataro M, Roberts L, Roberts SC. Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. *Biotechnol Lett* 28: 1361-1370, 2006.
19. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immun Meth* 64: 313-320, 1983.
20. Messer RL, Doeller JE, Kraus DW, Lucas LC. An investigation of fibroblast mitochondria enzyme activity and respiration in response to metallic ions released from dental alloys. *J Biomed Mater Res* 50: 598-604, 2000.
21. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12: E258-266, 2007.
22. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro* 16: 599-607, 2002.
23. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 19: 145-154, 2005.
24. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1: 154-162, 1997.
25. Schmalz G. Modern concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Trans Acad Dent Mater*. 9: 170-179, 1996.
26. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 104: 292-299, 1996.
27. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent* 84: 229-236, 2000.
28. Stanford JW. Recommended standard practices for cytotoxicity testing. FDI World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dental J* 30: 141-173, 1980.
29. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 56: 1285-1290, 1977.
30. Wataha J, Hanks C. Biocompatibility testing-what can we anticipate? *Trans Acad Dent Mater* 109-120, 1997.
31. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 86: 203-209, 2001.
32. Wataha JC. Biocompatibility of Dental Materials. In Anusavice KJ, ed. *Phillip's Science Of Dental Materials*. Missouri: Elsevier Science, 2003: 171-202.
33. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288: 369-376, 2005.
34. Yaka E, Eğrilmez MY, Keskinoglu P, Cavdar Z, Genç Ş, Genç K, İyilikçi L, Yener GG. [Biochemical markers in cerebrospinal fluid (CSF) and evaluation of effect of CSF on PC12 cell line viability in alzheimer's disease] *Turk J Geriat* 9: 1-7, 2006.

#### Yazışma Adresi

Prof. Dr. Funda BAYINDIR

Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Erzurum  
e-posta: bayindirf@atauni.edu.tr