

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ
ANABİLİM DALI

**SABİT PROTETİK RESTORASYONLARDA KULLANILAN
FARKLI MATERYALLERİN BİYUYUMLULUKLARININ
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. İsmail Hakkı UZUN

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Funda BAYINDIR**

**Doktora Tezi
Erzurum-2009**

T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROTETİK DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

SABİT PROTETİK RESTORASYONLARDA KULLANILAN FARKLI
MATERYALLERİN BİYOUYUMLULUKLARININ
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Arş. Gör. Dt. İsmail Hakkı UZUN

Tezin enstitüye verildiği tarih:

02.10.2009

Tezin sözlü savunma tarihi:

28.09.2009

Tez danışmanı:

Prof. Dr. Funda BAYINDIR

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Abubekir HARORLI

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Lütfü İhsan ALADAĞ

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Yasemin Kulak ÖZKAN

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Nuran YANIKOĞLU

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Doktora Tezi

ERZURUM-2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VII
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Co-Cr	4
2.1.1 Yapısı	4
2.1.2 Mekanik Özellikler	7
2.2 Titanyum	9
2.2.1 Kompozisyonu	11
2.2.2 Özellikleri	13
2.3 Empress 2	18
2.3.1 Yapısı	18
2.3.2 Üretim Şekli	19
2.3.3 Mekanik Özellikler	21
2.4 Zirkonyum	23

2.4.1	Yapısı	25
2.4.2	Mekanik Özellikler ve Y-TZP'nin Yaşlanması	31
2.5	Biyolojik Uyum	34
2.5.1	Biyouyumluluk	34
2.5.2	Dental Materyallerin Biyouyumluluğunu Etkileyen Faktörler	36
2.5.3	Biyolojik Uyum Testleri İçin Standartlar	39
2.5.4	Dental Materyaller İçin Biyolojik Uyum Testleri	41
2.5.5	Farklı Biyouyumluluk Testlerinin Birlikte Kullanılması	46
2.5.6	Dental Materyallerin Uzun Dönemli Toksikite Değerlendirmesi	50
2.6	Hücre Kültürü	53
2.6.1	Hücre Kültürlerinin Tarihçesi	54
2.6.2	Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları	55
2.6.3	Hücre Kültürlerinin Avantajları	57
2.6.4	Hücre Kültürlerinin Dezavantajları	57
2.6.5	Hücre Kültürü Teknikleri	58
2.6.6	Hücre Kültürü Test Yöntemleri	60
3	GEREÇ VE YÖNTEM	68
3.1	Örneklerin Hazırlanması	69

III

3.1.1	Co-Cr Örneklerin Hazırlanması	70
3.1.2	Titanyum Örneklerin Hazırlanması	71
3.1.3	Empress 2 Örneklerin Hazırlanması	71
3.1.4	Zirkonzahn Örneklerin Hazırlanması	72
3.2	Yapay Tükürük Solüsyonunun Hazırlanması	73
3.2.1	Örneklerin Yaşlandırılması	73
3.3	Hücre Kültürünün Hazırlanması	75
3.4	24 Well Plate'lerin Hazırlanması	76
3.5	Nötral Red Boyasının Hazırlanması ve Canlılık Değerlerinin Okunması	78
3.6	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	79
4	BULGULAR	80
5	TARTIŞMA	91
6	SONUÇ	117
7	KAYNAKLAR	118

TEŞEKKÜR

Çalışmamın başından sonuna dek yardım, ilgi ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Funda BAYINDIR'a ve doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım bölümümüz öğretim üyeleri ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca akademik birikimleri ve tecrübelerinden faydalandığım ve aynı zamanda tüm laboratuvar imkânlarını kullanımına sunan Tıbbi Genetik AD öğretim üyesi çok kıymetli, Yard. Doç. Dr. Sayın Abdülğani TATAR'a ve Farmakoloji AD öğretim üyesi değerli bilim adamı sayın Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na ve çalışma arkadaşlarına, tez istatistiklerinin yapılması ve yorumlanmasındaki katkılarından dolayı Tıp Eğitimi AD Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hamit ACEMOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Tüm çalışma sürem boyunca yardım ve desteklerini sürekli yanımda hissettiğim sevgili eşim Zühre ve neşe kaynağım kızım Zehra'ya özel teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sabit Protetik Restorasyonlarda Kullanılan Farklı Materyallerin Biyouyumluluklarının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi

Uzun diş hekimliği tarihi boyunca protetik tedavilerde birçok farklı materyal kullanılmıştır. Günümüzde, yeni materyallerin geliştirilmesinde fiziksel ve mekanik özelliklerle birlikte biyolojik özellikler de belirleyici hale gelmiştir.

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. İn 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.

Bu çalışmada, sabit protetik restorasyonlarda yaygın olarak kullanılan Co-Cr, saf titanyum, Empress 2 ve parsiyel stabilize zirkonyum materyallerinin biyouyumlulukları, in vitro direkt temas testi ile hücre canlılığını ölçen nötral kırmızı kullanılarak araştırıldı. Çalışma için ISO 10993 standardına uygun olarak 15 mm çapında ve 1.5 mm kalınlıkta örnekler hazırlandı. Sitotoksisite, başlangıçta ve yapay tükürükteki 15 ile 30 gün süren iki farklı yaşlandırma periyodu sonunda yapılan üç test ile ölçüldü. Her test, 6 defa tekrarlandı. Sonuçlar, spektrofotometrik yöntemle elde edildi.

Elde edilen sonuçlar, SPSS 11.5 istatistik programıyla analiz edildi. İstatistiksel analizler, one-way Anova, post-hoc Scheffe, Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis testleri ile yapıldı.

Çalışmanın sonuçlarına göre test edilen bütün materyaller, her üç deneyde de belli oranlarda sitotoksiktir. Test edilen materyaller içinde, Co-Cr alaşımı tüm deneylerde en az toksik, Empress 2 ise en toksik olan materyaldir. Zirkonyum ve saf titanyumun biyolojik özellikleri ise benzerlik göstermektedir. Yapay tükürükteki 15 günlük yaşlandırma tüm materyallerin toksisitesini düşürürken, 30 günlük yaşlandırma toksisiteyi artırarak başlangıç değerinin de üstüne çıkarmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dental Materyal, Biyouyumluluk, Sitotoksisite, İn Vitro Test

SUMMARY

**In Vitro Evaluation of Biocompatibility of Different Materials Used for
Fixed Prosthetic Restorations**

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 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 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.

This study evaluated the biocompatibility of Co-Cr, commercially pure titanium, Empress 2 and partially stabilized zirconia materials, which are commonly used in fixed partial dentures, with an *in vitro* direct contact test using a notral red assay that assessed cells' viability. For this study, 15 mm diameter and 1.5 mm thick specimens were prepared according to ISO's 10993 standard. Cytotoxicity was evaluated with three tests performed initially and after 15 and 30 days of aging in an artificial saliva solution. Each test was repeated six times. The results were obtained by the spectrophotometric method.

Obtained data were analyzed by the statistical software SPSS 11.5 for Windows. Anova, post-hoc Scheffe, Mann-Whitney U and Kruskall Wallis tests were performed for statistical analyses.

According to the study's results, all tested materials exhibited particular cytotoxic effects in the three tests. In all three tests, Co-Cr alloy was the least toxic material, and Empress 2 was the most toxic material, among all the tested materials. The biological properties of zirconia ceramics and pure titanium materials were similar. Although 15 days of aging in artificial saliva made all materials less toxic than they initially were, 30 days of aging increased their toxicity beyond their initial toxicity.

Keywords: Dental Material, Biocompatibility, Cytotoxicity, In Vitro Test

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda protetik tedavi alanındaki araştırmalar, dental materyallerin mekanik ve fiziksel özelliklerini inceleyen klasik anlayıştan bu materyallerin biyolojik cevabının bilimsel değerlendirilmesine doğru temel bir değişim geçirmektedir. Bu yaklaşım, titanyuma karşı oluşan biyolojik cevabı ölçmekle başlamış ve elde edilen sonuçlar, implant uygulamalarının klinik sınırlarını belirlemiştir. Bu nedenle protetik tedavi alanındaki ana gelişmeler, materyallerin biyolojik cevabını ölçen çalışmaların ışığında gerçekleşmeye devam etmektedir. Elde edilen veriler, arzulanan biyolojik cevabı oluşturabilecek yeni veya modifiye dental materyallerin tasarımına imkân sağlamaktadır.¹

Diş hekimliği bilimleri, birçok materyalin mekanik özellikleri hakkında hatırı sayılır bir birikime sahiptir. Bununla beraber, materyallerin ağız dokuları üzerindeki biyolojik etkileri konusunda bir bilgi eksikliği süregelmektedir. Bunun aşılabilmesi, planlanan protetik çalışmaların, biyomateryal yüzeyine mikrobiyal adezyon ve konağın da biyomateryallere karşı geliştirdiği immün, non-immün ve kronik inflamatuvar cevapları arayan hücrenel ve moleküler biyolojik yaklaşıma sahip olmasına bağlıdır.¹

Kullanımda olan birçok dental materyal, belli oranlarda -sistemik olarak değerlendirilmesi gereken şekilde- doku cevabı oluşurmaktadır. Günümüzde kabul gören dental materyallerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi ve yeni materyallerin de risk-fayda oranlarının analiz edilmesi, protetik araştırmaların önceliği olmalıdır.¹

İn vitro testler, yeni materyallerin biyoyumluluklarının belirlenmesi ve değerlendirilmesi için kullanılmaktadır.² Bu testler, hayvan deneyleri ve klinik

denemelere kıyasla daha ucuzdur. Ayrıca, hızlı, kesin ve kontrol edilebilir sonuçlar sunmaktadır.³

İn vitro sitotoksosite testleri, geliştirilen yeni materyallerin toksisitelerinin belirlenmesine ve mevcutlarla karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır.² İn vitro sitotoksosite testlerinden elde edilen sonuçların hayvan deneyleri ve klinik denemelerle genelde aynı paralelde olmaması, in vitro testleri sorgulanır hale getirmektedir.⁴ Ancak, bu temel dezavantaja rağmen yeni materyallerin ilk olarak insanlarda denenmesiyle ilgili etik ve yasal problemler, in vitro testleri biyouyumluluk test programının önemli bir parçası haline getirmektedir.⁵

Bu çalışmanın amacı, sabit protetik restorasyonlarda kullanılan bazı materyallerin biyouyumluluklarının in vitro olarak araştırılmasıdır.

2 GENEL BİLGİLER

Diş hekimliği tarihine bakıldığında farklı materyallerin belli zaman dilimlerinde ön plana çıktığı görülmektedir. Altın, Asyalılar, Babiller ve Mısırlılar tarafından en az 2500 yıldan beri protetik amaçlı olarak kullanılmaktadır. Altın kuron ve köprülerin tarihi ise MÖ 700-500 yıllarına rastlamaktadır.⁶

Diş hekimliği, MS 1500 yıllarına kadar çok az gelişme kaydetmiştir. Bu dönem karanlık çağ olarak bilinmektedir. 1900'lü yıllarda, döküm yöntemi, akrilik rezinler, ölçü maddeleri, parsiyel protezler için baz metal alaşımları ve ortodontik apareyler için paslanmaz çelik gibi birçok ana yöntem ve materyal diş hekimliği alanına kazandırılmıştır.⁶ 1950'li yıllara gelindiğinde metal iskelet dökümlerinde kullanılan altın alaşımlar, yerini Co-Cr alaşımlara bırakmaya başlamıştır. 20. yüzyılın sonlarına gelindiğinde ise titanyum, sabit ve hareketli protezlerde kullanılabilen döküm alaşım seçeneklerinden birisi haline gelmiştir.^{7,8}

Dental döküm alaşımlar, diş eksiklerinin tedavisinde önemli bir yer tutmakla beraber son zamanlarda bu eğilim, daha estetik tam seramik sistemlere ve rezin kompozitlere doğru değişim göstermektedir.⁹ Seramik materyaller 1800'lü yıllardan beri estetik restorasyonların yapımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.⁸ Materyal ve teknolojideki gelişmelere paralel olarak ilk seramiklerin uzun dönem başarısızlığına neden olan kırılma problemi üstesinden gelinebilmiştir. Bugün, ısı-basınç, CAD/CAM teknolojileri ve bu sistemlere uygun lityum disilikat ve zirkonyum katkı/esaslı materyaller sayesinde tek kuronlardan, çok üyeli köprülere, posterior restorasyonlardan, inley ve implantlara kadar sabit protezlerin her alanında seramik materyaller rahatlıkla kullanılabilir.¹⁰

2.1 Co-Cr

Baz metal alaşımları, diş hekimliği uygulamalarında 1930'lardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır.⁷ Döküm yoluyla elde edilen Co-Cr alaşımlar, hareketli iskelet protezlerin yapımında ve metal destekli porselen kuron ve köprülerde alt yapı materyali olarak kullanılmaktadır.^{7,11} Co-Cr alaşımların kullanımının yaygınlaşması, pahalı olan altın alaşımların kullanımını oldukça azaltmıştır. Altın alaşımlar yerine kullanılan baz metal alaşımların bazı temel gereksinimleri karşılaması şarttır:

- Materyalin kimyasal bileşiminde hasta, hekim ve teknik elemanlar için zararlı, toksik ve allerjen madde bulunmamalıdır.
- Materyalin ağız ortamındaki kimyasal ve fiziksel stabilitesi yeterli olmalı ve materyal, korozyona direnç gösterebilmelidir.
- Materyalin fiziksel özellikleri, rahatça işlenip çalışılmasına fırsat tanımalıdır.
- Ekonomik açıdan uygun olmalı ve kolay ulaşılabilir olmalıdır.^{6-8,11}

2.1.1 Yapısı

ANSI/ADA 14 nolu spesifikasyona göre, Co-Cr alaşımındaki kobalt oranı en az % 60 olmalı, krom oranı % 20'den daha az olmamalı ve alaşımın toplam ağırlılığının da en az % 85'ini Ni, Co ve Cr oluşturmalıdır. Geriye kalan miktarı ise karbon, molibdenyum, tungsten, berilyum ve alüminyum gibi yardımcı alaşımlama elementleri oluşturmaktadır. Bu minör elementler, alaşımın fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde önemli rol oynamaktadır (Tablo 2.1).^{6,8,11}

Tablo 2.1: Metal seramik restorasyonlarda kullanılan baz metal alaşımların bileşimi (% ağırlık).

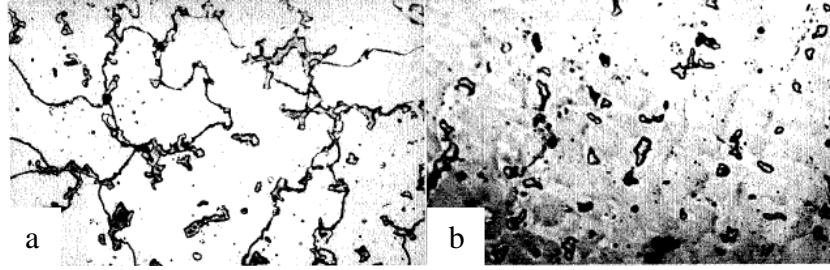
Tip	Ni	Cr	Co	Mo	Al	Fe	Be	Ga	Mn	Nb	W	B	Ru
Co-Cr	-	25-34	53-68	0-4	0-2	0-1	-	0-3	-	0-3	0-5	0-1	0-6
Ni-Cr	62-77	11-22	-	4-14	0-4	0-1	0-2	0-2	0-1	-	-	-	-

Alaşımların krom oranı yükseldikçe korozyon direnci de yükselmektedir. Baz metal alaşımların krom oranı % 28-29'dan fazla olmamalıdır. Bu oran, % 30'un üzerine çıktığında sigma fazı olarak bilinen kırılma fazı oluşmaktadır. Bu nedenle kırılma faza geçmeden önce alaşımların krom içeriği maksimize edilmeye çalışılmıştır. Kobalt ise alaşıma elastiklik kazandırmakta, direnç ve sertliği yükseltmektedir.^{6,7,12}

Yardımcı alaşımlayıcı elementlerin, baz metal alaşımları üzerindeki etkisi tahmin edilenden daha fazladır. Kobalt esaslı baz alaşımların sertliğini artırmanın en etkili yollarından birisi alaşımların karbon içeriğini artırmaktır. Karbon içeriğindeki yaklaşık %0.2'lik bir değişim, alaşımların özelliklerini artık diş hekimliğinde kullanılamayacak derecede değiştirmektedir. Karbon miktarında istenilen orandan % 0.2'lik fazlalık, alaşımları oldukça kırılma ve sert hale getirmektedir. Aksine azalma ise, gerilim dirençlerinde önemli derecede azalmaya neden olmakta ve alaşımlar kullanılamaz hale gelmektedir.^{6,7}

Molibdenyum, alaşımların termal genişleme katsayısını düşürürken, korozyon direncini de artırmaktadır. Ancak metal-seramik restorasyonlarda alt yapı materyali olarak kullanılan Co-Cr alaşımların termal genişleme katsayısı, Ni-Cr alaşımları gibi porselenlerle uyumlu değildir. Tungsten de korozyona karşı direnç oluşturmakta ve kromdan yoksun intermetalik alanları azaltmaktadır.¹²

Alaşımında bulunan krom, kobalt, molibdenyum gibi elementlerin çoğu, karbonla reaksiyona girerek karbitleri oluşturmaktadır. Alaşımın kimyasal yapısına ve döküm şartlarına bağlı olarak farklı karbitler oluşmakta, böylece alaşımın fiziksel özellikleri de değişime uğramaktadır. Dahası bu karbitlerin dağılımı, döküm sıcaklığına, soğuma derecesine bağlı olarak değişmektedir. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi gri hat boyunca oluşan karbitler, alaşım tamamen eriyince tüm yüzey boyunca ortaya çıkmakta ve alaşımın özelliklerine olumlu katkı sağlamaktadır. Küresel şekilli ve devamlılık arzetmeyen karbitler, alaşım normal erime ısısının yaklaşık 100 °C üzerinde ısıtıldığında oluşmakta ve yüksek uzama değerli ancak diş hekimliğinde kullanılamayacak kadar kötü yüzeyler oluşturmaktadır (Şekil 2.1).^{6,7}



Şekil 2.1: a) Gri hat boyunca oluşmuş devamlı karbitler b) Devamlılık göstermeyen ada tarzı karbitler

Basit yapısal bileşime sahip ilk Co-Cr alaşımlarının döküm işlemleri de basitti ve bu işlemler, alaşımın mekanik özelliklerini değiştirmiyordu. Ancak günümüzde, daha kompleks yapıları alaşımlar döküm işlemlerinin de daha dikkatli yapılmasını gerektirmektedir. Co-Cr alaşımları, baz metal alaşımları içinde titanyum hariç tutulursa laboratuvar işlemleri en güç alaşımdır. Bazı döküm işlemleri, Co-Cr alaşımını yapısal olarak zayıflatmakta ve kalıcı deformasyon (yield) direncinde düşüşe neden olmaktadır.^{6,8,9}

2.1.2 Mekanik Özellikler

Diş hekimliğinde kullanılan baz metal alaşımlar, soy metal alaşımlara göre daha yüksek mekanik özellikler sergilemektedir.¹¹ Diş hekimliğinde kullanılan bazı materyallerin temel mekanik özellikleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir.⁶

Tablo 2.2: Baz metal alaşımların bazı mekanik özellikleri

Tip	Co-Cr	Ni-Cr	Ti
Gerilim (Tensile) Direnci (MPa)	520-820	400-1000	240-890
% 0.2 Kalıcı Deformasyon (Yield) Direnci (MPa)	460-640	255-730	170-830
Elastiklik Modülü	145-220	150-210	103-114
Uzama (Elongation) (%)	6-15	8-20	10-20
Sertlik (kg/mm²)	330-465	210-380	125-350
Yoğunluk (gr/cm³)	7.5-7.6	7.5-7.7	4.4-4.5
Döküm Sıcaklığı (°C)	1350-1400	1300-1450	1760-1860

Yield direnci, materyalde kalıcı deformasyonun oluşma noktasını belirler.⁹ Sabit protezlerde bu tip başarısızlıklar, gövde birleşim yerlerinde oluşmaktadır.¹¹ Hem sabit hem de hareketli protezlerde kullanılan materyallerin yield direncinin en az 415 MPa olması gerekmektedir. Kullanımda olan baz metal alaşımları bu gereksinimi karşılamaktadır.^{6,9}

Bir alaşımın uzama oranı, materyalin kırılma veya esneklik özelliklerinin göstergesidir. Uzama, porözite gibi iç yapısal özelliklerden etkilenmektedir. Baz metal alaşımların uzama özellikleri, normal döküm sıcaklığında yükselmekte ancak bu sıcaklığın üzerine çıkıldığında materyal kırılma hale gelmektedir.⁶

Yorulma direnci, özellikle hareketli bölümlü protezlerde önem taşımaktadır. Hareketli protezlerin takılıp çıkarılması esnasında kroşelerin mukavemeti, kullanılan alaşımın yorulma direncine bağlıdır. Co-Cr alaşımlar, titanyum ve altın alaşımlara göre daha yüksek yorulma direncine sahiptir.⁶

Sertlik, materyalin yapısal bir özelliğidir. Aynı şartlarda baz metal alaşımların sertlik değerleri, soy metal alaşımlara göre üç kat daha fazladır. Bu özellik sayesinde metal iskeletlerin daha ince, hafif, ucuz olması sağlanabilmiştir. Alaşımın sertliği, karşıt dişler veya restorasyonların aşındırıcı etkisine karşı koyabilecek ancak diş minesini aşındırmayacak sınırlar içinde kalmalıdır. Sertliği 125 VH (Viker's sertliği)'den düşük olan materyallerin aşınmaya direnebilmesi şüphelidir. Sertliğin artması için özel bitirme cihazları ve işlemleri gerekmektedir.^{6,9,11}

Son dönemlerde araştırmalar, biyomateryallerin korozyon ve biyolojik özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır.¹³⁻¹⁶ Sabit protezlerin uzun dönem başarı ve/veya başarısızlığında korozyonun rolü büyüktür. Korozyon, materyalin yapısını zayıflatıp katstrofik kırılmalara yol açmakta, restorasyonu estetik açıdan zayıflatmakta ve galvanik akıma neden olmaktadır. Böylece sabit protezin başarısızlığına sebep olmaktadır.⁹

İn vitro korozyon testleri ile genelde, elektrolitik ortam ve yapay tükürük, alaşım yapısı ve mikroyapısı ile metallerin yüzey özellikleri gibi değişkenlerin etkisi araştırılmaktadır. Yüzey özelliklerinin korozyon üzerine etkisi oldukça fazladır. Çünkü işlem görmüş (döküm, presleme, CAD-CAM) materyalin yüzeyi hemen her zaman ana kitleden (ingot) farklılık göstermektedir.⁶ Luiz Bezzon ve arkadaşları¹⁷, Co-Cr alaşımından vakumla elde edilen örneklerin, normal yöntemle elde edilenlere göre daha

düz yüzeylere sahip olduğunu göstermiştir. Diş fırçalama gibi mekanik işlemler, baz metal alaşımların yapısal özelliklerini değiştirebilmektedir. Nogues ve arkadaşları¹⁸, fırçalama işleminin titanyumda, seramik ve Co-Cr alaşıma göre daha fazla kitlesel kayba neden olduğunu göstermişlerdir. Korozyon direnci için, heterojen yapısına rağmen altın içeren döküm alaşımları, oral kavitede tercih edilmektedir.¹⁹

2.2 Titanyum

Titanyum, 1790 yılında Reverend William Gregor tarafından keşfedilmiştir. Saf titanyum, Kroll processı olarak adlandırılan ve titanyum cevherinin karbon ve chlorine bulunan ortamda ısıl işleme tabi tutulmasını içeren bir yöntemle elde edilmektedir. Bu işleme elde edilen $TiCl_4$, titanyum öncülünü elde etmek için erimiş sodyumla indirgenir. Yumuşak haldeki titanyum öncülü, takiben basınç altında veya argon atmosferinde eritilerek birleştirilir ve böylece titanyum ingotlar elde edilir.^{7,20-22}

Hareketli ve sabit protezler için titanyum esaslı döküm materyallere olan ilgi, yaklaşık olarak titanyum implantların geliştirilmesiyle aynı döneme rastlamaktadır. Elektrokimyasal bozulmaya dirençli olmaları, biyolojik uyumlarının iyi olması, düşük ağırlık ve yoğunluklu olmaları ve fiziksel özelliklerinin iyi olması titanyum esaslı materyallerin diş hekimliği uygulamaları açısından cazibesini arttırmıştır. Diş hekimliğinde birkaç farklı titanyum türevi kullanılmaktadır. Bunlar; Ti-6Al-4V, saf titanyum (Commercially pure titanium-CpTi), döküm ve soğuk şekillendirilen titanyum alaşımlarıdır. Farklı titanyum türlerinin üretim şekilleri, bileşimleri, yapıları ve özellikleri birbirinden tamamen farklıdır.^{6,7,21,23} Diş hekimliği ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmakta olan bazı titanyum alaşım türleri Tablo 2.3'de gösterilmektedir.²⁴

Tablo 2.3: Biyomedikal uygulamalarda kullanılan titanyum alaşımları

Pure titanium (ASTM F67):	Grade 1, 2, 3 and 4
Ti-6Al-4V ELI (Wrought: ASTM F136 and forged: ASTM F620)	$\alpha+\beta$ tip
Ti-6Al-4V (Casting: F1108)	$\alpha+\beta$ tip
Ti-6Al-7Nb (ASTM F1295)	$\alpha+\beta$ tip (Switzerland)*
Ti-5Al-2.5Fe (ISO: DIS 5832-10)	β ağırlıklı $\alpha+\beta$ tip (Germany)*
Ti-5Al-3Mo-4Zr	$\alpha+\beta$ tip (Japan)*
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd	$\alpha+\beta$ tip (Japan)*
Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0.2Pd	$\alpha+\beta$ tip (Japan)*
Ti-13Nb-13Zr	β ağırlıklı tip (USA), düşük modülüs*
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	β tip (USA), düşük modülüs*
Ti-15Mo	β tip (USA), düşük modülüs*
Ti-16Nb-10Hf	β tip (USA), düşük modülüs*
Ti-15Mo-5Zr-3Al	β tip (Japan), düşük modülüs*
Ti-15Mo-3Nb	β tip (USA), düşük modülüs*
Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr	β tip (USA), düşük modülüs*
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	β tip (Japan), düşük modülüs*

*Biyomedikal uygulamalar için geliştirilmiş

Titanyum, diş hekimliğinde dental implant materyali olarak, yüzey kaplamasında ve daha yeni olarak da sabit, parsiyel, total protezlerde ve ortodontik tellerde kullanılmaktadır.^{6,21,24} Günümüze kadar Ti döküm alaşımların sabit ve hareketli protezlerdeki kullanım alanı, Ti'nin yüksek ergime noktası ve rövetmanla reaksiyona girmesinden dolayı kısıtlı kalmıştır. Döküm dental restorasyonlar için ergime noktası daha düşük olan Ti-Co ve Ti-Ag alaşımların prototipleri üzerindeki çalışmalar sürmektedir.²⁵⁻²⁷

2.2.1 Kompozisyonu:

Titanyum, düşük sıcaklıklarda sıkı paketli altıgen yapılı α fazında bulunan ve 885°C'nin üstünde body-centered cubic (BCC) yapısına (β fazına) dönüşen allotropik bir elementtir. Bu yapısal geçiş, titanyumun α , α' 'ya yakın, α/β ve β olmak üzere dört farklı faz kombinasyonunu ortaya çıkarmıştır.¹²

α -titanyum alaşımları, özellikle CpTi'den ve oda sıcaklığında sadece α -fazı bulunduran α fazlı alaşımlardan elde edilir. Bu alaşımlar, yüksek akma direncine sahiptir dolayısıyla da yüksek ısı işlemlerden sonra soğuma esnasında mikro yapısında ve mekanik özelliklerinde önemli değişiklikler oluşmamaktadır.²⁸

Diş hekimliğinde kullanılan titanyum alaşımları, α -fazındaki CpTi, α/β fazındaki Ti-6Al-4V ve β -fazındaki Ti-Mo ortodontik telleridir. Titanyum ve alaşımları, diş hekimliğinde döküm, soğuk şekillendirme ve frezeleme tekniğiyle kullanılmaktadır.¹²

Klinik olarak en çok ilgiyi, titanyumun iki farklı türevi çekmiştir. Bunlardan birisi CpTi (commercially pure titanyum) diğeri de % 6 alüminyum, % 4 vanadyum içeren Ti-6Al-4V alaşımıdır.^{7,21,24}

2.2.1.1 Saf Titanyum (Commercially Pure Titanium-CpTi)

Alaşım halde bulunmayan CpTi, oksijen ve demir içeriğine göre dört faklı Şekilde (Grade1-4) bulunabilir (Tablo 2.4).²⁹

CpTi, % 0,18-0,40 oranında oksijen içermektedir.²⁹ Oksijen, solüsyonda metalin tek fazda kalmasını sağlamaktadır. Oksijen, nitrojen ve karbon gibi elementler, sıkı paketleni altıgen yapılı α fazında, kübik formlu β -fazına göre daha fazla çözünürlüğe sahiptir. Bu elementler, solid haldeki yapıyı titanyuma dönüştürür ve α -fazının stabilizasyonuna yardım ederler. Molibden, kobalt, nikel, niobiyum, bakır, palladyum ve vanadyum gibi geçiş elementleri ise en çok kullanılan β stabilitrleridir. α -stabilitrleri, allotropik dönüşüm sıcaklığını arttırmasına karşın β -stabilitrleri düşürmektedir. β titanyum alaşımları, α -fazlı alaşımlara göre daha dirençli ancak daha kırılgandır.^{6,7,12,28}

Tablo 2.4: CpTi'nin kimyasal bileşimi (% ağırlık)

Element	Saf (CpTi) titanyum grade			
	1	2	3	4
Nitrojen (max.)	0,03	0,03	0,05	0,05
Karbon (max.)	0,10	0,10	0,10	0,10
Hidrojen (max.)	0,01	0,01	0,01	0,01
Demir (max.)	0,20	0,30	0,30	0,50
Oksijen (max.)	0,18	0,25	0,35	0,40
Titanyum	99,48	99,31	99,19	98,94

2.2.1.2 Ti-6Al-4V

Titanyuma az miktarlarda alüminyum ve vanadyum ilave edildiğinde alaşımın direnci, CpTi' ye göre daha fazla artmaktadır. Alüminyum, α - stabiliteörü olarak görev yaparken, vanadyum β - stabilizasyonunda rol oynamaktadır. α - β dönüşümünün ortaya çıktığı sıcaklıkta bu elementlerin titanyuma ilave edilmesiyle dönüşüm baskılanmış olur ve bu şekilde oda sıcaklığında hem α - hem de β - formları oluşmuş olur. Bu nedenle Ti-6Al-4V, α ve β grenlerinin iki fazlı yapısına sahiptir. Kolay ulaşılabilirliği, çalışma şartlarının uygunluğu ve düşük sıcaklıklarda güçlü mekanik özelliklere sahip olmalarından dolayı bu alaşımlar, farklı titanyum alaşımları arasında hala en yaygın olarak kullanılan biyomateryallerdir.^{7,24,28,30}

2.2.2 Özellikleri

Titanyum, 1950'li yılların başlarında havacılık endüstrisinde “muhteşem metal” olarak sıklıkla kullanılmıştır. Bunun, birbirinden oldukça farklı iki nedeni vardı. Birisi, düşük yoğunluk, yüksek gerilme direnci (~500MPa) ve yüksek ısılara dayanabilme gibi birçok eşsiz ve mükemmel özelliğe sahip olmasıydı. Diğeri de titanyumun geleceğin materyali olarak düşünülmesiydi. O dönemde titanyumun yaklaşık kırk yıl sonra diş hekimliği ve medikal uygulamaların en önemli metali olabileceği çok da düşünülemedi.^{7,20-22}

Biyomateryal olarak özellikle de sert doku protezi olarak kullanılacak titanyum alaşımlar, yüksek direnç-düşük elastiklik modülü, yüksek yorulma direncine sahip ve kolay çalışabilir olmalıdır. Titanyum alaşımların mekanik özellikleri, alaşımın bileşimi, fazların dağılımı ve termo-mekanik sürece doğrudan bağlıdır. Biyomedikal titanyum alaşımların bazı mekanik özellikleri Tablo 2.5'de gösterilmiştir.²⁴

Tablo 2.5: Medikal uygulamalar için geliştirilmiş Ti alaşımların mekanik özellikleri

Materyal	Gerilme Direnci (MPa)	Kalıcı Deformasyon Direnci (MPa)	Uzama (%)	Elastiklik Modülü (GPa)
α- tip				
Pure Ti grade 1	240	170	24	102.7
Pure Ti grade 2	345	275	20	102.7
Pure Ti grade 3	450	380	18	103.4
Pure Ti grade 4	550	485	15	104.1
$\alpha+\beta$ tip				
Ti-6Al-4V	895-930	825-869	6-10	110-114
Ti-6Al-4V ELI	860-965	795-875	10-15	101-110
Ti-6Al-7Nb	900-1050	880-950	8.1-15	114
Ti-5Al-2.5V	1020	895	15	112
β tip				
Ti-13Nb-13Zr	973-1037	836-938	10-16	79-84
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	1060-1100	1000-1060	18-22	74-85
Ti-15Mo	874	544	21	78
Ti-15Mo-5Zr-3Al	852-1100	838-1060	18-25	80
Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si	979-999	945-987	16-18	83
Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr	596.7	547.1	19	55
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	911	864	13.2	80

CpTi, beyaz, parlak, düşük yoğunluklu, yüksek dirençli ve korozyon direnci mükemmel bir materyaldir. Yumuşaktır ve diğer birçok metal için önemli bir alaşımlama elementidir. CpTi'nin gerilim özellikleri, büyük oranda oksijen içeriğine bağlıdır. Oksijen içeriğinin artması, esnekliği azaltmasına karşın gerilim streslerini ve sertliği artırmaktadır.^{6,7,20,22}

Titanyum alaşımların bazı özelliklerinin baz metal alaşımlarla karşılaştırılması Tablo 2.6'da gösterilmiştir. CpTi'nin elastisite modülü 55 ile 114 GPa'dır.^{7,24} Co-Cr gibi diğer biyomateryallerin elastisite modülleri 190 ile 240 GPa arasında değişmektedir. Bu değerler elastisite modülü 17-28 GPa olan kemiğe göre oldukça yüksektir. Biyomedikal titanyum alaşımlarının elastisitesi ise diğer biyomedikal materyallerden daha düşüktür.^{22,24} Bu durum, titanyum alaşımlarının kullanımını olumlu yönde etkilemektedir. β titanyum alaşımlar genelde Nb, Ta, Zr gibi non-toksik elementlerden oluşmuştur. Elastiklik modülünün diğer titanyum alaşımlarına göre daha düşük olmasından dolayı β tipi titanyum alaşımlar biyouyum yönünden daha üstün kabul edilmektedir.^{24,28}

Tablo 2.6: Ti ile baz metal alaşımların bazı özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	Co-Cr alaşım	Titanyum	Ti-6Al-4V
Density/yoğunluk (g/cm³)	8,9	4,5	4,5
Döküm sıcaklığı (°C)	1500	1700	1700
Tensile strength (MPa)	850	520	1000
Elastisite modülü (GPa)	190-230	110	85-115
Sertlik (VHN)	360-430	200	-
Ductility/esneklik (%)	2-8	20	14

Titanyum, birçok metal ile alaşımlanabilmektedir. Bu şekilde, direncin artırılması, akma direncinin yükseltilmesi ve dökülebilirlik gibi özelliklerin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Titanyumun alüminyum ve vanadyum ile alaşımlanması, mekanik özellikleri CpTi'ye göre arttırmaktadır. Titanyumun alüminyum (Al) ve vanadyum (V) alaşımları α - ve β -fazlarının karışımıdır. α -fazi

göreceli olarak daha yumuşak ve fleksibl iken β -fazı daha sert ve güçlüdür. α - ve β -fazlarının oranlarının değiştirilmesiyle de mekanik özelliklerin büyük bir çoğunluğunu değiştirmek mümkündür.^{7,21} Ti-6Al-4V alaşımları için, parsiyel protezler gibi yüksek stresle karşılaşılan durumlarda kullanılmayı sağlayan yüksek gerilim özelliklerine (~1030MPa) ulaşmak CpTi'ye göre daha kolaydır.⁷

Korozyon direnci, metalik biyomateryallerin en önemli özelliklerindedir.²⁸ Korozyon, hem protezlerin bozulması hem de protezlerden potansiyel olarak toksik veya allerjik parçaların salınması anlamında ciddi problem oluşturmaktadır. Hem CpTi hem de Ti-6Al-4V, korozyona karşı direnci yüksek materyaller olarak yüksek bir popüleriteye sahiptir. Titanyumun yüksek korozyon direnci, yüzeydeki yaklaşık 10 nm kalınlıktaki solid oksit tabakasına (TiO₂) bağlıdır. Bu oksit tabakası, titanyumu asit ataklarına, kimyasal ve ısı etkilere karşı korumaktadır. Mevcut oksit tabakası herhangi bir şekilde zarar görse bile hava ve su varlığında yeniden oluşabilmektedir. Kalıcı hasarların ortaya çıkması ağızda bulunmayan oldukça yüksek etmenlerin varlığına bağlıdır. Biyolojik ortamdaki korozyon çalışmaları, titanyumun mükemmel korozyon direncini teyit etmiştir.^{7,12,20-22,28,31}

Dental alaşımların birçoğunun protetik tedavide kullanılabilmesi için döküme ihtiyacı vardır ve döküm işlemi kendi başına alaşımın yapısını, mekanik ve kimyasal davranışını değiştirebilmektedir. Titanyumun konvansiyonel laboratuvar teknikleri ile dökümlerinin yapılmasında, yüksek ergime noktasından ve titanyumun yüksek sıcaklıklarda aşırı reaktif olmasından kaynaklanan ciddi bir kısım problemler bulunmaktadır.³² Titanyumun yüksek (1700 °C) ergime noktası, soğuma esnasındaki kontraksiyonun kompanse edilmesini zorlaştırmaktadır. Titanyum, aşırı reaktif bir metaldir ve oksijen, hidrojen gibi atmosferik gazlarla çok hızlı bir şekilde reaksiyona

girmektedir. Bu nedenle titanyumun tüm döküm işlemlerinin, özel döküm sistemi gerektiren, argon veya helyumla vakumlanmış ortamda veya inert atmosferde yapılması gerekmektedir. Titanyum döküm restorasyonların diğer bir dezavantajı da kenar uyumlarının yeterli seviyede olmamasıdır. Bu durum, özellikle implant destekli protezlerin üst yapılarının pasif olarak oturmasını engellemektedir. İç pörozite, titanyum dökümlerde oldukça sık karşılaşılan bir durumdur.^{7,11,12} Döküm yoluyla elde edilen titanyum sabit restorasyonların kenar uyumunu arttırmak amacıyla yeni döküm yöntemleri ve rövetmanlar geliştirilmektedir.³²⁻³⁵

Yüksek ergime ısısı (1700°C), titanyumun kullanılabilirliği açısından zorluk oluşturmaktadır. Alaşıma % 25 Co ilavesiyle bu değer 600°C'ye kadar düşürülebilmekte ancak korozyon direncinde de azalma görülmektedir. Alaşıma % 5 Ni ilavesiyle bunun üstesinden gelinebilmektedir. Ancak Ni, alaşımın biyouyumluluğunu olumsuz yönde etkilemektedir. Klasik Ti-6Al-4V alaşımı, alüminyum ve vanadyumdan kaynaklanan potansiyel toksik etkilere sahiptir.^{28,36,37} Bundan dolayı son zamanlarda vanadyumsuz titanyum dental implant materyalleri geliştirilmiştir.^{24,37}

Farklı döküm yöntemlerinin varlığına ilaveten tek veya çok üyeli kuron ve köprülerin yapımında CAD-CAM yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntem, ilk olarak 1980 yılında Procera (Nobel Biocare/University of Michigan, Ann Arbor, Michigan) sistem üzerinde Anderson tarafından açıklanmıştır. Bu yöntemde tek kuronların dış sınırları milling makinesinde oluşturulurken iç yüzeyler spark erozyon yöntemiyle şekillendirilmektedir. Çok üyeli restorasyonların yapımında ise lazer welding yöntemi kullanılmaktadır.²² Günümüzde ise hazır titanyum blokları CAD-CAM yöntemiyle işleyebilen birçok sistem mevcuttur.²⁸

2.3 Empress 2

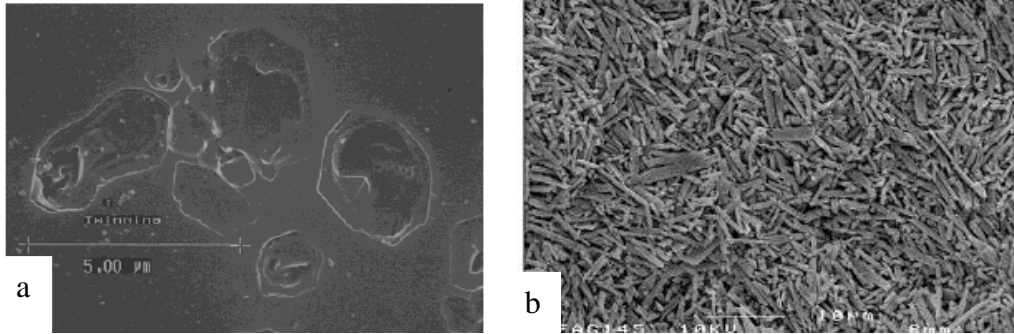
Porselen jaket kuronlar, ilk olarak anterior dişlerin restorasyonunda kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilk tam porselen restorasyonlar platin folyo üzerinde feldispatik porselenden hazırlanmaktaydı. Feldispatik porselenin düşük esneme direncinden kaynaklanan yüksek kırılma oranlarına rağmen bu tam porselen kuronlar, yüksek estetik sonuçlar sağlamaktaydı. Klinik kullanımda kırılmalığa aşırı yatkınlığından ötürü porselen jaket kuronlar, bugün artık kullanılmamaktadır.³⁸

Porselen jaket kuronların klinik başarısızlığından sonra tam porselen restorasyon materyallerinin geliştirilmesinde büyük bir aşama kaydedilmiştir. Bugün itibariyle bu amaçla kullanılabilir bir çok materyale ulaşmak mümkündür.^{39,40} Yeni tam seramik materyallerin geliştirilmesinde iki sebep baskın rol oynamıştır: yeni üretim metodları ve yapısal değişimler. Geleneksel seramikler metal alt yapı üzerine yığıma tekniğiyle yapılırken, güncel tam seramik materyaller döküm, makineleme, presleme veya slip-cast yöntemleriyle üretilebilmekte ya da alümina, zirkonya veya silika içeren diğer porselen türevlerinden elde edilebilmektedir.^{39,41} Yeni seramik sistemleri içinde lityum disilikat esaslı materyaller yüksek direnç, yüksek kırılma kalınlığı ve yüksek ışık geçirgenliği özellikleriyle dikkat çekmektedir.^{39,42-45} Lityum disilikat esaslı tam seramik sistemlerin kullanılması, bu seramiklerin yüksek direnç gerektiren posterior bölgelerde kullanılmasına izin veren yapısal gelişim ve üretim metodlarına bağlı olarak artış göstermiştir.^{38,42}

2.3.1 Yapısı

Piyasaya sunulan ilk ısı-basınç seramik sistemi, IPS Empress (Ivoclar, Schaan, Leichtenstein) sistemidir. IPS Empress, lösit bazlı bir cam seramik sistemidir.⁴³ Bu

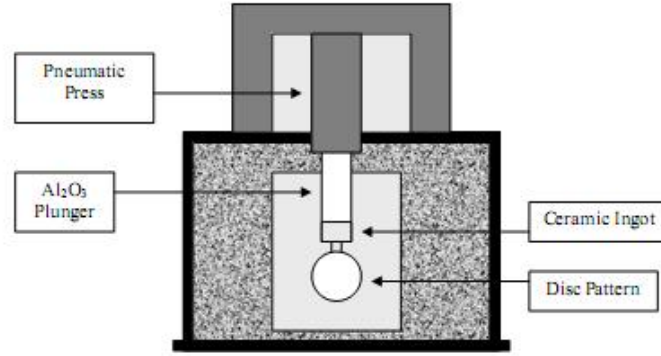
sistemin ikinci aşamasını IPS Empress 2 (Ivoclar, Schaan, Leichtenstein, 1998) sistemi oluşturmaktadır. Her iki sistem de aynı üretim yöntemiyle çalışmaktadır. IPS Empress sisteminden farklı olarak IPS Empress 2, camsı matriks içinde dağılmış uzun lityum disilikat kristalleri içeren yeni bir mikro yapıya sahiptir (Şekil 2.2).^{43,46} 1µm çapında ve 5µm uzunluğundaki homojen şekilli bu kristallerin kilitleme formu, gelen kuvvetleri absorbe ederek çatlak ilerlemesini engellemektedir. IPS Empress 2, % 70 oranında kristal fazı içermektedir. Cam seramiklerde kristal faz arttıkça direnç ve kırılma kalınlığı gibi mekanik özellikler de artmaktadır. Bundan dolayı Empress 2'nin mekanik özellikleri de Empress'e göre daha üstündür. IPS Empress 2 sistemi ile üç üyeli köprüler yapmak mümkün olmuştur.^{40,46-52}



Şekil 2.2: Isı-basınç seramiklerin mikroyapısı. a) IPS Empress b) IPS Empress 2

2.3.2 Üretim Şekli

Preslenebilir dental seramikler, mum atımı tekniği ve ısı-basınç yöntemlerinin kombinasyonu ile elde edilmektedir. Bu teknik, özelleşmiş laboratuvar cihazlarını gerektirmektedir (Şekil 2.3).^{39,43,45,53}



Şekil 2.3: Isı-basınç tekniğinin şematik görünümü.

Üretici firmalardan, camlı matris içinde dağılan kristallerden oluşmuş prefabrike ingotlar halinde temin edilirler. Restorasyon, tam şekli mumla modele edildikten sonra manşete alınır. Manşet kademeli olarak 900°C'ye kadar ısıtılır. 28 °C/dk ile 250°C'ye ulaşılır. 30 dk bu ısıda kaldıktan sonra 10 °C/dk ile 900 °C'ye çıkılır ve 45 dk bu ısıda beklenir. Manşet ardından 700 °C'deki presleme fırınına alınır ve 80°C/dk ile 1190 °C'ye ulaşılır. 20 dk beklendikten sonra plastize hale gelmiş istenilen renkteki cam-seramik ingot 17 dk'da vakumlu ortamda basınçla manşete gönderilir (Tablo 2.7).^{42,43,53-55}

Tablo 2.7: Empress 2 presleme kriterleri

Başlangıç ısısı	T1	700 °C
Presleme ısısı	T2	920 °C
Isı artışı	R	60 °C/dk.
Vakum 1	V1	500 °C
Vakum 2	V2	920 °C
Presleme öncesi bekleme	H1	20 dk.
Presleme basıncı	P	5 bar

Preslenebilir seramikler genellikle sadece alt yapı veya kor materyali olarak kullanılmaktadır. Final renge boyama veya tabakalama yöntemiyle ulaşılır.^{10,43,56-58}

Schmidt ve Weigl⁵⁹, Empress 2 materyalinin CAD-CAM tekniğiyle üretime uygunluğunu araştırmıştır. Teknik açıdan, materyalin mekanik özelliklerini, makineleme sürecini, yüzey özelliklerini, yüzey altı çatlak oluşumunu ve ekonomik performansını değerlendirdikleri çalışmada Empress 2 materyalinin CAD-CAM tekniğiyle de üretime uygun olduğunu göstermişlerdir.

Son zamanlarda lityum disilikat materyaller ile CAD-CAM üretim metodunu kombine eden farklı çalışmalar da yapılmış ve lityum metasilikat⁶⁰ esaslı IPS e.max materyali geliştirilmiştir. Tipik mavi renkli bu materyal, CAD-CAM tekniğinde kullanılması için milling işlemine özel olarak üretilmiştir. Milling işleminden sonra materyal ısıtılma işlemine tabi tutulur ve normal diş rengindeki lityum disilikat materyale dönüşür.^{40,42,61}

2.3.3 Mekanik Özellikler

Daha az poröz olması, fleksural direncinin yüksek olması ve marjinal uyumunun iyi olması lityum disilikat materyalleri, klasik feldispatik porselenlere ve diğer ısı-basınç seramiklerine göre daha avantajlı hale getirmektedir.^{46,53}

Fleksural direnç ve kırılma kalınlığı, seramik restorasyonların mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemlerdir. Yapılan birçok çalışmaya göre Empress 2'nin fleksural direnci, 205-407 MPa arasında değişmektedir.^{40,43,46,47,50,58,62-64} Empress 2'nin fleksural direnci, zirkonyumla (1200 MPa)⁶⁵ karşılaştırıldığında daha düşük kalmakta ancak feldispatik porselenlere (77-99 MPa)⁶⁶ göre ise daha yüksektir.

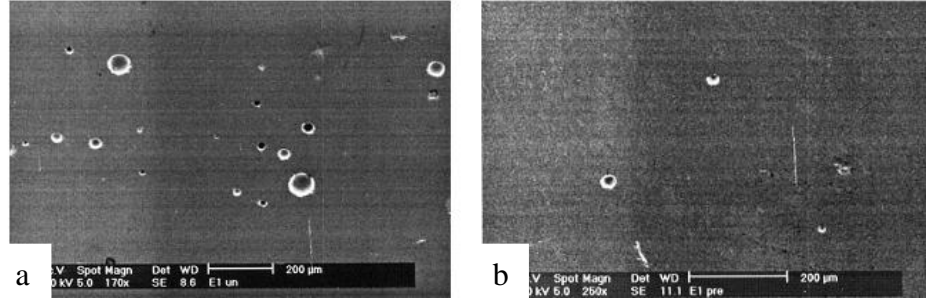
Drummond ve arkadaşları⁵⁵, lityum disilikat seramiklerin 3 aylık yaşlandırma periyodu sonunda mekanik özelliklerini araştırmış ve bu seramiklerin fleksural direncinin (205 MPa) feldispatik porselene (77-99 MPa) göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğunu bulmuştur. Kırılma direnci de (2,7 MPa/m) aynı şekilde geleneksel porselenden (1,2-1,9 MPa/m) daha yüksektir.

Tam seramik restorasyonların klinik başarısızlıkları, genelde düşük kırılma dirençlerinden kaynaklanmaktadır.^{44,51,67} Empress 2 kuronlarda en sık karşılaşılan kırılma tiplerinden birisi, tabakalama porseleninin alt yapıdan ayrılmasıdır (delaminasyon).^{64,68,69} Tam seramik kuronlarda chamfer basamak ve adeziv simantasyon kırılma direncini artırmaktadır.^{64,70-75} Asitleme ve benzeri yüzey işlemleri, Empress 2'nin bağlantı gücünü buna bağlı olarak da kırılma direncini yükseltmektedir.^{43,73,74,76}

Kırılma kalınlığı, seramik materyallerin güvenilirliğinin değerlendirilmesi için geniş kabul görmüş uygun bir parametredir. Bu özellik, materyalin kırık ilerlemesine karşı koyabilecek bir iç faktördür ve yapısal sağlamlık yanında termal şok direnci hakkında da bilgi vermektedir.^{48,50,64,67,77-79} Guazzato ve arkadaşları⁴⁰ Empress 2'nin kırılma kalınlığını, 2,9 MPa m^{1/2} olarak bulmuştur. Albakry ve arkadaşları⁴⁸, presleme işleminin lityum disilikat kristallerinin cam matriks içinde daha uniform dağılımını sağladığı ve bu işlemin de Empress 2'nin kırılma direncini artırdığını tespit etmişlerdir.

Porozite, bir materyal içerisindeki boşluk veya porların hacmini ifade eder. Materyal içerisinde stres birikim alanları oluşturan porozite, seramiklerin yapısal özelliklerini zayıflatmaktadır. Porozite, porselenlerin optik özelliklerini de olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun için üretim süreci boyunca kontrol altında tutulması

gereken, istenmeyen bir özelliktir.^{39,48,69} Albakry ve arkadaşları⁴⁸ yaptıkları SEM çalışmasında Empress 2'nin preslemeden önce küçük, az sayıda ve düzensiz por yapısına sahip olduğunu, preslemeden sonra ise porsuz ve düzgün bir yüzey yapısına kavuştuğunu göstermişlerdir (Şekil 2.4).⁴⁸



Şekil 2.4: Empress 2'nin preslemeden önce (a) ve preslemeden sonraki (b) yüzey özellikleri

Porselenlerin mekanik özelliklerini artırmak amacıyla farklı güçlendirme metodları denenmiştir.³⁹ Fischer ve arkadaşları⁴⁹, Empress 2 materyali yüzeyindeki küçük boyutlu lityum iyonlarının daha büyük çaplı potasyum ve sodyum iyonlarıyla değiştirilmesinin mekanik özellikleri geliştirmeye yardımcı olduğunu göstermişlerdir.⁴⁹

Empress 2, estetik açıdan feldispatik porselenlerle karşılaştırılabilecek kadar iyi, zirkonyum ve alümina gibi diğer alternatif kor materyallerine göre ise oldukça iyi özelliklere sahiptir.^{49,80-82}

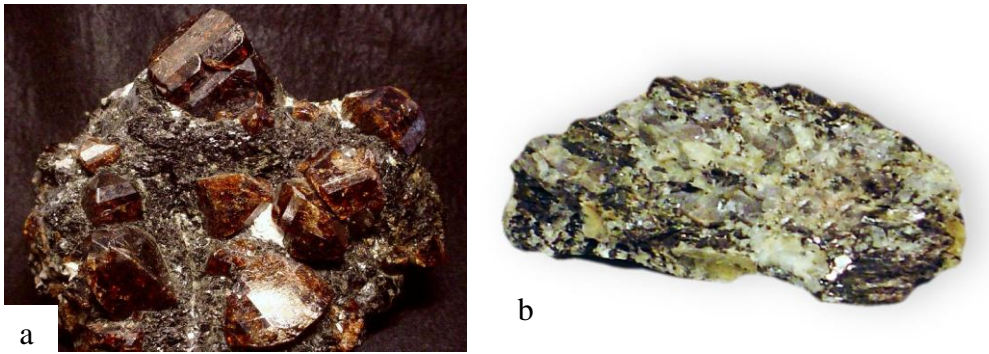
2.4 Zirkonyum

Dental materyallerin hasta, çalışan ve çevre üzerindeki yan etkileri ve diş renginde restorasyonların kullanımına artan ilgi nedeniyle araştırmalar, güçlü, estetik ve kimyasal açıdan stabil materyallerin geliştirilmesine yönelmiştir.⁸³ Bu anlamda yeni ve güçlü dental seramiklerin geliştirilmesi 20. yüzyılın son zamanlarının ana ilgi alanı

olmuştur.⁸⁴⁻⁸⁷ İleri dental materyal teknolojilerindeki gelişmeler, zirkonyumun diş hekimliğinde kullanılmasını sağlamıştır.^{83,88}

Zirkonyum, sembolü Zr, atom numarası 40 olan metalik bir elementtir. Eski zamanlardan beri kıymetli bir cevher olarak bilinen zirkonyum, Arapça altın rengi anlamındaki 'Zargon' isminden gelmektedir.⁶⁵ Periyodik tabloda geçiş elementleri arasında yer almaktadır ve atom ağırlığı 91.224, yoğunluğu ise 6,51g/cc'dir. Zirkonyum metal oksidi (zirkonyum dioksit-ZrO₂), ilk olarak 1789'da Alman kimyacı Martin Heinrich Klaproth tarafından, bir takım değerli taşların ısıtılması sonucu reaksiyon ürünü olarak bulunmuştur.⁸⁹

Element, İsveçli kimyacı Baron Jöns Jacob Berzelius tarafından 1824 yılında izole edilmiştir. Erime ısısı 1852 °C, kaynama ısısı 3580 °C'dir. Altıgen kristal yapıya sahiptir ve grimsi renktedir. Zirkonyum doğada saf halde bulunmaz. Silikat oksitle birlikte Zircon (ZrO₂xSiO₂) minerali olarak ya da serbest oksit halinde Baddeleyite minerali şeklinde bulunur (Şekil 2.5).⁶⁵



Şekil 2.5: a) Mineral zirkonyum b) Baddeleyite zirkonyum

Bu mineraller, yapılarını renklendiren metal elementleri ve bünyelerindeki doğal radyoaktif çekirdekler nedeniyle diş hekimliğinde direkt olarak kullanılamazlar.

Materyalin seramik biyomateryali olarak kullanılabilmesi için çeşitli işlemlerden geçirilerek saflaştırılması gerekmektedir.⁶⁵

2.4.1 Yapısı

Zirkonyum, sertliği, aşınma direnci, dayanıklılığı, yüksek korozyon direnci ve ani ısıl değişimlere dayanıklılığı gibi özellikleri ile endüstride kullanılmıştır. İyi bir kimyasal ve boyutsal stabiliteye sahip olması, mekanik direncinin yüksek olması ve young modülünün paslanmaz çeliğine yakın olması nedeniyle tıp ve diş hekimliğinde metal alaşımların yerine ideal bir alternatif oluşturmuştur (Tablo 2.8).⁶⁵ Biyomateryal olarak kullanımına 1960'lı yıllarda başlanmıştır.^{65,88,90-92} Zirkonyum, ilk olarak ortopedide kalça eklemi protezlerinde kullanılmış, mekanik özellikleri ve biyolojik uyumluluğu sayesinde kısa dönemde iyi sonuçlar alınmıştır.⁹³ Zirkonyumun eklem başı protezi olarak kullanılmasıyla ilgili ilk çalışmayı, Christel ve arkadaşları⁹⁴ literatüre sunmuştur.

Tablo 2.8: Bazı biyomateryallerin mekanik özellikleri

Özellik	Ti-6Al-4V	316 SS	Co-Cr	TZP	Alümina
Young modülü (GPa)	110	200	230	210	380
Strength (MPa)	800	650	700	900-1200	>500
Sertlik (HV 0.1)	100	190	300	1200	2200

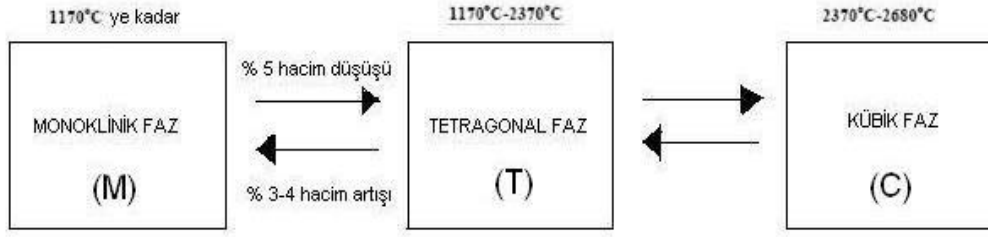
Gelişiminin ilk dönemlerinde, biyomedikal uygulamalar için zirkonyum içerikli birçok solid solüsyon (ZrO_2 -MgO, ZrO_2 -CaO, ZrO_2 - Y_2O_3) denenmiştir (Tablo 2.9).⁶⁵ Fakat takip eden dönemlerde araştırmalar, ince grenli mikroyapısından dolayı tetragonal

zir-konya polikristali (TZP) olarak bilinen yitriya-zir-konya seramikleri (Y-TZP) üzerine yoğunlaşmıştır.⁶⁵

Tablo 2.9: Biyomedikal uygulamalarda kullanılan bazı seramiklerin özellikleri

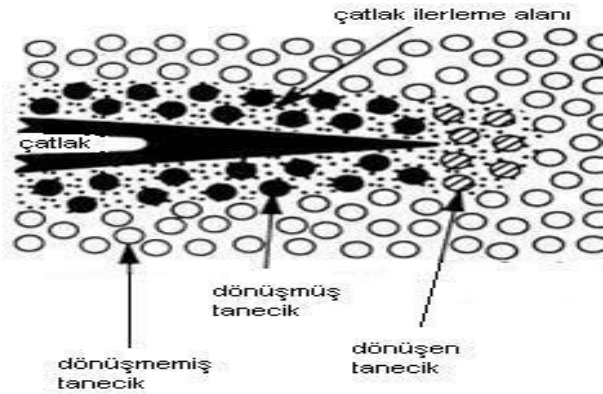
Özellik	Alümina	Mg-PSZ	TZP
Kimyasal bileşim	%99.9 Al ₂ O ₃ + MgO	ZrO ₂ +%0.8 mol MgO	ZrO ₂ +%3 mol Y ₂ O ₃
Yoğunluk (gr/cm³)	≥3.97	5.74-6	>6
Pörozite (%)	<0.1	-	<0.1
Eğilme direnci (MPa)	>500	450-700	900-1200
Sıkışma direnci (MPa)	4100	2000	2000
Young modülü (GPa)	380	200	210
Sertlik (HV 0.1)	2200	1200	1200

Saf zir-konyum dioksit (ZrO₂), yüksek erime ısısına ve düşük termal ilettime sahiptir. Monoklinik (M), Tetragonal (T) ve Kübik (C) olmak üzere üç fazda bulunmaktadır. Oda ısısında monoklinik fazda olan saf zir-konyum, 1170 °C ve 2370 °C arasında tetragonal faza geçmektedir. Tetragonal faz, eklendiği seramiğin konsantrasyonuna ve tanecik büyüklüğüne bağlı olarak oda ısısında stabilize edilebilmektedir. 2370 °C derecenin üstünde kübik formdadır.^{39,56,65} Saf zir-konyumun hacminde, faz geçişleri esnasında önemli değişiklikler olmakta ve bu durum, kitleye stabil olmayan bir özellik kazandırmaktadır.^{39,93} Monoklinik fazdan tetragonal faza ısıtma ile transformasyon esnasında % 5'lik bir hacim düşüşü gerçekleşir; bunun tersi olarak soğuma sırasında ise % 3-4'lük bir hacim artışı oluşmaktadır (Şekil 2.6). Bu hacim artışları, tetragonal fazdan monoklinik faza geçen zir-konyum yüzeyinde çatlaklar oluşturmaktadır.^{56,65,88,95}



Şekil 2.6: Zirkonyum dioksit seramiklerin faz geçiş şeması.

Zirkonyumun güçlü mekanik özellikleri, tetragonal-monoklinik (T-M) faz dönüşümünün bir sonucudur. Aşındırma, soğutma ve çarpma gibi dış kuvvetlerin etkisiyle oluşan T-M dönüşümü, çatlak başlangıcında sıkıştırıcı kuvvetler üreten %4'lük hacim artışına neden olmaktadır. Hacim artışı, çatlağın uç kısmında sıkıştırıcı stresler ortaya çıkarmakta, çatlağın ilerleyişini engellemekte ve dış streslerin nötralize edilmesini sağlamaktadır. T-M dönüşümü, zirkonyum partiküllerinin metastaza uygun tetragonal fazında oluşmaktadır. Dönüşümün metastaz miktarı, zirkonyum taneciklerinin kompozisyonu, çapı ve şekline, stabilize edici oksitlerin tür ve miktarına, zirkonyumun diğer fazlarla etkileşimine ve üretim şekline bağlıdır. Transformasyon sertleşmesi olarak tanımlanan bu fiziksel özellik, Y-TZP seramiklerin esas tercih nedenidir (Şekil 2.7).^{57,65,88,91,92}



Şekil 2.7: TZP'ye ait dönüşümsel sertlik mekanizması

Zirkonyumdaki T-M dönüşümü, üç farklı materyalin oluşumuna neden olmuştur (Tablo 2.10). Tetragonal faz, bunlardan ilk ikisinde minör faz olarak kalmakta diğerinde ise temel faz olmaktadır. Tetragonal fazın stabilizasyonunun orjini ve detayları, bu üç grupta da farklılık arz etmektedir. Her üç materyalde de tetragonal fazın stabilizasyonu ortaktır ve güçlendirme T-M dönüşümünü içermektedir.⁹⁶

Tablo 2.10: Zirkonyuma ait dönüşümsel sertlik ürünleri

Sertleşme formu	Dental örnek
Dağılımla güçlendirilmiş seramikler (Zirconia toughened alumina)	In-ceram zirconia (Vita Zahnfabrik)
Parsiyel stabilize zirkonya (PSZ; Ca-PSZ, Mg-PSZ, Y-PSZ)	Denzir-M (Dentronic ABD)
Tetragonal zirkonya polikristali (TZP; Y-TZP, Ce-TZP)	DC Zirkon (DCS Precident, Schreuder&Co), Cercon (Dentsply Prosthetics), Lava (3M, ESPE), In-Ceram (Vita Zahnfabrik)

Her ne kadar, zirkonyum içerikli birçok farklı seramik sistemi mevcutsa da bunlardan üç ana tipi diş hekimliğinde kabul görmüştür.^{90,92,96} Bunlar yitria-tetragonal zirkonyum polikristali (3Y-TZP), magnezyum stabilize zirkonyum (Mg-PSZ) ve zirkonyum ilaveli alüminadır (ZTA). Biyomateryal olarak en çok kullanılan tip, yitrium oksidin saf zirkonyuma ağırlığının % 3-5 oranında ilave edilmesi ile elde edilen Yitriya Tetragonal Zirkonyum Polikristali (3Y-TZP)'dir.^{83,88,93,97}

2.4.1.1 Dağılımla Güçlendirilmiş Zirkonyum

Zirkonyumu güçlendirmek için en az kullanılan yöntem, onu farklı bir matrix ile kombine etmektir. Zirkonyum ile sertleştirilmiş alümina (ZTA) ve müllit (ZTM) buna örnektir.⁹⁸ Dental materyaller arasında bu yolla elde edilmiş ticari bir ürün, In-Ceram

Zirconia (Ic-Z, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Germany)'dir.⁹⁶ In-Ceram Alumina (Ic-A, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Germany) içine, % 12 mol Ceria (Ce) ile stabilize edilmiş zirkonyumun ilave edilmesiyle geliştirilmiştir.⁸⁸ Materyal, geleneksel metod veya makineleme ile işlenebilir. Geleneksel metodun bir avantajı büzülme yüzdesinin çok limitli olmasıdır. Bununla birlikte porozite miktarı, sinterlenmiş 3Y-TZP'den daha fazladır.⁹⁶ Bu durum, materyalin 3Y-TZP dental seramiklere göre daha düşük mekanik özellikler göstermesini kısmen açıklamaktadır.⁸⁸

2.4.1.2 Parsiyel Stabilize Zirkonyum

Bu materyaller, üzerinde en çok çalışma yapılmış, ticari olarak kıymetli, mikroyapısı en kompleks olan zirkonyum türevleridir. Mg-PSZ en çok kullanılan zirkonyum esaslı mühendislik seramiklerinden biridir.^{96,99} Mg-PSZ ile ilgili olarak birçok araştırma yapılmış ancak 1990'ların başından itibaren, porozite varlığı ve buna eşlik eden büyük tanecik ebadı (30-60 mikron) yüzünden kullanılmasına son verilmiştir.^{65,99} Ayrıca yüksek sinterleme ısısı (1400-1800 °C) yüzünden soğuma evresi ciddi olarak kontrol edilmelidir.⁶⁵ Denzir-M (Dentronic ABD), dental restorasyon yapımında günümüzde kullanılan Mg-PSZ seramiklere örnektir.^{96,99}

2.4.1.3 Tetragonal Zirkonyum Polikristali (3Y-TZP)

Geliştirilmelerini takip eden yıllarda biyomedikal uygulamalar için kullanılan seramikler içinde araştırmalar, daha çok düzgün tanecik yapılı Tetragonal Zirkonyum Polikristalleri (3Y-TZP) olarak da bilinen zirkonyum-yttria seramiklerine odaklanmıştır.^{65,96,100-102} Sinterlenmesi daha zor olmasına rağmen, 3Y-TZP'nin mekanik özellikleri, halen medikal kullanımdaki diğer zirkonyum türevlerine göre daha yüksektir.^{56,103}

Az miktarlarda stabilize edici yitrium oksit ilavesiyle, % 98'e kadar metastaz yapabilen tetragonal faz içeren zirkonyumun sinterlemeyi takiben stabil hale getirilebildiği, ince grenli (genelde 0.5 μ m'den daha küçük) zirkonyum türevidir. İlk olarak 1977 yılında bulunmuştur. Bu materyalin yüksek direnci, tetragonal faz içeriğinin yüksekliğine, düşük direnci ise monoklinik faz miktarına bağlıdır. Maksimum direnç, ortalama gren boyutu 0,3 μ m'nin altında olduğunda ortaya çıkmaktadır.⁹⁶

Y-TZP, kalça eklemi protezlerinde eklem başı olarak 1980'lerin sonlarından beri kullanılmaktadır. Ancak, 2001 yılındaki başarısızlık serisinden sonra ortopedik cerrahideki kullanımı % 90'dan fazla düşüş göstermiştir.^{84,102,104,105}

Y-TZP'nin diş hekimliğinde kullanılması 1990'ların başına rastlamaktadır. Başlangıçta endodontik postlarda, implantların üst yapılarında ve ortodontik braketlerde kullanılan Y-TZP, son zamanlarda ise implant ve tam seramik restorasyonlarda da alt yapı materyali olarak bir alternatif haline gelmiştir.^{83,90,93,106-108}

Y-TZP restorasyonlar önceden sinterlenmemiş (pre-sintered) blokların makinelenmesi ardından da yüksek derecede sinterlenmesiyle ya da tam sinterlenmiş blokların direkt makinelenmesi ile yapılmaktadır. 3Y-TZP'nin mekanik özellikleri büyük oranda tanecik boyutuna bağlıdır.^{96,97} Tanecik boyutu ise zirkonyum yapısına katılan stabilize edici materyallerin türü ve yoğunluğuna bağlıdır. Aynı şartlar altında yitrium, seryum ve titanyuma göre daha güçlü bir stabiliteördür.⁹⁶ Belirli bir tanecik boyutu (yaklaşık 0,2 μ) altında transformasyon mümkün değildir ve düşük kırılma direnci kaçınılmazdır. Sinterleme koşulları da direkt olarak tanecik boyutunda etkilidir; daha yüksek sinterleme ısıları ve daha uzun sinterleme süreleri daha büyük tanecik boyutuna sebep olmaktadır.¹⁰²

2.4.2 Mekanik Özellikler ve Y-TZP'nin Yaşlanması

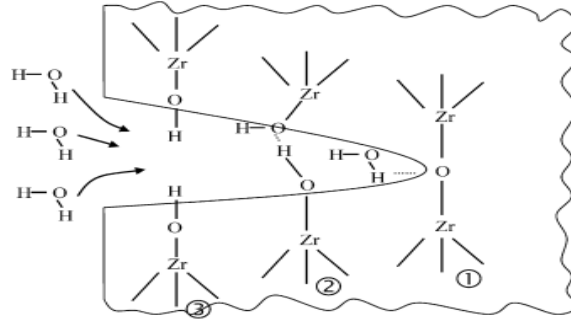
Zirkonyum seramiklerin diğer tüm seramiklerden daha üstün mekanik özelliklere sahip olduğu bir gerçektir. Bu durum, zirkonyumun posterior bölgede istenen incelikte bir kor materyali olarak kullanılmasına izin vermektedir.^{90,91} Tablo 2.11'da, biyomedikal alanda kullanılan alümina ve elde ediliş yöntemine göre Y-TZP'ye ait önemli mekanik özellikler verilmiştir.

Tablo 2.11: Alumina ve Y-TZP (unHIPped-HIPped) ye ait mekanik özelliklerin karşılaştırılması

Özellik	Alumina	Y-TZP (unHIPped)	Y-TZP (HIPped)
Yoğunluk (g/cm ³)	3.90	6	6.1
Ortalama tanecik boyutu (µm)	<7	<1	<0.5
Mikrosertlik (Vickers)	2000-3000	1000-1200	1000-1300
Young Modülü (GPa)	380	200	200
Bükülme Direnci (MPa)	400	900	1200
Tokluk Kır (MPa.m ^{1/2})	5-6	9-10	9-10

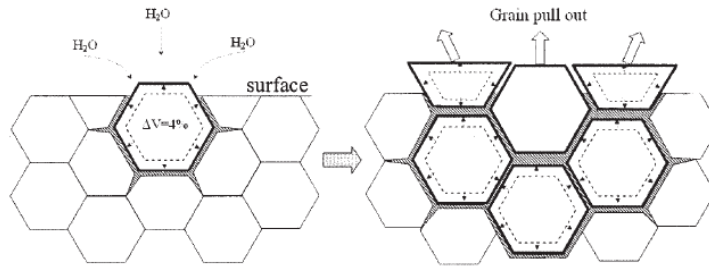
Zirkonyumun mekanik özellikleri, ince grenli olmasına ve metastaza uygun mikroyapısına bağlıdır. Bu mikroyapının stabilitesi, materyalin kullanımı sırasında beklenen performansı sunabilmesi için anahtar noktadır. Nemli ve göreceli olarak düşük sıcaklık (150-400 °C) ortamında, metastaza uygun tetragonal faz, yavaş yavaş daha stabil monoklinik faza dönüşmektedir. Bu durum, % 4.5-6 mol yitrium oksitle stabilize edilmiş tetragonal zirkonya polikristalinde ortaya çıkmaktadır. Materyalin mekanik özelliklerinde düşüşe yol açan bu spontane T-M dönüşümü, Low Temperature Degradation (LTD) diğer adıyla ageing (yaşlanma) olarak bilinmektedir.^{65,83,92,96,105}

LTD, klasik olarak tetragonal polikristalin yüzeyinden başlar ve materyalin içine doğru ilerler. Bir taneciğin dönüşümü, çevreleyen taneciklerde stres ve mikro çatlaklara neden olan hacim artışı ile sağlanır. Su penetrasyonu, Zr-O yerine Zr-OH bağlarının oluşmasına neden olarak yüzeyden tanecik salınımını ve dönüşümün tanecikten taneciğe yayılmasını şiddetlendirmektedir (Şekil 2.8).^{65,95,102,104,105,109}



Şekil 2.8: Su ile Zr-O bağlarının etkileşimi. 1-3: Zr-O yerine Zr-OH bağlarının oluşumu

LTD sonucu artan dönüşüm, yitriumun yüzeyden kopması, çöküntü şeklinde bozulma ve ileri derecede mikro çatlak oluşumu, sonunda da direnci zayıflatan yüzey pürüzlülüğüyle sonuçlanmaktadır (Şekil 2.9, 2.10).^{96,105}

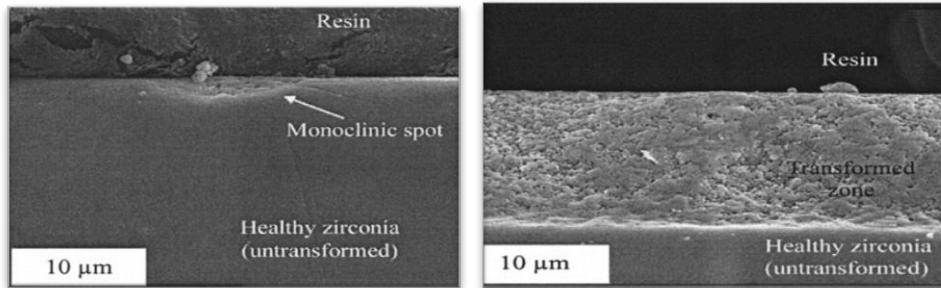


Şekil 2.9: Low temperature degradation (LTD). Tanecikten taneciğe T-M dönüşümünün artması, suyun materyal içine ilerlemesi için yeni yollar oluşturmaktadır.

TZP'nin yaşlanmasının ana basamakları, Swab¹¹⁰ tarafından şu şekilde sıralanmıştır:

1. Bu fenomen için en kritik ısı aralığı, 200-300 °C'dir.
2. Yaşlanma sonucu materyalin gücü, tokluğu ve yoğunluğu azalmakta, monoklinik faz içeriği artmaktadır.
3. Buna mikro ve makro çatlak oluşumu eşlik etmektedir.
4. T-M transformasyonu yüzeyden başlayarak materyalin içine doğru ilerlemektedir.
5. Gren boyutunun azalması ve/veya stabilize edici oksitlerin konsantrasyonunun artması, transformasyon oranını azaltmaktadır.
6. T-M transformasyonu ihtimali, su veya buhar varlığında artmaktadır.

Y-TZP'nin LTD oranı, porozite, rezidüel stres, tanecik boyutu, ortam, üretim metodu, seramiğe uygulanan yük gibi mikroyapıyı etkileyebilecek birçok faktöre bağlıdır.^{83,102,104,111} Tanecik boyutunun küçülmesi, dağılımı veya stabilize edici oksit ajan oranının artırılması, transformasyon oranını düşürebilir.^{112,113} Bununla birlikte tanecik boyutunun çok fazla küçültülmesi ve stabilize edici oksit oranının çok artırılması ise arzu edilen seviyedeki metastaz yeteneğini ortadan kaldıracaktır.



Şekil 2.10: LTD sonucu yaşlanmış örneğin dikey kesiti. İlk resimde 3 saat sonraki tek nokta şeklinde kopma, ikinci resim, 11-16 saat sonraki oldukça kırılğan dönüşüm bölgesinin genişleşmiş hali

Zirkonyumun üretimindeki farklılıklar (ısı, zaman ve makineleme) materyalin mikroyapısını ve yaşlanma direncini etkilemektedir.^{95,104,114} Piconi ve Maccauro⁶⁵,

materyalin mikroyapısındaki defektlerin, sinterleme ile aşılabileceğini bildirmiş, Hot Isostatic Presleme (HIPped) yönteminin daha olumlu sonuçlar verdiğini ifade etmiştir. Yapılan araştırmalar, aşındırmanın 3Y-TZP materyalini yapısal olarak zayıflattığını, kumlamanın ise yapıyı güçlendirdiğini^{115,116} ve bağlantı gücünü artırdığını¹¹⁷ göstermiştir.

Yeşil aşama ve pre-sinterize bloklardan üretilen restorasyonlar, daha sonraki aşamada sinterlenmektedir. Bu işlem, üretim sırasında oluşan stresten kaynaklanan T-M dönüşümünü önlemekte ve nihai yüzeye, aşındırma uyumlaması veya kumlama işlemi yapılmaya kadar, monoklinik fazdan arındırılmış olarak ulaşmayı sağlamaktadır. Öte yandan, tam sinterlenmiş 3Y-TZP blokların makineleneyle elde edilen restorasyonların bir miktar monoklinik zirkonyum içerdiği gösterilmiştir.^{88,90} Chevalier'e¹⁰⁴ göre, vücut sıvıları ile materyalin temasta olan yüzeylerinde monoklinik faz oranı % 10'dan az olmalıdır.

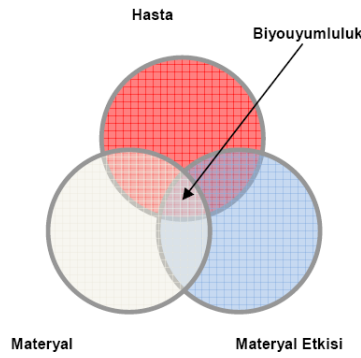
2.5 Biyolojik Uyum

2.5.1 Biyoyumluluk

Biyoyumluluk, bir materyalin uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevabı oluşturabilmesi olarak tanımlanır.¹¹⁸ Biyoyumluluk konusundaki geleneksel yaklaşım, materyalin ağız dokuları üzerinde önemli yan etkiler oluşturmaması olarak görülmektedir. Daha uygun yaklaşım ise çevreleyen biyolojik ortamla uyumlu bir etkileşim sergileyebilecek kimyasal yapıdaki materyallerin seçilmesi veya dizayn edilmesidir.^{1,119}

Biyoyumluluk terimi, bir materyalin doku veya fizyolojik sistem üzerindeki yan etkilerini aynı zamanda fizyolojik çevrenin de materyal üzerindeki etkilerini ve her

iki yöndeki etkileşimi içermektedir. Bir materyal canlı dokulara yerleştirildiğinde kompleks biyolojik sistemle materyal arasında bir etkileşim oluşmaktadır. Materyal, konağı etkilerken aynı zamanda konak da materyali etkilemektedir. Materyalin biyolojik olarak inert olması demek bu tarz etkileşimlerin olmaması demektir. Bu anlamda, inert materyal yoktur.¹¹⁹ Şüphe yok ki bugün kullanımda olan birçok dental materyal, sistemik olarak değerlendirilmesi gereken şekilde belli oranlarda doku cevabı oluşturmaktadır.¹ Herhangi bir materyalin biyouyumluluğu, materyalin türüne, yerleştirildiği bölgeye ve kendisinden beklenen fonksiyona bağlıdır (Şekil 2.11).^{3,120}



Şekil 2.11: Biyouyumluluğu belirleyen faktörler

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.³

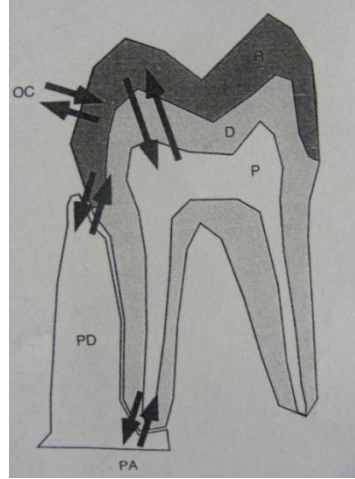
Biyouyumluluk, yalnızca materyalin değil aynı zamanda materyalle çevresi arasındaki etkileşimin bir özelliğidir.³ Örneğin, titanyum uygun şartlarda yerleştirildiğinde osseointegrasyonu başarılı olan uygun bir dental implant materyalidir. Aynı konak, aynı yöntem ve aynı yükleme şartları altında titanyum 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 isabetli değildir. Fonksiyon ve yerleşimini tanımlamadan herhangi bir materyali biyouyumlu olarak tanımlamak mümkün değildir.³

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 iritanlara 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.¹²⁰

2.5.2 Dental Materyallerin Biyouyumluluğunu Etkileyen Faktörler

Biyouyumluluk, herhangi bir dental restoratif materyalin temel şartlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Dental materyallerin biyouyumlulukları, biyolojik faktörleri, hasta risk faktörlerini, klinik deneyimleri ve mühendislik konularını içeren karmaşık bir konudur.¹¹⁹

Biyouyumluluk tanımı, vücut ve materyal arasında bir etkileşimi ifade etmektedir. Vücuda yerleştirilen bir materyal, normalde var olmayan yeni arayüzler oluşturmaktadır (Şekil 2.12). Bu arayüzler, 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 biyolojik arayüzler aktif olduğundan bir materyalin biyolojik olarak inert olması sözkonusu değildir. Biyolojik arayüzlerin aktivitesi, materyalin lokasyonuna, vücutta kalma süresine, materyalin özelliklerine ve konağın sağlık durumuna bağlıdır.¹¹⁹



Şekil 2.12: Yeni bir restorasyon (R), diş, materyal ve çevre dokular arasında yeni arayüzler oluşturur. Bu arayüzler genelde, materyal ile dentin (D) aracılığıyla pulpa (P) arasında, periodonsiyum (PD), periapikal kemik (PA) veya oral kavite (OC) arasında oluşmaktadır. Ara yüzün olduğu her yerde materyalin vücudu, vücudun da materyali etkilemesi şeklinde iki yönlü ve sürekli bir aktivite oluşmaktadır.

Biyolojik cevabı ölçerken göz önünde bulundurulması gereken birçok faktör vardır. İlk olarak, materyalin lokasyonu, biyolojik cevabın tümü üzerinde etkilidir. Materyalin yumuşak veya mineralize dokuya yerleştirilmesi, oral epitel ile doğrudan veya kemik içi 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.¹¹⁹

Materyalin vücutta kalma süresi, biyolojik cevabı yakından etkilemektedir. Ölçü maddeleri gibi ağızda kısıtlı bir süre kalan materyallerin biyolojik etkileri, ağızda çok daha uzun kalanlara göre farklılık göstermektedir. Ölçü maddeleri, ağızda kaldıkları kısa süre içinde allerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Hâlbuki bu kısa süre, toksik ve mutajenik etkilerin görülmesi için yeterli değildir. Materyalin vücutta kalma süresi aynı zamanda, vücut ve materyal arasındaki karşılıklı etkileşimlerin ortaya çıkmasını da doğrudan etkilemektedir. Uzun kullanım süreleri, karmaşık yollarla materyalin vücudu, aynı zamanda da vücudun materyali etkilemesi için gerekli zamanı sağlamaktadır.¹¹⁹

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.¹¹⁹

Oral ve maksillofasiyal bölge kompleks ve değişken bir yapıya sahiptir. Protetik materyaller, doku içine tamamen implante olan materyallerden farklı olarak tükürük, yiyecek ve bakterilerle ve aynı zamanda bunlarla çevresel elemanlar arasındaki reaksiyon ürünleriyle de etkileşim halindedir. Bu etkileşimlerin tümü, materyal ve/veya protezin performansı üzerinde ciddi etkilere sahiptir ve bu etkiler oral bölgeye has bir durum sergilemektedir. Ağızdan farklı vücut bölgelerine yerleştirilen biyomateryaller, uygun sıcaklık ve stabil kimyasal yapıda kaldığı halde ağız ortamı, aşırı sıcaklık ve pH değişmelerine ve farklı kimyasal yapıdaki besinlere maruz kalmaktadır. Bir

dondurmadan (0°C), sıcak bir kahveye (90°C) aşırı sıcaklık değişimleri ısıl genişleme, mekanik özelliklerde değişme veya bağlanmada başarısızlık gibi uyumluluk problemlerine yol açabilmektedir.¹²⁰

Diş çürüğüne neden olan bakterilerin etrafındaki mikro çevrede, pH değeri 2.2 ye kadar düşebilmektedir. Gastrik salgıların pH değeri, 1.0-3.5 mide asitlerinininki 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.¹²⁰

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.¹²⁰

2.5.3 Biyolojik Uyum Testleri İçin Standartlar

Günümüzde biyouyumluluğu test etmek için kullanılacak metodlar, uluslararası standartlar tarafından belirlenmiştir.^{3,121} Bu standartlardan bazıları, özel olarak dental materyallerle (ISO 7405)¹²²⁻¹²⁴ ilgili test metodlarını belirlerken bazıları da dental materyaller de dâhil olmak üzere diğer tıbbi malzemeler ve cihazların test yöntemleri (ISO 10993)¹²⁵ hakkındadır. Diş hekimliği maddeleri, özel olarak diş hekimliğinde kullanılmak için imal edilmiş ve/veya geliştirilmiş maddeler veya değişik maddelerin kombinasyonudur.¹²²

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 preklinik 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. ISO 10993 standardının 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.¹²¹

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 ve öngörülen toksisite profiline uygun test yöntemlerinin seçimiyle ilgili sorumluluklar yükler.
- Üretici maliyet, deneyim ve başka nedenlerden dolayı sitotoksisite 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.¹²¹

2.5.4 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 esastır.^{121,126,127}

Biyolojik testler için farklı basamaklar ve bunlar için de 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 irritasyon veya sensitizasyon testlerini içermektedir. Son aşamada materyalin asıl kullanılmak istenildiği çevredeki klinik performansı değerlendirilmektedir.^{1,123,124}

Diş hekimliğinde kullanılan malzemeler, biyolojik uyumla ilgili olarak beş grupta incelenirler:^{122,123,128-131}

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.^{122,128,129} Biyouyumluluğun belirlenmesinde en önemli aşama, uygun test yönteminin seçilmesidir.^{128,131}

Biyolojik testler genel olarak üç grupta sınıflandırılmıştır.^{3,122,123,128,129,131,132}

1. Başlangıç testleri
2. İkincil testler
3. Kullanım testleri

2.5.4.1 Başlangıç testleri

Başlangıç testleri, materyalin toksik profilini ortaya koymaktadır.¹³³ Bu testlerin çoğu ilaçları değerlendirmek için kullanılan testlerden seçilmiştir. Hücre kültürü test metodları hariç tutulursa bu testlerden ancak birkaçı ile dental materyaller test edilebilmiştir. Bu metodlar sitotoksisite, hemoliz, sistemik toksisite, karsinogenez ve teratojeniteyi (dominant letal test, ames testi, styles testi) araştıran bir dizi testten oluşmaktadır.^{123,132}

2.5.4.1.1 İn vitro Sitotoksisite Testleri

Yeni bir materyali değerlendirmek için geliştirilmiş olan ilk test yöntemidir. Test malzemesinin, uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir.^{122,129}

İn vitro testler, organizmanın dışında yapılan testlerdir.³ Bu tür testler, test tüpleri, hücre kültür kapları, flask veya diğer taşıyıcı kaplarda yapılabilmektedir. 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.^{3,119}

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.^{3,119,126,129}

İn vitro biyoyumluluk testlerinin amacı; vücut dokuları üzerine veya içine yerleştirildiklerinde, malzemelere karşı oluşacak biyolojik reaksiyonun test ortamında oluşturulmasıdır. Öncül laboratuvar testleri yapılmadan hayvan testlerinin gerçekleştirilmesi çok zaman alıcı ve masraflı olmaktadır.^{126,128,134,135} Yapılacak in vitro deneyler, daha karmaşık hayvan deneylerine geçilmeden önce materyalin toksik olup olmadığı konusunda ön bilgi sağlamalıdır.^{126,136}

İn vitro biyoyumluluk testlerinin uygulanmasında karşılaşılan temel problemler; bu testlerle araştırılmak istenen biyolojik reaksiyonların in vivo sistem mekanizmasından bağımsız olarak tek başına ayrıştırılması ve uygulanan test yöntemleri için her test sürecinde benzer sonuçlara ulaşılabilecek standartlar geliştirilmesi gerekliliğidir. Ancak teknoloji, standardizasyondan daha hızlı gelişmektedir ki bu da standart geliştirme sürecini zorlaştırmakta ve neredeyse sürekli hale getirmektedir.^{128,129}

İn 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.¹³⁴

2.5.4.1.1.1 İn Vitro Sitotoksisite Testlerinin Avantajları

İn vitro sitotoksisite testlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir;^{3,119,126,127,131,132,134}

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.

2.5.4.1.1.2 İn Vitro Sitotoksisite Testlerinin Dezavantajları

İn vitro testlerin dezavantajları şunlardır: ^{3,119,127,131,135}

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,

3. İn vitro ortamın organizmada bulunan immün sistem, inflematuar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık koordinasyon mekanizmalarına sahip olamaması. 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 sitotoksisite testlerinde, test sisteminin non-toksik, steril ve tekrarlanabilir olması önemlidir.

2.5.4.2 İkincil Testler

Test edilecek materyal, fare, rat, koyun, kedi, köpek ve domuz gibi bazı deney hayvanlarına implante edilmektedir.^{3,119} Bu şekilde materyal ile 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.^{3,121,131}

Bu testler, kemik içi veya deri altı implantasyon testlerini, oral müköz membran iritasyon testlerini ve allerji testlerini içermektedir.^{123,132}

2.5.4.3 Kullanım Testleri

Bu test metodolojisi, 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 alakalıdır.^{123,132}

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.^{3,121}

Kullanım testlerinin bir kısım dezavantajları vardır. En önemlisi, bu testlerin oldukça karmaşık olması, deney kontrolünde ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde yaşanan güçlülüdür. Diğer biyoyumluluk testlerine göre oldukça pahalıdırlar. Materyalin uzun dönem etkileri araştırılmak isteniyorsa aylar veya yıllar süren uzun zaman dilimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan klinik denemeler resmi kurumların onayı ve hasta aydınlanmış onamını gerektirirler. Son olarak bu denemelerin yapılması, in vitro ve hayvan deneylerinde gerekli olmayan birçok yasal sorumluluğu gerekli kılmaktadır.^{3,119}

2.5.5 Farklı Biyoyumluluk Testlerinin Birlikte Kullanılması

Yukarıda anlatılan her bir 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

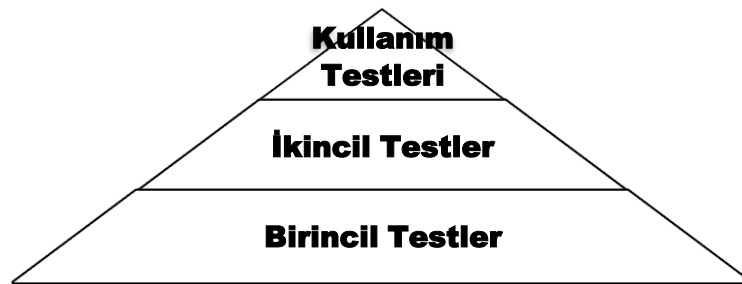
kesin olarak tespit edebilen tek bir test yöntemi henüz olmamakla birlikte üç temel test türünün uygun karışımı hakkında da tam bir fikir birliği yoktur.^{119,128,131}

İlk araştırmacılar, spesifik olmayan, spesifik ve klinik kullanım basamaklarından oluşan üç aşamalı piramit modeli oluşturmuşlardır (Şekil 2.13).^{3,131} Spesifik olmayan testlerin, materyalin klinik kullanımıyla alakalı olması şart değildir. Spesifik testler ise materyalin klinik denemeleriyle ilgili durumunu yansıtmaktadır.³



Şekil 2.13: Geliştirilen ilk biyoyumluluk test prosedürü

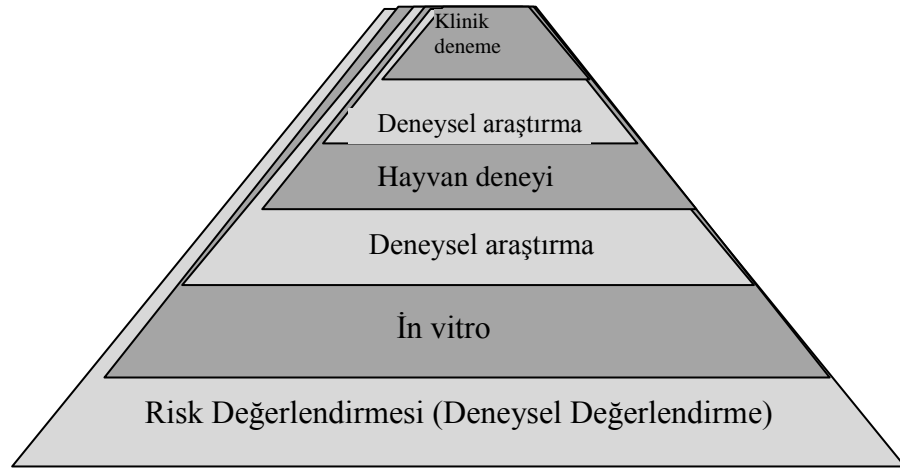
Bu ilk modelden kısa süre sonra primer, sekonder ve kullanım testlerinden oluşan farklı bir piramit modeli ortaya konulmuştur (Şekil 2.14).⁵ Primer testler, genel hücre toksisitesini, hayvanlardaki sistemik toksisiteyi, bakteriyal mutajenite testlerini ve diğer in vitro testleri kapsamaktadır. Sekonder testler ise allerji, mukozal irritasyon ve enflamasyonu belirlemek için yapılan hayvan testlerini içermektedir. Kullanım testleri ise klinik denemelerdir.³



Şekil 2.14: Biyoyumluluk test prosedürü, ikinci konsept

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 bazen yanlış pozitif bazen de yanlış negatif sonuçlar verebildiği için, zaman ve maliyet açısından avantajlı olan bu modeller, gerçeği tam yansıtamamaktadır.³

Bir materyalin biyoyumluluğunun kompleks yapısını daha iyi yansıtmak için yeni modeller de geliştirilmiştir (Şekil 2.15).^{5,118,128} Bu testlere göre bir materyalin biyoyumluluğu, klinik denemeleri de içeren dinamik bir süreçtir. Tek bir testle herhangi bir materyalin biyoyumluluğunu değerlendirmek mümkün değildir.^{3,128}



Şekil 2.15: Biyoyumluluk testleri için modern konsept. Deney tabanlı risk analizi yöntemi

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.¹³¹

Dental materyallerin biyolojik değerlendirilmesi için uygulanan test programı, dört aşamadan oluşmaktadır (Tablo 2.13). 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).¹²¹

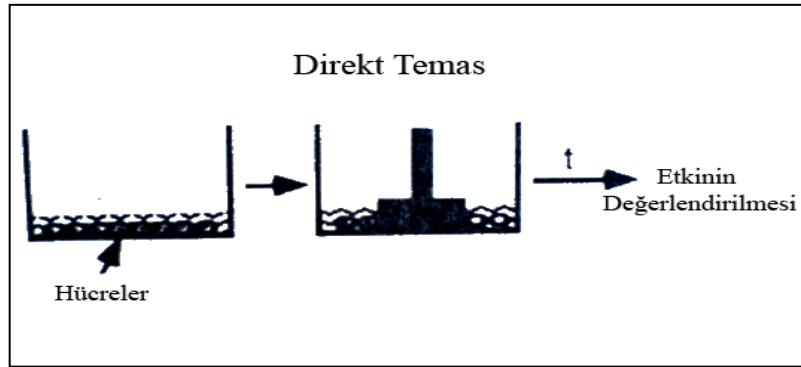
Tablo 2.13: Dental biyomateryallerin test protokolü

Test fazı	1	Değerlendirilme aşamasında			2	3	4
Test değerlendirmesi	Genel toksisite	Değerlendirilen ancak henüz tavsiye edilmeyen			Lokal doku cevabı	Preklinik	Klinik
Değerlendirme tipi	Monolayer hücre kültürü	Monolayer hücre kültürü	Embriyonik organ kültürü	Diş kültürü	Hayvan implantasyon	Hayvan kullanım testi	Klinik deneme
Doku kaynağı	Permanent hücre kültürü	Primer hücre kültürü	İnsan, hayvan	İnsan, hayvan	Küçük hayvanlar; hint domuzu	Primatlar; maymun	İnsan
Test tipi	İn vitro	İn vitro	İn vitro	İn vitro	İn vivo	İn vivo	İn vivo
Test elemanı	3T3 hücre hattı	Odontoblast hücre hattı	Papilla	Diş slice	Deri altı implantasyon	Canlı diş in situ	Canlı diş in situ
Deney süresi (gün)	≥1 gün	≥1 gün	21-35 gün	≥14 gün	≥365 gün	70 -/+ 5 gün	≤365 gün
Test uygunluğu							
Doku iritasyonu&enflemasyon	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet
Hipersensitivite	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
Karsinojenite veya mutajenite	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet
Sitotoksikite veya dentinal hasar	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet
Bakteriyal birikim	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Evet
Genetik etki	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet
Büyüme faktör terapisi	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet
Kök hücre terapisi	Hayır	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet

2.5.6 Dental Materyallerin Uzun Dönemli Toksikite Değerlendirmesi

Dental döküm alaşımların seçiminde son kararı maliyet, fiziksel özellikler ve biyouyumluluk etkilemektedir.¹³⁷ İn vitro testler yaklaşık 20 yıldır yeni veya kullanımda olan dental materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Klinik tecrübe olmadığında bu testler, yeni materyallerin geleneksel altın esaslı sistemlerle karşılaştırılması adına pratik bir yöntem sunmaktadır.^{2,128} Ancak, in vitro test sonuçlarının hayvan testleri ve klinik tecrübelerle örtüşmemesi sorgulanmaktadır. Bu büyük dezavantaja rağmen in vitro testler, yeni materyallerin ilk olarak insanlarda denenmesiyle ilgili etik ve kanuni kısıtlamalardan ötürü halen biyouyumluluk değerlendirmesinde iyi bir başlangıç noktası olarak durmaktadır.^{2,5,118}

Direkt temas testlerinin birçoğunda kültürle ilgili mikrobiyal kontaminasyon, besleyici medyumun özelliğini kaybetmesi ve hücrelerin aşırı çoğalması gibi kısıtlayıcı nedenler, materyal ile hücre temas süresini kısaltmaktadır (Şekil 2.16). Bu durum, in vitro testlerle in vivo testlerin uyumsuzluğunda önemli bir yer tutmaktadır.^{2,138-140}

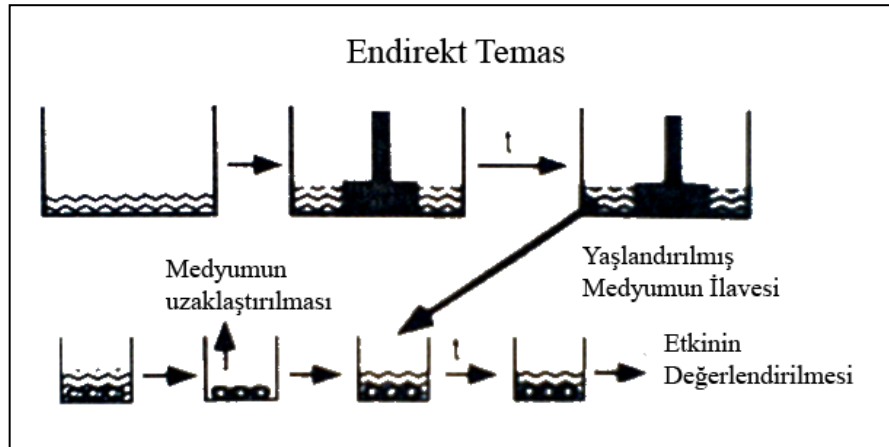


Şekil 2.16: Toksikitenin materyalle hücrelerin direkt teması yöntemiyle test edilmesi

Yapılan çalışmalar dental materyallerin toksisitesinin materyalden elemental salınım ya da kitlesel kayıpla ilgili olabileceğini göstermektedir.^{2,137,140-144} Dental

materyallerden elemental salınım veya toksik cevap genelde kısa süreli protokol (72-168 saat) ile ölçülmektedir. Bu materyaller ağızda çok uzun süre kaldıkları için kısa süreli test protokolünün biyoyumluluk için kesin ve güvenilir sonuçlar vermesi şüphelidir.^{137,145} Yapılan çalışmalarda döküm alaşımların toksik cevabı belli aralıklarla araştırılmış ve başlangıçtaki cevabın daha yüksek olduğu ve zamanla giderek azaldığı görülmüştür.^{140,146,147}

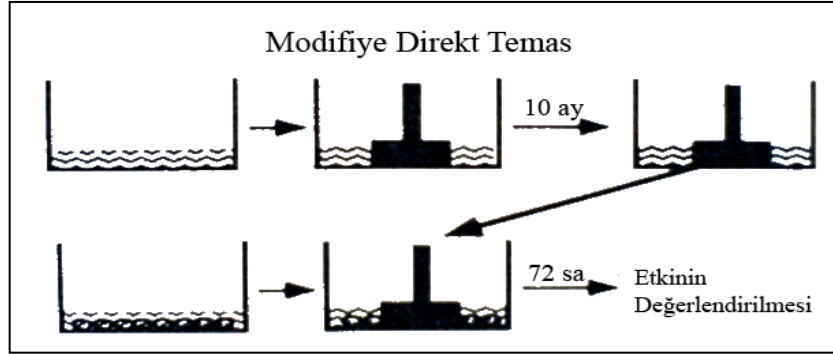
Direkt temas testlerinin bir alternatifi endirekt (dolaylı) temas test sistemleridir. Bu strateji, materyalin öncelikle hücrelerle değil de hücre kültür ortamıyla temasa gelmesine ardından da bu ortamın hücrelerle temas etmesi prensibine dayanır (Şekil 2.17). Endirekt temas yöntemiyle biyolojik medyum kullanarak materyalin yaşlandırılması mümkün olmaktadır. Materyalle hücrelerin dinamik etkileşimine izin vermemesi ve hücre kültür ortamının değişmesi sırasında belli oranda hücrenin ölmesi önemli bir olumsuzluk unsurudur.²



Şekil 2.17: Endirekt temas yöntemiyle yaşlandırılmış medyumun test edilmesi

Direkt temas testleri için diğer bir alternatif metod da materyalin biyolojik ortamda yaşlandırılması, ardından toksisite değerlendirmesi için direkt temas testinde de

yaşlandırma medyumunu yerine materyalin kendisinin kullanılmasıdır (Şekil 2.18). Bu modifiye direkt temas testi, materyal ile hücrelerin dinamik etkileşimine izin vermekte, endirekt temas testinin dezavantajlarını ortadan kaldırmakta ve yaşlandırılan materyalin daha gerçekçi sonuçlar vermesini sağlamaktadır.²



Şekil 2.18: Materyalin medyumda yaşlandırıldıktan sonra direkt yöntemle test edilmesi

Materyal yaşlandırma işleminin yaşlandırmamaya göre elemental salınımı değiştirip değiştirmediğiyle ilgili çalışmalar, bazı yaşlandırma prosedürlerinin materyal üzerindeki labil elementleri uzaklaştırdığını göstermiştir.^{137,147,148} Hızlandırılmış yaşlandırma işlemi, materyalin uzun dönem toksik cevabının veya elemental salınımın araştırılması için tavsiye edilmektedir.^{140,146,148} Uzun dönem klinik kullanımda öngörülebilir sonuçlar için materyalin farklı biyolojik ortamlarda yaşlandırılması gerekmektedir.^{141,146-150}

Nelson ve arkadaşları¹³⁷, % 0.8'lik NaCl'yi, hücre kültür medyumunu ve BSA'yı (tuzlu bovine-serum-albumin) yaşlandırma solüsyonu olarak kullanmışlar ve her üçünün de farklı oranlarda toksik cevabı etkilediğini göstermişlerdir.

Yaşlandırma solüsyonu olarak kullanılan diğer bir solüsyon da yapay tükürüktür. Yapay tükürkle yapılan yaşlandırma işlemleri, elemental salınımı artırmakta ve

materyalin uzun dönem biyolojik etkileri hakkında bilgi sağlamaktadır.^{38,151} İn vitro çalışmalar için birçok farklı formülasyonda yapay tükürük kullanılmıştır.^{138,152-155}

İki aşamalı birçok dental materyal, karıştırıldıktan hemen sonra polimerizasyon tam bitmeden ağıza yerleştirilmektedir. Materyalin, ağıza yerleştirildikten sonraki kısa zaman diliminde daha toksik olması beklenir. Ancak bu kısa zaman, restoratif materyalin doku hasarı oluşturması için yeterli değildir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra da ağız sıvılarının çözücü etkisiyle ve fiziksel kuvvetlerin koroziv ürünü olarak materyalden potansiyel toksik partiküllerin salınımı devam etmektedir.^{127,142,155}

Metal alaşımlardan biyolojik ortama elemental salınım aylarca devam edebilmektedir. Dental materyaller ağızda çok uzun süre kaldığından uzun süreli salınımın testleri, kısa süreli protokollere göre klinik tabloyu daha iyi yansıtmaktadır. Elemental salınımın dental alaşımların biyoyumluluğu ile olan ilgisi, bu konuyu dental alaşımların uzun dönem biyolojik etkileri üzerinde önemli kılmaktadır.^{140,146,147}

2.6 Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek tek ayrıştırılmasına ve bir besiyeri yardımıyla kültür kaplarında doku bağlantısı olmadan in vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü denilmektedir.¹⁵⁶

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilir olmaları, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi, materyale karşı gelişen spesifik cevabı belirleyebilmelerinden dolayı tercih edilmektedir. Aynı zamanda deneylerde kullanılacak hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı da tercih

edilmektedir.^{133,134} Buna karşın hücre kültürü testleri ile materyallerin sadece ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksisite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir.¹³⁴

İn vitro hücreler, in vivo dokulara göre toksik materyale karşı genelde daha hassastır. Bu nedenle, in vitro testlerde toksik olarak tanımlanan bir materyal, in vivo şartlarda toksik olmayabilir. İn vivo şartlarda materyalden salınan korozyon veya aşınma ürünleri, dokuda koruyucu reaktif bir süreci tetikleyebilmektedir.¹³⁴

2.6.1 Hücre Kültürlerinin Tarihçesi

Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllara dek uzanmaktadır. 1885'te Wilhelm Roux, tavuk embriyosunun meduller tabakasını alarak ılık salin solüsyonu içinde günlerce canlı tutarak doku kültürünün temellerini atmıştır. 1887 yılında Arnold kurbağalara kemik iliği fragmanları implante etmiş, 1898'de Ljungren insan derisini in vitro koşullarda bir-iki gün yaşatabilmiştir. 1903 yılında Jolly, semenderlerden bir ay boyunca aşılı damlalar şeklinde lökosit elde ederek, in vitro koşullarda hücre bölünmesi ve yaşamı ile ilgili ilk detaylı gözlemleri yapmıştır. Bu çalışma üç yıl sonra 1906 yılında, Ewing ve Bebe tarafından takip edilmiş ve doku kültürü kavramına ilk gerçek teşebbüsü oluşturmuştur.^{157,158}

1913 yılında Burrows ve Carrell, hayvan hücrelerinin aseptik koşullar altında düzenli beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre büyüebileceğini göstermişlerdir. Çeşitli sentetik malzemelerin toksisitelerinin in vitro tekniklerle araştırılmaya başlanması, 1926 yılında doku kültürü yönteminin ilk kez tanımlanmasından yaklaşık 30 yıl sonra gerçekleşmiştir. 1952'de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (HeLa) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları

arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü vasatları hazırlanmıştır.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Kawahara ve arkadaşları¹⁶⁰ 1968 yılında tek tabakalı L929 hücre kültürlerini kullanarak metal alaşımları, siman ve farklı kanal dolgu malzemeleri gibi birçok dental materyallerin sitotoksik etkilerini incelemiştir.

1982'de kompozit rezinlerin fibroblast ve makrofajlar üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirtilmiştir. 1990'da tavşan primer pulpa fibroblast kültürü kullanılarak cam iyonomer simanların toksik etki oluşturabildikleri bildirilmiştir. Kawahara ve ark.¹⁶⁰ hücrelerin kullanıldığı in vitro metodların, kontrol edilebilir ve yüksek istatistiksel bilgi verdiğini bildirerek klinik kullanımdan önce dental malzemelerin analitik - biyolojik cevaplarının in vitro çalışmalarla belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. 1981'de ilk kez Schmalz¹⁶¹ tarafından agar overlay tekniği dental materyallerin sitotoksitesini test etmek için kullanılmıştır.

Hücre kültürleri, son zamanlarda spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak fertilizasyon, yapay organ ve toksikoloji gibi farklı alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır.

2.6.2 Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

Hücre kültürlerinin günümüzdeki yaygın kullanım alanları şu şekilde özetlenebilir:^{133,159}

1. Viral aşı üretimi ve viral teşhis amaçlı
2. Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi
3. İnterferon üretimi

4. Enzim üretimi
5. İnsekt aşı üretimi
6. İnterlökin üretimi
7. Hormon üretimi (İnsülin)
8. Büyüme faktörlerinin üretimi

Hücre kültürlerinin yeni kullanım alanları ise şöyle sıralanabilir:

- 1- Somatik gen tedavisi
- 2- Tümör aşıları
- 3- Canlı hücrelerin greft amaçlı kullanılması
 - Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
 - Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
 - Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
 - Organizma dışında hücre modifikasyonu
- 4- Kompleks üç boyutlu dokular
 - Yapay deri
 - Yapay kıkırdak
 - Yapay karaciğer
 - Yapay pankreas

2.6.3 Hücre Kültürlerinin Avantajları

1. Hücre kültürü ortamında çevresel ve fizyolojik koşullar kontrol altında tutulabilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda stabil ortam oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.

2. Örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelmektedirler. Hücrelerin homojenitesi, sonuçların homojenitesi açısından önem taşımaktadır.

3. Hücre kültürleri ekonomiktir. İn vivo sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak % 10'una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90'lara çıkabilmektedir.

4. Son yıllarda geliştirilen tekniklerle, hücre kültürleriyle endüstriyel amaçlı ürünler elde edilebilmektedir.^{133,135}

2.6.4 Hücre Kültürlerinin Dezavantajları

1. Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani primer hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.

2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.

3. Deneyim çok önemli bir faktördür. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.

4. Hücre kültürü ekipmanları son derece pahalıdır. Buna rağmen elde edilen sonuçların saf olması önemli bir avantajdır. Son yıllarda gelişen teknoloji sayesinde kullanılan malzemeler geliştirilmiş ve giderek ucuzlamıştır.^{53,55,64}

2.6.5 Hücre Kültürü Teknikleri

Farklı dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç grupta toplanır:¹³⁵

1. Primer hücre kültürleri,
2. Diploid hücre kültürleri
3. Devamlı hücre kültürleri

2.6.5.1 Primer Hücre Kültürleri

Orijinal dokudan yeni izole edilen kültürler ilk pasajlamaya kadar primer kültür olarak bilinir. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücrelerin genotipi ve fenotipi, orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri taşımaktadır.^{133,162} Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme subkültür adı verilmektedir. Yeni üretilen hücre kültürleri aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre hatlarını oluşturmaktadırlar. Primer kültürler, toksik maddeye karşı daha hassastır. Kültür şartlarında orijinalliklerini kaybetmeleri ve homojen olmamaları, en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır.^{135,163}

Odontoblast ve pulpal fibroblast hücrelerinin primer kültürlerinin, toksisite deneylerinde kullanılmasının klinik durumu daha iyi yansıtacağı düşünülmektedir. Ancak bu hücreler dentinden izole edilir edilmez kültüre edilmeye müsait değildir.

Primer hücre kültürünün ardından pasajlanarak devamlı hücre hatlarına dönüştürüldüklerinde ise dokudan bağımsız gelişen mitotik aktivite sonucu orijinal hücre fenotipinden farklı bir yapı oluşmaktadır.^{121,131,163}

2.6.5.2 Diploid Hücre Kültürleri

Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılmasından elde edilmektedirler. Bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipinin en az % 75'ini korumalıdır. Primer kültürlere göre homojen olmaları, standardize edilebilmeleri ve tekrarlanabilmeleri yönüyle avantajlıdır.^{133,135}

2.6.5.3 Devamlı Hücre Kültürleri

Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Herhangi bir kültürün, devamlı doku kültürü olabilmesi için en az 70 kere subkültürünün yapılması gerekmektedir. Bu hücreler, sürekli transformasyona uğramaları nedeniyle fizyolojik özelliklerini koruyamamaktadırlar. Devamlı hücre hatları, standart kültür örnekleri olarak embriyonik veya kanserli dokulardan kodlanarak kullanıma sunulmuştur.^{133,135}

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde primer hücrelerin devamlı hücrelere oranla daha etkili oldukları bilinmektedir.^{134,135} Bununla birlikte, primer ve devamlı hücre kültürlerinin sitotoksik maddeye verdikleri metabolik cevaplar arasında bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Devamlı hücre kültürleri, genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonu daha kolaydır.^{135,163}

Dental materyallerin toksisitelerinin değerlendirilmesinde primer, sekonder ve devamlı hücre kültürleri kullanılmaktadır.^{132,164-167}

2.6.6 Hücre Kültürü Test Yöntemleri

Hücre kültürleri yaklaşık olarak 30 yıldır dental materyallerin toksisitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Metodolojinin geliştirilmesi, ayrıntılı orijinal çalışmalar üzerine ya da mevcut çalışmaların modifiye edilmesi temeline dayandırılmıştır. Bu testlerin yapılabilmesi için hücre kültürleri konusunda tecrübeli bir ekibe ve donanımlı bir hücre kültürü laboratuvarına ihtiyaç vardır.¹³²

Diş hekimliği materyallerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılan hücre kültürü test yöntemlerinin çoğu ilaçların sitotoksitesinin değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerden uyarlanmıştır. Ancak ilaçların çoğu farklı sıvılarda kolayca çözünebilirken dental materyaller düşük çözünebilirlik değerlerine sahiptir. Bu nedenle diş hekimliğinde yapılan hücre kültürü çalışmaları, hem kurulan metodlarda hem de değerlendirme ölçütlerinde köklü teknik düzenlemelerin yapılmasını zorunlu kılmaktadır.¹³²

Diş hekimliği malzemelerinin sitotoksite testlerinde en sık ve standart olarak kullanılan fibroblast hücre kültürleri, L929 ve Balb/c3T3 devamlı hücre kültür hatlarıdır.^{128,129,156} Bu hücre hatları, homojen morfolojileri ve büyüme özelliklerinden dolayı tekrarlanabilme özelliğine sahiptirler.¹²⁶

Sitotoksite testleri, ilk 72-168 saat içerisinde toksik madde ile temasa bağlı olarak oluşan sınırlı etkileri belirleyebilir. Konak hücreler ya iyileşirler ya da kimyasal ve fiziksel yaralanmaya bağlı olarak ölürlür. Buna karşın in vivo biyolojik reaksiyonların çoğu basit bir sitotoksite değildir ve 24 saat boyunca yayılarak, enflamatuar ve immun reaksiyonlar oluştururlar.¹²⁸ Bu nedenle malzemeye karşı gelişen öncül tepkiler belirlendikten sonra malzemenin uzun dönem kullanımı sonrasında

oluşacak enflamasyon, immun cevaplar, mutagenез ve karsinogenез gibi subakut toksisite değerlerini yansıtan ikincil testler denenmelidir.¹

Tıbbi malzeme ve materyallerin değerlendirilmesinde kullanılan toksisite testleri hem toksisitenin hem de toksisite mekanizmasının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Toksisite testleriyle materyalin toksik olup olmadığı araştırılır. Bu tip testler hızlı, basit ve genel geçerliliği olan ancak materyalin son kullanımı hakkında belirleyici olmayan testlerdir. Eğer materyalin toksisite mekanizması çalışılmak isteniyorsa bu durumda ilave testler uygulanmalıdır. Materyalin son kullanımıyla ilgili olan bu testler, materyalin uyumluluk derecesi hakkında da bilgi sağlarlar. Böylece materyalin fayda/zarar oranı tespit edilmektedir.¹³⁴

Bileşiklerin sitotoksitesinin ölçümünde birçok çalışma, maddedeki tek bir içerik üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, klinik materyaller birçok farklı elemanın kombinasyonundan veya toz/likit karışımından oluşmaktadırlar.¹³² Wataha ve arkadaşları¹⁶⁸ bu kombinasyonların 3 farklı etki yaratabileceğini göstermişlerdir:

- İlave etki (her bileşiğin etkisini normal olarak göstermesi),
- Sinerjistik etki (her bileşiğin etkisinin toplamından daha fazla toksik etki görülmesi),
- Antagonistik etki (her bileşiğin etkisinin toplamından daha az toksik etki görülmesi).

Hücre kültürleri kullanılarak dental malzemelerin biyolojik uyumlarının belirlenmesi amacıyla çok sayıda in vitro test yöntemi kullanılmaktadır. İn vitro sitotoksisite testleri için genel kurallar ISO 10993-5 nolu standartta, detaylı test

protokolleri ise ISO 7405 nolu standartta açıklanmıştır. İn vitro sitotoksisite tayininde kullanılması önerilen yöntemler; doğrudan temas veya özüt testleri, agar difüzyon testi, milipore filtre testi ve dentin bariyer testlerdir.^{121,122,125,126}

2.6.6.1 Doğrudan Temas Veya Özüt İle Hücre Kültür Testleri

Test yöntemi, dental materyalin veya materyalden elde edilen özütün direkt olarak tek katmanlı hücre kültürü üzerine konulduğunda oluşan toksik etkinin kısa süreli ölçülmesine dayanır. Doz-cevap eğrisiyle doğrudan temas testinde, materyalin hem kimyasal hem de geometrik şeklinden kaynaklanan toksik cevap, özüt testlerinde ise yalnızca kimyasal toksik cevap belirlenmektedir.^{121,134}

İN vitro biyoyumluluk testleri ile yapılan çalışmalarda birçok farklı örnek boyutu kullanılmıştır. ISO'nun in vitro sitotoksisite testlerini düzenleyen 10993-5¹²⁹ numaralı spesifikasyonuna göre test edilecek katı materyallerin en az bir düz yüzeye sahip olması gerekmektedir.

Sitotoksisite ve dental alaşımlardan salınan elemental ürünler, in vitro testlerle kısa süreli test protokolüyle ölçülmektedir. Sitotoksisite, bazı hücrel fonksiyonların değerlendirilmesiyle, elemental salınım ise atomik absorpsiyon spektroskopisi yöntemiyle ölçülmektedir.^{121,137}

2.6.6.2 Bariyer Testleri

Kullanılan restoratif materyallerden birçoğunun hücrelerle direkt temasta olmaması nedeniyle doğrudan temas testlerinin klinik durumu tam olarak yansıtamayacağı düşünülmekte ve bu durum, doğrudan temas testlerinin en büyük dezavantajı olarak görülmektedir.¹³² Pulpal hücrelerle materyal arasında normalde dentin bariyeri bulunmaktadır. Bariyer test metodları, çözünmeyen fakat materyalin

toksik elemanlarının difüzyon kapasitesine bağlı olarak dentin tübüllerinden geçebilmesini taklit eden dentin benzeri bariyer sistemlerini kullanmaktadır.¹²¹

Materyalin toksik tehlikesinin in vitro tespitine olanak sağlayan ve in vivo sisteme genellenebilen böyle basit bir test stratejisi, bir dereceye kadar başarılıdır.¹²¹

2.6.6.2.1 Agar Difüzyon Testi:

Katı malzemelerin ve katı malzemelerden sızan komponentlerin ya da filtre kâğıdına emdirilmiş sıvı örneklerin akut sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanılır. Test materyali, nötral red ile boyanmış tek tabakalı L929 fibroblast hücrelerin üzerine kaplayan agar tabakasının üzerine yüzeye temasta olacak şekilde yerleştirilir. 24 saat inkübe edilir. Besinler, gaz ve çözülebilen toksik maddeler agar içine difüze olabilirler. Toksik cevabın oluştuğu bölgede renk kaybı oluşur. Renk kaybı olan alandaki ölü hücrelerin kültür kabındaki canlı hücrelere oranı lizis indeksini (1-5) vermektedir. Materyalin sitotoksik cevabı bu lizis indeksi ile ölçülür. Agar içinde çözünmeyen veya agardan difüze olamayan materyaller hücrel hasar oluşturmayacağından bu materyallerin toksik cevabı bu yöntemle belirlenememektedir.^{121,123,132,144,156,161,136,169}

2.6.6.2.2 Milipore Filtre Testi:

Hücre kültürleri ile ilgili en önemli soru işaretlerinden birisi direkt materyal-hücre temasıdır. Bu teknikte materyal ile hücre teması aradaki filtre yardımıyla indirekt hale gelmekte ve böylelikle klinik duruma biraz daha yaklaşılmaktadır. L929 veya HeLa hücre tipleri bu yöntemde en çok kullanılan hücre hatlarıdır. Selüloz esterlerinden yapılmış 0.45 µm filtre üzerine tek tabaka hücre yapışması sağlanır. Daha sonra hücre kültür ortamı % 1 agar içeren ortam ile değiştirilir ve bu ortamın hücreler üzerinde jel haline gelmesi beklenir. Son olarak filtre - hücre tabakası – agar üçlüsü ters çevrilerek

filtrenin üstte kalması sağlanır. Katı veya çözünebilen test örneği filtre üzerine yerleştirilerek belirlenen test süresi boyunca beklenir. Örnekler alındıktan sonra filtre kaldırılır ve örneğin hücre aktivitesi üzerindeki etkisi herhangi bir test yardımıyla belirlenir.^{121,123,130,132,144,156}

2.6.6.2.3 Dentin Bariyer Testi

Dentin bariyer testlerinin geliştirilmesinin temelinde, toksik olaylara karşı dentinin koruyucu etkilerinin gösterilmesi yatmaktadır. Henüz gelişim aşamasında bulunan dentin bariyer testlerinin en önemli dezavantajları test sistemlerinin oturmamış olması ve dentin kesitlerinin standardizasyonundaki güçlüklerdir.^{128,170-172} Bu problemleri aşabilmek ve testin uygulanabilirliğini arttırmak amacıyla dentin bariyer testleri için yeni düzeneklerin geliştirilmesi süreci devam etmektedir.^{121,173-176}

Dentin bariyer testlerinde sitotoksisite değerlendirmeleri belirlenen inkübasyon süreleri sonunda, canlı hücre sayımı veya MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ile enzim aktivitesindeki değişikliklere göre yapılmaktadır.^{158,173,175}

2.6.6.3 Sitotoksisite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Geçmiş yıllarda hücre canlılığı ve büyümesiyle ilgili birçok yöntem geliştirilmiştir.¹⁷⁷ Ancak en güvenilir ve kullanışlı yöntemler, çok gözlü mikropatelerin bulunmasından sonra geliştirilmiştir. Bu sayede birçok örneğin kısa sürede, hızlı ve güvenilir biçimde değerlendirilmesi sağlanmıştır. Kolorimetri ve florasan esasına dayanan sistemler, ELISA veya mikrotiterplate okuyucuları sayesinde örneklerin çok gözlü hücre kültür kaplarından doğrudan okunmasına izin vermektedir.^{178,179}

Hücre kültürleri kullanılarak hücresel fonksiyonlarda materyalin neden olduğu bazı değişimler değerlendirilmektedir. Toksikite tespit aşamasında tüm hücre tiplerinde ortak olarak değerlendirilen fonksiyonlar ve değerlendirme yöntemleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.^{121,122,129,132-134,180}

Tablo 2.14: Hücre kültürleri ile değerlendirilen hücresel fonksiyonlar ve test yöntemleri

Fonksiyon	Test
Enzim aktivitesi	<ul style="list-style-type: none"> • MTT testi, • Alamar mavisi
Hücre canlılığı	<ul style="list-style-type: none"> • Nötral kırmızı uptake, • Propidium iodide boyaması
Hücre büyümesi	<ul style="list-style-type: none"> • Hücre sayımı, kristal violet veya amidoblack boyaması, • Total protein değerlendirmesi • DNA değerlendirmesi • H-TDR uptake

2.6.6.3.1 Biyosentez veya Enzimatik Aktivite Testleri:

DNA sentezi ya da protein sentezi ölçümleri bu test türünün yaygın örnekleridir. DNA veya protein sentezi analizleri genellikle, hücre kültür ortamına işaretleyici radyoizotop ilave edilmesini takiben DNA veya protein ile birleşip birleşmediği değerlendirilir. Sitotoksisitenin 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.^{178,180-186} Optik yoğunluk ölçülerek formazan oluşumu saptanabilir. Alternatif olarak test örneği çevresindeki formazan, ışık veya elektron mikroskopuyla belirlenebilir.^{133,144,187}

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^+ 'nın indirgenme reaksiyonlarında görev almaktadır. Sonuç, kolorimetrik ölçüm yöntemleriyle değerlendirilmektedir.^{178,184,188}

2.6.6.3.2 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_2CrO_4 '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.^{121,123,132,133,135,178,179,182,186}

2.6.6.3.3 Hücre Sayısı ve Büyüme Testleri:

Malzeme ile temas sonrasında hücre sayısının veya büyümesinin ölçülmesi ile sitotoksiteyi belirler.¹³⁵ 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.^{135,179}

Sitotoksosite değerlendirmesinde kullanılan bazı boyalar ve değerlendirme kriterleri Tablo 2.15’de özetlenmiştir.¹⁸⁶

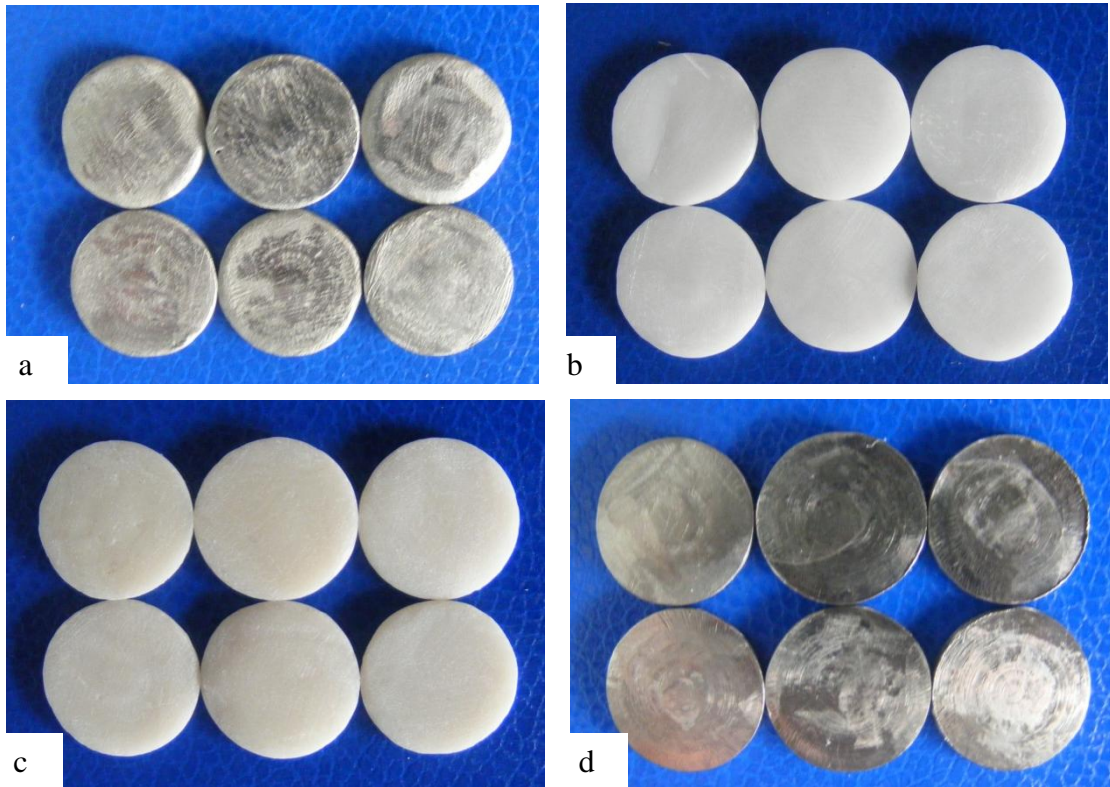
Tablo 2.15: Sitotoksosite değerlendirmesinde kullanılan bazı boyalar ve kriterler

Değerlendirme	Ölçüm kriteri	Toksosite tipi değerlendirmesi
Nötral kırmızı	Aktif endositoz, canlı lizozomdaki emilen boyayı ölçer.	Hücre sayısı ve canlılığı değerlendirilir.
MTT	Mitokondrial dehidrogenaz aktivitesini ölçer	Hücre sayısı ve canlılığını değerlendirilir.
XTT	Mitokondrial dehidrogenaz aktivitesini ölçerek canlılığı değerlendirir.	Hücre sayısı ve canlılığını değerlendirilir.
Kenasid mavisi	Boya emilimini ölçerek hücredeki total proteini tespit eder.	Hücrelerin emdiği boya miktarındaki değişime göre toplam hücre sayısı değerlendirilir.
Asit fosfataz	Hücre-zar asit fosfataz aktivitesiyle hücre kitlesini ölçer.	Direkt hücre hasarı ölçülür.
LDH	Hücre zarı geçirgenliğini ölçer.	Hücre plazma zarı hasarı ölçülür.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, günümüzde sabit protetik restorasyonlarda yaygın olarak kullanılmakta olan dört farklı materyalin zamana bağlı sitotoksik etkileri araştırıldı. Bu amaç için in vitro sitotoksikite testlerinden direkt temas test yöntemi ve hücre canlılığını ölçen nötral kırmızı boyası kullanıldı.

Çalışmada kullanılan restoratif materyaller Şekil 3.1’de, içerik ve üretici firma bilgileri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Sitotoksik etkileri araştırılan materyaller. a) Co-Cr b) Zirkonyum c) Empress 2 d) CpTi

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyallerin içerik ve üretici firma bilgileri

TİCARİ ADI	ÜRETİCİ FİRMA	MATERYAL	İÇERİK	ÜRETİM YÖNTEMİ	LOT NO
MAGNUM CERAMİC Co	MESA	Co-Cr	Co: %64 Cr: %21 Mo: %6 Diğer: W, Si, Fe, Mn	Mum Atımı ve Döküm	P0677CC
HINT-ELs TITAN	HINT-ELs	CpTi	%99 Titanyum	CAD-CAM	000920075 0002
EMPRESS 2	IVOCLAR VIVADENT	Lityum Disilikat İle Güçlendirilmiş Seramik	Seramik ingot: > %99 SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , La ₂ O ₃ , MgO, ZnO, K ₂ O, Li ₂ O, P ₂ O ₅ < %1 Pigment	Isı-Basınç	MM0040
ZIRCON ZAHN	ZIRCON ZAHN s.r.l.	Y-TZP blok (green-stage/yeşil aşama)	Y ₂ O ₃ : % 4.95-5.26 Al ₂ O ₃ : % 0.15-0.35 SiO ₂ : max 0.02 Fe ₂ O ₃ : max 0.01	Manuel Dizayn Bilgisayarlı Üretim	590028

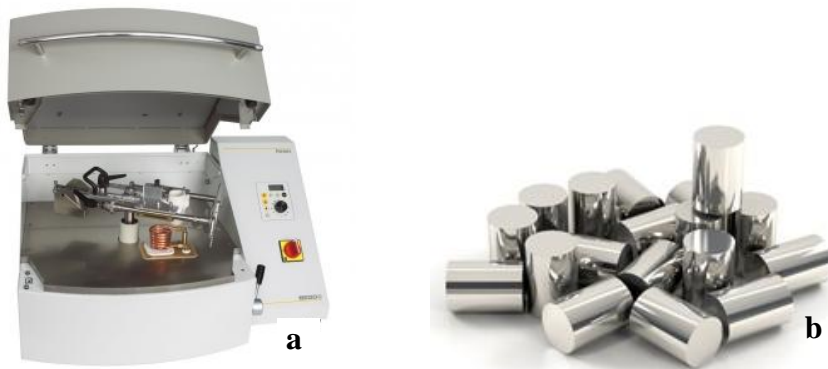
3.1 Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada, ISO yönergeleri^{122,129} ve yapılan çalışmalar¹³⁶ göz önünde bulundurularak 1,5 mm kalınlıkta ve 15 mm çapındaki örnekler kullanılmıştır. Bu

boyutların seçilmesinde, örneklerin hücre kültürü çalışmasında kullanılan 24 gözlü hücre kültür kabının (well plate) taban alanını maksimum düzeyde kaplaması ve maksimum hücre temas yüzeyi elde edilmesi amacı güdülmüştür. Herbir materyal kendi üretici firmasının yönergelerine uygun olarak hazırlanmıştır.

3.1.1 Co-Cr Örneklerin Hazırlanması

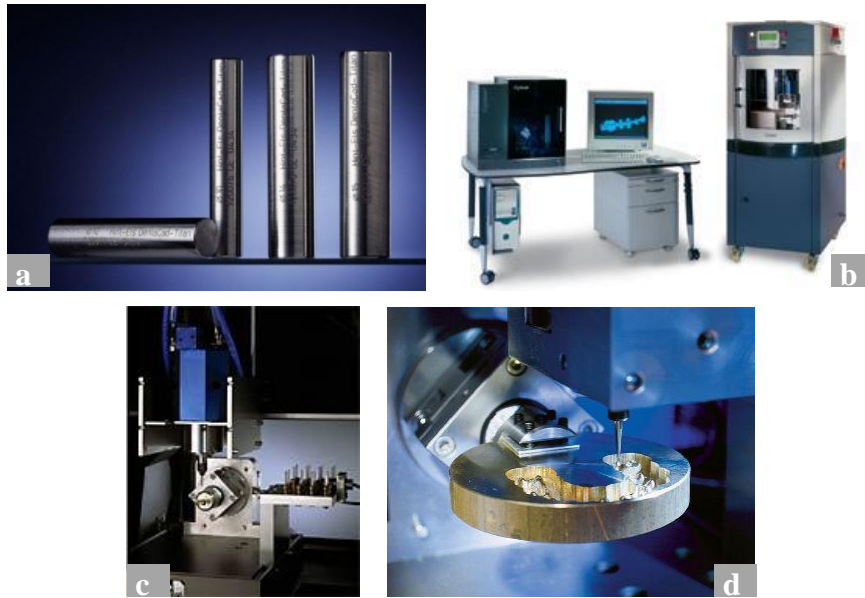
Örnek boyutlarında hazırlanmış mum modelaj rövetmana (SHERA Werkstoff-Technologie GmbH & Co. KG, Germany) alındı. 20 dakika rövetmanın sertleşmesi beklendikten sonra manşet 500°C'deki döküm fırınına (Ugin Dentaire, Seyssins, France) alındı. Döküm fırınının sıcaklığı 900°C'ye ulaştıktan sonra manşetin tamamen ısınması için 1 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda manşet elektrik rezistanslı otomatik indüksiyonlu döküm makinesine (Bego Fornax T, Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) alındı (Şekil 3.2). Döküm potasındaki Co-Cr metal ingot (Magnum, Mesa di Sala Giacomo & C, Brescia, Italia) eridikten sonra döküm yapıldı (Şekil 3.2). 1 saat manşetin tamamen soğuması beklendikten sonra tijler kesildi ve Al₂O₃ (110µm, YETI Dentalprodukte GmbH, Engen, Germany) ile kumlama yapıldı. Kumlanan örneklere başka herhangi bir yüzey işlemi uygulanmadı.



Şekil 3.2: a) Elektrik rezistanslı indüksiyonlu döküm cihazı b) Co-Cr metal ingotlar

3.1.2 Titanyum Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada prefabrik Hint-ELs titan bloklardan (Hint-ELs, Griesheim, Germany) elde edilen örnekler kullanıldı. Örnekler, istenen şekil ve boyutların bilgisayarda (CAD: Computer aided design - bilgisayar destekli tasarım) tasarlanmasından sonra prefabrike grade 2 saf titanyum blokların milling ünitesinde makinelenmesiyle (CAM: Computer aided manufacturing- bilgisayar destekli üretim) elde edildi. Kullanılan grade 2 saf titanyum bloklar ve CAD-CAM sistemi Şekil 3.3'te görülmektedir.

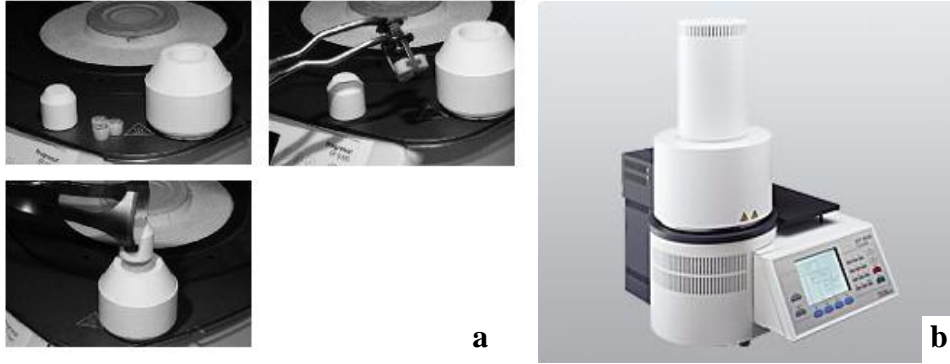


Şekil 3.3: a) Çalışmada kullanılan prefabrike tip 2 CpTi bloklar. b) CAD-CAM sistemi
c) Milling ünitesi d) Prefabrike blokların makinelenmesi

3.1.3 Empress 2 Örneklerin Hazırlanması

İstenen boyutlarda hazırlanan mum örnek, ısı-basınç sistemi için geliştirilmiş özel rövetman (IPS PressVEST Speed, Ivoclar Vivadent AG, Schaan / Liechtenstein) kullanılarak manşete alındı. 30 dakika rövetmanın sertleşmesi beklendikten sonra manşet ön ısıtma fırınında (Ugin Dentaire, Seyssins, France) 850°C'de 45 dakika ısıtılarak mum atımı yapıldı. Bu işlemden sonra manşet presleme fırınına (Ivoclar

EP600 combi, Ivoclar Vivadent AG, Schaan / Liechtenstein) alındı (Şekil 3.4). Empress 2 için geliştirilmiş özel döküm programında, döküm kanalına yerleştirilen hazır Empress 2 blok (IPS One-Way Plunger 300 g, Ivoclar Vivadent AG, Liechtenstein), yumuşatılarak 915 °C'de 20 dakikada manşete gönderildi (Şekil 3.4). Manşetin soğuması için 30 dakika beklendikten sonra Al₂O₃ (YETI Dentalprodukte GmbH, Engen, Germany) ile kuşlama yapılarak tijler kesildi. Empress 2 yüzeylere başka bir bitirme işlemi uygulanmadı.

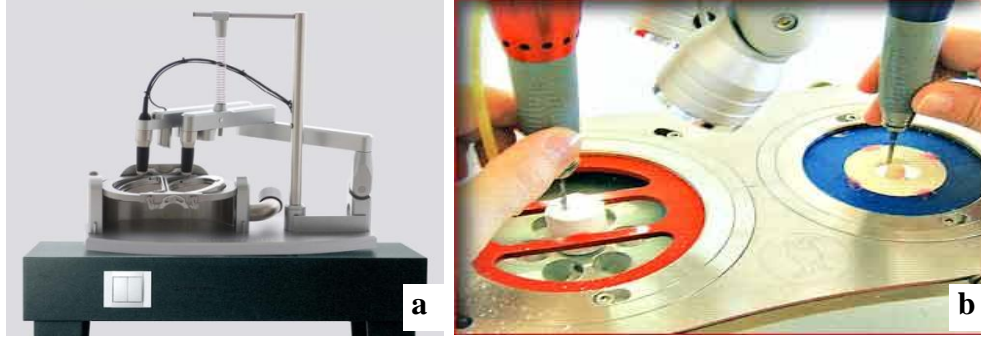


Şekil 3.4: a) Empress 2'ye ait manşet sistemi ve hazır ingotlar
b) Empress 2 ısı-basınç sistemine uygun fırın

3.1.4 Zirkonzahn Örneklerin Hazırlanması

Örnek boyutlarında hazırlanan analog model, sisteme ait pantografi cihazına (Zirkograph, Steger, Brunneck, Italy) yerleştirildi (Şekil 3.5). Diğer tarafta firmanın yttrium-stabilize zirkonyum hazır bloğu (Ice Zircon Ceramic, Zirkon Zahn SRL, Steger, Brunneck, Italy) manuel olarak tarama yapan ucun hareketlerini takip eden kullanıcı tarafından milled işleme tabii tutuldu. Analog modelin % 25 daha büyük boyutlusu elde edildi. Elde edilen zirkonyum alt yapı, sinterleme fırınında (Zirkonofen, Steger, Brunneck, Italy) 20 dakika 1500 °C derecede sinterlendi. Sinterleme büzülmesiyle

(% 25) hedef boyuta ulaşıldı. Daha sonra herhangi bir bitirme ve polisaj işlemi uygulanmadı.



Şekil 3.5: a,b) Pantografi Cihazı (Zirkograph, Steger, Brunneck, Italy)

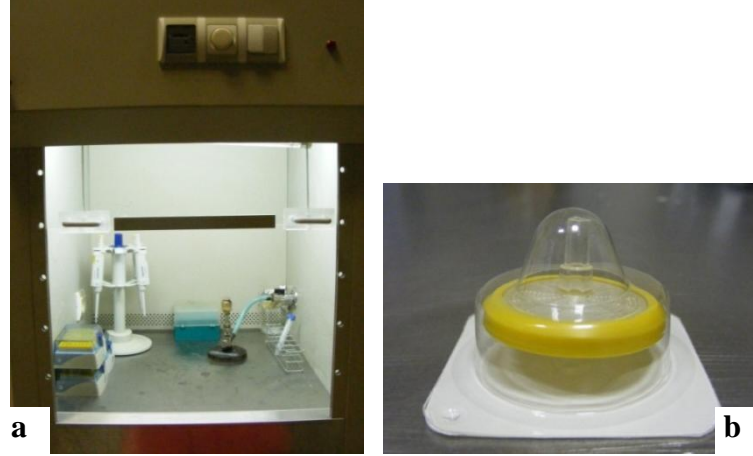
3.2 Yapay Tükürük Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada önceki *in vitro* çalışmada³⁸ kullanılmış olan yapay tükürük solüsyonunun formülasyonu (1.0mL/well; 4.1mM KH_2PO_4 , 4.0mM Na_2HPO_4 , 24.8mM KHCO_3 , 16.5mM NaCl , 0.25mM MgCl_2 , 4.1mM sitrik asit, 2.5mM CaCl_2 , pH 6,7) kullanılmıştır. İlgili formülasyon, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.2.1 Örneklerin Yaşlandırılması

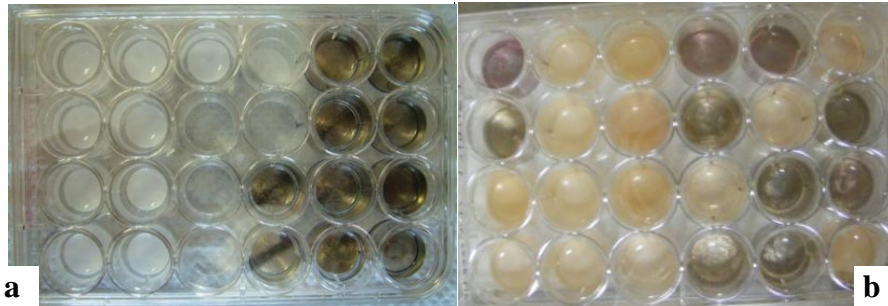
Çalışmada başlangıç ve 15 ile 30 günlük iki yaşlandırma periyodu sonunda üç farklı toksisite testi yapıldı. Yaşlandırma işlemi için yapay tükürük solüsyonu kullanıldı. Deney materyalleri, başlangıç toksisite testinden sonra lastik (Bego, Germany) yardımıyla hafifçe polisajlandı. Bu işlemin ardından yüzey temizliği için örnekler, yumuşak bir diş fırçasıyla (Oral B, Procter&Gamble) sıvı sabun (Evyap, Türkiye) ve distile suyla iki kez yıkandı. Yıkanan materyaller ayrı ayrı poşetlenerek Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Sterilizasyon Ünitesi’nde etilen oksit ile sterilize edildi. Steril deney materyalleri, steril kabin içerisinde steril bir presel yardımıyla her göze tek örnek gelecek şekilde 24 well-plate’ye taşındı. Yapay tükürük solüsyonu,

kullanılmadan önce 20 μ m'lik filtreler (Millipore, Corrigtwohill, Co. Cork, Ireland) yardımıyla steril edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: a) Steril kabin b) 20 μ m'lik filtre

Örneklerin üzerine steril pipetlerle 5'er ml yapay tükürük solüsyonu ilave edildi (Şekil 3.7). İlk yaşlandırma işlemi için 37°C'deki etüvde 15 gün beklendi. Bu süre sonunda ikinci toksisite deneyi yapıldı. İkinci toksisite deneyinin ardından yukarıda anlatılan temizleme ve sterilizasyon işlemleri tekrarlandı ve aynı şartlarda 30 günlük yaşlandırma işlemi yapıldı. Bu son yaşlandırma işleminin ardından da son toksisite deneyi yapıldı.



Şekil 3.7: Materyallerin yapay tükürükte yaşlandırılması, a) 15 günlük b) 30 günlük yaşlandırma sonrası

3.3 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Araştırmada kullanılan L929 fare fibroblast hücre kültürü (L929 An2 Hükük 95030802; Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) Şap Enstitüsü hücre kültür koleksiyonundan (HÜKÜK) sağlandı. Çözünmüş stok olarak alınan hücreler 5 dakika süreyle 800 devirde santrifüj (Herause, Germany) edildi. Santrifüj sonrası yüzeydeki süpernatant kısım atılarak pellet içerisindeki hücreler, içinde %10 fetal sığır serumu-FBS (Biochrom AG, Germany, SO113) ve %1 gentamisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium–DMEM (Hyclone, England, AQF24057) besi ortamı ile 25 cm² hücre kültürü üretme kabı (flask)'na alındı.

7. günün sonunda inverted mikroskop (Olympus CK 40, Japan) ile hücrelerin flask tabanını kaplayıp kaplamadıkları ve sağlıklı bir şekilde üreyip üremedikleri kontrol edildi. Hücreler flask tabanını tamamen kapladıklarında kültür kabındaki besiyeri (medyum) aspire edildi. Divalent katyonları (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) içermeyen fosfat tampon solüsyonu- PBS (pH=7.0) ile hücrelerin yüzeyi yıkanarak kültür ortamındaki hücre atıklarının ve serum artıklarının uzaklaştırılması sağlandı. Böylelikle serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisini inhibe etmesi önlenmiş oldu. Kültür daha sonra tripsin / EDTA-etilendiamin tetraasetik asit (%0.05 / %0.02, Biochrom AG, Germany) solüsyonu ile yıkanarak tripsinize edildi ve 37°C'deki inkübatörde (Heracell, Germany) yaklaşık olarak 5–10 dakika inkübe edildi (Şekil 3.8).



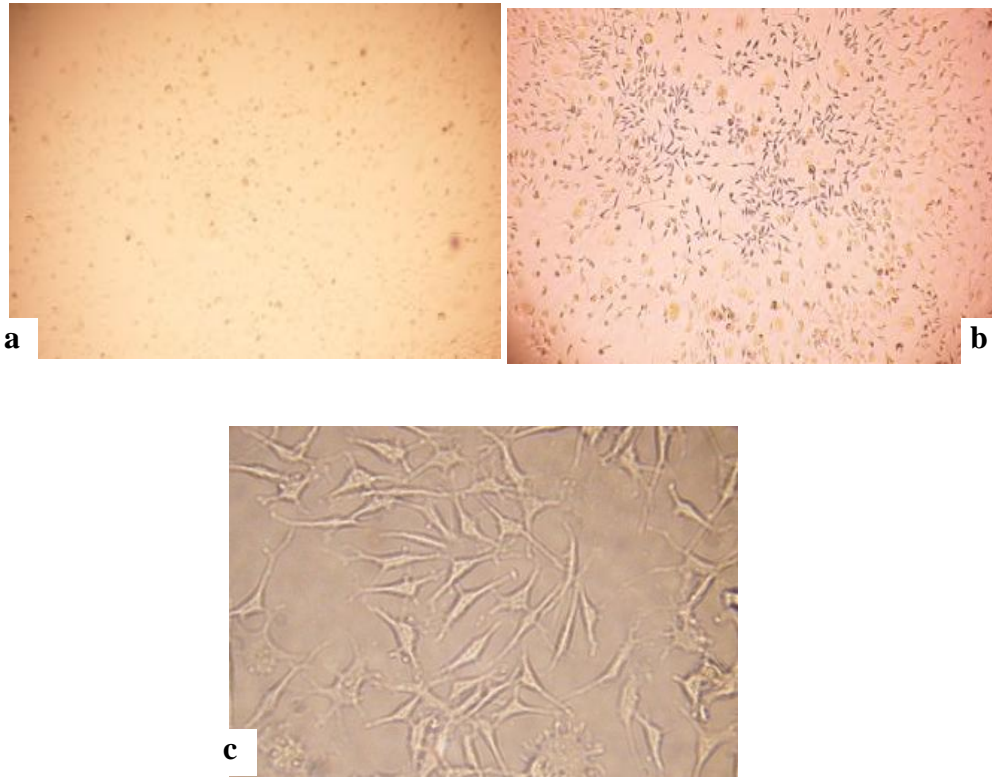
Şekil 3.8: Çalışmada kullanılan % 5 CO₂'li etüv.

Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin flask tabanından ayrıldıkları görüldü. Yüzeyden ayrılan hücrelere % 10 serum içeren yeni medyum ilave edildi ve pipetajla karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle santrifüj edildi (800–1000 rpm). Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pellet içerisindeki hücreler tekrar, 37°C sıcaklıkta, % 10 serum ve % 1 antibiyotikli DMEM medyum ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonu 3 adet flaska bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlandı. Bu şekilde 2 seri pasaj yapıldı.

3.4 24 Well Plate'lerin Hazırlanması

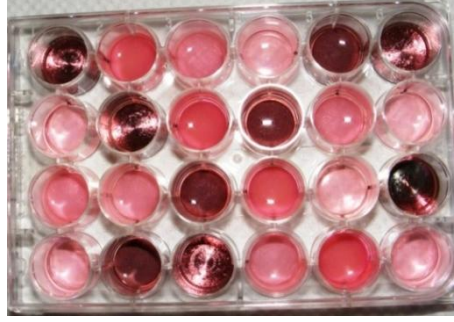
Logaritmik üreme tarzında olan, aktif ve yüzeyi % 90–95 oranında kaplamış hücreler, pasajlama işleminde olduğu gibi flask tabanından ayrıldı ve taze medyum ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Çalışmada kullanılacak olan 24 well plate için her göze 250 µL olacak şekilde hücre süspansiyonu eklendi. Aynı yöntemle iki farklı 24 well plate hazırlandı. 5. günde kültür ortamındaki DMEM medyum aspire edilerek uzaklaştırıldı ve yerine taze medyum ilave edildikten sonra tekrar 37°C'deki % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

% 5 CO₂'li ve 37°C'de nemli ısıdaki 7 günlük inkübasyon süresi sonunda hazırlanan her iki 24 well platede de hücrelerin tüm wellerin tabanını tamamen doldurup doldurmadığı inverted mikroskop ile kontrol edildi. Şekil 3.9'da deney öncesinde hücrelerin gözleri tamamen doldurduğu ve fibroblast hücrelerinin karakteristik iğsi yapısı ışık mikroskopunda görülmektedir.



Şekil 3.9: Deney öncesinde kültür. a) x10 büyütme b) x40 büyütme c) x100 büyütme

Örnekler daha sonra steril bir presel yardımıyla steril kabin içerisinde teker teker ve rastgele olarak hücrelerle doğrudan temas edecek şekilde 24 well plate'ye taşındı (Şekil 3.10). 37°C'deki % 5 CO₂'li inkübatörde 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda nötral red ile vitalite testi uygulandı. Bu işlemlerin tamamı başlangıç, 15 gün ve 30 günlük yaşlandırma işlemlerinden sonraki her toksisite testi için ayrı ayrı uygulandı.



Şekil 3.10: Materyaller ile hücreler arasında doğrudan temas.

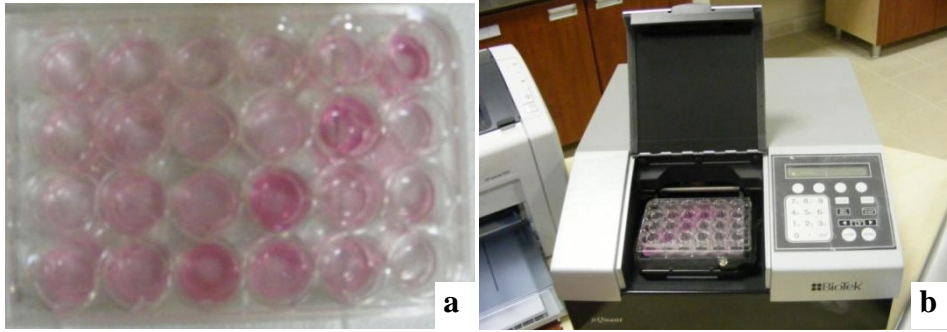
3.5 Nötral Red Boyasının Hazırlanması ve Canlılık Değerlerinin Okunması

37°C’de, % 5 CO₂’li etüvde 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda toksisite testine geçildi. İlk olarak, 24 well-plate ters çevrilerek materyaller ve medyum kültürden uzaklaştırıldı. 1,2ml nötral red boyası (Sigma Aldrich, Germany), 78,8 Hank’s Balanced Salt Solüsyonu (HBSS)’na (Sigma Aldrich, Germany) eklendikten sonra 2600 rpm’de 5 dk süreyle santrifüj (EBA21, Hettich, Germany) edilerek homojenizasyon sağlandı. Ardından hazırlanan solüsyon 37°C’de 10 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Her göze, hazırlanan nötral red solüsyonundan mikropipetler (Eppendorf Research) yardımıyla 300µl ilave edildi ve 24 well-plate 2,5 saat süreyle 37°C’deki % 5 CO₂’li etüvde bekletildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Nötral red ilave edilmiş hücre kültürleri.

Üstte kalan sıvı alındıktan sonra her göz, önce 300 µl % 1'lik formik asitle (Merck KGaA, Germany) sonra da 300µl % 1'lik asetik asitle (Merck KGaA, Germany) yıkandı. Bu yıkama işleminin ardından absorbands, spektrofotometrede (µ Quant, Biotek) 550nm dalga boyunda ölçüldü (Şekil 3.12). Kontrol grubuna bağımlı % değerler, bağıl değerlendirme için kullanıldı.



Şekil 3.12: Vitalite değerlerinin okunması a) Spektrofotometrede okunmaya hazır 24 well-plate b) 24 well-platenin spektrofotometrede okunması

3.6 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler SPSS 11.5 paket programıyla değerlendirildi. Veriler, sayı, yüzde ortalama ve standart sapma olarak verildi. Başlangıç, 15. gün ve 30. günlerde yapılan deneyler için, grup içi karşılaştırmalar spektrofotometre değerleri kullanılarak varyans analizi ve post-hoc Sheffe testleri ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar, elde edilen basit yüzde oranları kullanılarak Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İkili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bütün karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ alındı.

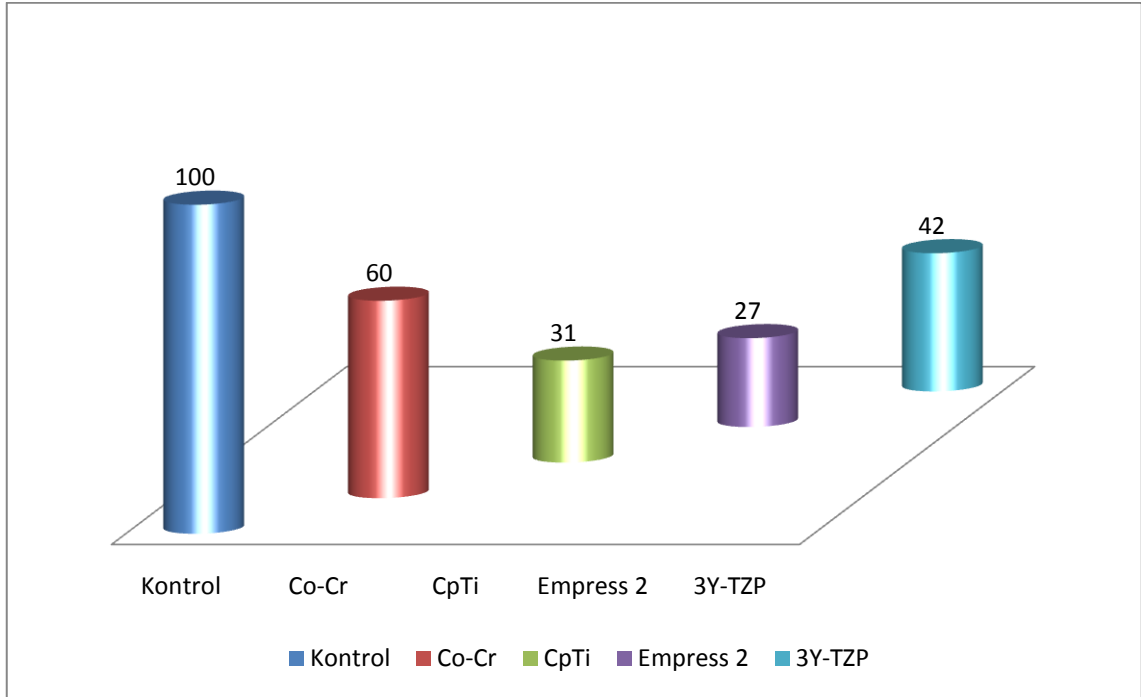
4 BULGULAR

Başlangıç deneyine ait spektrofotometrik canlılık değerleri ile bunlara ait basit yüzde oranları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Tüm deneylerde, herhangi bir materyale maruz kalmamış hücre gözleri negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Materyallerin L929 hücrelerinde oluşturduğu canlılık değerleri, kontrol grubuyla karşılaştırılarak toksik cevap araştırılmıştır.

Tablo 4.1: Başlangıç deneyine ait spektrofotometre değerleri ve basit % oranları

n	Kontrol	Co-Cr	CpTi	Empress 2	3Y-TZP
1	0,200	0,107	0,068	0,051	0,086
2	0,196	0,121	0,057	0,054	0,071
3	0,210	0,128	0,060	0,059	0,094
4	0,190	0,109	0,058	0,053	0,089
5	0,197	0,117	0,074	0,053	0,081
6	0,203	0,123	0,061	0,049	0,081
Ortalama	0,199	0,118	0,063	0,053	0,084
%	100	60	31	27	42

Başlangıç deneyinde kontrol grubundaki L929 hücrelerinde oluşan ortalama canlılık değeri, oran olarak % 100 kabul edilmiş ve deney materyallerinin oluşturduğu değerler buna göre yüzdelik oranlara dönüştürülerek canlılık grafiklerinde ve üç deneyin birbiriyle karşılaştırılmasında kullanılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Başlangıç deneyine ait hücre canlılık sonuçları (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir).

Başlangıç deneyine ait hücre canlılık oranlarına bakıldığında, en yüksek değer (% 60) Co-Cr örneklere, en düşük değer ise Empress 2 (% 27) örneklere ait olduğu görülmektedir. CpTi, Empress 2 ve 3Y-TZP örneklerin oluşturduğu hücre canlılık değerleri birbirine yakındır ancak bu değerler, Co-Cr örneklere göre oldukça düşüktür. Başlangıç toksisite deneyinde hücre canlılık değerleri, çoktan aza doğru, **Kontrol>Co-Cr>3Y-TZP>CpTi>Empress 2** şeklinde sıralanmıştır. Toksikite sıralaması, ise tam ters yönde oluşmaktadır.

Tek yönlü varyans analizinde (ANOVA), başlangıç deneyinde farklı materyallerin toksisiteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Tablo 4.2).

Post Hoc Scheffe testi sonuçlarına göre, CpTi ile Empress 2 örneklerin oluşturduğu hücre canlılık değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu ikili grup

dışında tüm ikili karşılaştırmalarda grupların hücre canlılık değerleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.2: Başlangıç, 15 ve 30. günlerde yapılan deneylerin one-way anova test sonuçları.

GRUP		Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F	Sig. ($p<0,05$)
Başlangıç	Gruplar arası	,084	4	,021	451,260	,000
	Gruplar içi	,001	25	,000		
	Toplam	,085	29			
15.Gün	Gruplar arası	,014	4	,003	54,379	,000
	Gruplar içi	,002	25	,000		
	Toplam	,015	29			
30. Gün	Gruplar arası	,153	4	,038	267,659	,000
	Gruplar içi	,004	25	,000		
	Toplam	,157	29			

Tablo 4.3: Başlangıç deneyine ait post Hoc Scheffe test sonuçları

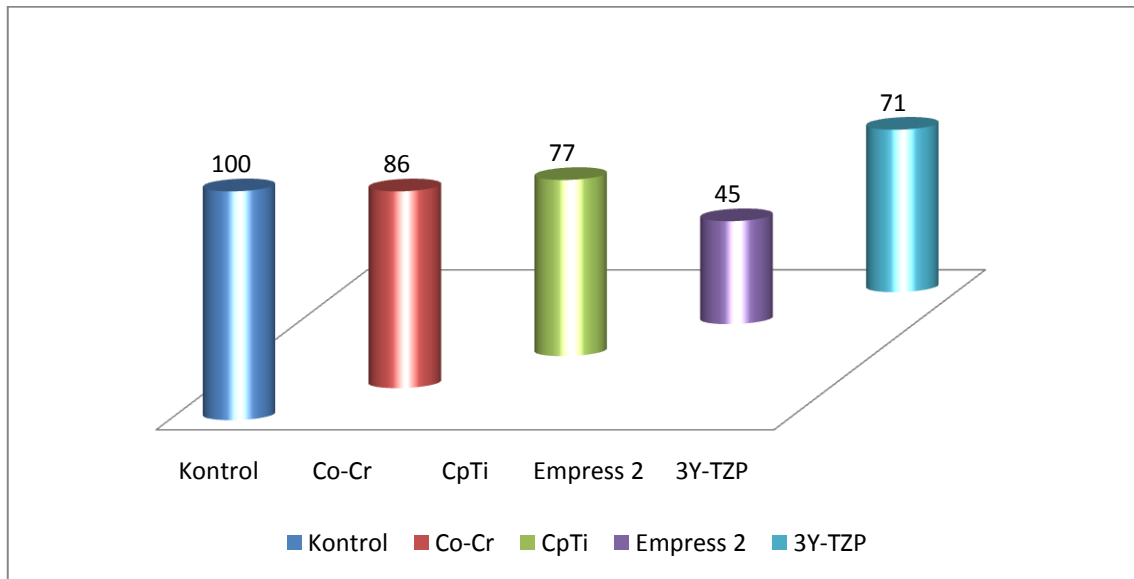
DENEY	GRUP I	GRUP II	ORTALAMA FARK	ÖNEM ($p<0,05$)
Başlangıç	Kontrol	Co-Cr	,08183(*)	,000
		CpTi	,13633(*)	,000
		3Y-TZP	,11567(*)	,000
		Empress 2	,14617(*)	,000
	Co-Cr	Kontrol	-,08183(*)	,000
		CpTi	,05450(*)	,000
		3Y-TZP	,03383(*)	,000
		Empress 2	,06433(*)	,000
	CpTi	Kontrol	-,13633(*)	,000
		Co-Cr	-,05450(*)	,000
		3Y-TZP	-,02067(*)	,001
		Empress 2	,00983	,215
	3Y-TZP	Kontrol	-,11567(*)	,000
		Co-Cr	-,03383(*)	,000
		CpTi	,02067(*)	,001
		Empress 2	,03050(*)	,000
	Empress 2	Kontrol	-,14617(*)	,000
		Co-Cr	-,06433(*)	,000
		CpTi	-,00983	,215
		3Y-TZP	-,03050(*)	,000

15 günlük yaşlandırma işleminden sonra yapılan ikinci toksisite testine ait spektrofotometre değerleri ile canlılık oranları Tablo 4.4'te görülmektedir.

Tablo 4.4: 15 günlük yaşlandırma deneyine ait spektrofotometre değerleri ve basit % oranları.

n	Kontrol	Co-Cr	Cp-Ti	Empress 2	3Y-TZP
1	0,121	0,103	0,100	0,048	0,099
2	0,118	0,101	0,101	0,057	0,083
3	0,113	0,100	0,085	0,062	0,083
4	0,114	0,111	0,088	0,050	0,092
5	0,120	0,098	0,078	0,050	0,066
6	0,115	0,090	0,089	0,048	0,073
Ortalama	0,117	0,101	0,090	0,053	0,083
%	100	86	77	45	71

15 günlük yaşlandırma sonrasında yapılan toksisite deneyinde, genel olarak canlılık oranlarının yükseldiği ve toksisitenin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: 15 günlük yaşlandırma sonunda oluşan hücre canlılık oranları

15 günlük yaşlandırma sonunda en yüksek vitalite değerleri başlangıç deneyinde olduğu gibi yine Co-Cr grubuna ait örneklerde ortaya çıkmıştır (Tablo 4.4). CpTi örneklere ait hücre canlılık oranı, % 31'den % 77'ye yükselmiştir. Böylece en yüksek artış oranını CpTi örnekler göstermiştir. Canlılık oranı % 27'den % 45'e yükselmesine rağmen Empress 2, yine de dört materyal grubu içerisinde en yüksek toksisite değerlerine sahip materyal olmuştur. Başlangıç testine göre 3Y-TZP örneklerin toksisitesi CpTi'ye göre daha düşük iken 15 günlük yaşlandırma sonunda CpTi daha az toksik hale gelmiştir. Böylece toksisite sıralaması 15 günlük yaşlandırma işlemi sonunda değişim göstererek en az toksik olandan en toksik olana doğru, **Kontrol<Co-Cr<CpTi<3Y-TZP<Empress 2** şeklinde gerçekleşmiştir.

15 günlük yaşlandırma sonunda yapılan toksisite deneyine ait tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre materyaller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). (Tablo 4.2) Yapılan ikili karşılaştırmalarda, kontrol grubu tüm gruplardan farklı bulunmuştur. Co-Cr ile CpTi örneklerin canlılık oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun dışında Co-Cr ile diğer tüm grupların toksisiteleri arasındaki fark, anlamlıdır. CpTi-Co-Cr ve CpTi-3Y-TZP grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Empress 2 ile tüm grupların ikili karşılaştırmaları arasındaki farklar, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Tablo 4.5).

30 günlük yaşlandırma sonrasında yapılan toksisite deneyine ait canlılık değerlerini gösteren spektrofotometre değerleriyle bu değerlerin basit yüzdelik oranları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

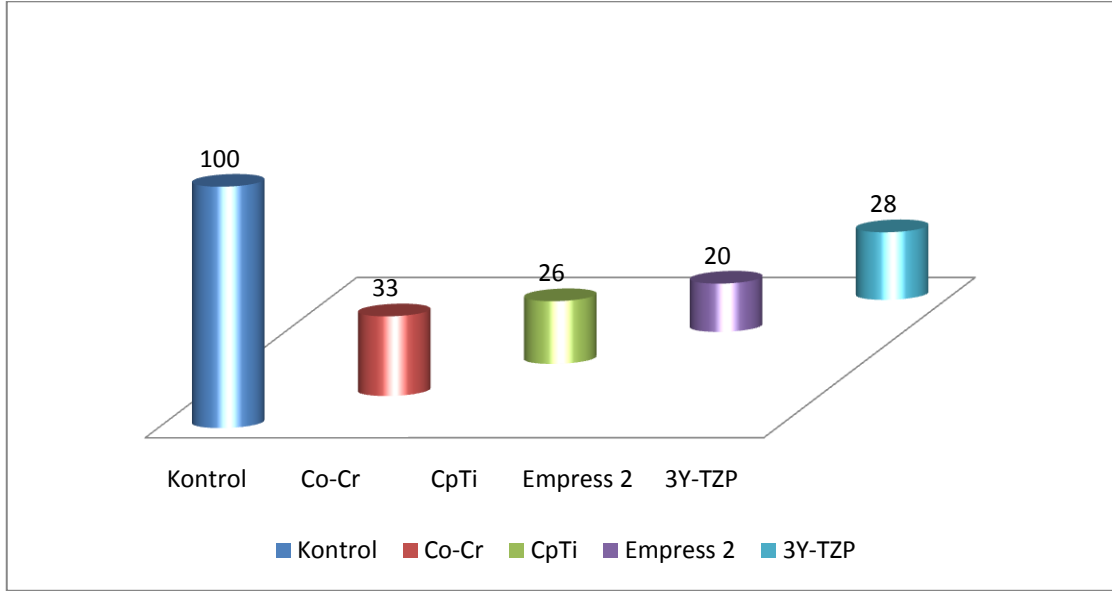
Tablo 4.5: 15 günlük yaşlandırma sonunda yapılan toksisite deneyinin Scheffe test Tablosu

GRUP	GRUP I	GRUP II	ORTALAMA FARK	ÖNEM (p<0,05)
15.Gün	Kontrol	Co-Cr	,01633(*)	,030
		CpTi	,02667(*)	,000
		3Y-TZP	,03417(*)	,000
		Empress 2	,06433(*)	,000
	Co-Cr	Kontrol	-,01633(*)	,030
		CpTi	,01033	,307
		3Y-TZP	,01783(*)	,015
		Empress 2	,04800(*)	,000
	CpTi	Kontrol	-,02667(*)	,000
		Co-Cr	-,01033	,307
		3Y-TZP	,00750	,618
		Empress 2	,03767(*)	,000
	3Y-TZP	Kontrol	-,03417(*)	,000
		Co-Cr	-,01783(*)	,015
		CpTi	-,00750	,618
		Empress 2	,03017(*)	,000
	Empress 2	Kontrol	-,06433(*)	,000
		Co-Cr	-,04800(*)	,000
		CpTi	-,03767(*)	,000
		3Y-TZP	-,03017(*)	,000

Tablo 4.6: 30 günlük yaşlandırma deneyine ait spektrofotometre değerleri ve basit % oranları.

n	Kontrol	Co-Cr	CpTi	Empress 2	3Y-TZP
1	0,278	0,079	0,061	0,052	0,077
2	0,244	0,078	0,060	0,050	0,073
3	0,240	0,066	0,058	0,050	0,069
4	0,209	0,096	0,067	0,049	0,063
5	0,250	0,069	0,068	0,046	0,060
6	0,230	0,090	0,061	0,048	0,068
Ortalama	0,242	0,080	0,063	0,049	0,068
%	100	33	26	20	28

30 günlük yaşlandırma işleminin ilk etapta, tüm gruplarda hücre canlılığını belirgin miktarda düşürdüğü, toksisiteyi artırdığı göze çarpmaktadır. Şekil 4.3'te, 30 günlük ikinci yaşlandırma deneyine ait oransal canlılık değerleri verilmiştir.



Şekil 4.3: 30 günlük yaşlandırma sonunda oluşan canlılık oranları

Üçüncü toksisite deneyine göre, tüm materyallerin hücre canlılık değerlerinde kontrol grubuna göre ciddi bir düşüş görülmüştür. Co-Cr örnekler, ilk iki toksisite deneyine göre en yüksek canlılık değerleri sağlayan materyaldir. Son yaşlandırma sonunda canlılık değerinde en çok düşüş gerçekleşen grup olmasına rağmen Co-Cr örnekler, hala en yüksek canlılık değeri (% 33) sağlayan materyal olmuştur. En yüksek toksisite yine Empress 2 örneklerde (% 20 canlılık oranı) oluşmuştur. CpTi ve 3Y-TZP örnekler, her üç deneyde de benzer canlılık değerleri gösteren materyallerdir. 30 günlük yaşlandırma sonunda oluşan toksisite sıralaması en yüksekten düşüğe doğru, **Empress 2>CpTi>3Y-TZP>Co-Cr>Kontrol** şeklinde ilk deneyle benzer şekilde oluşmuştur.

Tek yönlü varyans analizine göre üçüncü toksisite deneyinde grup içinde fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Tablo 4.2). Grup içi ikili karşılaştırmalarda, kontrol grubu tüm gruplardan anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Co-Cr ile CpTi ve 3Y-TZP arasındaki fark anlamlı değildir, ancak Co-Cr ile Empress 2 arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). CpTi ve 3Y-TZP grupları ile kontrol grubu arasındaki farklar anlamlı iken bu gruplarla Co-Cr ve Empress 2 grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: 30 günlük yaşlandırma deneyine ait grup içi karşılaştırma sonuçları.

GRUP	GRUP I	GRUP II	ORTALAMA FARK	ÖNEM ($p<0,05$)
30. Gün	Kontrol	Co-Cr	,16217(*)	,000
		CpTi	,17933(*)	,000
		3Y-TZP	,17350(*)	,000
		Empress 2	,19267(*)	,000
		Co-Cr	Kontrol	-,16217(*)
		CpTi	,01717	,220
		3Y-TZP	,01133	,617
		Empress 2	,03050(*)	,005
	CpTi	Kontrol	-,17933(*)	,000
		Co-Cr	-,01717	,220
		3Y-TZP	-,00583	,947
		Empress 2	,01333	,461
		3Y-TZP	Kontrol	-,17350(*)
	Co-Cr		-,01133	,617
	CpTi		,00583	,947
	Empress 2		,01917	,137
	Empress 2		Kontrol	-,19267(*)
		Co-Cr	-,03050(*)	,005
		CpTi	-,01333	,461
		3Y-TZP	-,01917	,137

Başlangıç, 15 ve 30 günlük yaşlandırma işlemlerinin materyallerin toksisiteleri üzerine etkilerini karşılaştırmak amacıyla ortalama spektrofotometre değerleri (Tablo 4.8) basit yüzde oranlarına dönüştürüldü (Tablo 4.9). Bu basit yüzde oranları kullanılarak yapılan Kruskal-Wallis testinde, materyallerin üç deney sonundaki toksisite

değerlerinin farklı olduğu ve Mann-Whitney U testleri ile her deneyin, toksisite değerlerinde, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklar oluşturduğu görülmüştür (Tablo 4.10).

Tablo 4.8: Her üç deneye ait ortalama spektrofotometre değerleri.

Deney	Kontrol	Co-Cr	CpTi	Empress 2	3Y-TZP
Başlangıç	0,199	0,118	0,063	0,053	0,084
15 Gün	0,117	0,101	0,090	0,053	0,083
30 Gün	0,242	0,080	0,063	0,049	0,068

Tablo 4.9: Her üç deneye ait ortalama hücre canlılık değerlerinin basit % oranları

Deney	Kontrol	Co-Cr	CpTi	Empress 2	3Y-TZP
Başlangıç	100	60	31	27	42
15 Gün	100	86	77	45	71
30 Gün	100	33	26	20	28

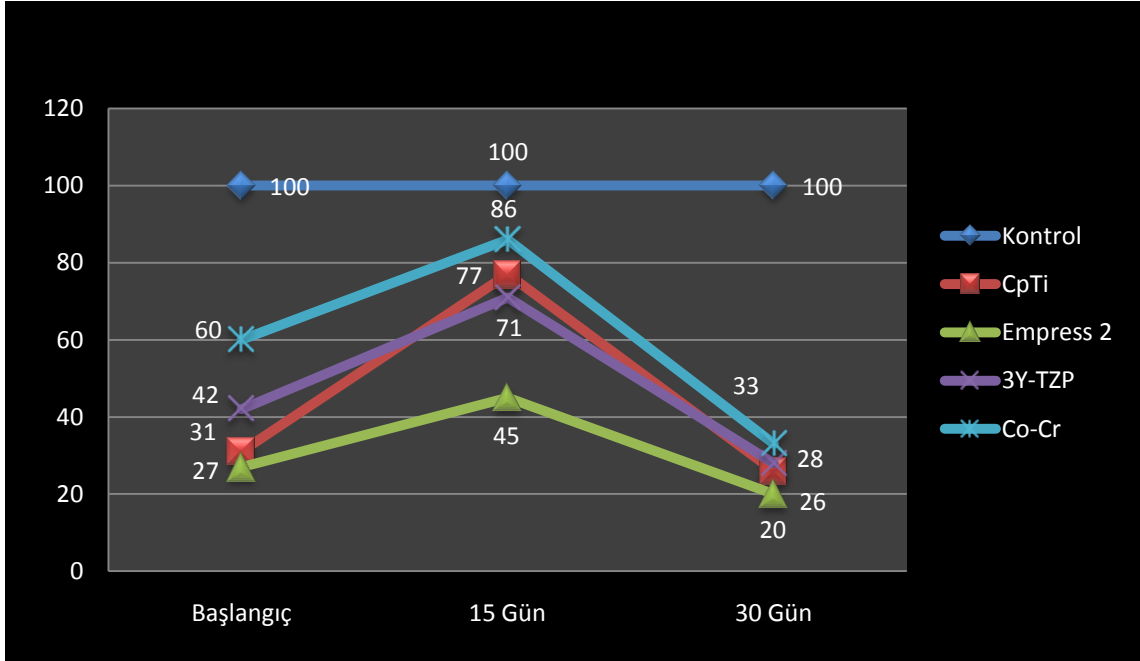
Tüm veriler incelendiğinde, her üç deneyde de en yüksek canlılık değerlerinin Co-Cr, en düşük değerlerin ise Empress 2 örneklerle sağlandığı görülmektedir. Deneylerin tamamında CpTi ile 3Y-TZP örneklerin toksisite değerleri paralellik göstermektedir. 15 günlük yaşlandırma süresi sonunda hücre canlılık oranlarında belirgin bir artış yaşanmıştır. Bütün materyaller, bu süre sonunda en yüksek canlılık oranlarını sağlamıştır. 30 günlük yaşlandırma süresi sonunda ise hücre canlılık oranları düşerek toksisite, başlangıç değerlerinin de üstüne çıkmıştır. Tüm materyaller, 30 günlük yaşlandırma sonunda, başlangıç ve 15 günlük yaşlandırma sonuçlarına göre daha toksik hale gelmiştir.

Tablo 4.10: Yaşlandırma işlemlerinin deney materyallerinin toksik cevabı üzerine etkisi

Materyal	Deney	Mann-Whitney U	Z	Exact sig. (p<0,05)
Kontrol	Başlangıç-15. gün	18,000	0,000	1,000
	Başlangıç-30.gün	18,000	0,000	1,000
	15.gün-30. gün	18,000	0,000	1,000
Co-Cr	Başlangıç-15. gün	0,000	-3,317	0,002
	Başlangıç-30.gün	0,000	-3,317	0,002
	15.gün-30. gün	0,000	-3,317	0,002
Cp-Ti	Başlangıç-15. gün	0,000	-3,317	0,002
	Başlangıç-30.gün	0,000	-3,317	0,002
	15.gün-30. gün	0,000	-3,317	0,002
Empress 2	Başlangıç-15. gün	0,000	-3,317	0,002
	Başlangıç-30.gün	0,000	-3,317	0,002
	15.gün-30. gün	0,000	-3,317	0,002
3Y-TZP	Başlangıç-15. gün	0,000	-3,317	0,002
	Başlangıç-30.gün	0,000	-3,317	0,002
	15.gün-30. gün	0,000	-3,317	0,002

Co-Cr örneklerin sağladığı canlılık oranı, 15 günlük yaşlandırma sonunda kontrol grubuna en yakın değere ulaşmıştır. 30 günlük yaşlandırma, 15 günlük yaşlandırmanın aksine toksisiteyi artırıcı etki göstermiştir. Mann-Whitney U testiyle yapılan ikili karşılaştırmalarda Co-Cr örneklerin canlılık oranlarındaki değişimler her üç deneyde de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Başlangıç testi ile 15 günlük yaşlandırma deneyinin sonuçları karşılaştırıldığında, yaşlandırma işleminin materyalin toksisitesini azalttığı görülmektedir. 30 günlük yaşlandırma işlemi, başlangıç ve 15

günlük yaşlandırma deneyine göre Co-Cr materyalini daha toksik hale getirmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Üç farklı deney sonunda oluşan toksisite eğrileri

Yaşlandırma işlemi, CpTi ve 3Y-TZP'nin de toksik davranışını değiştirmiştir. Her iki materyalin bu üç deney sonundaki ikili karşılaştırmalarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Empress 2 örnekler, her üç deneyde de en düşük canlılık değerlerini veren materyal olmuştur. Yaşlandırma işleminin materyallerin toksisite değerlerinde neden olduğu oransal değişimler incelendiğinde, sayısal anlamda en küçük dalgalanmanın Empress 2 örneklere ait olduğu görülmektedir. Empress 2 örneklerin farklı yaşlandırma deneylerinde oluşturduğu canlılık değerleri birbirinden anlamlı olarak farklıdır ($p < 0,05$) (Tablo 4.10).

5 TARTIŞMA

Diş hekimliği tedavilerinin tümü gibi protetik tedavilerin de temel amacı estetik, fonksiyon ve fonasyon özelliklerinin yanı sıra ağız sağlığının devamının sağlanmasıdır. Bir veya birkaç dişin eksikliğini gidermek için yapılan sabit protetik restorasyonlar, hastalar tarafından yıllarca kullanılmakta ve bu süre boyunca birçok mekanik, termal ve kimyasal kuvvetin etkisinde kalmaktadır. Sabit protetik tedavide kullanılan materyallerin bir kısmı, eskiden beri kullanılan materyallerdir. Bununla birlikte biyomateryallerden en iyi klinik ve biyolojik verimi alabilmek amacıyla yeni materyallerin geliştirilmesi süreci devam etmektedir ve bu durum protetik tedavide de her geçen gün farklı materyallerin kullanılmasının önünü açmaktadır. Bu açıdan hem geleneksel hem de yeni materyallerin üretim yöntemleri ve klinik uygulamalarının nasıl bir biyolojik cevap oluşturduğu/oluşturacağı bu materyallerin kullanım alanının tespiti adına belirleyici bir faktördür. Uygun klinik tabloda uygun biyolojik cevabı oluşturacak biyomateryallerin geliştirilmesi, materyal biliminin önemli hedeflerinden birisidir.

Dental materyallerden kaynaklanan pek çok muhtemel yan etki vardır. Bunlar klasik olarak toksik, enflematuar, allerjik ve mutajenik etkiler olarak sınıflandırılmaktadır. Materyallere karşı gelişen yan etkilerden ilk çalışılmış olanı ve günümüzde de hemen hemen her materyal için kullanılan görüntüleme yöntemi toksisite testleridir. Materyallerden salınan partiküller, vücutta toksik cevap oluşmasını tetikleyebilmektedir.^{119,189}

Biyomateryallere karşı gelişen ikinci temel biyolojik reaksiyon tipi, enflemasyondur. Enflematuar cevap, konağın immün sisteminin aktif olduğu karmaşık

bir durumdur. Toksikite ve allerjinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilen enflestasyon, histolojik olarak, komşu dokuya kısa vadede n6trofil, uzun vadede ise monosit ve diğer lenfositik h6crelerin penetrasyonu sonucu oluşan 6demle karakterizedir.^{36,119}

Dental materyallere karşı gelişen allerjik reaksiyonların çoğu aileseldir ve bunların kinik olarak tespit edilmesi de zordur. Allerji, v6cudun bir maddeyi yabancı madde olarak kabul etmesinin bir sonucu ve materyal miktarıyla gelişen reaksiyon derecesinin bağlantılı olmadığı bir durumdur. Allerjide, tipik olarak T ve B lenfositleri, monosit ve makrofajlar gibi imm6n sistemin t6m elemanları aktiftir. Allerjik reaksiyonlar, histolojik olarak d6şuk dereceli toksisite ve allerjik olmayan enflestasyondan ayrılması zor bir enflestatuar cevap oluştururlar.^{36,119,189}

Allerjik reaksiyonlar ile enflestasyon arasındaki temel fark, allerjide v6cudun bir materyale yabancı madde muamelesi yapmasıdır. Bu durum, t6m bireyler için geçerli değildir ve dozdan bağımsız olarak oluşur. Enflestasyon ise t6m bireyler için geçerlidir ve doz arttıķa şiddeti de artmaktadır.^{119,190}

Mutajenik reaksiyonlar, materyalin DNA sekansının bir b6l6m6n6 değiştirmesidir. Bu durum, materyalle DNA'nın doğrudan veya dolaylı yoldan etkileşmesiyle oluşmaktadır. Mutasyonlar, kimyasallar, radyasyon ve DNA replikasyonundaki hataların etkisiyle oluşmaktadır. Dental materyallerde kullanılan nikel, berilyum, bakır gibi bazı elementler mutajendir. Ayrıca bazı kanal dolgu maddelerinin de mutajen olduğu g6sterilmiştir. Bununla birlikte materyalin formu ve temas yolu mutajen ve karsinojen etkilerin oluşmasında 6nemlidir. G6ncel dental materyallerin hiçbiri karsinojen ve mutajen değildir.^{119,190}

Vücutta kullanılan her materyal lokal veya sistemik biyolojik etkiler oluşturmaktadır. Bu durum, materyalden salınan toksik partiküllere ve bunlara karşı gelişen biyolojik cevaba bağlıdır. Biyolojik cevabın şiddeti, doğası ve lokasyonu salınan partiküllerin vücuda dağılmasıyla ilişkilidir. Dental materyallerin neden olduğu lokal etkiler, pulpa, periodontal dokular, komşu yanak mukozası veya dilde ortaya çıkmaktadır. Lokal etkinin şiddeti ilgili bölgelere salınan partiküllerin yoğunluğuna ve etki süresine bağlıdır.^{119,127,189}

Dental materyallerin sistemik etkileri de aynı şekilde materyalden salınan partiküllere bağlıdır. Bu partiküller, yutma, soluma, dişin apeksinden salınım veya bukkal mukozadan emilim yoluyla vücuda girmekte ve basit difüzyon kuralları ya da kan ve lenfatik sistemle aktif taşıma sayesinde vücuda dağılmaktadır. Sistemik biyolojik cevap, etkileşimin yoğunluk ve süresine, etkileşim bölgesine ve materyalin çözünme oranına bağlıdır. Vücutta uzun süre kalan materyallerden salınan partiküller, dokularda birikebilmekte ve kritik seviyelere ulaşabilmektedir. Ayrıca her doku iritanlara karşı farklı oranlarda reaksiyon göstermektedir.^{119,127}

Biyomateryallerin uyumluluğunu gösteren iki anahtar nokta vardır. Bunlardan ilki, metalik biyomateryallerin korozyon özellikleridir. Diğer faktör ise metalik olmayan materyallerin degradasyonu yani aşınmasıdır. Korozyon, metallere konağa partikül salınımı ile sonuçlanmaktadır. Elektrokimyasal etkiler, okluzyon ve diş fırçalama gibi mekanik işlemler korozyonu artırmaktadır. Rezin kompozitler, seramikler gibi materyallerde ise siklik yüklemeler sonucu partikül kopmaları oluşmaktadır. Bu materyallerin biyolojik uyumundaki kritik nokta, aşınma sonucu kopan ve vücuda dağılan partikül miktarıdır. Toksisite, korozyon ürünlerinin miktarına, bileşimine,

formuna ve doku içindeki yerleşimine bağlıdır. Korozyon, her dental materyal için belli seviyede söz konusudur.¹¹⁹

Korozyon yalnızca materyalin kompozisyonuyla değil aynı zamanda materyalle temasta olan biyolojik çevrenin de katkısıyla belirlenmektedir. Örneğin tükürük esterazları, kompozitlerden kopmaları ve kırılmaları hızlandırırken asidik içecekler de seramiklerin aşınmasını artırmaktadır. Materyalin biyoyumunu belirleyen diğer bir özellik de yüzey özelliğidir. Yüzeyin bileşimi, pürüzlülüğü, mekanik ve kimyasal özellikleri bu açıdan kritik öneme sahiptir. Yüzey pürüzlülüğü, bakteriyel tutulumu artırarak biyoyumluluğu olumsuz etkilemektedir.¹¹⁹

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin dokular üzerinde yarattığı toksik etkilerin değerlendirilmesinde in vitro ve in vivo yöntemler kullanılmaktadır.^{4,108,124,133,135,180,191}

Toksisitesi bilinmeyen bir materyalin insanlarda kullanımı etik açıdan mümkün değildir.^{2,127} Bu nedenle, klinik kullanıma geçmesi düşünülen materyallerin toksik özelliklerinin in vivo koşullarda değerlendirilmesi amacıyla hayvan deneyleri yapılmaktadır. Ancak, hayvanlar ve insanlardaki fizyolojik reaksiyonlar birbirinden farklı olabilmektedir. Deneyler sırasında hayvanlara bağlı yapısal faktörler, deney sonuçlarını ve çalışmanın güvenilirliğini etkileyebilmekte, ortaya çıkabilecek biyolojik etkileşimler, anlamlı ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bununla beraber hayvan deneylerinin pahalı ve zaman alıcı olması, hayvanların beslenme ve bakımıyla ilgili sorunlar bu tip deneylerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımı, hayvan hakları açısından giderek artan şekilde sorgulanmakta ve sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle klinik kullanıma

gececek materyallerin vücut dokuları üzerindeki potansiyel toksik etkilerini değerlendirmek ve oluşturabilecekleri biyolojik cevabı tahmin edebilmek için in vitro biyoyumluluk testleri geliştirilmiştir.^{127,128} İn vitro koşullarda yürütülen test yöntemleri, dental materyallerin temel biyolojik fonksiyonlar üzerine etkilerinin ve bunlara karşı oluşan hücresel yanıtların belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.¹²⁷

İn vitro çalışmalar; kontrol edilebilen şartlarda yürütülen ve hücresel toksisitenin mekanizmasını açıklayan, uygulanması kolay araştırmalardır. Bu testlerde hücresel olaylar tek başına, karmaşık hücreler arası ilişkilerden bağımsız olarak değerlendirilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, toksisitenin belirlenmesinde genellikle hücre kültürü test yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir.^{127,140} Hücre kültürü test yöntemleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri ve çalışma koşullarının standardize edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir.^{127,131,180,192}

ISO'nun 10993-5¹²⁹ nolu spesifikasyonuna göre in vitro sitotoksosite testleri direkt, indirekt ve özüt testleri olmak üzere üç farklı materyal hücre temas yöntemiyle yapılabilmektedir. Diş hekimliği materyallerinin her üç temas yöntemiyle de toksisite çalışması yapılmıştır.^{126,131,134,193}

Saw ve arkadaşları¹²⁶, farklı hücre tiplerinin ve farklı temas şekillerinin sitotoksosite sonuçları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Buna göre direkt ve indirekt testler arasında iyi bir ilişki bulunmuş, en az hassasiyeti ise özüt testi göstermiştir. İndirekt temas testinde arada bulunan bariyer membranlar deney koşullarını in vivo şartlara yaklaştırmaktadır. Ancak bu amaçla in vitro test sistemlerinde agar

kullanılmasının uygun olmayacağı bunun yerine direkt temas testinin, indirekt ve özüt testleri yerine tercih edilmesinin daha uygun olacağı belirtilmiştir.

Cao ve arkadaşları¹⁹³, materyal ile hücre kültürü arasındaki farklı temas türlerinin kompozit materyallerin sitotoksitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada direkt ve indirekt temas yöntemlerinin özüt deneylerine göre daha hassas sonuçlar verdiğini göstermişlerdir.

Farklı canlılık testlerinden elde edilen sonuçlar, her zaman birbiriyle ilişkili olmamaktadır. Bu durumun nedeni, in vitro sitotoksite testlerinin sonuçlarının farklı yöntemlerle değerlendirilmesi ve bu yöntemlerin farklı hücresel fonksiyonları ölçmesidir.¹³² Örneğin, nötral kırmızı, hücre membran bütünlüğünü ölçme esasına dayanırken MTT testi ile mitokondriyal fonksiyonlar ölçülmektedir.¹⁸⁵ Nötral kırmızı, canlı hücrelerde plazma ve organel zarlarından geçerek lizozomlarda birikebilen zayıf katyonik bir boyadır. Deney materyallerinin sebep olduğu hücresel hasar veya ölümler sonucu hücre zarının bütünlüğü bozulmakta ve nötral kırmızı boyasının hücre retansiyonu da azalmaktadır. Sonuçta canlı hücreler boyayı tutarken ölü hücreler renksiz kalmaktadır.^{182,193} Literatürde bu konuyla ilgili yapılmış birçok çalışma vardır.^{126,134,144,194}

Fotakis ve Timbrell¹⁸², iki farklı hücre hattı kullanarak dört farklı sitotoksite değerlendirme yönteminin etkinliklerini araştırmışlar ve nötral kırmızı ile MTT değerlendirmesinin en hassas sonuçları verdiğini bulmuşlardır. Aynı zamanda bir materyalin toksik özellikleri hakkında karar verirken farklı toksisite testlerinin uygulanmasının daha güvenilir sonuçlar vereceğine dikkat çekmişlerdir.

Bu amaçla, sunulan bu çalışmada sabit protetik restorasyonlarda kullanılan farklı materyallerin sitotoksik özellikleri, direkt temas testi ve nötral kırmızı boyası kullanılarak in vitro koşullarda hücre kültürü yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyallerin toksik özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılan sitotoksisite testlerinde en çok L929 veya 3T3 fare fibroblast hücre hatları tercih edilmektedir.^{123,132,163,195} Bu devamlı hücre hatları, uygun büyüme oranları ve standarda yakın biyolojik cevapları nedeniyle tercih edilmekte ve rutin olarak kullanılmaktadır. İlave olarak, L929 hücrelerinin toksikolojik incelemeler için özelleşmiş olduğu, ISO'nun in vitro toksisite deneylerini belirleyen 10993-5 nolu spesifikasyonunda da belirtilmektedir.¹²⁹ Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksik özelliklerinin incelendiği deneysel çalışmalarda dişeti dokusundan izole edilen epitel veya fibroblast hücrelerinden oluşan primer kültürler de kullanılmaktadır.^{119,123,134,179,195,196} Ancak, primer kültürlerde kullanılan hücrelerin birkaç pasajlamadan sonra değişime uğraması, testlerde elde edilen biyolojik cevaplarda varyasyonlara neden olmakta ve toksisite bulgularının karşılaştırılması ve standardizasyonu açısından önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Schedle ve arkadaşları¹⁹⁵, metal alaşımlarının toksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla, materyalleri 7 gün süre ile L929 hücreleri, dişeti fibroblast hücreleri ve mast hücreleri ile inkübe ederek, direkt temas yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişiklikleri değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, in vitro sitotoksisite testlerinde üreme yeteneklerinin gelişmiş olması nedeniyle L929 fibroblastlarının kullanılmalarının, primer dişeti fibroblast ve mast hücre kültürlerine oranla daha uygun olacağı belirtilmiştir.

Bu nedenlerle; çalışmamızda in vitro sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere farklı restoratif materyaller ve yaşlandırma süreleri kullanılarak yapılan in vitro sitotoksitate deneylerinde, kolay ulaşılabilir olması, kullanım alanının geniş olması ve standart biyolojik cevap elde edilebilmesi amacıyla L929 fare fibroblast hücrelerinin kullanılması tercih edilmiştir.

Direkt temas testlerinin birçoğunda kültürle ilgili mikrobiyal kontaminasyon, besleyici medyumun özelliğini kaybetmesi ve hücrelerin aşırı çoğalması gibi kısıtlayıcı nedenler, materyal ile hücre temas süresini kısaltmaktadır. Bu durum, in vitro testlerle in vivo testlerin uyumsuzluğunda önemli bir yer tutmaktadır.^{2,138-140} Bu olumsuzluğu aşmanın bir yolu materyalin toksisite testinden önce biyolojik ortamda yaşlandırılmasıdır.²

Yapılan çalışmalar, dental materyallerin toksisitesinin materyalden elemental salınım ya da kitlesel kayıpla ilgili olabileceğini göstermektedir.^{2,137,140-144} Bu materyaller, ağızda çok uzun süre kaldıkları için uzun süreli elemental salınım verilerinin dental materyallerin yan etkilerini tanımlamada daha iyi bir hareket noktası olacağı düşünülmektedir.¹⁴⁰

Wataha ve Lockwood¹⁴⁰, diş hekimliğinde kullanılan bazı soy ve baz metal alaşımlarını 10 ay boyunca hücre kültürü medyumunda yaşlandırmış ve her iki grupta da bu süre boyunca elemental salınımın belli oranlarda devam ettiğini göstermişlerdir. Elemental salınım başlangıçta fazla iken sonraki intervallerde azalma göstermiştir.

Wataha ve arkadaşları², bir başka çalışmada dental materyallerden 10 aylık yaşlandırma periyodu sonunda, kitlesel kayıpla toksisite arasındaki bağlantıyı araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre yaşlandırma süresi, dental alaşımların direkt temas

testine göre toksik cevabını önemli oranda değiştirmektedir. Bu süre sonunda materyaller genelde başlangıca göre daha az toksiktir. Yaşlandırma süresi arttıkça elemental salınım azalmakta ancak elemental salınımın azalmasına bağlı olarak toksisite başlangıca göre ya azalmakta ya da aynı kalmaktadır.

Materyal yaşlandırma işleminin yaşlandırmamaya göre elemental salınımı değiştirip değiştirmediğiyle ilgili çalışmalar, bazı yaşlandırma prosedürlerinin materyal üzerindeki labil elementleri uzaklaştırdığını göstermiştir.^{137,147,148} Hızlandırılmış yaşlandırma işlemi, materyalin uzun dönem toksik cevabının veya elemental salınımın araştırılması için tavsiye edilmektedir.^{140,146,148}

Hızlandırılmış yaşlandırma işlemi için farklı yaşlandırma medyumları kullanılmıştır.^{141,146-150} Nelson ve arkadaşları¹³⁷, çalışmalarında % 0,8'lik NaCl'yi, hücre kültür medyumunu ve BSA'yı (tuzlu bovine-serum-albumin) yaşlandırma solüsyonu olarak kullanmışlar ve farklı dental alaşımları 7 gün boyunca bu ortamlarda yaşlandırmışlardır. BSA, bir hafta sonunda 10 aylık yaşlandırma işlemine en yakın kitlesel kayıp ve toksisite sonuçlarını vermiştir.

İn vitro sitotoksisite çalışmalarında, materyalin farklı biyolojik ortamlarda yaşlandırılması elde edilen sonuçları, uzun dönem klinik kullanıma daha da yaklaştırmaktadır. Bu amaçla, yapay tükürük de dâhil olmak üzere birçok farklı biyolojik solüsyon kullanılmaktadır. İn vitro çalışmalar için halen birçok yapay tükürük formülasyonu mevcuttur.^{155,197}

Baz metal alaşımları sabit ve hareketli protezlerde 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Hareketli protezler hastalar tarafından kolaylıkla çıkarılabilirken mine, dentin, gingiva, oral mukoza, kan ve tükürük gibi vücut sıvılarıyla temasta olan sabit

protezler uzun süre hasta ağızında kalmaktadır. Bu süre boyunca oluşan koroziv ürünler, vücutta birikebilmekte ve fagositoz ya da aktif taşıma ile hücre içerisine girerek normal metabolik aktiviteye dâhil olmaktadır.¹⁹⁸

Jakobsen ve arkadaşları¹⁹⁹, Co-Cr-Mo alaşımının karaciğer ve böbreklerde metal iyonlarının birikimine neden olup olmadığını fareler üzerinde araştırmışlardır. Alaşım, hem intraperitoneal hem de ayak kası içine yerleştirildikten sonra fareler dokuz ay takip edilmiştir. Bu süre sonunda implante edilen materyaller çıkarıldığında, her iki grup materyalin de makrofajdan zengin beyaz granülasyon dokusuyla kaplı olduğu görülmüştür. Doku kesitlerinin analiz sonuçları hem Cr hem de Co elementlerinin karaciğer ve böbrekte varlığını göstermiştir. Steril bir deney ortamı oluşturulup oluşturulamaması, metal iyonlarının serbest iyonlar, metal-protein kompleksi, inorganik metal tuzları veya oksitleri şeklinde birikmesi yan etkilerin oluşmasında önemli rol oynamaktadır.

İmplant materyallerinden salınan Cr^{+6} , Cr^{+3} 'e göre hücre zarını daha kolay geçebilmekte ve bazı enzimleri inaktif hale getirmektedir. Messer ve Lucas²⁰⁰, bu iyonların hücre içi birikim bölgelerini dişeti fibroblast kültüründe araştırmışlardır. Cr^{+6} iyonları en çok plazma membranı, çekirdek ve mitokondride birikirken Cr^{+3} , plazma membranı ve düşük yoğunluklu moleküllerde birikmektedir. Mitokondri içerisinde Cr^{+3} iyonlarının düşük yoğunlukta kalması, bu iyonların çok hızlı şekilde bileşimlere dönüşmesinin bir sonucudur. Metal iyonlarının hücre içindeki yerleşim bölgeleri, bu metallerin neden olduğu toksik etkileri, morfolojik ve yapısal değişimleri açıklamak ve bunların etki mekanizmasını anlayabilmek için önemlidir.

Tai ve arkadaşları¹⁹⁸, yapay ağız ortamı oluşturarak alaşımların aşınma değerlerini ve krom, nikel ve berilyum salınım miktarlarını araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, alaşımlardan krom salınımı, nikel ve berilyum salınımına göre oldukça düşüktür. Bu sonuçlar üzerinde alaşımların krom ve nikel içeriklerinin farklı olmasının ve kullanılan cihazların hassasiyetinin etkisi sözkonusudur. Okluzal yükler ve oral çevre, alaşımlar üzerinde koroziv etkiye sahip iki faktördür ve çiğneme, normal ağız ortamına göre iki kat daha fazla koroziv etki oluşturmaktadır.

Aşınma sonucu salınan partiküllerin yüzey özellikleri, materyale karşı gelişen hücrel cevap üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu türlü salınım ürünlerinin yüzey özellikleri, orijinal yapıdan farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, materyalin yüzeyinde oksit tabaka oluşması gibi faktörler ve biyolojik ortamdan kaynaklanan çevresel etmenler, materyal ve partikül yüzeyinin kişiden kişiye farklılık göstermesine de neden olmaktadır. Lewis ve arkadaşları²⁰¹, Co-Cr partiküllerinin yüzey özellikleri ile materyalin yerleştirildiği çevrenin partikül üzerine etkilerinin hücreler üzerindeki etkilerini fibroblast kültüründe araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan iki farklı biyolojik (insan serumu ve minimum essential medyum-MEM) solüsyon da, farklı partikül yüzeylerinin oluşmasına neden olmuştur. Farklı yüzeylere sahip partiküllerin fibroblast hücreleri tarafından fagositoza uğrama oranları da farklılık göstermiştir. Aynı çalışmada Co-Cr partiküllerinin genetik etkilerine de bakılmış ve kontrol grubuna göre önemli oranda DNA hasarı tespit edilmiştir. DNA hasarı, ilk 9 saat içerisinde ortaya çıkmış ve 48 saat boyunca da artarak devam etmiştir.

Lewis ve arkadaşları²⁰¹'nin çalışması, restoratif materyallerin ve bunlardan kaynaklanan partiküllerin yüzey özelliklerinin, çevreleyen biyolojik ortamın özelliklerine göre değiştiğini ve bunun da fagositoz ve DNA hasarı gibi toksik özellikleri

etkilediğini açıkça göstermektedir. Bu sonuçla bağlantılı olarak çalışmamızda kullandığımız yapay tükürük solüsyonunun da materyallerin yüzey özellikleri ve nihayetinde toksisiteleri üzerinde belli miktarda etkisinin olduğu kaçınılmazdır. Farklı yaşlandırma medyumları materyalin çözünme oranı, elemental salınım miktarı ve yüzey özelliklerinin değişmesi anlamında etkili rol oynamaktadır.

Prabhu ve arkadaşları²⁰², polimetilmetakrilat (PMMA) ve Co-Cr alaşım partiküllerinin fagositozu sonucu ortaya çıkan bazı immunolojik ve biyolojik parametreleri J774A.1 makrofaj hücre kültüründe araştırmışlardır. SEM görüntülerinde her iki materyale ait partiküllerin de makrofajlar tarafından fagosite edildiği ve fagosite edilen Co-Cr partiküllerinin yüzeyinin düzleştiği görülmüştür. PMMA ve Co-Cr partikülleri ilk 24 saatte metabolik aktiviteyi etkilememiş ancak 48 saat sonunda Co-Cr partiküllerinin MTT testine göre hücre canlılığında kontrol grubuna göre önemli azalmalara neden olduğu görülmüştür. Bu durumun tam olarak hangi sebepten kaynaklandığı bilinmemekle birlikte, partikül yüzey alanı, hacmi ve pürüzlülüğünün etkili olabileceği düşünülmektedir. Her iki materyalin apoptik hücre ölümü üzerine anlamlı etkisi yoktur. Bu materyallere karşı inflamatuvar cevabın bir göstergesi olarak TNF- α , IL-1 α , IL-6 ve IL-12 gibi sitokinlerin salınımı artmakla beraber her iki materyalin de hücre kültürü üzerindeki etkileri önemsiz bulunmuştur.

Çalışmamızda her üç deneyde Co-Cr partiküllerinin kontrol grubuna göre önemli derecede toksik olduğu görülmektedir. Bulgularımız, Prabhu ve arkadaşları²⁰²'nin bulgularıyla belli oranda uyumaktadır. Sözedilen çalışmada Co-Cr partiküllerin hücre kültürü üzerindeki toksik etkisi 48 saatin sonunda artmaktadır. Sürenin uzaması durumunda toksik cevabın bundan nasıl etkileneceği bilinmemektedir. Çalışmamızda

ise toksik cevap 72 saatin sonunda ölçülmüştür. Kültür ile materyalin temas süresinin artması çalışmamıza göre toksik cevabı da artırmaktadır.

Dental alaşımlardan elemental salınım hakkında yapılan çalışmaların çoğunluğu genelde kısa süreli ölçüm esasına dayanmaktadır. İn vivo şartlarda çok daha uzun süre kullanımda kalan bu alaşımların in vitro şartlarda da uzun süreli test protokolü ile değerlendirilmesi, alaşımlardan kaynaklanan muhtemel yan etkilerin daha isabetli tahmin edilmesine imkân tanımaktadır. Wataha ve Lockwood¹⁴⁰, bazı saf metal ve baz alaşımların elemental salınım değerlerini 10 ay boyunca takip etmiştir. Bu süre boyunca tüm materyallerde salınım, belli bir süre sonunda kararlı hale gelmiş ancak devamlılık göstermiştir. Elemental salınım, başlangıçta fazla iken zamanla azalma eğilimi göstermektedir.

Metal ve metal alaşımlarının in vitro toksik cevabının incelenmesinde metal tuz solüsyonları ile yapılan özüt testleri ve direkt temas testi kullanılmaktadır. Özüt testleri ile materyalden salınan iyonların spesifik etkileri araştırılırken, direkt temas testinde ise salınan iyonlarla beraber materyalin yüzey özelliklerinin de etkisi araştırılabilmektedir.¹⁹⁰

Al-Hiyasat ve arkadaşları²⁰³, kıymetli ve baz metal alaşımların toksik cevabını Balb/C 3T3 fare fibroblastları üzerinde direkt temas ve MTT testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre en az toksik olan materyal, soy metal alaşımlarıdır. Diğer alaşımlar içerisinde en toksik olanı Cu esaslı olandır. Ni-Cr alaşımları içinde de toksisite değerleri farklılık göstermektedir. Alaşım içindeki Cr ve Mo içeriği yükseldikçe toksisite azalmaktadır. Bu durum, Cr ve Mo elementlerinin korozyona dirençli oksit tabaka oluşturmasının bir sonucudur. Co-Cr alaşımının toksisitesi ise bazı Ni-Cr alaşımlardan

daha yüksektir ki bu durumun muhtemel sebebi her iki alaşımdaki Mo oranının farklı olmasıdır. Schedle ve arkadaşları¹⁹⁵, Co iyonlarının Ni iyonlarına göre daha toksik olduğunu bulmuştur. Alaşımdaki Co içeriğinin artması toksisiteyi de artırmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz başlangıç deneyi sonuçları, Al-Hiyasat ve arkadaşlarının²⁰³ buldukları sonuçlarla uyumludur. Ancak mevcut çalışmada herhangi bir yaşlandırma işlemi yapılmamış olması daha ileri bir karşılaştırmayı olanaksız kılmaktadır. Yaşlandırma işleminin süresi uzadıkça muhtemelen, elemental salınım değerlerinde ve yüzey pürüzlülüğünde artış olmaktadır. Bu durum, materyalden hücre kültürü ortamına daha fazla toksik ajan salınımına neden olmaktadır. Yüzey pürüzlülüğünün artışına bağlı olarak da ilave bir mekanik toksisite oluşmaktadır ki bu durumun uzun yaşlandırmayla artan toksik cevabın nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Titanyum, biyouyumluluğu yüksek bir materyal olarak bilinmektedir. Buna bağlı olarak da titanyumun biyomedikal alandaki kullanımı her geçen gün artmaktadır. Titanyumun diş hekimliği uygulamalarındaki kullanımında da dental implantların geliştirilmesiyle gözle görülen bir artış yaşanmıştır. Titanyumun biyouyumluluk özellikleri bu nedenle hala güncelliğini koruyan bir konudur.

İmplant materyali olarak kullanılan titanyumun korozyon ürünleri, lokal lenf nodlarında ve iç organlarda birikebilmekte²⁰⁴ ve galvanik yan etkiler²⁰⁵ oluşabilmektedir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar tarafından²⁰⁶⁻²⁰⁸ titanyuma karşı allerjik reaksiyon vakası rapor edilmiştir. Bu durum, implant materyali olarak geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen, titanyumun biyouyumluluğunun sorgulanmasına neden olmaktadır.²⁰⁹

Biyomateryal olarak titanyumla ilgili yapılan çalışmalar çok çeşitli in vitro testlerden hayvan deneyleri ve in vivo çalışmalara kadar uzanmaktadır.

Titanyum implant materyallerinin korozyonuyla ilgili en geniş çaplı çalışma ortopedi alanında Urban ve arkadaşları²⁰⁴ tarafından yapılmıştır. Urban ve arkadaşları²⁰⁴, kalça ve diz eklem protezi taşıyan hastalardaki protez aşınma ürünlerinin karaciğer, dalak ve abdominal para-aortik lenf nodlarına dağılımını ve bu ürünlere karşı gelişen histopatolojik cevabı araştırmışlardır. Bu çalışmada, ortalama 174 ay protez kullanmış olan post-mortem 29 ve canlı iki hastadan alınan biyopsi sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, aşınan Ti6Al4V ve Co-Cr-Mo partiküllerin bahsedilen dokulara sistemik olarak yaygın bir biçimde taşınabildiği bulunmuş ancak histolojik kesitlerde, biriken partiküllerin toksik etkiler oluşturmadığı gözlenmiştir.

Koike ve Fujii²¹⁰, döküm yoluyla elde ettikleri tip 2 saf titanyum örneklerin farklı pH'lara sahip çözeltilerdeki renk değişikliği, ağırlık kaybı ve yüzey morfolojisi özelliklerini değerlendirmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre yapay tükürük ve laktik asit içindeki örneklerde, ortama Ti iyonlarının salındığı, hidrojen dönüşüm korozyonu oluşmaktadır.

Wang ve Li²¹¹, CpTi ve deneysel titanyum türevlerinin biyolojik uyumunu araştırmış ve Ames testine göre bu materyallerin mutajenik etkisi olmadığını göstermişlerdir. In vitro toksik cevap ise L929 hücre hattı kullanılarak agar difüzyon testi ile araştırılmış ancak herhangi bir toksik etki görülmemiştir.

Faria ve arkadaşları²¹², Ti6Al4V, CpTi ve Ni-Cr ile Co-Cr alaşımların sitotoksik özelliklerini, SCC-9 hücre hattı üzerinde hücre canlılığı ve sayısı yönünden

değerlendirdikleri çalışmalarında her iki Ti materyalinin de toksik olmadığını göstermişlerdir. Kullanılan SCC-9 hücre hattı, hücre canlılığı yönünden L929 ve 3T3 hücre hatları ile yapılan diğer çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir. Co-Cr alaşımının toksik, Ni-Cr alaşımının ise non-toksik bulunması bu çalışmanın en ilginç sonucudur. Faria ve arkadaşları²¹², aynı zamanda toksik materyallerin hücre canlılığını etkilemediğini ancak bunun yerine hücre proliferasyon mekanizmasını inhibe ettiğini dolayısıyla, toksik etkinin de hücre ölümüne neden olma yerine hücre çoğalmasını engelleme şeklinde ortaya çıktığını düşünmektedir.

Çalışmalar, restoratif materyallerden salınan partiküllerin toksisitesinin iki nedenden kaynaklandığı üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlardan ilki, salınan partiküllerin, iyonların veya diğer çözünebilir komponentlerin kimyasal toksisitesi diğeri de bu partiküllerin boyut ve şeklinden kaynaklanan toksisitedir. Vücut sıvılarında veya kültür ortamında çözünebilir partiküller kimyasal toksisite oluşturmaktadır. Ortama herhangi bir iyon veya çözünebilir partikül salmayan materyallerden kaynaklanan toksisite ise mekanik stimülasyon yoluyla oluşmaktadır.²¹³

Mostardi ve arkadaşları²¹⁴, 2.72µm boyutundaki CpTi partiküllerinin fibroblast hücrelerinin morfolojileri üzerindeki etkilerini in vitro şartlarda araştırmıştır. Kontrol grubu hücreleri iğsi yapıda ve uzun iken, CpTi partikülleri ile temasta veya çevrelenmiş olan hücreler daha yuvarlak ve kısa forma dönüşmüştür. Spesifik bir mekanizma tanımlanamamakla birlikte, partikül geometrisi, toksik iyonlar ve bu elementlerin redoks potansiyelinin, hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir.

Yamamoto ve arkadaşları²¹³, TiO₂ ve farklı seramik materyallerin partikül sayısı, yüzey alanı ve hacmi ile farklı şekil ve boyutlardaki TiO₂ partiküllerinden kaynaklanan

toksik özellikleri, L929 ve fare makrofaj hücreleri üzerinde araştırmışlardır. Dentritik, çubuk ve küresel şekilli TiO_2 partikülleri içerisinde toksisite yüksek olandan düşüğe doğru, dentritik, çubuk ve küresel şeklinde sıralanmıştır. Bu durum, keskin kenar ve yüzeylerin daha toksik olduğu görüşüyle uyumludur. Mevcut çalışmada partiküllerin toksisitesi hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile ölçülmüştür. Ancak, partikül toksisite mekanizmasının daha iyi anlaşılması için, partikül büyüklüğü ve geometrisinin, sitokin salınımı, ekstraselüler matriks ve enzim üretimi gibi spesifik hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisinin de araştırılması gerekmektedir. Partiküllerin fagositik mekanizmayı harekete geçirmesi, partikül toksisite çalışmalarında makrofaj hücre kültürlerinin L929 hücrelerine göre daha hassas sonuçlar vermesini sağlamaktadır.

Literatüre bakıldığında CAD-CAM yöntemiyle elde edilmiş grade 2 CpTi'nin sitotoksikite özelliklerini kısa veya uzun süreli olarak test etmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut literatürlerde, saf veya alaşımlanmış titanyumun toksik özelliklerini farklı kriterleri baz alarak değerlendirmiş çalışmaları bulmak mümkündür. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, titanyumun toksik özellikleri üzerinde materyal kompozisyonu ve elde ediliş yöntemlerinin, tercih edilen test metodunun ve değerlendirme kriterinin, kullanılan hücre hattının ve materyalin test öncesinde maruz bırakıldığı biyolojik ortamın ve yaşlandırma süresinin belli oranlarda etkisi vardır.

Metal destekli seramik veya tam seramik restorasyonların periodontal dokularla çok uzun süre temasta kalması, bu materyallerin uzun dönem başarısı açısından biyouyumluluk konusunu önemli hale getirmektedir.^{3,41}

Dental seramikler, kimyasal olarak inert bilinmektedir. Farklı porselenler farklı kimyasal yapıya sahiptir. Spesifik bir dental porselenin inert olma hali bütün seramik

materyallere genellenemez.²¹⁵ Porselenlerin bileşimleri ve mikroyapıları, içinde buldukları ortamın koroziv özellikleri, bu ortama maruz kalma süresi ve ortamın sıcaklığı gibi faktörler, dental seramiklerin kimyasal davranışını olumsuz etkilemektedir.^{216,217}

Tükrüğün pH'sı ve yapısı, besinlerin pH'sı, plak miktarı ve mide asitlerinin varlığı restoratif materyaller için ağız ortamını koroziv hale getirmektedir. Yüzey pürüzlülüğü, restorasyonla biyolojik çevrenin etkileşimini değiştirebilmektedir. Kimyasal stabilitenin bozulmasıyla da dental porselenlerden potansiyel olarak toksik inorganik iyonların salınımı artmaktadır.²¹⁵

Milleding ve arkadaşları²¹⁷, farklı kristal ve oksit seramiklerin sulu ve asidik ortamdaki korozyon davranışlarını araştırmış, Empress gibi kristal seramiklerin, zirkonyum ve alüminyum gibi oksit seramiklere göre korozyona daha yatkın olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmanın diğer bir önemli sonucu, tüm materyallerin az veya çok korozyona uğraması, bununla ilgili olarak da porselenlerin kimyasal olarak inert olmadığını ortaya koymasıdır.

Dental porselenlerin toksisitesinin bu materyallerden meydana gelen kitlesel kayıpla ilgili olduğu düşünülmektedir. Kitlesel kayıpla biyouyumluluk arasındaki bağlantıyı araştıran sadece birkaç çalışma^{217,218} bulabilmek mümkündür. Bu çalışmaların ortaya koyduğu sonuçlara göre farklı tip seramiklerden farklı oranlarda kitlesel kayıp oluşmaktadır ve bu durumun biyouyumluluğu nasıl etkilediği konusunda da çok az şey bilinmektedir. Seramiklerden kitlesel kaybın araştırılması, salınan elementlerin oksidasyonu gibi teknik problemlerle ve atomik absorpsiyon yöntemlerinin düşük hassasiyetlerinden dolayı zordur.⁴¹

Literatürde Empress 2 materyalinin in vitro toksik cevabını ölçen çok az sayıda çalışma vardır. Üretici firma bilgilerine göre, lityum disilikat ile güçlendirilmiş ısı-basınç sistemi porselenlerinin, direkt temas testine göre toksik potansiyelinin olmadığı belirtilmiştir.⁶¹

Jakovac ve arkadaşları²¹⁵, 4 farklı Empress seramik materyalinden sodyum, potasyum, silisyum ve alüminyum iyonlarının salınımını değerlendirmiş ve Empress 2 materyalini bu iyonların salınımı bakımından genelde daha stabil bulmuşlardır. Salınan iyon miktarları üreticilerin verdiği değerlerle uyumlu olmamakla birlikte toksik seviyenin de altında bulunmuştur. Çalışmada aynı zamanda Empress 2 materyalinin yapısında bulunan lityum gibi diğer iyonların da salınım ve toksik özelliklerinin araştırılması gerektiği vurgulanmıştır.

Messer ve arkadaşları⁴¹, güncel bazı seramiklerin in vitro toksik cevabını 3T3 hücre hattı kullanarak, direkt temas yöntemi ve MTT kullanarak araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları, yukarıda da ifade edildiği gibi seramik materyallerin biyolojik olarak inert olmadığını ve farklı seramik materyallerden farklı miktarlarda kitlesel kayıp oluştuğunu ortaya koymuştur. Söz konusu bu çalışma, Empress 2 için oldukça ilginç sonuçlar vermiştir. Çalışmada, materyaller başlangıç toksisite testine tabi tutulmuş ardından 1 ve 2 haftalık yaşlandırma yapılmıştır. Bu süre sonunda materyal yüzeyleri agresif aşındırmaya tabi tutulduktan hemen sonra tekrar toksisite değerlendirilmiş, ardından polisaj yapıldıktan sonra iki haftalık ikinci bir yaşlandırma yapılmış ve her basamakta toksisite testi tekrarlanmıştır. Çalışmaya göre başlangıç testinde en toksik materyal, Empress 2'dir. Ancak bu durum, yaşlandırma ile ortadan kalkmaktadır. Empress 2'nin toksik etkisi, agresif yaşlandırmayla geri gelmiş ve ardından yapılan iki haftalık yaşlandırma işlemi ile tekrar düşüş göstermiştir. Bu durum Empress 2'nin

biyolojik ortama maruz kaldıktan sonra biyolojik uyum özelliklerinin arttığını göstermiştir. Ancak diş fırçalama veya Empress 2 materyal yüzeyindeki koruyucu tabakanın uzaklaşmasına neden olabilecek günlük işlemler, Empress 2'nin yeniden toksik hale gelmesine neden olabilmektedir.

Messer ve arkadaşları⁴¹'nin yaptıkları çalışmanın ardından lityum disilikat ile güçlendirilmiş seramik restorasyonların in vitro toksik cevabını ölçen ikinci bir çalışma Brackett ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Brackett ve arkadaşları³⁸, iki farklı CAD-CAM ve üç farklı preslenebilir lityum disilikat materyalinin 3T3 fare fibroblastları üzerindeki toksik etkisini, direkt temas testi ile MTT kullanarak Messer ve arkadaşlarının uyguladığı test yöntemine benzer bir test stratejisi ile araştırmıştır. Bu çalışmaya göre, CAD-CAM lityum disilikat materyallerinin başlangıçtaki toksik etkisi yaşlandırma ile ortadan kalkmıştır. Polisaj işleminden sonra ise bir materyalde toksik cevap stabil hale geldiği halde diğer materyalde toksisite artmıştır. Preslenebilir materyallerde ise başlangıçtaki toksik cevap yüksektir ve 2 haftalık yaşlandırma işlemi sonunda toksisite azalmaktadır. 6 haftalık yaşlandırma süresinin sonunda preslenebilir üç lityum disilikat materyalinden ikisi 4. haftaya göre daha toksik hale gelmiştir. Polisajlama işleminden sonra, bu üç materyal de 6. haftaya göre biraz daha yüksek toksisite değerlerinde stabil hale gelmiştir.

Hem Messer ve arkadaşları⁴¹ hem de Brackett ve arkadaşları³⁸'nin lityum disilikat materyallerinin toksisitesiyle ilgili yaptığı in vitro çalışmalar, Empress 2'nin materyal üretim yöntemi ve küçük yapısal farklılıklardan bağımsız olarak başlangıçta biyolojik olarak riskli olduğunu ve bu etkinin yaşlandırma ile azaldığını göstermiştir. Çalışmalardaki dikkate değer diğer bir nokta ise bu materyallere uygulanan yüzey

işlemleri ile yaşlandırma işlem ve sürelerine bağlı olarak lityum disilikat materyalinin toksik cevabının dalgalı bir seyir izlediğini ortaya koymasıştır.

Bizim de çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar mevcut literatürle büyük oranda uyumluluk göstermektedir. Empress 2 materyali başlangıçta yüksek toksisite değerlerine sahipken yapay tükrükte 15 günlük yaşlandırma sonunda toksisite azalmış ancak, Brackett ve arkadaşları³⁸'nin çalışmasında olduğu gibi 30 günlük yaşlandırma sonunda toksik cevap artış göstermiştir. Brackett ve arkadaşları³⁸, preslenebilir lityum disilikat materyalinin toksisitesini 4. ve 6. haftanın sonunda ölçmüştür. Bu nedenle toksisite değerlerindeki artışın, 4-6. haftalar arasında tam olarak hangi zaman diliminde oluştuğunu bulmak mümkün değildir. Ancak 4. haftadan itibaren toksisitenin tekrar yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu tablo, bizim sonuçlarımızla birebir uyumludur. Lityum disilikat materyallerin toksisitesinin yaşlandırma periyodunun sonunda ilk yaşlandırma işlemine göre geri dönmesi, bu süre sonunda muhtemelen başlangıçta salınmayan bazı komponentlerin salınmasından kaynaklanmaktadır.³⁸

Toksisite değerlerinde 4. haftadan itibaren oluşan bu artış, Brackett ve arkadaşları³⁸'nin yaptığı çalışmaya göre biyolojik risk sınırlarının dışında kalmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre artış miktarı, başlangıçtaki gibi biyolojik risk oluşturabilecek düzeydedir. Toksisite değerlerindeki bu farklılığının, kullanılan hücre hattı ile değerlendirme yöntemlerindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz. Empress 2 materyali ile farklı biyolojik ortamlarda yapılacak daha uzun süreli yaşlandırma işlemleri, toksisitenin hangi süre sonunda kararlı hale geleceğini veya gelip gelmeyeceğini ortaya koyma adına önem taşımaktadır.

Lityum disilikat materyalin başlangıç toksisitesinin, materyalden doğal kitlesel kayıptan kaynaklanması muhtemeldir. Kitlesel kayıp miktarı ise materyalin içeriğiyle bağlantılıdır. İçeriğinde zirkonyum, çinko gibi farklı katkı elementleri içeren materyallerin kitlesel kayıp oranları da farklılık göstermektedir. Porselenlerde kitlesel kayıp miktarıyla ilgili diğer bir durum da materyal ile biyolojik ortam arasındaki iyon değişimidir.³⁸

Lityum disilikat materyallerin biyolojik cevabının tam olarak anlaşılabilmesi için, mikroyapısal özellikler, porözite, yapıdan hangi elementlerin salındığı, bunlardan hangilerinin hücre ölümüne neden olduğu ve hücre toksisitesinin hangi yollarla oluştuğu gibi hususların ayrıca araştırılmasına ihtiyaç vardır.^{38,41}

Kırılgan olmaları, estetik açıdan tatminkâr sonuçlar veren seramiklerin kuvvet dayanıklılığı gerektiren durumlarda kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Oksit seramikler içerisinde daha yüksek mekanik özellikler sunmasına rağmen bazı zirkonyum türleri, ısı ve nem varlığında hızlı yaşlanmaya uğramakta ve bu da zirkonyum restorasyonların başarısızlığıyla sonuçlanmaktadır.

Warashina ve arkadaşları²¹⁹, aralarında alaşım titanyum (Ti6Al4V) ve Y-TZP'nin bulunduğu bazı restoratif materyalleri, fare calvariası içine yerleştirerek bu materyallerin enflematuar cevabını araştırmışlardır. Titanyum, interlökin-1 β , interlökin-6 ve TNF- α gibi enflematuar öncüllerin salınımını önemli oranda arttırarak geniş osteolitik alanlar oluşturmuştur. Zirkonyum ise vücutta yabancı madde olarak algılanmakta ve buna bağlı olarak enflematuar cevap oluşturmaktadır. Zirkonyumun oluşturduğu enflematuar cevap, titanyum ile karşılaştırıldığında çok hafif kalmaktadır.

Ichikawa ve arkadaşları²²⁰, 10 mm uzunlukta ve 2 mm çapında hazırladıkları parsiyel stabilize zirkonyum örneklerin doku uyumluluğunu, Wistar farelerinde subkütanöz implantasyon testi ile araştırmışlardır. 3, 6, 12 aylık süre sonunda yapılan değerlendirmelerde zirkonyum etrafında oluşmuş olan ince fibröz kapsülün kalınlığının değişmediği görülmüştür. Kitlesel kaybı ölçmek için implantasyon öncesi ve sonrasındaki hassas ölçümlerde herhangi bir anlamlı fark bulunmamıştır. Histolojik kesitlerde yapılan incelemeler, parsiyel stabilize zirkonyumun subkütanöz dokular tarafından çok iyi tolere edildiğini göstermiştir.

Covacci ve arkadaşları²²¹, biyomateryal olarak kullanılan sinterize ve presinterize Y-TZP partiküllerinin mutajenik ve karsinojenik etkisini in vitro olarak araştırmış ve sonuçta her iki materyal türünün de biyolojik olarak güvenle kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

TiO₂, ZrO₂ ve Al₂O₃ materyallerin partikül sayısı, ebadı ve hacminin toksisite üzerine etkisini, L929 ve fare makrofaj hücreleri üzerinde araştırdıkları çalışmada Yamamoto ve arkadaşları²¹³, seramik partiküllerden kaynaklanan toksik cevabın iki farklı hücre hattında çok farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak, farklı hücre hatları üzerinde hücre proliferasyonunu engelleyen yaygın bir mekanizma sözkonusudur. Kimyasal toksisite, farklı hücre hatlarında farklı toksik cevaplar oluştururken seramik partiküllerin, benzer toksik profil oluşturması, bu materyallerin hücre proliferasyon mekanizmasını kimyasal toksisiteden farklı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Partiküllerin ebatları arasında bir karşılaştırma yapıldığında, partikül toksisitesinin, partikül ebatından bağımsız olduğunu ve toplam hacmin bu konuda belirleyici olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ko ve arkadaşları²²², makineleme yoluyla elde ettikleri saf titanyum ve Y-TZP seramik yüzeylerine osteoblast hücrelerinin yapışma ve çoğalmasını in vitro olarak araştırdıkları çalışmalarında her iki materyal için ilk 4 günde benzer değerler elde ederken 4. günden sonra zirkonyumda titanyuma göre biraz daha aktif bir hücre çoğalması gözlemlenmiştir.

Biyomateryal olan zirkonyumun diş hekimliğinden önce ortopedi alanında kullanılmaya başlanması, zirkonyumla ilgili biyouyumluluk çalışmalarının daha çok ortopedistler tarafından ve osteoblast hücre kültürleriyle yapılmasına yol açmıştır.

Josset ve arkadaşları²²³, alüminyumoksit ve zirkonyumun biyouyumluluk özelliklerini osteoblast kültüründe araştırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, her iki materyalin de toksik, mutajenik ve karsinojenik etkisi olmadığını ortaya koymuştur.

Uo ve arkadaşları²²⁴, 3Y-TZP seramiklerin toksik özelliklerini DNA sayımı ve alamar mavisi kullanarak özüt testi ile in vitro olarak araştırmış ve herhangi bir toksik etkiye rastlamamışlardır.

3Y-TZP, uzun yıllardır biyomateryal olarak kullanılmasına rağmen dental materyal olarak zirkonyumun biyouyumluluğunu araştıran sınırlı sayıda çalışma bulabilmek mümkündür. Zirkonyumla ilgili gerek fibroblast gerekse de osteoblast hücre kültürleriyle yapılan başlangıç toksisite çalışmaları genel olarak zirkonyumun toksik olmadığını göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, genel durumun aksine Yamamoto ve arkadaşları²¹³'ün yaptığı çalışmayla uyumluluk göstermektedir. Mevcut çalışmalarda, zirkonyumun biyolojik ortamda yaşlandırılmasıyla ilgili çalışmamızla benzer bir deney düzeneğine rastlamak mümkün değildir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre zirkonyum örneklerin toksik özellikleri yaşlandırma ile belirgin şekilde

değişim göstermektedir. Kısa süreli yaşlandırma biyoyum özelliklerine olumlu katkı sağlarken yaşlandırma süresinin uzaması toksisiteyi artırmaktadır. Materyaller üzerinde yaşlandırmanın ilk etkisi, toksik olabilecek labil elementlerin uzaklaştırılmasıyla biyolojik özelliklerdeki iyileşmedir. Zaman ilerledikçe biyolojik ortama maruz kalan restoratif materyallerden çözünme ve potansiyel olarak toksik elementlerin salınım miktarı artmaktadır. Bu durum, başlangıçta görülmeyen ancak zamanla ortaya çıkan toksisitenin nedeni olabilmektedir.

Lewis ve arkadaşları²⁰¹, çalışmalarında biyolojik çevrenin toksisite üzerinde kesin bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Buna göre materyal hangi ortama yerleştirilmiş ise materyalin yüzeyi ve bu materyalden salınan partiküller de ortamın özelliklerine göre değişik özelliklerde kaplanmaktadır. İkinci bir etken olarak materyalin yaşlandırılması, elemental salınım ve kitlesel kayıp miktarını, aynı zamanda materyalin pürüzlülüğünü artırmakta bu da hem kimyasal hem de mekanik toksisiteyi artırmaktadır.

Biyomateryal zirkonyumun kullanımını kısıtlayan en önemli faktör, materyalin maruz kaldığı hızlı yaşlanmadır. Hızlı yaşlanma (LTD), 60°C ve nemli ortamda veya 200°C'de oluşabilmektedir.^{220,225} Yaşlanmayla birlikte 3Y-TZP'nin yapısındaki yitrium yüzeyden koparak ayrılmakta ve bu süreç materyalin iç katmanlarına doğru yayılarak ilerlemektedir. Klinik tabloda da oluşabilen bu tür hızlı yaşlanma ürünlerinin biyolojik çevre üzerindeki etkileri ayrıca araştırılması gereken bir konudur.

İn vitro biyoyumluluk çalışmaları, organizmadan bağımsız olarak yapıldıklarından hayvan ve insan deneylerinin içerdiği legal ve etik problemlere sahip değildir. Ancak herhangi bir in vitro test düzeneğinde; kullanılan hücre tipi, sitotoksisite

değerlendirme yöntemi ve kriteri, materyal ile hücrelerin temas şekli, materyalin hazırlanma şekli ve yüzey özellikleri, test süresi ve yaşlandırma işlemlerinin elde edilen sonuçlar üzerinde belli oranlarda etkisi sözkonusudur. Bu nedenle yeni veya halen kullanımda olan materyallerin biyouyumluluk özellikleri hakkında tek bir yöntemle kesin bir hükme varmak mümkün değildir. Birbirinden farklı metodların ve klinik uygulamaya en yakın test prosedürlerinin uygulanması daha gerçekçi sonuçlara varılmasını sağlayacaktır. Ancak elde edilen sonucun yine de klinik tabloyu birebir yansıtamayacağına dikkat edilmelidir.

6 SONUÇ

Sabit protetik tedavide kullanılan farklı materyallerin sitotoksitelerinin in vitro olarak değerlendirildiği bu çalışmanın sonuçları şöyledir:

1. Başlangıç sitotoksosite testinin sonuçlarına göre, bütün materyaller belli oranlarda toksik bulunmuştur. Toksisite sıralaması; **Kontrol<Co-Cr<3Y-TZP<CpTi<Empress 2** şeklinde oluşmuştur.
2. Sitotoksosite testinden önce dental materyallerin biyolojik ortamda yaşlandırılması, uzun dönem toksisitenin daha net tahmin edilebilmesine olanak sağlamaktadır.
3. Yapay tükrükteki 15 günlük ilk yaşlandırma işlemi tüm materyallerin toksik cevabını olumlu yönde etkilemiştir. Bu süre sonundaki toksisite sıralaması ise; **Kontrol<Co-Cr<CpTi<3Y-TZP<Empress 2** şeklindedir.
4. Yapay tükrükteki yaşlandırma süresi uzadıkça toksisite de artmaktadır. 30 günlük yaşlandırma işlemi tüm materyallerin toksisitesini artırmış, toksisite sıralaması; **Kontrol<Co-Cr<3Y-TZP<CpTi<Empress 2** şeklinde oluşmuştur.
5. Üç deneyde de Empress 2 en toksik, Co-Cr ise en az toksik materyal olarak tespit edilmiştir.

7 KAYNAKLAR

1. Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent* 1993; 69: 406-415.
2. Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK, Bouillaguet S. Long-term cytotoxicity of dental casting alloys. *Int J Prosthodont* 1999; 12: 242-248.
3. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; 86: 203-209.
4. Wennberg A, Mjor IA, Hensten-Pettersen A. Biological evaluation of dental restorative materials--a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res* 1983; 17: 23-36.
5. Schmalz G. Modern concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Trans Acad Dent Mater* 1996; 9: 170-179.
6. Craig RG, Powers JM. *Restorative Dental Materials*. Missouri: Mosby, 2002:480-513.
7. Van Noort R. *Introduction To Dental Materials*. Edinburgh ; New York : Mosby: 2002: 221-230.
8. Roberts HW, Berzins DW, Keith Moore B, Charlton DG. Metal-ceramic alloys in dentistry: A review. *J Prosthodont* 2009; 18: 188-194.
9. Wataha JC, Messer RL. Casting alloys. *Dent Clin North Am* 2004; 48: 499-512.
10. Griggs JA. Recent advances in materials for all-ceramic restorations. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 713-727.
11. Wataha JC. Alloys for prosthodontic restorations. *J Prosthet Dent* 2002; 87: 351-363.

12. Roach M. Base metal alloys used for dental restorations and implants. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 603-627.
13. Haynes DR, Crotti TN, Haywood MR. Corrosion of and changes in biological effects of cobalt chrome alloy and 316L stainless steel prosthetic particles with age. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 167-175.
14. Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B. In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77: 962-966.
15. Molina C, Nogues LI, Martinez-Gomis J, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, et al. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes of various abrasivities. Part II: corrosion and ion release. *J Mater Sci: Mater Med* 2008; 19: 3015-3019.
16. Ardlin BI, Dahl JE, Tibballs JE. Static immersion and irritation tests of dental metal-ceramic alloys. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 83-89.
17. Luiz Bezzon O, Pedrazzi H, Zaniquelli O, Da Silva TBC. Effect of casting technique on surface roughness and consequent mass loss after polishing of NiCr and CoCr base metal alloys: A comparative study with titanium. *J Prosthet Dent* 2004; 92: 274-277.
18. Nogues LI, Martinez-Gomis J, Molina C, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, et al. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes with various abrasivities. Part I: wear behavior. *J Mater Sci: Mater Med* 2008; 19: 3041-3048.
19. Tuna S, Pekmez N, Keyf F, Canli F. The influence of the pure metal components of four different casting alloys on the electrochemical properties of the alloys. *Dent Mater* 2009; 25: 1096-1103.

20. Brown D. All you wanted to know about titanium, but were afraid to ask. *Br Dent J* 1997; 182: 393-394.
21. Lautenschlager EP, Monaghan P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J* 1993; 43: 245-253.
22. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int* 1996; 27: 401-408.
23. Contreras EF, Henriques GE, Giolo SR, Nobilo MA. Fit of cast commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy crowns before and after marginal refinement by electrical discharge machining. *J Prosthet Dent* 2002; 88: 467-472.
24. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater Sci Eng* 1998; A243: 231-236.
25. Oh K-T, Shim H-M, Kim K-N. Properties of titanium–silver alloys for dental application. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005; 74B: 649-659.
26. Shim H-M, Oh K-T, Woo J-Y, Hwang C-J, Kim K-NK. Corrosion resistance of titanium–silver alloys in an artificial saliva containing fluoride ions. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005; 73B: 252-259.
27. Zhang BB, Zheng Y, Liu Y. Effect of Ag on the corrosion behavior of Ti-Ag alloys in artificial saliva solutions. *Dent Mater* 2009; 25: 672-677.
28. Mark JJ, Waqar A. *Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices*. New York: Springer, 2007: 533-576.
29. Adhestop website. CP titanium. Available at:
www.medinfo.dist.unige.it/adhestop/cp_titanium.htm.
30. Niinomi M. Metallic biomaterials. *J Artif Organs* 2008; 11: 105-110.

31. Liua X, Chub PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng* 2004; R 47: 49-121.
32. Zhang Z, Tamaki Y, Hotta Y, Miyazaki T. Novel method for titanium crown casting using a combination of wax patterns fabricated by a CAD/CAM system and a non-expanded investment. *Dent Mater* 2006; 22: 681-687.
33. Cheng WW, Ju CP, Chern Lin JH. Structure, castability and mechanical properties of commercially pure and alloyed titanium cast in graphite mould. *J Oral Rehabil* 2007; 34: 528-540.
34. Paulino SM, Leal MB, Pagnano VO, Bezzon OL. The castability of pure titanium compared with Ni-Cr and Ni-Cr-Be alloys *J Prosthet Dent* 2007; 98: 445-454.
35. Okabe T, Ohkubo C, Watanabe I, Okuno O, Takada Y. The present status of dental titanium casting. *JOM* 1998; 24-29.
36. Lygre H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontol Scand* 2002; 60: 1-9.
37. Niinomi M. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metal Mater Trans A* 2002; 33A 477-486.
38. Brackett MG, Lockwood PE, Messer RL, Lewis JB, Bouillaguet S, Wataha JC. In vitro cytotoxic response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent Mater* 2008; 24: 450-456.
39. Denry IL. Recent advances in ceramics for dentistry. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7: 134-143.

40. Guazzato M, Albakry M, Ringer SP, Swain MV. Strength, fracture toughness and microstructure of a selection of all-ceramic materials. Part I. Pressable and alumina glass-infiltrated ceramics. *Dent Mater* 2004; 20: 441-448.
41. Messer RL, Lockwood PE, Wataha JC, Lewis JB, Norris S, Bouillaguet S. In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J Prosthet Dent* 2003; 90: 452-458.
42. Holand W, Rheinberger V, Apel E, van 't Hoen C, Holand M, Dommann A, et al. Clinical applications of glass-ceramics in dentistry. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17: 1037-1042.
43. Cattell MJ, Palumbo RP, Knowles JC, Clarke RL, Samarawickrama DY. The effect of veneering and heat treatment on the flexural strength of Empress 2 ceramics. *J Dent* 2002; 30: 161-169.
44. Sadowsky SJ. An overview of treatment considerations for esthetic restorations: A review of the literature. *J Prosthet Dent* 2006; 96: 433-442.
45. Denry IL, Lejus AM, Théry J, Masse M. Preparation and characterization of a new lithium-containing glass-ceramic. *Mater Res Bull* 1999; 34: 1615-1627.
46. Holand W, Schweiger M, Frank M, Rheinberger V. A comparison of the microstructure and properties of the IPS Empress 2 and the IPS Empress glass-ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 53: 297-303.
47. Nakamura T, Ohyama T, Imanishi A, Ishigaki S. Fracture resistance of pressable glass-ceramic fixed partial dentures. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 951-955.
48. Albakry M, Guazzato M, Swain MV. Influence of hot pressing on the microstructure and fracture toughness of two pressable dental glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 71: 99-107.

49. Fischer H, De Souza RA, Watjen AM, Richter S, Edelhoff D, Mayer J, et al. Chemical strengthening of a dental lithium disilicate glass-ceramic material. *J Biomed Mater Res A* 2008; 87: 582-587.
50. Della Bona A, Mecholsky JJ, Anusavice KJ. Fracture behavior of lithia disilicate- and leucite-based ceramics. *Dent Mater* 2004; 20: 956-962.
51. Taskonak B, Sertgoz A. Two-year clinical evaluation of lithia-disilicate-based all-ceramic crowns and fixed partial dentures. *Dent Mater* 2006; 22: 1008-1013.
52. Della Bona A, Kelly JR. The clinical success of all-ceramic restorations. *J Am Dent Assoc* 2008; 139 Suppl: 8S-13S.
53. Gorman CM, McDevitt WE, Hill RG. Comparison of two heat-pressed all-ceramic dental materials. *Dent Mater* 2000; 16: 389-395.
54. Rosenblum MA, Schulman A. A review of all-ceramic restorations. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 297-307.
55. Drummond JL, King TJ, Bapna MS, Koperski RD. Mechanical property evaluation of pressable restorative ceramics. *Dent Mater* 2000; 16: 226-233.
56. Conrad HJ, Seong WJ, Pesun IJ. Current ceramic materials and systems with clinical recommendations: a systematic review. *J Prosthet Dent* 2007; 98: 389-404.
57. Raigrodski AJ. Contemporary materials and technologies for all-ceramic fixed partial dentures: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 2004; 92: 557-562.
58. Albakry M, Guazzato M, Swain MV. Biaxial flexural strength, elastic moduli, and x-ray diffraction characterization of three pressable all-ceramic materials. *J Prosthet Dent* 2003; 89: 374-380.

59. Schmidt C, Weigl P. Machinability of IPS Empress 2 framework ceramic: Potential for ceramic dentures. *J Biomed Mater Res* 2000; 53: 348-352.
60. Ching WY, Li YP, Veal BW, Lam DJ. Electronic structures of lithium metasilicate and lithium disilicate. *Phys Rev B Condens Matter* 1985; 32: 1203-1207.
61. IPS e.max Press. Scientific Documentation. Ivoclar Vivadent. 2005.
62. Albakry M, Guazzato M, Swain MV. Effect of sandblasting, grinding, polishing and glazing on the flexural strength of two pressable all-ceramic dental materials. *J Dent* 2004; 32: 91-99.
63. Cattell MJ, Knowles JC, Clarke RL, Lynch E. The biaxial flexural strength of two pressable ceramic systems. *J Dent* 1999; 27: 183-196.
64. Aboushelib MN, De Jager N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Effect of loading method on the fracture mechanics of two layered all-ceramic restorative systems. *Dent Mater* 2007; 23: 952-959.
65. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999; 20: 1-25.
66. Tinschert J, Zvez D, Marx R, Anusavice KJ. Structural reliability of alumina-, feldspar-, leucite-, mica- and zirconia-based ceramics. *J Dent* 2000; 28: 529-535.
67. Mitov G, Lohbauer U, Rabbo MA, Petschelt A, Pospiech P. Investigations of subcritical crack propagation of the Empress 2 all-ceramic system. *Dent Mater* 2008; 24: 267-273.
68. Taskonak B, Mecholsky JJ, Jr., Anusavice KJ. Residual stresses in bilayer dental ceramics. *Biomaterials* 2005; 26: 3235-3241.

69. Pallis K, Griggs JA, Woody RD, Guillen GE, Miller AW. Fracture resistance of three all-ceramic restorative systems for posterior applications. *J Prosthet Dent* 2004; 91: 561-569.
70. Zhang D, Lu C, Zhang X, Mao S, Arola D. Contact fracture of full-ceramic crowns subjected to occlusal loads. *J Biomechanics* 2008; 41: 2995-3001.
71. Quinn JB, Quinn GD, Kelly JR, Scherrer SS. Fractographic analyses of three ceramic whole crown restoration failures. *Dent Mater* 2005; 21: 920-929.
72. Addison O, Marquis PM, Fleming GJ. Resin strengthening of dental ceramics- the impact of surface texture and silane. *J Dent* 2007; 35: 416-424.
73. Clelland NL, Ramirez A, Katsube N, Seghi RR. Influence of bond quality on failure load of leucite- and lithia disilicate-based ceramics. *J Prosthet Dent* 2007; 97: 18-24.
74. Pisani-Proenca J, Erhardt MCG, Valandro LF, Gutierrez-Aceves G, Bolanos-Carmona MV, Del Castillo-Salmeron R, et al. Influence of ceramic surface conditioning and resin cements on microtensile bond strength to a glass ceramic. *J Prosthet Dent* 2006; 96: 412-417.
75. Kumbuloglu O, Lassila LV, User A, Toksavul S, Vallittu PK. Shear bond strength of composite resin cements to lithium disilicate ceramics. *J Oral Rehabil* 2005; 32: 128-133.
76. Panah FG, Rezai SM, Ahmadian L. The influence of ceramic surface treatments on the micro-shear bond strength of composite resin to IPS Empress 2. *J Prosthodont* 2008; 17: 409-414.
77. Anusavice KJ, Lee RB. Effect of firing temperature and water exposure on crack propagation in unglazed porcelain. *J Dent Res* 1989; 68: 1075-1081.

78. Drummond JL, Thompson M, Super BJ. Fracture surface examination of dental ceramics using fractal analysis. *Dent Mater* 2005; 21: 586-589.
79. Wang H, Pallav P, Isgrò G, Feilzer AJ. Fracture toughness comparison of three test methods with four dental porcelains. *Dent Mater* 2007; 23: 905-910.
80. Heffernan MJ, Aquilino SA, Diaz-Arnold AM, Haselton DR, Stanford CM, Vargas MA. Relative translucency of six all-ceramic systems. Part I: Core materials. *J Prosthet Dent* 2002; 88: 4-9.
81. Heffernan MJ, Aquilino SA, Diaz-Arnold AM, Haselton DR, Stanford CM, Vargas MA. Relative translucency of six all-ceramic systems. Part II: Core and veneer materials. *J Prosthet Dent* 2002; 88: 10-15.
82. Chen YM, Smales RJ, Yip KH, Sung WJ. Translucency and biaxial flexural strength of four ceramic core materials. *Dent Mater* 2008; 24: 1506-1511.
83. Ardlin BI. Transformation-toughened zirconia for dental inlays, crowns and bridges: chemical stability and effect of low-temperature aging on flexural strength and surface structure. *Dent Mater* 2002; 18: 590-595.
84. Chevalier J, Gremillard L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *J Eur Ceram Soc* 2009; 29: 1245-1255.
85. McLean JW. Evolution of dental ceramics in the twentieth century. *J Prosthet Dent* 2001; 85: 61-66.
86. Qualtrough AJ, Piddock V. Ceramics update. *J Dent* 1997; 25: 91-95.
87. Janda R, Roulet JF, Wulf M, Tiller HJ. A new adhesive technology for all-ceramics. *Dent Mater* 2003; 19: 567-573.

88. Guazzato M, Albakry M, Ringer SP, Swain MV. Strength, fracture toughness and microstructure of a selection of all-ceramic materials. Part II. Zirconia-based dental ceramics. *Dent Mater* 2004; 20: 449-456.
89. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/periodyk/periodyk.html>.
90. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater* 2008; 24: 299-307.
91. Kosmac T, Oblak C, Jevnikar P, Funduk N, Marion L. Strength and reliability of surface treated Y-TZP dental ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 53: 304-313.
92. Hannink RHJ, Kelly PM, Muddle BC. Transformation toughening in zirconia-containing ceramics. *J Am Ceram Soc* 2000; 83: 461-487.
93. Kern M, Wegner SM. Bonding to zirconia ceramic: adhesion methods and their durability. *Dent Mater* 1998; 14: 64-71.
94. Christel P, Meunier A, Heller M, Torre JP, Peille CN. Mechanical properties and short-term in-vivo evaluation of yttrium-oxide-partially-stabilized zirconia. *J Biomed Mater Res* 1989; 23: 45-61.
95. Papanagiotou HP, Morgano SM, Giordano RA, Pober R. In vitro evaluation of low-temperature aging effects and finishing procedures on the flexural strength and structural stability of Y-TZP dental ceramics. *J Prosthet Dent* 2006; 96: 154-164.
96. Kelly JR, Denry I. Stabilized zirconia as a structural ceramic: an overview. *Dent Mater* 2008; 24: 289-298.
97. Burger W, Richter HG, Piconi C, Vatteroni R, Cittadini A, Boccalari M. New Y-TZP powders for medical grade zirconia. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8: 113-118.

98. Affatato S, Torrecillas R, Taddei P, Rocchi M, Fagnano C, Ciapetti G, et al. Advanced nanocomposite materials for orthopaedic applications. I. A long-term in vitro wear study of zirconia-toughened alumina. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 78B: 76-82.
99. Sundh A, Sjogren G. Fracture resistance of all-ceramic zirconia bridges with differing phase stabilizers and quality of sintering. *Dent Mater* 2006; 22: 778-784.
100. Drouin JM, Cales B, Chevalier J, Fantozzi G. Fatigue behavior of zirconia hip joint heads: experimental results and finite element analysis. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 149-155.
101. Piconi C, Burger W, Richter HG, Cittadini A, Maccauro G, Covacci V, et al. Y-TZP ceramics for artificial joint replacements. *Biomaterials* 1998; 19: 1489-1494.
102. Chevalier J, Deville S, Munch E, Jullian R, Lair F. Critical effect of cubic phase on aging in 3mol% yttria-stabilized zirconia ceramics for hip replacement prosthesis. *Biomaterials* 2004; 25: 5539-5545.
103. Manicone PF, Iommetti PR, Raffaelli L. An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications. *J Dent* 2007; 35: 819-826.
104. Chevalier J. What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials* 2006; 27: 535-543.
105. Deville S, Gremillard L, Chevalier J, Fantozzi G. A critical comparison of methods for the determination of the aging sensitivity in biomedical grade yttria-stabilized zirconia. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72: 239-245.

106. Silva NRFA, Coelho PG, Fernandes CAO, Navarro JM, Dias RA, Thompson VP. Reliability of one-piece ceramic implant. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009; 88B: 419-426.
107. Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Naujoks C, Wiesmann H-P, Kiattavorncharoen S, et al. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med* 2008; 11: 30.
108. Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin Oral Impl Res* 2007; 18: 662-668.
109. De Aza AH, Chevalier J, Fantozzi G, Schehl M, Torrecillas R. Crack growth resistance of alumina, zirconia and zirconia toughened alumina ceramics for joint prostheses. *Biomaterials* 2002; 23: 937-945.
110. Swab JJ. Low temperature degradation of Y-TZP materials. *J Mater Sci* 1991; 26: 6706-6714.
111. Tsubakino H, Matsuura N. Relationship between transformation temperature and time-temperature-transformation curves of tetragonal-to-monoclinic martensitic transformation in zirconia-yttria system. *J Am Ceram Soc* 2002; 85: 2102-2106.
112. Yasuda K, Arai S, Itoh M, Wada K. Influence of Y₂O₃ distribution on the rate of tetragonal to monoclinic phase transformation of yttria-stabilized zirconia during hydrothermal aging. *J Mater Sci* 1999; 34: 3597-3604.
113. Liang YM, Zhao JH. Effect of zirconia particle size distribution on the toughness of zirconia-containing ceramics. *J Mater Sci* 1999; 34: 2175-2181.

114. Luthardt RG, Holzhuter MS, Rudolph H, Herold V, Walter MH. CAD/CAM-machining effects on Y-TZP zirconia. *Dent Mater* 2004; 20: 655-662.
115. Kosmac T, Oblak C, Jevnikar P, Funduk N, Marion L. The effect of surface grinding and sandblasting on flexural strength and reliability of Y-TZP zirconia ceramic. *Dent Mater* 1999; 15: 426-433.
116. Curtis AR, Wright AJ, Fleming GJP. The influence of surface modification techniques on the performance of a Y-TZP dental ceramic. *J Dent* 2006; 34: 195-206.
117. Nakamura T, Wakabayashi K, Zaima C, Nishida H, Kinuta S, Yatani H. Tensile bond strength between tooth-colored porcelain and sandblasted zirconia framework. *J Prosthodont Res* 2009; 53: 116-119.
118. Wataha JC, Hanks C. Biocompatibility testing-what can we anticipate? *Trans Acad Dent Mater* 1997: 109-120.
119. Wataha JC. Biocompatibility of Dental Materials. In Anusavice KJ, ed. *Phillip's Science Of Dental Materials*. Missouri: Elsevier Science, 2003: 171-202.
120. Kenneth RSJ. Biocompatibility of dental materials. *Dent Clin North Am* 2007; 51: 747-760.
121. Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12: E258-266.
122. ISO 7405, 1997. 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.

123. Stanford JW. Recommended standard practices for cytotoxicity testing. FDI World Dental Federation in conjunction with International Standards Organization. *Dental J* 1980; 30: 141-173.
124. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Council on Dental Materials and Devices. *JADA* 1972; 84: 382-387.
125. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices. International Standards Organization. Geneva, Switzerland, 1997.
126. Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 145-154.
127. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-- does it have a role? *Int Endod J* 1988; 21: 50-58.
128. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 1996; 12: 186-193.
129. ISO 10993 part 5, 1999. International Standard 10993 "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods." International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.
130. Deliağa N. Farklı estetik materyallerle hazırlanan protetik restorasyonların hücre kültüründe sitotoksik etkilerinin incelenmesi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2002.
131. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1997; 1: 154-162.
132. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 1988; 21: 89-99.

133. Freshney RI. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1992:17-168.
134. Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Arciola CR, Savarino L, Stea S, et al. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices in vitro. *Toxicol In Vitro* 1999; 13: 801-810.
135. Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In Bourdeau P, ed. *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*: John Wiley & Sons, 1990: 75-97.
136. Hornez JC, Lefevre A, Joly D, Hildebrand HF. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomol Eng* 2002; 19: 103-117.
137. Nelson SK, Wataha JC, Lockwood PE. Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. *J Prosthet Dent* 1999; 81: 715-720.
138. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater* 1992; 8: 65-70.
139. Craig RG, Hanks CT. Reactions of fibroblasts to various dental casting alloys. *J Oral Pathol* 1988; 17: 341-347.
140. Wataha JC, Lockwood PE. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater* 1998; 14: 158-163.
141. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium. *J Dent Res* 1991; 70: 1014-1018.
142. Manaranche C, Hornberger H. Corrosion and biocompatibility of dental alloys. *Euro Cells Mater* 2005; 9: 35-36.

143. Schmalz G, Langer H, Schweikl H. Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. *J Dent Res* 1998; 77: 1772-1778.
144. 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* 2000; 84: 229-236.
145. Craig RG, Hanks CT. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 1990; 69: 1539-1542.
146. Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK. Initial versus subsequent release of elements from dental casting alloys. *J Oral Rehabil* 1999; 26: 798-803.
147. Sandrucci MA, Nicolin V, Casagrande L, Biasotto M, Breschi L, Di Lenarda R, et al. Preconditioning of dental alloys: Analysis of fibroblast proliferation and expression of fibronectin and chondroitin sulfate. *J Mater Sci* 2005; 40: 6233-6240.
148. Nelson SK, Wataha JC, Neme AL, Cibirka RM. Cytotoxicity of dental casting alloys pretreated with biological solutions. *J Prosthet Dent* 1999; 81: 591-596.
149. Wataha JC, Nelson SK, Lockwood PE. Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein. *Dent Mater* 2001; 17: 409-414.
150. Wataha JC, Lockwood PE, Khajotia SS. Effect of pH on element release from dental casting alloys. *J Prosthet Dent* 1998; 80: 691-698.
151. Nejatidanesh F, Savabi O, Yazdanparast A. An investigation on metallic ion release from four dental casting alloys. *J Dent* 2005; 2: 168-174.
152. Gal JY, Fovet Y, Adib-Yadzi M. About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta* 2001; 53: 1103-1115.

153. Leung VW, Darvell BW. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *J Dent* 1997; 25: 475-484.
154. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85: 162-169.
155. Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA, Lewis JB, Lockwood PE, Ergle JW, et al. In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investig* 1999; 3: 144-149.
156. Murphy WM. The testing of endodontic materials in vitro. *Int Endod J* 1988; 21: 170-177.
157. Özdemir KG. Farklı yumuşak astar materyallerinin sitotoksitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2007.
158. Kuşdemir M. Farklı dentin bağlayıcı ajanların dentin bariyer testi kullanılarak L929 hücreleri üzerine sitotoksitelerinin incelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Konya, 2007.
159. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 5665-5668.
160. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968; 18: 443-467.
161. Schmalz G. Agar overlay method. *Int Endod J* 1988; 21: 59-66.

162. Pollard JW, Walker JM. Basic Cell Culture Protocols. New Jersey: Humana Press Inc, 1997:48-160
163. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin component. *Dent Mater* 2002; 18: 318-323.
164. Tsaryk R, Kalbacova M, Hempel U, Scharnweber D, Unger RE, Dieter P, et al. Response of human endothelial cells to oxidative stress on Ti6Al4V alloy. *Biomaterials* 2007; 28: 806-813.
165. Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials* 1999; 20: 1647-1657.
166. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller KA, Schweikl H. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 86-91.
167. Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro* 2002; 16: 63-69.
168. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. In vitro synergistic, antagonistic and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1297-1309.
169. Imai Y, Watanabe A, Chang PI, Masuhara E. Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J Dent Res* 1982; 61: 1024-1027.
170. Hume WR. Methods of assessment in vitro of restorative material cytotoxicity using an intact human dentine diffusion step. *Int Endod J* 1988; 21: 85-88.

171. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J* 1988; 21: 143-154.
172. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res* 1985; 64: 613-620.
173. Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endodont* 1996; 22: 249-252.
174. Hanks CT, Diehl ML, Craig RG, Makinen PL, Pashley DH. Characterization of the "In Vitro Pulp Chamber" using the cytotoxicity of phenol. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 97-107.
175. Schmalz G, Schweikl H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using a standard toxicant. *J Endodont* 1994; 20: 592-594.
176. Schmalz G, Schweikl H, Eibl M. Growth kinetics of fibroblasts on bovine dentin. *J Endodont* 1994; 20: 453-456.
177. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989; 179: 1-7.
178. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 2005; 288: 369-376.
179. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 292-299.
180. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 1977; 56: 1285-1290.
181. Yaka E, Eğrilmez MY, Keskinoglu P, Cavdar Z, Genç Ş, Genç K, et al. Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (Bos) biyolojik belirteçler ve

- bos'un Pc12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi. Turk J Geriat 2006; 9: 1-7.
182. 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 2006; 160: 171-177.
183. 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 2000; 50: 598-604.
184. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacol 2008; 8: 8.
185. Khattak SF, Spataro M, Roberts L, Roberts SC. Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells. Biotechnol Lett 2006; 28: 1361-1370.
186. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicol In Vitro 2002; 16: 599-607.
187. 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.
188. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J Immun Meth 1983; 64: 313-320.
189. Mjor IA. Current views on biological testing of restorative materials. J Oral Rehabil 1990; 17: 503-507.

190. Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 71-84.
191. Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK, Rakich D. In vitro cytotoxicity of dental casting alloys over 8 months. *J Oral Rehabil* 1999; 26: 379-387.
192. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; 22: 6-11.
193. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AU, Ng ML. Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxic* 2005; 25: 101-108.
194. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 316-322.
195. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Fureder W, Sperr WR, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995; 74: 1513-1520.
196. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10: 73-77.
197. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater* 2003; 19: 25-31.
198. Tai Y, De Long R, Goodkind RJ, Douglas WH. Leaching of nickel, chromium and beryllium ions from base metal alloy in an artificial oral enviroment. *J Prosthet Dent* 1992; 68: 692-697.
199. Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, Larsen A, Bruun JM, Mygind T, et al. Cobalt-Chromium-Molybdenum alloy causes metal accumulation and

- metallothionein up-regulation in rat liver and kidney. *Bas Clin Pharma Toxicol* 2007; 101: 441-446.
200. Messer RL, Lucas LC. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. *Dent Mater* 1999; 15: 1-6.
201. Lewis AC, Ladon D, Heard PJ, Peto L, Learmonth I. The role of the surface chemistry of CoCr alloy particles in the phagocytosis and DNA damage of fibroblast cells. *J Biomed Mater Res* 2007; 82A: 363-372.
202. Prabhu A, Shelburne E, Gibbons DF. Cellular proliferation and cytokine responses of murine macrophage cell line J774A.1 to polymethylmethacrylate and cobalt–chrome alloy particles. *J Biomed Mater Res* 1998; 42: 655-663.
203. Al-Hiyasat AS, Bashabsheh OM, Darmani H. An investigation of the cytotoxic effects of dental casting alloys. *Int J Prosthodont* 2003; 16: 8-12.
204. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82: 457-476.
205. Cortada M, Giner L, Costa S, Gil FJ, Rodriguez D, Planell JA. Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11: 287-293.
206. Valentine-Thon E, Schiwara HW. Validity of MELISA for metal sensitivity testing. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 57-64.

207. Lalor PA, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MAR. Sensitivity to titanium. A cause of implant failure. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73-B: 25-28.
208. Tamai K, Mitsumori M, Fujishiro S, Kokubo M, Ooya N, Nagata Y, et al. A case of allergic reaction to surgical metal clips inserted for postoperative boost irradiation in a patient undergoing breast-conserving therapy. *Breast Cancer* 2001; 8: 90-92.
209. Tschernitschek H, Borchers L, Geurtsen W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal--a review. *Quintessence Int* 2005; 36: 523-530.
210. Koike M, Fujii H. In vitro assessment of corrosive properties of titanium as a biomaterial. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 540-548.
211. Wang RR, Li Y. In vitro evaluation of biocompatibility of experimental titanium alloys for dental restorations. *J Prosthet Dent* 1998; 80: 495-500.
212. Faria ACL, Rosa AL, Rodrigues RCS, Riberio R. In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2008; 85B: 504-508.
213. Yamamoto A, Honma R, Sumita M, Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J Biomed Mater Res A* 2004; 68: 244-256.
214. Mostardi RA, Meerbaum SO, Kovacic MW, Gradisar IA, Jr. In vitro response of human fibroblasts to commercially pure titanium. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 60-64.
215. Jakovac M, Zivko-Babic J, Curkovic L, Aurer A. Measurement of ion elution from dental ceramics. *J Eur Ceram Soc* 2006; 26: 1695-1700.

216. Milleding P, Wennerberg A, Alaeddin S, Karlsson S, Simon E. Surface corrosion of dental ceramics in vitro. *Biomaterials* 1999; 20: 733-746.
217. Milleding P, Haraldsson C, Karlsson S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J Biomed Mater Res* 2002; 61: 541-550.
218. Kokoti M, Sivropoulou A, Koidis P, Garefis P. Comparison of cell proliferation on modified dental ceramics. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 880-887.
219. Warashina H, Sakano S, Kitamura S, Yamauchi KI, Yamaguchi J, Ishiguro N, et al. Biological reaction to alumina, zirconia, titanium and polyethylene particles implanted onto murine calvaria. *Biomaterials* 2003; 24: 3655-3661.
220. Ichikawa Y, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo. *J Prosthet Dent* 1992; 68: 322-326.
221. Covacci V, Bruzzese N, Maccauro G, Andreassi C, Ricci GA, Piconi C, et al. In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomaterials* 1999; 20: 371-376.
222. Ko HC, Han JS, Bachle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dent Mater* 2007; 23: 1349-1355.
223. Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 481-493.
224. Uo M, Sjogren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 2003; 19: 487-492.

225. Sato H, Simada M. Transformation of yttria-doped tetragonal zirconia polycrystals (Y-TZP) by annealing in water. *J Am Ceram Soc* 1985; 68: 356-360.