

BİYOUYUMLULUĞUN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN TEST YÖNTEMLERİ

TEST METHODS FOR ASSESSING BIOCOMPATIBILITY

¹*Ülkü Tuğba KALYONCUOĞLU, ²Gülay Kansu

¹Dt. Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, ANKARA.

²Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, ANKARA.

Özet

Biyoyumluluk diş hekimliğinde dikkate alınması gereken güncel konulardan biridir. Diş hekimliğinde birçok biyoyumluluk testi kullanılmaktadır. Dental materyallerin neden olabileceği biyolojik yan etkilerin çeşitliliğine bağlı olarak, biyoyumluluğun değerlendirilmesi tek bir teste dayandırılmamalı, planlı ve yapılandırılmış bir yaklaşım (konsept) temel alınmalıdır. Bu derlemede çeşitli biyoyumluluk yaklaşımları anlatılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyoyumluluk, biyoyumluluk testleri, dental materyaller.

Abstract

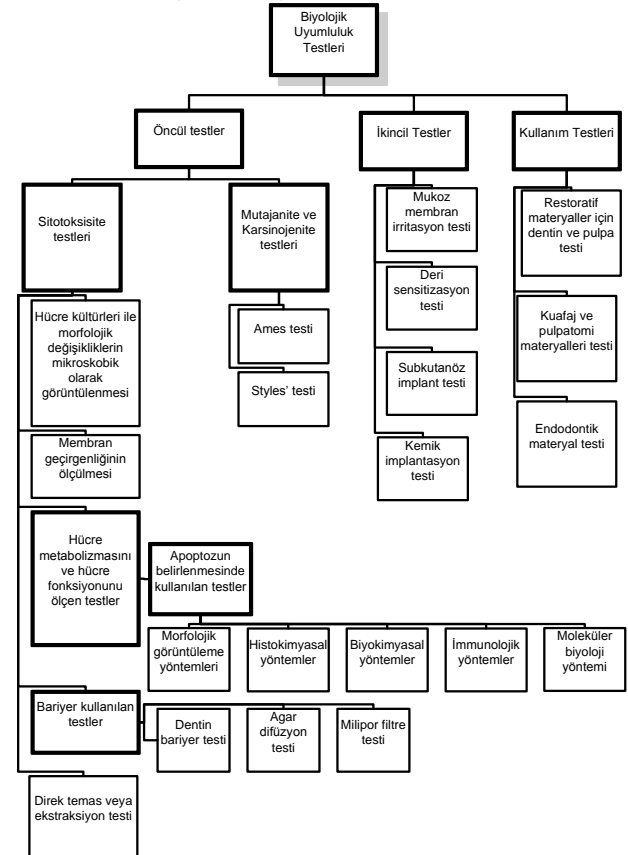
Biocompatibility is one of current issues in dentistry which must be considered. Many biocompatibility tests are used in dentistry. Due to the diversity of adverse biological effects which might be caused by dental materials, biocompatibility assessment cannot rely on a single test, has to be based on a planned and structured approach (concept). In this review many kinds of biocompatibility approaches is described.

Key words: Biocompatibility, biocompatibility tests, dental materials.

Giriş

Langeland adlı araştırmacının FDA standartlarında olan ve sonrasında da 1984'te ISO 7405 sayısı ile kabul edilen görüşünde, biyolojik testler: Öncül Testler; LD50 ağız içi testi, LD50 karın içi testi, Soluma testi, Hemolizis testi, Ames testi, Styles testi, Dominant letal test ve Sitotoksiste testi olarak, İkincil testleri: Kemik implantasyon testi, Oral müköz membran iritasyon testi, Sensitizasyon testi ve Subkutanöz implant testi olarak, Kullanım testlerini ise: Restoratif materyaller için pulpa ve dentin testi, Kuafaj ve pulpa materyalleri testi, Endodontik materyal testi ve Kemik içi implant materyal testi olarak sınıflandırılmıştır.^(1,2) Wataha⁽³⁾ da; in vitro, hayvan ve kullanım testleri olarak benzer şekilde bir sınıflama yapmıştır. Güncel literatürlerde adları sıklıkla geçen test yöntemlerini düzenli bir şekilde kapsamaları

nedeniyle Wataha tarafından yapılan bu sınıflandırma temel alınarak testlerle ilgili bilgi verilecektir. (Tablo 1)



Tablo-1: Biyoyumluluk testleri

*İletişim Adresi

Dr. Ülkü Tuğba TERZİ
Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, 06500
Beşevler-ANKARA.

Tel: 0-312-2965555

Faks: 0-312-2123954

e-mail: ulkutugbaterzi@gmail.com

A.Öncül Testler

Bu grupta yer alan in vitro testler test tüpü içerisinde, hücre kültür kabı kullanılarak veya canlı bir organizmanın dışında yapılır. Materyal veya materyalin bir bileşeninin bir hücre, enzim veya izole edilmiş başka bir biyolojik sistemle temas halinde yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Temas ya direkt materyalle temas eden hücre sistemi arasında bariyer olmaksızın ya da indirekt, arada bariyer bulunarak olabilir. Direkt temas testleri ayrıca materyalin hücreler içinde fiziksel olarak bulunduğu sistemler ve materyalden salınan maddelerin hücre sistemi ile temasta bulunduğu sistemler olarak ayrılabilir.^(4,5) In vitro testler ayrıca; sitotoksositeyi değerlendirenler, metabolik veya diğer hücre fonksiyonunu değerlendirenler ve hücredeki genetik materyal üzerindeki etkiyi değerlendirenler (mutajenezis testleri) olarak alt gruplara ayrılabilir. Kısa sürede sonuca ulaşılabilmesi, hayvan kullanım testlerinden daha ucuz olması, standardize ve tekrar edilebilir olması, geniş çapta taramaya imkan vermesi, hassas olması ve belli bilimsel sorularla kontrol edilebilir olması avantajlarıdır.^(3,6) Ayrıca bu testler dental materyallerin ağız içine yerleştirildikten sonra kısa sürede gösterdikleri toksik etkilerinin belirlenmesine de yardımcı olurlar; çünkü dental materyallerin çoğunun, bu safhada daha fazla toksisite sergilediği ve bu anlamda en uygun değerlendirme yönteminin in vitro yöntemler olduğu bildirilmektedir.⁽⁷⁾ Materyalin biyoyumluluğunun sadece in vitro testlerle değerlendirilemeyeceği unutulmamalıdır. Enflamatuar ve diğer doku koruyucu mekanizmaların in vitro çevrede bulunmaması in vivo'ya göre zayıf kalan yanıdır.⁽³⁾

Sitotoksosite testleri: Seçilen materyal veya parçasının uygun hücre kültürlerinde, negatif ve pozitif kontrol materyalleri kullanılarak, materyal uygulandıktan sonraki hücre büyüme oranı ve hücre tahribatı üzerindeki etkisi esas alınarak değerlendirme yapılan bir yöntemdir.⁽¹⁾ Dental materyallerin sitotoksik etkilerini ölçmek için birçok metot bulunmaktadır.⁽⁸⁾ Bunlardan bazıları; hayatta kalan hücrelerin sayılması, proliferasyon oranı ölçümü, hücresel makromoleküler aktivitenin belirlenmesi, hücrelerin enzim aktivitelerinin incelenmesi, hücre zarı bütünlüğü ve hücre metabolizması (DNA, RNA ve protein sentezi), Cilt / Volume 12 • Sayı / Number 2 • 2011

hücre morfolojisinde oluşan değişiklikler, ED50 'nin (Hücre büyümesini % 50 oranında azaltan doz) belirlenmesi, TC50 'nin (ortamındaki hücrelerin % 50'sinin yaşamasını sağlayan doz) belirlenmesidir.^(4,9,10,11)

ISO standartlarına göre ise değerlendirme; morfolojik anlamda hücre değişikliklerinin değerlendirilmesi, hücre hasarının ölçülmesi, hücre büyümesinin ölçülmesi, hücresel metabolizmanın spesifik yönden ölçülmesi şeklinde belirtilmiştir.^(12, 13) In vitro sitotoksosite testlerine ISO 10993-5'te değinilmiştir.⁽¹⁴⁾ Uygun protokolleri ise ISO 7405'te açıklanmıştır. Sitotoksosite testlerinde, hücre morfolojisinde, aktivitesinde ve membranındaki değişikliklere göre değerlendirme yapılabileceği gibi hücre proliferasyon oranlarındaki değişiklikler de göz önüne alınabilir. Membran değişiklikleri, canlı hücrelerde depolanan nötral kırmızı veya canlı hücrelerden salınan tripan mavisi gibi boyalarla belirlenebilmektedir. Hücre aktivitesini belirlemeye yönelik test sistemlerinde ise, belirli bir enzim, enzim grubu veya maddenin ölçülmesi ile değerlendirme yapılmaktadır.^(4,7) Son yıllarda dental materyallerin sitotoksosite değerlendirmelerinde sıkça kullanılan dehidrogenaz aktivitesini ölçmeye yönelik MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] değerlendirmesi⁽¹⁵⁾ ve fluorsein diasetat ile nonspesifik hidrolazların ölçülmesine yönelik değerlendirmeler hücre aktivitesini belirleyen testlere örnek olarak verilebilir.⁽⁴⁾ Hücre hasarının belirlenmesinde kullanılan en eski ve en yaygın yöntem hücre proliferasyon oranlarının ölçülmesidir.⁽⁷⁾ Bu tür geleneksel yaklaşımların dışında, materyallere karşı gelişen enflamatuar veya immun reaksiyonların da sitotoksosite değerlendirmelerinde belirleyici olarak kullanılmaya başlandığı görülmektedir.^(16,17) Değerlendirme amacıyla enflamatuar ve immun reaksiyonlar sırasında yüksek konsantrasyonlarda salınan sitokinlerin kullanımı ile umut verici sonuçlara ulaşıldığı belirtilmektedir.⁽¹⁸⁾ Yine son yıllarda, hücrelerin materyal yüzeyine adhezyonunu temel alan değerlendirmelerin de biyoyumluluk belirlemede kullanılabileceği bildirilmektedir.⁽¹⁹⁾

Hücre kültürleri ile morfolojik değişikliğin mikroskopik olarak görüntülenmesi: Bir materyalin sitotoksosite değerleri, materyalin hücrelerle teması önce

veya sonrasını takiben ölçülen hücre sayısı veya büyümesiyle değerlendirilir. Hücreler, hücre kültür kaplarının odacıkları içine yerleştirilir. Eğer materyal toksik değilse hücreler yapışmaya devam eder. Materyal sitotoksik ise hücreler büyümeyi durdurur ve sitopatik özellikler gösterir veya hücre kabından ayrılır.⁽³⁾ Günümüzde in vitro hücre kültürlerinde bazı sonuçların klinik koşullardan çok farklı olması nedeniyle, embriyonik organ kültürleri, odontoblast hücre kültürleri, diş kesit kültürleri gibi klinik duruma uygun seçimler yapılmaktadır.⁽²⁰⁾

Membran geçirgenliğinin ölçülmesi:

Bu yöntemin temel ölçmeye yakın bir hücrenin, hücre membranındaki geçirgenliğinin de artmış olması prensibine dayanır. Bu amaçla kullanılan belirli boyaların hücre membranını geçip geçememesine göre membranın geçirgen, yani hücrenin canlı veya ölü olduğu saptanır. Bu işlem için kullanılan vital boyalar aktif olarak canlı hücrelerden geçerler, nonvital boyalar hücre membranından geçemezler, sadece sitotoksikite sonucu geçirgenlik bozuldu ise geçebilir. Sıklıkla kullanılan vital boyalar radyoaktif olarak işaretlenmiş krom içeren Na₂CrO₄ ve nötral kırmızıdır. Nonvital boyalara örnek ise propidium iodide ve tripan mavisidir. Bu yöntemin avantajı hücrelerin canlı veya ölü olup olmadığı ayırımının mikroskop altında yapılmasıdır.^(21,7)

Hücre metabolizmasını ve hücre fonksiyonunu ölçen testler: Hücre metabolizmasıyla ilgili materyalin canlı dokuda hücre bazındaki yıkımı değerlendirilebilir. Genel olarak hücre canlılığındaki azalma hücre nekrozu ve apoptozu ya da diğer mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir.⁽²²⁾ Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler:

a.Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

Apoptozun saptanmasında ilk olarak kullanılan bu yöntem, apoptotik hücrelerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin çeşitli boyalar kullanılarak tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Hemotoksilen boyama, giemsa boyası, propidyum iyodür ve hoeschst boyası gibi çeşitli boyalar görüntüleme yöntemlerine göre seçilmektedir. Bu amaçla kullanılan görüntüleme tekniklerinde ise; ışık mikroskobu,

floresan mikroskop, elektron mikroskobu ve faz kontrast mikroskop kullanılmaktadır.⁽²³⁾

b.Histokimyasal yöntemler:

Apoptozun pek çok gen tarafından düzenlendiği, nekrozun ise toksik ya da fiziksel etkenlerle başlayan pasif dejeneratif bir olay olduğu, Bcl-2 ve kaspaz gibi enzimlerin apoptoza özgü olduğu düşünülmektedir. Histokimyasal yöntemler, bu enzimlerin veya apoptoza özgü olduğu düşünülen bazı hücresel değişikliklerin boyama yoluyla gösterilmesi temeline dayanır. Bu yöntemlere örnek olarak; Annexin V, M30, kaspaz3 ve Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) yöntemi sayılabilir.^(24,25) Bu yöntem tek tek hücrelerde apoptozu gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Kan hücreleri gibi sayıca çok olan hücrelerde kantitatif sonuçlar elde etmek için, aynı TUNEL tekniği flow sitometri ile de uygulanabilmektedir. Oldukça zaman alıcı ve karmaşık olmasına rağmen güvenilirdir.^(26, 27)

c.Biyokimyasal yöntemler:

Bu yöntemler apoptoza özgü olduğu düşünülen enzimlerin veya hücresel değişikliklerin varlığının, aktivasyonları gösterilerek tespit edilmesi esasına dayanır. Agoroz jel elektorforezi, Western Blotting ve flow sitometri örnek olarak sayılabilir.⁽²³⁾

d.İmmünolojik yöntemler:

Bu yöntemde hedeflenen proteinin antikor kullanılarak boyama yapılır. Hedeflenen protein enzim de olabilir, apoptotik hücrelerde meydana gelen spesifik DNA içindeki kırıklarda ortaya çıkan proteinler de olabilir. Bu yöntemler arasında Elisa ve florometrik yöntem sayılabilir.⁽²³⁾

e.Moleküler biyoloji yöntemi (DNA microarrays):

Bu yöntem henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Bu teknoloji ile kısa süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin mRNA'larının tespitinin mümkün olabileceği iddia edilmektedir. Böylece apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörleri hakkında geniş bilgi edinilebilecektir. Sitotoksik cevabı ölçen in vitro testlerin bazıları; hücrelerin biyosentetik veya enzimatik aktivitelerinin ölçülmesi yöntemini kullanırlar. DNA veya protein sentezinin değerlendirilmesi sık kullanılan

biyosentetik aktivite değerlendirme yöntemidir.⁽²³⁾

Hücre metabolizması ve fonksiyonlarını ölçen testler apoptotik aktiviteyi belirleyen testler dışında enzimatik aktiviteyi belirleyen testler şeklinde de olabilir. Bunlar; MTT, XTT [23-bis-2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide], NBT (Nitro blue tetrazolium) ve WST (Water-Soluble Tetrazolium salt)'dir. En çok kullanılan yöntem MTT olup, hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kalorimetrik yöntemle kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, çökmüş reaksiyon ürününün çözünür hale gelmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır.^(28,29,30,31) Van de Loosdrcht ve arkadaşları⁽³²⁾, MTT test yönteminin sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanışlı, hassas ve hızlı bir yöntem olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmadığını belirtmişlerdir. Wilson ve arkadaşları⁽³³⁾, MTT'den oluşan formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde edilen klinik sonuçların MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir⁽³⁴⁾. Son yıllarda alamar blue gibi boyalar, oksidasyon-redüksiyon indikatörü kullanarak hücre proliferasyonunu ölçmek amacıyla kullanılır. Sonuç olarak renk değişimi ve floresan işaretler ölçülür^(35,36).

Bariyer kullanılan testler: Birçok sitotoksitesite testi, materyal ve hücre kültürü ile direkt olarak temasta olacak şekilde planlanmıştır. Araştırmacılar in vivo olarak aslında materyal ve hücre arasında tam bir temasın olmadığını görmüşlerdir. Hücreler ve materyalin birbirinden ayrılması; dentin keratinize epitel veya ekstraselüler matriks aracılığıyla olmaktadır.⁽⁷⁾ In vivo koşulları taklit Cilt / Volume 12 • Sayı / Number 2 • 2011

etmek için geçerli çeşitli in vitro test yöntemleri geliştirilmiştir. Dentin bariyer, agar difüzyon testi, milipor filtre testi bu testlere örnektir. Direkt materyal hücre kontakının olduğu bu hücre kültür testinde, normalde materyal pulpa arasında bulunan dentin bariyeri taklit edilir. Materyalin dentinde çözünme kabiliyeti ve dentinal tübüllerden difüzyonunu test ederek, materyalin difüzyonal kapasitesine bağlı toksisitesinin ölçülmesine olanak tanır.⁽³⁷⁾

Dentin bariyer testi: Restoratif materyallerin pulpa üzerine sitotoksik etkilerini belirlemede, model kavite ve diş kavite yöntemlerinden sonra varılan nokta dentin bariyer testleridir. Dentin bariyer testlerinin geliştirilmesinde, toksik olaylara karşı dentinin koruyucu etkilerinin gösterilmesi yatmaktadır. Henüz gelişim aşamasındaki dentin bariyer testinin en önemli dezavantajları test sistemlerinin oturmamış olması ve dentin kesitlerinin standardizasyonundaki güçlüklerdir.^(18,7) Bu problemleri aşabilmek ve testin uygulanabilirliğini arttırmak amacıyla yeni düzeneklerin piyasaya sürüldüğü görülmektedir. Dentin bariyer testlerinde sitotoksitesite değerlendirilmeleri; belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında, canlı hücre sayımı⁽³⁸⁾ veya MTT ile enzim aktivitesindeki değişikliklere göre yapılmaktadır.⁽³⁹⁾

Agar difüzyon testi: Doku kültürü overlay testi olarak da adlandırılır.⁽³⁷⁾ Biyomateryallerin sitotoksitesite değerlendirmesinde standart prosedür olan, agar difüzyon test yönteminin amacı, katı materyallerden salınabilen bileşenlerin ve materyal ekstratlarının akut sitotoksitesitesinin belirlenmesidir.⁽²¹⁾ Agar difüzyon yönteminde biyolojik sistem olarak, fare fibroblastları kullanılmaktadır. Sitotoksitesite derecesinin belirlenmesi bireysel yorum gerektirmekle beraber, referans standart toksik ajanların kullanılması, yorumların daha tutarlı olmasına yardımcı olmaktadır. Rutin hücre kültür laboratuvarlarında düzenlenebilen bu teknikte, düşük maliyet, tüm bileşenlerinin ticari kaynaklardan kolayca elde edilebilmesi, tüm test prosedürlerinin kolay ve açık olması, sonuçların tekrarlanabilmesi ve elde edilen sonuçların insan ve hayvan çalışmaları ile ilişki kurabilmesine izin verebilmesi gibi standart test prosedürlerinde bulunması gereken temel özellikler karşılanabilmektedir. Ayrıca, bu

yöntemde hiçbir radyokimyasala veya pahalı donanım gereksinim duyulmaz.⁽⁴⁰⁾ Materyal veya ekstratlarının, hücre tabakasını kaplayan agara doğru difüze olma gerekliliği bakımından dezavantajlıdır. Bununla beraber materyaller klinik olarak çalışıldığında sitotoksik olmasa da çözünmez veya agara difüze olmazsa hücre hasara yol açacaktır.⁽³⁷⁾ Agar difüzyon yönteminde in vitro test sistemlerinin karakteristiklerinden kaynaklanan genel problemler gözlenebilmektedir; ancak bu yöntem ile elde edilen veriler sayesinde, diğer kullanım testlerine ait sonuçların daha iyi yorumlanmasının mümkün olacağı bildirilmiştir.⁽⁴⁰⁾

Millipor filtre testi: Filtre difüzyon test metodu, selüloz asetat filtre test metodu şeklinde de adlandırılan yöntem endirekt hücre materyal temasını esas alan materyalin fiziksel durumundan bağımsız bir sitotoksikite değerlendirme testidir.^(7,37) Sistemde, hedef hücreler filtrenin bir tarafında büyürken, test örneği filtrenin diğer tarafına yerleştirilerek test materyalinin oral kontakt durumunu belirtir. Filtre yüzeyi, hücrelerin tutunması ve büyüebilmesi için uygun koşulları sağlayabilecek özellikler sahiptir.^(21, 37) Testte, biyolojik sistem olarak insan epitel hücreleri (HeLa) veya fare fibroblastlarının kullanılacağı bildirilmiştir. Farklı biyolojik değerlendirme noktaları esas alınabilen ve hücrelerin enzim aktivitesindeki değişiklikleri gösterebilen bu test yöntemi, basit, hızlı ve tekrar edilebilir olması nedeniyle rutin kullanımda önerilir.⁽⁷⁾

Direkt temas veya ekstraksiyon testi: Materyal ekstratlarının toksisitesinin test edildiği bu teknikte, hücreler direkt olarak tek tabaka kültür içerisine 24 saatten uzun bir süre yerleştirilerek doz cevap eğrisiyle toksisite potansiyelleri değerlendirilir. Pratikteki dezavantajı, hücre ve koloni hesaplarının zaman alıcı, yorucu ve morfolojideki minor değişikliklere hassas olmasıdır. Hücre sayıları morfolojik olarak sağlam hücreleri belirtir; fakat canlı ve cansız hücreleri ayırt edemez.^(14, 37)

Mutajenite ve karsinojenite test yöntemleri: Mutajenite, hücre DNA'sını baz çiftlerinin sıralanmasındaki değişimi bir başka deyişle mutasyonunu tanımlar.⁽⁴¹⁾ Mutasyon oluşturucu maddeye "mutajen", bu olaya "mutajenite" adı verilmektedir.⁽⁴²⁾ Mutajenite Cilt / Volume 12 • Sayı / Number 2 • 2011

testleri bir materyalin, hücrenin genetik içeriği yani DNA'sı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılan test yöntemleridir. Bir materyal hücrenin genetik içeriğini çok çeşitli yollarla etkileyebilmektedir. Mutajen maddeler genotoksik mutajen, promutajen ve epigenetik mutajenler olarak türlere ayrılmaktadır.⁽⁴³⁾ Genotoksik mutajenler hücre DNA'sını çeşitli mutasyonlara uğratarak direkt olarak değiştirirler. Genotoksik kimyasallar doğal ortamlarında mutajen olarak bulunurlar, doğal ortamlarında herhangi bir mutajenite göstermeyen aktivasyon veya biyotransformasyon sonucu mutajenite kazanan kimyasallar veya mutajenlere ise promutajen adı verilmektedir. Epigenetik mutajenler ise hücre DNA içeriğini kendi başlarına değiştirmezler; fakat hücrenin biyokimyasını, immun sistemi değiştirir ve tümör oluşumunu destekleyerek mutajenite gösterirler. Karsinojenite, hücre DNA'sındaki değişikliklerin, bir hücrenin uygun olmayan şekilde büyümesine ve bölünmesine yol açması anlamına gelir.⁽⁴⁴⁾ Bir başka deyişle; in vivo olarak kanser neden olma yeteneği olarak tanımlanabilir.⁽⁴³⁾ Mutajenler karsinojen olabilir karsinojenler de aynı şekilde mutajen olabilmektedir. Bu nedenle, karsinojenite ve mutajenite ölçümü yapan testler oldukça kompleks yapıdadır. Biyoyumlu olmayan materyallere uzun süre maruz kalmanın bitişik hücrelerde neoplastik değişikliklere yol açabileceği ileri sürülmüştür.⁽²⁰⁾ ANSI/ADA sınıflamasına göre Ames testi ve Styles hücre transformasyon testi olmak üzere sadece iki mutajenite testi tanımlanmıştır.⁽⁴³⁾ Hücre kültürleri üzerinde yapılan bu testler ile hücredeki mutasyon farklılıkları gözlenerek, materyalin toksisite potansiyeline karar verilir. Ames testi en sık kullanılan mutajenite testidir. Testte histidin içermeyen ortamlarda büyümeyen "Salmonella Typhimurium" adlı bakteri türünün histidin amino asitini üretmemesine sebep olan bir genetik bozukluk taşıyan suşu kullanılır. Histidin içermeyen bir petri kabına S. Typhimurium konulur (yayılır). Daha sonra aynı kaba karsinojenliği test edilmek istenen madde eklenir. Eğer madde mutajen ise kaptaki bazı bakteri hücrelerinde tesadüfen histidin geninin yeniden aktif olmasını sağlayacak bir geri mutasyona sebep olur ve petri kabında bakteri kolonilerinin oluştuğu gözlenir. Böylece o madde için test sonucu pozitif olur ve seçilen kimyasal maddenin

mutajenik potansiyeli hakkında bir indeks elde edilir. Son yıllarda *Salmonella typhimurium*ün prokaryotik bir hücre olması ve dolayısıyla ökaryotik insan hücreleri için yeterli bir model olmaması sebebiyle ökaryotik hücreler olan maya hücreleri de kullanılmaya başlanmıştır. Genetik materyalin değişmesi sebebiyle bu şekilde değişimi gerçekleştirebilen kimyasalların memeliler üzerinde oldukça karsinojen oldukları tespit edilir. (45,46,43) Mutajenite ölçmek için kullanılan diğer bir test ise Styles hücre transformasyon testidir. Bu test yöntemi potansiyel karsinojenlerin standardize hücre kültürlerini transforme edebilme yeteneğini ölçer. Normalde fibroblastlar agar jelin üzerinde üreyemezler; fakat genetik olarak transforme olmuş hücreler jel yüzeyinin altından üremeye devam eder. Transforme olan fibroblastların bu karakteristiği, bu hücrelerin in vivo olarak tümör oluşturabilmesi anlamına gelir. Bu test sistemlerinde BHK, HeLa, W1-38, Chang olmak üzere dört farklı memeli hücresi kullanılmaktadır. (43)

B. İkincil Testler:

Biyoyumluluk için kullanılan hayvan testlerinde çok çeşitli hayvanlar kullanılsa da sıklıkla fare, sıçan, hamster ve guinea pig gibi memeliler kullanılmaktadır. Deney hayvanları tüm biyolojik sistem ve materyal arasında karmaşık etkileşimlerin oluşmasına izin vermesi bakımından avantajlı bir yaklaşımdır. Hayvan testleri in vitro testlere göre daha anlamlı ve karmaşıktır; fakat bu testlerin çok pahalı, kontrol edilmelerinin zor ve zaman alıcı olmaları gibi birçok dezavantajı vardır. Sıklıkla kullanılan hayvan testleri mukoz membran irritasyon testi ve deri sensitizasyon testidir. (47) Wataha (3) biyoyumluluk testlerinin sınıflandırmasını yaparken ikincil testler maddesini hayvan testleri olarak nitelemiştir; ancak bu grup altında bahsi geçen deri testleri (patch, stratch... vs) insanlar üzerinde etik çalışmalar dahilinde uygulandığı için ikincil testler olarak da ele alınabilir. Langeland ve Schmalz da bu grubu ikincil testler başlığı altında incelemiştir.

Mukoz membran irritasyon testi: Bu test bir materyalin mukoz membranda veya abrade edilmiş deri üzerinde enflamasyon yapma kapasitesini ölçer. Test boyunca pozitif kontroller, negatif kontroller ve materyal, hamster yanak cebi dokusu veya tavşan ağız Cilt / Volume 12 • Sayı / Number 2 • 2011

dokusu ile temasta olacak şekilde yerleştirilir. Yerleştirilmeyi takiben birkaç hafta içinde kontroller ve test alanı incelenir, doku reaksiyonları kaydedilir ve fotoğraflanır. (47)

Deri sensitizasyon testi: Bu testlerde guinea pig kullanılır ve materyal deri içine enjekte edilerek deride hipersensitizasyon oluşturup oluşturmadığı test edilir. Bu enjeksiyonu takiben test materyalini içeren yapışkan patch (yamalar) kullanılarak ikinci teste geçilir. (1,48,49) İlk testte hipersensitizasyon gelişti ise ikinci test enflamatuar cevabın ortaya çıkmasını sağlar. Patch testinde oluşan reaksiyonun derecesi ve reaksiyon gösteren hayvanların yüzdesi bir materyalin alerji potansiyelinin temel göstergesidir. (48,49) Bu testin insanlarda uygulanması pratikte mümkün değildir; çünkü duyarlılaştırma işleminden sonra kullanılan materyale karşı duyarlılık yıllar sürebilir ve bireyin söz konusu madde ile her karşılaşmasında şiddetli reaksiyonlar görülebilir; fakat insanlarda alerjen maddenin belirlenmesinde çeşitli yöntemler vardır. Bunlardan deri testleri: çizik testi (scratch test), delme testi (prick test), deri içi testi, konjunktiva testi, kontakt dermatitis için kullanılan yama testi (patch test) olmak üzere başlıca 5 tiptir. (1)

Subkutanöz implantasyon testi:

Deney hayvanı olarak seçilen rat, guinea pig ve hamster'ların deri altında derin dermis bölgesine, doğrudan plakalar şeklinde, polietilen ya da teflon tüpler içinde veya çubuk şeklinde hazırlanan test örneklerinin trokar yardımıyla, cerrahi yöntem kullanılarak yerleştirilmesi esasına dayanır. Deney periyodu olarak, Mitchell tarafından önerilen 7, 30, 90 günlük sürelerle genellikle uyulur. Bu sürenin sonunda deney örnekleri, çevresindeki bir miktar sağlam dokuyla birlikte çıkarılarak histopatolojik inceleme yapılır. (1)

Kemik implantasyon testi: Endodontik materyaller ve implant materyalleri için kullanılabilir. Standart bir yöntem olmamakla beraber, materyalin direkt olarak kemik içine implantasyonu esasına dayanır. (1)

C. Kullanım Testleri:

Kullanım testleri, herhangi bir materyalin gönüllü insanlarda veya insana yakın yüksek memeli sınıftan hayvanlarda, klinik olarak

kullanılması hedeflenen alana yerleştirilmesi sonrasında materyale verilen cevapların gözlenmesi esasına dayanmaktadır. ⁽¹⁾ Değerlendirme prelinik kullanım testleri olarak adlandırılır; insanlar üzerinde yapılan testlere ise klinik kullanım testleri adı verilir. ⁽⁸⁾ Bu testler materyallerin klinik kullanımı ile birebir aynı olacak şekilde yerleştirilmesi ile hayvan testlerinden ayrılırlar. Ayrıca materyalin klinik kullanımını zaman, yer, çevre ve yerleştirme tekniği bakımından taklit edilmesi sebebiyle en uygun test yöntemidir. ^(49,2) Bu testlerde insana en yakın ağız dokularına sahip köpek ve maymun gibi hayvanlar kullanılmaktadır. ^(50,43) Kullanım testleri altın standart testlerdir, yani materyalin biyouyumluluğuna dair kesin sonucu verirler. Fakat çok pahalı ve zaman alıcı oldukları, ayrıca birçok yasal ve etik prosedür gerektirdikleri ve kontrolleri zor oldukları için kullanımları sınırlıdır. Diş hekimliğinde pulpa, periodonsiyum, dişeti ve mukoza dokuları sıklıkla hedef dokular olarak kullanılırlar. Bu amaçla kullanılan testlerin başlıcaları, diş pulpa iritasyon testi ve kemik implantasyon testidir. ^(43,51) Restoratif materyaller için pulpa ve dentin testi, kuafaj ve pulpatomi materyalleri testi ve endodontik materyal testi de diş hekimliğinde materyal biyouyumluluğunda rutin kullanılan materyal testlerindedir. ^(1, 52)

Kaynaklar

1. Kansu G. Ağızda kullanılan muhtelif metal alaşımlarının biyolojik yönden uyumluluklarının toksik ve alerjenik potansiyeller yönünden değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara. 1991
2. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin. Oral Invest.* 1997; 1: 154-162.
3. Wataha JC. Biocompatibility of dental materials. In: *Restorative Dental Materials*. Ed.: Craig, R.C., Powers, J.M., 11th Ed., Philadelphia: C.V. Mosby Co., 2002 ;pp: 125-162 (Chapter 5).
4. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations (Suppl.). *J. Dent.* 1994;22: 6-11.
5. Craig RG, Ward ML. Restorative Dental Materials. (10th Ed.) Mosby Inc., Chapter 7.1997;pp: 146-151.
6. Koulaouzidou EA, Helvatoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *Eur. J. of Dent.*, 2009;3: 3-9.
7. Demir E. Hipoalerjenik akrilik kaide materyallerinin fibroblastlar üzerinde apoptoz ve nekroza dayalı sitotoksikite değerlerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara.2007.
8. Murray F, Garcia-Godoy C. Comparison of the clinical and preclinical biocompatibility testing of dental materials: are the ISO usage tests meaningful? *J.Biomed Mater. Res. A.*, 2007; 81: 51-58.
9. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci.*, 1998; 106: 696-706.
10. Geursten W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2000; 11:333-355.
11. Zorba YO, Yıldız M. Adeziv restoratif materyallerde biyouyumluluk testleri ve kriterleri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.*, 2007; 2: 15-2.
12. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wanger M, Köhler H, van Kooten TG, Klein CL, Otto M. Current trends in biocompatibility testing. *Proc. Instn. Mech. Engrs.* Part H., 1998; 212: 75-84.
13. International Organisation for Standardization. ISO 10993-4 Selection of tests for interactions with blood, 1999; p. 3, Subsection 6.1.6 (International Standardization Organization, Geneva).
14. International Organisation for Standardization. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Test For In Vitro Cytotoxicity. Switzerland, ISO 1999:1-9.
15. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblast. *J. Endod.*, 2000; 26: 288-291.
16. Koh ET, McDonald F, Ford TRP, Torabinejad, M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 1998; 24: 543-545.
17. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Effect of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2003; 95: 739-745.
18. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent. Mater.*, 1996; 12: 186-193.
19. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LSW. Adhesion of human osteoblasts on root- end filling materials. *J. Endod.*, 2000; 26: 404-406.
20. Kenneth RSJ. Biocompatibility of Dental Materials. *Dent. Clin. of N. Am.*, 2007;51: 747-760.
21. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endod. J.*, 1988; 21: 89-99.
22. Göktepe İ, Can G. L 929 fare fibroblastlarının canlılığı üzerine dental döküm alaşımlarının etkisi. *A. Ü. Diş Hek. Fak. Derg.*, 2007; 34: 53-59.
23. Ulukaya E. biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf (Erişim Tarihi: 24.03.2009)
24. Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 2000; 55: 1081-1093.
25. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res.*, 2000; 301: 19-31.
26. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, De Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labelling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 1998; 152: 885-892
27. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in human disease. *J. Intern. Med.*, 2005; 258: 479-517.
28. Sjögren G, Sletten GBG, 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.
29. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effect of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int. J. Prosthodont.*, 2001; 14: 439-443.
30. Lönnroth EC, Dahl, J. E. Cytotoxic effects of liquids and powders of one bonding materials, one temporary material, and four glass ionomer. *Act. Odont. Scand.*, 2003; 61: 52-56.
31. Issa Y, Watts ADC, 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.
32. Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkopple GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified calorimetric MTT assay. A methodological study. *J. Immunol. Methods*, 1991; 141: 15-22.

33. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br. J. Cancer.*, 1990; 62: 189-194.
34. Sipahi C, Özen J, Ural AU, Dalkız M, Beydemir B. Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2005; 47: 275-278.
35. Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent. Mater.*, 2003; 19: 487-492.
36. Kreisler M. et. Al. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system. *Clin. Oral Implants Res.*, 2005; 16: 36-43.
37. Murray PE, Garcia-Godoy C, Garcia-Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2007; 12: 258-266.
38. Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endod.*, 1996; 22: 249-252.
39. Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J. Endod.*, 2002; 28: 188-192
40. Schmalz G. The agar overlay method. *Int. Endod. J.*, 1988; 21: 59-66.
41. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J. Prosthet. Dent.*, 2001; 86: 203-209.
42. Vural N. Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniv. Basımevi, 1996; Bölüm 1.
43. Powers JM, Sakaguchi RL. Craig's Restorative Dental Materials, 12th ED., Mosby Inc. 2006
44. Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J. Prosthet. Dent.*, 2000; 83: 223-234
45. Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AH Plus in the Ames test. *Clin. Oral Investig.*, 1998; 2: 125-129.
46. Milić I, Jukić S, Anić I, Zeljezić D, Garaj-Vrhovac V. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH PLUS sealers. *Int. Endod. J.*, 2003; 36: 330-335.
47. Kansu G, Aydın AK. Evaluation of the biocompatibility of various dental alloys: Part 1—Toxic potentials. *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.*, 1996a; 4: 129-136.
48. Kansu G, Aydın AK. Evaluation of the biocompatibility of various dental alloys: Part 2 – Allergenic potentials. *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.*, 1996b; 4: 155-161.
49. Kaverna L, Jolanki R, Estlander T. 10 Years of patch testing with the (meth)acrylate series. *J. Cont. Derm.*, 1997; 37: 255-258.
50. Schmalz G, Thonemann B, Riledel M, Elderton RJ. Biological and clinical investigations of a glass ionomer base material. *Dent. Mater.*, 1994; 10: 304-313.
51. Mjör IA. Minimum requirements for new dental materials. *J. Oral Rehab.*, 2007; 34: 907-912.
52. Terzi Ü.T., Kansu G. Diş hekimliği ve biyouyumluluk. *Dicle Diş Hek. Derg.*, 2010; 11(1): 66-70.