

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİŞ MACUNLARININ
SİTOTOKSİK VE MUTAJENİK ETKİLERİ

Dt. İsmail SERDAROĞLU

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdulkadir ŞENGÜN

2015 – KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Restoratif Diş Tedavisi Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/12/ 2015

İmza

Prof. Dr. Ç. Türksel DÜLGERGİL

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Abdulkadir ŞENGÜN

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Üye

Doç. Dr. Emine Şirin KARAARSLAN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Doç. Dr. Esra ULKER

Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Eren YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VII
Tablolar	VIII
Fotoğraflar	X
Grafikler	XI
ÖZET	1
SUMMARY	2
1 GİRİŞ	3
1.1 Diş Macunlarının İçeriği ve Sitotoksik ve Mutajenik Etkileri	3
1.1.1 Aşındırıcılar	3
1.1.2 Nemlendiriciler	4
1.1.3 Deterjanlar	4
1.1.4 Bağlayıcı Ajanlar	6
1.1.5 Tatlandırıcı ve Esanslar	6
1.1.6 Terapötik Ajanlar	7
1.2 Amaç	14
1.3 Hipotez	14
2 GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1.1 Hücrelerin Hazırlanması	16
2.1.2 Diş Macunlarının Uygulanması	18
2.1.2.1 Diş Macunları	18
2.1.2.2 Diş Macunlarının Stok Solüsyonunun Hazırlanması	18

2.1.3 Metil Tetrazolyum Testi	20
2.1.4 MTT Solüsyonlarının Hazırlanması	21
2.2 RTCA (Real Time Cell Analysis)	23
2.2.1 Hücrelerin Hazırlanması	24
2.2.2 RTCA E-Plate'lerin Hazır Hale Getirilmesi	25
2.2.3 Diş Macunlarının Uygulanması	26
2.3 Mikronükleus Testi	27
2.3.1 IC 50 Değerleri	28
2.3.2 Hücrelerin Hazırlanması	29
2.3.4 Diş Macunlarının Uygulanması	30
2.4 İstatistiksel Yöntem	32
3 BULGULAR	34
3.1 MTT Sonuçları	34
3.2 RTCA Sonuçları	55
3.2.1 24 Saat Sonrası RTCA	61
3.3 Mikronükleus Sonuçları	67
4 TARTIŞMA VE SONUÇ	72
5 KAYNAKLAR	81
7 ÖZGEÇMİŞ	91

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince değerli bilgisi ile hep yanımda olup, her türlü desteği veren ve bana yol gösterici olan danışman hocam Prof. Dr. Abdulkadir ŞENGÜN'e;

Doktora eğitimim süresince her zaman sabırla bilgi ve tecrübelerini aktaran Prof. Dr. Ertuğrul ERCAN, Prof. Dr. Ç. Türksel DÜLGERGİL ve Doç. Dr. Ahmet YEŞİLYURT'a;

Laboratuvar araştırmalarım süresince Tıbbi Genetik Laboratuvarını açarak bana her türlü desteği sağlayan Turgut Özal Üniversitesi Yönetimine, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Esra GÜNDÜZ'e, Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na ve Bilge KALYONCU'ya, Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan ACAR ve Ali AZZAWRI'ye, istatistiksel analizlerin yapılmasında ve yorumlanmasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Mehmet Kaya'ya;

Hayatım boyunca her zaman sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim aileme;

Doktora eğitimim süresince destekleri için çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma;

Teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HCl	: Hidroklorik asit
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
MN	: mikronükleus
MTT Assay	: Metil Tetrazolyum Testi [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide]
nM	: nanomolar
PVM/MA	: Poli (metil vinil eter / maleik anhidrit)
RNA	: Ribonükleik asit
RTCA	: Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SHN	: Sakkarin
SLS	: Sodyum Lauril Sülfat
TCS	: Triklozan
TUNEL	: Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Numunelerin 96'lık plate'e yerleştirilmesi.....	20
Şekil 2.2 Numunelerin xCELLigence E-Plate'lere yerleştirilmesi.....	27

TABLolar

Tablo 1.1 Diş macunlarının yaklaşık yüzdesel içeriği.....	3
Tablo 2.1 Çalışmada kullanılan diş macunları.....	18
Tablo 2.2 Diş macunu numunesinin farklı konsantrasyonları.....	19
Tablo 2.3 Diş macunlarının IC 50 değerleri.....	28
Tablo 3.1 MTT sonuçları, 24-48-72 saat uygulaması.....	34
Tablo 3.2 GC Tooth Mousse'un tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları.....	35
Tablo 3.3 Signal'in tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları.....	37
Tablo 3.4 Colgate'in tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları.....	39
Tablo 3.5 Paradontax'ın tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları.....	41
Tablo 3.6 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %1 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri.....	43
Tablo 3.7 %1 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)	43
Tablo 3.8 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,50 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri.....	44
Tablo 3.9 %0,50 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi).....	44
Tablo 3.10 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,10 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri.....	45
Tablo 3.11 %0,10 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi).....	45
Tablo 3.12 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,05 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri	46
Tablo 3.13 %0,05 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi).....	46
Tablo 3.14 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,01 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri	47
Tablo 3.15 %0,01 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi).....	47
Tablo 3.16 RTCA sonuçları, 24-48-72 saat uygulaması.....	55
Tablo 3.17 Diş macunlarından bağımsız dönemler için tek örneklem Kolmogorov-Smirnov normal dağılıma uygunluk testi.....	55

Tablo 3.18 RTCA sonuçlarına göre aynı diş macunu için tüm konsantrasyonların karşılaştırılması	56
Tablo 3.19 RTCA sonuçlarına göre aynı diş macununun tüm konsantrasyonlarının ve ikili karşılaştırmalarının P değeri.....	57
Tablo 3.20 RTCA sonuçlarına göre aynı konsantrasyon için farklı diş macunlarının karşılaştırılması	58
Tablo 3.21 RTCA sonuçlarına göre aynı konsantrasyonlardaki farklı diş macunlarının ikili karşılaştırmalarının P değeri.....	59
Tablo 3.22 RTCA sonuçlarına göre 24-48-72 saat kıyaslaması.....	60
Tablo 3.23 Deney gruplarından mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre sayısı (/1000).....	70
Tablo 3.24 24 Saat sonra diş macunları arasındaki kıyaslama	70
Tablo 3.25 48 Saat sonra diş macunları arasındaki kıyaslama	71

FOTOĞRAFLAR

Fotoğraf 2.1 Hava akım kabini.....	17
Fotoğraf 2.2 Kuyucuklara kültür ortamı eklenmesi.....	23
Fotoğraf 2.3.a Kuyucuklara MTT solüsyonu eklenmesi.....	23
Fotoğraf 2.3.b Kuyucuklara SDS-HCl eklenmesi.....	23
Fotoğraf 2.4 1 ml içindeki hücre sayısı sonucu.....	25
Fotoğraf 3.1.a MTT ve SDS-HCl uygulanmış kuyucuklar, 48. saat görüntüleri.....	34
Fotoğraf 3.1.b MTT ve SDS-HCl uygulanmış kuyucuklar, 72. saat görüntüleri.....	34
Fotoğraf 3.2 Kontrol hücrelerinin sitokalsin B eklenmesiyle gerçekleşen değişimi (10x mikroskop görüntüsü).....	67
Fotoğraf 3.3 IC 50/2 konsantrasyonunda dış macununa maruz kalmış sitokalsin B eklenmiş hücreler arasındaki fark (10x mikroskop görüntüsü).....	68
Fotoğraf 3.4 Tek çekirdekli ve çift çekirdekli hücre görüntüsü (40x mikroskop görüntüsü).....	69
Fotoğraf 3.5 Mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre örnekleri (40x mikroskop görüntüsü).....	69

GRAFİKLER

Grafik 3.1 Colgate, tüm konsantrasyonlar, 24 saat	49
Grafik 3.2 Signal, tüm konsantrasyonlar, 24 saat	50
Grafik 3.3 Paradontax, tüm konsantrasyonlar, 24 saat	50
Grafik 3.4 GC Tooth Mousse, tüm konsantrasyonlar, 24 saat	51
Grafik 3.5 Tüm diş macunlarının %1 konsantrasyonu, 24 saat.....	52
Grafik 3.6 Tüm diş macunlarının %0,5 konsantrasyonu, 24 saat.....	52
Grafik 3.7 Tüm diş macunlarının %0,1 konsantrasyonu, 24 saat.....	53
Grafik 3.8 Tüm diş macunlarının %0,05 konsantrasyonu, 24 saat.....	53
Grafik 3.9 Tüm diş macunlarının %0,01 konsantrasyonu, 24 saat.....	54
Grafik 3.10 Colgate, 24 saat RTCA grafiği.....	61
Grafik 3.11 Signal, 24 saat RTCA grafiği.....	61
Grafik 3.12 Paradontax, 24 saat RTCA grafiği.....	62
Grafik 3.13 GC Tooth Mousse, 24 saat RTCA grafiği.....	62
Grafik 3.14 24 saat, %0,5'lik konsantrasyonların karşılaştırılması.....	63
Grafik 3.15 24 saat, %0,1'lik konsantrasyonların karşılaştırılması.	63
Grafik 3.16 24 saat, %0,05'lik konsantrasyonların karşılaştırılması.....	64
Grafik 3.17 24 saat, %0,01'lik konsantrasyonların karşılaştırılması.....	64

ÖZET

Diş çürükleri ve periodontal hastalıkların başlıca nedeni olan mikrobiyal plağı kaldırmak için diş macunları önemli bir role sahiptir. Diş macunlarının içeriğinde birçok farklı madde bulunmaktadır. Bunlardan; sodyum lauril sülfat gibi deterjan ve florid ve triklozan gibi tedavi edici ajanların sitotoksiteleriyle ilgili birçok araştırma bulunmakla birlikte, genel olarak diş macunlarının hücre üzerindeki etkilerini gösteren gerek *in vivo* gerekse *in vitro* çalışma sayısı çok azdır. Yapılan çalışmalarda; artan konsantrasyon ve maruziyet zamanının uzamasına bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada; farklı özellikleriyle ön plana çıkan dört farklı diş macununun (GC Tooth Mousse, Colgate Total, Signal Beyaz Güç, Paradontax) beş farklı konsantrasyonundaki sitotoksik etkileri Metil Tetrazolyum Testi (MTT), dört farklı konsantrasyonundaki etkileri ise Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) yöntemleriyle incelenmiştir. Ayrıca çalışmada yer alan diş macunlarının mutajenik özellikleri de mikronükleus testi kullanılarak analiz edilmiştir.

GC Tooth Mousse haricindeki diş macunlarının %0,5 ve %1'lik konsantrasyonlarının, MTT ve RTCA sonuçlarına dayanarak insan fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Gerek MTT kitiyle gerekse RTCA yöntemiyle yapılan çalışmada; içerdiği maddeler yönünden farklı özelliklere sahip olan diş macunlarının sitotoksik etkileri de farklı çıkmıştır. Çalışmada kullanılan konsantrasyonlar arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır. GC Tooth Mousse'un çalışmada yer alan konsantrasyonlarının tamamında sitotoksik açıdan olumsuz sonuca rastlanılmazken, diğer macunların %1 ve %0,5'lik konsantrasyonları sitotoksik çıkmıştır. Paradontax'ın hücre üzerindeki olumsuz etkileri diğer diş macunlarına kıyasla daha fazla olmuştur. Çalışmada yer alan diş macunlarının tamamının %0,1, %0,05 ve %0,01'lik konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi tespit edilmemiştir. Bundan dolayı diş fırçalama esnasında maruz kalınacak diş macunu konsantrasyonunun sitotoksik olmadığı sonucuna varılabilir. 24, 48 ve 72 saatler açısından kıyaslama yapıldığında sitotoksik konsantrasyonlarda (%1 ve %0,5) sonuç daha kötüye giderken, diğer konsantrasyonlarda olumsuz yönde gelişme olmamıştır. Dört diş macununun mikronükleus testinde mutajenik olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte Signal Beyaz Güç diğer diş macunlarına kıyasla daha mutajenik bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Diş macunu, mikronükleus, MTT, mutajenite, RTCA, sitotoksitite

SUMMARY

Toothpaste has a very important role to remove microbial plaque which is the main reason of dental caries and periodontal diseases. Toothpaste includes a lot of different substances. Although there are lots of researchs about cytotoxicity of sodium lauril sulfate as detergent and florid and triclosan as treatment agencies, there are generally very few researchs about the effects of the toothpastes on cells, both *in vivo* and *in vitro* studies. It is observed from the studies that; depending on increasing of the concentration and exposure time, cytotoxic effects increase.

In this study; cytotoxic effects of five different concentrations of four different toothpastes (Gc Tooth Mousse, Colgate Total, Signal White Power, Paradontax) were examined with Methyl Tetrazolium Assay (MTT), four different concentrations were examined with Real-Time Cell Analysis (RTCA) method. Mutagenic properties of four toothpastes in the study were also analyzed by using micronucleus test.

According to the results of MTT and RTCA, 0,5% and 1% concentrations of the toothpastes except GC Tooth Mousse effected human fibroblast cells proliferation adversely. The cytotoxic effects of the toothpastes having different features because of their content were found different according to both MTT method and RTCA method. By increasing of concentrations used in this study, cell aliveness decreased. There was no unfavorable result in whole concentration of this study of GC Tooth Mousse in terms of cytotoxicity but 1% and 0,5% concentrations of the other toothpastes were found cytotoxic. The negative effects of Adverse effect of Paradontax on the cells were higher when compared with the others. Cytotoxic effects of 0,1% , 0,05% and 0,01% concentrations of all toothpastes present in this study were not detected. Therefore, it can be concluded that; toothpaste concentration exposure is not cytotoxic during brushing of teeth. If the results of 24, 48 and 72 hours were compared, when the result was bad in the concentration of cytotoxic (1% and 0,5%), another concentrations were not effected negatively. Four toothpastes were concluded as mutagenic in micronucleus test. In addition to this, Signal White Power was more mutagenic comparing to other toothpastes.

Key Words: Cytotoxicity, micronucleus, MTT, mutagenicity, RTCA, toothpaste

1 GİRİŞ

Ağız sağlığı bakımı, mekanik ve kimyasal yollarla gerçekleştirilebilir. Diş macunu, diş çürükleri ve periodontal hastalıkların başlıca nedeni olan diş plağını kaldırarak önemli bir görev yapmaktadır (Forward 1991).

1.1 Diş Macunlarının İçeriği ve Sitotoksik ve Mutajenik Etkileri

Sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki ederek hücrenin fonksiyonunu durduran ya da hücrenin ölümüne neden olan maddelerdir. Mutajenik maddeler ise, canlı organizmaların genetik moleküler yapısında değişikliğe neden olan fiziksel veya kimyasal etmenlerdir.

Diş macununun yapısına giren en yaygın olarak bulunan maddeler Tablo 1.1’de yaklaşık oranlarıyla birlikte görülmektedir (Harris ve Garcia-Godoy 2004).

Tablo 1.1 Diş macunlarının yaklaşık yüzdesel içeriği

Diş Macunlarının İçeriği	Yüzdesi (%)
Aşındırıcılar	20-40
Su	20-40
Nemlendiriciler	20-40
Deterjanlar	1-2
Bağlayıcı Ajanlar	2
Tatlandırıcılar	2
Terapötik Ajanlar	5
Renklendiriciler ve Koruyucular	1

1.1.1 Aşındırıcılar

Plak birikiminin engellenmesi, dişte oluşan renklenmelerin mekanik ve kimyasal olarak uzaklaştırılabilmesi için diş macunlarına bir takım aşındırıcı maddeler ilave edilmiştir. Bunlardan bazıları; kalsiyum karbonat, dikalsiyum fosfat dihidrat, alümina, silika, sodyum bikarbonat olarak sayılabilir. (Forward ve ark. 1997).

Beyazlatıcı diş macunlarının leke çıkarıcı etkisi genellikle içerdikleri aşındırıcı miktarına bağlı olarak değişmekle birlikte her zaman aşındırıcı miktarı ile doğrudan ilişkili değildir (Lima ve ark. 2008, Schemehorn ve ark. 2011). Partiküllerin sertliği, şekli ve büyüklüğü ile birlikte pH değeri de diş macununun aşındırma kapasitesini belirler (Hilgenberg ve ark. 2011).

Beyazlatıcı diş macunları; çeşitli enzimler, peroksit, yüzey aktif maddeler, sitrat, pirofosfat ve heksametafosfat içerebilirler (Davies ve ark. 2010). Alumina, dikalsiyum fosfat dihidrat ve silika gibi abrazyonlar de diş macununun beyazlatıcı etkisini artırır (Joiner ve ark. 2008a, Demarco ve ark. 2009).

1.1.2 Nemlendiriciler

Nemlendiriciler, diş macunu yapısında oluşabilecek nem kaybının önüne geçerler. Böylelikle macunun sertleşmesi engellenmiş olur. Tatlandırıcı etkileri de bulunabilmektedir (Forward ve ark. 1997). Yaygın olarak kullanılan nemlendiriciler gliserin, sorbitol, propilen glikol ve mannitoldür (Forward ve ark. 1997, Harris ve Garcia-Godoy 2004)

1.1.3 Deterjanlar

Sodyum Lauril Sülfat

Sodyum Lauril Sülfat (SLS), anyonik sürfaktandır. Emülgatör etkisi, deterjan etkisi ve köpüğü artırması için kişisel bakım ürünlerine eklenir. SLS, günümüzde en yaygın olarak kullanılan deterjandır. Kararlı yapıda olup düşük yüzey gerilimi ile diş macununun diş yüzeyinde kolay akmasını sağlar. SLS, nötral pH’de aktif olan bir maddedir ve diş macunundaki diğer maddelerle uyumludur (Harris ve Garcia-Godoy 2004).

SLS, diş macunlarında %1-2 konsantrasyonda bulunmaktadır. Antimikrobiyal etkiye sahip olan SLS, köpürücü ajan olarak işlev görmektedir. SLS; mikroorganizmaları öldürür, yüzey enerjisini düşürür ve proteinleri denatüre eder (Joiner ve ark. 2008b).

SLS içeren ağız gargaralarının insanlarda ağız epitel deskuamasyonuna ve yanma hissine sebep olduğu ayrıca fibroblastlarda vakuolizasyona yol açtığı rapor edilmiştir (Babich ve Babich 1997). SLS'nin aynı zamanda oral mukozadaki denatürasyon etkisi ve irritasyonlar nedeniyle ağızda aftöz ülserlerle ilişkili olduğu görülmüştür (Herlofson ve Barkvoll 1994).

SLS'nin varsayılan etkilerini incelemek üzere üç boyutlu hücre kültürü modelinde, *in vitro* ortamda, insan oral epiteli üzerinde bir çalışma da kültür dokuları histomorfometri, immünohistokimya (Ki-67, epitel E-kadherin, Alpha6-, beta1–integrinleri, cleaved kaspaz-3) ve TUNEL metodu ile değerlendirilmiştir. SLS'in düşük konsantrasyonlarına (%0.015) maruz kalan kültürlerinde; artan epitelyal kalınlık ve profilerasyon (Ki-67), tüm epitel hücre tabakaları boyunca E-kadherin'in daha belirginleşmesi, orta spinöz hücre katmanlarında tekil TUNEL-pozitif hücreler gözlemlenmiştir. Yüksek SLS konsantrasyonlarında ($\geq$ %0.15), epitel kalınlığının, hücre proliferasyonunun ve E-kadherin varlığının yavaş yavaş azaldığı ve maruz kalan bölgelerin merkezi alanlarında, hücrelerin birbirlerinden ayrıldığı ve hücre ölümünün gerçekleştiği görülmüştür (Neppelberg ve ark. 2007).

SLS'nin *in vitro* (Healy ve ark. 2000) ve *in vivo* (Veys ve ark. 1994) olarak, insanlarda oral mukozanın bariyer özelliklerini değiştirebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca SLS'nin, diş eti kan akışını arttırdığı da iddia edilmektedir (Herlofson ve ark. 1996).

Bir çalışmada kullanılan 10 farklı diş macunundaki SLS ve SHN (sakkarin) oranlarının sağlık otoritelerinin belirlediği günlük kabul edilebilir alım miktarından fazla olması yüzünden özellikle çocuklardaki kontrolsüz diş macunu kullanımlarının potansiyel olarak zehir etkisi taşıdığı iddia edilmiştir (Gimba ve ark. 2014).

Üç farklı ağız çalkalama suyu ile yapılan başka bir çalışmada, SLS içeren ürün diğerlerine göre daha sitotoksik bulunmuştur (Ghabanchi ve ark. 2013). Diş macunlarının içerdikleri deterjanlara yönelik yapılan araştırmalarda; deterjanların artan konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığının azaldığı gözlemlenmiştir. Bazı deterjanların ağızda yumuşak doku hasarına yol açabilmesi ile birlikte klinik ortamda tükürüğün bu etkiyi nötralize edebildiği ileri sürülmüştür (Moore ve ark. 2008).

1.1.4 Bağlayıcı Ajanlar

Diş macununun stabilitesini ve kıvamını kontrol eden bazı bağlayıcılar; karragenan, aljinat, sodyum karboksimetilselüloz, magnezyum alüminyum silikat, sodyum magnezyum silikat, kolloidal silikalar olarak sayılabilir (Forward ve ark. 1997).

1.1.5 Tatlandırıcı ve Esanslar

Diş macunu yapısında tatlandırıcı olarak genellikle eklenen sakkarin, nane tayfı, anason, limon, okaliptüs vs. kullanılabilmektedir (Forward ve ark. 1997).

Sakkarin (SHN), (O-benzoic sülfamid) ve tuzları kokusuz olup, beyaz kristal tozları şeker kamışından 500 kat, sükrozdan 300 kat daha tatlıdır (Parfitt ve Martin 1999, Koutojiam 2005).

Sakkarinin uzun bir kullanım geçmişı vardır ve onun muhtemel kanserojen etkileri üzerinde yoğun tartışmalar yaşanmaktadır (Zhu ve ark. 2005). Çeşitli bilimsel araştırma raporlarına göre, sakkarin tümör ve mesane kanserine neden olabilmektedir (Joseph ve Nair 2012). Ayrıca, ciltte alerjik tepkilere, toksik reaksiyonlara ve özellikle de kalp ve gastrointestinal sistem problemlerine neden olabilmektedir (WHO 1995). FDA'ya göre günlük kabul edilebilir alım miktarı 5 mg/kg'dır (Gimba ve ark. 2014).

Mentolün diş macunlarındaki konsantrasyonu %0,1 - 0,5 olup antimikrobiyal aktivite gösterir. (Joiner ve ark. 2008b). Birçok gıda maddesinde, kozmetik ürünlerinde, sabunlarda ve diş macunlarında yaygın şekilde kullanılan mentolün astım ve ürtikere sebep olabileceği bildirilmiştir (Takatsuka ve ark. 2008).

Diş macunlarında kullanılan ve kozmetikte güzel koku verici olan nane uçucu yağı ile yapılan çalışmalar neticesinde bu maddenin belirli konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik olduğunu tespit edilmiştir (Franzios ve ark. 1997).

Nair (2001) naneden elde ettiği maddelerle testler yapmıştır. Nanenin ana komponentleri mentol, menton, pulegone, menthofuran, limonene olarak bulunmuştur. Nane uçucu yağında bulunan pulegone, hepatotoksin olarak bilinmektedir (Nair 2001). Yapılan çalışmalarda nane yağının sıçanlara ağız yolu ile verilmesi sonucu düşük derecede toksik

olduğu tespit edilmiş, sub-kronik oral çalışmalarda ise beyinde kist lezyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir (200mg/kg/gün) (Nair 2001). Tavşanlarda intradermal uygulamalarda önemli reaksiyonlar gözlenmiştir (Nair 2001). Nane yağı Ames testinde negatif sonuçlar verirken, fare lenf hücrelerinde mutajenite göstermiş ve Chinese hamster fibroblast hücrelerinde ise kromozom aberasyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir (Nair 2001). Nane yağının toksisitesinin pulegone'den kaynaklandığı ve miktarının en fazla %1 veya daha düşük olması gerektiği anlaşılmıştır. Bu sınıra dikkat edildiği zaman nane yağı, sulu ekstraktları, yaprak suyu ve yapraklarının güvenli bir şekilde kozmetikte kullanılabileceği bildirilmiştir (Nair 2001).

Lazutka ve ark. (2001), nane yağının insan lenfositleri için sitotoksik olduğunu iddia etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada ise nane yağı ve ana komponentlerinin genotoksik ve insektisit aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma *Drosophila melanogaster* (sinek cinsi) somatik mutasyon ve *Bactrocera oleae* rekombinasyon (SMART) testleri uygulanarak yapılmıştır. Sonuç olarak nane yağı ve ana komponentlerinin *B. Oleae* üzerinde oldukça toksik olduğunu tespit edilmiştir. Aynı çalışma sonunda nane yağının genotoksik etkiye sahip olmadığı da bildirilmiştir (Pavlidou ve ark. 2004).

1.1.6 Terapötik Ajanlar

Florid

Günlük oral florür alımı için minimum risk seviyesinin 0.05 mg/kg/gün olduğu saptanmıştır. İnsanlarda florun tahmini öldürücü dozu erişkinlerde 16-64 mg/kg, çocuklarda ise 3-16 mg/kg. dır (ATSDR 2003). Florid, çok elektonegatif olup bir çözelti içinde güçlü bir negatif yük elde etme eğilimi bulunmaktadır. Asidik koşullardaki sulu çözeltilerde, örneğin midede, flor, hidrojen florüre dönüşür. Yutulan florürün yaklaşık %40'ı midede emilir (Whitford ve ark. 1994). Yine ağız yoluyla yutulan florun %45'inin ise ince bağırsaklarda emildiği görülmüştür (He ve ark. 1998).

Florid bir kez kana geçti mi vücut içinde kalsiyumdan zengin kemik ve diş gibi dokulara kolayca dağılır. Bebeklerde, emilen flor yaklaşık %80-90 seviyesinde muhafaza edilir, ancak erişkinlerdeki seviyesi yaklaşık %60 düşer (ATSDR 2003).

Yirminci yüzyılın son yarısında, florozisten muzdarip insanların sayılarının artması ve laboratuvar ortamındaki deneyler, florun yüksek konsantrasyonlardaki zararlı etkileri, toksikolojistlerin ilgisini bu alana çekmiştir (Barbiera ve ark. 2010). 1990'lara kadar gerek topikal uygulamalardaki gerekse de dış macunundaki floridin dış çürüğünü engelleme özelliği onun toksik yönünün göz ardı edilmesine yol açmıştır (Barbiera ve ark. 2010). Çalışmalar florun düşük konsantrasyonlarda bile hücrel sistemlerde farklılaşmalara neden olarak istenmeyen etkilere yol açtığını gösterdi (Barbiera ve ark. 2010). Ayrıca floridin oksidatif strese, hücre içi redoks hemostazını, lipid peroksidasyonunu ve proteinin karbonil içeriğini modüle etmeye neden olduğu gibi, gen ekspresyonunu değiştirmeye ve apoptoza neden olduğu görülmektedir (Barbiera ve ark. 2010). Florid ile modüle genler içinde stres tepkisi, metabolik enzimler, hücre döngüsü, hücre-hücre iletişimi ve sinyal transdüksiyonu ile ilgili olanlar yer alır (Barbiera ve ark. 2010). Florid geniş bir yelpazede hücrel süreçlerle etkileşime girebilir, örneğin; gen ekspresyonu, hücre döngüsü, çoğalması ve göç, solunum, metabolizma, iyon transportu, sekresyon, endositoz, apoptoz/nekroz, ve oksidatif stres (Barbiera ve ark. 2010). Gen ekspresyonu ve/veya protein aktivitesi ile sinyal proteinlerinin hassas düzenlemesini içeren programlanmış hücre ölümü (apoptozis) karmaşık bir olgudur (Franco ve Cidlowski 2009). Genel olarak oksidatif stresin rolü, özellikle de ROS (reaktif oksijen türleri), apoptozun indüklenmesinde, konsantrasyona bağlı olarak görünmektedir (Karube ve ark. 2009, Anuradha ve ark. 2001, Mohammadi ve ark. 2009, Flora ve ark. 2009). Birçok çalışma floridin apoptozisi indüklemesinin, lipid peroksidasyonuna bağlı oksidatif stresin yükselmesiyle olduğu sonucuna varmıştır. Böylelikle mitokondriyal disfonksiyon gerçekleşmiştir (Anuradha ve ark. 2001, Karube ve ark. 2009, Mohammadi ve ark. 2009, Flora ve ark. 2009).

Bir mutajen, somatik ya da germinal hücrelerin DNA'sında değişikliklere neden olan madde veya maddelerin karışımı olarak tanımlanır. Bu değişiklikler arasında, nokta mutasyonlar (DNA baz dizisinde değişiklik) ve yapısal ya da sayısal kromozom sapmaları yer almaktadır. Yapısal anormallikler eksiklikler, tekrarlar, inversiyon ve translokasyon içerir. Sayısal anormallikler tüm bir kromozom ya da kromozom setlerinin kazanç veya kayıplarını içerir (Geoffrey ve Smith 1988).

Sodyum floridin (NAF) kültür ortamında insan diploid hücrelerinin büyümesini engellediği bildirilmiştir (Oguro ve ark. 1990). Floridin relatif olarak düşük konsantrasyonu (5-10 ppm) ile muamele sonunda insan diploid fibroblast hücrelerinde kromozomal sapmalara rastlanmamıştır. İnsan diploid fibroblastları, toplumsal su kaynaklarındaki değere eş olan düşük

dozlarda uzun süreli NaF'e maruz bırakıldıklarında, kromozomal sapmalarda bir artış gözlenmemiştir. Sodyum florid uygulanan sünnet derisi fibroblastında (JHU-1), kromozomal anomali frekansında anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Tsutsui ve ark. 1995).

Floridin insan pulpa hücrelerinin protein sentezi ve mitokondriyal aktiviteleri üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (Chang ve Chou 2001). Jeng ve ark. (1998) *in vitro* ortamda NaF ile protein sentezi engellenmesinin oral mukozal fibroblastlarda toksik etkiye neden olduğunu göstermişlerdir. 2 mmol/L (40 ppm) in üzerindeki NaF konsantrasyonları sitotoksik etkiye neden olurken dozun artması ile birlikte azalan protein sentezi ve mitokondriyal fonksiyonlar ile oral mukoza fibroblastlarında sitoksik etki gerçekleşmektedir.

Slamenova ve ark. (1992) NaF sitotoksitesinin, DNA, RNA ve protein biosentezindeki genel bir azalma ile de ilişkilendirmişlerdir. Kültüre edilmiş HL-60 hücrelerinde, NaF'in DNA ve protein biyosentezi kapasitesini azalttığı ve böylece hücrelerin canlı kalabilmelerine olumsuz etkilerinin olduğuna işaret edilmiştir (Song ve ark. 2002).

Florid iyonunun toksisitesi, kalsiyuma bağlanan ve proteolitik ve glikolitik enzim aktivitesine müdahale eden bir direkt hücre zehirlenmesiyle gerçekleşir. Florid, oksijen tüketimi ve kan pıhtılaşmasını önler ve eritrosit glikolizini azaltır. Ayrıca kırmızı kan hücrelerinden potasyumun dışarı akışını indükler. Böylelikle hiperkalemi ve hipokalsemi ile sonuçlanır ki flor kaynaklı aritmilere katkı sağlayan faktörlerden sorumlu tutulmuştur (McIvor 1987, 1990).

Yüksek oranda floride maruz kalmak önemli ölçüde iskeletsel florozisin gelişmesine yol açarken hem osteoblast hem de osteoklast kemik hücrelerine etki etmektedir. Bununla birlikte florid, renal, endotel, gonadal ve nörolojik yumuşak doku hücrelerini de etkilemektedir (National Research Council (NRC) 2006).

Flor, kalsiyum iyonları, G-protein ve siklik AMP gibi haberciler ile etkileşerek, sonrasında enzim adenil siklaz üzerinde uyarıcı etkisi ile temel hücre düzenleyici yolları etkilemektedir. Siklik AMP, hücrenin hormonal düzenlenmesi için büyük önem taşımaktadır, bu nedenle bu fonksiyon bozulmuştur. Yüksek florid alımı ve yüksek kanser insidansı arasında var gibi görünen ilişki böyle bazal hücresel etkiler ile açıklanabilir (Whitford ve ark. 1987, Takahashi 2001).

Kemikteki yüksek florid düzeylerinin, osteosarkom gelişimi için önemli bir faktör olabileceği bildirilmiştir (Ramesh ve ark. 2001). Floridin yüksek konsantrasyonlarına maruz kalmak osteosarkomun gelişmesi için bir risk faktörü olabilmektedir (Eyre ve ark. 2009). Hirayama (1977), Japonya'daki mide kanseri oranının sıcak çay ve balığın tüketiminin artmasıyla doğru orantılı olarak arttığını, süt ile ters orantılı bir ilişkide olduğunu bildirmiştir. Çay ve balık nispeten yüksek konsantrasyonlarda florid içerirken, süt midedeki hidrojen floridin etkin konsantrasyonunu azaltan tampon maddesi ve bağlayıcı ajan olarak görev yapmaktadır.

Triklozan

Triklozan (TCS) (5-kloro-2-(2, 4-diklorofenoksi) fenol), bir kristal toz olup, 289,55 molekül ağırlığına sahiptir. Düşük suda çözünürlüğü (10 mg/l) ve yüksek lipofilik özelliği ile pek çok organik solven içerisinde çözünür (Kalyanee ve ark. 2008). Triklozan pek çok mikroorganizmaya karşı geniş spektrumlu aktivite gösteren iki hidroksidifenil eterin trikloro türevidir (Saleh ve ark. 2010). Geniş spektrumlu bir antibakteriyel ajandır. (Harris ve ark. 2004). Klinik etkiyi arttırmak adına yavaş salınımı için genellikle başka bir kopolimerle ve/veya çinko sitrat gibi başka bir antimikrobiyal ajanla kombine edilir. Pek çok ağız bakterisine ve mayaya karşı aktivitesi vardır. Triklozanın tükürükteki bakteri sayısını ve gingivitisi azalttığı gösterilmiştir (Robertshaw ve Leppard 2007).

Anne sütü ile bebeklerin triklozana maksimum maruz kalmasının, bir günde vücut ağırlığı kg başına yaklaşık 7,4 μM olduğu bildirilmiştir. Anne sütündeki bu seviye bebeklere minimum risk sunar (Dayan 2007). Çeşitli çalışmalar, insan kanındaki toplam triklozan seviyesinin, ağız gargaralarından diş macunlarına kadar farklı kullanımlarından dolayı 1,4 nM'den 1,4 μM 'ye kadar değiştiğini göstermiştir (DeSalva ve ark. 1989, Bagley ve Lin 2000, Sandborgh-Englund ve ark. 2006). Emildikten sonra, triklozanın en önemli kısmı 24 saat içinde idrarla dışarı atılır. Ancak, triklozanın toplam idrar atılımı, bireyler arasında farklılık göstermekte olup, oral dozun %24 - %83'ü maruziyetten sonra ilk 4 günde atılır (Sandborgh-Englund ve ark. 2006).

Triklozan; bakteriyel yağ asidi biosentezini inhibe ederek hücre yapılarında negatif etki yaratır (Escalada ve ark. 2005).

Östrojen sülfotransferaz aktivitesinin bir inhibitörü olarak triklozanın yüksek gücü, fetal büyüme ve gelişme üzerindeki olası etkileri konusunda endişelere yol açmaktadır (James ve ark. 2009).

Memelilerde, triklozanın MCF-7 ve SK-BR-3 meme kanser hücrelerine karşı bu konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu kanıtlanmıştır (Liu ve ark. 2002). Rodricks ve ark. (2010) farelerde oral 18 aylık karsinojenite biyodeneyinde triklozan tarafından indüklenen karaciğer tümörlerinin insidansında artış bildirmişlerdir.

Mevcut literatüre dayanarak, laboratuvar ortamında antibakteriyel çapraz direnç bulunmasına rağmen triklozanın kontrollü kullanımının güvenli olduğu söylenilmiştir (Andrea ve ark. 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda, TCS'nin mutajen olmadığı ve antimikrobiyal içeren kişisel bakım ürünlerinin, insan sağlığı için risk oluşturmadığını bildirmişlerdir (DeSalva ve ark. 1989, Bhargava ve Leonard 1996, Rodricks ve ark. 2010).

Tespit edilen kinetik parametreler ve epididimislerde histopatolojik değişiklikler dikkate alındığında, epididimal birikimi nedeniyle triklozan, epididimal hasara neden olabilir. Ayrıca, anormal sperm morfolojisi ve düşük sperm üretimine yol açan sperm toksisitesine neden olur (Zhou ve ark. 2013).

Yapılan bir çalışmada; triklozana alternatif olarak tiyosiyonat/karbamid peroksit içerikli diş macunu, gingivitis kontrolünde ticari olarak elde edilebilen triklozanlı diş macunu kadar etkili bulunmuştur. Tiyosiyonat/karbamid peroksit içerikli diş macunları etkinlikleri ile konvansiyonel diş macunlarına alternatif olarak sunulmuştur (Rosin ve ark. 2002).

Çinko Oksit (ZnO); dental plak oluşumuna etki etmek üzere diş macunlarında, antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle kanal dolgu patı ve siman gibi dental materyallerde kullanılmaktadır (Giertsen 2004). Çinko Oksit gibi metal oksitler düşük konsantrasyonlarda yüksek antibakteriyel etki gösterirken toksik olmadıkları kabul edilen inorganik bileşiklerdir (Brayner ve ark. 2006). Aynı zamanda çinko oksit'in streptokokkus mutansın da dahil olduğu geniş bir bakteri spektrumunda büyümeyi inhibe etme özelliği vardır (Jones ve ark. 2008). Çinkonun antimikrobiyal etkisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, su ve oksijenden reaktif oksijen oluşumunu katalize ederek bakteriyel membran bütünlüğünün bozulmasını sağladığı düşünülmektedir (Brayner ve ark. 2006).

Yapılan çalışmalarda ZnO nanoparçacıklarının daha büyük partiküllere oranla hem gram negatif, hem de gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir (Jones ve ark. 2008). Çalışmalar göstermiştir ki, ZnO gibi bazı nano boyutlu metal oksitler seçici toksik etkiye sahiptirler (Reddy ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2007).

Diş macunları içinde beyazlaştırıcı olarak toz titanyum dioksit (TiO_2) yaygın biçimde kullanılır (Giertsen 2004). Titanyum dioksit ile yapılan bir sitotoksosite çalışmasında, TiO_2 'nin hücrelere herhangi bir toksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Wagner ve ark. 2008). TiO_2 'in normalde kullanılan konsantrasyonlarda toksik olmadığı düşünülse de nano- TiO_2 'in zararlı olabileceği düşünülmektedir (Blake ve ark. 1999). Nanopartiküllerin boyutları nanopartiküllerin toksisitelerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Çünkü nanopartiküller küçük oldukları için hücre membranına penetre olabilirler ve hücre içi komponentler ile toksik reaksiyonlara sebep olabilirler. Nanopartiküllerin konsantrasyonu da boyutlarında olduğu gibi toksisitede önemlidir. Yüksek konsantrasyonlardaki nanopartiküller düşük konsantrasyonlardakilere göre hücre için daha toksik olabilirler. Yine nanopartiküllerin hücreler ile olan yüzey etkileşimleri de toksik etkiye sebep olabilir (Shukla ve ark. 2005).

Metal oksit nanopartiküllerinin $40\mu\text{g/ml}$ den daha düşük konsantrasyondaki partiküllerden daha toksik olduğu bildirilmiştir (Karlsson ve ark. 2008).

Yapılan bir çalışmada, çinko sitrat tuzu içeren diş macunlarının plak oluşumunu önleyici etkisinin olduğu ve diş eti sağlığına olumlu katkısının olduğu saptanmıştır (Moran ve ark. 2001). Çinko sitratın etkisini artırmak amacıyla klorheksidin, heksetidin ve sanguinarin gibi başka antimikrobiyal ajanlar diş macunlarının yapısına katılmıştır (Moran ve ark. 2001). Çinkonun, bulunduğu plakta bakteriyel proliferasyon oranını azaltarak etki ettiği bildirilmiştir (Moran ve ark. 2005).

Birçok çalışmada klorheksidinin düşük dozlarda bile kültürlerde, birçok hücre tipinde ki bunlar; epitel hücreleri, gingival fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar ve kırmızı kan hücreleri, toksik etkisi gösterilmiştir (Mariotti ve Rumpf 1999, Giannelli ve ark. 2008). Chang ve ark. (2001) *in vitro* ortamda kültürlenmiş insan periodontal ligament hücrelerinin üzerinde klorheksidinin etkilerini incelemişler ve klorheksidinin protein sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Bir benzofenantridin alkaloid olan sanguinarinin; anti-mikrobiyal, anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Analiz sonucu, sanguinarinin, hücre

döngüsünün farklı aşamalarında hücrelerin dağılımını etkilemediği gösterilmiştir (Das 2004). Yapılan bir çalışmada hayat boyu sanguinarine maruziyetin, önemli bir tahriş sorununa yol açmadığı, oral mukoza üzerine etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. Mutajenisite ve genotoksikoloji verilerine dayanarak, sanguinarin ekstresi veya bileşenlerinin *in vivo* ortamda genotoksik olmadığı görülmüştür. 2 GLP uyumlu sıçan onkojenisite çalışmaların sonuçları sanguinarin ekstresinin herhangi bir kanserojen etkisi olmadığına kanıt sağlar. İnsanlardaki lökoplaki ile ilgili olmadığı da ortaya çıkmıştır (Munro ve ark. 1999).

Kloroform, sitotoksisitenin göstergesi olarak, hücre döngüsü ile ilişkili ılımlı düşük düzeyde renal proksimal tübül hasarı üretmektedir (Hard ve ark. 2000). Diş macunundaki kloroforma maruziyetin hiçbir şekilde neoplazm üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. Fareler ve sıçanlarda buna benzer yapılan çalışmalar gösteriyor ki, tekrar tekrar %3,5'lik kloroforma maruz kalma insan sağlığı açısından bir risk oluşturmaz (Heywood ve ark. 1979).

DeneySEL ve klinik veriler, oral sağlık bakım ürünlerinde, hidrojen peroksit ve sodyum bikarbonat kombinasyonunun önemli bir mutajenik potansiyeli olmadığını göstermektedir (Marshall ve Gragg 1998).

Setilpiridinium klorid (SPK); kuvvetli bakterisid etkisi olan, diş macunları, ağız gargaraları ve boğaz pastillerinde kullanılan bir kuaterner amonyum tuzudur (Versteeg ve ark. 2010). SPK'nın plak oluşumunu önleyici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Schroeder ve Hirzel 1969). Hücre duvarı komponentlerine bağlanıp bakteriyel hücre membranına penetre olmak ve sitoplazmik materyalin sızmasını indüklemek, hücre büyümesini inhibe etmek ve sonuçta hücre ölümüne yol açmak sayesinde antibakteriyel etkisini gösterir (Scheie 1989).

Günlük hayatta krem, deodorant, diş macunu, ağız suyu ve güneş koruyucuları gibi birçok medikal veya kozmetik amaçlı ürün içinde usnik asit bulunmaktadır (Ingólfssdóttir 2002). Usnik asitin, ağrı kesici, ateş düşürücü, yara iyileştirici ve ekspektoran olarak Asya, Afrika ve Avrupa'da değişik amaçlarla kullanıldığı bildirilmiştir (Okuyama ve ark. 1995). Antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkinliklerini prostaglandin sentezini inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir (Ingólfssdóttir 2002).

Correche ve ark.'nın (1998) yaptığı bir çalışmada usnik asidin *in vitro* mikrobik aktiviteyi azalttığı, sitotoksisiteye neden olduğu ve dalak lenfosit büyümesini tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte usnik asidin Ames testinde mutajenik olmadığı belirtilmiştir (Shibamoto ve Wei 1984).

Yukarıda sayılan maddelerin dışında diş macunlarında; dentin hassasiyetinin giderilmesinde; stronsiyum iyonları da çökelerek tübüler kapanma sağlanmasında kullanılmıştır (Jacobsen ve Bruce 2001). Kalay florid, alüminyum, potasyum, ferrik oksalatlar ve floridler dentin duyarlılığı için kullanılmaktadır (Walters 2005). Potasyum nitrat dentin tübüllerinden penetre olarak sinirin uyarılara karşı depolarize olmasını sağlar, repolarizasyon önlenir böylelikle ağrı uyarılarının beyne iletimi engellenir (Jacobsen ve Bruce 2001, Davies ve ark. 2010).

1.2 Amaç

Bu çalışmada,

1. Değişik özelliklere sahip diş macunlarının sitotoksiteleri arasında fark olup olmadığının belirlenmesi,
2. Diş macunlarının konsantrasyonları ile sitotoksiteleri arasında fark bulunup bulunmadığının tespit edilmesi,
3. Diş macunlarına maruziyet zamanı ile sitotoksik etkileri açısından farkın olup olmadığının belirlenmesi,
4. Diş macunlarının mutajenik özellik gösterip göstermeyeceğinin tespiti amaçlandı.

1.3 Hipotez

Diş macunlarının konsantrasyonlarının ve maruziyet zamanının artmasıyla hücreler üzerindeki sitotoksik ve mutajenik etkileri artmaktadır.

2 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma diş macunlarının sitotoksik ve mutajenik özelliklerini değerlendirme amacıyla iki aşamalı olarak planlandı. İlk aşamada farklı özellikleri ile öne çıkan dört diş macununun, değişik konsantrasyonlarında, MTT ve RTCA yöntemleriyle, insan fibroblast hücre kültüründe olası sitotoksik etkileri gözlemlendi. İkinci aşamada ise mikronükleus testi ile mutajenite karşılaştırması gerçekleştirildi.

2.1.1 Hücrelerin Hazırlanması

Bu çalışma insan cilt fibroblastları¹ üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada 20-30. pasajdaki hücreler kullanıldı.

Sitotoksosite çalışmalarının tamamı hava akım kabininde² gerçekleştirildi (Fotoğraf 2.1). Nitrojen tankında³ saklanan, hücre dondurma tüplerinde⁴ bulunan insan fibroblast hücre hattı¹, tanktan çıkarılarak, su banyosunda⁵ çözünene kadar bekletildi. İnsan fibroblast hücreleri¹ hücre kültür kabına⁶ % 10' luk fetal bovine serumu (FBS) ⁷, 150 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ⁸ içine ekilerek %5 CO₂' li ortamda 37°C'de inkube edildi.

Hücre kültür kabının⁶ yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı⁸ aspire edildi. Serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 3 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) ⁹ ile iki kez yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 3 ml % 0,25 Trypsin/EDTA¹⁰ ilave edilerek 5 dk inkübatörde¹¹ bekletildi.

¹ : İnsan Fibroblastı, Human Skin Fibroblast, NB1RGB, LOT: 32, RIKEN Cell Bank/Japonya

² : Hava Akım Kabini, Metisafe Class II Safety cabinet, Model: BSC-IIA-120, Seri No: 1010513E120, Metisafe Temizoda ve Biyogüvenlik Sistemleri/Türkiye

³ : Nitrojen Tankı, Biocane 34, Model: 808, Thermo Scientific/ABD

⁴ : Hücre Dondurma Tüpü, CryoTube Vials, LOT: 132837, Thermo Scientific/Danimarka

⁵ : Su Banyosu, Nüve Bath, Model: NB20, Nüve sanayi malzemeleri İmalat ve Ticaret AŞ. /Belçika

⁶ : Hücre Kültür Kabı, Petri Kabı, Nunclon Surface, LOT: 122229, Nunc/Danimarka

⁷ : FBS (Fetal Bovine Serum), HyClone, Research Grade, Fetal bovine Serum, LOT: RXA35901, Thermo Scientific/İngiltere

⁸ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

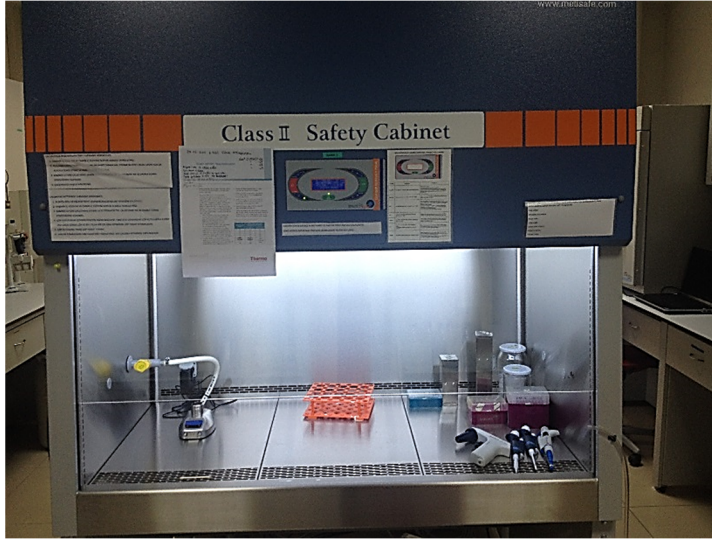
⁹ : PBS (Fosfat Tamponlama Tuzu), HyClone, Phosphate Buffered Saline (10X), LOT: AXG44028, Thermo Scientific/ABD

¹⁰ : Trypsin, Trypsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

¹¹ : İnkübatör, Sanyo CO₂ Incubator, Model: MCO-18AIC, Sanyo Electric Ltd./Japonya

Tripsin¹ etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra tripsinin etkisini durdurmak amacıyla, ortama 10 ml serum içeren kültür ortamı² ilave edildi. Daha sonra hücreler steril bir tüp³ içerisine toplandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj⁴ edildi. Sonrasında süpernatant kısım atıldı. Tripsinden¹ tamamen arındırılan hücreler 10 ml. kültür ortamında² çözüldü ve her kuyucuğa 100 mikrolitre gelecek şekilde, 96 kuyucuklu hücre kültürü kabına⁵ aktarıldı. Herbir kuyucuğa 10 bin hücre ekildi ve 24-48 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübatörde⁶ kültüre edilen hücreler mikroskop⁷ altında kontrol edildi ve 48 saatin sonunda sayısal olarak çalışma yapılabilecek yeterlilik olan %70-80 taban doluluk oranına ulaşıldığı gözlemlendi.

Fotoğraf 2.1 Hava akım kabini



¹ : Tripsin, Tripsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

² : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

³ : 15 ml.'lik Falcon Tüp, 10-0152- 15 ml. Centrifuge Tubes with Plug Seal Cap, LOT: J0069Z303-03, Biologix Research Company/Çin

⁴ : Santrifüj Makinesi, Rotina 380 R, Tip: 1706, Seri No: 0000456, Hettich Zentrifugen/Almanya

⁵ : Plate, Thermo Scientific, 130188 BioLite 96 Well Multidish, LOT: A6NA6JJ117, Thermo Fisher Scientific/Kore

⁶ : İnkübatör, Sanyo CO₂ Incubator, Model: MCO-18AIC, Sanyo Electric Ltd./Japonya

⁷ : Mikroskop, Leica DFC295, Leica Microsystems, Tip: 11 090 137 002, Leica/Almanya

2.1.2 Diş Macunlarının Uygulanması

2.1.2.1 Diş Macunları

Çalışmada kullanılacak diş macunları, özellikleri ve içerdiği maddeler Tablo 2.1’de yer almaktadır. Sadece o macuna özel içerikler tabloda koyu olarak yazılmıştır.

Tablo 2.1 Çalışmada kullanılan diş macunları

ADI	İÇERİĞİ	ÖZELLİĞİ
PARADONTAX (GlaxoSmithKline, Slovakya, LOT: 1027BKWA)	Sodyum Bikarbonat , Aqua, Gliserin, Kokamidopropil Betain , Alkol, Krameria Triandra Ekstresi , Ekinezya Purpurea , Çiçeği/Yaprağı/Kök Suyu , Alkol Denat, Ksantan Gum , Chamomilla Recutita Ekstresi (Mayıs Papatyası Çiçeği) , Commiphora Myrrha Ekstresi , Sodyum Sakkarin, Sodyum Benzoat , Salvia Officinalis Yağı (Adaçayı) , Mentha Piperita Yağı (Siyah İngiliz Nanesi) , Mentha Arvensis Yağı (Japon Nanesi) , Limonen, Cİ 77491 (Demir Oksit, Kahverengi)	Bitkisel
GC TOOTH MOUSSE (Recaldent/ GC Corporation, Tokyo/Japonya, LOT: 130903S)	Saf Su , Gliserol, CPP (Kazein Fosfopeptid) –ACP (Amorf Kalsiyum Fosfat) , D-sorbitol, CMC-Na (Sodyum Karboksimetil Selüloz) , Propilen Glikol, Silikon Dioksit , Titanyum Dioksit, Xylitol , Fosforik Asit , Tatlandırıcı , Çinko Oksit , Sodyum Sakkarin, Etil p-hidroksibenzoat , Magnezyum Oksit , Guar Gum , Propil p-hidroksibenzoat , Bütül p-hidroksibenzoat	Protein Bazlı (Süt Proteini)
COLGATE TOTAL (Colgate-Palmolive, Çin, LOT: 4095CN122H)	Sodyum Florid (1450 ppm Florid), Aqua, Silika Hidrat, Gliserin, Sorbitol, PVM/MA Kopolimer , Sodyum Lauril Sülfat, Aroma, Sodyum Hidroksit , Karragenan , Propilen Glikol, Triklozan , Sodyum Sakkarin, Mika , Seluloz Gum, Sinnamal , Öjenol , Limonen, Cİ 77891(titanyum oksit, beyaz boya), Cİ42090 (mavi boya)	Tam Koruma
SİGNA BEYAZ GÜÇ (Unilever Mashreq, Mısır LOT: ABN0117)	Kalsiyum Karbonat , Aqua, Sorbitol, Silika Hidrat, Sodyum Lauril Sülfat, Sodyum Monoflorofosfat, Aroma, Selüloz Gum, Potasyum Sitrat , Trisodyum Fosfat , Sodyum Sakkarin, Kalsiyum Gliserofosfat , Fenilkarbinol , Gliserin, Limonen, Cİ 12490 (kırmızı boya)	Beyazlatıcı

2.1.2.2 Diş Macunlarının Stok Solüsyonunun Hazırlanması

0,5 g diş macunu + 4,5 ml dH₂O = %10’luk stok solüsyonu hazırlandı. Ardından Tablo 2.2’deki veriler kullanılarak diğer konsantrasyonlar hazırlandı.

Tablo 2.2 Diş macunu numunesinin farklı konsantrasyonları

KONSANTRASYON	STOK (ml)	KÜLTÜR ORTAMI (ml)
%1	1	9
%0,5	0,5	9,5
%0,1	0,1	9,9
%0,05	0,05	9,95
%0,01	0,01	9,99

Diş macunu tüpünden steril şartlarda numuneler alındı. Hassas terazide¹ 0,5 g.lık ölçümler yapıldı. 50 ml.'lik falkon tüplerin² içine distile su doldurulup alınan diş macunu numuneleri seyreltilip, her bir diş macunu için %10'luk stok çözeltisi hazırlandı. Çözeltinin homojen dağılması için vorteks³ kullanıldı. %1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 lik çözeltilerin hazırlanması için 20 adet 15 ml.'lik falkon tüpü⁴ kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki karışımlar kültür ortamı⁵ eklenerek elde edildi (Tablo 2.2). Farklı konsantrasyonlardaki diş macunları deneyler bitene kadar buzdolabında⁶, +4 °C'de muhafaza edildi.

¹ : Hassas Terazi, Electronic Balance, Type: AUW220D, NO: D450012768, Shimadzu Corporation/Japonya

² : 50 ml.'lik falkon Tüp, 339652 – Thermo scientific Nunc 50 ml. Conical Centrifuge Tubes, LOT: D1CFCJ8118, Thermo Scientific/Kore

³ : Vorteks, Vortexmixer, Model: Fine Vortex, FINEPCR/Kore

⁴ : 15 ml.'lik Falkon Tüp, 10-0152- 15 ml. Centrifuge Tubes with Plug Seal Cap, LOT: J0069Z303-03, Biologix Research Company/Çin

⁵ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

⁶ : Buzdolabı, Bosch/Türkiye

Daha önce hazırlanan insan fibroblast hücre hattı¹ bulunan 96 kuyucuklu 3 plate'deki² kültür ortamları³ boşaltıldı. Plate'teki² kuyucuklara farklı konsantrasyonlardaki farklı diş macunlarından oluşan karışımlar her bir kuyucuğa 100 mikrolitre gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 2.1). Diş macunu ile herhangi bir teması olmayan hücre grubu, negatif kontrol grubu olarak belirlendi ve plate'in² ilk sırasında yer alan toplam 12 adet kuyucuğa yerleştirildi. Plate'ler² tekrar inkübatöre kaldırıldı.

Şekil 2.1 Numunelerin 96'lık plate'e yerleştirilmesi

KONSANTRASYONLAR	GC TOOTH MOUSSE			SİGNAL BEYAZ GÜÇ			COLGATE TOTAL			PARADONTAX		
KONTROL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1%	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,50%	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,10%	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,05%	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,01%	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ
BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ	BOŞ

2.1.3 Metil Tetrazolyum Testi

MTT Metodu [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide], bir ilacın veya ajanın hücre üzerindeki sitotoksik etkisini renk değişikliğine bağlı yorumlamaya yarayan bir yöntemdir. Hücre canlılığı ve proliferasyon miktarı ve ilacın IC50 (%50 İnhibitör Konsantrasyon) değerini sayısal verilerle ifade etmeye yardımcı olur. MTT uygulandığı ortamdaki canlı hücrelerin mitokondrisindeki enzimlerin yapısına bağlanır. Enkübasyon döneminin ardından kültürler dodeksil sülfat+etanol+hidroklorik asit kombinasyonundan oluşan çözelti katılarak canlı hücrelere bağlanmış MTT'ler tuz haline getirilir. Oluşan tuz hücrenin canlılığı ile doğru orantılı olarak ilk uygulandığı anda oluşan sarı renkten giderek mor rengin tonlarına dönüşür. Canlılığın ve proliferasyonun çok olduğu hücre koyu mor boyanırken, sitotoksik etki oluşmuş canlılığını azalmış veya kaybolmuş hücreler açık mor veya pembe renkte boyanır (Kasugai ve ark. 1990).

¹ : İnsan Fibroblastı, Human Skin Fibroblast, NB1RGB, LOT: 32, RIKEN Cell Bank/Japonya

² : Plate, Thermo Scientific, 130188 BioLite 96 Well Multidish, LOT: A6NA6JJ117, Thermo Fisher Scientific/Kore

³ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika

MTT analizi hücre canlılığını gösteren güvenilir bir testtir. Bu test, hücreler kimyasal bir madde veya bir malzemenin etkisinde kaldıktan sonra, hücre mitokondrisinin fonksiyonel durumunu değerlendirilmesi yoluyla sitotoksik etkiyi belirler. Canlı hücrelerde mitokondrial dehidrojenaz hücrenin içinde tutunan sarı tetrazolium tuzunu azaltır, MTT'yi mavi MTT formazona dönüştürür (Polyzois ve ark: 1994, Veres ve ark. 1990). Formazon ürünlerinin oluşumunun canlı hücrelerin sayısı ile orantılı olduğu bulunmuştur (Veres ve ark. 1990).

Bu testin sonuçları hücre sayısını göstermekle kalmamakta, hücrelerin metabolik düzeyini de ortaya koymaktadır. Sonuç olarak MTT yöntemi dış hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksiklerinin değerlendirilmesinde hassas bir göstergedir (Tang ve ark. 1999, Huang ve ark. 2001).

2.1.4 MTT Solüsyonlarının Hazırlanması

Komponent A:

Hazır 5 mg MTT tüpünün¹ içine 1 ml Steril 1X PBS² konulup, vorteksenerek 12 Nm. MTT solüsyonu hazırlandı. Işıktan korumak için tüp alüminyum folyo ile kaplandı.

¹ : MTT Seti, İnvitrogen MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154), LOT: 1103068, Invitrogen/ABD

² : PBS (Fosfat Tamponlama Tuzu), HyClone, Phosphate Buffered Saline (10X), LOT: AXG44028, Thermo Scientific/ABD

Komponent B:

İçinde 1 gr SDS solüsyonu¹ olan hazır 2 tüpün içine 10 ml 0,01M HCl² eklendi. Solüsyon çözününceye kadar hafifçe çalkalandı, sonrasında berrak bir hal aldı.

24 saat sonra plate'ler³ inkübatörden çıkarıldı. MTT yöntemini uygulamak için invitrogen MTT seti⁴ kullanıldı. Hava akım kabininde⁵ 96 kuyucuğun içinde bulunan kültür ortamı boşaltıldı ve içlerine 100 µl taze kültür ortamı⁶ konuldu (Fotoğraf 2.2). Üzerine 10 µl 12 mM MTT solüsyonu eklendi. Fotoğraf 2.3.a'da MTT solüsyonu eklenmiş kuyucuklardaki renk değişimi gözlemlenmektedir. 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 100 µl SDS-HCl solüsyonu eklendi ve hafif pipetaj yapıldı. SDS-HCl eklenmesi sonucu Fotoğraf 2.3.b'deki renk değişimi oluştu. Tekrar 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 570 nm dalga boyunda plate okuyucu cihazı⁷ ile ölçüm yapıldı. Aynı işlemler ve ölçümler 2. plate için 48. saatte, 3. plate için 72. saat de tekrarlandı.

¹ : Sodium dodecyl sulfate (SDS), SDS (%10), Gibco-invitrogen, Cat.#15553-027

² : Hidroklorik asit (HCl), 30721 Hydrochloric acid min 37%, LOT: SZE92600, SIGMA-ALDRICH/Almanya

³ : Plate, Thermo Scientific, 130188 BioLite 96 Well Multidish, LOT: A6NA6JJ117, Thermo Fisher Scientific/Kore

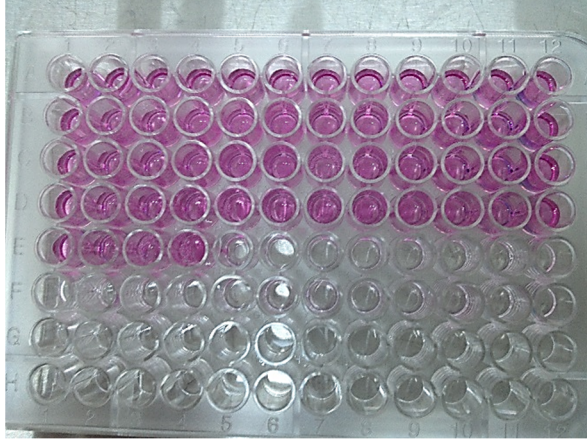
⁴ : MTT Seti, Invitrogen MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154), LOT: 1103068, Invitrogen/ABD

⁵ : Hava Akım Kabini, Metisafe Class II Safety cabinet, Model: BSC-IIA-120, Seri No: 1010513E120, Metisafe Temizoda ve Biyogüvenlik Sistemleri/Türkiye

⁶ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

⁷ : Plate Okuyucu, Varioskan Flash, Tip: 3001, Thermo Scientific/Finlandiya

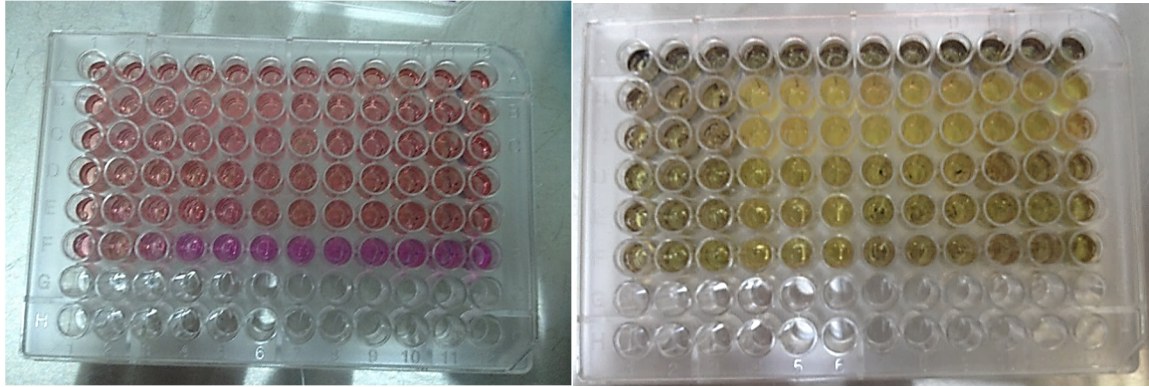
Fotoğraf 2.2 Kuyucuklara kültür ortamı eklenmesi



Fotoğraf 2.3 a) Kuyucuklara MTT solüsyonu eklenmesi **b)** Kuyucuklara SDS-HCl eklenmesi

a

b



2.2 RTCA (Real Time Cell Analysis)

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi, yüksek verimli (RTCAHT) sistemi; uzun süreli sitotoksikite deneyleri gerçekleştirmek için non-invaziv ve etkili bir araç olarak kullanılmaktadır. Hücreler üzerindeki toksik maddelerin dinamik sitotoksitesinin yorumlanmasını sağlamak için multi-konsantrasyon zaman-bağımlı hücresel tepki profilleri (TCRPs) üretir (Hartigan ve Downey 2010, Abassi ve ark. 2009, Limame ve ark. 2012, Xing ve ark. 2005).

Bu sistem, sitotoksitenin değerlendirmesinde kullanılmaktadır (Pan ve ark. 2013). Bu sistemle hücre invazyonu ve geğişi analizleri de yapılabilmektedir (Bird ve Kirstein 2009).

2.2.2 Hücrelerin Hazırlanması

Nitrojen tankında¹ saklanan, hücre dondurma tüplerinde² bulunan insan fibroblast hücre hattı³, tanktan çıkarılarak, su banyosunda⁴ çözünene kadar bekletildi. İnsan fibroblast hücreleri³ hücre kültür kabına⁵ % 10'luk fetal bovine serumu (FBS)⁶, 150 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)⁷ içine ekilerek %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkube edildi.

Hücre kültür kabının⁵ yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı⁷ aspire edildi. Serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 3 ml Phosphate Buffered Saline (PBS)⁸ ile iki kez yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 3 ml % 0,25 Trypsin/EDTA⁹ ilave edilerek 5 dk inkübatörde¹⁰ bekletildi. Trypsin⁹ etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra tripsinin etkisini durdurmak amacıyla, ortama 10 ml serum içeren kültür ortamı⁷ ilave edildi.

¹ : Nitrojen Tankı, Biocane 34, Model: 808, Thermo Scientific/ABD

² : Hücre Dondurma Tüpü, CryoTube Vials, LOT: 132837, Thermo Scientific/Danimarka

³ : İnsan Fibroblastı, Human Skin Fibroblast, NB1RGB, LOT: 32, RIKEN Cell Bank/Japonya

⁴ : Su Banyosu, Nüve Bath, Model: NB20, Nüve sanayi malzemeleri İmalat ve Ticaret AŞ. /Belçika

⁵ : Hücre Kültür Kabı, Petri Kabı, Nunclon Surface, LOT: 122229, Nunc/Danimarka

⁶ : FBS (Fetal Bovine Serum), HyClone, Research Grade, Fetal bovine Serum, LOT: RXA35901, Thermo Scientific/İngiltere

⁷ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

⁸ : PBS (Fosfat Tamponlama Tuzu), HyClone, Phosphate Buffered Saline (10X), LOT: AXG44028, Thermo Scientific/ABD

⁹ : Trypsin, Trypsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

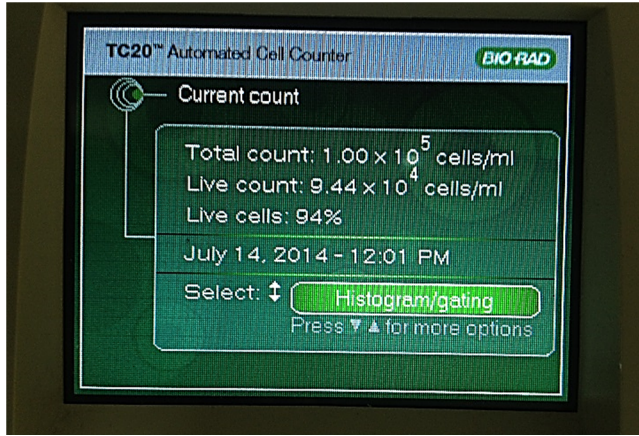
¹⁰ : İnkübatör, Sanyo CO₂ Incubator, Model: MCO-18AIC, Sanyo Electric Ltd./Japonya

Daha sonra hücreler steril bir tüp¹ içerisine toplandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant kısım atıldı. Tripsinden² tamamen arındırılan hücreler 10 ml. kültür ortamında³ çözüldü.

2.2.3 RTCA E-Plate'lerin Hazır Hale Getirilmesi

Hazırlanan hücre solüsyonundan 10 mikrolitre alınıp 10 mikrolitre trypan blue⁴ ile mikrosantrifüj tüpünde⁵ karıştırıldı. Hazırlanan karışım slide'a⁶ alınarak hücre sayıcıda⁷ okutuldu. 1 ml kültür ortamı³ içinde 100 bin adet hücre sayıldı.

Fotoğraf 2.4 1 ml içindeki hücre sayısı sonucu



Çalışmada ihtiyaç olunan toplam hücre sayısı; 48 kuyucuk için, 5x10³ hücre, toplamda 24x10⁶ hücredir.

¹ : 15 ml.'lik Falcon Tüp, 10-0152- 15 ml. Centrifuge Tubes with Plug Seal Cap, LOT: J0069Z303-03, Biologix Research Company/Çin

² : Trypsin, Trypsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

³ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika

⁴ : Trypan Blue, Trypan Blue Dye, %0,4, Control: 350001943, BIO RAD, ABD

⁵ : Mikrosantrifüj tüpü, 1.6 ml. Graduated Microcentrifuge Tubes, LOT: 13073, Neptune/ABD

⁶ : Slide, Counting Slides, Dual Chamber for cell Counter, LOT: 020713, BIO RAD/ABD

⁷ : Hücre Sayıcı, BIO RAD TC 20 Automated Cell Counter, Seri No: 508BR02341, BIO RAD/Singapur

Bir ml içinde 100 bin hücre bulunuyorsa 240 bin hücre 2,4 ml içinde bulunur. Her kuyucuk için 100 mikrolitre, toplamda 48 kuyucuk için 4,8 ml hücre içeren kültür ortamına ihtiyaç bulunmaktadır. 2,4 ml kültür ortamı eklenerek, 4,8 ml içinde toplam 240 bin hücre elde edildi.

İnkübatör¹ içinde yer alan xCELLigence cihazında² çalışılmak üzere 3 adet E-Plate³ hazırlandı. Öncelikle 3 adet E-Plate'te³ bulunan toplam 48 kuyucuğun her birine 100 mikrolitre kültür ortamı⁴ eklendi. Bu halde Z0 empedansının oluşturulması için 3 E-plate³ xCELLigence cihazına² yerleştirildi ve gerekli okutmalar yapıldı. Cihazın okuması bittikten sonra E-plate'ler³ cihazdan çıkarılıp, kuyucukların içlerindeki kültür ortamı⁴ boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 5 bin hücrenin geleceği şekilde 100 mikrolitre kültür ortamı⁴ içinde hücre konuldu. Daha sonra E-Plate'ler³, xCELLigence cihazına² kaldırıldı.

2.2.4 Diş Macunlarının Uygulanması

24 saat sonra E-plate'ler³ inkübatörden¹ çıkarıldı. İçlerindeki kültür ortamı⁴ boşaltıldı ve daha önce buzdolabında⁵ +4 °C'de sakladığımız farklı konsantrasyonlardaki diş macunları Şekil 2.2'deki gibi kuyucuklara 100 mikrolitre gelecek şekilde dolduruldu. Tekrar inkübatöre¹ kaldırılarak cihazın değerleri okumaya başlaması sağlandı.

Gerek mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde gerekse MTT sonuçları dikkate alındığında hücre canlılığının çok fazla gözlemlenmediği diş macunlarının %1 konsantrasyonundan numune alınmadı. Hücre canlılığı konusunda olumsuz düşündüğümüz diş macunlarının %0,5 konsantrasyonları iki kontrol ile asıl çalışma konsantrasyonları olan %0,1, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları ise 3 kontrol ile çalışıldı.

¹ : RTCA Cihazının İnkübatörü, Thermo Scientific, Forma Steri-Cycle CO₂ Incubator, Model: 371, Thermo Fisher Scientific/ABD

² : RTCA Cihazı, xCELLigence RTCA DP, ACEA Biosciences Inc./Çin

³ : E-Plate, E-Plate 16, ID: 673526, LOT: 20130434, ACEA Biosciences.Inc./Çin

⁴ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

⁵ : Buzdolabı, Bosch/Türkiye

Şekil 2.2 Numunelerin xCELLigence E-Plate'lere yerleştirilmesi

C % 0,1	C % 0,01	S % 0,01	P % 0,01	P % 0,1	G % 0,1
C % 0,1	C % 0,01	S % 0,01	P % 0,01	P % 0,1	G % 0,1
C % 0,1	C % 0,01	S % 0,01	P % 0,01	P % 0,1	G % 0,1
C % 0,05	S % 0,1	S % 0,05	P % 0,05	G % 0,05	G % 0,01
C % 0,05	S % 0,1	S % 0,05	P % 0,05	G % 0,05	G % 0,01
C % 0,05	S % 0,1	S % 0,05	P % 0,05	G % 0,05	G % 0,01
C % 0,5	S % 0,5	P % 0,5	G % 0,5	KONTROL	
C % 0,5	S % 0,5	P % 0,5	G % 0,5	KONTROL	KONTROL
1. Plate		2. Plate		3. Plate	

24, 48 ve 72 saat boyunca cihazın okuması kontrol edilip araştırmada kullanılacak gerekli verileri elde edildi.

2.3 Mikronükleus Testi (MN)

Sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen Mikronükleus testi (MN), organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir. MN oluşum sıklığındaki artış, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002).

Sitotoksik ajanların etkisindeki hücreler kromozom kırıklarına, mikronükleus ve apoptotik hücre oluşumlarına yol açmaktadır. Cytokinesis Block MicroNucleus (CBMN) metodu ile apoptotik ve nekrotik hücreler de belirlenerek, DNA hasarı gösterilebilmektedir. Mikronükleus (MN) indeksi kanser riskinde de belirleyicidir. Böyle çalışmaların eklenmesi ile de kromozom kırığı onu takip eden mikronükleus ve apoptotik hücre oluşumu ve kanser ilişkisi ortaya konulabilmektedir (Üstüner, 2011).

2.3.2 IC 50 Değerleri

İn vitro sitotoksosite testlerinde IC50 değerlerinin hesaplanmasında non-lineer regresyon analizi ile eğriler çizdirilerek eğri formülünden %50 hücre sağ kalımına karşılık gelen diş macunlarının konsantrasyon değerleri hesaplandı.

Tablo 2.3 Diş macunlarının IC 50 değerleri

Diş Macunu	IC 50 Değeri	IC 50 Değeri / 2
GC TOOTH MOUSSE	%0,86	%0,43
SİGNAL BEYAZ GÜÇ	%0,46	%0,23
COLGATE TOTAL	%0,52	%0,26
PARADONTAX	%0,43	%0,215

Tablo 2.3'te yer alan konsantrasyon değerleri üzerinden hassas terazi¹ kullanılarak diş macunlarının kültür ortamı² yardımıyla çözeltileri hazırlandı. Mikronükleus testi uygulamasında, daha çok canlı hücre sayısından daha doğru kıyaslama yapabilmek için, diş macunlarının gerek IC 50 konsantrasyonları gerekse bu konsantrasyonların bir misli seyreltilmiş farklı iki hali kullanıldı.

¹ : Hassas Terazi, Electronic Balance, Type: AUW220D, NO: D450012768, Shimadzu

² : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

2.3.3 Hücrelerin Hazırlanması

Nitrojen tankında¹ saklanan, hücre dondurma tüplerinde² bulunan insan fibroblast hücre hattı³, tanktan çıkarılarak, su banyosunda⁴ çözünene kadar bekletildi. İnsan fibroblast hücreleri³ hücre kültür kabına⁵ % 10'luk fetal bovine serumu (FBS)⁶, 150 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)⁷ içine ekilerek %5 CO₂'li ortamda 37°C'de inkube edildi.

Hücre kültür kabının⁵ yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamı⁷ aspire edildi. Serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler 3 ml Phosphate Buffered Saline (PBS)⁸ ile iki kez yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 3 ml % 0,25 Trypsin/EDTA⁹ ilave edilerek 5 dk inkübatörde¹⁰ bekletildi. Trypsin⁹ etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra tripsinin etkisini durdurmak amacıyla, ortama 10 ml serum içeren kültür ortamı⁷ ilave edildi. Daha sonra hücreler steril bir tüp¹¹ içerisine toplandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant kısım atıldı.

¹ : Nitrojen Tankı, Biocane 34, Model: 808, Thermo Scientific/ABD

² : Hücre Dondurma Tüpü, CryoTube Vials, LOT: 132837, Thermo Scientific/Danimarka

³ : İnsan Fibroblastı, Human Skin Fibroblast, NB1RGB, LOT: 32, RIKEN Cell Bank/Japonya

⁴ : Su Banyosu, Nüve Bath, Model: NB20, Nüve sanayi malzemeleri İmalat ve Ticaret AŞ. /Belçika

⁵ : Hücre Kültür Kabı, Petri Kabı, Nunclon Surface, LOT: 122229, Nunc/Danimarka

⁶ : FBS (Fetal Bovine Serum), HyClone, Research Grade, Fetal bovine Serum, LOT: RXA35901, Thermo Scientific/İngiltere

⁷ : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

⁸ : PBS (Fosfat Tamponlama Tuzu), HyClone, Phosphate Buffered Saline (10X), LOT: AXG44028, Thermo Scientific/ABD

⁹ : Trypsin, Trypsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

¹⁰ : İnkübatör, Sanyo CO₂ Incubator, Model: MCO-18AIC, Sanyo Electric Ltd./Japonya

¹¹ : 15 ml.'lik Falcon Tüp, 10-0152- 15 ml. Centrifuge Tubes with Plug Seal Cap, LOT: J0069Z303-03, Biologix Research Company/Çin

Tripsinden¹ tamamen arındırılan hücreler 50 ml. kültür ortamında² çözüldü ve dört farklı 6'lık plate'e³ herbir kuyucukta 200 bin hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

2.3.4 Diş Macunlarının Uygulanması

Hazırlanan diş macunu çözeltileri 6'lık platelerin³ içine Tablo 2.3'te yer alan konsantrasyonları oranında ilave edildi. Bir saat süreyle ve ikinci grup için 24 saat süreyle inkübatörde⁴ bekletildikten sonra inkübatörden alınan diş macunu uygulanmış hücrelere, sitoplazma bölünmesini engelleyerek, bir kez bölünme geçirmiş hücrelerin iki nükleuslu hale gelmesini sağlayan, %0,2 IC 50 konsantrasyonunda sitokalsin B⁵ eklendi. Plate'ler daha sonra inkübatöre⁴ kaldırıldı. 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan hücreler 2 ml. steril PBS⁶ ile iki kez yıkandı. Kuyucuklara daha sonra 1 ml. %0,25 lik tripsin¹ eklendi ve hücreler 5-10 dakika 37 derecede inkübe edildi. 10x ışık mikroskopunda⁷ hücreler incelendikten sonra hala kuyucuk tabanında tutunan hücreler fiziksel darbeler ile kaldırıldı. Kuyucukların her birine 1'er ml. kültür ortamı² eklendi. Hücre solüsyonu 15'lik falkon tüplere⁸ aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılan hücrelerin üzerine 5 ml. fiksatif⁹ (1/4 asetik asit-metanol) damlatıldı. 1500 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildikten ve süpernatant kısmı atıldıktan sonra 3 ml. fiksatif⁹ damlatıldı ve son kez santrifüj edildi.

¹ : Tripsin, Tripsin / EDTA Solution (10x), LOT: 1010A, BIOCHROM/Almanya

² : Kültür Ortamı, BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), LOT: 4MB013, Lonza/Belçika, (Hyclone, Penicillin-Streptomycin Solution, LOT: J101651, Thermo Scientific/ABD)

³ : 6'lık Plate, Costar 3513, LOT: 15511008, Corning Incorporated/ABD

⁴ : İnkübatör, Sanyo CO₂ Incubator, Model: MCO-18AIC, Sanyo Electric Ltd./Japonya

⁵ : Sitokalsin B, Cytochalasin B, C-6762, LOT: 109H4006, Sigma Chemical CO., St. Louis/ABD, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Almanya

⁶ : PBS (Fosfat Tamponlama Tuzu), HyClone, Phosphate Buffered Saline (10X), LOT: AXG44028, Thermo Scientific/ABD

⁷ : Mikroskop, Leica DFC295, Leica Microsystems, Tip: 11 090 137 002, Leica/Almanya

⁸ : 15 ml.'lik Falkon Tüp, 10-0152- 15 ml. Centrifuge Tubes with Plug Seal Cap, LOT: J0069Z303-03, Biologix Research Company/Çin

⁹ : Fiksatif, Acetic Acid, LOT: K45402163, Methanol, LOT: 1557009 040, Merck/Almanya

Tüplerden pipetleme yapılarak alınan hücreler lamaların¹ üzerine damlatıldı ve preparat hazırlanmış oldu. Kontrol ve dış macunu uygulanmış hücreler, konsantrasyonları da dikkate alınarak ikişer preparat üzerinden çalışıldı. Sitokalsin B eklenme zamanı da düşünüldüğünde toplamda 36 preparat hazırlandı. Bir gece süreyle 70 derecede kurutulan preparatlar giemsa boyasıyla² boyandı. On dakika giemsa boyasının içinde bekletilen preparatlar musluk suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Sonrasında mikronükleusları sayabilmek için ışık mikroskopu³ altında 40x büyütmede incelemeye alındı.

Mikronüklus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır (Vanparys 1990). MN sayısındaki artış sayısal ve yapısal olarak kromozom düzensizliklerinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002).

Sitokalsin-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MN bulunduran hücrelerin oranı bulunabilmektedir (Fenech ve Morley 1986).

MN içeren hücre sayarken Heddle ve Countryman'ın (1976) kriterleri kullanılmaktadır. Buna göre; çift nükleuslu, belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünüme sahip olan hücrelerde, mikronükleusların çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır. Şekilleri ana çekirdekte olduğu gibi yuvarlak ve oval olurken boya alma yoğunluğu ana nükleus ile aynı olmalıdır.

¹ : Lam, Menzel-Glaser Superfrost, 76*26 mm, 50'lik, LOT: 650632, Thermo Scientific/Almanya

² : Giemsa, LOT: HX268147, Merck/Almanya

³ : Mikroskop, Leica DFC295, Leica Microsystems, Tip: 11 090 137 002, Leica/Almanya

2.4 İstatistiksel Yöntem

Test materyallerine maruz kalmamış kontrol grubu ile 4 farklı diş macununun MTT yöntemi için 5 farklı konsantrasyonu, RTCA yöntemi için 4 farklı konsantrasyonu uygulanmış çalışma grupları kültürlerindeki hücresel değişiklikler karşılaştırmalı olarak incelendi. Ayrıca kontrol grubu ve tüm diş macunu numunelerinin 24, 48 ve 72. saatlerdeki değişiklikleri de karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Microsoft Excel ve SPSS programları kullanılarak veri girişleri yapıldı. İstatistiksel analizler ve boxplot grafikler SPSS 20 paket programı ile gerçekleştirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS), ortanca (%25-75) ve sayı (%) olarak ifade edildi.

MTT sonuçlarında öncelikle Kolmogorov-Smirnov Testi ile normal dağılımına bakıldı. Farklı konsantrasyonlar, 24, 48 ve 72 saatlik farklı dönemler ve farklı diş macunlarını ihtiva eden verilerin hepsi normal dağılıma uygun çıktı ($p>0,05$). Bu nedenle parametrik hipotez testi ANOVA yapıldı.

Konsantrasyon ve diş macunlarından bağımsız olarak 24, 48 ve 72 saatin sonunda oluşan değerler arasında fark olup olmadığı ANOVA testi ile değerlendirildi. Her saatin kendi içindeki konsantrasyonları arasındaki farka 12 gözlem sayısı üzerinden ANOVA ile bakıldı. Yine 3 farklı saat sonunda, bu sefer 4 farklı diş macununa göre konsantrasyonlar arasında farklılık gösterip göstermediğine kontrol için 12 diğer konsantrasyonlar için 3 farklı gözlem sayısı üzerinden ANOVA ile değerlendirildi. Tüm farklı konsantrasyonlarda diş macunları arasındaki farklılığa ANOVA testi ile bakıldı. Homojenite değerlendirmesinde Levene testi kullanıldı. ANOVA testi sonucunda anlamlı çıkan sonuçlar çoklu karşılaştırma testi (Post Hoc testi) ile değerlendirildi. Sonuçların ikili grup karşılaştırılmasında Tukey testi kullanıldı.

RTCA sonuçlarının Kolmogorov-Smirnov Testi ile dağılıma bakıldığında nonparametrik istatistiksel yöntemlerin kullanılmasına karar verildi. RTCA sonuçlarına göre aynı diş macununun farklı konsantrasyonlarının istatistiksel analizinde ve aynı konsantrasyondaki farklı diş macunlarının istatistiksel analizinde ortanca değerler tespit edildi. Farklı konsantrasyon ve farklı diş macunları arasındaki karşılaştırmaların istatistiksel analizlerinde Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal Wallis testinde anlamlı çıkan analizlerde Mann Whitney-U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

RTCA sonuçlarına göre diş macunlarının farklı konsantrasyonlarının 24-48-72 saatlik istatistiksel analizlerinde ortanca değerler belirlendikten sonra saatler arasındaki karşılaştırmalarda Friedman testi kullanılmıştır.

Mikronükleus testinin sonuçları Ki-Kare testi kullanılarak analiz edildi. Sitokalsin B ilave edilme zamanları ve konsantrasyonları üzerinden diş macunu uygulanmış hücrelerin gerek kontrol grubuyla gerekse birbirleriyle kıyaslaması yapıldı.

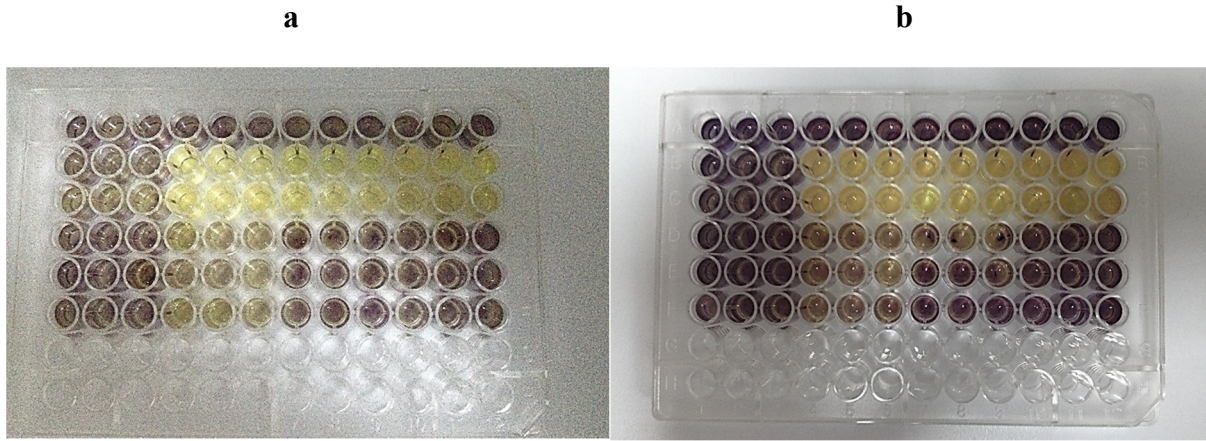
Bütün istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

3 BULGULAR

3.1 MTT Sonuçları

İnkübatörden çıkarılan, MTT ve SDS-HCl solüsyonlarının uygulandığı hücrelere ait 48. ve 72. saat görüntüleri Fotoğraf 3.5'te gösterilmektedir.

Fotoğraf 3.1 MTT ve SDS-HCl uygulanmış kuyucuklar; **a)** 48. saat görüntüleri, **b)** 72. saat görüntüleri



MTT uygulamasının sonuçları ise Tablo 3.1'de belirtilmektedir. Grafiğe yansımış görüntüleri Grafik 3.1 ile 3.9 arasında yer almaktadır.

Tablo 3.1 MTT sonuçları, 24-48-72 saat uygulaması

MTT SONUÇLARI (24 SAAT)													
SAAT	KONSANTRASYON	GC TOOTH MOUSSE			SİGNAL BEYAZ GÜÇ			COLGATE TOTAL			PARADONTAX		
24 SAAT	KONTROL	0,752	0,720	0,674	0,379	0,377	0,404	0,446	0,489	0,492	0,640	0,568	0,562
	1%	0,431	0,377	0,415	0,213	0,216	0,252	0,365	0,357	0,360	0,148	0,129	0,124
	0,50%	0,616	0,632	0,663	0,355	0,376	0,402	0,344	0,404	0,450	0,391	0,344	0,349
	0,10%	0,747	0,651	0,562	0,679	0,889	0,690	0,673	0,744	0,774	0,617	0,509	0,540
	0,05%	0,786	0,741	0,895	0,641	0,638	0,489	0,598	0,630	0,743	0,660	0,674	0,614
	0,01%	0,905	0,941	0,955	0,634	0,729	0,833	0,704	0,807	0,848	0,528	0,496	0,515
48 SAAT	KONTROL	0,733	0,776	0,829	0,390	0,406	0,373	0,621	0,735	0,663	0,608	0,685	0,671
	1%	0,636	0,530	0,556	0,355	0,360	0,328	0,184	0,185	0,186	0,137	0,104	0,114
	0,50%	0,707	0,625	0,748	0,388	0,362	0,367	0,327	0,313	0,240	0,180	0,204	0,180
	0,10%	0,714	0,748	0,793	0,766	0,929	0,725	0,607	0,666	0,620	0,581	0,578	0,655
	0,05%	0,970	0,858	0,844	0,544	0,602	0,578	0,863	0,774	0,751	0,619	0,687	0,712
	0,01%	0,978	0,915	1,052	0,479	0,503	0,567	0,981	0,833	0,782	0,558	0,576	0,626
72 SAAT	KONTROL	1,087	0,975	0,959	0,719	1,054	0,837	0,877	0,816	0,728	0,666	0,726	0,770
	1%	0,523	0,870	0,739	0,431	0,442	0,339	0,178	0,185	0,195	0,155	0,179	0,148
	0,50%	0,892	0,909	0,819	0,513	0,459	0,578	0,293	0,366	0,316	0,189	0,217	0,232
	0,10%	1,038	0,984	0,966	0,926	1,014	0,956	0,547	0,402	0,528	0,661	0,698	0,732
	0,05%	1,129	1,088	0,965	0,588	0,572	0,455	0,841	0,726	0,796	1,108	1,016	0,990
	0,01%	1,065	1,342	1,319	1,064	1,072	1,053	1,052	0,989	1,127	0,698	0,766	0,923

Kolmogorov-Smirnov Testi ile beş farklı konsantrasyon, üç farklı saat dilimi ve dört farklı diş macununa ait MTT ortalamalarının normal dağılıma uygun olduğu teyit edildi ($p>0,05$). Bu nedenle parametrik hipotez testi ANOVA yapılmasına karar verildi.

Tablo 3.2 GC Tooth Mousse'un tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları

Konsantrasyon (n)	24. saat	48. saat	72. saat	P ²
Kontrol (12)	0,54±0,13	0,62±0,15	0,85±0,14	0,000^a
0,01% (3)	0,93±0,03	0,98±0,07	1,24±0,15	0,018^f
0,05% (3)	0,81±0,08	0,89±0,07	1,06±0,09	0,019^e
0,10% (3)	0,65±0,09	0,75±0,04	1,00±0,04	0,001^d
0,50% (3)	0,64±0,02	0,69±0,06	0,87±0,05	0,002^c
1% (3)	0,41±0,03	0,57±0,06	0,71±0,18	0,037^b
P¹	0,000	0,001	0,001	

H0: Ort_{kont} = Ort %1 = Ort %0,50 = Ort %0,10 = Ort %0,05 = Ort %0,01

P¹ < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

H0: Ort₂₄ = Ort₄₈ = Ort₇₂

P² < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

^a grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla, p=0,000 ve p=0,001)

^b grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat arasında bulundu (p=0,031)

^c grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla, p=0,002 ve p=0,008)

^d grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla, p=0,001 ve p=0,007)

^e grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat arasında bulundu (p=0,017)

^f grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla, p=0,020 ve p=0,040)

GC Tooth Mousse'un farklı konsantrasyonlarının MTT sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 3.2). Post Hoc Testi ile yapılan çoklu karşılaştırmalarda; 24. saatte, kontrol ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,008 ve p=0,000), %1 ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,001 ve p=0,000),

%0,50 ile %0,01 konsantrasyonları arasında ($p=0,022$), %0,10 ile %0,01 konsantrasyonları arasında ($p=0,034$) anlamlı fark saptandı. 48. saatte, kontrol ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla $p=0,025$ ve $p=0,002$), %0,10 ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla $p=0,038$ ve $p=0,005$) anlamlı fark saptandı. 72. saatte, kontrol ile %0,01 konsantrasyonu arasında ($p=0,001$), %0,10 ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla $p=0,032$ ve $p=0,001$), %0,50 ile %0,01 konsantrasyonları arasında ($p=0,022$) anlamlı fark saptandı. 24. saatin sonunda konsantrasyonlar arasındaki farklar daha anlamlıyken, 48. saat ve 72. saatin sonunda bu farklılık daha azalmaktadır.

GC Tooth Mousse'un 24, 48 ve 72. saatlerde, sabit konsantrasyonda, MTT değerleri karşılaştırıldığında; %1, %0,50, %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonlarda anlamlı farklılık görüldü. %1 konsantrasyonda 24 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken ($p=0,031$) diğer saatlerin ikili karşılaştırılmasında fark gözlenmedi. %0,50 konsantrasyonda 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında fark varken (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,008$), %0,10 konsantrasyonda yine 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında fark bulundu (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,007$). Diğer karşılaştırmalarda fark yoktu. %0,05 konsantrasyonda 24 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken ($p=0,017$), %0,01 konsantrasyonda 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0,020$ ve $p=0,040$) (Tablo 3.2). Süre açısından değerlendirildiğinde GC Tooth Mousse'ta; daha fazla 24-72 saat arasındaki değişimler anlamlı çıkmaktadır. 48-72 saat arasındaki değişimlere daha az rastlanılırken, 24-48 saat arasında çok daha az anlamlı fark tespit edilmiştir.

Tablo 3.3 Signal'in tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları

Konsantrasyon (n)	24. saat	48. saat	72. saat	P²
Kontrol (12)	0,54±0,13	0,62±0,15	0,85±0,14	0,000^a
0,01% (3)	0,73±0,10	0,52±0,05	1,06±0,01	0,000^f
0,05% (3)	0,59±0,09	0,58±0,03	0,54±0,07	0,655^e
0,10% (3)	0,75±0,12	0,80±0,11	0,97±0,05	0,079^d
0,50% (3)	0,38±0,02	0,37±0,01	0,52±0,06	0,005^c
1% (3)	0,23±0,02	0,35±0,02	0,40±0,06	0,003^b
P¹	0,000	0,001	0,000	

H0: Ortkont = Ort %1 = Ort %0,50 = Ort %0,10 = Ort %0,05 = Ort %0,01

P¹ < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

H0: Ort24 = Ort 48 = Ort 72

P² < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

^a grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,001)

^b grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 48. Saat ve 24 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,016 ve p=0,002)

^c grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla, p=0,010 ve p=0,008)

^d grupiçi karşılaştırmada farklılık bulunmadı

^e grupiçi karşılaştırmada farklılık bulunmadı

^f grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 48. Saat, 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. Saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,014, p=0,002 ve p=0,000)

Signal'in farklı konsantrasyonlarının MTT sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 3.3). Post Hoc Testi ile yapılan çoklu karşılaştırmalarda; 24. saatte, kontrol ile %1 konsantrasyonu arasında (p=0,003), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,007 ve p=0,000), %0,50 ile %0,10 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,005 ve p=0,009) anlamlı fark saptandı. 48. saatte, kontrol ile %1 ve %0,50 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,017 ve p=0,034), %1 ile %0,10 konsantrasyonu arasında (p=0,001), %0,50 ile %0,10 konsantrasyonu arasında (p=0,002) anlamlı fark saptandı. 72. saatte, kontrol ile %1, %0,50 ve %0,05 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,001 ve p=0,002), %1 ile %0,10 ve %0,01 konsantrasyonları

arasında (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,000$), %0,50 ile %0,10 ve %0,01 konsantrasyonları arasında ($p=0,001$ ve $p=0,000$), %0,10 ile %0,05 konsantrasyonu arasında ($p=0,001$), %0,05 ile %0,01 konsantrasyonu arasında ($p=0,000$) anlamlı fark saptandı.

Signal'in 24, 48 ve 72. saatlerde, sabit konsantrasyonda, MTT değerleri karşılaştırıldığında; %1, %0,50 ve %0,01 konsantrasyonlarında anlamlı farklılık görülürken, %0,10 ve %0,05 konsantrasyonlarda anlamlı farklılık görülmedi. %1 konsantrasyonda 24 ile 48. saat ve 24 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken (sırasıyla $p=0,016$ ve $p=0,002$) 48 ile 72. saatin ikili karşılaştırılmasında fark gözlenmedi. %0,50 konsantrasyonda 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında fark varken (sırasıyla $p=0,010$ ve $p=0,008$), %0,10 konsantrasyonda saatler arasında fark görülmedi ($p=0,079$). Yine %0,05 konsantrasyonda da saatler arasında fark görülmedi ($p=0,655$). %0,01 konsantrasyonda ise 24 ile 48. saat, 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0,014$, $p=0,002$ ve $p=0,000$) (Tablo 3.3).

Tablo 3.4 Colgate'in tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları

Konsantrasyon (n)	24. saat	48. saat	72. saat	P ²
Kontrol (12)	0,54±0,13	0,62±0,15	0,85±0,14	0,000^a
0,01% (3)	0,79±0,07	0,87±0,10	1,06±0,07	0,019^f
0,05% (3)	0,66±0,08	0,80±0,06	0,79±0,06	0,069^e
0,10% (3)	0,73±0,05	0,63±0,03	0,49±0,08	0,007^d
0,50% (3)	0,40±0,05	0,29±0,05	0,33±0,04	0,073^c
1% (3)	0,36±0,00	0,19±0,00	0,19±0,01	0,000^b
P¹	0,000	0,000	0,000	

H0: Ortkont = Ort %1 = Ort %0,50 = Ort %0,10 = Ort %0,05 = Ort %0,01

P¹ < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

H0: Ort24 = Ort 48 = Ort 72

P² < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

^a grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,001)

^b grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 48. saat ve 24 ile 72. saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000)

^c grup içi karşılaştırmada farklılık bulunmadı

^d grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat arasında bulundu (p=0,005)

^e grup içi karşılaştırmada farklılık bulunmadı

^f grup içi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat arasında bulundu (p=0,018)

Colgate'in farklı konsantrasyonlarının MTT sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 3.4). Post Hoc Testi ile yapılan çoklu karşılaştırmalarda; 24. saatte, kontrol ile %0,01 konsantrasyonu arasında (p=0,016), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,003, p=0,022 ve p=0,001), %0,50 ile %0,10 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,009 ve p=0,002) anlamlı fark saptandı. 48. saatte, kontrol ile %1, %0,50 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,004 ve p=0,049), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,002, p=0,000 ve p=0,000), %0,50 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,024, p=0,000 ve p=0,000) anlamlı fark saptandı. 72. saatte, kontrol ile %1, %0,50 ve %0,10 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,001), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,025, p=0,000 ve p=0,000),

%0,50 ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında ($p=0,000$ ve $p=0,000$), %0,10 ile %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla $p=0,032$ ve $p=0,000$) anlamlı fark saptandı.

Colgate'in 24, 48 ve 72. saatlerde, sabit konsantrasyonda, MTT değerleri karşılaştırıldığında; %1, %0,10 ve %0,01 konsantrasyonlarında anlamlı farklılık görülürken, %0,50 ve %0,05 konsantrasyonlarda anlamlı farklılık görülmedi. %1 konsantrasyonda 24 ile 48. saat ve 24 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,000$) 48 ile 72. saatin ikili karşılaştırılmasında fark gözlenmedi. %0,50 konsantrasyonda saatler arasında fark görülmedi ($p=0,073$). %0,10 konsantrasyonda 24 ile 72. saatler arasında anlamlı fark görüldü ($p=0,005$). %0,05 konsantrasyonda da saatler arasında fark görülmedi ($p=0,069$). %0,01 konsantrasyonda ise 24 ile 72. saat arasında anlamlı fark bulundu ($p=0,018$) (Tablo 3.4).

Tablo 3.5 Paradontax'ın tüm konsantrasyonları için 24, 48, 72 saate ait MTT sonuçları

Konsantrasyon (n)	24. saat	48. saat	72. saat	P²
Kontrol (12)	0,54±0,13	0,62±0,15	0,85±0,14	0,000^a
0,01% (3)	0,51±0,02	0,59±0,04	0,80±0,12	0,007^f
0,05% (3)	0,65±0,03	0,67±0,05	1,04±0,06	0,000^e
0,10% (3)	0,56±0,06	0,61±0,04	0,70±0,04	0,024^d
0,50% (3)	0,36±0,03	0,19±0,01	0,21±0,02	0,000^c
1% (3)	0,13±0,01	0,12±0,02	0,16±0,02	0,039^b
P¹	0,000	0,000	0,000	

H0: Ortkont = Ort %1 = Ort %0,50 = Ort %0,10 = Ort %0,05 = Ort %0,01

P¹ < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

H0: Ort24 = Ort 48 = Ort 72

P² < 0,05 olduğunda H0 red edilebilir.

^a grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,001)

^b grupiçi karşılaştırmada farklılık 48 ile 72. saat arasında bulundu (p=0,035)

^c grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 48. saat ve 24 ile 72 saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000)

^d grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat arasında bulundu (p=0,021)

^e grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. saat ve 48 ile 72 saat arasında bulundu (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000)

^f grupiçi karşılaştırmada farklılık 24 ile 72. Saat ve 48 ile 72. saat arasında bulundu (sırasıyla p= 0,006 ve p=0,025)

Paradontax'ın farklı konsantrasyonlarının MTT sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (Tablo 3.5). Post Hoc Testi ile yapılan çoklu karşılaştırmalarda; 24. saatte, kontrol ile %1 konsantrasyonu arasında (p=0,000), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,001), %0,50 ile %0,05 konsantrasyonu arasında (p=0,018) anlamlı fark saptandı. 48. saatte, kontrol ile %1 ve %0,50 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,001), %0,50 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,003, p=0,000 ve p= 0,004) anlamlı fark saptandı. 72. saatte, kontrol ile %1 ve %0,50 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000,

p=0,000), %1 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,000), %0,50 ile %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları arasında (sırasıyla p=0,000, p=0,000 ve p=0,000), %0,10 ile %0,05 konsantrasyonu arasında (p=0,012) anlamlı fark saptandı.

Paradontax'ın 24, 48 ve 72. saatlerde, sabit konsantrasyonda, MTT değerleri karşılaştırıldığında; %1, %0,50, %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonlarda anlamlı farklılık görüldü. %1 konsantrasyonda 48 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken (p=0,035) diğer saatlerin ikili karşılaştırılmasında fark gözlenmedi. %0,50 konsantrasyonda 24 ile 48. saat ve 24 ile 72. saat arasında fark varken (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000), %0,10 konsantrasyonda 24 ile 72. saat arasında fark bulundu (p=0,021). Diğer karşılaştırmalarda fark yoktu. %0,05 konsantrasyonda 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saatler karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenirken (sırasıyla p=0,000 ve p=0,000), %0,01 konsantrasyonda 24 ile 72. saat ve 48 ile 72. saat arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0,006 ve p=0,025) (Tablo 3.5).

MTT sonuçlarına göre aynı diş macununun çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarının karşılaştırılmasına yönelik hazırlanan istatistiksel tablolar incelendiğinde; dört farklı diş macununun değişik konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (p<0,05). Bununla birlikte ikili karşılaştırmalar değerlendirildiğinde birçoğunda %1 ve %0,50 konsantrasyonlarının birbirine benzer, bu iki konsantrasyonun gerek kontrol grubuyla gerekse %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonlara göre farklı olduğu anlaşılmıştır. Aynı durum diş macunlarının %0,10, %0,05 ve %0,01 konsantrasyonları içinde geçerlidir. Bu konsantrasyonlar birbirleriyle benzer görünürken %1 ve %0,50 ile kıyaslandıklarında anlamlı farklar tespit edilmiştir. Yukarıda sıralanan tablolarda yer alan ortalamalar değerlendirildiğinde; diş macunlarının konsantrasyonları azaldıkça genel olarak canlı hücre sayılarının arttığı tespit edilmektedir. Konsantrasyonlar arttıkça toksisite artmaktadır.

İkili karşılaştırmalarda genel olarak düşük konsantrasyonlar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar bulunmazken, dozlar arttıkça kontrol grubundan sapmalar gözlemlenmektedir. GC Tooth Mousse'un yüksek konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, diğer diş macunlarında özellikle süre ilerledikçe kontrol grubuna göre toksisite artmaktadır.

MTT sonuçlarına göre dört farklı diş macununun tüm konsantrasyonları süre açısından değerlendirildiğinde; Signal'in % 0,1'lik ve % 0,05'lik, Colgate'in % 0,5'lik ve % 0,05'lik konsantrasyonlarında süre açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tüm diş macunları genel olarak süre açısından değerlendirildiğinde; daha fazla 24-72 saat arasındaki değişimler anlamlı çıkmaktadır. 48-72 saat arasındaki değişimlere daha az rastlanırken, 24-48 saat arasında çok daha az anlamlı fark tespit edilmiştir.

GC Tooth Mousse'un 24 saatten sonraki süreç boyunca hücre canlılığı düzenli şekilde artarken, diğer diş macunlarındaki değişim farklı gerçekleşmiştir. Genel olarak % 0,1, % 0,05 ve % 0,01 gibi düşük konsantrasyonlarda süre ile birlikte hücre canlılığında artış gözlemlenirken, % 1 ve % 0,5 gibi yüksek konsantrasyonlarda zaman içinde hücre canlılıkları azalmıştır.

Tablo 3.6 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %1 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri

Diş Macunu (n)	24.saat	48. saat	72.saat
GC (3)	0,41±0,03	0,57±0,06	0,71±0,18
Signal (3)	0,23±0,02	0,35±0,02	0,40±0,06
Colgate (3)	0,36±0,00	0,19±0,00	0,19±0,01
Paradontax (3)	0,13±0,01	0,12±0,02	0,16±0,02
P	0,000	0,000	0,000

Tablo 3.7 %1 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)

(I) Macun	(J) Macun	24.saat		48. saat		72. saat	
		Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P
GC	Signal	-0,18*	0,000	0,23*	0,000	0,31*	0,015
	Colgate	0,05	0,061	0,39*	0,000	0,53*	0,001
	Paradontax	0,27*	0,000	0,46*	0,000	0,55*	0,000
Signal	GC	-0,18*	0,000	-0,23*	0,000	-0,31*	0,015
	Colgate	-0,13*	0,000	0,16*	0,001	0,22	0,078
	Paradontax	0,93*	0,001	0,23*	0,000	0,24*	0,049
Colgate	GC	-0,05	0,061	-0,39*	0,000	-0,53*	0,001
	Signal	0,13*	0,000	-0,16*	0,001	-0,22	0,078
	Paradontax	0,23*	0,000	0,07	0,100	0,03	0,986
Paradontax	GC	-0,27*	0,000	-0,46*	0,000	-0,55*	0,000
	Signal	-0,93*	0,001	-0,23*	0,000	-0,24*	0,049
	Colgate	-0,23*	0,000	-0,07	0,100	-0,03	0,986

Diş macunlarının %1 konsantrasyonu için MTT sonuçları karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72. saatlerde diş macunları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 3.6). Yapılan Post Hoc analiz sonuçlarına göre 24. Saatte GC ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü. 48. saatte Parodontax ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü. 72. saatte Signal ile Colgate ve Parodontax ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken (sırasıyla $p=0,078$ ve $p=0,986$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü. (Tablo 3.7)

Tablo 3.8 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,50 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri

Diş Macunu (n)	24.saat	48. saat	72.saat
GC (3)	0,64±0,02	0,69±0,06	0,87±0,05
Signal (3)	0,38±0,02	0,37±0,01	0,52±0,06
Colgate (3)	0,40±0,05	0,29±0,05	0,33±0,04
Paradontax (3)	0,36±0,03	0,19±0,01	0,21±0,02
P	0,000	0,000	0,000

Tablo 3.9 %0,50 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)

(I) Macun	(J) Macun	24.saat		48. saat		72. saat	
		Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P
GC	Signal	0,26*	0,000	0,32*	0,000	0,36*	0,000
	Colgate	0,24*	0,000	0,40*	0,000	0,55*	0,000
	Paradontax	0,28*	0,000	0,51*	0,000	0,66*	0,000
Signal	GC	-0,26*	0,000	-0,32*	0,000	-0,36*	0,000
	Colgate	-0,02	0,861	0,08	0,154	0,19*	0,003
	Paradontax	0,02	0,933	0,18*	0,002	0,30*	0,000
Colgate	GC	-0,24*	0,000	-0,40*	0,000	-0,55*	0,000
	Signal	0,02	0,861	-0,08	0,154	-0,19*	0,003
	Paradontax	0,04	0,549	0,11*	0,050	0,11	0,055
Paradontax	GC	-0,28*	0,000	-0,51*	0,000	-0,66*	0,000
	Signal	-0,02	0,933	-0,18*	0,002	-0,30*	0,000
	Colgate	-0,04	0,549	-0,16*	0,050	-0,11	0,055

Diş macunlarının %0,50 konsantrasyonu için MTT sonuçları karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72. saatlerde diş macunları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 3.8). Yapılan Post Hoc analiz sonuçlarına göre 24. Saat, 48 saat ve 72 saat karşılaştırmalarının tamamında GC Tooth Mousse diğer diş macunlarından farklı gözlemlendi ($p<0,05$). 24. Saatte Signal, Colgate ve Paradontax gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmadı ($p>0,05$). 48. saatte Signal ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü ($p<0,05$). 72. saatte Parodontax ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü ($p<0,05$). (Tablo 3.9)

Tablo 3.10 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,10 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri

Diş Macunu (n)	24.saat	48. saat	72.saat
GC (3)	0,65±0,09	0,75±0,04	1,00±0,04
Signal (3)	0,75±0,12	0,88±0,11	0,97±0,05
Colgate (3)	0,73±0,05	0,63±0,03	0,49±0,08
Paradontax (3)	0,56±0,06	0,61±0,04	0,70±0,04
P	0,075	0,013	0,000

Tablo 3.11 %0,10 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)

(I) Macun	(J) Macun	48.saat		72. saat	
		Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P
GC	Signal	-0,06	0,720	0,03	0,886
	Colgate	0,12	0,170	0,50*	0,000
	Paradontax	0,15	0,083	0,30*	0,001
Signal	GC	0,06	0,720	-0,03	0,886
	Colgate	0,18*	0,038	0,47*	0,000
	Paradontax	0,20*	0,019	0,27*	0,001
Colgate	GC	-0,12	0,170	-0,50*	0,000
	Signal	-0,18*	0,038	-0,47*	0,000
	Paradontax	0,03	0,955	-0,21*	0,006
Paradontax	GC	-0,15	0,083	-0,30*	0,001
	Signal	-0,20*	0,019	-0,27*	0,001
	Colgate	-0,03	0,955	0,21*	0,006

Diş macunlarının %0,10 konsantrasyonu için MTT sonuçları karşılaştırıldığında 24. saat dışında, 48 ve 72. saatlerde diş macunları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 3.10). Yapılan Post Hoc analiz sonuçlarına göre 48. saatte Signal ile Colgate ve Signal ile Paradontax gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunurken (sırasıyla $p=0,038$ ve $p=0,019$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görülmedi ($p>0,05$). 72. saatte GC Tooth Mousse ile Signal gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü ($p<0,05$). (Tablo 3.11)

Tablo 3.12 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,05 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri

Diş Macunu (n)	24.saat	48. saat	72.saat
GC (3)	0,81±0,08	0,89±0,07	1,06±0,09
Signal (3)	0,59±0,09	0,58±0,03	0,54±0,07
Colgate (3)	0,66±0,08	0,80±0,06	0,79±0,06
Paradontax (3)	0,65±0,03	0,67±0,05	1,04±0,06
P	0,030	0,000	0,000

Tablo 3.13 %0,05 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)

(I) Macun	(J) Macun	24.saat		48. saat		72. saat	
		Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P
GC	Signal	0,22*	0,024	0,32*	0,000	0,52*	0,000
	Colgate	0,15	0,123	0,10	0,212	0,27*	0,006
	Paradontax	0,16	0,102	0,22*	0,005	0,02	0,978
Signal	GC	-0,22*	0,024	-0,32*	0,000	-0,52*	0,000
	Colgate	-0,07	0,669	-0,22*	0,004	-0,25*	0,011
	Paradontax	-0,06	0,741	-0,10	0,191	-0,50*	0,000
Colgate	GC	-0,15	0,123	-0,10	0,212	-0,27*	0,006
	Signal	0,07	0,669	0,22*	0,004	0,25*	0,011
	Paradontax	0,01	0,999	0,12	0,085	-0,25*	0,010
Paradontax	GC	-0,16	0,102	-0,22*	0,005	-0,02	0,978
	Signal	0,06	0,741	0,10	0,191	0,50*	0,000
	Colgate	-0,01	0,999	-0,12	0,085	0,25*	0,010

Diş macunlarının %0,05 konsantrasyonu için MTT sonuçları karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72. saatlerde diş macunları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 3.12). Yapılan Post Hoc analiz sonuçlarına göre 24. saatte GC Tooth Mousse ile Signal gruplarının ikili karşılaştırılmasında anlamlı farklılık görünürken ($p=0,024$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). 48. saatte GC Tooth Mousse ile Signal, GC Tooth Mousse ile Paradontax ve Signal ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunurken (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,005$ ve $p=0,004$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar gözlenmedi ($p>0,05$). 72. saatte GC Tooth Mousse ile Parodontax gruplarının ikili karşılaştırmaları farklı bulunmazken ($p>0,05$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü ($p<0,05$). (Tablo 3.13)

Tablo 3.14 MTT sonuçlarına göre tüm diş macunları için %0,01 konsantrasyon ve ikili karşılaştırmalarının 24, 48, 72 saat sonucunda oluşan P değeri

Diş Macunu (n)	24.saat	48. saat	72.saat
GC (3)	0,93±0,03	0,98±0,07	1,24±0,15
Signal (3)	0,73±0,10	0,52±0,05	1,06±0,01
Colgate (3)	0,79±0,07	0,87±0,10	1,06±0,07
Paradontax (3)	0,51±0,02	0,59±0,04	0,80±0,12
P	0,000	0,000	0,005

Tablo 3.15 %0,01 Konsantrasyonları için çoklu karşılaştırma (Post Hoc Testi)

(I) Macun	(J) Macun	24.saat		48. saat		72. saat	
		Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P	Ortalama Fark (I-J)	P
GC	Signal	0,20*	0,020	0,47*	0,000	0,18	0,218
	Colgate	0,15	0,085	0,12	0,237	0,19	0,195
	Paradontax	0,42*	0,000	0,40*	0,000	0,45*	0,003
Signal	GC	-0,20*	0,020	-0,47*	0,000	-0,18	0,218
	Colgate	-0,05	0,732	-0,35*	0,001	0,01	1,000
	Paradontax	0,22*	0,013	-0,07	0,610	0,27	0,050
Colgate	GC	-0,15	0,085	-0,12	0,237	-0,19	0,195
	Signal	0,05	0,732	0,35*	0,001	-0,01	1,000
	Paradontax	0,27*	0,003	0,28*	0,005	0,26	0,056
Paradontax	GC	-0,42*	0,000	-0,40*	0,000	-0,45*	0,003
	Signal	-0,22*	0,013	0,07	0,610	-0,27	0,050
	Colgate	-0,27*	0,003	-0,28*	0,005	-0,26	0,056

Diş macunlarının %0,01 konsantrasyonu için MTT sonuçları karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72. saatlerde diş macunları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 3.14). Yapılan Post Hoc analiz sonuçlarına göre 24. saatte GC Tooth Mousse ile Colgate ve Signal ile Colgate gruplarının ikili karşılaştırılmasında anlamlı farklılık görünmezken (sırasıyla $p=0,085$ ve $p=0,732$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). 48. saatte GC Tooth Mousse ile Colgate, Signal ile Paradontax gruplarının ikili karşılaştırmalarında fark bulunmazken (sırasıyla $p=0,237$ ve $p=0,610$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görüldü ($p<0,05$). 72. saatte GC Tooth Mousse ile Parodontax gruplarının ikili karşılaştırmalarında anlamlı fark görülürken ($p=0,003$) diğer diş macunlarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılıklar görülmedi ($p>0,05$) (Tablo 3.15)

MTT sonuçlarına göre aynı konsantrasyonlardaki farklı diş macunlarının karşılaştırılmasına yönelik hazırlanan istatistiksel tablolar incelendiğinde; toplam dört farklı diş macununun birbirleriyle olan altı farklı karşılaştırmaları 24, 48 ve 72. saatler dikkate alınarak değerlendirildi.

24. saatin sonunda genel olarak konsantrasyonlar azaldıkça (%0,01'lik konsantrasyon hariç), diş macunları arasındaki farklılıklar da azalmaktadır. Bununla birlikte %0,10'luk konsantrasyonda diş macunları arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

48. saatin sonunda; diş macunlarının karşılaştırılmasında, yüksek konsantrasyonlarda daha fazla anlamlı farklılıklar ortaya çıkarken, konsantrasyonlar azaldıkça farklılıklar da azalmıştır.

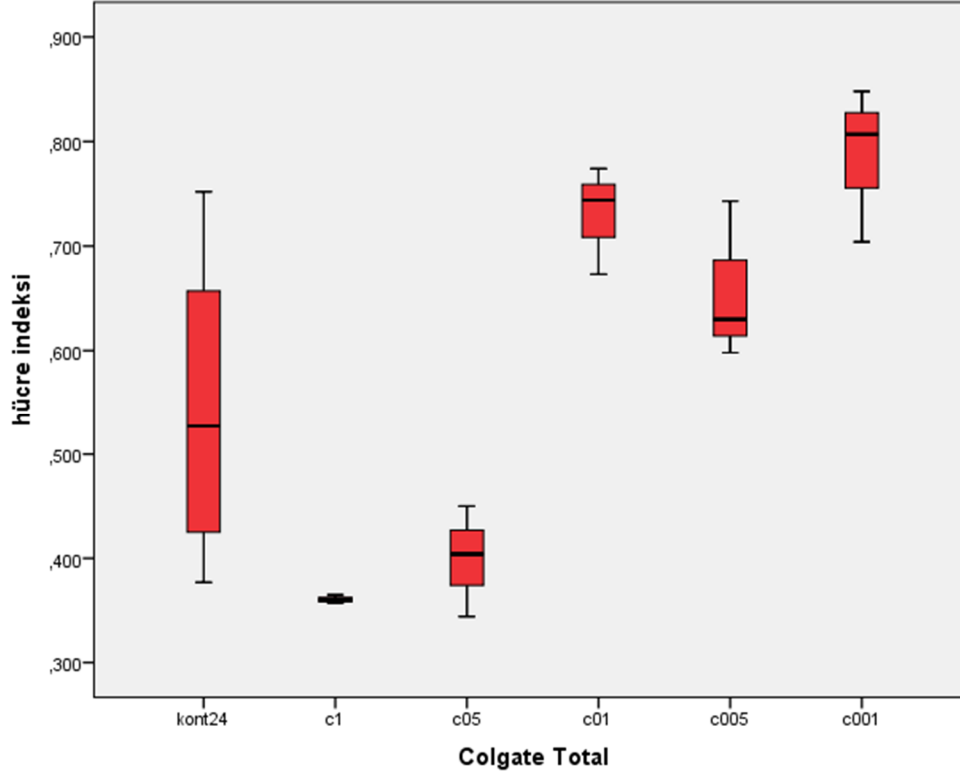
72. saatin sonunda; %0,01'lik konsantrasyon hariç diş macunlarına ait diğer tüm konsantrasyonların karşılaştırılmasında daha çok anlamlı fark bulunurken ($p<0,05$), %0,01'lik konsantrasyon için sadece GC Tooth Mousse ile Paradontax arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,003$).

%1 ve %0,50 gibi yüksek konsantrasyonlarda çok kısa sürede diş macunları arasındaki fark ortaya çıkarken, düşük konsantrasyonlarda süre ile farklar anlamlılık kazanmaktadır. 48 ve 72 saatin sonunda ise tüm diş macunları arasındaki fark belirginleşmiştir.

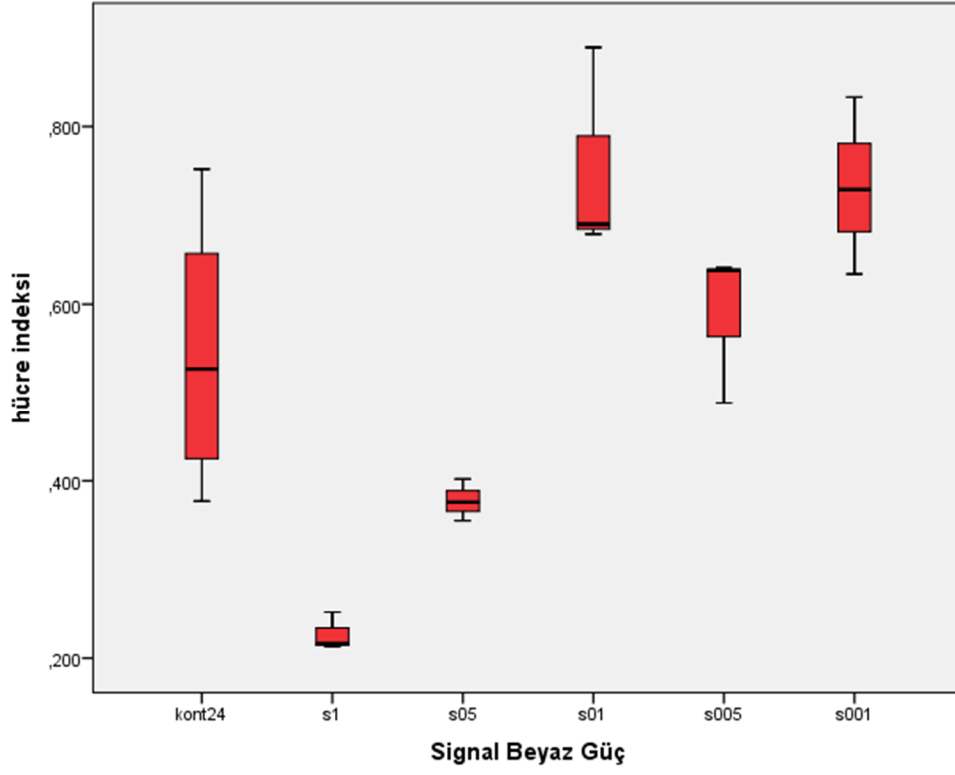
Yukarıda yer alan tablolardaki rakamlar değerlendirildiğinde; % 1, % 0,5, % 0,1 ve % 0,01'lik konsantrasyonlarda Paradontax en düşük hücre canlılığına sahiptir (%0,10'un 72. saati ve %0,01'lik konsantrasyonun 48. saati hariç). %0,05'lik konsantrasyonda en az hücre

canlılığına sahip Signal'dir. %0,1'lik konsantrasyonun 24 ve 48 saatleri haricinde en yüksek hücre canlılığı ise GC Tooth Mousse'da gözlemlenmektedir.

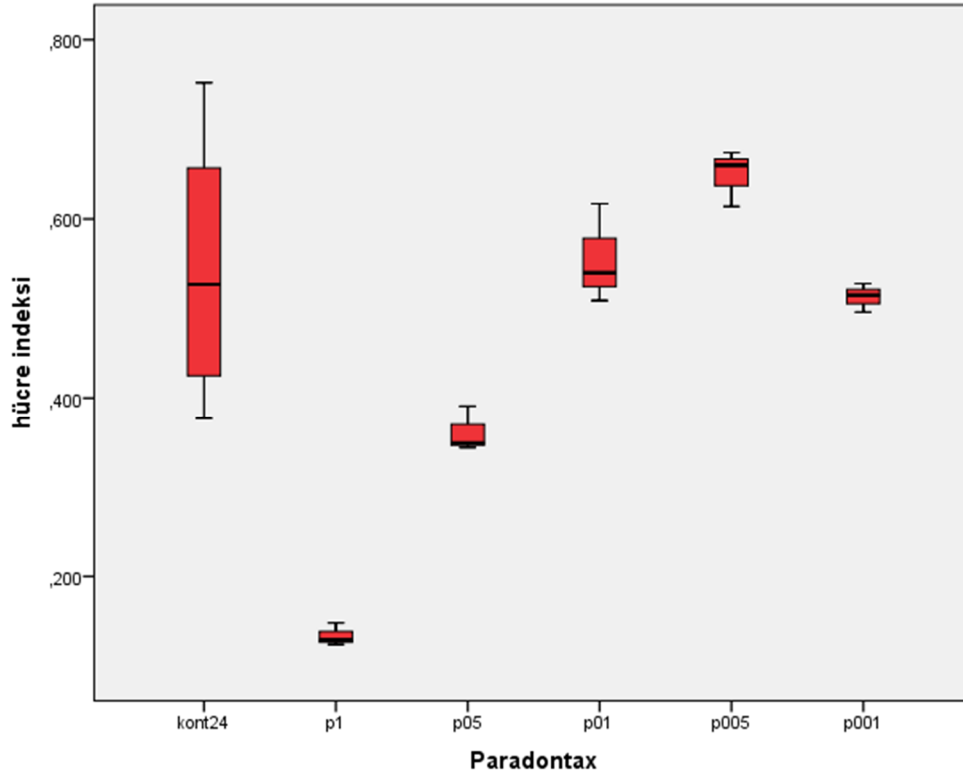
Grafik 3.1 Colgate, tüm konsantrasyonlar, 24 saat



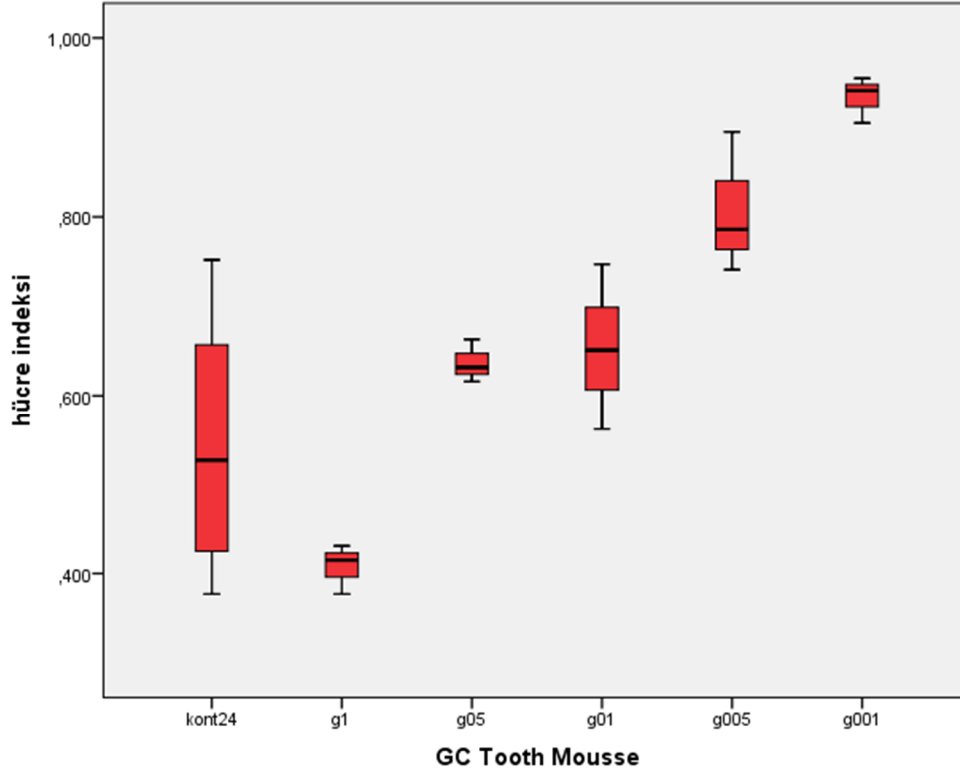
Grafik 3.2 Signal, tüm konsantrasyonlar, 24 saat



Grafik 3.3 Paradontax, tüm konsantrasyonlar, 24 saat

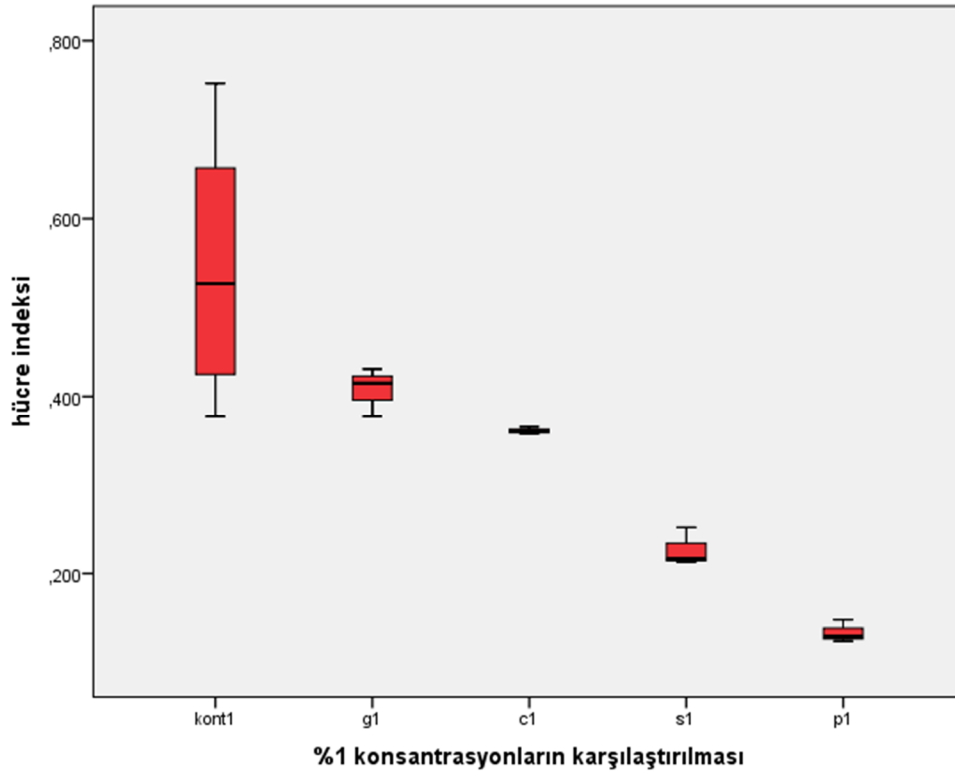


Grafik 3.4 GC Tooth Mousse, tüm konsantrasyonlar, 24 saat

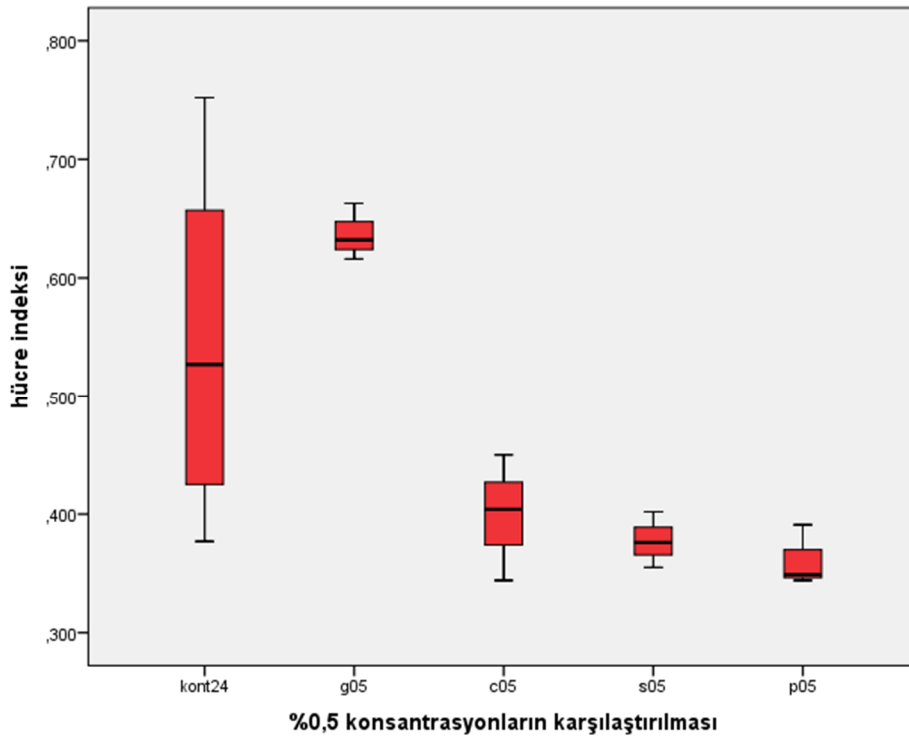


Grafik 3.1 – 3.4 incelendiğinde; diş macunu yoğunluğu azaldıkça canlı hücre sayısının genel olarak arttığı tespit edilmiştir. Colgate, Signal ve Paradontax'ın %1 ve %0,5'lik konsantrasyonları kontrol hücre grubuna kıyasla daha altta yer alırken, GC Tooth Mousse'un %0,5'lik konsantrasyonu kontrol grubuna yakın çıkmıştır.

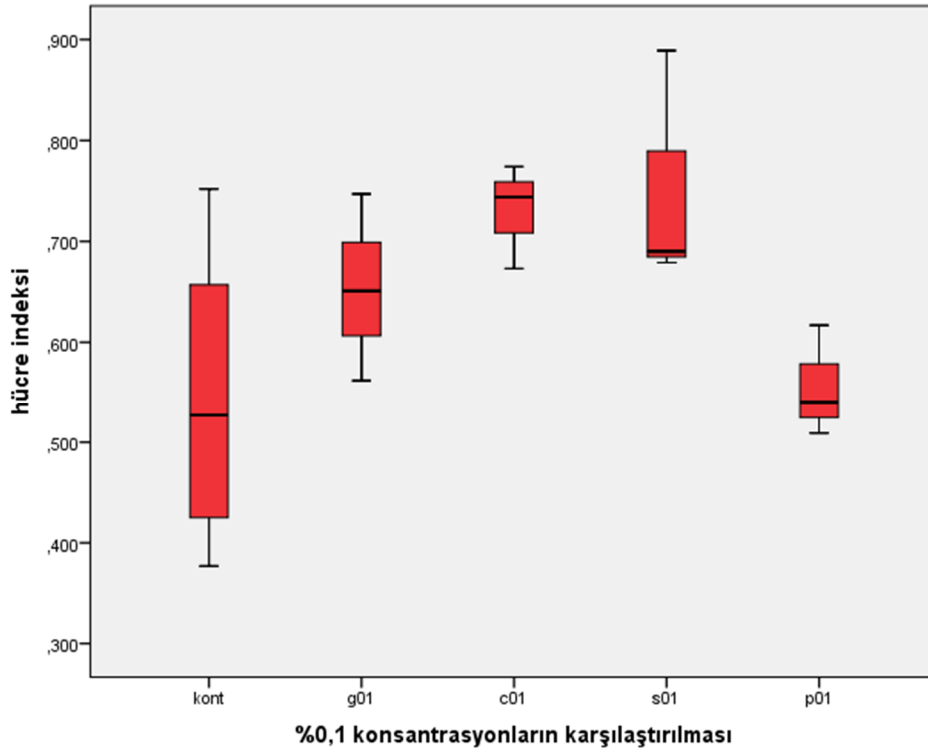
Grafik 3.5 Tüm diş macunlarının %1 konsantrasyonu, 24 saat



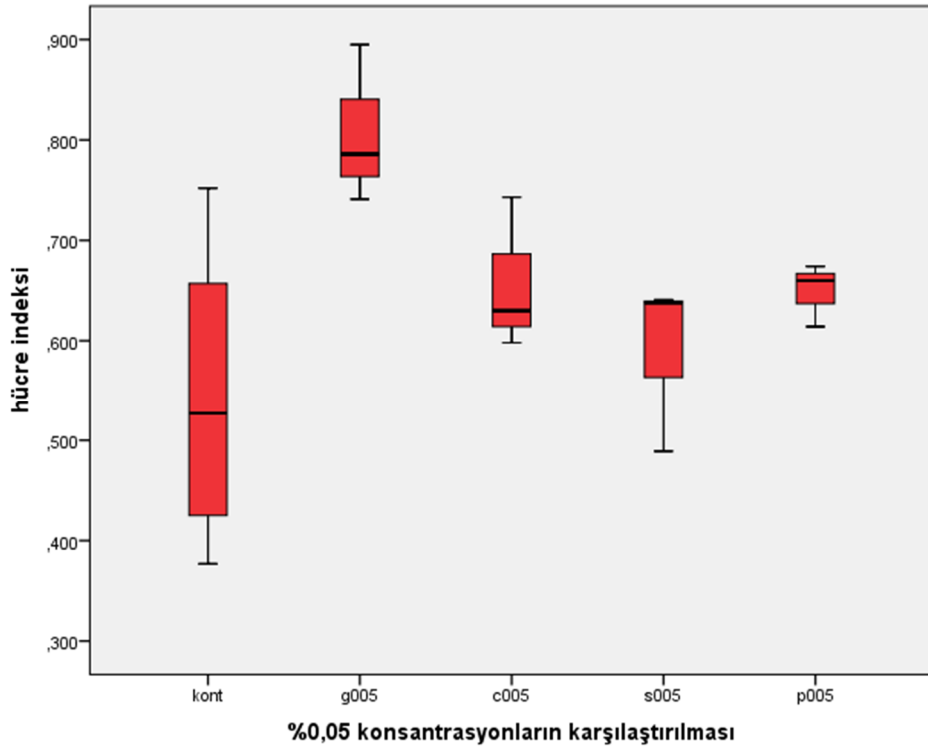
Grafik 3.6 Tüm diş macunlarının %0,5 konsantrasyonu, 24 saat



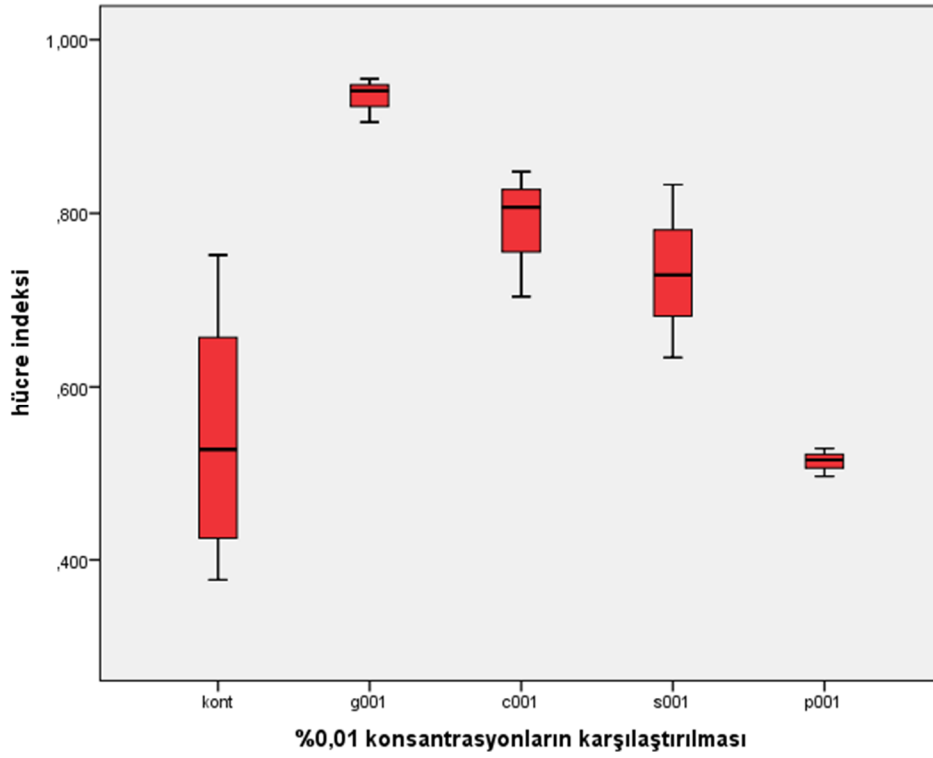
Grafik 3.7 Tüm diş macunlarının %0,1 konsantrasyonu, 24 saat



Grafik 3.8 Tüm diş macunlarının %0,05 konsantrasyonu, 24 saat



Grafik 3.9 Tüm diş macunlarının %0,01 konsantrasyonu, 24 saat



Grafik 3.5 – 3.9 değerlendirildiğinde; %0,1’lik konsantrasyon haricinde GC Tooth Mousse’un tüm konsantrasyonlarda en yüksek hücre indeksine sahip olduğu görülmüştür. Buna karşılık Paradontax canlı hücre oranında en altta yer almıştır (%0,05’lik konsantrasyon hariç).

Tüm diş macunlarının %1’lik konsantrasyonları kontrol hücre grubunun altında yer almıştır. GC Tooth Mousse’un %0,5’lik konsantrasyonu kontrol grubuna paralelken, diğer macunların %0,5’lik konsantrasyonları kontrol grubunun altında yer almıştır. Düşük konsantrasyonların tamamında kontrol hücre grubuna yakın bir görüntü elde edilmiştir.

GC Tooth Mousse haricindeki diğer diş macunlarının %1 ve %0,5’lik konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlerde kontrol hücre grubuna göre negatif yönde seyrederken, diğer konsantrasyonları paralel seyretmiştir. GC Tooth Mousse’da ise sadece %1’lik konsantrasyonun ilk 24 saati kontrol grubunun altında yer almış olup, diğer tüm konsantrasyonlar süreç dahilinde pozitif seyretmiştir.

3.2 RTCA Sonuçları

Tablo 3.16 RTCA sonuçları, 24-48-72 saat uygulaması

RTCA SONUÇLARI (24-48-72 SAAT)												
SAAT	KONSANTRASYON	GC TOOTH MOUSSE			SİĞNAL BEYAZ GÜÇ			COLGATE TOTAL			PARADONTAX	
24 SAAT	KONTROL	0,7914	0,8223	0,7315	0,7914	0,8223	0,7315	0,7914	0,8223	0,7315	0,7914	0,8223
	0,50%	0,9610	0,9506		-0,0917	-0,1969		-0,0604	-0,1294		-0,0788	-0,0845
	0,10%	0,4948	0,7648	0,6781	0,8499	1,0580	0,7930	0,5537	0,9488	0,8646	0,3890	0,8092
	0,05%	0,8667	1,1053	1,0409	0,9336	0,6661	0,8192	0,8640	0,8843	0,8422	0,8544	0,8171
	0,01%	1,0667	1,0973	0,7758	0,7124	1,0104	0,9480	0,4866	0,8326	0,9994	0,6408	0,6614
48 SAAT	KONTROL	1,0029	1,0066	0,8730	1,0029	1,0066	0,8730	1,0029	1,0066	0,8730	1,0029	1,0066
	0,50%	1,1920	1,0810		-0,1633	-0,2763		-0,1957	-0,2470		-0,2289	-0,2614
	0,10%	0,6125	0,9331	0,9014	1,1834	1,4377	1,1356	0,5956	0,9652	0,9516	0,4315	0,9930
	0,05%	1,1940	1,4768	1,3972	1,2804	0,7705	1,1741	0,9892	0,9859	0,9833	1,1051	1,1120
	0,01%	1,4650	1,4586	1,1408	0,9270	1,3202	1,3229	0,5185	0,9118	1,1914	0,9109	0,9111
72 SAAT	KONTROL	1,6636	1,3957	1,2813	1,6636	1,3957	1,2813	1,6636	1,3957	1,2813	1,6636	1,3957
	0,50%	1,5984	1,3519		-0,2049	-0,3279		-0,2624	-0,3135		-0,2934	-0,3195
	0,10%	0,9513	1,4450	1,5208	1,5931	1,9296	1,6720	0,8588	1,2995	1,1859	0,4785	1,2737
	0,05%	1,8168	2,0309	2,0341	1,7578	1,1513	1,6163	1,4668	1,3118	1,4617	1,9169	1,8003
	0,01%	2,1627	2,0899	1,7213	1,4674	1,8337	1,9697	0,7257	1,3873	1,8926	1,5215	1,5375

Tablo 3.17 Diş macunlarından bağımsız dönemler için tek örneklem Kolmogorov-Smirnov normal dağılıma uygunluk testi

Dönem	N (Gözlem Sayısı)	K - S istatistiği	P (Anl. Düz.)
24 Saat	47	0,22	0,000
48 Saat	47	0,24	0,000
72 Saat	47	0,21	0,000

H0: Değişkenler normal dağılıma uygundur.

P = 0,000 < tablo değeri (0,05) olduğu için H0 Red edilebilir.

Tablo 3.17'deki veriler incelendiğinde; dört farklı konsantrasyon, üç farklı zaman dilimi ve dört farklı diş macunu ihtiva eden RTCA sonuç verileri normal dağılıma uygun çıkmadı ($p < 0,05$). Bu nedenle nonparametrik hipotez testi Kruskal Wallis yapılmasına karar verildi.

Tablo 3.18 RTCA sonuçlarına göre aynı diş macunu için tüm konsantrasyonların karşılaştırılması

	Konsantrasyon	24 saat (ortanca)	48 saat (ortanca)	72 saat (ortanca)
	Kontrol	0,79 (0,73-0,82)	1,00 (0,87-1,01)	1,40 (1,28-1,66)
GC	0,50%	0,96 (0,95-0,96)	1,14 (1,08-1,19)	1,48 (1,35-1,60)
	0,10%	0,68 (0,50-0,77)	0,90 (0,61-0,93)	1,45 (0,95-1,52)
	0,05%	1,04 (0,87-1,11)	1,40 (1,19-1,48)	2,03 (1,82-2,03)
	0,01%	1,07 (0,78-1,10)	1,46 (1,14-1,47)	2,09 (1,72-2,16)
Signal	0,50%	-0,14 (-0,20- -0,09)	-0,22 (-0,28- -0,16)	-0,27 (-0,33- -0,21)
	0,10%	0,85 (0,79-1,06)	1,18 (1,14-1,44)	1,67 (1,59-1,93)
	0,05%	0,82 (0,67-0,93)	1,17 (0,77-1,28)	1,62 (1,15-1,76)
	0,01%	0,95 (0,71-1,01)	1,32 (0,93-1,32)	1,83 (1,47-1,97)
Colgate	0,50%	-0,10 (-0,13- -0,06)	-0,22 (-0,25- -0,20)	-0,29 (-0,31- -0,26)
	0,10%	0,87 (0,55-0,95)	0,95 (0,60-0,97)	1,19 (0,86-1,30)
	0,05%	0,86 (0,84-0,88)	0,99 (0,98-0,99)	1,46 (1,31-1,47)
	0,01%	0,83 (0,49-0,10)	0,91 (0,52-1,19)	1,39 (0,73-1,89)
Paradontax	0,50%	-0,08 (-0,09- -0,08)	-0,25 (-0,26- -0,23)	-0,31 (-0,32- -0,29)
	0,10%	0,68 (0,39-0,809)	0,83 (0,43-0,99)	1,12 (0,48-1,27)
	0,05%	0,83 (0,82-0,85)	1,11 (1,11-1,15)	1,92 (1,80-1,97)
	0,01%	0,66 (0,64-0,68)	0,91 (0,91-0,91)	1,54 (1,52-1,55)

Tablo 3.19 RTCA sonuçlarına göre aynı diş macununun tüm konsantrasyonlarının ve ikili karşılaştırmalarının P değeri

Konsantrasyon	P (24 saat)	P (48 saat)	P (72 saat)
Gc	0,061	0,029*	0,045*
Kontrol & 0,5	0,083	0,083	1,000
Kontrol & 0,1	0,127	0,275	0,827
Kontrol & 0,05	0,050	0,050	0,050
Kontrol & 0,01	0,275	0,050	0,050
0,5 & 0,1	0,083	0,083	0,564
0,5 & 0,05	0,564	0,083	0,083
0,5 & 0,01	0,564	0,248	0,083
0,1 & 0,05	0,050	0,050	0,050
0,1 & 0,01	0,050	0,050	0,050
0,05 & 0,01	0,827	0,827	0,513
Signal	0,170	0,112	0,121
Colgate	0,160	0,165	0,119
Paradontax	0,032*	0,034*	0,019*
Kontrol & 0,5	0,083	0,083	0,083
Kontrol & 0,1	0,275	0,127	0,050
Kontrol & 0,05	0,127	0,050	0,050
Kontrol & 0,01	0,050	0,513	0,513
0,5 & 0,1	0,083	0,083	0,083
0,5 & 0,05	0,083	0,083	0,083
0,5 & 0,01	0,083	0,083	0,083
0,1 & 0,05	0,050	0,050	0,050
0,1 & 0,01	0,827	0,513	0,050
0,05 & 0,01	0,050	0,050	0,050

***p<0,05**

RTCA sonuçlarına göre aynı diş macununun çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarının karşılaştırılmasına yönelik hazırlanan istatistiksel tablolar (Tablo 3.18 ve Tablo 3.19) incelendiğinde; GC Tooth Mousse'un 48 ve 72. saatlerindeki ve Paradontax'ın tüm saatlerdeki konsantrasyonlarının farkları anlamlı bulunurken ($p<0,05$); Signal ve Colgate'in farklı konsantrasyonlarında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte Signal ve Colgate'in % 0,5'lik konsantrasyonlarının gerek kontrol grubundan gerekse diğer yüzdelik konsantrasyonlardan çok farklı olduğu görülebilmektedir. GC Tooth Mousse'un aksine Paradontax'ın % 0,5'lik konsantrasyonu da eksi değerlerde yer almaktadır. Tablo 3.18'de yer alan veriler değerlendirildiğinde; diş macunlarının konsantrasyonları azaldıkça genel olarak canlı hücre sayılarının arttığı tespit edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda

fark daha net anlaşılabilirken, düşük konsantrasyonlarda farklar çok daha az değerlere inmiştir.

Tablo 3.20 RTCA sonuçlarına göre aynı konsantrasyon için farklı diş macunlarının karşılaştırılması

	Konsantrasyon	24 saat (ortanca)	48 saat (ortanca)	72 saat (ortanca)
	Kontrol	0,79 (0,73-0,82)	1,00 (0,87-1,01)	1,40 (1,28-1,66)
0,50%	GC	0,96 (0,95-0,96)	1,14 (1,08-1,19)	1,48 (1,35-1,60)
	Signal	-0,14 (-0,20- -0,09)	-0,22 (-0,28- -0,16)	-0,27 (-0,33- -0,21)
	Colgate	-0,10 (-0,13- -0,06)	-0,22 (-0,25- -0,20)	-0,29 (-0,31- -0,26)
	Paradontax	-0,08 (-0,09- -0,08)	-0,25 (-0,26- -0,23)	-0,31 (-0,32- -0,29)
0,10%	GC	0,68 (0,50-0,77)	0,90 (0,61-0,93)	1,45 (0,95-1,52)
	Signal	0,85 (0,79-1,06)	1,18 (1,14-1,44)	1,67 (1,59-1,93)
	Colgate	0,87 (0,55-0,95)	0,95 (0,60-0,97)	1,19 (0,86-1,30)
	Paradontax	0,68 (0,39-0,81)	0,83 (0,43-0,99)	1,12 (0,48-1,27)
0,05%	GC	1,04 (0,87-1,11)	1,40 (1,19-1,48)	2,03 (1,82-2,03)
	Signal	0,82 (0,67-0,93)	1,17 (0,77-1,28)	1,62 (1,15-1,76)
	Colgate	0,86 (0,84-0,88)	0,99 (0,98-0,99)	1,46 (1,31-1,47)
	Paradontax	0,83 (0,82-0,85)	1,11 (1,11-1,15)	1,92 (1,80-1,97)
0,01%	GC	1,07 (0,78-1,10)	1,46 (1,14-1,47)	2,09 (1,72-2,16)
	Signal	0,95 (0,71-1,01)	1,32 (0,93-1,32)	1,83 (1,47-1,97)
	Colgate	0,83 (0,49-0,10)	0,91 (0,52-1,19)	1,39 (0,73-1,89)
	Paradontax	0,66 (0,64-0,68)	0,91 (0,91-0,91)	1,54 (1,52-1,55)

Tablo 3.21 RTCA sonuçlarına göre aynı konsantrasyonlardaki farklı diş macunlarının ikili karşılaştırmalarının P değeri

Konsantrasyon	P (24 saat)	P (48 saat)	P (72 saat)
0,50%	0,160	0,244	0,244
GC & Signal			0,121
GC & Colgate			0,121
GC & Paradontax			0,121
Signal & Colgate			1,000
Signal & Paradontax			1,000
Colgate & Paradontax			0,439
0,10%	0,204	0,094	0,063
GC & Signal			0,050
GC & Colgate			0,275
GC & Paradontax			0,275
Signal & Colgate			0,050
Signal & Paradontax			0,050
Colgate & Paradontax			0,513
0,05%	0,129	0,075	0,033*
GC & Signal			0,050
GC & Colgate			0,050
GC & Paradontax			0,275
Signal & Colgate			0,513
Signal & Paradontax			0,050
Colgate & Paradontax			0,050
0,01%	0,132	0,066	0,183
GC & Signal			0,275
GC & Colgate			0,127
GC & Paradontax			0,050
Signal & Colgate			0,275
Signal & Paradontax			0,513
Colgate & Paradontax			0,513

***p<0,05**

RTCA sonuçlarına göre aynı konsantrasyonlardaki farklı diş macunlarının karşılaştırılmasına yönelik hazırlanan istatistiksel tablolar (Tablo 3.20 ve tablo 3.21) incelendiğinde; 24 ve 48 saatin sonunda oluşan değerler istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadırlar ($p>0,05$). Yalnızca 72 saat sonunda % 0,05’lik konsantrasyonda diş macunları arasında oluşan fark anlamlı çıkmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte ikili karşılaştırmalar değerlendirildiğinde GC Tooth Mousse ve Paradontax’ın Signal ve Colgate ile aralarında oluşan p değerinin 0,05’e eşit olduğu gözlenmiştir. Tablo 3.20’de yer alan

rakamlar değerlendirildiğinde; GC Tooth Mousse'un aksine Signal, Colgate ve Paradontax'ın % 0,5'lik konsantrasyonundaki hücresel indeksin negatif değerler taşıdığı gözlenmektedir. GC Tooth Mousse; % 0,1'lik konsantrasyonu hariç en çok hücre canlılığına sahipken diğer diş macunlarının değerleri birbirine benzer çıkmıştır.

Tablo 3.22 RTCA sonuçlarına göre 24-48-72 saat kıyaslaması

Konsantrasyon	24 saat (ortanca)	48 saat (ortanca)	72 saat (ortanca)	P
Gc %0,5'lik	0,96 (0,71-0,72)	1,14 (0,81-0,89)	1,48 (1,01-1,20)	0,135
Signal %0,5'lik	-0,14 (-0,15-0,20)	-0,22 (-0,21-0,15)	-0,27 (-0,25-0,12)	0,135
Colgate %0,5'lik	-0,10(-0,10- -0,11)	-0,22 (-0,19- -0,22)	-0,29 (-0,24- -0,27)	0,135
Paradontax %0,5'lik	-0,08 (-0,06- -0,12)	-0,25 (-0,20- -0,23)	-0,31 (-0,24- -0,28)	0,135
Gc %0,1'lik	0,68 (0,50-0,77)	0,90 (0,61-0,93)	1,45 (0,95-1,52)	0,05
Signal %0,1'lik	0,85 (0,79-1,06)	1,18 (1,14-1,44)	1,67 (1,59-1,93)	0,05
Colgate %0,1'lik	0,87 (0,55-0,95)	0,95 (0,60-0,97)	1,19 (0,86-1,30)	0,05
Paradontax %0,1'lik	0,68 (0,39-0,81)	0,83 (0,43-0,99)	1,12 (0,48-1,27)	0,05
Gc %0,05'lik	1,04 (0,87-1,11)	1,40 (1,19-1,48)	2,03 (1,82-2,03)	0,05
Signal %0,05'lik	0,82 (0,67-0,93)	1,17 (0,77-1,28)	1,62 (1,15-1,76)	0,05
Colgate %0,05'lik	0,86 (0,84-0,88)	0,99 (0,98-0,99)	1,46 (1,31-1,47)	0,05
Paradontax %0,05'lik	0,83 (0,82-0,85)	1,11 (1,11-1,15)	1,92 (1,80-1,97)	0,05
Gc %0,01'lik	1,07 (0,78-1,10)	1,46 (1,14-1,47)	2,09 (1,72-2,16)	0,05
Signal %0,01'lik	0,95 (0,71-1,01)	1,32 (0,93-1,32)	1,83 (1,47-1,97)	0,05
Colgate %0,01'lik	0,83 (0,49-0,10)	0,91 (0,52-1,19)	1,39 (0,73-1,89)	0,05
Paradontax %0,01'lik	0,66 (0,64-0,68)	0,91 (0,91-0,91)	1,54 (1,52-1,55)	0,05
Kontrol	0,79 (0,73-0,82)	1,00 (0,87-1,01)	1,40 (1,28-1,66)	0,135

***p<0,05**

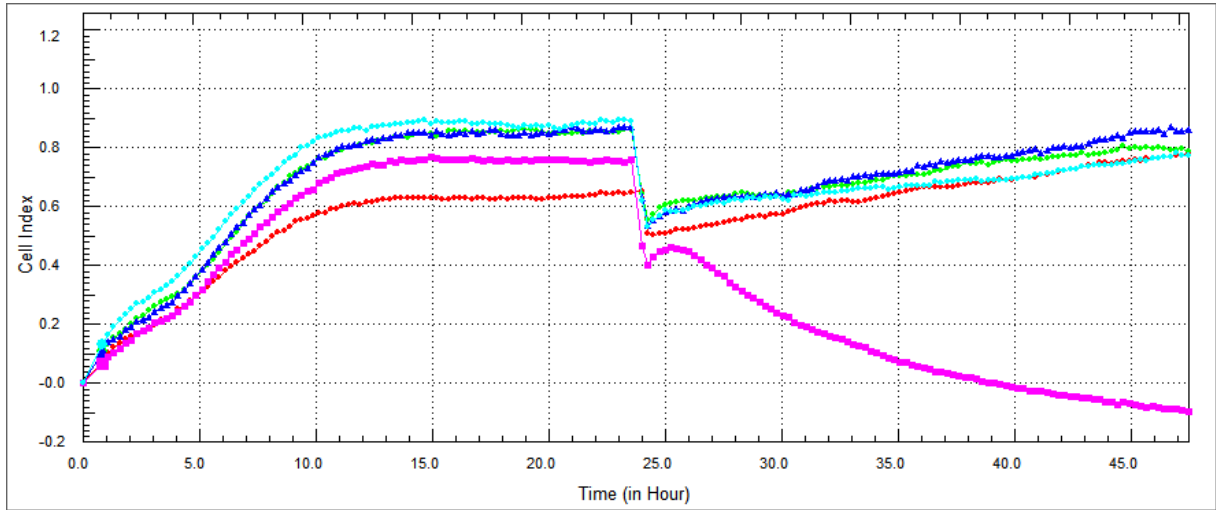
RTCA sonuçlarına göre dört farklı diş macununun tüm konsantrasyonları süre açısından değerlendirildiğinde; % 0,50 haricindeki konsantrasyonlarda, tüm diş macunlarının p değeri 0,05 bulunmuştur (Tablo 3.22).

% 0,1, % 0,05 ve % 0,01'lik konsantrasyonlarda süre ilerledikçe hücre indeksi artarken, % 0,5'lik konsantrasyonda GC Tooth Mousse'un hücre indeksi artmış diğer negatif değerli tüm diş macunlarının indeks değerleri azalmıştır.

3.2.1 24 saat Sonrası RTCA

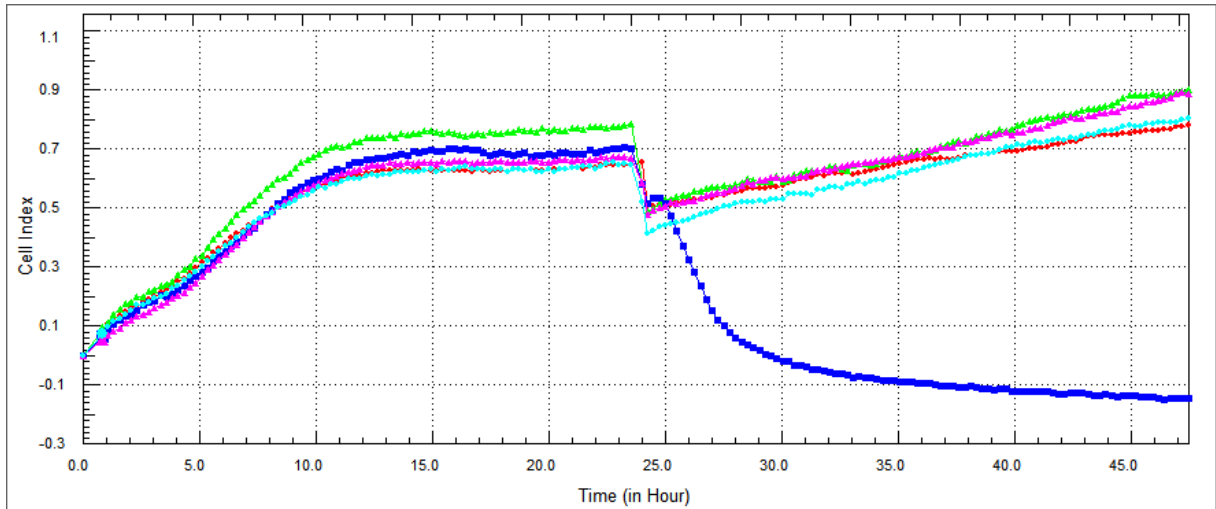
24 saat sonra xCELLigence cihazından elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler aşağıda verilmektedir. Alt detaylar Grafik 3.10 - 3.17 arasında gösterilmektedir.

Grafik 3.10 Colgate, 24 saat RTCA grafiği



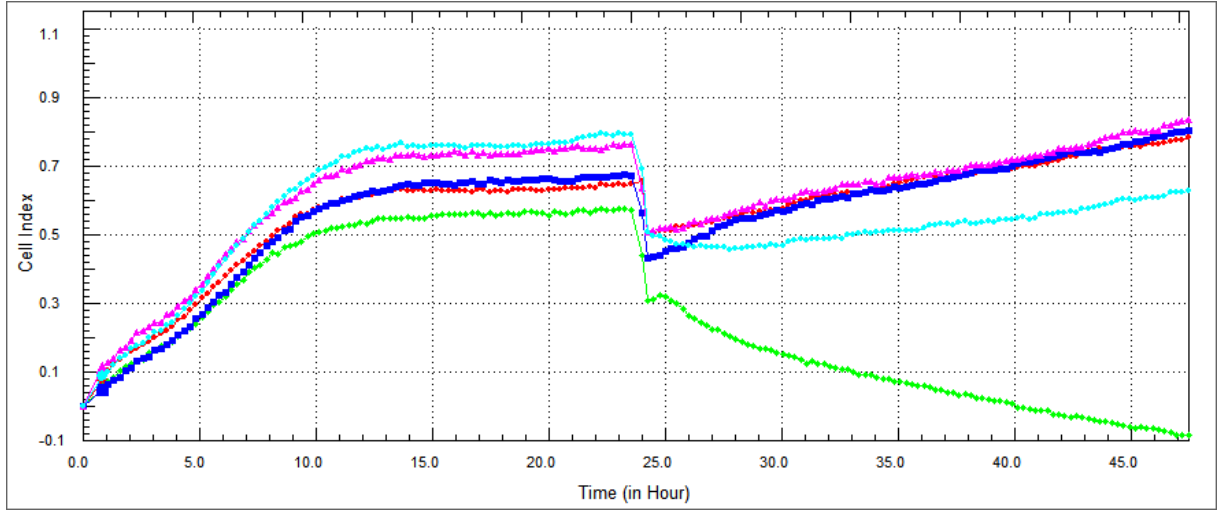
Kırmızı : Kontrol Pembe : C %0,5 Yeşil : C %0,1 Mavi : C %0,05 Turkuaz : C %0,01

Grafik 3.11 Signal, 24 saat RTCA grafiği



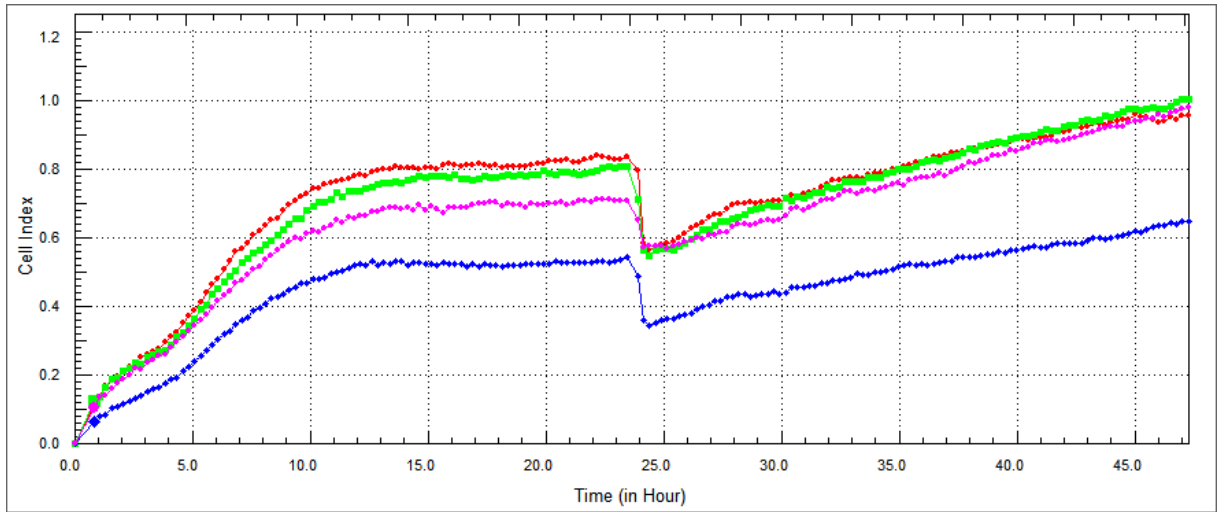
Kırmızı : Kontrol Mavi : S %0,5 Yeşil : S %0,1 Turkuaz : S %0,05 Pembe : S %0,01

Grafik 3.12 Paradontax, 24 saat RTCA grafiği



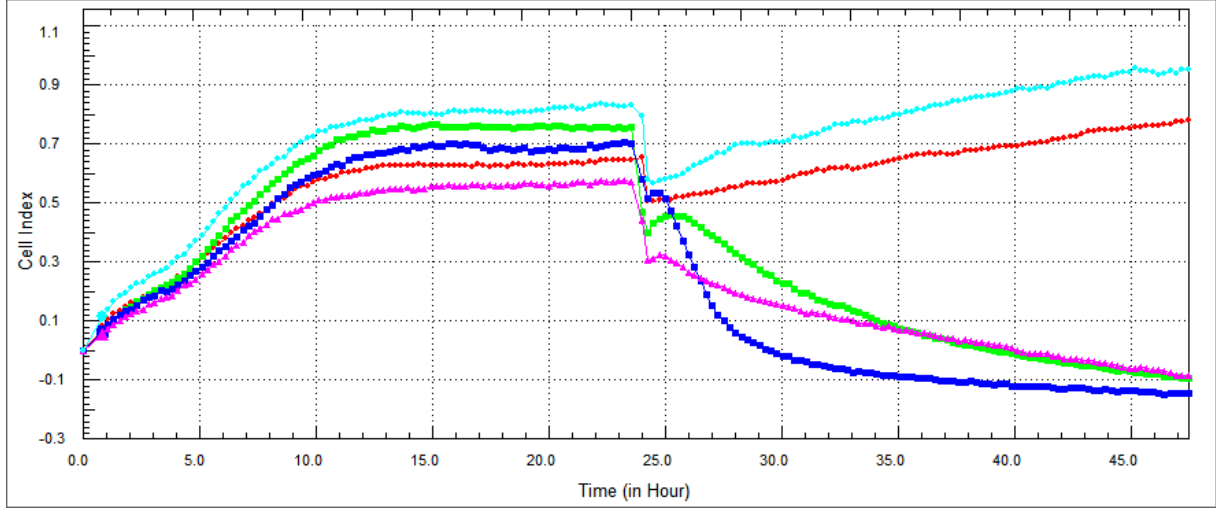
Kırmızı : Kontrol Yeşil : P %0,5 Turkuaz : P %0,1 Pembe : P %0,05 Mavi : P %0,01

Grafik 3.13 GC Tooth Mousse, 24 saat RTCA grafiği



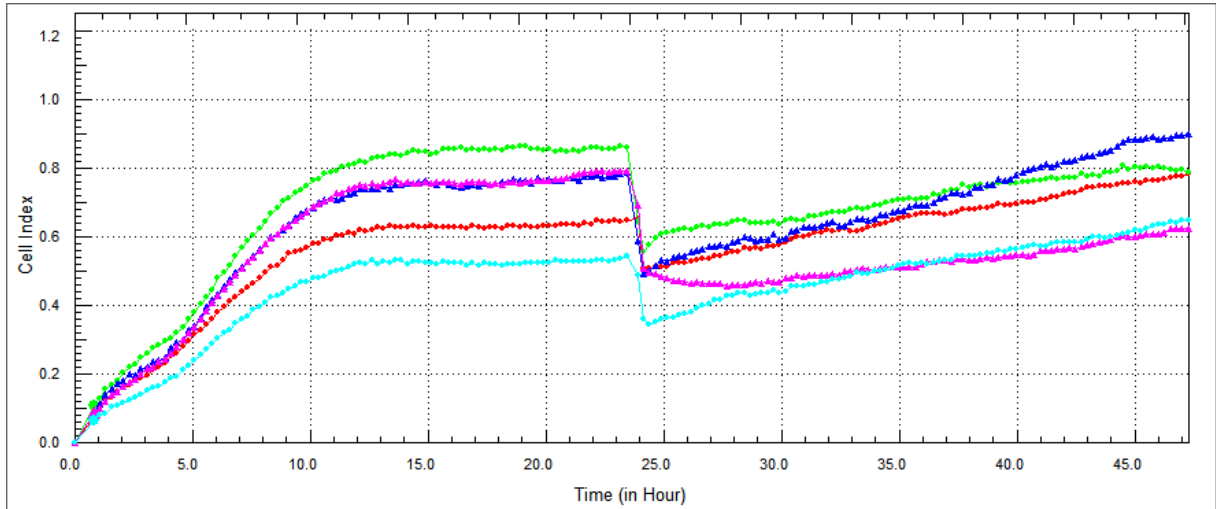
Kırmızı:Kontrol Yeşil:G %0,5 Pembe:G %0,1 Mavi:G %0,05 Turkuaz:G %0,01

Grafik 3.14 24 saat, %0,5'lik konsantrasyonların karşılaştırılması



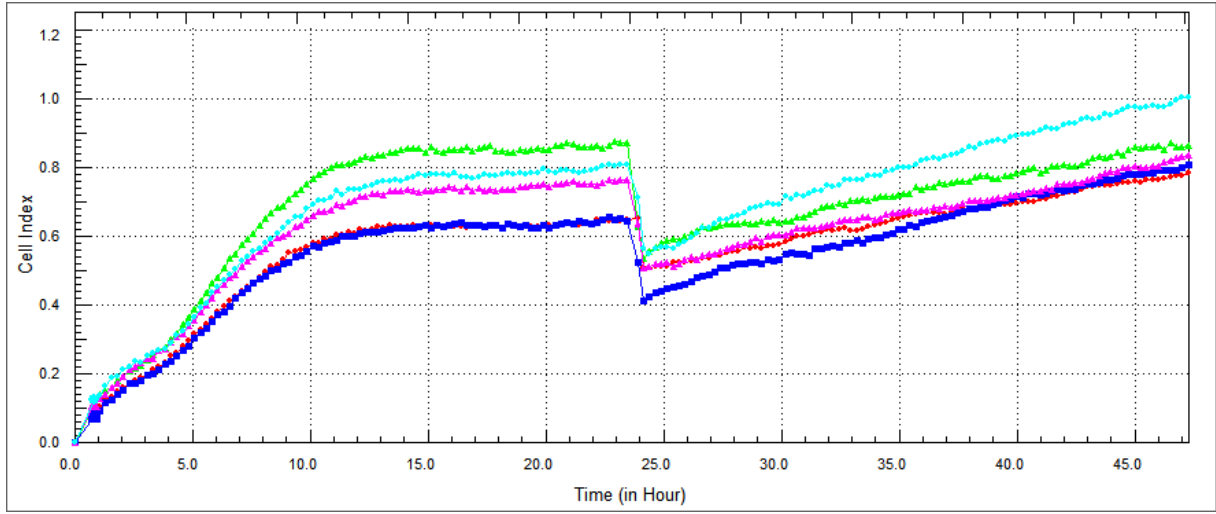
Kırmızı:Kontrol Yeşil:Colgate Pembe:Paradontax Mavi:Signal Turkuaz:GC Tooth Mousse

Grafik 3.15 24 saat, %0,1'lik konsantrasyonların karşılaştırılması



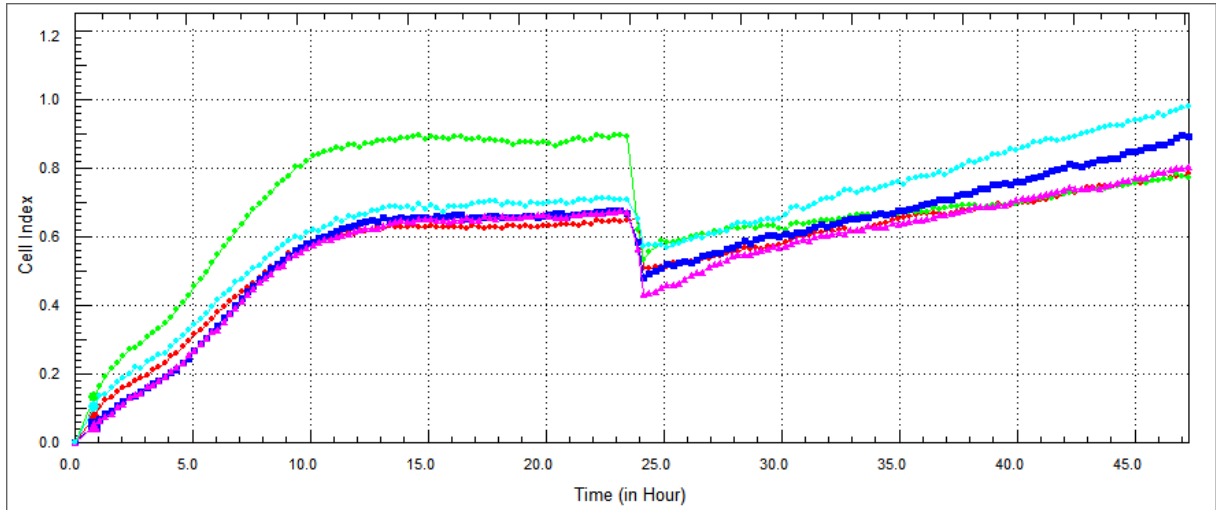
Kırmızı:Kontrol Yeşil:Colgate Pembe:Paradontax Mavi:Signal Turkuaz:GC Tooth Mousse

Grafik 3.16 24 saat, %0,05'lik konsantrasyonların karşılaştırılması



Kırmızı:Kontrol Yeşil:Colgate Pembe:Paradontax Mavi:Signal Turkuaz:GC Tooth Mousse

Grafik 3.17 24 saat, %0,01'lik konsantrasyonların karşılaştırılması



Kırmızı:Kontrol Yeşil:Colgate Pembe:Paradontax Mavi:Signal Turkuaz:GC Tooth Mousse

Grafik 3.10 ile 3.17 arası incelendiğinde, Colgate Total, Signal Beyaz Güç ve Paradontax'ın %0,5'lik konsantrasyonlarının önemli derecede sitotoksik olduğu, neredeyse hiç canlı hücrenin kalmadığı buna karşılık GC Tooth Mousse'ın %0,5'lik konsantrasyonunun diğer konsantrasyonlarından çok fazla farkının olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Colgate Total'ın %0,5'lik konsantrasyonunun sitotoksitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlense de, diğer konsantrasyonlarının tamamı kontrol hücre grubuna yakın seyretmektedir (Grafik 3.10).

Signal Beyaz Güç için de Colgate Total'de gözlenen sonuçla karşılaşılmakta olup %0,5 haricindeki konsantrasyonlarının hücre indeksi grafikte toplu bir şekil çizmektedirler (Grafik 3.11).

Paradontax diş macununda ise %0,10, %0,05 ve %0,01'lik konsantrasyonlarındaki hücre indeksi kontrol grubuyla benzerken, %0,5'lik konsantrasyonun hücre indeksini konsantrasyonla doğru orantılı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Grafik 3.12).

GC Tooth Mousse incelendiğinde, sonuçların diğer macunlardan farklı olduğu tespit edilmektedir. İncelenen tüm konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı gözlemlenmektedir. Neredeyse tüm değerler kontrol hücre grubuna yakın çıkmıştır (Grafik 3.13).

24 saat sonrası, %0,5'lik konsantrasyonların karşılaştırılması yapıldığında GC Tooth Mousse pozitif yönde seyrederken, diğer tüm diş macunları negatif seyirli bir grafik çizmektedir. Başlangıçta 3 macunun değerleri birbirinden farklı gözlemlense de 24 saatin sonunda neredeyse aynı noktada buluşmaktadırlar. İlk 5 saati dikkate aldığımızda Signal Beyaz Güç'teki sitotoksik etkinin diğerlerinden fazla olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (Grafik 3.14).

24 saat sonrası diş macunlarının %0,1'lik konsantrasyonları karşılaştırıldığında; Paradontax ve GC Tooth Mousse kontrol hücre grubuna göre alt bölgesinde, Colgate Total ve Signal Beyaz Güç ise üst kısmında yer almaktadırlar. İlk 3 saat içinde gözlemlenen değerler birbirinden daha farklı olmakla birlikte genel itibariyle diş macunlarının değerleri kontrol grubuyla örtüşmektedir (Grafik 3.15).

%0,05'lik konsantrasyonlar açısından diş macunları kıyaslandığında; GC Tooth Mousse ve bir miktar da Colgate Total kontrol grubuna göre daha pozitif seyretse de, tüm

macunlar arasındaki fark ilk 5 saat içinde daha net görülebilmektedir. Genel itibaiyle kontrol grubunun etrafında seyreden bir grafik görüntüsü elde edilmektedir (Grafik 3.16).

%0,01'lik konsantrasyonlar incelendiğinde; GC Tooth Mousse ve Signal Beyaz Güç grafikte daha yukarıda yer alırken, diğerleri kontrol grubunun etrafında kümelenmişlerdir. Macunlar arasındaki fark yine macunların hücelere verilışinden sonraki ilk 5 saat içinde daha net görülebilmektedir (Grafik 3.17).

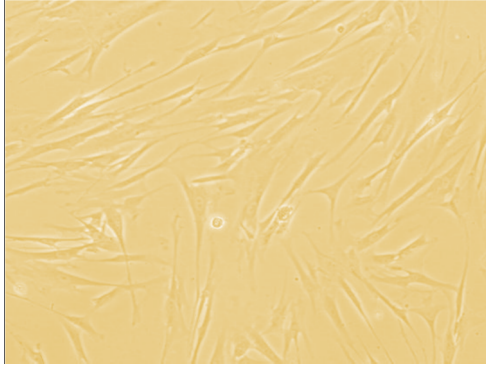
GC Tooth Mousse haricindeki diğer diş macunlarının %0,5'lik konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saatlerde kontrol hücre grubuna göre negatif yönde seyrederken, diğer konsantrasyonları paralel seyretmiştir. GC Tooth Mousse'da ise %0,5'lik konsantrasyon da tüm saatlerde kontrol grubuna yakın seyretmiştir.

3.3 Mikronükleus Sonuçları

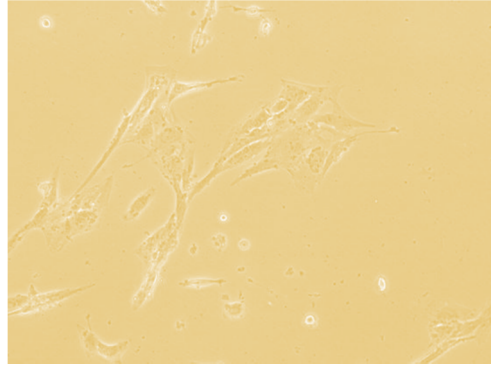
Sitokalsin B eklendikten 24 saat sonra kontrol grubuna ait hücrelerin aldığı şekil Fotoğraf 3.2’de gösterilmektedir.

Sitokalsin B eklenmiş diş macunlarının IC 50/2 konsantrasyonlarına ait karşılaştırmalı mikroskop görüntüleri Fotoğraf 3.3’te gösterilmektedir.

Fotoğraf 3.2 Kontrol hücrelerinin sitokalsin B eklenmesiyle gerçekleşen değişimi (10x mikroskop görüntüsü)



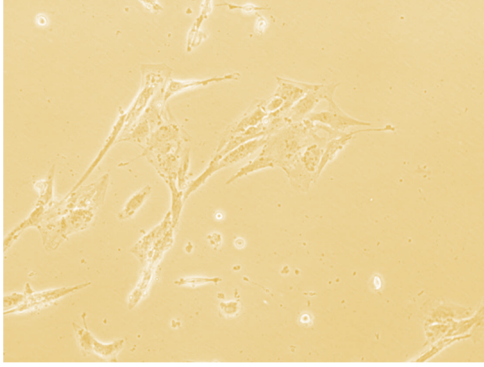
Kontrol



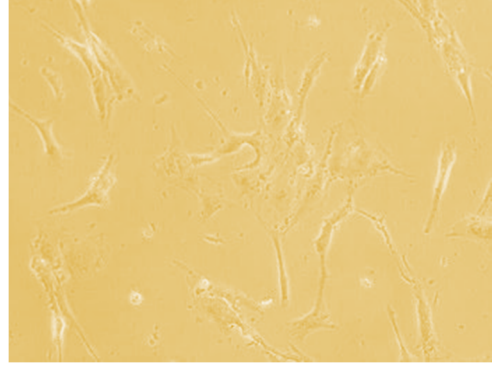
Sitokalsin B İlave Edilmiş Kontrol

Fotoğraf 3.2’de yer alan mikroskop görüntülerinden, sitokalsin B eklendikten 24 saat sonra hücre sayısının azaldığı görülebilmektedir. Sitokalsin B hücreler üzerinde toksik etki oluşturmuş ve böylelikle lam üzerinde kontrol grubuna göre daha az sayıda hücrenin varlığı tespit edilmiştir.

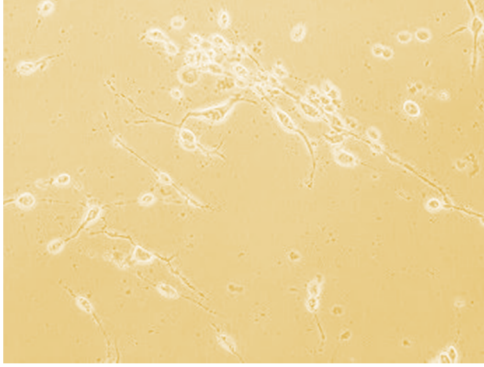
Fotoğraf 3.3 IC 50/2 konsantrasyonunda diş macununa maruz kalmış sitokalsin B eklenmiş hücreler arasındaki fark (10x mikroskop görüntüsü)



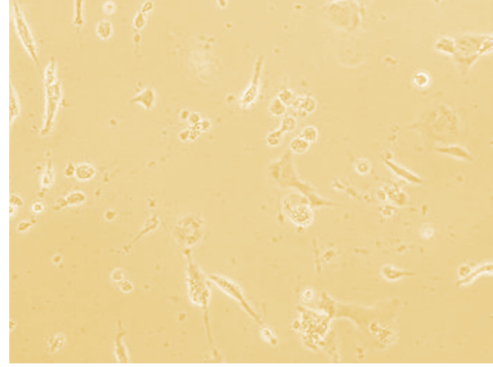
Kontrol



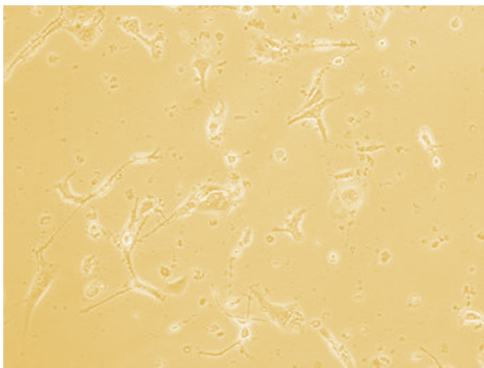
GC



Colgate



Signal

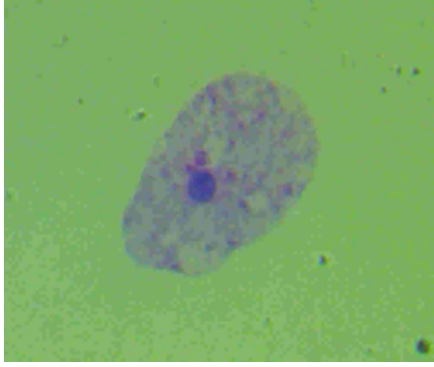


Paradontax

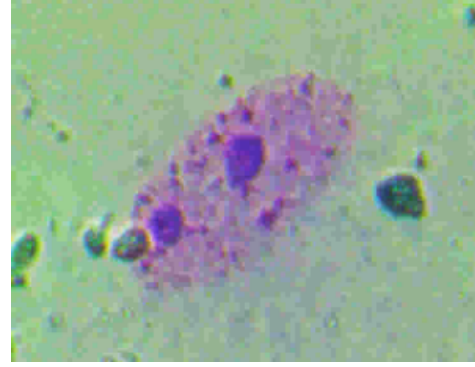
Mikroskobik incelemede farklı diş macunlarının hücre kültürleri üzerinde yaptığı etkilerin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda diş macunu uygulamanın hücreler üzerindeki toksik etkisi Fotoğraf 3.3'ten anlaşılabilmektedir. Hücrelere uygulanan diş macunu konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa canlı kalan hücre sayısı da o kadar azalmaktadır.

Tek çekirdekli fibroblast hücresi ve sitokalsin B eklenmesi sonucu oluşan çift çekirdekli hücrelerin mikroskop görüntüleri Fotoğraf 3.4'te gösterilmektedir. Mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre örnekleri Fotoğraf 3.5'te yer almaktadır.

Fotoğraf 3.4 Tek çekirdekli ve çift çekirdekli hücre görüntüsü (40x mikroskop görüntüsü)

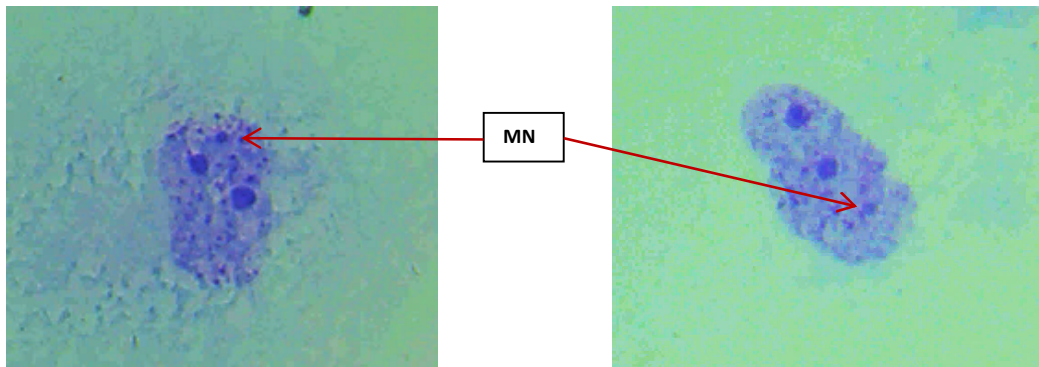


Tek Çekirdekli Hücre



Çift Çekirdekli Hücre

Fotoğraf 3.5 Mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre örnekleri (40x mikroskop görüntüsü)



Mikroskopta 40x büyütme ile yapılan sayım sonucunda preparatlardaki mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre sayısı Tablo 3.23'te yer almaktadır. Sitokalsin B ekledikten 24 saat sonra ve 48 saat sonra, her bir örnek için toplam bin çift çekirdekli hücre sayılmıştır. GC Tooth Mousse dışındaki diş macunlarının IC 50 konsantrasyonlarında preparat üzerinde yeteri kadar çift çekirdekli hücre bulunmadığından, bu örneklerde bin adet çift çekirdekli hücre sayılamamış ve değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Tablo 3.23 Deney gruplarından mikronükleus içeren çift çekirdekli hücre sayısı (/1000)

NUMUNELER	24 SAAT SONRA	48 SAAT SONRA
KONTROL	4	7
GC TOOTH MOUSSE IC 50	25	26
GC TOOTH MOUSSE IC 50/2	21	19
COLGATE IC 50	Hücre Sayısı Yetersiz	Hücre Sayısı Yetersiz
COLGATE IC 50/2	27	21
SİGNAL IC 50	Hücre Sayısı Yetersiz	Hücre Sayısı Yetersiz
SİGNAL IC 50/2	47	66
PARADONTAX IC 50	Hücre Sayısı Yetersiz	Hücre Sayısı Yetersiz
PARADONTAX IC 50/2	26	23

Tablo 3.24 24 Saat sonra diş macunları arasındaki kıyaslama

	GC 50	GC 50/2	COLGATE 50/2	SİGNAL 50/2	PARADONTAX 50/2
KONTROL	0,000*	0,001*	0,000*	0,000*	0,000*
GC 50		0,551			
GC 50/2	0,551		0,381	0,001*	0,460
COLGATE 50/2		0,381		0,018*	0,889
SİGNAL 50/2		0,001*	0,018*		0,012*
PARADONTAX 50/2		0,460	0,889	0,012*	

*p<0,05

Tablo 3.25 48 Saat sonra diş macunları arasındaki kıyaslama

	GC 50	GC 50/2	COLGATE 50/2	SİGNAL 50/2	PARADONTAX 50/2
KONTROL	0,001*	0,018*	0,008*	0,000*	0,003*
GC 50		0,291			
GC 50/2	0,291		0,749	0,000*	0,533
COLGATE 50/2		0,749		0,000*	0,760
SİGNAL 50/2		0,000*	0,000*		0,000*
PARADONTAX 50/2		0,533	0,760	0,000*	

***p<0,05**

Tablo 3.24 ve Tablo 3.25 incelendiğinde; kontrol hücre grubu ile diş macunu uygulanan tüm numuneler arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Diş macunu uygulanan preparatlarda mikronükleus sayısı anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. IC 50 konsantrasyonunda çalışmanın yapılabildiği tek diş macunu olan GC Tooth Mousse'un IC 50/2 konsantrasyonu ile yapılan karşılaştırmasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Signal'in diğer diş macunları ile yapılan kıyaslamasında anlamlı bir fark görülürken ($p<0,05$), Signal'in diğer diş macunlarına göre daha mutajenik olduğu sonucuna varılabilir. Sitokalsin B'nin eklenme süresinin farklı olması, ulaşılan çalışma sonucu açısından bir fark yaratmamıştır.

Bu çalışmada dört farklı diş macunu uygulamasının insan fibroblast hücrelerinde mikronükleus insidansında artışa yol açtığı, dolayısı ile uygulamanın mutajenik olduğu söylenebilir.

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan farklı diş macunlarının değişik konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksisite farklılıkları tespit edildi.

Diş macunlarının konsantrasyonları azaldıkça genel olarak canlı hücre sayılarının arttığı tespit edildi. Yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisite farkı daha net anlaşılabilirken, düşük konsantrasyonlarda farklar çok daha az değerlere inmiştir.

Bu çalışmada kullanılan diş macunlarından Paradontax içerdiği ekinezya, papatya, adaçayı ve nane gibi maddelerle bitkisel özelliği ile ön plana çıkmaktadır. Diş macunlarına yönelik daha geleneksel ürünler içeren Colgate Total ve Signal Beyaz Güç'te florid ve sodyum lauril sülfat bulunmaktadır. Ayrıca Colgate Total'in içeriğinde diş macununa tam koruma özelliğini veren triklozan maddesi de yer almaktadır. GC Tooth Mousse'un içeriğinde süt kazeini bulunmakta olup, özellikleri ile florid, triklozan veya sodyum lauril fosfat içeren diğer diş macunlarından tamamen ayrılmaktadır.

Diş macunlarının içerdiği SLS'ye yönelik yapılan araştırmalarda; deterjanların artan konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığının azaldığı iddia edilmiştir (Moore ve ark. 2008). Mevcut çalışmada da; SLS içeren Colgate Total ve Signal Beyaz Güç kullanılmış ve her ikisinin artan dozlarıyla beraber sitotoksisitenin arttığı gözlemlendi. Signal ve Colgate'in % 0,5'lik konsantrasyonlarının gerek kontrol grubundan gerekse diğer konsantrasyonlardan çok farklı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada SLS içeren macunların gösterdikleri toksisitenin bir sebebi olarak SLS gösterilebilir.

SLS'nin bir özelliği de dokulara derin penetrasyon özelliğine sahip olmasıdır. Düşük dozlarda SLS epitel hücre proliferasyonunu artırırken, yüksek dozları epiteliyal atrofi ve hücre ölümüne yol açtığı iddia edilmiştir. Diş macunlarında SLS'nin ticari olarak izin verilen dozu %1-3'tür. Bununla birlikte oral mukozada organopatik değişime yol açacak konsantrasyon aralığının ise %0.015-1.5 olduğu öne sürülmüştür (Quirynen ve ark. 2001).

In vitro koşullarda farklı deterjan türü içeren diş macunları, farklı hücre toksisitesi ile ilişkilendirilmektedir. SLS ve AF (amin florid) içeren diş macunlarının düşük konsantrasyonlarda bile hücre canlılığını kuvvetle inhibe ettiği gözlemlenmiştir. CAPB

(cocamidopropyl betaine) ve Stearet-20 içeren macunlar ise daha yüksek LC50 değerleri gösterdiği savunulmuştur (Cvikl ve ark. 2015).

Neppelberg ve ark. (2007) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; epitel hücre kültürleri düşük ve yüksek konsantrasyonlarda SLS'e maruz bırakılmış olup, düşük konsantrasyonlarda (%0,015) mukozal bir cevap oluşurken, yüksek konsantrasyonlarda ($\geq$ %0,15) yıkım daha fazla gerçekleşmiş olup epitel kalınlığı ve hücre çoğalması yavaş yavaş azalmış ve hücre ölümleri gerçekleşmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları da bu bulguyu destekler niteliktedir.

Mevcut çalışmadaki diş macunlarının ikili karşılaştırmalarında genel olarak düşük konsantrasyonlar ile kontrol grubu arasında sitotoksosite açısından anlamlı farklar bulunmazken, dozlar arttıkça kontrol grubundan sapmalar gözlemlenmektedir. GC Tooth Mousse bu çalışmada yer alan diğer macunlardan farklı olarak, araştırması yapılan tüm konsantrasyonlarda, hücre canlılığı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı gözlemlenmektedir. GC Tooth Mousse'un yüksek konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, diğer diş macunlarında özellikle de süre ilerledikçe fark daha anlamlı hale gelmektedir.

Paradontax; % 1, % 0,5, % 0,1 ve % 0,01'lik konsantrasyonlarda genel itibariyle en düşük hücre canlılığına sahiptir (%0,10'un 72.saati ve %0,01'lik konsantrasyonun 48. saati hariç). Macunların %0,05'lik konsantrasyonda en düşük hücre canlılığına sahip olanı Signal'dir. Test ürünlerinde %0,1'lik konsantrasyonun 24 ve 48 saatleri haricinde en yüksek hücre canlılığı ise GC Tooth Mousse'da gözlemlendi. GC Tooth Mousse'un 24 saatten sonraki süreç boyunca hücre canlılığı düzenli şekilde artarken, diğer diş macunlarındaki değişim farklı gerçekleşti. Colgate Total, Signal Beyaz Güç ve Paradontax uygulanmış hücrelerin canlılığında genel olarak % 0,1, % 0,05 ve % 0,01 gibi düşük konsantrasyonlarında süre ile birlikte hücre canlılığında artış gözlemlenirken, % 1 ve % 0,5 gibi yüksek konsantrasyonlarda zaman içinde canlı hücre sayısının azalarak kalmadığı görüldü.

24. saatin sonunda genel olarak düşük konsantrasyonlarda (%0,01'lik konsantrasyon hariç), diş macunları arasındaki farklılıklar azalmaktadır. Bununla birlikte %0,10'luk konsantrasyonda diş macunları arasında herhangi bir anlamlı fark bulunamadı.

48. saatin sonunda; diş macunlarının karşılaştırmasında, yüksek konsantrasyonlarda daha fazla anlamlı farklılıklar ortaya çıkarken, konsantrasyonlar azaldıkça farklılıklar da azaldı.

72. saatin sonunda; %0,01'lik konsantrasyon hariç diş macunlarına ait diğer tüm konsantrasyonların karşılaştırmasında daha çok anlamlı fark bulunurken, %0,01'lik konsantrasyon için sadece GC Tooth Mousse ile Paradontax arasında anlamlı fark bulundu. GC Tooth Mousse uygulanan hücre kültüründe Paradontax'a göre çok daha fazla canlı hücre tespit edildi.

Buradan yola çıkılarak şu yargıya varılabilir; %1 ve %0,50 gibi yüksek konsantrasyonlarda çok kısa sürede diş macunları arasındaki fark ortaya çıkarken, düşük konsantrasyonlarda süre ile farklar anlamlılık kazanmaktadır. 48 ve 72 saatin sonunda ise tüm diş macunları arasındaki fark belirginleşti.

Tüm diş macunları genel olarak süre açısından değerlendirildiğinde; daha fazla 24-72 saat arasındaki değişimler anlamlı çıkmaktadır. 48-72 saat arasındaki değişimlere daha az rastlanırken, 24-48 saat arasında çok daha az anlamlı fark tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada; yavru hamster böbrek hücresi (BHK-21), insan epitelyal karsinom hücresi (KB) ve Afrika yeşil maymun böbrek hücresi (Vero), hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücreler 3 gün boyunca triklozanın farklı konsantrasyonlarına maruz kalmışlar, konsantrasyon arttıkça bu üç hücre tipinde de canlılığın azaldığı iddia edilmiştir. (Kalyanee ve ark. 2008).

Li-Wu ve ark. (2012) tarafından insanlardaki mezenkimal kök hücrenin farklılaşması üzerine triklozanın etkilerini incelemek için sitotoksikite, morfolojik değişiklikler, lipid birikimi ve 21 günlük adipogeneziste adiposit farklılaşma biyomarkırları ölçülmüştür. İki gün boyunca indüklenmemiş mezenşimal hücreler 0.625'den 40 μ M'a kadar farklı konsantrasyonlarda triklozan ile muamele edilmiş, işlemin sonunda öncelikle hücrelerin ışık mikroskopu ile morfolojik değişiklikleri analiz edilmiştir. Düşük konsantrasyonda triklozana (≤ 2.5 μ M) maruz kalmış hücrelerin morfolojik olarak kontrol grubuyla aynı olduğu iddia edilmiştir. Yuvarlak hücre çekirdekli, uzun, ince, fiber şeklindedir. Yüksek konsantrasyonda triklozana (5.0-20 μ M) maruz kalındığında hücreler kontrol grubundakilere nazaran daha geniş görünmekte ve yuvarlak hücre çekirdeğini fark etmek zorlaşmaktadır. 40 μ M triklozan uygulanan grupta hücreler kültür yüzeyinden ayrılmış, yuvarlanmış gibi veya medyumda

yüzer gibi görünmektedir. MTT testi sayesinde 5 µM konsantrasyonun üzerindeki triklozanın, canlı hücre sayısını azaltarak sitotoksik etki yarattığı, fakat ≤ 2.5 µM'ın altındaki konsantrasyonlarda böyle bir etkinin olmadığı savunulmuştur.

Triklozan, bizim çalışmamızda yer alan diş macunlarından sadece Colgate Total'de bulunmakta olup, konsantrasyonu %0,3 düzeyindedir. Molekül ağırlığı 289,55 olan triklozanın hazırladığımız solüsyonlardaki konsantrasyonu; %1 için 115 µM, %0,01 için ise 1.15'µM dır. Diğer çalışmaların aksine çalışmamızda daha geniş konsantrasyon aralığı kullanılmış olup, solüsyonlar MTT ve RTCA testlerinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında triklozanın %0,1'lik konsantrasyonlara kadar hücre indeksi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı dolayısıyla %0,1'lik konsantrasyonlara kadar sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte Colgate Total'e maruz kalmış hücrelerde diş macunu konsantrasyonu arttıkça toksisitenin artışında triklozanın etkisinin bulunduğunu söylemek çok da yanlış değildir.

Jingjun ve ark.'nın (2011) 0,1%w/w o-cymen-5-ol ve 0,6%w/w zinc chloride (ZnCl₂) içeren diş macunları ile yaptıkları bir çalışmada; 0,05, 0,025 ve 0,1% w/ v.'lik karışımlar epigingival dokulara farklı sayılarda uygulanmış ve sonuçlar MTT testi ile değerlendirilmiştir. Her iki madde için de konsantrasyonları ve tekrarlayan topikal uygulama çokluğu ile doku tutulumu arasında pozitif bir korelasyonun olduğu iddia edilmiştir. Bizim çalışmamızda tekrarlayan topikal uygulamalar yerine başlangıçta diş macunlarının farklı konsantrasyonları hücre kültürlerine uygulanmış ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre indeksleri incelenmiştir.

Günde yaklaşık olarak 1 litre tükürük salgılanmaktadır. Yemek yeme ve çiğneme gibi aktiviteler esnasında tükürük uyarılırken, uyku sırasında tükürük salgısı sıfıra yakındır. Bunun dışındaki zamanlarda tükürük akış hızında büyük bir değişiklik görülmemektedir (Larnas, 1985). Tükürük akış hızı uyarımlı ve uyarımsız olarak hesaplanmaktadır. Uyarımlı tükürük akış hızı 1 ml/dk'nın üzerindedir (Koray ve ark. 2002). Diş fırçalama esnasında yaklaşık olarak diş fırçası üzerine 1 g. diş macunu yerleştirilmekte ve iki dakika boyunca diş macunu ile fırçalanması önerilmektedir. Diş fırçalama esnasında beklenen uyarılmış tükürük akış hızı 1 ml/dk olup, ağız içinde, iki dakika süre boyunca 2 ml'nin üzerinde tükürük salgılanacak ve yaklaşık olarak %30'un üzerinde bir diş macunu çözeltisi ağız ortamındaki dokulara temas edecektir. Sağlıklı bir ağız bakımı için günde 3 defa diş fırçalayan bireylerde her ne kadar koruyucu ağız mukozası yer alsa da tüm hayat boyunca yüksek miktarda diş macununa maruz kalılabilmektedir. Bu açıdan tekrarlayan uygulamaların çokluğu neticesinde ağız içi

dokuların hücrelerinde sitotoksik etki beklenebilmelidir. Bununla birlikte kesin sonuçlara ancak tekrarlayan uygulamaları kapsayan daha kapsamlı hücresel çalışmalar yapılarak ulaşılabilir.

Floridin sitotoksik etkilerinin tüm hücre tiplerinde ortaya çıktığı, ancak, zaman ve konsantrasyona göre tepkilerin her hücre tipinde farklı olduğu savunulmuştur. Nekrozun, nispeten yüksek florür konsantrasyonlarının mevcudiyetinde birincil hücre ölümü mekanizması olduğu iddia edilmiştir (Barbiera ve ark. 2010). Ghosh ve arkadaşları (2008), 1 saat boyunca İsviçre soylu farelerin hepatositlerin primer kültürüne 100 mM NaF maruz bırakmışlar, artmış oksidatif stres sonucu nekroz oluşmuştur. Bu veriler Matsui ve ark.'nın (2007) sonuçları ile uyumludur. Fare timositlerinin primer hücre kültürüne on kat daha düşük konsantrasyonda NaF (10 mM) kullanmışlardır. İlaveten bu çalışmada, hücre içi kalsiyumda bir artış da gözlemlenmiştir.

Florid preparatlarının insan gingival keratinositlerine doza bağlı bir artış içinde sitotoksik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Tsutsui ve ark. 1997). Sodyum florürün, *in vitro* olarak, Suriye hamster embriyo hücrelerinin morfolojik dönüşümünü sadece sitotoksik konsantrasyonlarda indüklediği bildirilmiştir (Tsutsui ve ark. 1984c, Jones ve ark. 1988a, Jones ve ark. 1988b, Lasne ve ark. 1988).

10-150 ppm NaF'ün insan EUE hücrelerinde herhangi bir mutajenik etkiye neden olmadığı belirtilmiştir (Slamenova ve ark. 1992). Sodyum florid ve potasyum floridin (KF) memeli kültürlerinde ve insan hücre hatlarında, gen lokusu mutasyonlarının sıklığını arttırdığı iddia edilmiştir (Cole 1986, Caspary ve ark. 1987, Caspary ve ark. 1988, Crespi ve ark. 1990). Caspary ve ark. (1988) L 5178Y fare lenfoma hücresi kullanılarak mutasyon deneyi yapmışlar, hem sodyum hem de potasyum floridin 300-600 µg ml⁻¹ konsantrasyon aralığında mutajen olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan birçok çalışma florürün 10-500 µg F ml⁻¹ konsantrasyon aralığında genotoksik olduğunu göstermiştir. Oral mukoza hücreleri rutin diş fırçalama esnasında böyle bir konsantrasyona maruz kalabilmektedir (Tsutsui ve ark. 1984a, Tsutsui ve ark. 1984b, Tsutsui ve ark. 1984c, Cole ve ark. 1986, Caspary ve ark. 1987).

Yaşları 18-22 arasında değişen dört erkek ve dört bayan, topikal APF (acidulated phosphated flüoride, asitlendirilmiş fosfat florid) uygulamasından önce ve uyguladıktan 24 saat sonra analiz edilmiş, farklı bireyler arasında geniş varyasyon aralıkları gözlemlense de,

uygulama öncesi ve sonrası mikronükleus (MN) insidansı arasında belirgin bir farklılık oluşmuştur. Bu sonuçlar APF jelinin oral epitel hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve/veya mutajenik etkilerinin olduğunu desteklemektedir (Şengün ve ark. 2003).

Mevcut çalışmada yer alan diş macunlarından Colgate Total ve Signal Beyaz Güç florür içermektedir. 1450 ppm florür içeren Colgate Total'in %1'lik araştırma konsantrasyonunda en fazla 72,5 µg florür bulunurken, sitotoksik etkinin tamamen florürden kaynaklandığını söylemek doğru değildir. Zira florür içermeyen Paradontax'ın %1'lik konsantrasyonu da sitotoksik bulunduğu florürün tek başına sitotoksikite yol açmadığı, özellikle yüksek dozlarda sitotoksikiteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Faria ve ark. (2007) fibroblastlarda ortaya çıkan eş zamanlı iki hücre ölüm tipinin, apoptoz ve nekrozun, yaygınlığının klorheksidinin konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Klorheksidinin, konsantrasyona ve maruziyet zamanına bağlı olarak gingival fibroblastların proliferasyonunu azalttığı savunulmaktadır (Mariotti ve Rumpf 1999, Mariotti ve Cochran 1990).

Yapılan bir çalışmada 15 ticari diş macununun sitotoksikitesi, insan epitel hücre kültürlerinde incelenmiştir. Protein konsantrasyonu, DNA sentezi, hücre morfolojisi ve otoradyografik parametreler değerlendirilmiştir. Kontrol hücre kültürüne göre, bir tane diş macununun hücre büyümesi üzerinde hiç bir etkisi bulunmamış, diğer macunlar da ise diş macunu süspansiyonunun konsantrasyonuna bağlı olarak daha fazla ya da daha az büyüme inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur (Gerckens ve ark. 1991). Bizim çalışmamızda da GC Tooth Mousse ürününün araştırma dozlarında hücre etkisi yönünden anlamlı bir fark bulunamadı. Diğer üç diş macununun ise hücre büyümelerine farklı oranlarda etkisinin olduğu tespit edildi.

Diş macunlarının sitotoksik etkilerine yönelik yapılan çalışmalar daha ziyade içerdiği maddeler üzerinden yapılmış olup, diş macunlarının total olarak ele alındığı çalışma sayısı çok sınırlı sayıdadır. Mevcut çalışmada farklı özellikleri ile ön plana çıkan diş macunları ele alınmıştır. Plate'lerdeki kuyucuk sayıları nedeniyle numunelerin en fazla 3 kontrol ile çalışılması çalışmamızın zayıf tarafı iken, sonuçların farklı iki yöntem olan MTT ve RTCA'da benzer çıkması çalışma sonuçları açısından güven vermektedir.

Farklı diş macunlarının ışık mikroskop bulgularına dayanarak hücre kültürlerinde farklı oranda hücre ölümüne yol amaları içeriklerindeki maddelerin ve bu madde konsantrasyonlarının farklı olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada sitotoksisite ile birlikte dört farklı diş macununun mutajenitesi de çalışılmış olup, yöntem olarak mikronükleus testi tercih edilmiştir. Dört farklı diş macunu uygulamasının insan fibroblast hücrelerinde mikronükleus insidansında artışa yol açtığı ve çalışma yapılan IC 50/2 konsantrasyonlarında mutajenik olduğu sonucuna varılmıştır.

Rat kemik iliği hücrelerinde NaF uygulamasının kromozomal sapmalara neden olduğu bildirilmiştir (Khalil 1995). Florid, kromozom anormalliklerine, kardeş kromatid değişimlerine ve memeli hücre kültürlerinde sitotoksik etkilere neden olduğundan bir mutajenik ajan olarak görünmektedir (Zeiger ve Shelby 1993). Yapılan çalışmalarda düşük florid konsantrasyonları bile insan periferik kan kültüründe primer DNA hasarı ile birlikte kromozomal anomalilerde artışa neden olduğu savunulmaktadır (Tiwari ve Rao 2010). Bu çalışmada florür içeren Colgate Total ve Signal Beyaz G'n önemli derecede mutajenik bulunmasında florürün etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Bir alışmada 50 μ M triklozana maruz kalmanın farelerdeki 3T3-L1 hücrelerindeki preadiposit değişimini önlediği bildirilmiştir (Schmid ve ark. 2005). Başka bir çalışmada ise 3 gün boyunca 0.023 mM triklozan uygulanan KB ve Vero hücrelerinde hiç ya da çok az genotoksik özelliğe rastlanılmıştır. Beş günlük işlemden sonra genotoksisite artmış, hcreseel seviyede, DNA kırılımına yol açan triklozanın etkilerinin, konsantrasyona ve sreye bağlı olduğu bildirilmiştir (Kalyanee ve ark. 2008). Mevcut çalışmada içeriğinde triklozan bulunan Colgate Total'in kontrol grubuna kıyasla mutajenik özellik göstermesinde triklozanın etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Camargo ve ark. (2014) nın yapmış olduğu çalışmada da dört farklı diş macununun (Colgate Total 12 Professional Whitening, Colgate Total 12 Professional Clean, Oral-B Whitening, Oral-B) genotoksik özellikleri incelenmiş olup, beyazlatıcı özelliği olan diş macunlarının belirgin şekilde daha genotoksik oldukları tespit edilmiştir. Mevcut alışmada Signal Beyaz G içerdiği maddeler yönünden beyazlatıcı özelliği diğer diş macunlarına göre daha nde olup, mikronükleus testi sonuçlarına göre daha mutajenik bulundu.

Nair (2001) tarafından diş macunlarında yapılan çalışmalarda kanserojenik herhangi bir etkiye rastlanmamakla birlikte Lazutka ve ark. (2001) nın yapmış olduğu çalışmada; nane

bitkisinden elde ettikleri uçucu yağları insan lenfositlerinde *in vitro* olarak CA ve SCE (sister kromatid değişimi) testleri ile *Drosophila melanogaster*'de (sinek cinsi) ise *in vivo* koşullarda somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi ile denemişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda nane yağının SCE'yi artırdığı ve doza bağlı olmaksızın mutasyonlara sebep olduğu iddia edilmiştir. Mevcut çalışmada Paradontax'ın mutajenik özelliğinin bulunmasında nane içeriğinin etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada farklı özelliklere sahip dört diş macununun (GC Tooth Mousse, Signal Beyaz Güç, Colgate Total ve Paradontax) beş farklı konsantrasyonda sitotoksik etkileri değerlendirildi. 24, 48 ve 72 saatin sonunda ölçümler yapılarak zaman-sitotoksosite ilişkisi de incelendi. Ayrıca mikronükleus testi kullanılarak mutajenite değerlendirmesi yapıldı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir:

- Farklı özelliklere sahip olan diş macunlarının sitotoksik etkileri de farklı çıkmıştır.
- Çalışmada kullanılan diş macunu konsantrasyonları arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır.
- GC Tooth Mousse'un çalışmada yer alan konsantrasyonlarının tamamında sitotoksik açıdan olumsuz sonuca rastlanılmazken, diğer macunların %1 ve %0,5'lik konsantrasyonları sitotoksik çıkmıştır. Paradontax'ın hücre üzerindeki olumsuz etkileri diğer diş macunlarına kıyasla daha fazla olmuştur. Çalışmada yer alan diş macunlarının %0,1, %0,05 ve %0,01'lik konsantrasyonları sitotoksik çıkmamıştır. Buradan diş fırçalama esnasında mümkün mertebe daha az macun kullanımının gerektiği sonucuna varılabilir.
- Deney sonuçlarına göre %1 ve %0,5'lik konsantrasyonların hücre üzerindeki etkilerinin farkları daha fazla iken düşük çalışma konsantrasyonlarının etkileri birbirine benzer olmuştur. Tüm diş macunu ve farklı konsantrasyonlarının etkileri en fazla, uygulamalarını takiben ilk 3-5 saat içinde gözlemlenmektedir. Sonraki süreçte, sitotoksik olmayan konsantrasyonlar kontrol hücre grubuna yakın seyrederken, sitotoksik olan konsantrasyonlarda maruziyet süresi artması ile sitotoksik etkilerin arttığı gözlemlendi.
- 24, 48 ve 72 saatler açısından kıyaslama yapıldığında %1 ve %0,5'lik konsantrasyonların maruziyet süresine paralel olarak sitotoksositeyi arttırdığı, diğer konsantrasyonlarda herhangi bir olumsuz etkilenme olmadığı tespit edildi.

- Farklı dört diş macununun çalışma yapılan IC 50/2 konsantrasyonlarında mutajenik olduğu sonucuna varıldı.
- Signal Beyaz G diğer diş macunlarına kıyasla daha fazla mutajenik bulundu.

Genel olarak bütün bulgular değerlendirildiğinde diş macunlarının konsantrasyonlarının artmasıyla ve sitotoksik konsantrasyonlarda maruziyet zamanının uzamasıyla hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri artmaktadır şeklindeki hipotezimizi destekleyen bulgular tespit edilmiştir.

5 KAYNAKLAR

- ABASSI Y., XI B., ZHANG W., YE P., KIRSTEIN S., GAYLORD M., FEINSTEIN S., WANG X., XU X., (2009) Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects, *Chem. Biol.*, 16 (7), 712–723.
- ANDREA B. DANN AND ALICE HONTELA, (2011) Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action, *J. Appl. Toxicol.*, 31, 285–311.
- ANURADHA C.D., KANNO S., HIRANO S., (2001) Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 367–373.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2003) Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride and Fluorine, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, September 2003.
- BABICH H. AND BABICH I.P., (1997) Sodium lauryl sulphate and triclosan, in vitro cytotoxicity studies with gingival cells, *Toxicol. Lett.*, 91 (3), 189-196.
- BAGLEY D.M., LIN Y.J., (2000) Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices, *Am. J. Dent.*, 13, 148–152.
- BARBIERA O., ARREOLA-MENDOZAB L., MARIA DEL RAZOA L., (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 324-329.
- BHARGAVA H.N. AND LEONARD P.A., (1996) Triclosan: applications and safety, *Am J Infect Control*, 24 (3), 209-218.
- BIRD C., KIRSTEIN S., (2009) Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xcelligence system, *Nat. Methods*, 6 (8).
- BLAKE DM., MANESS PC., HUANG Z., WOLFRUM EJ., JACOBY WA., HUANG J., (1999) Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells, *Sep Purif Methods*, 28, 1-50.
- BRAYNER R., FERRARI-ILIOU R., BRIVOIS N., DJEDIAT S., BENEDETTI MF., FIEVET F., (2006) Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium, *Nano Letters*, 6, 866-870.
- CAMARGO S.E.A., JOLAS R.P., SANTANA-MELO G. F., FERREIRA L. T., EL ACHKAR V.N.R., RODE S. DE M., (2014) Conventional and whitening toothpastes: Cytotoxicity, genotoxicity and effect on the enamel surface, *American Journal of Dentistry*, Vol 27, No 6, December 2014, 307-311.
- CASPARY W.J., LANGENBACH R., PENMAN B.W., CRESPI C., MYHR B. AND MITCHELL, A.D., (1988) The mutagenic activity of selected compounds at the TK locus: rodent vs. human cells, *Mutat. Res.*, 196, 61-81.
- CASPARY W.J., MYHR B., BOWERS L., MCGREGOR D., RIACH C. AND BROWN, A., (1987) Mutagenic activity of fluorides in mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 187, 165-180.

- CHANG Y.C., CHOU M.Y., (2001) Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91 (2), 230-234.
- CHANG YC., HUANG FM., TAI KW., CHOU MY., (2001) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001, 92, 446-450.
- COLE J., MURIEL W.J. AND BRIDGES, B.A., (1986) The mutagenicity of sodium fluoride to L5178Y [wild-type and TK+/- (3.7.2C)] mouse lymphoma cells, *Mutagenesis*, 1, 157-167.
- CORRECHE E.R., CARRASCO M., ESCUDERO M.E., VELAQUEZ L., GUZMAN A.M.S., GIANNINI F., ENRIZ R.D., JAUREGUI E.A, CENAL J.P., GIORDANO O.S., (1998) A study on the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives, *Fitoterapia*, 69, 493.
- CRESPI C.L., SEIXAS G.M., TURNER T. AND PENMAN, B.W., (1990) Sodium fluoride is a less efficient human cell mutagen at low concentrations, *Environ. Mol. Mutagen.*, 15, 71-77.
- CVIKL B., LUSSI A., GRUBER R., (2015), The in vitro impact of toothpaste extracts on cell viability, *Eur J Oral Sci*, 1-7.
- DAS A., MUKHERJEE A., CHAKRABARTI J., (2004) Sanguinarine: an evaluation of in vivo cytogenetic activity, *Mutat Res.*, 563 (1), 81-87.
- DAVIES R., SCULLY C., PRESTON AJ., (2010) Dentifrices--an update, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2010, 15, e976-982.
- DAYAN A.D., (2007) Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk, *Food Chem. Toxicol*, 45, 125-129.
- DEMARCO FF., MEIRELES SS., MASOTTI AS., (2009) Over-the-counter whitening agents: a concise review, *Braz Oral Res*, 23 Suppl 1, 64-70.
- DEMİREL Ş., ZAMANİ A.G., (2002) Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 126
- DESALVA S.J., KONG B.M. LIN, Y.J., (1989) Triclosan: a safety profile, *Am. J. Dent.*, 2, 185-196.
- ESCALADA MG., HARWOOD JL., MAILLARD JY., OCHS DJ., (2005) Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa, *J Antimicrob Chemother*, 55, 879-882.
- EYRE R., FELTBOWER R.G., MUBWANDARIKWA E., EDEN T.O., MCNALLY R.J., (2009) Epidemiology of bone tumours in children and young adults, *Pediatr. Blood Cancer*, 53, 941-952.
- FARÍA G., CELES MR., DE ROSSI A., SILVA LA., SILVA JS., ROSSI MA., (2007) Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured 1929 fibroblasts. *J Endod*, 33, 715-722.
- FENECH M., MORLEY AA., (1986) Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation, *Mutat Res*, 161, 193-198.
- FLORA S.J., MITTAL M., MISHRA D., (2009) Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain, *J. Neurol. Sci.*, 285, 198-205.

- FORWARD GC., (1991) Role of toothpastes in the cleaning of teeth, *Int Dent J*, 41, 164-170.
- FORWARD GC., JAMES AH., BARNETT P., JACKSON RJ., (1997) Gum health product formulations: what is in them and why? *Periodontol* 2000, 15, 32-39.
- FRANCO R., CIDLOWSKI J.A., (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ*, 16, 1303–1314.
- FRANZIOS G., MIROTSOU M., HATZIAPOSTOLOU E., KRAL J., SCOURAS ZG., AND MAVRAGANI PT., (1997) Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), 2690-2694.
- GEOFFREY E. SMITH, (1998) The Science of the Total Environment, 68, 80-81
- GERCKENS B., EISINGER G., KADEN P., KRÜGER W., (1991) Comparative studies of toothpastes and toothpaste ingredients in biological systems: 1. Can various toothpastes be differentiated by relative biological effectiveness in cell culture studies?. *Oralprophylaxe*, 13 (2), 55-60.
- GHABANCHI J.A., MOATTARI A.B., DARAFSHI R.C., ANDISHEH TADBIR A.D., KHORSHIDI H.E., SHAKIB M.F., (2013) Effects of three Commercial Mouth Rinses on the Cultured Fibroblasts: An in Vitro Study, *J Dent Shiraz Univ Med Scien*, 14 (2), 64-67.
- GHOSH J., DAS J., MANNA P., SIL P.C., (2008) Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway, *Toxicol In Vitro*, 22, 1918–1926.
- GIANNELLI M., CHELLINI F., MARGHERI M., TONELLI P., TANI A., (2008) Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation, *Toxicol In Vitro*, 22, 308-317.
- GIERTSEN E., (2004) Effects of mouthrinses with triclosan, zinc ions, copolymer and sodium lauryl sulphate combined with fluoride on acid formation by dental plaque in vivo, *Caries Res*, 38, 430-435.
- GIMBA C.E., ABECHI S.E. AND ELIZABETH O., (2014) Investigations of Sodium Lauryl Sulphate and Saccharin Concentrations in Brands of Toothpaste, *Research Journal of Chemical Sciences*, Vol., 4 (6), 58-61.
- GOLDSTEIN RE., (1987) Bleaching teeth new materials new role, *JADA*, 44E-52E (special issue).
- HARD GC., BOORMAN GA., WOLF DC., (2000) Re-evaluation of the 2-year chloroform drinking water carcinogenicity bioassay in Osborne-Mendel rats supports chronic renal tubule injury as the mode of action underlying renal tumor response, *Toxicol Sci.*, 53, 237-244.
- HARRIS NO., GARCIA-GODOY F., (2004) Primary Preventive Dentistry, 6th ed., Upper Saddle River, NJ: Pearson Education.
- HARTIGAN C.L., DOWNEY W., (2010) Moving forward with label-free technology, *DrugDiscov.*, 11, 41.
- HEALY CM, CRUCHLEY AT, THORNHILL MH, WILLIAMS DM., (2000) The effect of sodium lauryl sulphate, triclosan and zinc on the permeability of normal oral mucosa. *Oral Dis.*, 6, 118–123.

- HE H., GANAPATHY V., ISALES C.M., WHITFORD G.M., (1998) pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1372, 244–254.
- HEDDLE JA., COUNTRYMAN RI., (1976) The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.*, 41, 321–332.
- HERLOFSON B.B. AND BARKVOLL P., (1994) Sodium lauryl sulphate and recurrent aphthous ulcers: A preliminary study, *Acta. Odontol. Scand.*, 257–259.
- HERLOFSON BB, BRODIN P, AARS H., (1996) Increased human gingival blood flow induced by sodium lauryl sulfate. *J Clin Periodontol*, 23, 1004–1007.
- HEYWOOD R., SORTWELL RJ., NOEL PR., STREET AE., PRENTICE DE., ROE FJ., WADSWORTH PF., WORDEN AN., VAN ABBÉ NJ., (1979) Safety evaluation of toothpaste containing chloroform. III. Long-term study in beagle dogs, *J Environ Pathol Toxicol*, 2 (3), 835–851.
- HILGENBERG SP., PINTO SC., FARAGO PV., SANTOS FA., WAMBIER DS., (2011) Physical-chemical characteristics of whitening toothpaste and evaluation of its effects on enamel roughness, *Braz Oral Res*, 25, 288–294.
- HIRAYAMA H., HIATT IN H.H., WATSON J.D. AND WINSTON J.A. (Eds), (1977) Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor.
- HUANG FM., TAI KW., HU CC., CHANG YC., (2001) Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro, *Int. J. Prosthodont*, 14, 439–443.
- INGÓLFSDÓTTIR K., (2002) Usnic acid, *Phytochemistry*, 61, 729.
- JACOBSEN PL., BRUCE G., (2001) Clinical dentin hypersensitivity: understanding the causes and prescribing a treatment, *J Contemp Dent Pract*, 2, 1–12.
- JAMES M.O., LI W., SUMMERLOT D.P., ROWLAND-FAUX L., WOOD, C.E., (2009) Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta, *Environ. Int.*, 36, 942–949.
- JENG J.H., HSIEH C.C., LAN W.H., CHANG M.C., LIN S.K., HAHN L.J., KUO M.Y., (1998) Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its Mechanisms, *Cell Bio Toxicol.*, 14, 383–389.
- JINGJUN YANG, GURINDERPAL DEOL AND NISHA MYANGAR, (2011) Retention of o-cymen-5-ol and zinc on reconstructed human gingival tissue from a toothpaste formulation, *International Dental Journal*, 61 Suppl 3, 41–45.
- JOINER A., PHILPOTTS CJ., ASHCROFT AT., LAUCELLO M., SALVADERI A., (2008a) In vitro cleaning, abrasion and fluoride efficacy of a new silica based whitening toothpaste containing blue covarine, *J Dent*, 36 Suppl 1, 32–37.
- JOINER A., SCHWARZ A., PHILPOTTS CJ., COX TF., HUBER K., HANNIG M., (2008b) The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine, *J Dent*, 36, 360–368.
- JONES N., RAY B., RANJIT KT., MANNA AC., (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 279, 71–76.

- JONES C.A., CALLAHAN M.F. AND HUBERMAN E. (1988a) Sodium fluoride promotes morphological transformation of Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis*, 9, 2279-2284.
- JONES C.A., HUBERMAN E., CALLAHAN M.F., TU A., HALLOWEEN W., PALLOTA S., SIVAK A. LUBET R.A., AVERY M.D., KOURI R.E., SPALDING J. AND TENNANT R.W. (1988b). An inter-laboratory evaluation of the Syrian hamster embryo cell transformation assay using fourteen coded chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 2, 103-116.
- JOSEPH B. AND NAIR V. M., ONCMİRS., (2012) Small Noncoding RNA with Multifaceted Role in Cancer, *Res.J.Recent Sci.*, 1(11), 70-76.
- KALYANEE J., THANATE W., SUNISA M., (2008) Risk Assessment of Triclosan Using Animal Cell Lines, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 42, 353 – 359.
- KARLSSON HL., CRONHOLM P., GUSTAFSSON J., MOLLER L., (2008) Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and karbon nanotubes, *Chem. Res Toxicol*, 1726-1732.
- KARUBE H., NISHITAI G., INAGEDA K., KUROSU H., MATSUOKA M., (2009) NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells, *J. Dent. Res.* 88, 461–465.
- KASUGAI S., HASEGAWA N., OGURA H., (1990) A simple in vito cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A), *Jpn J Pharmacol*, 52, 95-100.
- KHALIL A.M., (1995) Chromosome aberrations in cultured rat bone marrow cells treated with inorganic fluorides, *Mutat Res.*, 343, 67-74.
- KORAY F., GÜVEN Y., KÜLEKÇİ G., ÇİNTAN S., Ağız Biyolojisi ve Bireysel Profilaksi Uygulamalı Eğitim Programı Kitabı., Çürük Riski, Çürük Aktivite Testleri, İstanbul, 2002, 1-15.
- KOUTOJIAN P., (2005) Sugar Substitutes, A publication of the House Committee on Health Care, 3(2), 5.
- LARNAS M., Simple tests for caries susceptibility, *Int Dent J*, 1985; 35, 109-117.
- LASNE C., LU Y.-P. AND CHOUROULINKOV I. (1988) Transforming activities of sodium fluoride in cultured Syrian hamster embryo and BALB/3T3 cells, *Cell Biol. Toxicol.*, 4, 311-324.
- LAZUTKA JR., MIERAUSKIEN J., SLAPSYTE G., AND DEDONYTE V., (2001) Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*, *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 485-492.
- LIMA DA., SILVA AL., AGUIAR FH., LIPORONI PC., MUNIN E., AMBROSANO GM., et al., (2008) In vitro assessment of the effectiveness of whitening dentifrices for the removal of extrinsic tooth stains, *Braz Oral Res*, 22, 106-111.
- LIMAME R., WOUTERS A., PAUWELS B., FRANSEN E., PEETERS M., LARDON F., DE WEVER O., PAUWELS P., (2012) Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays, *PLoS ONE* 7 (10), e46536.

- LIU B., WANG Y., FILLGROVE K.L., ANDERSON V.E., (2002) Triclosan inhibits enoylreductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49, 187–193.
- LI-WU GUO A., QIANGEN WU B., BRIDGETT GREEN A., GREG NOLEN A., LEMING SHI C., JESSICA LOSURDO D., HELEN DENG E., STEVEN BAUER D., JIA-LONG FANG, BAITANG NING, (2012) Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262, 117–123.
- MARIOTTI A., COCHRAN DL., (1990) Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva, *J Periodontol*, 61, 103-111.
- MARIOTTI AJ., RUMPF DA., (1999) Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production, *J Periodontol*, 70, 1443-1448.
- MARSHALL M. W., AND P. P. GRAGG, (1998) “The Effect of Fluoride Salts on Hydrogen Peroxide Decomposition in the Oral Cavity,” AADR Abstracts, Abstract #301, *Journal of Dental Research*, 77, 143.
- MATSUI H., MORIOTO M., HORIMOTO K., NISHIMURA Y., (2007) Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: cytotoxicity of sodium fluoride, *Toxicol. In Vitro*, 21, 1113–1120.
- MCLVOR M.E., (1987) Sudden cardiac death from fluoride intoxication: the role of potassium, *Annals of emergency medicine*, 16, 777–781.
- MCLVOR, M.E., (1990) Acute fluoride toxicity: pathophysiology and management, *Drug safety*, 5, 79–85.
- MOHAMMADI S., MOVAHEDIN M., MOWLA S.J., (2009) Up-regulation of CatSper genes family by selenium, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7, 126.
- MOORE C., ADDY M., MORAN J., (2008) Toothpaste detergents: a potential source of oral soft tissue damage? *Int J Dent Hyg.*, 6 (3), 193-198.
- MORAN J., ADDY M., CORRY D., NEWCOMBE RG., HAYWOOD J., (2001) A study to assess the plaque inhibitory action of a new zinc citrate toothpaste formulation, *J Clin Periodontol*, 28, 157-161.
- MORAN J., NEWCOMBE RG., WRIGHT P., HAYWOOD J., MARLOW I., ADDY M., (2005) A study into the plaque-inhibitory activity of experimental toothpaste formulations containing antimicrobial agents, *J Clin Periodontol*, 32, 841-845.
- MUNRO IC., DELZELL ES., NESTMANN ER., LYNCH BS., (1999) Viadent usage and oral leukoplakia: a spurious association, *Regul Toxicol Pharmacol*, 30 (3), 182-196.
- NAIR B., (2001) Final report on the safety assessment of Mentha piperita (Peppermint) oil, Mentha piperita (Peppermint) leaf extract, Mentha piperita (Peppermint) leaf and Mentha piperita (Peppermint) leaf water, *Int. J. Toxicol.*, 3, 61-73.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), (2006) Fluoride in drinking-water, A scientific review of EPA’s standards, Washington DC.
- NEPPELBERG E., COSTEA DE., VINTERMYR OK., JOHANNESSEN AC., (2007) Dual effects of sodium lauryl sulphate on human oral epithelial structure, *Exp Dermatol*, 16 (7), 574-579.

- O'BRIEN WJ., (2002) Dental Materials and Their Selection, Chicago:3rd ed., Quintessence Pub Co, 21-22.
- ODELL E. W. M. P., (1998) Biopsy Pathologies of The Oral Tissues, 1st ed., London, Chapman&Hall, Chapter 1.
- OGURO A., CERVENKA J., HORII E., (1990) Effect of sodium fluoride on growth of human diploid cells in culture, *Pharmacol Toxicol.*, 67, 411-414.
- OKUYAMA E., UMEYAMA K., YAMAZAKI M., KINOSHITA A. Y., YAMAMOTO Y., (1995) Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*, *Planta Med*, 61, 113.
- PAN T., HUANG B., ZHANG W., GABOS S., HUANG D.Y., DEVENDRAN V., (2013) Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration time-dependent cellular response curves, *Anal. Chim. Acta*, 764, 44-52.
- PARFITT K. AND MARTIN D., (1999) The Complete Drug Reference, 32nd ed, World Color Books Services, Tounton, Massachusetts, 1353.
- PAVLIDOU V., KARPOUHTESIS I., FRANZIOS G., ZAMBETAKI A., SCOURAS Z., AND MAVRAGANI-TSIPIDOU P., (2004). Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and Mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), *J. Agric. Urban Entomol.*, 21(1), 39-49.
- POLYZOIS GL., HENSTEN-PETTERSEN A., KULLMANN A., (1994) An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers, *J. Prosthet. Dent.*, 71, 500-504.
- QUIRYNEN M., DE SOETE M., PAUWELS M., GOOSSENS K., TEUGHELIS W., VAN ELDERE J., et al., (2001) Bacterial survival rate on tooth- and interdental brushes in relation to the use of toothpaste, *J Clin Periodontol*, 28, 1106-1114.
- RAMESH N., VUAYARAGHAVAN A.S., DESAI B.S., NATARAJAN M., MURTHY P.B., PILLAI K.S., (2001) Low levels of p53 mutations in Indian patients with osteosarcoma and the correlation with fluoride levels in bone, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 20, 237-243.
- REDDY KM., FERIS K., BELL J., WINGETT DG., HANLEY C., PUNNOOSE A., (2007) Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems, *Appl Phys Lett*, 90, 902.
- RIBEIRO D.A., MARQUES M.E., DE ASSIS G.F., ANZAI A., POLETI M.L., SALVADORI D.M., (2004) No relationship between subchronic fluoride intake and DNA damage in Wistar rats, *Caries Res.*, 38, 576-579.
- ROBERTSHAW H., LEPPARD B., (2007) Contact dermatitis to triclosan in toothpaste, *Contact Dermatitis*, 57, 383-384.
- RODRICKS J.V., SWENBERG J.A., BORZELLECA J.F., MARONPOT R.R., SHIPP A.M., (2010). Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products, *Crit. Rev. Toxicol.*, 40, 422-484.
- ROSIN M., KRAMER A., BRADTKE D., RICHTER G., KOCHER T., (2002) The effect of a SCN-/H2O2 toothpaste compared to a commercially available triclosan-containing toothpaste on oral hygiene and gingival health - a 6-month home-use study. *J Clin Periodontol*, 29, 1086-1091.

- SALEH S., HADDADIN RNS., BAILLIE S., COLLIER PJ., (2010) Triclosan-an update, *Lett Appl Microbiol*, 52, 87-95.
- SANDBORGH-ENGLUND G., ADOLFSSON-ERICI M., ODHAM G., EKSTRAND J., (2006) Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans, *J. Toxicol. Environ. Health*, 69, 1861–1873.
- SCHEIE AA., (1989) Models of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine, *J Dent Res*, 68, 1609-1616.
- SCHEMEHORN BR., MOORE MH., PUTT MS., (2011) Abrasion, polishing, and stain removal characteristics of various commercial dentifrices in vitro, *J Clin Dent*, 22, 11-18.
- SCHMID B., RIPPMANN J.F., TADAYYON M., HAMILTON B.S., (2005) Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 328, 1073–1082.
- SCHROEDER HE., HIRZEL HC., (1969) A method of studying dental plaque morphology, *Helv Odontol Acta*, 3, 22-27.
- SHIBAMOTO T., WEI C.I., (1984) Mutagenicity of lichen constituents, *Environ Mutagen*, 6, 757.
- SHUKLA R., BANSAL V., CHAUDHARY M., BASU A., BHONDE RR., SASTRY M., (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their Endocytotic Fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir*, 21, 10644-10654.
- SLAMENOVA D., GABELOVA A., RUPPOVA K., (1992) Cytotoxicity and genotoxicity testing of sodium fluoride on Chinese hamster V79 cells and human EUE cells, *Mutat Res.*, 279, 109-115.
- SONG J.S., LEE H.Y, LEE E., HWANG H.J., KIM J.H., (2002) Cytotoxicity and apoptosis induction of sodium fluoride in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells, *Environmental toxicology and pharmacology*, 11, 85-91.
- ŞENGÜN A., ÜLKER M., ACAR H., DURAN İ., ÖZER F., (2003) Micronucleus testi kullanılarak bir florid jelinin insan bukkal mukoza epitel hücrelerine genotoksik ve/veya sitotoksik etkilerinin incelenmesi, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Cilt:6 Sayı:1-2003, 19-22.
- TAKAHASHI K., AKINIWA K., NARITA K., (2001) "Regression analysis of cancer incidence rates and water fluoride in the U.S.A. based on IACR/IARC (WHO) data (1978-1992)", International Agency for Research on Cancer, *J Epidemiol*, 11 (4), 170.
- TAKATSUKA T., EXTERKATE RA., TEN CATE JM., (2008) Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study, *Clin Oral Investig*, 12, 173-177.
- TANG ATH., LI J., EKSTRAND J., LIU Y., (1999) Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device, *J.Biomed. Mater. Res.*, 45, 214-222.
- TIWARI H., RAO M.V., (2010) Curcumin supplementation protects from genotoxic effects of arsenic and fluoride, *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1234–1238.
- TSUTSUI T., IDE K. AND MAIZUMI M. (1984a) *Mutat. Res.*, 140, 43-48.

- TSUTSUI T., SUZUKI N., OHMORI M., MAIZUMI M., (1984b) *Mutat. Res.*, 138, 193-198.
- TSUTSUI T., SUZUKI N., OHMORI M., (1984c) Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells, *Cancer Res.*, 44, 938-941.
- TSUTSUI T., TANAKA Y., MATSUDO Y., UEHAMA A., SOMEYA T., HAMAGUCHI F., YAMAMOTO H., TAKAHASHI M., (1995) No increases in chromosome aberrations in human diploid fibroblasts following exposure to low concentrations of sodium fluoride for long times, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 355, 15-20.
- TSUTSUI T., TANAKARA Y., USHIMURA T., IDE T., MATSUMURA M., BARRETT J.C., (1997) In vitro cytotoxicity of diverse preparations used in dental practice to human gingival keratinocytes, *Toxicology in vitro*, 11, 393-398.
- ÜSTÜNER D., (2011), Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı, 4(1), 67
- VANPARYS P., VERMEÏREN F., SYSMANS M., TEMMERMAN R., (1990) The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity, *Mutat Res.*, 244, 95-103.
- VERES EM., WOLFAARDT JF., BECKER PJ., (1990) An evaluation of the surface characteristics of a facial elastomer. Part I: Review of the literature on the surface characteristics of dental materials with maxillofacial prosthetic application, *J. Prosthet. Dent.*, 63, 193-197.
- VERSTEEG PA., ROSEMA NAM., HOENDERDOS NL., SLOT DE., VAN DER WEIJDEN GA., (2010) The plaque inhibitory effect of a CPC mouthrinse in a 3-day plaque accumulation model- a cross-over study, *Int J Dent Hygiene*, 8, 269-275.
- VEYS RJ, BAERT JH, DE BOEVER JA., (1994) Histological changes in the hamster cheek pouch epithelium induced by topical application of sodium lauryl sulphate. *Int J Exp Pathol*, 75, 203–209.
- WAGNER S., MÜNZER S., BEHRENS P., SCHEPER T., BAHNEMANN D. AND KASPER C., (2008) Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles, Nanosafe: International Conference on Safe production and use of nanomaterials, *Journal of Physics, Conference Series* 170 (2009), 1-8.
- WALTERS PA., (2005) Dentinal hypersensitivity: a review, *J Contemp Dent Pract*, 6, 107-117.
- WHITFORD G.M., ALLMANN D.W., SHAHED A.R., (1987) Topical fluorides: effects on physiologic and biochemical processes, *J. Dent. Res.*, 66 (5), 1072.
- WHITFORD G.M., BAWDEN J.W., BOWEN W.H., BROWN L.J., CIARDI J.E., CLARKSON T.W., IMREY P.B., KLEEREKOPER M., MARTHALER T.M., MCGUIRE S., OPHAUG R.H., ROBINSON C., SCHULTZ J.S., STOOKEY G.K., TOCHMAN M.S., VENKATESWARLU P., ZERO D.T., (1994) Report for Working Group I: strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues, *Adv. Dent. Res.*, 8, 113–115.
- WHO, (1995) World Health Organisation, Toxicological evaluation of some food colors, enzymes, flavours, enhancers, thickening agents and certain other additives, *WHO Food Additives*, 6, 13.
- XING J., ZHU L., JACKSON J., GABOS S., SUN X., WANG X., XU X., (2005) Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors, *Chem. Res. Toxicol.*, 18 (2), 154–161.

- ZEIGER E., SHELBY M.D., WITT K.L., (1993) Genetic toxicity of fluoride, *Environ. Mol. Mutagen.*, 21, 309–318.
- ZHANG LL., JIANG YH., DING YL., POVEY M., YORK D., (2007) Investigation in to the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids), *J. Nanopart Res*, 2007; 9, 479-489.
- ZHOU LAN, TAE HYUNG KIM, KAI SHUN BI, XIAO HUI CHEN, HYUNG SIK KIM, (2013) Triclosan Exhibits a Tendency to Accumulate in the Epididymis and Shows Sperm Toxicity in Male Sprague-Dawley Rats, *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox, 1-9.
- ZHU Y., GUO Y., YE M., (2005) Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography, *J. Chromatogr.*, 1085, 143-146.

6 ÖZGEÇMİŞ

İsmail SERDAROĞLU 01.01.1974 tarihinde Emet/Kütahya’da doğdu. İlk öğrenimini Emet’te, orta öğrenimini Kütahya’da ve lise öğrenimini ise Eskişehir’de tamamladı. 1992 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nden 1997 yılında mezun oldu.

2012 yılı bahar döneminde Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. Evli ve 2 kız çocuğu babasıdır.