

Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi

Cumhur Sipahi (*), Jülide Özen (*), Ali Uğur Ural (**), Mehmet Dalkız (*), Bedri Beydemir (*)

Özet

Bu çalışmanın amacı, beş farklı protez kaide materyalinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini saptamak ve gingival fibroblastlar üzerindeki toksik etkilerini karşılaştırmaktır. Işınla sertleşen, ısıyla sertleşen, kimyasal olarak sertleşen, mikrodalga ile sertleşen ve enjeksiyonla sertleşen akrillere oluşturulan test örnekleri, gingival fibroblast hücre kültüründe test edildi. Hücre canlılığı 3- (4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile 48. ve 120. saatlerde belirlendi. Bütün test örnekleri toksik olarak bulundu. Test örnekleri arasında en toksik etkiyi, kimyasal olarak sertleşen kaide materyali gösterdi. Toksisite sırasıyla; ısıyla sertleşen, görülebilir ışıkla sertleşen, enjeksiyonla sertleşen, mikrodalga ile sertleşen kaide materyallerinde gözlemlendi. Farklı protez kaide maddeleri, içeriklerine ve polimerizasyon işlemlerine bağlı olarak orta ve düşük seviyelerde toksisite göstermiştir. Uzun süreli kullanımlarda, toksisite düzeyi düşük olan kaide materyalinin kullanımı doku uyumu açısından önemli olabilir.

Anahtar kelimeler: Gingival fibroblast, hücre canlılığı, protez kaide materyalleri

Summary

Effects of five different acrylic resin denture base materials on gingival fibroblasts

The objectives of this study were to detect the cytocompatibility of five different types of denture base resins and to compare the cytotoxic effect of these materials on primary human gingival fibroblasts. The gingival fibroblast cultures were exposed to test specimens from light-cured resin, heat-cured resin, self-cured resin, microwave-cured resin and injection-cured resin. Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide (MTT) method at the 48th and 120th hours after exposure. All of the test specimens were cytotoxic to primary gingival fibroblast cultures. Self-cured resin was the most toxic denture base material among the other test materials. The cytotoxicity decreased in the order of heat-cured, visible light-cured, injection-cured, and microwave-cured resin. It is concluded that different denture base materials displayed low to intermediate degrees of cytotoxicity depending on their chemical composition and polymerization type. In the case of long term use, denture bases with low cytotoxicity should be preferred.

Key words: Gingival fibroblast, cell viability, denture base materials

Giriş

Akril reçinesinin polimerizasyonu, yıllardır araştırma konusu olmuştur. Akril reçinelerin diş hekimliğinde kullanıma girmesiyle birlikte kitlenin fiziksel özelliklerini daha da geliştirebilmek, dokulara uyumunu daha da mükemmel hale getirebilmek ve kitle içinde oluşma ihtimali olan poroziteyi yok edebilmek için, çeşitli polimerizasyon yöntemleri denen-

miştir. Polimerizasyon, reaksiyonu başlatan etkenlere bağlı olarak ısı, kimyasal maddeler, ışık ve mikrodalga enerjisi olmak üzere dört başlık altında toplanabilir. Protez kaidesi yapımında, çeşitli akriller kullanılır. Bunlar; akıcı tipte protez akrili, çok sert akril, ısıyla çabuk polimerize olan akril, görünür mavi ışıkla polimerize olan akril ve mikrodalga enerjisiyle polimerize olan akrillerdendir (1).

Protezin yapımında kullanılan akriller, polimerizasyon işleminden sonra reaksiyona girmeyen komponentlerin varlığından dolayı farklı derecelerde toksisiteye ve allerjik reaksiyonlara neden olabilir (2,3). Protez kaide akrilleri uzun süreli olarak gingival dokularla temasta olduğu için, ağız mukozasına karşı allerjik ve iritan özellikler gösterebilmektedir. Bu yan etkiler, protezin yapımında kullanılan akril resininin içindeki polimetil metakrilat monomerinden kaynaklanmaktadır (4,5). Klinik semptomların genellikle eritem, ağız mukozası erozyonu, mukozada ve dilde yanma olabileceği rapor edilmiştir (2-8).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, protez kaide materyallerinin toksisitesini belirleyen çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Bundan dolayı, bu çalışmanın amacı beş farklı protez kaide materyalinin toksisitesini gingival fibroblast hücre kültüründe belirleyerek, doku uyumu açısından en uygun materyali saptamaktır.

* GATA Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi Protetik Diş Tedavisi AD

** GATA Hematoloji AD

Ayrı basım isteği: Dt. Jülide Özen, GATA Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi, Protetik Diş Tedavisi AD Etlik-06018, Ankara
E-mail: julideozen@yahoo.com

Makalenin geliş tarihi: 27.04.2005

Kabul edilme tarihi: 01.09.2005

Gereç ve Yöntem

Test örneklerinin hazırlanması: Test edilen örnekler, Tablo I'de gösterilmiştir. Herbir test örneği, üçer tane olacak şekilde, steril şartlarda yapım kurallarına uygun olacak şekilde üretildi. Bütün kaide materyalleri, muflada (5 mm çap x 0.5 mm kalınlık) boyutlarında hazırlanan mum örneklerden elde edildi. Polimerizasyon işlemi Tablo I'de gösterildiği gibi yapım kurallarına uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Örnekler, hücre kültürüne konulmadan önce %70 etanol ve steril su ile yıkanıp kurutuldu.

roskobu (Zeiss, West Germany) kullanılarak kontrol edildi. Hücreler flasksın yaklaşık 1/4'ünü doldurdıklarında, içindeki 3 ml'lik besiyeri alındı. Tripsin-EDTA'nın (Biological Industries, 25115, Kibbutz Beit Haemak, Israel) 1.5 ml solüsyonu kabın içine boşaltıldı. Beş dakika 37°C'lik inkübatörde hücrelerin yapıştıkları kap yüzeyinden kalkmaları beklendi. Hafif pipetaj yapılarak hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Doku kültür kabının içine 3 ml'lik DMEM besiyeri aktarıldı ve Tripsin-EDTA'nın aktivitesi DMEM besiyeri ile

Chambridge, MA, USA) geçirildi. Böylece, stok MTT hazırlanmış oldu. Hazırlanan stok MTT kullanım süresi yakın olduğu için, deney gününe kadar +4°C'de saklandı. Deney günü 48. ve 120. saatlerde, metaller kültür ortamından alındıktan sonra tripsinizasyon yapılarak hücreler döküldü. Tripsinizasyon yapılan hücreler 15'lik tüpler içine alınıp santrifüj edilip, hücrelerin dibe çökmesi sağlandı. Doksan altı kuyucuklu doku kültür kabının (Costar, Chambridge, MA, USA) en dışındaki kuyucuklara 200 µl DMEM, ortadakilere ise solüsyon olarak hazırlanmış hücrelerden 1x10² hücre/µL konsantrasyon konuldu. Daha önce hazırlanmış olan stok MTT'den 5 mg/ml olacak şekilde DMEM ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Yapılan çalışma solüsyonundan 20 µl hücrelerin üzerine ilave edildi. Doksan altılık doku kültür kabı, 4 saat süreyle 37°C'deki inkübatörde bekletildi. Dört saat sonra hücre kültürünün bulunduğu herbir kuyucuktan 200 µl sıvı steril pipetle alındı ve 100 µl isopropyl (0.04 N HCl içinde) konuldu. Doku kültür kabı, streç film ile sarılıp hava alması önleildi. Dört saat süreyle, oda ısısında karanlıkta bekletildi. Dört saat sonunda Biotek firmasının 540 nm'lik mikropate okuyucusunda (ELISA Reader-EL312e, Bio-Tek, Vermont, USA) MTT değerleri okundu. Optik okuyucudan elde edilen değerler, aşağıdaki denklem ile yüzde olarak hesaplandı.

Veriler, SPSS 10.0 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde, student t testi ve istatistiksel anlamlılık için 0.05 düzeyi kullanılmıştır.

Bulgular

Bütün test örneklerinden elde edilen hücre canlılık sonuçları Şekil 1'de görülmektedir. Kırk sekizinci saatte elde edilen hücre canlılığının 120. saate göre daha az olduğu görülmektedir. Test örnekleri içinde en fazla toksisiteye sahip test örneği, kimyasal olarak polimerize olan akrilikte bulunmuştur (%75-%78). Bunu sırasıyla, ısı ile polimerize olan (%80-%82), enjeksiyonla polimerize olan (%83-%84), ışımla polimerize olan (%86-%89) ve mikrodalga ile polimerize olan (%88-%90) akrillikler izlemektedir. Kontrol grubuna göre bütün test örneklerinde,

Tablo I. Test edilen protez kaide akrilleri

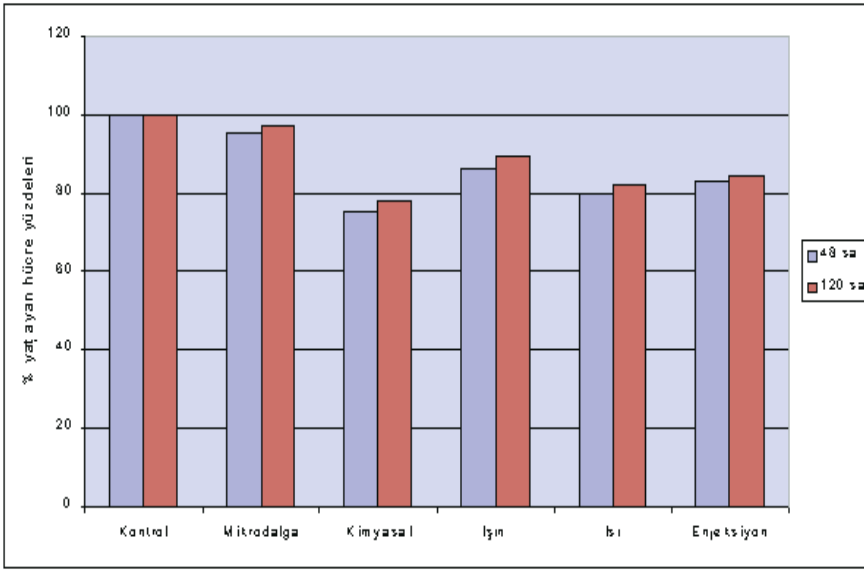
Polimerizasyon yöntemi	Ticari ismi (Üretici firma)	Sertleşme süresi
Kimyasal polimerizasyon (Soğuk akril)	Rebase (Tokuyama)	Oda ısısında 1 saat
Isı ile polimerizasyon (Sıcak akril)	Lucitone199 (Dentsply)	70 °C, 9 saat
İşıkla polimerizasyon	Triad (Dentsply)	Görülebilir ışık, 10 dakika
Enjeksiyonla polimerizasyon	Palajet/Palaxpress (Heraeus, Kulzer)	55 °C, 30 dakika
Mikrodalga ile polimerizasyon	Acron MC (GC Corp)	Mikrodalga fırını, 3 dakika

Hücre kültürünün oluşturulması: Çalışmamıza, periyodontal olarak sağlıklı, ortodontik çekim endikasyonu olan yaşları 14 ile 26 arasında değişen (ortalama 20.64±3.6 yıl) 15 hasta alındı. Bu hastaların onayı alındıktan sonra, çekim soketinden epitelsiz bağ dokusu örnekleri alındı. Yüz ml RPMI (Biological Industries, 1640, Kibbutz Beit Haemak, Israel) ile 1 ml penisilin ve streptomisinden hazırlanan taşıma solüsyonundan 5 ml, steril tüpler içine konularak örnekler laboratuvara getirildi. Doku örnekleri, laboratuvarında steril petri kabına alınarak taşıma solüsyonu ile iki defa yıkandı. Yıkama işleminden sonra steril 20 numaralı bistüri kullanılarak doku örnekleri küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan doku parçacıkları 25 cm²'lik doku kültür kaplarına (flasklara) aktarıldı. Doku kültür kaplarının üzerine kaplayacak şekilde 3 ml besiyeri DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 25115, Kibbutz Beit Haemak, Israel) ilave edildi. Doku kültür kabının ağzı hafif açılarak, %5'lik CO₂, 37°C'deki inkübatöre (Sanyo, Japan) hücrelerin üremesi için konuldu. Üç günde bir, hücre kültür besiyeri tazelenildi. Hücrelerin üremesi, Invert ışık mik-

inhibe edilmiş oldu. Yirmi dört saat sonra flask içindeki besiyerinin tamamı alınarak 3 ml yeni besiyeri eklendi. Devam eden günlerde, 3 günde bir besiyeri değiştirildi. Hücreler flask yüzeyinin en az 3/4'lük kısmını kapladığında, gingival fibroblast hücre kültürü elde edilmiş oldu.

Gingival fibroblast hücre kültürü elde edildikten sonra, 24'lük doku kültür kabının (Costar, Chambridge, MA, USA) her bir kuyucuğuna 1x10⁴ hücre gelecek şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. Test örnekleri de hücre ekimi yapılmış 24'lük doku kültür kabının her bir kuyucuğunun ortasına gelecek şekilde yerleştirildi. Herbir test örneği, üçer kez test edildi. Muamele edilmemiş kültür, kontrol grubu olarak kullanıldı.

Hücre canlılık testinin yapılması: Bu işlem, test örneklerinin 48. ve 120. saatlerinde kültür ortamından alınmasından sonra yapıldı. Yapılan işlemler karanlık ortamda ve oda ısısında gerçekleştirildi. İşleme başlamadan önce 50 mg MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide) (Sigma M2128 St.Louis, MO, USA), 10 ml DMEM içerisinde çözülerek 5 mg/ml'lik MTT solüsyonu hazırlandı. Çözülen MTT solüsyonu, 0.2 µl'lik filtreden (Costar,



Şekil 1. Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerindeki hücre canlılığının MTT test yöntemiyle değerlendirilmesinin yüzde olarak sonuçları görülmektedir. Herbir materyalin, 48. ve 120. saat hücre canlılık yüzdesi kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

istatistiksel olarak farklılık görülmüştür ($p < 0.05$). Test örneklerinin birbirleri ile olan karşılaştırmasında ise mikrodalga, enjeksiyon ve ısıyla polimerize olan akriller, ısıyla ve kimyasal olarak polimerize olan diğer test örneklerine göre istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 1).

Tartışma

Ülkemizde rutin olarak kullanılan farklı akrillerin ve bu akriller içinde bulunan elementlerin gingival dokuları ne şekilde etkilediği konusunda kapsamlı bir çalışma bulunmaması göz önüne alınarak, bu konudaki eksikliğin giderilmesi amacıyla planlanan bu araştırmada, toksisiteye zamana bağlı olarak bakılmış ve elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Protez kaide materyalleri, uzun süreli olarak gingival dokularla temastadır. Bu temas sonucu, materyal ve doku arasında element salınımı oluşmaktadır. Element salınımı, tükürük ile dilüe edilemeyeceği için yüksek konsantrasyona ulaşabilmektedir. Böylelikle bağ dokusu hücreleri mukoza üzerindeki protez kaide materyallerinin kimyasal etkilerine direkt olarak maruz kalmadığı halde, zaman içinde difüzyon ile etkilenebilmektedir. Dişeti bağ dokusunun içerisinde çeşitli hücre elementleri bulunmaktadır. Bunlar fibroblastik hücreler ile lenfositler, plazma

hücreleri, farklılaşmamış mezankim hücreleri ve seygar hücrelerdir. Gingival fibroblastlar, dişeti dokularının en fazla kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda gingival fibroblastların kullanılması tercih edilmiştir.

MTT test yöntemi, ilk olarak Mosmann tarafından kullanılan alanına sokulmuştur (9). Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı ve sayılabilir olması avantaj olarak belirtilmiştir. Arjan ve ark., MTT test yönteminin sitotoksitenin belirlenmesinde kullanışlı, hassas ve hızlı bir metod olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek kalmadığını belirtmişlerdir (10). Wilson ve ark., MTT'den üreyen formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir (11). Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir. Schauer ve ark., MTT yönteminin immün yetmezliği olan veya immünsüpresif ilaç alan hastalarda T hücrelerinin fonksiyonel analizinde klinik olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşler ve sonuç olarak, bu yöntemin immün yetmezliği olan hastalarda değişimleri belirlemede uygun bir yön-

tem olduğunu savunmuşlardır (12). Sitotoksiste çalışmalarında güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi nedeniyle, bu çalışmamızda MTT test yöntemi tercih edilmiştir.

Hensten-Pettersson ve Wictorin, kimyasal olarak polimerize olan rezinlerin, ısıyla polimerize olanlara göre daha toksik olduğunu bildirmişlerdir (13). Sheridan ve ark. ısı ile polimerize olan, kimyasal olarak polimerize olan ve mikrodalga ile polimerize olan akriller üzerinde araştırmalar yapmışlar ve en yüksek toksisiteye kimyasal olarak polimerize olan akrillerin, en az toksisiteye de mikrodalga ile polimerize olan akrillerin neden olduğunu saptamışlardır (14). Kimyasal olarak sertleşen akrillerin ısı ve mikrodalga akrillerine göre daha fazla formaldehid ve metil metakrilat salgılayarak sitotoksisiteye neden oldukları iddia edilmiştir (15,16). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan bu çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermekte olup, en fazla toksisite kimyasal olarak polimerize olan akrilde ve en az toksisite ise mikrodalga akrilinde bulunmuştur. Işıyla sertleşen akrilin toksisitesi, mikrodalga akrilin toksisitesine yakın çıkmıştır. Enjeksiyon akrilin toksisitesi ise, ısı ile sertleşen akrilin toksisitesinden daha iyi çıkmıştır. Sonuç olarak polimerizasyon yöntemleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, ısı ve kimyasal olarak sertleşen akrillerin, diğer test örneklerine göre istatistiksel olarak farklılıklar gösterdikleri görülmektedir. Çalışmamızın sonuçları, farklı protez kaide maddelerinin ve bunlara uygulanan polimerizasyon yöntemlerinin gingival dokuya karşı farklı oranlarda toksik olabileceklerini göstermektedir. Bununla birlikte polimerizasyon tipinin, protez akrilinin fiziksel özellikleri üzerine olan etkilerinin önemli olabileceği de göz önüne alınmalıdır.

Kaynaklar

1. Çalikkocaoglu S. Tam Protezler. Cilt 2. İstanbul: 1998: 533-536.
2. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. J Prosthet Dent 2003; 90: 190-193.
3. Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. J Prosthet Dent 1980; 43: 138-142.
4. Austin AT, Basker RM. The level of resid-

- ual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis. *Br Dent J* 1980; 149: 281-286.
5. Stafford GD, Brooks SC. The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. *Dent Mater* 1985; 1: 135-138.
6. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent* 1993; 21: 240-243.
7. Kedjarune U, Charoenworakul N, Koon-tongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 1999; 44: 25-30.
8. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent* 1994; 72: 644-650.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
10. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified calorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991; 141: 15-22.
11. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 1990; 62: 189-194.
12. Schauer U, Krolkowski I, Rieger CHL. Detection of activated lymphocyte subsets by fluorescence and MTT staining. *J Immunol Methods* 1989; 116: 221-227.
13. Hensten-Pettersen A, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 1981; 39: 101-106.
14. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10: 73-77.
15. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 618-624.
16. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, et al. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odont Scand* 2000; 58: 217-228.