

Kauçuk yapıda Foley idrar sondalarının sitotoksitesinde çinko bileşiklerinin olası rolü

The possible role of zinc compounds on the cytotoxicity of latex Foley urinary catheters

Mehmet Kürşat DERİCİ¹, Hakan BÜZKAYA¹, Ferat ŞAHİN¹

ÖZET

Amaç: Doğal kauçuk yapıda olan sonda ve cerrahi eldivenlerin farklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu etkilerin azaltılması amacıyla gümüş ya da polimerik (hidrojel, silikon, politetrafloroetilen) kaplamalar gibi değişik kaplama teknikleri geliştirilmiştir. Kaplama sondaların üretim aşamasında, kauçuk sondalara benzer şekilde hızlandırıcı olarak çinko bileşikleri kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kauçuk sondaların in vitro sitotoksik etkilerini, silikon kaplanan kauçuk sondalar ile karşılaştırmak ve toksisite nedenini araştırmaktır.

Yöntem: Doğal kauçuk, silikon kaplı kauçuk ve %100 silikon olmak üzere üç grupta sekiz farklı markadan 48 sondanın sitotoksik etkileri, fare bağı dokusu fibroblast hücre kültüründe (L-929) nitel (görüntüleme ve skorlama) ve nicel (MTT) yöntemler ile araştırılmıştır. Sonda özütlerinde bulunan element düzeyleri Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) ile incelenmiştir.

Bulgular: Negatif kontrol olarak kullanılan standart polietilen ile karşılaştırıldığında, %100 silikon sondalardan elde edilen özütlerin uygulandığı hücrelerde % canlılık

ABSTRACT

Objective: The cytotoxic effects of natural rubber gloves and urinary catheters on different cells have been earlier reported. In order to reduce these effects, various coating techniques such as silver or polymer (hydrogel, silicone, polytetrafluoroethylene (PTFE)) coatings have been developed. However, during manufacturing process of silicone-coated rubber catheters, similar to latex catheters, zinc compounds, which have cytotoxic effects are added to the natural rubber base. The aim of this study was to compare the in vitro cytotoxic effects of rubber catheters with the silicone-coated rubber and to investigate the causes of the toxic effect.

Method: The cytotoxic effects of total 48 urinary catheters in three different structure (natural rubber, silicone, silicone-coated rubber) and 8 different brands were analysed in mouse connective tissue fibroblast cell culture (L-929) by qualitative (imaging and scoring) and quantitative (MTT) methods. The levels of the elements in catheter extracts were examined in an Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS).

Results: Compared with standard polyethylene used as a negative control, the extracts from 100% silicone did not change vitality of the fibroblast cells

¹ Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç, Biyolojik ve Tıbbi Ürünler Laboratuvar Dairesi, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Mehmet Kürşat DERİCİ

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç, Biyolojik ve Tıbbi Ürünler Laboratuvar Dairesi, ANKARA

Tel : +90 312 498 21 50

E-posta / E-mail : derici@tr.net

Geliş Tarihi / Received : 08.08.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 05.02.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.78790

Derici Mk, Buzkaya H, Şahin F. Kauçuk yapıda Foley idrar sondalarının sitotoksitesinde çinko bileşiklerinin olası rolü. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(1): 21-30.

oranı ($95,43 \pm 5,39$) değişmezken, doğal kauçuk ($8,57 \pm 0,54$) ve silikon kaplı kauçuk sondalarda ($21,0 \pm 2,52$) canlılığın anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0,01$). AAS ile ölçülen sonda özütleri çinko düzeyleri silikon sondalarda $0,11 \pm 0,01$, kauçuk sondalarda $4,78 \pm 0,66$ mg/L, silikon kaplı grupta ise $2,78 \pm 0,33$ mg/L olarak bulunmuş ve toksik etkiler arasında korelasyon tespit edilmiştir. Düzeyleri araştırılan diğer elementler (Cr, Ag, Cu, Bi, Pb, Fe, Co, Cd) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Metal iyon şelatörü olan etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)'in hücreler için toksik olmayan düzeyi ($5 \mu\text{M}$) uygulama öncesinde özüt içerisine eklendiğinde kauçuk yapıda sondaların sitotoksitesi anlamlı olarak geriye dönmüştür (sırasıyla $101,05 \pm 5,86$ ve $100,24 \pm 4,9$).

Sonuç: Çalışmamız, doğal kauçuk ve silikon kaplı kauçuk sondaların sitotoksik etkilerinin silikon sondalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu toksisiteden, üretim aşamasında çeşitli amaçlar ile kauçuğa eklenen çinko bileşiklerinin sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. Silikon kaplı sondaların sitotoksik etkileri arasında görülen anlamlı fark, üretim teknolojisinin, kalite için önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Farklı kaplama yöntemlerinin araştırılması veya kauçuk sondaların yerine toksik olmadığı kanıtlanan ürünler kullanılması, kliniklerde üriner kateterizasyondan kaynaklanan komplikasyonların azaltılması için çözüm olabilir.

Anahtar Sözcükler: Sitotoksosite, idrar sondaları, kaplama, çinko bileşikleri

($95.43\% \pm 5.39$), while the natural rubber ($8.57\% \pm 0.54$) and the silicone-coated rubber ($21.0\% \pm 2.52$) decreased this significantly ($p < 0.01$). The analysis of the catheter extracts by the AAS method showed that the zinc levels of rubber and silicon-coated catheter extracts were 4.78 ± 0.66 mg/L and 2.78 ± 0.33 mg/L, respectively and correlated with the observed toxic effects. No significant differences were found in the levels of elements such as Cr, Ag, Cu, Bi, Pb, Fe, Co and Cd. The addition of the metal chelating agent ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) in a non-toxic level ($5 \mu\text{M}$) for the cells, reversed the latex cytotoxicity ($101.05\% \pm 5.86$ and 100.24 ± 4.9 , respectively).

Conclusion: Our study demonstrated that both the rubber and the silicone-coated rubber catheters have cytotoxic effects. Zinc compounds, which are added to rubber in the production stage for a variety of purposes, have proven to be responsible for this toxicity. The significant difference between the cytotoxic effects of the silicone-coated rubber and latex catheters suggests that the production technology is an important factor for the quality. Different coating methods have to be investigated or the products proved to be non-toxic should be used instead of the rubber catheters, in order to reduce complications in urinary catheterization in clinical practice.

Key Words: Cytotoxicity, urinary catheters, coating, zinc compounds

GİRİŞ

Üriner kateterlerin tarihsel gelişimine bakıldığında farklı dizayn ve hammaddelerin kullanıldığı görülmektedir. Milattan sonra üçüncü yüzyılda Yunan hekimlerin kullanıldığı bilinen bakır, altın, bronz gibi metallerin yanı sıra Mısır'da papirusdan yapılan kateterlerin kullanıldığı da gösterilmiştir (1). İlk elastik kateter, 1779 yılında Fransa'da Bernard tarafından geliştirilmiş daha sonra 1853'de bu tasarıma retansiyon baloncuğu da eklenmiştir. Bu gün kullanılan, doğal kauçuk yapıda üretilen ve Foley kateter olarak bilinen tip ise 1930'ların ortalarında Dr. Frederick B. Foley tarafından geliştirilmiştir

(2). Günümüzde sağlık alanında, üriner tıkanma ve inkontinens sorunlarının tedavisinde en sık kullanılan medikal ürünlerin idrar sondaları olduğu görülmektedir.

Ülkemizdeki kullanımıyla ilgili kesin kayıtları bulunmamakla birlikte, yakın tarihte İngiltere'de yapılan bir araştırma, uzun süreli üriner kateterizasyon prevalansının yetişkin hasta grubunda $0,03-0,07$, 75 yaş üzerinde $0,5$ 'e, 85 yaş ve üzerinde ise 2 ye ulaştığını göstermektedir (3). İleri yaş hastalarda idrar yolu sorunları, sondaların kullanım sıklığı yanında sondaların uygulama sürelerini de uzatmaktadır.

Araştırmalar idrar sondalarının bu hastalarda 1-3 ay arası sürelerde ve değiştirilerek kullanıldığını göstermektedir (3,4).

Günümüzde kullanılan idrar sondalarının büyük çoğunluğu, orijinal Foley katetere benzer şekilde doğal kauçuk veya poliisopren adlı maddeden imal edilmektedir. Doğal kauçuk (lateks) bol bulunduğu için nispeten düşük maliyetli olmasının yanında kolay ve kısa sürede şekillendirilebilmesi, işlenebilmesi nedeniyle aynı zamanda üretim maliyetlerini de azalttığından kateter üretiminde halen sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda doğal kauçuğun, yoğunluk, sertlik, uzama katsayısı, gerilme kuvveti gibi fiziksel özelliklerinden kaynaklanan avantajları bu hammaddenin yerine koyulabilecek alternatiflerini sınırlamaktadır. Ancak özellikle 1980'li yıllarda, kauçuk yapıda malzemelerin neden olduğu zayıf biyoyumluluk, yüksek idrar yolu enfeksiyonu yatkınlığı ve lümen tıkanması sıklığında artış gibi sorunlar, sağlık çalışanları tarafından fark edilmiş ve bildirilmiştir (5). Bunun dışında insan immün sisteminin, kauçuk içeriğinde bulunan proteinler ile aktivasyonu sonucu gelişen ve lateks alerjisi olarak tanımlanan bir tablo da ortaya konmuştur (6). Tüm bu sorunlar, sonda üreticilerinin yeni çözümler aramasına neden olmuş ve günümüzde gümüş, hidrojel, politetrafloroetilen (PTFE) veya silikon kaplanmış kauçuk sondaların ya da tamamen silikon hammaddesinin kullanıldığı sondaların üretimi ile sonuçlanmıştır. Kauçuğun polimerik kaplama ile muamele edilmesi sonucunda biyo-uyumluluğunun iyileştiği, nispeten yüzey kayganlığının artması nedeniyle uygulanmasının kolaylaştığı, uygun esneklik ve sertlik değerlerine ulaşabildiği iddia edilmektedir (5). %100 silikon sondalar ise fiziksel, kimyasal ve biyoyumluluk özellikleri yönünden, üriner kateterizasyon ile ilgili olduğu bildirilen bir çok sorun için kesin çözüm olarak görülmeyle birlikte üretim maliyetleri diğer sonda tiplerine oranla yüksektir. Bunlara ek olarak sondaların çeşitli antibiyotikler ile muamele edilmesi ile hem mikroorganizmaların yapışmasının engellendiği hem de sitotoksik etkilerinin azaltıldığı gösterilmiştir (7).

Bu çalışmanın amacı ülkemizde kullanılmakta olan çeşitli marka ve serilerinden oluşan üç tip idrar sondasının (doğal kauçuk, silikon kaplanmış doğal kauçuk ve %100 silikon) hücre kültürü yöntemi kullanılarak in vitro sitotoksitelerinin ortaya konması ve bunun olası nedenlerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü, Farmakoloji Laboratuvarına, Sağlık Bakanlığı tarafından piyasa gözetim ve denetimi kapsamında, testlerinin yapılması istemi ile gönderilen, üç farklı hammaddeden (doğal kauçuk, silikon, silikon kaplı doğal kauçuk) üretilen sekiz farklı marka, toplam 48 adet idrar (Foley) sondası alınmıştır. Çalışılacak sondalar, seriler içerisinde rastgele sayılar tablosu kullanılarak seçilmiştir.

Sitotoksite Testleri: Sondalarda özütlemeye çalışmaları, TS EN ISO 10993-12 "Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 12; Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler. Mart 2010" standardına uygun şekilde yapılmıştır (8). Sonda özütleri, %5 fetal sıgır serumu (FBS) içeren MEM (Minimal Essential Medium) vasatı içerisinde 24 saat 37 °C koşullarda ve sondaların bütünlüğü korunarak elde edilmiştir. Sitotoksite çalışmaları ise TS EN ISO 10993-5 "Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi": Bölüm 5- Vücut dışı sitotoksite deneyleri. Temmuz 2010" standardında belirtildiği şekilde nitel ve nicel deneyler kullanılarak yapılmıştır (9). Deneyler, NCTC klon 929 (L-929) fare subkutanöz bağ doku hücreleri (fibroblast) üzerinde gerçekleştirmiştir. Hücreler, Tarım Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası'ndan sağlanmıştır. Standartta tarif edilene uygun şekilde çözdürülen hücrelerin daha sonra üç pasajı yapılarak çalışmaya hazır hale gelmesi beklenmiştir. Hücrelerin çoğaltılması aşamalarında %10 FBS+ 2 mM Lglutamin,+ 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren MEM (PAA Laboratories, Austria) vasatı kullanılmıştır. Hücreler %90 nem

37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde (19AIC-UV, Sanyo) inkübe edilmiştir.

Nitel Değerlendirme: Hücreler altılı plakalara ekilerek inkübatöre konulmuş ve %80 konfluense ulaşması beklenmiştir. Daha sonra üzerlerine 1/1, 1/10, 1/100 ve 1/1000 dilüsyonlarda hazırlanan sonda özütlerini derişimleri uygulanmıştır. 24 saat %90 nemli, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra hücreler mikroskopa incelenerek genel morfoloji, vokuolizasyon (boşluk oluşması), hücre kalkması, hücre yıkımı ve membran bütünlüğündeki değişiklikler TS EN ISO 10993-5 standardında bulunan Tablo-1'e göre değerlendirilmiştir.

Nicel Değerlendirme (MTT Testi): MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir testtir (10). Deney için gerekli olan özüt dilüsyonları ve pozitif ve negatif kontrol, MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) boyası, aynı gün hazırlanarak taze olarak kullanılmıştır. MTT (Sigma, Almanya), fenol kırmızısı içermeyen MEM içinde 1 mg/ml olacak şekilde çözülerek 0,22 µm filtreden süzölmüştür.

MTT testi için, 96 kuyulu plaklara 100 µl besiyeri içinde 104 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat inkübe edilen hücreler üzerine özütler 1/1-1/128 dilüsyonlar arasında hazırlanarak eklenmiş ve 24 saat daha 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler her ilaç konsantrasyonu için altı kuyu olarak çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak, aynı şartlarda özüt uygulanmamış hücreler ve USP standart polietilen özütü (0,2 g/mL), pozitif kontrol olarak ise 10 mM Amonyum Molibdat (Amonium heptomolybdate-tetrahydrate, Merck) çözeltisi kullanılmıştır. 24 saat sonra özütler boşaltılarak hücrelerin üzerine 50 µl MTT eklenmiş ve iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulardaki çözeltiler dökölüp her kuyucuğa 100 µl isopropanol eklenmiş ve plakların spektrofotometrik olarak 570 nm (referans 650 nm)'de absorbans değerleri okunmuştur.

Sitotoksitesiyi değerlendirmeden önce, hücresiz kuyulardaki OD değerleri (sadece vasat + MTT), özütlerin bulunduğu kuyucukların OD değerlerinden çıkarılmıştır. Numunelerin toksitesinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Tablo 1. Sonda özütlerin sitotoksitesinin nitel morfolojik derecelendirilmesi

Deney Grubu	Skor	Kültürlerin durumları
USP Standart Polietilen (Negatif Kontrol)	0 (Yok)	Ayrık sitoplazma içi granüller, hücre yıkımı yok, hücre çoğalmasında azalma yok
%100 Silikon	1 (Çok az)	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
Silikon Kaplanan Kauçuk	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış
Doğal Kauçuk	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış
Doğal Kauçuk + EDTA ve Silikon Kaplanan Kauçuk + EDTA	1 (Çok az)	Hücrelerin %20'sinden daha fazlası yuvarlak olmayan, zayıf tutunmuş ve sitoplazma içi granül içermeyen veya morfolojide değişiklikler gösteren, nadiren yıkıma uğramış hücreler var, sadece hafif büyüme inhibisyonu gözlemlenebilir
Amonyum Molibdat (10mM) (Pozitif Kontrol)	4 (Şiddetli)	Hücre katmanların tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış

(TS EN ISO 10993-5 Temmuz 2010 standardında bulunan Tablo-1'e göre değerlendirilmiştir).

% canlılık = $100 \times$ Her bir numunenin bulunduğu kuyucukların ortalama OD değeri / Negatif kontrol kuyucuklarının Ortalama OD değeri

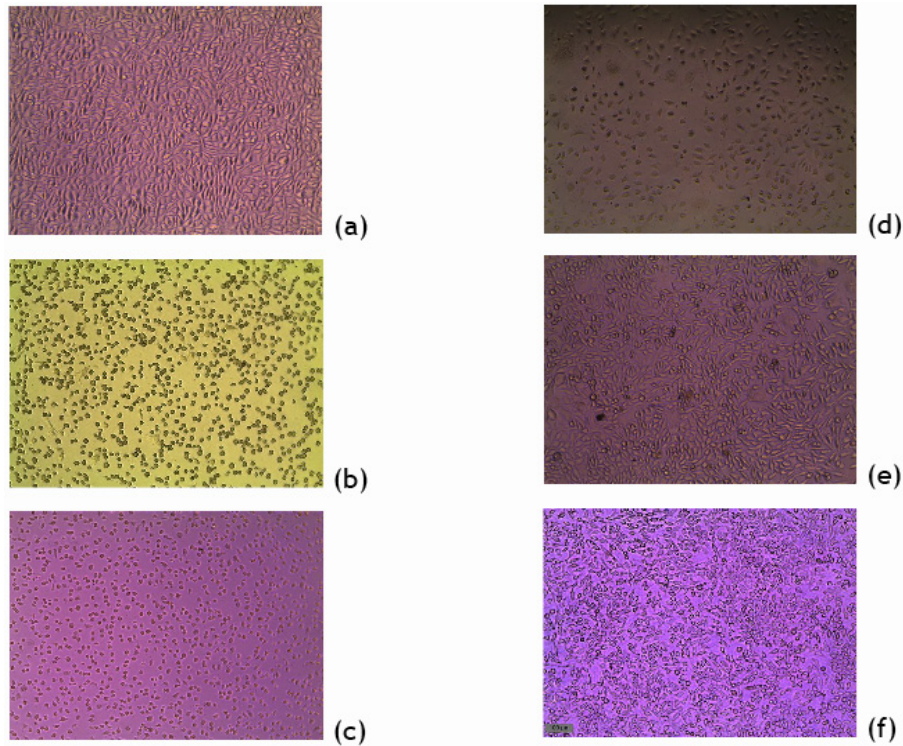
Alevli Atomik Absorbsiyon Yöntemi: Bu araştırmada, özütler içeriğinde bulunan elementlerin miktar tayini için Alevli Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (AAS) yöntemi uygulanmıştır. Krom (Cr), Gümüş (Ag), Bakır (Cu), Bizmut (Bi), Kurşun (Pb), Demir (Fe), Kobalt (Co), Kadmiyum (Cd) ve Çinko (Zn) elementlerinin her biri için, istenilen dalga boyunda ışın yayan uygun “Oyuk Katot Lambası” kullanılmıştır. Yanıcı ve yakıcı gazlar, analizi yapılacak elementin atomlaşma sıcaklığına göre seçilmiştir. Her element için uygun konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltiden yararlanarak standart eğrisi

çizilmesini takiben sonda özütlerinin absorpsiyon değeri okutularak elementin numune içerisindeki konsantrasyonu hesaplanmıştır.

İstatistiksel Yöntem: Elde edilen bulgular; ortalama± standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar, “Kruskal Wallis H” ve “Mann-Whitney U” testleri ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

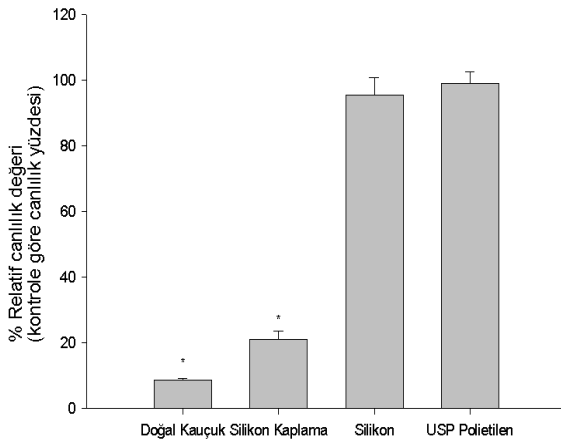
BULGULAR

L-929 hücrelerinin özütler ile 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında inkübe edilmesi sonrasında ortaya çıkan mikroskopik değişiklikler nitel değerlendirme ile ortaya konmuştur. Şekil 1, (c) ve (d) fotoğraflarında görüldüğü gibi doğal kauçuk



Şekil 1. Sonda özütlerine 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında 24 saat boyunca maruz kalan L-929 hücrelerinde görülen mikroskopik etkiler (LEICA DFC295 FIREWIRE görüntüleme sistemli mikroskop- 10x büyütme). Negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilen (a) ve silikon yapıda sonda (e) özütlerine maruz kalan fibroblast hücrelerinde mikroskopik olarak herhangi bir değişiklik görülmezken pozitif kontrol örneği (Amonyum Molibdat 10 mM) (b), doğal kauçuk (c) ve silikon kaplanan kauçuk (d) sondaların özütü ile inkübe edilen hücrelerde yuvarlaklaşma, konflüens kaybı, ayrılma gibi toksisite belirtileri gözlenmiştir. Bu toksik etkilerin özütlere 5 µM Na-EDTA eklenmesi ile tümüyle geri dönmüştür (f).

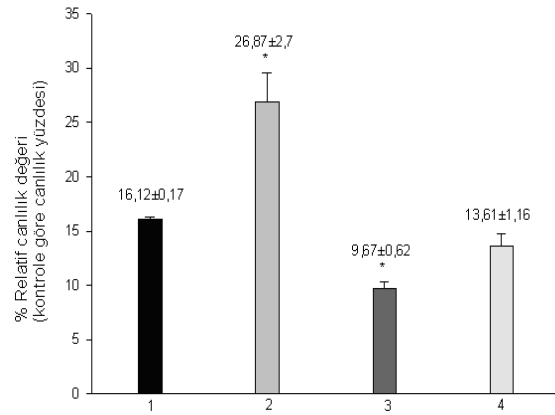
ve silikon kaplanan kauçuk sondalarda, özütlerin uygulanması sonrası hücreler negatif kontrol numunesinde görülen paternlerini değiştirmişler, sitoplazmik kayba uğrayarak tanecikler halinde kümelenmişlerdir. Hücreler arasında geniş boşluklar, hücre membran lizisi ve hücre yıkımı dikkati çekmiştir. Geniş alanlardaki boşluklar, hücrelerin canlılığını kaybederek yüzeyden kalktığını göstermiştir. Silikon sonda örneklerinde ise yuvarlak hücre oranının %20'den daha az olduğu, hücrelerin sitoplazma içi granül içermediği ve morfolojik değişiklikler görülmediği, sadece hücre büyümesinde hafif inhibisyon olduğu dikkati çekmiştir. Özütlere uygulama öncesinde 5 μ M Na-EDTA eklenmesi ile sitotoksik etkilerin ortadan kalktığı ve hücrelerin canlılıklarını koruduğu fark edilmiştir (f). Bu nitel değerlendirmeler TS EN ISO 10993-5 Temmuz 2010 standardına göre skorlandığında ortaya çıkan bulgular Tablo 1'de özetlenmiştir.



Şekil 2. Değişik yapısal özelliklerdeki sondalardan elde edilen özütlerin L-929 fibroblast hücre canlılığı üzerine olan etkileri: Hücrelerin, üç farklı yapısal grup sondadan elde edile özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılması sonrasında, negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilenin (%98,97 ± 3,49) ve silikon yapıdaki (%95,43 ± 5,39) sondaların hücre canlılığına herhangi bir etkisi olmadığı ancak doğal kauçuk (%8,57 ± 0,54) ve silikon kaplı doğal kauçuk (%21,0 ± 2,52) yapıdaki sondalarda canlılık değerlerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (* p<0,01, n=6).

Sonda özütlerinin L-929 fare bağ doku fibroblast hücrelerinin canlılıkları üzerine olan etkileri Şekil 2' de gösterilmiştir. Hücrelerin, üç farklı yapısal grup sondadan elde edilen özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılması sonrasında, negatif kontrol olarak kullanılan USP standart polietilenin (%98,97 ± 3,49) ve silikon yapıdaki (%95,43 ± 5,39) sondaların hücre canlılığına herhangi bir etkisi olmadığı ancak doğal kauçuk ve silikon kaplı doğal kauçuk yapıdaki sondalarda (sırasıyla %8,57 ± 0,54 ve %21,0 ± 2,52) canlılık değerlerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (p<0,01, n=6).

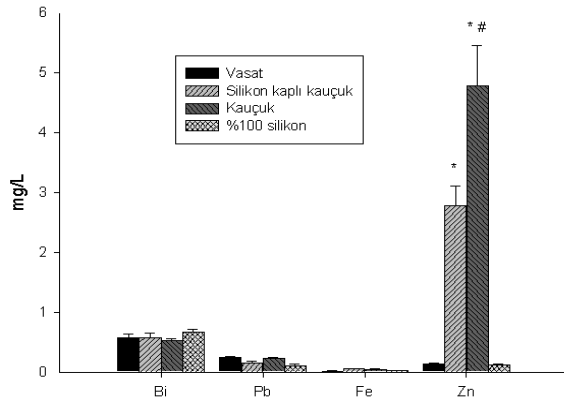
Doğal kauçuk sondaların toksik etkisi, Silikon ile kaplanan kauçuk sondalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p< 0,01). Silikon kaplı ve doğal kauçuk sondalardan elde edilen özütlerin %50 inhibisyon yapan konsantrasyon (IC50) değerleri ise sırasıyla 0,16±0,01 ve 0,05±0,001 olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak farklı markalardaki silikon kaplı sondalar arasında sitotoksosite oranları açısından anlamlı farkların bulunduğu da görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı marka silikon kaplama sonda özütlerinin L-929 hücre canlılığı üzerine olan etkileri: Hücreler, dört farklı marka silikon kaplı kauçuk sondadan elde edile özütlerle, 24 saat, 37 °C, %5 CO₂'li ortam şartlarında maruz bırakılmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Aynı yapıda olsa da farklı sonda markalarının sitotoksik etkileri arasında anlamlı farkların bulunduğu dikkati çekmektedir. (* p<0,05, n=6).

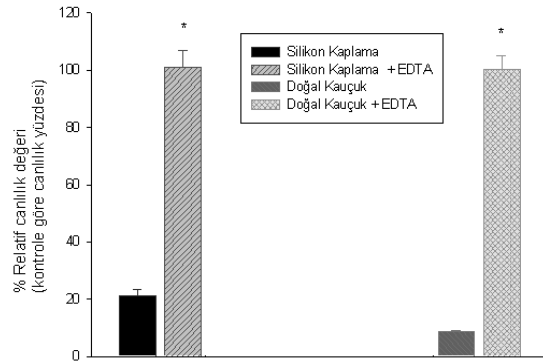
Sonda özütleri içeriğinde bulunan elementlerin analiz sonuçları Şekil 4'de özetlenmiştir. Özütlerdeki Cr, Co, Cd, Ag ve Cu değerleri AAS yönteminin deteksiyon limitlerinin altında bulunmuştur. Konsantrasyonları değerlendirilebilen Bi, Pb ve Fe elementlerinin düzeyleri bakımından sonda özütleri ile kontrol olarak kullanılan vasat arasında fark bulunmamıştır. Ancak kauçuk yapıdaki sondalardan elde edilen özütlerdeki Zn düzeylerinin, vasattan ($0,13 \pm 0,03$ mg/L) ve silikon sondalardan ($0,12 \pm 0,01$ mg/L) anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).

AAS yöntemi ile elde edilen sonuçlar, kauçuk yapıdaki sonda özütlerinde yüksek düzeyde bulunan Zn oranlarının, ortaya çıkan sitotoksiteden sorumlu olabileceğini göstermiştir. Bu bulguyu desteklemek amacıyla birçok metodolojide metal



Şekil 4. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi(AAS) yöntemi ile sonda özütlerinin elementer analizi: Araştırılan elementler içerisinde bulunan Cr, Ag, Cu, Co ve Cd'nin özütlerdeki düzeyleri yöntemin deteksiyon limitlerinin altında olduğundan gösterilmemiştir. Konsantrasyonları değerlendirilebilen Bi, Pb, Fe elementlerinin kontrol olarak kullanılan vasat ile sonda özütleri arasında fark bulunmamıştır. Kauçuk yapıdaki sondalardan elde edilen özütlerin Zn düzeyleri, vasattan ($0,13 \pm 0,03$ mg/L) ve silikon sondalardan ($0,12 \pm 0,01$ mg/L) anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$). Ek olarak, Doğal kauçuk sondalarda ($4,8 \pm 0,66$ mg/L) bulunan Zn değerleri Silikon kaplı doğal kauçuk sondalardaki değerlerden ($2,8 \pm 0,34$ mg/L) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (# $p < 0,05$, $n=6$).

iyonlarının eliminasyonunda kullanılan bir şelatör olan etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'in hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. 0,1 - 500 μ M arasındaki EDTA konsantrasyonları L-929 hücreleri üzerine uygulanan MEM vasatına katılarak MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, 5 μ M düzeyinde eklenen Na-EDTA, hücre yaşayabilirliğini değiştirmemiştir ($100,24 \pm 4,91$). Bulgu literatürde, sıçan böbrek hücre kültüründe Na-EDTA maruziyetini inceleyen bir araştırma sonuçları ile uyumludur (11). Sondaların özüt alma işleminde kullanılan MEM hücre vasatına, özütleme sonrasında 5 μ M Na-EDTA eklenerek hücrelere uygulanmış ve 24 saat sonra MTT testi ile canlılık oranları değerlendirilmiştir. Kauçuk sondalar ile ortaya çıkan sitotoksitenin EDTA varlığındaki değişimi Şekil 5'de görülmektedir. Sonuçlar; kauçuk ile ilişkili olduğu düşünülen toksik etkilerin, Na-EDTA (5 μ M) varlığında anlamlı olarak geri döndüğünü göstermiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).



Şekil 5. Doğal Kauçuk ve Silikon kaplı sondalardan elde edilen özütlerin sitotoksik etkilerinin EDTA (5 μ M) varlığında değişimi: Hücre özütlerinin alındığı MEM hücre vasatına, özütleme işlemi sonrasında 5 μ M Na-EDTA eklendiğinde canlılık düzeyinde ortaya çıkan değişim MTT testi ile ortaya konmuştur. Hücrelerin doğal kauçuk ($8,57 \pm 0,54$) ve silikon kaplı doğal kauçuk ($21,0 \pm 2,52$) yapıdaki sondalarda ortaya çıkan canlılık değerlerinin, ortama 5 μ M Na-EDTA eklenmesi ile anlamlı olarak artarak negatif kontrol düzeylerine çıktığı (sırasıyla $101,05 \pm 5,86$ ve $100,24 \pm 4,9$) gözlenmiştir (* $p < 0,01$, $n=6$).

TARTIŞMA

Foley kateterlerin ilk kullanıldığı yıllardan bu yana enfeksiyon yada tıkanma gibi problemlere neden olduğu bilinmektedir. Bu sorunların çözümü için yapısal değişikliklerin, farklı koruyucuların, anti bakteriyel ajanların veya hidrojel, gümüş, teflon, silikon gibi kaplamaların uygulanması denenmiştir. Toplumlar da yaşlı hasta sayısının giderek artması, uzun süreli idrar sondası uygulanması gereken kalp damar cerrahisi veya serebrovasküler olayların insidansının artışı da birlikte getirmiştir. Buna bağlı olarak da, üriner kateterizasyon ile ilişkilendirilen komplikasyonların olası nedenleri ve çözüm yolları daha büyük bir önem kazanmıştır. Bu çözüm yollarının birbirlerine olan üstünlüğü halen tartışılmakta ve tedavi maliyet analizlerine olan etkisi karşılaştırılarak kişi ve duruma özgü öneriler oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Kateter üretiminde kullanılan materyallerin klinikte görülen komplikasyonlardan sorumlu olabileceğine yönelik şüphelerin ortaya konduğu ilk günden itibaren yapılan çalışmalarda, kauçuk sondaların etkileri in vivo ve in vitro olarak araştırılmaktadır. Bu çalışmaların birçoğunda doğal kauçuk yapıda sondaların diğer sondalara oranla uygulandığı hastalarda daha çok komplikasyona yol açtığı ve toksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (12-14). Bizim bulgularımız da bu yönüyle literatür ile uyumludur. Buna karşın Engelbart ve ark. tarafından köpeklerde yapılan bir çalışmada, silikon ve kauçuk yapıda altı farklı grup kateterin, dokudaki inflamasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Sondalar altı hafta süre ile uygulandıktan sonra, doku cevapları incelenmiş, silikon ve kauçuk gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı iddia edilmiştir (15). Ancak bu çalışmada ilk 24 saat içerisinde inceleme yapılmadığından bizim çalışmamızda ilk 24 saat sonrası kauçuk sondalarda gözlemlediğimiz toksik etkilerin gözden kaçırıldığı açıktır. Graham ve arkadaşları tarafından uygulanan, hücre kültürü, tavşan kas implantasyonu ve fare sistemik toksisite deneylerinde ise, kauçuk sondalardan salıverilen bazı zararlı maddelerin

üretit veya darlık gibi klinik sonuçlara yol açabilecek toksisite gösterdiği rapor edilmiştir (16). Aynı çalışmada, hücre kültürü metotlarının, hayvan denekler kullanılan in vivo testlere göre çok daha hassas olduğunu belirtilmiş ve diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmiştir (14,17). Örneğin tavşan primer üreter epitel (18) ya da insan üreter epitel (19) gibi hücre kültürü teknikleri ile yapılan araştırmalarda, kauçuk sondaların toksik etkileri gösterilmiştir. Benzer sonuçlar doğal kauçuktan yapılan cerrahi eldivenlerin özütleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmiştir (20).

Doğal kauçuk hammaddesinden idrar sondası üretimi aşamaları sırasında sertlik, esneklik, gerim direnci, yoğunluk v.b. özelliklerinin geliştirilmesi için birçok kimyasal madde ile muamele edilmekte, daha sonra yüzey geriliminin, bakteri adezyonunun veya toksisitesinin azaltılması amacıyla kaplanmaktadır. Bu maddeler (stabilizatörler, boyalar, tepkime hızlandırıcılar vs.) içinde hangilerinin, ne oranda bulunduğu endüstriyel bir sırdır.

Çalışmamızda, %100 silikon yapıda sondaların toksik olmadığı, silikon kaplanan kauçuk sondalarda görülen toksisitenin doğal kauçuk sondalara göre anlamlı olarak ($p<0,01$) azaldığı ancak buna rağmen uygun kabul edilen sınırdan (%70) oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak silikonize kauçuk sonda grupları arasında da toksisite açısından fark olması dikkat çekicidir. AAS çalışmalarımızın sonuçları, kauçuk ve silikonize kauçuk sondalardan özütlenme sırasında süzülerek hücreler üzerinde toksik etkiye sebep olabilecek etkenin, çinko olabileceğini göstermiştir. Kauçuk yapıdaki sondalardaki Zn miktarı, toksisite ile uyumlu olarak daha yüksektir. Metal iyonlarının EDTA ile bağlanması ile sitotoksitesinin tamamen geri dönmesi, toksik etkinin yüksek Zn düzeylerinden kaynaklandığı hipotezimizi desteklemiştir. Çinko, doğal kauçuğun kükürt ile işlenmesi aşamasında kullanılan önemli bir elementtir. Büyük bölümü çinko oksit (ZnO) şeklinde kullanılmaktadır. Bunun yanında üretimde

tepkime hızlandırıcı olarak kullanılan birçok kimyasal içerisinde de çinko bulunmaktadır. Çinko oksit ve diğer birçok çinko türevinin sitotoksik ve karsinojenik etkiler gösterdiği daha önce de rapor edilmiştir (21, 22).

Kauçuk sondalar ile ortaya çıkan toksisitenin azaltılması amacıyla silikon ile kaplanmasının, toksik etkiyi azaltmasına rağmen önleyemediği görülmüştür. Bunun nedeninin kaplama süreci sırasında kullanılan Zn değeri yüksek kimyasallar olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle üretim aşamasında kullanılan kimyasallardaki çinko oranlarının azaltılması toksisite için faydalı olabilir. Silikonize kauçuk yapıdaki sonda grupları arasında gözlemlenen farklı toksisite oranlarının, üretim kalitelerindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu görüş, silikon, hidrojel, teflon gibi kaplama metodolojileri kullanılarak kaplanan kauçuk sondaların iç ve dış yüzeylerinin SEM (Scannig Electron Microscopy) ile incelendiği bir çalışma ile desteklenmektedir (23). Bu çalışmada incelenen sondalar arasında, farklı üreticilerin uyguladığı kaplamalar arasında anlamlı farklar bulunduğu gösterilmiştir.

İdrar sondalarındaki toksik etkilerin nedenleri üzerine yapılan başka çalışmalar da bulunmaktadır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi L-929 fibroblastik seri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kauçuk sondalarda görülen toksisiteden, yapılarından salınan N-nitrosaminler sorumlu tutulmuştur (24). N-nitrozodi-N-butilamin ve N-nitrozodietilamin düzeylerindeki yükseklik hücrelerdeki toksisite oranları ile ilişkili bulunmuştur. Bu maddelerin doğal kauçuktan sonda üretim aşamasında hızlandırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir.

Günümüzde idrar sondaları ayaktan ve yatan hastalarda sıklıkla kullanılan tıbbi cihazlardır. Şu anda ülkemizde kullanılan sondaların (özellikle kauçuk sondalar) neden olduğu komplikasyonların ortaya çıkardığı ek tedavi maliyetlerini ortaya koyan ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu önemli sorunun aşılabilmesi için üriner kateterizasyon amacıyla kullanılan kauçuk yapıdaki idrar sondalarının üretim aşamalarının gözden geçirilmesi, iyileştirilmesi, piyasa gözetim ve denetimleri ile kalitelerinin izlenmesi önemli adımlardır. Bu şekilde toksik olmayan ve güvenle kullanılacak sondaların tedavide yer bulmaları mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Elves AW, Feneley RC. Long-term urethral catheterization and the urine-biomaterial interface. *Br J Urol.* 1997; 80(1): 1-5.
2. Winson L. Catheterization: A need for improved patient management. *Br J Nurs.* 1997; 10; 6(21): 1229-32.
3. Evans A, Pheby D, Painter D, Feneley R. The costs of long-term catheterization in the community. *Br J Community Nurs.* 2000; 5(10): 477-8.
4. Morris NS, Stickler DJ, McLean RJ. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol.* 1999;17(6): 345-50.
5. Lawrence EL, Turner IG. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Med Eng Phys.* 2005; 27(6): 443-53.
6. Hunt LW, Kelkar P, Reed CE, Yunginger JW. Management of occupational allergy to natural rubber latex in a medical center: the importance of quantitative latex allergen measurement and objective follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(2 Suppl): S96-106.
7. Kowalczyk D, Ginalska G, Przekora A. The cytotoxicity assessment of the novel latex urinary catheter with prolonged antimicrobial activity. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 98(2): 222-8.

8. TS EN ISO 10993- 12 “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 12; Numune Hazırlama ve Referans Malzemeler. Mart 2010”.
9. TS EN ISO 10993-5 “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi: Bölüm 5- Vücut dışı sitotoksosite deneyleri. Temmuz 2010”.
10. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method*, 1983; 65: 55-63.
11. Hugenschmidt S, Planas-Bohne F, Taylor DM. On the toxicity of low doses of tetrasodium-ethylenediamine-tetraacetate (Na-EDTA) in normal rat kidney (NRK) cells in culture. *Arch Toxicol*, 1993; 67(1): 76-8.
12. Graham DT, Mark GE, Pomeroy AR. Cellular toxicity of urinary catheters. *Med J Aust*, 1983; 14; 1(10): 456-9.
13. Bruce AW, Plumpton KJ, Willett WS, Chadwick P. Urethral response to latex and Silastic catheters. *Can Med Assoc J*, 1976; 115(11): 1099-100.
14. Ruutu M, Alfthan O, Talja M, Andersson LC. Cytotoxicity of latex urinary catheters. *Br J Urol*, 1985; 57(1): 82-7.
15. Engelbart RH, Bartone FF, Gardner P, Hutson J. Urethral reaction to catheter materials in dogs. *Invest Urol*, 1978;16(1): 55-6.
16. Graham DT, Mark GE, Pomeroy AR, Macarthur EB. In vivo validation of a cell culture test for biocompatibility testing of urinary catheters. *J Biomed Mater Res*, 1984; 18(9): 1125-35.
17. Talja M, Andersson LC, Ruutu M, Alfthan O. Toxicity testing of urinary catheters. *Br J Urol*. 1985; 57(5): 579-84.
18. Drewa T, Wolski Z, Gałazka P, Wozniak A, Olszewska-Stonina D, Sir J. [Silicone and latex urinary catheters cytotoxicity on primary cultured rabbit urothelial cells]. *Pol Merkur Lekarski*. 2004; 16(93): 228-31.
19. Pariente JL, Bordenave L, Jacob F, Bareille R, Baquey C, Le Guillou M. Cytotoxicity assessment of latex urinary catheters on cultured human urothelial cells. *Eur Urol*. 2000; 38(5): 640-3.
20. Baek HS, Yoo JY, Rah DK, Han DW, Lee DH, Kwon OH, et al. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. *Yonsei Med J*, 2005; 31; 46(4): 579-83.
21. Talja M, Saarela K, Ruutu M, Andersson LC, Alfthan O. Zinc compounds in urethral catheters. A possible source of toxicity? *Ann Chir Gynaecol Suppl*, 1993; 206: 74-9.
22. Borovanský J, Riley PA. Cytotoxicity of zinc in vitro. *Chem Biol Interact*, 1989; 69(2-3): 279-91.
23. Lawrence EL, Turner IG. Characterisation of the internal and external surfaces of four types of Foley catheter using SEM and profilometry. *J Mater Sci Mater Med*, 2006; 17(12): 1421-31.
24. Heenan MP, Nacey JN, Delahunt B, Ferguson AF, Dickson SJ. Volatile N-nitrosamines in urinary catheters. *Br J Urol*, 1989; 63(1): 72-5.