

YENİ BİR KÖK KANAL DOLGU PATININ SİTOTOKSİSİTE VE GENOTOKSİSİTESİNİN İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ*

IN VITRO EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF A NEW ROOT CANAL SEALER

Hülya ERTEN CAN†

Oya BALA†

Güven KAYAOĞLU ‡

Tayfun ALAÇAM §

Hamza OKUR¶

ÖZET

Çinko oksit-öjenol esaslı kök kanal dolgu patlarının içeriğinde bulunan öjenol, kök kanallarının biyomekanik preparasyonu ve dezenfeksiyonundan sonra canlı kalabilen mikroorganizmaların elimine edilmesinde yardımcı olmaktadır. Ancak foramen apikaleden periapikal dokulara geçebilen serbestleşmiş öjenolün bu dokular üzerinde toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yeni geliştirdiğimiz çinko oksit-öjenol (ZOE) esaslı deney patının içeriğindeki öjenol miktarı olabildiğince azaltılmış ve içeriğinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu çalışmada ZOE esaslı iki kök kanal dolgu patının (Deney patı ve Roth kök kanal dolgu patı) L 929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Materyaller 24 saat ve 1 hafta süreler ile sertleşmeleri için nemli ortamda bırakılmış, daha sonra toz haline getirilerek hücre kültürü ortamında 24 saat süre ile çözeltileri alınmıştır. Elde edilen çözeltilerin sitotoksisite ve genotoksisitesinin değerlendirilmesinde Flow Cytometry yöntemi kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda deney patının sitotoksisite ve genotoksisitesinin Roth kök kanal dolgu patından daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ZOE esaslı kök kanal dolgu patı, sitotoksisite, genotoksisite.

SUMMARY

Eugenol, present in the content of the zinc oxide-eugenol (ZOE) based root canal sealers, helps to eliminate the residual bacteria, surviving the biomechanical preparation and disinfection procedures of root canals. However, liberated eugenol passing through the foramen apicale is known to have toxic effects on the periapical tissues. Therefore the amount of the eugenol in our recently developed ZOE based experimental root canal sealer is intended to be minimized as much as possible and some modifications in the content of a ZOE based root canal sealer is also done. In this study, cytotoxic and genotoxic effects of two zinc oxide-eugenol based root canal sealers, (Experimental root canal sealer and Roth root canal sealer) on L 929 mouse fibroblast cells were determined. Materials were prepared and left for setting for 24 hours and 1 week in moist chamber. Thereafter the set materials were pulverized and eluted for 24 hours in the cell culture medium. The cytotoxic and genotoxic effects of the eluates were determined performing the Flow Cytometry Assay. The experimental root canal sealer revealed less cytotoxicity and genotoxicity than the Roth root canal sealer.

Keywords: ZOE based root canal sealers, cytotoxicity, genotoxicity.

* Türk Endodonti Derneği 7. Uluslararası Bilimsel Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

† Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Doç. Dr.

‡ Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Dt.

§ Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Prof. Dr.

¶ Hacettepe Üniversitesi Gen Tedavi Merkezi, Yard. Doç. Dr.

GİRİŞ

Endodontik tedavinin son aşaması, guta-perka ve kök kanal dolgu patlarının birlikte kullanılarak kök kanallarının hermetik bir şekilde doldurulmasıdır. ideal bir kök kanal dolgu patınının kanal duvarları ile iyi adaptasyon sağlamasının yanısıra temasta olduğu periapikal dokular üzerinde toksik etkisi bulunmayan ve iyileşmeyi stimüle edebilecek özelliklere sahip, biyouyumlu materyaller olmaları istenmektedir. Değişik içerik ve özellikleri olan birçok kök kanal dolgu patı bulunmakla birlikte, bunlardan çinko oksit-öjenol (ZOE) içerenler günümüzde en çok tercih edilenler arasında yer almaktadır.

Çinko oksit ve öjenol karıştırıldığında şelasyon reaksiyonu meydana gelmekte ve sonuçta içerisinde çinko oksit kristalleri bulunan, çinko öjenolat matrisi oluşmaktadır^{16,18,21}. Yapılan hücre kültürü ve doku implant çalışmalarında, bu matrisin içinde reaksiyona girmemiş veya hidroliz ile serbestleşebilen öjenolün toksik etkilere yol açabileceği tespit edilmiştir^{2,5,9,15,17,19,23}. in vitro deneylerin bu olumsuz sonuçlarına rağmen, ZOE'lü kök kanal dolgu patlarının klinik uygulamalarında oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir⁶. Ayrıca bu patların iyi tıkkama sağlaması, analjezik, antienflamatuar ve antimikrobiyal özelliklerinin bulunması, yıllardır tercih edilen bir kök kanal dolgu patı olmasında önemli rol oynamaktadır.

ZOE esaslı kök kanal dolgu patlarının sitotoksitesilerinin serbestleşen öjenolün sitoplazmik membran ile olan hidrofobik reaksiyonlara¹³ veya hücre respirasyonu üzerine olan etkilerine bağlı olduğunu savunan araştırmalar bulunmaktadır¹². Ancak ZOE esaslı kök kanal dolgu patlarının biyouyumluluklarını genotoksitesite yöntemleri ile değerlendiren çok az sayıda araştırma mevcuttur^{7,11}.

Yaptığımız çalışmanın amacı, yeni geliştirdiğimiz ZOE esaslı deney patınının sitotoksitesite ve genotoksitesitesinin Roth 801 kök kanal dolgu patı ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada yeni geliştirdiğimiz ZOE esaslı kök kanal dolgu patı olan Deney patı (içeriği Tablo

† Roth Inc. ABD

‡ Sigma Chemical Co. ABD

l'de verilmektedir) ile Roth 801[†] kök kanal dolgu patı kullanıldı. Kök kanal dolgu patları üreticinin talimatlarına göre hazırlanarak 4mm çapında, 3 mm yüksekliğinde polistren kalıplara yerleştirildi. Her iki gruba ait örneklerden yarısı 24 saat, diğer yarısı ise 1 hafta süre ile 37°C'de, %95 nemli ortamda sertleşmeye bırakıldı. Bu süreler sonrasında örnekler toz haline getirildi. 10mg toz tartılarak 5 ml'lik hücre kültürü ortamında-Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)[‡], 37°C'de 24 saat süresince çözümleri elde edildi. Elde edilen çözümler test edilene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo I. Deney patının içeriği

Toz	Likit
Çinko oksit	Öjenol
inhibitörler	Ökaliptol
Alışkanlığı kontrol eden ajan	
Plastikleştirici ajan	
Film oluşturan rezin	

Fibroblast Hücre Kültürü

%10'luk Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde -196°C'de donmuş halde bulunan L 929 fare fibroblast hücreleri (ATCC-NCTC CLONE 929) 37°C'ye getirildikten sonra 2 defa DMEM ile yıkandı. Fibroblastlar, DMEM içine konularak etüvde enkübe edildi. Donma ve çözülme işlemleri ve DMSO'nun etkisi ile canlılıkları %60 civarına düşmüş fibroblastların canlılıklarının %95'e yükseltilebilmesi için 7-10 gün süre ile pasajları yapıldı. Hücreler %95 canlı hale gelince tripsinize edildi. Tripsinizasyon ile toplanan hücreler 2 defa DMEM ile yıkandı. 24 gözlü mikropatelere her gözde 2x10⁵ canlı hücre olacak şekilde fibroblast hücreleri aktarıldı. Bu ortama 0.1'er ml aliquotlar halinde kök kanal dolgu patı çözümleri eklenerek 24 saat enkübe edildikten sonra değerlendirmelere başlandı. Çalışma üç defa tekrarlandı.

Mikroskopik Değerlendirme

Her iki gruba ait örneklerin piknotik özellikler bakımından değerlendirmeleri inverted mikroskop[§] ile yapıldı.

Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Inverted mikroskop ile yapılan değerlendirmeden sonra hücreler tripsinizasyon ile toplandı. Bu hücreler Etidium Bromide ve Acridine orange ile boyanarak floresan mikroskop[¶] ile sitotoksiste bakımından incelendi. Bu incelemede canlı hücreler Etidium Bromide ile yeşil floresan, ölü hücreler ise Acridine orange ile kırmızı-turuncu floresan verdiler. Boyama yapıldıktan sonra canlı ve cansız hücrelerin sayımları yapıldı.

Genotoksitenin Değerlendirilmesi

Hücreler tripsinizasyondan sonra 100ml'de 1×10^5 canlı hücre olacak şekilde DMEM ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 100ml alınarak Flow Cytometry* cihazının tüplerine aktarıldı ve üzerlerine Triton X ve 1mg/ml RNase solüsyonlarından 100ml eklendi. 800 devirde vortexlendikten 5 dakika sonra üzerine 1ml Propidium Iodide-400 mg/ml solüsyonu ilave edildi. 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta enkübe edildikten sonra Flow Cytometry cihazı ile genotoksiste incelendi.

BULGULAR

Mikroskopik Değerlendirme

Inverted mikroskop ile yapılan değerlendirmede, 24 saat ve 1 hafta süresince sertleşmeye bırakılan kök kanal dolgu patlarından Deney patı çözeltisinin ortamdaki hücrelerin piknotik özellikleri bakımından Roth 801 kök kanal dolgu patı çözeltisine göre daha az toksik etki gösterdiği saptanmıştır.

Sitotoksiste

24 saat süresince sertleşmeye bırakılan kök kanal dolgu patlarından Deney patı çözeltisinin uygulandığı grupta, 24 saatlik enkübasyon periyodu sonrasında, hücrelerin %90'ının canlı olduğu, buna karşılık Roth 801 kök kanal dolgu patı çözeltisinin uygulandığı grupta hücrelerin %85'inin canlı olduğu belirlenmiştir.

§ Nikon, Japonya

¶ Nikon, Japonya

* Coulter Elite, ABD

1 hafta süresince sertleşmeye bırakılan kök kanal dolgu patlarından Deney patı çözeltisinin uygulandığı grupta, 24 saatlik enkübasyon periyodu sonrasında, hücrelerin tamamının (%100) canlı olduğu, buna karşılık Roth 801 kök kanal dolgu patı çözeltisinin uygulandığı grupta hücrelerin %95'inin canlı olduğu saptanmıştır.

Genotoksiste

24 saat süresince sertleşmeye bırakılan kök kanal dolgu patlarından Deney patı çözeltisinin uygulandığı grupta, 24 saatlik enkübasyon periyodu sonrasında, hücrelerin %3'ünde DNA kırılmaları izlenirken, Roth 801 kök kanal dolgu patı çözeltisinin uygulandığı grupta hücrelerin %5'inde DNA kırılmaları tespit edilmiştir.

1 hafta süresince sertleşmeye bırakılan kök kanal dolgu patlarından Deney patı ve Roth 801 kök kanal dolgu patlarının uygulandığı gruplarda 24 saatlik enkübasyon periyodu sonrasında, hücrelerde herhangi bir genotoksik değişim izlenmemiştir.

TARTIŞMA

Kök kanallarının doldurulmasında kök kanal dolgu patınının doku sıvıları ile hidrolizi sonucu açığa çıkan toksik komponentlerin canlı hücreler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri, in vitro şartlarda patların akuöz çözeltilerinin alınması ile test edilmiştir. Günümüzde çeşitli içeriklerde kök kanal dolgu patları kullanılıyor olmakla birlikte, yapmış olduğumuz çalışmada, ZOE esaslı deney patı ile yine ZOE esaslı Roth kök kanal dolgu patını karşılaştırdık.

ZOE esaslı kök kanal dolgu patlarının toksisitesinin genellikle içeriğindeki öjenole bağlı olduğu düşünülmekle beraber, Fujisawa ve Masuhara⁸, ZOE simanlardan çinko iyonlarının da salındığını bildirmektedirler. Meryon ve ark.¹⁶, ZOE simanların sitotoksitesinin çinko iyonlarının muhtemel toksik etkilerine de bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Valle ve ark.²² tarafından yapılan bir çalışmada ZOE simanların preparasyonunda likit-toz oranının toksisite ile direkt olarak ilişkili olduğu ve yüksek oranda likidin bileşiği daha toksik hale getirdiği tespit edilmiştir.²² Patın toz kısmındaki çinko iyonlarının da toksik etkilere sahip olabileceği düşünülse de bu sonuç, öjenolün

içerikteki en toksik component olabileceğini düşünmektedir. Yaptığımız çalışmada deney patının içeriğindeki öjenol konsantrasyonunun Roth kök kanal dolgu patına oranla daha düşük olmasından dolayı deney patının daha az toksik etki gösterdiği kanısındayız.

Abou Hashieh ve ark.¹ ZOE esaslı bir kök kanal dolgu patını değerlendirdikleri in vitro çalışmada öjenolün apikal serbestleşmesinin zaman ile ters orantılı olduğunu tespit etmişler, 1 ay sonunda serbestleşen öjenol konsantrasyonunu ise sıfır bulmuşlardır. Maseki ve ark.¹⁴ da yaptıkları çalışmada öjenol serbestleşmesinde sıfır konsantrasyonuna ulaşılmıyorsa da, zamana bağlı olarak serbestleşen öjenol konsantrasyonunda bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Yine Becker ve ark.⁴ öjenolün ZOE karışımlarından fizyolojik salın solüsyonu içerisine serbestleştiğini ve bu serbestleşmenin zamana bağlı olarak azalma gösterdiğini bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda patın sertleşmesine bağlı olarak 24 saat ve 1 haftalık örneklerin karşılaştırmasında, öjenolün serbestleşme derecelerindeki değişikliğe bağlı olduğunu düşündüğümüz, toksik etkiler bakımından bir farklılık gözlemledik.

Ömürlü ve ark.²⁰, deney patının periapikal dokulardaki etkilerini inceledikleri histopatolojik çalışmalarında, deney patının Roth 801 kök kanal dolgu patına göre biyoyumluluğunun daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Görgül ve ark.¹⁰, Vero daimi hücre kültürü kullanarak deney patının toksisitesini Roth kök kanal dolgu patı ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, geliştirdiğimiz deney patının daha biyoyumlu bir materyal olduğu sonucuna varmışlardır. Bala ve ark.³ ise farklı kök kanal dolgu patlarının insan periodontal ligament fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksitesini değerlendirdikleri çalışmalarında; en az sitotoksik etkinin Ketac-Endo tarafından meydana getirildiğini, deney patı ve Sealapex 'in orta derecede, AH 26'nın ise şiddetli derecede toksik etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Literatürde kök kanal dolgu patlarının genotoksik etkilerini değerlendiren fazla sayıda çalışma olmamakla beraber, ökaryotik ve prokaryotik hücreler üzerinde yapılan sitotoksitesite ile genotoksitesinin birlikte değerlendirildiği bir çalışmada üç ZOE içeren kök kanal dolgu patının, ayrıca bir de formaldehit içe-

ren ZOE esaslı bir kök kanal dolgu patının in vitro olarak Ames testinde genotoksik bulunmadığı gösterilmiştir⁷. Bunun yanında diğer bir çalışmada paraformaldehit içeren ZOE esaslı başka bir kök kanal dolgu patının DNA sentez inhibisyon testi ve umu testinde genotoksik etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir¹¹. Ancak bu etkinin öjenole mi yoksa içeriğindeki bir başka komponente mi bağlı olduğu açıklanamamıştır.

Sonuç olarak; yeni geliştirdiğimiz deney patının sitotoksitesite ve genotoksitesinin Roth kök kanal dolgu patından daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun yeni geliştirdiğimiz deney patının içeriğindeki öjenol miktarının azaltılmasına ve patın sertleşme süresinin Roth kök kanal dolgu patına oranla çok daha kısa olmasına bağlı olduğu düşüncesindeyiz.

Ancak in vitro araştırma bulgularının, iyileşme ve savunma mekanizmalarının işler halde bulunduğu in vivo şartlar üzerinde tıpatıp uyum göstermeyeceği bilinmekle beraber bu tür laboratuvar sonuçlarından yola çıkarak bir genelleme yapabilmeyen imkansız olduğu açıktır. Ancak yine de böyle çalışmaların, kök kanal dolgu patlarının toksik potansiyelleri hakkında relatif bir fikir vereceğine inanmaktayız. Bunun yanında sitotoksitesite değerlendirmeleri ile birlikte genotoksitesite değerlendirmelerinin de yapılmasının, klinikte materyal seçimi konusunda hekim için daha doğru karar vermede yardımcı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- 1 Abou Hashieh I, Pommel L, Camps J Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol based sealers. J Endod 25:713-715,1999
- 2 Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spangberg LSW. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. J Endod 19:554-557,1993
- 3 Bala O, Gürkan I, Görgül G. Çeşitli kanal dolgu materyallerinin sitotoksitesilerinin değerlendirilmesi. AÜ Diş Hek Fak Derg 23:147,1996
- 4 Becker RM, Hume WR, Wolinsky LE. Release of eugenol from mixtures of zinc oxide and eugenol in vitro. J Pedodont 8:71-77,1983

- 5 Economides N, Pareskevi Kotsaki-Kovatski V, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. J Endod 21:122-127,1995
- 6 Eriksen HM, Orstavik D, Kerekes K. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three different root canal sealers. Endod Dent Traumatol 4:114-117,1988
- 7 Ersev H, Schmalz G, Bayırlı G, Shweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. J Endod 25:359-363,1999
- 8 Fujisawa S, Masuhara E. Binding of eugenol and O-ethoxy benzoic acid to bovine serum albumin. J Dent Res 60:860-864,1981
- 9 Gerosa R, Menegezzi G, Borin M, Cavalleri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. J Endod 21:446-448,1995
- 10 Görgül G, Alaçam T, Ömürlü H, Karaoğlu T, Burgu I. Yeni bir çinko oksit öjenol kanal patının sitotoksitesinin değerlendirilmesi. GÜ Diş Hek Fak Derg 13:1-6,1996
- 11 Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. Mutat Res 368:181-194,1996
- 12 Hume WR. Effect of eugenol of respiration and division in human pulp, mouse fibroblast and liver cells in vitro. J Dent Res 63:1262-1265,1984
- 13 Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. Scand J Dent Res 89:552-556,1981
- 14 Maseki T, Nakata K, Kohsaka T, Kobayashi F, Hirano S, Nakamura H. Lack of correlation between the amount of eugenol released from zinc oxide-eugenol sealer and cytotoxicity of the sealer. J Endod 17:76-79,1991
- 15 Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. J Endod 15:60-67,1989
- 16 Meryon SD, Johnson SG, Smith AJ. Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combinations. J Dent 16:66-70,1988
- 17 Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. J Endod 21:622-624,1995
- 18 Molnar EJ. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. J Dent Res 46:645-649,1967
- 19 Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto Y, Hirano S, Hayakawa S, Sakai K, Yip M. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. J Endod 12:156-160,1986
- 20 Ömürlü H, Alaçam T, Can HE, Can M, İde T, Görgül G. Yeni bir kök kanal dolgu patının deneysel rat periapikal lezyonları üzerindeki etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. T Klin Diş Hek Bil 5:37-41,1999
- 21 Philips RW. Skinner's science of dental materials. 8th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1982
- 22 Valle FG, Taintor JF, Marsh CL. The effect of varying liquid to powder ratio to zinc oxide and eugenol of rat pulpal respiration. J Endod 6:400-404,1980
- 23 Wönnberg A. Tissue compatibility of endodontic sealers. J Dent Res 68:1009,1989 (Abstrakt no 1142)

Yazışma Adresi

Doç. Dr. Hülya ERTEN CAN
Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Diş Hast. ve Ted. Anabilim Dalı
8. Cad. 06510 Emek/ANKARA
Tel : 0.312 212 62 20/216