

BAZI KANAL PATLARININ SİTOTOKSİSİTELERİNİN İNCELENMESİ

Nimet Gençoğlu* Ferda Kelağasıoğlu**

Yayın kuruluşuna teslim tarihi: 24.02.1994

Yayına kabul tarihi : 14.04.1994

ÖZET

Bu çalışmamızda değişik kanal patlarının (Sealapex, Grossman, Ketac-Endo, Diaket, CRCS ve AH26) KB hücreleri (epidermoid karsinom, insan) üzerindeki sitotoksik etkileri SRB testi ile incelenmiştir. Kanal patları imalatçının tarifine uygun olarak hazırlanmış ve toz veya krem kısım esas alındığında 25, 250 ve 2500µg/ml nihai konsantrasyonunda denenmiştir. Diaket haricindeki tüm patların etkisi doz düşürülünce azalmıştır. 2500 µg/ml konsantrasyonunda AH 26 %100, Grossman %95, CRCS %94, Sealapex %83, Diaket %73, ve Ketac Endo %23 oranında toksisite göstermiştir. Sonuç olarak, 2500µg/ml konsantrasyonunda en az toksik patın Ketac-Endo ve en fazla toksik patların AH26, CRCS ve Grossman olduğu görülmektedir. Diğer yandan, konsantrasyon 25µg/ml'a düşürüldüğü zaman Diaket ve Grossman en fazla sitotoksik bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Kanal patı, sitotoksisite.

GİRİŞ

Endodontide kullanılan kanal dolgu maddeleri periapikal doku ile yakın temasta bulunmalarından dolayı biyolojik uyum içinde olmaları ve aşırı doku reaksiyonu göstermemeleri gerekmektedir (9). Toksik ve doku nekrozuna neden olabilecek kanal dolgu maddeleri doku iyileşmesine engel olduğu gibi endodontik tedavinin de başarısını engeller.

Doku toksisitesi ile ilgili çalışmalar değişik yöntemler ile yapılabilmektedir. Bunlar arasında in vitro hücre kültürü sistemleri, materyalin hayvan ya da insan dişlerinde yol açtığı pulpa reaksiyonunun incelenmesi veya hayvanda subkütan veya intramuskülör implantasyon deneyleri sayılabilir (10, 16). Ancak günümüzde hücre kültürü çalışmaları giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bir materyalin sitotoksisitesi, hücre kültürü deneyleri ile organizmanın kompleks

INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY OF SOME ROOT CANAL SEALERS

ABSTRACT

Cytotoxicity of various root canal sealers (Sealapex, Grossman, Ketac-Endo, Diaket, CRCS ve AH26) in KB cell line (human epidermoid carcinoma) was investigated by sulforhodamine B test. Root canal sealers were prepared according to the instructions of the manufacturer and tested at final concentrations of 25, 250 ve 2500µg/ml with respect to powder or creme part. All the root canal sealers other than Diaket inhibited the growth of KB cells in a dose-depent manner. At 2500µg/ml, AH 26, Grosman, CRCS, Sealapex, Diaket ve Ketac Endo inhibited the growth by 100%, 95%, 94%, 83%, 73% and 23%, respectively. Conclusively, Ketac Endo was found to be the least toxic root canal sealer, whereas CRCS, AH26 and Grossman seem the most toxic sealers at 2500µg/ml. On the other hand, Diaket and Grossman were the most cytotoxic sealers at 25µg/ml.

Key words: Root canal sealers, cytotoxicity.

etkisi olmaksızın saptanabilmekte ve sonuçların değerlendirilmesi kalitatif ve kantitatif olarak yapılabilmektedir (23). Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksisitesi hücre sayımı, DNA analizi ya da laktat oluşumuna dayanarak hücre büyümesinin, koloni oluşumuna dayanarak mitotik aktivitenin, oksijen alımındaki veya glukoz metabolizmasındaki değişimin, 51 Cr salınımı veya boya maddesi alımına dayanarak membran bütünlüğündeki değişimlerin ve histokimyasal çalışmalarla mitokondrial enzim fonksiyonunun ölçümü gibi kriterlerle belirlenmektedir (1, 2, 7, 11-15, 18, 22).

Hücre kültürü çalışmalarında genellikle iki tip hücre kullanılır. Bunlardan ilki devamlı hücrelerdir. Bu hücreler uzun süre devamlı olarak üretilebilen dondurulup saklanabilen ve istenildiğinde eritilip tekrar üretilen heteroploid hücrelerdir. İkinci tip hü-

* Dr. M. Ü. Diş Hek. Fak. Diş Hast. ve Ted. Anabilim Dalı

** Uz. Dr. İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

reler ise organa özgü olan hücrelerdir. Bunlar kendi aralarında primer hücreler ve organa özgü hücre tipi olan diploid hücre dizisi adı altında iki gruba ayrılırlar. Primer hücre kültürleri, hücrenin in vitro ortamda bulunduğu ilk durumdur. Diploid hücre dizisi ise bir defadan daha fazla subkültürleri alınmış ancak orjinal dokudaki karyotiplerini kaybetmemiş hücrelerdir (3, 4).

Endodontide bugüne kadar pek çok kanal patı denemesine rağmen ideal bir pat bulunamamıştır. Son yıllarda cam iyonomer (Ketac-Endo) kanal patı piyasaya sürülmüş ve dentin duvarlarına çok iyi adapte olduğu belirtilmiştir (17). Ancak cam iyonomer simanların yapısındaki polikarbonik asidin canlı dokular üzerindeki etkisi tartışmalıdır (8).

Bu amaçla endodontide yaygın olarak kullanılan kanal patlarının yanısıra cam iyonomer patı olan Ketac Endo'nun da sitotoksitesitelerinin araştırılması planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda devamlı bir hücre soyu olan KB hücre soyu (epidermoid karsinom, insan) kullanılmıştır. KB hücreleri %10 (h/h) oranında (56° C'da 40 dakika süreyle inaktive edilmiş) fetal dana serumu, L-glutamin (2mM/L), penisilin (100 U/ml) ve streptomisin (100µg/ml) içeren minimum essential medium (MEM)'de, 250 ml.lik kültür şişeleri (Greiner) içinde, %5 O₂/%95 CO₂ li ve nemli bir ortamda üretilmişlerdir.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Plastik zemine yapışarak tek tabaka halinde çoğalan KB hücreleri tripsin yardımıyla yapıştıkları zeminden kaldırılmıştır. 45.000 hücre/ml olacak şekilde bir hücre suspansiyonu hazırlanmıştır. Bu suspansiyondan 24 kuyuluk plakaların her kuyusuna birer ml eklenmiştir. Bu arada steril şartlarda firmaların belirttiği şekilde hazırlanan Sealapex¹, Grossman patı², Ketac Endo³, Diaket⁴, CRCS⁵ ve AH26⁶ kanal patları dimetil sülfoksitde (DMSO) çözülmüş ve nihai konsantrasyon toz veya krem kısım esas alındığında 25,

250 ve 2500 µg/ml olacak şekilde her kuyuya toplam 10µl hacim içinde eklenmiştir. Her kontrol kuyusuna 10µl DMSO eklenmiştir. 24 saat sonra sülforhodamin B (SRB) testi ile hücre sağkalım oranı belirlenmiştir (19).

SRB TESTİ

24 kuyuluk plakaların her kuyusuna 200µl %50'lik trikloroasetik asid eklenmiş, plaklar 4°C'da bir saat bekletildikten sonra musluk suyu ile 5 kez yıkanmış ve havada kurutulmuştur. %0.4'lük SRB ile 40 dakika boyanmış ve bu süre sonunda bağlanmamış boya %1'lik asetik asid ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bağlanmış boya tris bazında çözülmüş ve 564 nm. deki abzorbanans kaydedilmiştir. Sağkalım oranı, test/kontrol abzorbanansın % si olarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Elde edilen değerler I.Tablo'da verilmiştir. 2500µg/ml konsantrasyonunda Sealapex %83, Grossman %95, Ketac-Endo %23, Diaket %73, CRCS %94 ve AH26 %100 oranında KB hücre proliferasyonunu inhibisyona uğratmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyonun ardından 2500 µg/ml konsantrasyonunda AH26, Grossman patı ve CRCS en fazla sitotoksitesite gösterirken, bunları Sealapex ve Diaket izlemiş ve Ketac Endo en az sitotoksik bulunmuştur.

Bütün örneklerde Diaket haricinde doza bağımlı bir etki saptanmıştır. Doz düşürüldükçe etki de azalmıştır.

Tablo I. KB hücrelerinde kanal dolgu materyelleri ile değişik konsantrasyonlarda 24 saatlik inkübasyonu takiben saptanan sağ kalım oranları. Sağ kalım test/kontrol abzorbanans %'si olarak ifade edilmiştir. Her değer en az üç deneyin ortalaması ± standart sapmasını göstermektedir.

PAT	2500 µg/ml	250 µg/ml	25 µg/ml
Sealapex	17.28 ± 0.92	40.25 ± 11.34	53.69 ± 2.53
Grossman	5.44 ± 3.08	29.66 ± 4.12	36.87 ± 3.69
Ketac-endo	77.73 ± 7.49	108.95 ± 4.31	105.56 ± 6.09
Diaket	27.06 ± 2.93	37.47 ± 6.17	26.28 ± 8.70
CRCS	5.97 ± 3.91	38.79 ± 5.81	89.90 ± 8.10
AH 26	0	15.12 ± 0.03	70.80 ± 7.40

(1) Sealapex, Kerr, Romulus, MI, USA

(2) Grossman, Sultan Co, Englewood, NJ, USA

(3) Ketac-Endo, Espe, Seefeld, Germany

(4) Diaket, Espe, Germany

(5) CRCS, Hygenic Corp, Akron, OH, USA

(6) AH 26, De Trey, Densply, AG, Zurich

TARTIŞMA

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, Ketac-Endo en az, Grossman patı, CRCS ve AH26 en fazla sitotoksik bulunmuştur. Bütün örneklerde Diaket haricinde konsantrasyon yükseltildikçe sitotoksite artmıştır.

Grossman'a göre ideal kanal dolgu maddesinin sitotoksitesinin düşük olması gerekmektedir (9). En fazla toksik bulunan kanal dolgu maddelerinden AH26 daki epoksi resin simanı ve Grossman patındaki öjenol, sitotoksiteden sorumlu olabilir. Çalışmamızdan elde edilen bu bulgular Sonat ve ark (20) ve Nakamura ve ark (14)'ün sonuçları ile uyumludur. Dörter (8) çalışmasında cam iyonmer simanları ile beraber Ketac-Endo'nun sitotoksitesini nemli ve kuru olmak üzere iki farklı ortamda incelemiştir. Dörter Ketac-Endo'yu 24 saatlik inkübasyonun ardından sitotoksik bulunurken, sitotoksitesinin ancak 168 saat sonra yapılan incelemede anlamlı olarak azaldığını saptamıştır. Sonat ve ark. çalışmalarında CRCS, Sealapex, N2, Endomethasone, Diaket, Tubiseal, AH26 kanal patlarının sitotoksitelerini incelemişler, N2 ve AH26'da en fazla sitotoksiteye rastlamışlardır (20). Nakamura ve ark. hücre kültürü çalışmalarında AH26'nın 7 gün sonra bile şiddetli toksite gösterdiğini belirtmişlerdir (14).

Briseno ve Willerhausen (1991) hücre kültürü çalışmalarında AH26, Diaket ve Lee Endo Fill kanal dolgu patlarının sitotoksitelerini araştırmışlar ve AH26 ve Diaket'i 24 saatlik sürenin sonunda güçlü sitotoksik bulmuşlardır (6). 1990 yılında yaptıkları çalışmada ise çinko oksid esaslı kanal patlarının hücre

kültürü ile sitotoksitelerini incelediklerinde, 24 saat sonunda orta şiddette sitotoksiteye rastlamışlardır (5). Bu çalışmanın bulguları da çalışmamızın sonuçlarına uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda kanal dolgu patlarının sitotoksik etkileri ilk kez SRB testi ile ve konsantrasyon-cevap ilişkisi açısından incelenmiştir. I. Tablo'da görüldüğü gibi Diaket dışındaki tüm test maddelerinin etkisi doz düşürüldükçe azalmaktadır.

Klinikte de kullanılacak kanal patı, radyografik görüntüde taşkın olmasa bile preapikal doku ile temasta olacaktır. Bu nedenle en az sitotoksite gösteren kanal patı preapikal dokuda en az iltihabi reaksiyon gösterecek kanal patıdır. Bu yüzden klinikte en az irrite edici kanal patı tercih edilmelidir.

Spanberg ve Pascom yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında kanal patının içeriğindeki maddelerin miktarı ile sitotoksitesinin değişebileceğini vurgulamışlar ve bu çeşit sitotoksite çalışmalarında oranların standardizasyonunun yanısıra diğer faktörlerin de önemli rol oynadıklarını savunmuşlardır (21). Klinik kullanımda her zaman aynı dozda toz ve likid karıştırılması imkansızdır. Dolayısıyla içeriğinde en az sitotoksite gösteren kanal patı tercih edilmelidir.

Periapikal dokunun dinamik doğasının yapısının in vitro şartlara uyarlanması oldukça zordur. Ancak günümüzde yaygın olarak kullanılan hücre kültüründen elde edilen sonuçlardan değişik kanal dolgu patlarının toksiteleri hakkında bir fikir edinilebilir.

KAYNAKLAR

1. Al-Nazhan S, Spanberg LSW. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblast and L-929 cells. *J Endodon* 1990; **16**: 129-35.

2. Antrim DD. Evaluation of cytotoxicity of root canal sealing agents on tissue culture cell in vitro: Grossman's sealer, N (permanent) Ricert's sealer and Cavit. *J Endodon* 1976; **2**: 111-6.

3. Brauner A, Auguthun M, Kaden P. Die Zellkultur als System zur Prüfung Zell Wachstumsbeeinflussender Wirkungen in der biologischen Materialtestung. *Z Zahnarz. Implantol* 1984; **4**: 223-7.

4. Brauner A, Auguthun M, Kaden P. Die Zellkultur humaner Gingivafibroblasten zur biologischen Prüfung von in der mundhöhle verwendeten Materialien. *Z Stomatol* 1989; **86**: 533-8.

5. Briseno BM, Willerhausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: I. Zinc oxide eugenol-based sealers. *J Endodon* 1990; **16**: 383-6.

6. Briseno BM, Willerhausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. Silicon and resin-based sealers. *J Endodon* 1991; **17**: 537-40.

7. Craig RG. Restorative dental materials 8 th ed. St. Louis, CV/Mosby Co 1989.

8. Dörter (Aslan) F. Cam iyonmer sistemlerinin in vitro sitotoksitelerinin karşılaştırmalı incelemesi-Doktora tezi: İstanbul, 1993.

9. Grossman LI. Endodontic Practice, 10 th ed. Philadelphia: Lea and Febriger, 1981.

10. Költzer WT. Oral mucosa usage tests. *J Endodon* 1978; **4**: 312-5.

11. Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture *J Endodon* 1989; **15**: 60-7.
12. Meryon SD, Brook AM. In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int Endodon J* 1990; **23**: 203-10.
13. Mohammad AR, Mincer HH, Youinis O, Dillingham E, Siskin M. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; **45**: 768-73.
14. Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto N, Hirano S, Hayakawa H, Sakai K, Yipi M. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endodon* 1986; **12**: 156-160.
15. Pascon EA, Spanberg LSW. In vitro cytotoxicity of root canal sealing materials.1.Gutta-percha. *J Endodon* 1990; **16**: 429-32.
16. Paterson RC, Watts A. Toxicity to the pulp of a glass ionomer cement. *Br Dent J* 1987; **162**: 110-2.
17. Ray H, Seltzer S. A new glass ionomer root canal sealer *J Endodon* 1991; **17**: 598-603.
18. Safavi KE, Spanberg LSW, Costa NS, Sappounas G. An in vitro method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. *J Endodon* 1989; **15**: 484-6.
19. Skehan P, Storeng R, Scuderio D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JL, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. A new colorimetric assay for anticancer drug screening. *JNCI* 1990; **82**: 1107-12.
20. Sonat B, Dalat D, Burgu İ, Özkul A. Kanal dolgu maddelerinin toksisite potansiyellerinin HeLa hücre kültürleri üzerinde değerlendirilmesi *AÜ Diş Hek Fak Der Nisan* 1992; **19**: 35-42.
21. Spanberg L, Pascon E. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during in vitro evaluation of biomaterials. *J Endodon* 1988; **14**: 247-50.
22. Tyas MJ. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Rest* 1977; **56**: 1285-89.
23. Welker D, Neupert G, Oehring H. Aspekte der Toxizitätsprüfung stomatologischer Werkstoffe. *Zahn Mund Kieferheilkd* 1986; **74**: 699-705.

Yazışma adresi

Dr. Nimet Gençoğlu
M.Ü. Diş Hek. Fakültesi
Büyükkıftlık Sok. No: 6
80200 Nişantaşı-İST