

İki farklı rezin modifiye cam iyonomer simanın bölgesel toksisitesinin değerlendirilmesi

Türkay Kölüş((0000-0002-0840-7126)^α, Hayriye Esra Ülker (0000-0002-2967-5680)^β

Selcuk Dent J, 2020; 7: 413-421 (Doi: 10.15311/selcukdentj. 676906)

Başvuru Tarihi: 18 Ocak 2020
Yayına Kabul Tarihi: 04 Mayıs 2020

ÖZ

İki farklı rezin modifiye cam iyonomer simanın bölgesel toksisitesinin değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı iki farklı rezin modifiye cam iyonomer simanın bölgesel toksisitesini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntemler: Fuji II LC Capsule (GC) ve Vitrebond (3M ESPE) örnekleri üreticilerinin talimatlarına göre standart teflon disklerde hazırlandı. Örnekler, örnek/solüsyon hacmi 91,6mm²/ml olacak şekilde 24 saat kültür ortamında bekletildi. L929 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına alındı ve 24 saat 37°C'de %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kültür ortamında bekletildi. Elde edilen materyallerin seyreltilmemiş ekstraktı ve 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranında seyreltilmiş olan ekstraktları hücrelere uygulandı. Hücre canlılığı 24. saatin sonunda XTT (2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolyum) testi ile belirlendi. Kontrol grubunun canlılığı %100 olacak şekilde kabul edildi ve tüm grupların canlılık yüzdesi buna göre belirlendi (n=27). İstatistiksel değerlendirmeler için one way ANOVA ve post hoc Tukey's HSD testleri kullanıldı. Her bir materyalin L929 hücrelerinin canlılıklarına ve proliferasyonlarına nasıl etki ettiği gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi ile 15 dakikada bir empedans ölçümü alınarak izlendi. Elde edilen verilerin analizi RTCA Software 2.0 programı ile gerçekleştirildi, istatistiksel olarak hiyerarşik kümeleme analizi yapıldı.

Bulgular: XTT deneyi sonucunda Fuji II LC'nin seyreltilmemiş konsantrasyonu, Vitrebond'un ise seyreltilmemiş, 1/2 ve 1/4 oranında seyreltilmiş konsantrasyonlarının L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğu izlendi (p<0,05). Gerçek zamanlı hücre analiz deneyi sonuçlarına göre Fuji II LC Capsule'ün seyreltilmemiş konsantrasyon grubunda, Vitrebond'un ise seyreltilmemiş, 1/2, 1/4 ve 1/8 konsantrasyon gruplarında hücre canlılığının 144. saat sonunda tamamen kaybolduğu görülmüştür.

Sonuç: Resin modifiye cam iyonomer simanların biyolojik olarak aktif içerikleri pulpa hücrelerinin metabolizmasını değiştirebilecek sitotoksik potansiyele sahip olabilir. Bu nedenle özellikle derin kaviteelerde materyal seçimine dikkat edilmelidir.

ANAHTAR KELİMELELER

Biyouyumluluk, sitotoksosite, XTT testi, rezin modifiye cam iyonomer simanlar

ABSTRACT

Evaluation of regional toxicity of two different resin modified glass ionomer cement

Background: The aim of this study was to evaluate the regional toxicity of two different resin modified glass ionomer cement.

Methods: Fuji II LC Capsule (GC) and Vitrebond (3M ESPE) material specimens were prepared according to manufacturers' instructions with using standard teflon matrix (2x5mm). Samples were kept in culture medium for 24 hours with a sample surface area/solution volume ratio of 91.6 mm²/ ml. L929 cells were taken into 96-well plates and incubated for 24 hours at 37°C in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) culture medium with containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The acquired material undiluted extract and 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 of the diluted extracts were applied to the cells. In the control group, only serum-containing culture medium was added to the cells. Cell viability determined by XTT (2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium) test at the end of 24 hours. The viability of the control group was accepted to be 100% and the viability of all other groups was determined accordingly. ANOVA and post hoc Tukey's HSD tests were used for statistical evaluations. The effect of each material on the viability and proliferation of L929 cells was monitored by real-time cell analysis method by taking impedance measurement every 15 minutes. The analysis of the obtained data was performed by RTCA Software 2.0 program, thereafter statistically analyzed by hierarchical clustering method.

Results: XTT test showed that undiluted concentration of Fuji II LC and Vitrebond's undiluted, 1/2 and 1/4 diluted concentrations had cytotoxic effects on L929 fibroblast cells (p <0.05). In real time cell analysis Fuji II LC Capsule's undiluted concentration group and Vitrebond's undiluted, 1/2, 1/4, 1/8 concentration groups cell viability completely disappeared after 144 hours.

Conclusion: Biologically active ingredients of resin modified glass ionomer cements may have cytotoxic potential that may alter the metabolism of pulp cells. Therefore, especially in deep cavities material selection should be careful.

KEYWORDS

Biocompatibility, cytotoxicity, XTT assay, resin modified glass ionomer cements

^α Sütçü İmam Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş

^β Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Konya

Bireylerin yaşamları boyunca karşı karşıya kaldıkları, dünya genelinde insanlarda en sık görülen kronik hastalıklardan biri de diş çürüğüdür.¹ Çürüten dişlerin tedavisinde kullanılan pek çok materyal vardır. Bu materyaller her ne kadar ilgili dişin sağlığını geri kazanmasına yardımcı olsa da vücut dokularında istenmeyen etkiler oluşturabilme özelliklerine sahiptir. Genel olarak hekimliğin temel ilkelerinden biri olarak kabul edilen “Önce zarar verme” ilkesi gereği herhangi bir olguda kullanılması söz konusu materyalin vücutta istenmeyen bir etki oluşturmaması ya da en azından faydalarının zararlarından fazla olması gerekir.²

Biyouyumluluk, bir biyomateryalin tıbbi tedaviye göre istenen işlevini yerine getirme yeteneğini ifade eder. Bu işlevler; istenmeyen herhangi bir lokal veya sistemik etkinin oluşturulmaması, faydalı olan en uygun hücresel veya doku yanıtının üretilmesi, tedavinin klinik olarak performansının optimize edilmesidir.³ Diş hekimliğinde kullanılan restoratif materyaller, biyomateryaller sınıfında yer alır. Biyomateryallerin korozyona uğraması ve çözünmesiyle ortama bileşenleri salınabilir ve bu bileşenler insan vücudunda toksik etki gösterebilir. Dental materyallerden salınan bileşenler çok düşük düzeyde olmasından ve bu bileşenlerin LD₅₀ (Ortalama öldürücü doz) değerlerinin çok yüksek olmamasından dolayı dental materyallerin genel olarak sistemik akut toksik etki oluşturması beklenmez.⁴ Bunun yanında dental materyaller ağız ortamında uzun süre kullanımda kalırlar ve bileşenlerini uzun bir dönem boyunca salabilirler. Bu bileşenlerin kronik sistemik toksisite oluşturma potansiyeli ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Amalgamdan salınan cıvanın MS (multiple sclerosis)⁵, kompozitten salınan BPA (Bisfenol A)'nın tiroit bozuklukları⁶, cam iyonomer simanlardan salınan alüminyumun Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabileceği yönünde çalışmalar⁷ olduğu gibi bu salınan bileşenlerin herhangi kronik hastalıkla bağı olmadığına yönelik çalışmalar^{8,10} da vardır. Gelişmiş varlıklarda bölgesel etkileşimler, sistemik toksisiteden farklılık gösterir, dental materyallerden salınan maddeler bölgesel olarak pulpa, diş eti, alveol kemiği ve oral mukoza ile etkileşime girebilmektedirler. Bu etkileşimlerin sonucunda hücre metabolizması değişiklik gösterip enflamatuar mediatörler salabilir ya da hücrenin hasar alması durumunda apoptoz (kontrollü hücre ölümü) ya da nekroz gerçekleşebilmektedir.¹¹ Tüm bu olası olumsuz etkilerinden dolayı insan vücudunda kullanılan tüm biyomateryallerde olduğu gibi restoratif materyallerin de biyouyumluluğu oldukça önemlidir.¹²

Tekniğin ve teknolojinin sürekli ilerlemesiyle amalgam ve resin kompozitlere alternatif olarak kullanılan birçok restoratif materyal geliştirilmiştir, resin modifiye cam iyonomer simanlar da bunlardan biridir. Çalışmamızda, ışıkla sertleşen iki farklı resin modifiye cam iyonomer siman olan Fuji II LC Capsule (GC) ve Vitrebond'un (3M ESPE) bölgesel toksisitesi *in vitro* olarak tetrazolyum

indirgenme testi olan XTT testi ve gerçek zamanlı hücre analizi yöntemleri ile değerlendirilecektir. Bu çalışmadaki sıfır hipotezimiz şudur; resin modifiye cam iyonomer simanların L929 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkileri yoktur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada resin modifiye cam iyonomer olan Fuji II ile Vitrebond' un sitotoksik etkileri XTT [2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -2H-tetrazolium] ve gerçek zamanlı hücre analizi yöntemleri ile incelenmiştir.

Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

L929 hücreleri %10 FBS (heat inactivated, non-USA origin, sterile-filtered, Sigma Aldrich) ve %1 penisilin/streptomisin (Biochrom) içeren Dulbecco modifiye Eagle's medyum (Biochrom) kültür ortamında 37°C'de ve %5'lik CO₂ içeren nemli havada kültüre edildi. Deneyler için %75-80 doluluk oranına ulaşmış ekspanansiyel büyüme fazındaki L929 hücreleri kullanıldı.

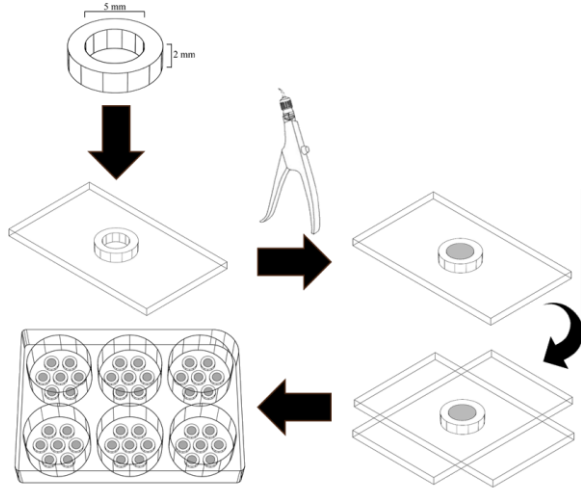
Test Materyallerinin Hazırlanması

Tablo 1.

Çalışmada test edilen restoratif materyaller, üreticileri ve endikasyonları

Restoratif Materyal ve Üreticisi	Materyal Türü	Endikasyonları (Üreticilerin önerilerine göre)
Fuji II LC Capsule (GC)	Resin modifiye cam iyonomer	Sınıf III, V ve sınırlı sınıf I kaviteilerin restorasyonunda
		Süt dişlerinin restorasyonunda
		Kor yapımında
		Radyoopak restorasyon gerektiğinde
		Geriatrik uygulamalarda
		Kaide veya astar olarak
Vitrebond (3M ESPE)	Resin modifiye cam iyonomer	Amalgam restorasyonların altında
		Sınıf I ve II kompozit restorasyonların altında
		Pulpanın açılmadığı durumlarda kalsiyum hidroksite alternatif olarak
		Kavite verniği olarak
		Yüksek çürük eğilimi olan hastalarda
		Belirgin kötü ağız sağlığı olan durumlarda

Araştırmada değerlendirilmek üzere resin modifiye cam iyonomer simanlar, laboratuvarında güvenlik kabini içerisinde üreticilerinin önerdiği talimatlar doğrultusunda hazırlandı (NuAire LabGard ESNU-425 Sınıf II Tip A2 Biyogüvenlik Kabini). Hazırlanan materyallerin sertleşmeden önce boyutlarını standardize etmek için cam üzerinde yer alan yüksekliği 2 mm, iç çapı 5 mm olan steril teflon diskler içerisine aktarıldı. Teflon disklerin üst kısmı da başka bir cam ile kapatılarak iki tarafta da düzgün bir yüzey oluşması sağlandı. Örnekler, primer sertleşmeleri sağlandıktan sonra 6 kuyucuklu hücre kültür kabına aktarıldı.

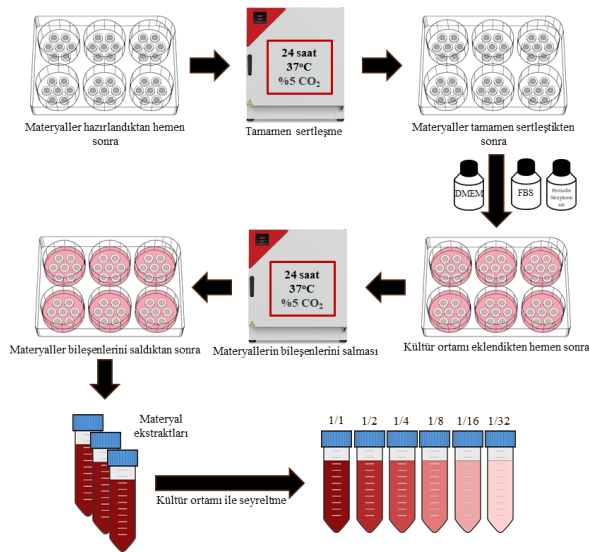


Resim 1

Materyal örneklerinin hazırlanmasının şematizasyonu.

Materyal Ekstraktlarının Hazırlanması

Materyal ekstraktlarını elde etmek üzere 6 kuyucuklu hücre kültür kabının her kuyucuğuna her bir gruptan 7'şer örnek hazırlanarak yerleştirildi. Örneklerinin tam olarak sertleşmesini sağlamak için 24 saat 37°C bekletildi. Kuyucuklara 3 ml kültür ortamı (%10 FBS, penisilin/streptomisin içeren DMEM) eklenerek ISO standartlarına göre materyal yüzey alanı-kültür ortamı hacmi oranının 91,6 mm²/ml olması sağlandı. Ekstraktlar kültür ortamıyla dilüe edilerek 15 mililitrelik falkon tüplerinde orijinal konsantrasyonun yanısıra 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 konsantrasyonlarında da seyreltileri hazırlandı.

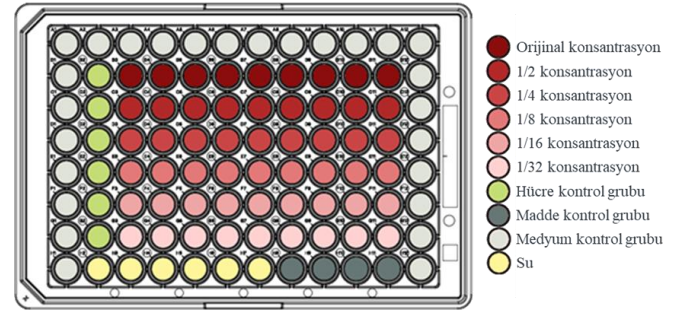


Resim 2

Materyal ekstraktlarının elde edilmesi ve seyreltilmesi.

XTT Deneyinin Uygulanması

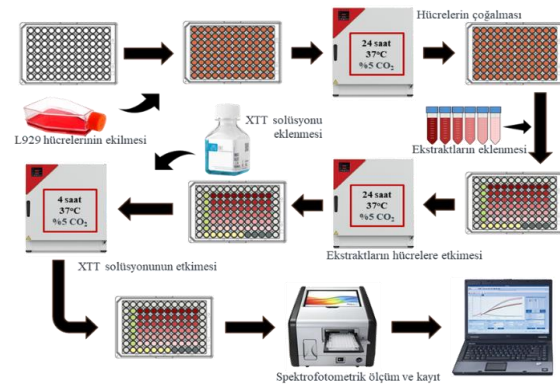
XTT deneyi için 96 kuyucuklu hücre kültür kabının (Greiner Bio-One) ekstrakt eklenecek kuyucukları ile hücre kontrol grubunun bulunacağı kuyucuklara 10⁴ yoğunlukta olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Resim 3'de gösterildiği üzere her bir materyalin her bir konsantrasyona 96 kuyucuklu hücre kültür kabında 9 kuyucuk ayrıldı. Hücre kontrol grubu için ise 6 kuyucuk ayrıldı.



Resim 3

96 kuyucuklu hücre kültür kabı planı.

Ayrılan kuyucuklara daha önceden elde edilmiş materyal ekstraktlarının 100 µl'lik farklı dilüsyonları eklendi. Hücre kontrol grubuna ise sadece kültür ortamı eklendi. Ekstrakt eklenmiş hücre kültür kapları 37°C'de 24 saat boyunca inkübatörde bekletilerek ekstraktların hücrelere etki etmesi sağlandı. İnkübasyondan sonra hücrelerin canlılığını değerlendirmek üzere her bir 96 kuyucuklu hücre kültür kabı için 5 ml XTT solüsyonuna 0,1 ml aktivatör [Cell Proliferation Kit (XTT based), Biological Industries] eklenmesiyle belirteç çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan belirteç çözeltisinden hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 0,05 ml eklendi ve belirtecin etki etmesi için hücre kültür kapları 4 saat boyunca inkübatörde 37°C'de bekletildi. Renk değişimi gözlemlendi. Spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments) cihazıyla hücre kültür kaplarında 460 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.



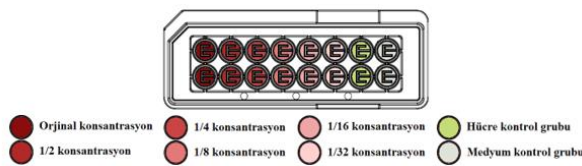
Resim 4

XTT deneyinin şematizasyonu

Her bir hücre kültür kabı ayrı ayrı değerlendirilerek her bir kuyucuk için sayısal veriler elde edildi ve bu veriler dijital ortamda kaydedildi. Deney 3 kez tekrarlanarak her bir materyalin her bir konsantrasyonu için 9 kuyucuk kullanıldı (n=27)

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Deneyin Uygulanması

Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde deneyin uygulanması için hücre ekimi öncesi her bir elektronik hücre kültür kabı (E-plate 16, ACEA Biosciences) kuyucuğuna önceden ısıtılmış 50 µl DMEM besiyeri eklendi ve elektronik hücre kültür kapları güvenlik kabini içerisinde 30 dakika bekletildi. 30 dakikanın sonunda elektronik hücre kültür kapları gerçek zamanlı hücre analiz istasyonuna (xCELLigence RTCA DP, ACEA Biosciences) yerleştirilerek arka plan okuması yapıldı. Ardından hücre pasajlaması ve sayımı yapılarak 10⁴ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Medyum kontrol ve madde kontrol kuyucukları hariç diğer kuyulara 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. Hücrelerin kuyu tabanına sağlıklı bir şekilde yapışabilmeleri için elektronik hücre kültür kapları güvenlik kabin içinde 30-60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra plaklar gerçek zamanlı hücre analiz istasyonuna yerleştirilerek saatte bir empedans ölçümü alındı. Yaklaşık 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li ve %95 nemlendirilmiş gerçek zamanlı hücre analiz istasyonun içinde hücreler plak tabanlarına yapıştı ve prolifer oldu. Ardından daha önce hazırlanmış materyal ekstraktları eklenmek üzere elektronik hücre kültür kapları gerçek zamanlı hücre analiz istasyonundan çıkarıldı.

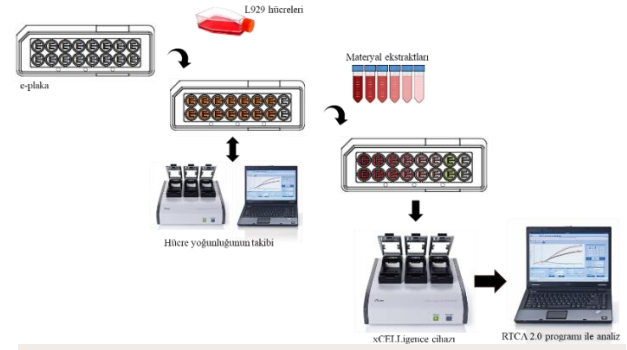


Resim 5

Gerçek zamanlı hücre analizinde kullanılan 16 kuyucuklu elektronik hücre kültür kabının planı

Hücreler ekstraktlar ile muamele edilmeden önce kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi. Medyum ve hücre kontrol kuyularına 150 µl FBS içermeyen DMEM eklendi. Madde kontrol kuyucuklarına 150 µl maksimum doz materyal süspansiyonu, diğer kuyucuklara ise belirlenen konsantrasyonlarda 150 µl hacimde solüsyon eklendi. Her bir doz iki tekrarlı çalışıldı. Madde ekleme işlemi tamamlandıktan sonra elektronik hücre kültür kapları tekrar gerçek zamanlı hücre analiz istasyonuna konuldu ve yaklaşık 144 saat boyunca her 15 dakikada bir

ölçüm alınacak şekilde cihaz programlandı. Kuyucuklardan elde edilen CI (Cell index, hücre endeksi) verileri RTCA 2.0 (ACEA Biosciences) programı ile analiz edildi. Kuyucuklar arası daha standart veriler elde etmek üzere üretici talimatları doğrultusunda RTCA 2.0 programında kuyucukların ekstrakt eklenmeden hemen önceki hücre endeksi değerleri 1 değerine eşitlenerek normalize hücre endeksi değerleri elde edildi.



Resim 6

Gerçek zamanlı hücre analizinin şematizasyonu

İstatistiksel Analiz

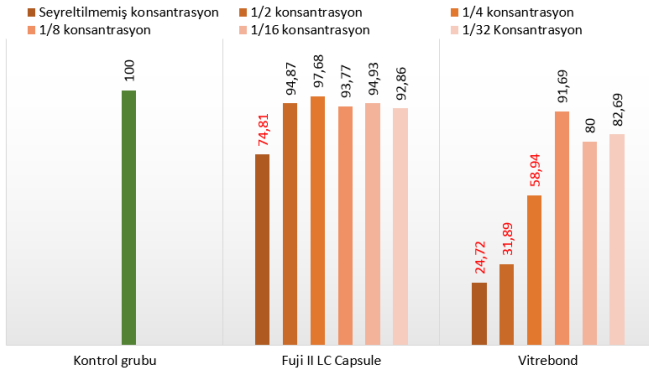
XTT deneyi neticesinde spektrofotometre cihazından alınan sonuçlar Microsoft Office Excel 2016 (versiyon 16.0.4639.1000, 64 bit sürüm) programına kaydedildi. Pozitif kontrol grubunun canlılık yüzdesi %100 olarak kabul edildi ve diğer grupların canlılıkları, kontrol grubunun canlılığına göre yüzdesel olarak oranlandı. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics (versiyon 25, 64 bit sürüm) programı kullanıldı. Shapiro-Wilk testi ile verilerin homojenitesi değerlendirildi. Deney grupları ile kontrol grubu canlılık yüzdesi arasındaki farklar One-way ANOVA ve post hoc Tukey's HSD testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen verilere göre elde edilen zamana bağlı hücre canlılığı grafiklerinin istatistiksel değerlendirilmesi hiyerarşik kümeleme analizi yapıldı. Hiyerarşik kümeleme analizi için IBM SPSS Statistics programında z skoru ile standardize edilmiş Öklid uzaklığı algoritması ile gruplar arası ortalama bağlantı kümeleme yöntemi kullanıldı.

BULGULAR

XTT Deneyi Bulguları

XTT deneyi sonuçlarına göre materyal ekstraktlarının, konsantrasyonlarına göre değişimle birlikte L929 hücrelerinin canlılığını etkilediği gözlemlendi. Elde edilen bulgulara göre verileriyle hazırlanan grafik aşağıdadır.



Resim 7

Farklı konsantrasyonlardaki alternatif dolgu materyalleri uygulanan L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. Kırmızı renk sitotoksik konsantrasyonları belirtir.

Fuji II LC Capsule ekstraktlarının L929 hücre kültürlerine eklendikten 1 gün sonra kültürlerdeki hücre canlılıklarının kontrol grubuna göre;

Seyreltilmemiş ekstrakt eklenen grupta %74,81 ($\pm 6,37$)

- 1/2 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %94,87 ($\pm 4,18$)
- 1/4 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %97,68 ($\pm 3,06$)
- 1/8 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %93,77 ($\pm 2,61$)
- 1/16 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %94,93 ($\pm 3,84$)
- 1/32 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %92,86 ($\pm 2,68$) oranında olduğu bulundu.

İstatistiksel değerlendirme sonucu sadece seyreltilmemiş ekstraktın oluşturduğu farkın anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,05$).

Vitrebond ekstraktlarının L929 hücre kültürlerine eklendikten 1 gün sonra kültürlerdeki hücre canlılıklarının kontrol grubuna göre;

Seyreltilmemiş ekstrakt eklenen grupta %24,72 ($\pm 0,76$)

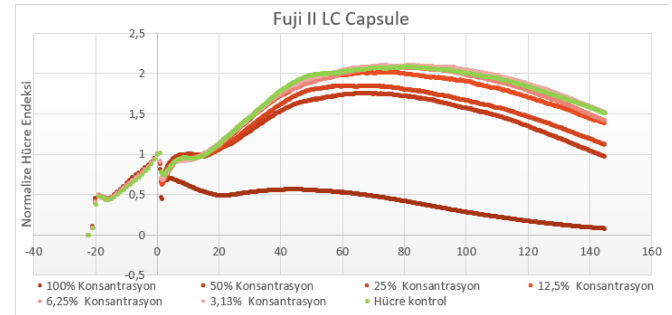
- 1/2 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %31,89 ($\pm 1,06$)
- 1/4 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %58,94 ($\pm 5,01$)
- 1/8 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %91,69 ($\pm 3,06$)
- 1/16 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %80 ($\pm 5,21$)
- 1/32 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupta %82,69 ($\pm 4,12$) oranında olduğu bulundu.

İstatistiksel değerlendirme sonucu seyreltilmemiş ekstrakt ile birlikte 1/2 ve 1/4 konsantrasyonda ekstrakt eklenen grupların oluşturduğu farkın anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,05$).

Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları

Gerçek zamanlı hücre analiz deneyi sonuçlarına göre materyal ekstraktlarının, konsantrasyonlarına göre değişmekle birlikte L929 hücrelerinin canlılığını etkilediği gözlemlendi.

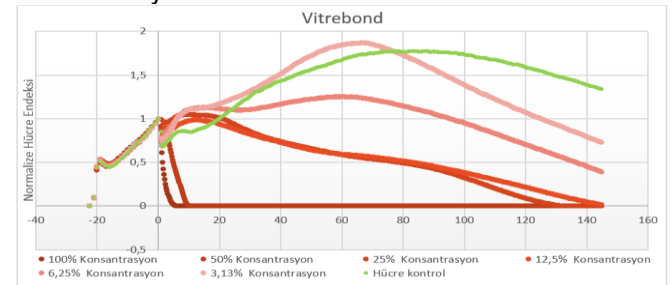
Fuji II LC Capsule'ün kontrol grubu ile 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 konsantrasyonda ekstrakt eklenen gruplarındaki hücreler 144. saat sonunda canlılıklarını devam ettirebilirken seyreltilmemiş ekstrakt eklenen gruptaki hücreler canlılıklarını 0,08 CI birimi gibi nispeten düşük seviyede devam ettirebilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda konsantrasyon gruplarının sitotoksitelerini sıralamamız gerekirse; Hücre kontrol grubu = 1/32 konsantrasyon grubu = 1/16 Konsantrasyon Grubu = 1/8 Konsantrasyon Grubu < 1/4 Konsantrasyon Grubu = 1/2 Konsantrasyon Grubu < Seyreltilmemiş Konsantrasyon Grubu



Resim 8

Fuji II LC Capsule'ün gerçek zamanlı hücre analizinde elde edilen canlılık verilerinin zamana bağlı değişimi.

Vitrebond'ün seyreltilmemiş ve 1/2, 1/8, 1/4 konsantrasyonlarındaki ekstraktlarının L929 hücre kültürlerine eklendikten sonra kültürlerdeki hücreler canlılıklarını kaybetmişlerdir. 144. saat sonunda kontrol grubu ve 1/16 ile 1/32 hücreler canlılıklarını devam ettirebilmişken 1/8 konsantrasyonda ekstrakt eklenen gruptaki hücreler 0,02 CI birimi gibi nispeten düşük seviyede devam ettirebilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda konsantrasyon gruplarının sitotoksitelerini sıralamamız gerekirse; Hücre Kontrol Grubu < 1/32 Konsantrasyon Grubu = 1/16 Konsantrasyon Grubu < 1/8 Konsantrasyon Grubu = 1/4 Konsantrasyon Grubu < 1/2 Konsantrasyon Grubu = Seyreltilmemiş Konsantrasyon Grubu



Resim 9

Vitrebond'ün gerçek zamanlı hücre analizinde elde edilen canlılık verilerinin zamana bağlı değişimi.

TARTIŞMA

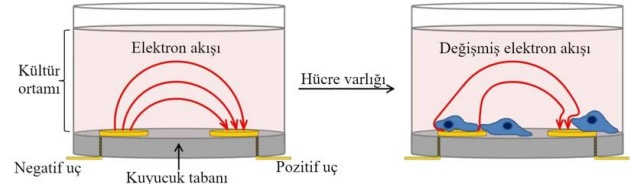
Rezin modifiye cam iyonomer simanlar dış sert dokularına kimyasal olarak bağlanabilen, çürük önleme özelliği olan ve nispeten fiziksel olarak dayanıklı restoratif dolgu materyalleridir. Bu çalışmada, iki farklı cam iyonomer simandan elde edilen ekstraktların *in vitro* sitotoksitesini iki farklı yöntem ile test edilmiştir. Sıfır hipotezimiz, çalışma sonucunda elde edilen verilere göre reddedilmiştir. Test edilen materyallerin seyreltilmemiş ekstraktları ve bazı seyreltilmiş konsantrasyonları L929 hücreleri üzerinde toksik etkiler göstermiştir.

In vitro sitotoksite testleri, dental materyallerin bölgesel toksisitesini *in vivo* veya insan testinden önce biyoyoumluluğunun değerlendirilmesinde temel bir tarama adımıdır ve bu amaçla hücre kültür testleri kullanılabilir. Ökaryotik hücrelerin canlılığını değerlendirmek üzere kullanılan tetrazolyum indirgenme testlerinden olan MTT testinin dental materyallerin sitotoksitesini değerlendirmek için uygun bir *in vitro* yöntem olduğu gösterilmiştir ve yaygın olarak kullanılan standart bir test haline gelmiştir.^{13,15} Daha sonradan geliştirilen farklı bir tetrazolyum indirgenme testi olan XTT testinde işlem basamakları azaltılmıştır. Böylelikle daha hızlı ve daha kolay sitotoksite testleri yapabilmeye olanak sağlanmıştır.^{16,17} Bu avantajlarından dolayı çalışmamızda ilgili materyallerin sitotoksik etkilerini incelemek üzere XTT test yöntemini kullanımı uygun görülmüştür.

XTT testi ve genel olarak diğer sitotoksite belirleme testleri her bir test sonucunda hücre canlılığı için tek bir ölçülebilir değer vermektedir. Ayrıca bu testlerin uygulanması için görece birçok işlem basamağı gereklidir ki bu ölçülen değerde varyasyonlara neden olabilir. Bununla birlikte sitotoksite sonuçları sadece test materyaline göre değil test yöntemine göre de değişiklik gösterebildiğinden birçok farklı test yöntemi kullanılmalı ve risk analizleri yapılmalıdır.¹⁸

Gerçek zamanlı hücre analizi yapan xCELLigence sistemi ile belirlenen zaman dilimi içerisinde istenilen sıklıkta okuma yapılabilmesi ve böylelikle hücrelerin canlılığının izlenebilmesi olanaklı olmuştur. Ayrıca bu yöntemde hücrelerin izlenebilmesi için herhangi bir etiketleme işlemine gerek yoktur. Etiketleme yapılmadığından iş yükünden ve kaynaklardan tasarruf sağlar ve daha fizyolojik bir ölçüm yapılmasına olanak verir. Devamlı takip sayesinde test süresi boyunca kapsamlı bilgi sağlar.¹⁹ Bu üstünlüklerinden dolayı çalışmamızda materyallerin sitotoksite yönünden değerlendirmek amacıyla XTT testi ile birlikte gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi uygulanmıştır. Bu iki test yöntemi beraber kullanılarak elde edilen sonuçlar kendi içlerinde karşılaştırılmış ve çalışmanın güvenilirliğinin artırılması amaçlanmıştır.

Gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi ile hücre kültür plakalarının tabanına yerleştirilmiş mikro elektrotlar aracılığıyla empedans ölçümü yapılarak hücre canlılığı invaziv olmayan bir şekilde belirlenebilir. Ölçülen empedans hücre endeksi (Cell Index, CI) değeri olarak verilir. Hücreler yoksa ya da elektrotlara yapışmamışsa hücre endeksi sıfır ya da sıfıra yakın, aynı fizyolojik koşullarda elektrotlara daha fazla hücre yapışır ise hücre endeksi değeri daha yüksektir.^{20,21}



Resim 10

Gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde kullanılan e-plak kuyucuklarının şematik olarak lateral kesitsel görüntüsü

Hücre kültürü çalışmalarında primer hücreler ve devamlı hücre hatları kullanılır. Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları (L929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleridir (HeLa).²² Dental materyallerden salınan iyonlara L929 fare fibroblast hücrelerinin, insan fibroblast hücreleri ile benzer tepki vermesinden dolayı²³ bizim çalışmamızda da hücre kültürlerinde kullanılmak üzere L929 fare fibroblastları seçilmiştir.

Bizim çalışmamızda Fuji II LC Capsule'ün XTT deneyi sonuçlarına göre sadece orijinal konsantrasyonları sitotoksik olarak bulunmuştur. Fuji II LC Capsule'ün gerçek zamanlı hücre analizi sonuçlarına göre sadece orijinal konsantrasyon grubundaki hücrelerin canlılığının 144. saat sonunda oldukça azaldığı, diğer gruplardaki hücrelerin canlılığının kontrol grubuna benzer bir şekilde zamana göre değiştiği görülmektedir. XTT testinden elde edilen Vitrebond sonuçları incelendiğinde, orijinal, 1/2 ve 1/4 konsantrasyonlarının sitotoksik sonuç vermesiyle ve gerçek zamanlı hücre analizi sonuçlarına göre 144. saat sonunda sadece 1/16 ve 1/32 konsantrasyon gruplarındaki hücrelerin canlılığını devam ettirdiğinin görülmesiyle, Vitrebond'un Fuji II LC Capsule'e göre daha sitotoksik bir materyal olduğu görülmektedir.

Geleneksel cam iyonomerlere rezin eklenmesiyle mekanik özellikleri artırılmış fakat bunun sonucunda bu materyallerin biyoyoumluluğu ile ilgili endişeler ortaya çıkmıştır. Genel olarak rezin modifiye cam iyonomerler, geleneksel cam iyonomerlerden daha sitotoksik olarak değerlendirilirler.²⁴ Bunun yanında yüksek viskoziteli cam iyonomer olan Fuji IX ile rezin modifiye cam iyonomer olan Fuji II birçok çalışmada sitotoksite bakımından değerlendirilip

karşılaştırılmıştır. Kanjavec ve arkadaşları¹⁰ MTT testi kullanarak SHED hücreleri üzerine yaptıkları değerlendirmede Fuji II'yi, Fuji IX'dan daha sitotoksik bulurlarken Huang ve Chang²⁵ insan pulpa hücre kültürleri üzerine MTT testiyle yaptıkları sitotoksikite çalışmalarında Fuji IX'u Fuji II'den daha sitotoksik bulmuşlardır.

Koulaouzidou ve arkadaşları BHK21/C13 (bebek hamster karaciğer fibroblastları), RPC-C2A (fare pulpa hücreleri) ve L929 üzerine SRB testi ile yaptıkları sitotoksikite çalışmasında Fuji II nin MTA'ya benzer sitotoksik etki gösterdiğinden bahsetmişlerdir.²⁶ Ayrıca Guertsen ve arkadaşları Fuji II LC'nin yüksek oranda hidroksi etil metakrilat, glisidil metakrilat monomerler ve etilen glikol salmasına rağmen bu materyalin diğer rezin modifiye cam iyonomer simanlardan daha az sitotoksik etkisi olduğunu belirtmişlerdir.²⁷

L929 fare fibroblastları üzerine MTT testiyle yapılan, Biodentine'nin birçok restoratif materyal ile karşılaştırıldığı Ranjkesh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Biodentine'nin Fuji II LC'den ve Fuji II LC'nin de Vitrebond'dan uygulanan test koşullarında daha biyouyumlu olduğunu bildirmişlerdir.²⁸

Bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde muhtelif yöntemlerle yapılan birçok hücre kültür çalışmasında Vitrebond sitotoksik olarak bulunmuştur.^{29,31} Vitrebond'un bu yüksek sitotoksik etkisinin içeriğinde bulunan DPICl (difenil iyodonyum klorid) başlatıcısının bozunup klorin benzen, iyodin benzen ve bromin benzen oluşturmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.²⁷

XTT testinde materyallerin kültürlerde bir günlük ekspozu sonucunda sitotoksikite değerlendirilmesi yapılmış ancak gerçek zamanlı hücre analizinin sağladığı avantajlar sebebiyle bu yöntemde test süresi altı güne çıkarılabilmektedir. Böylelikle her bir materyalin her bir konsantrasyonu için elde edilen veri miktarı oldukça artırılmış, materyallerin zamana göre hücre canlılıklarını nasıl değiştirdiği daha detaylı gözlemlenebilmektedir.

Bir *in vitro* çalışmanın sınırları göz önüne alındığında bu çalışmalardan elde edilen sonuçların *in vivo* şartlara uygulanamayabileceği de akıldan çıkarılmamalıdır. Örneğin, dentin varlığı ve preparasyon sonrası kalan kalınlığı, dental materyallerden salınan potansiyel zararlı bileşenlerin pulpaya ulaşabilmelerinin önünde bir bariyer olarak görev yapabilir.³² Ayrıca bir biyomateryalin insan vücudunda ömür boyu kalabileceği göz önünde bulundurulursa, laboratuvar çalışmalarında ilgili materyallerin çok kısıtlı bir süre boyunca test edildiği sonucu çıkarılabilir. Ağız ortamının oldukça değişken koşulları göz önüne alındığında biyomateryaller

zamanla korozyona uğrayabilir ve kişiye zarar verebilir. Bununla beraber bir materyal tüm uygulamalar için biyolojik olarak uyumlu olmayabilir. Tüm bunların yanında bölgesel olarak toksisite dışında biyomateryaller sistemik toksisite, genotoksisite, alerji, teratolojik etkileri de sahip olabilir. Bundan dolayıdır ki bir biyomateryalin biyouyumlu olup olmadığını söylemek, kapsamlı testler yapılmadan, hangi amaçla ve nerede kullanıldığını belirtmeden pek anlamlı değildir.

Çalışmamızda da elde edilen veriler sadece *in vitro* ekstraksiyon testine dayanılarak verilmiştir. Alternatif restoratif materyallerin, özellikle yeni kullanıma girmiş olanların biyouyumluluğu hakkındaki bilgi birikimi daha kapsamlı *in vitro* ve klinik çalışmalarla artırılmalıdır.

SONUÇ

- L929 fibroblast hücreleri üzerine hem Vitrebond'un hem de Fuji II LC'nin sitotoksik etki potansiyeli vardır.
- L929 fibroblast hücreleri üzerine Vitrebond, Fuji II LC Capsule'e göre daha sitotoksiktir.

Dental materyallerin sitotoksikitesini değerlendirmede gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi, XTT yöntemine göre daha yararlı bilgi verebilme potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
2. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2001;86(2):203-9.
3. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
4. Schmalz G. Determination of Biocompatibility. In: Schmalz G, Bindeslev DA, editors. *Biocompatibility of Dental Materials*: Springer; 2009. p. 13-43.
5. Bates MN, Fawcett J, Garrett N, Cutress T, Kjellstrom T. Health effects of dental amalgam exposure: a retrospective cohort study. *International Journal of Epidemiology*. 2004;33(4):894-902.
6. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2009;30(4):293-342.
7. Kim D-A, Abo-Mosallam HA, Lee H-Y, Kim G-R, Kim H-W, Lee H-H. Development of a novel aluminum-free glass ionomer cement based on magnesium/strontium-silicate glasses. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;42:665-71.
8. Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L. Number of amalgam fillings in relation to cardiovascular disease, diabetes, cancer and early death in Swedish women. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1993;21(1):40-4.
9. Shelnutt S, Kind J, Allaben W. Bisphenol A: Update on newly developed data and how they address NTP's 2008 finding of "Some Concern". *Food and chemical toxicology*. 2013;57:284-95.
10. Kanjevac TV, Milovanović MZ, Milošević-Djordjević O, Tešić Ž, Ivanović M, Lukić A. Cytotoxicity of glass ionomer cement on human exfoliated deciduous teeth stem cells correlates with released fluoride, strontium and aluminum ion concentrations. *Archives of biological sciences*. 2015;67(2):619-30.
11. Schmalz G, Bindeslev DA. *Biocompatibility of Dental Materials*: Springer; 2009.
12. Pameijer C, Stanley H. Primate pulp response to anhydrous Chembond. *Journal of Dental Research*. 1984;63:171-.
13. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al. *Assay guidance manual*. 2004.
14. Gilbert DF, Friedrich O. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*: Springer New York; 2017.
15. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dental Materials*. 1995;11(5-6):327-31.
16. Stevens MG, Olsen SC. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods*. 1993;157(1-2):225-31.
17. Parboosing R, Mzobe G, Chonco L, Moodley I. Cell-based assays for assessing toxicity: a basic guide. *Medicinal Chemistry*. 2017;13(1):13-21.
18. Shelton R. *Biocompatibility of Dental Biomaterials*: Elsevier Science; 2016.
19. Teng Z, Kuang X, Wang J, Zhang X. Real-time cell analysis—a new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of virological methods*. 2013;193(2):364-70.
20. Ozdemir A, Ark M. xCELLigence real time cell analysis system: a new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche*. 2013;2(2).
21. ACEA-Biosciences. *xCELLigence RTCA SP and MP Instruments Brochure*. 2013.
22. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2011;2011(2).
23. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan X, Franz A, Füreder W, Sperr W, et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *Journal of dental research*. 1995;74(8):1513-20.
24. Galić E, Tadin A, Galić N, Kašuba V, Mladinić M, Rozgaj R, et al. Micronucleus, alkaline, and human 8-oxoguanine glycosylase 1 modified comet assays evaluation of glass-ionomer cements-in vitro. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2014;65(2):179-88.
25. Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Endodontology*. 2002;94(3):361-5.
26. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *Journal of Endodontics*. 2005;31(1):44-6.
27. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *Journal of dental research*. 1998;77(12):2012-9.
28. Ranjkesh B, Isidor F, Kraft DCE, Løvschall H. In vitro cytotoxic evaluation of novel fast-setting calcium silicate cement compositions and dental materials using colorimetric methylthiazolyl-tetrazolium assay. *Journal of oral science*. 2018;60(1):82-8.

29. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, L Lukic M, Arsenijevic N, Markovic D, et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Medicinal Chemistry*. 2012;8(1):40-5.
30. Selimović-Dragaš M, Huseinbegović A, Kobašlija S, Hatibović-Kofman Š. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2012;12(4):273.
31. Mendonça AAMd, Oliveira CFd, Hebling J, Costa CAdS. Influence of thicknesses of smear layer on the transdental cytotoxicity and bond strength of a resin-modified glass-ionomer cement. *Brazilian dental journal*. 2012;23(4):379-86.
32. Schmalz G, Schmalz C, Rotgans J. Die Pulpaverträglichkeit eines Glasionomer- und eines Zinkoxiphosphat-Zementes. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*. 1986;41(9):806-12.

Yazışma Adresi:

Türkey KÖLÜŞ
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi,
Diş Hastalıkları ve Tedavisi AD
Kahramanmaraş, Türkiye
Tel : +90 344 300 38 94
E Posta : turkaykolus@ksu.edu.tr