

**PROTEZ KAİDE MATERYALLERİNİN SİTOTOKSİSİTESİNİN
AGAR DİFÜZYON VE FİLTRE DİFÜZYON TEST YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ**

**EXAMINATION OF CYTOTOXICITY OF DENTURE BASE RESINS,
BY AGAR DIFFUSION AND FILTER DIFFUSION TEST METHODS**

*Gülfem ERGÜN**

Lamia Mutlu SAĞESEN†

Arife DOĞAN‡

Aykut ÖZKUL§

Erol DEMİREL‡

ÖZET

Amaç: Kimyasal, ısı veya mikrodalga enerjisi ile polimerize olan 4 protez kaide materyalinin sitotoksitesisi, Primer insan Gingival Fibroblast (PİGF) hücre kültüründe, agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemi ile değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: Test edilecek materyallerden 1 cm çapında 2 mm kalınlığında, toplam 48 adet örnek disk polimerize edildi. Agar difüzyon test yöntemi için 100 mm çaplı petri kutularına 1.5×10^5 hücre/ml olacak şekilde PİGF hazırlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan 1M amonyum molibdat çözeltisi emdirilmiş disk şeklinde steril kurutma kağıdı; negatif kontrol olarak da steril distile su emdirilmiş kurutma kağıdı diskler hazırlandı. 6., 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde, Giemza ile boyanan hücreler makroskopik ve mikroskopik olarak tersine çevrilmiş doku kültür mikroskobu ile incelendi. Filtre difüzyon test yöntemi için 60 mm çaplı petri kutularına 1.5×10^5 hücre/ml olacak şekilde PİGF hazırlandı. Her test örneği için altı petri kutusu kullanarak standart büyüklükteki test örneklerinden membran filtreler üzerine düzenli olarak yerleştirildi. Örneklerle ilgili toksisite kontrolleri inokülasyonu izleyen 6., 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde test sistemlerindeki membranlar uzaklaştırılarak hücrelerin mikroskopta incelenmesiyle gerçekleştirildi.

Bulgular: Polimerize edilen rezin diskler, agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemlerinde toksisite göstermedi.

Sonuç: Test materyallerinden salınması beklenen toksik ürünlerin, agar ve filtre bariyerlerini aşmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Protez kaide materyalleri, agar difüzyon, filtre difüzyon, sitotoksisite.

SUMMARY

Objective: The cytotoxic effect of four denture base resin materials polymerized chemically, by heat or by microwave energy on human gingival fibroblast cells were investigated using agar diffusion and filter diffusion test methods.

Material and Method: Totally 48 sample discs, 1 cm diameter 2 mm thickness, have been polymerised from materials which will be tested. 1.5×10^5 cell/ml PİGF were seeded into 100 mm diameter petri dishes for agar diffusion test method. Discs of blotting paper, absorbed 1M Ammonium molybdate solution (positive control) or sterile distilled water (negative control) were also prepared. In the 6th, 12th, 24th, 36th, 48th, and 72nd hours, cells stained with Giemza and we examined macroscopically and microscopically with inverted tissue culture microscope. For filter diffusion test method, 1.5×10^5 cell/ml PİGF were seeded into 60 mm diameter petri dishes. Using six petri dishes for every test sample, standard sized test samples were placed on to the membrane filters in order. The toxicity controls related to the samples were materialized with the investigation of cells under microscope by removing the membranes in test systems in the 6th, 12th, 24th, 36th, 48th, and 72nd hours following the inoculation.

Results: Polymerised resin discs, didn't show any toxicity in agar diffusion and filter diffusion test methods.

Conclusion: Toxicity products expected to be released from test materials, couldn't pass over the agar and filter barrier.

Key words: Denture base resins, agar diffusion, filter diffusion, cytotoxicity.

Makale Gönderiliş Tarihi: 27.06.2005

Yayma Kabul Tarihi: 24.10.2005

* Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD, Yrd. Doç. Dr.

† Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dr. Dt.

‡ Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD, Prof. Dr.

§ Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Viroloji AD,

Türk Protodonti ve İmplantoloji Derneği 11. Bilimsel Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur. Ekim, 26-29, 2000, Ankara, Türkiye.

GİRİŞ

Protez kaide materyalleri olarak, günümüzde yaygın kullanım alanı bulan akrilik rezinlerden; protez kaidelerinin yapımının yanısıra, suni dişler, restoratif uygulamalar, tamir materyalleri, ortodontik splintler, yer tutucular, kuron köprü restorasyonlarında fasetler, ölçü kaşıkları, damak yarıkları obtüratörleri gibi pek çok alanda faydalanılmaktadır^{1,5}.

Diş hekimliğinde kullanılan protez kaide rezinleri, ısı, enjeksiyon yöntemi, kimyasal olarak, görünür ışık ve mikrodalga enerjisi ile polimerize edilebilmektedir^{1,5,18,31,32}.

Isı ile polimerize olan rezinler, konvansiyonel muflalama veya enjeksiyon yöntemi ile polimerize olan akrilik rezinlerdir. Kimyasal olarak polimerize olan akrilik rezinlerde, polimerizasyon oda sıcaklığında gerçekleşmektedir. Görünür ışıkla polimerize olan rezinlerin polimerizasyonu, yüksek yoğunlukta kuarts halojen lambaları ile oluşturulan 400-500 nm'lik mavi bir ışıkla sağlanmaktadır^{1,5,15,16,31,32}.

Mikrodalga enerjisi ile polimerizasyonda, konvansiyonel rezinler kullanılabilir gibi, aynı zamanda bu yöntem için özel akrilikler geliştirilmiştir. Bu akrilik rezinlerde monomer, metil ve etil metakrilat karışımından oluşmaktadır^{17,20,28,32}.

Biyolojik uyum; canlı dokuya yerleştirilen bir restorasyon veya implantın çevresindeki yumuşak ya da sert dokuda herhangi bir değişikliğe yol açmaksızın tepkisiz kalabilmesidir^{2-4,7}.

Biyolojik uyum için; materyalin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku ile temasının şekli, yeri ve dokunun özellikleri gibi pek çok faktörün bir arada uyum içinde olması gerekmektedir. Biyolojik uyumu olmayan materyaller; değişik doku reaksiyonlarına neden olabilmektedir^{7,11,22}.

Diş hekimliği alanında kullanıma sunulan materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanısıra biyolojik uyumlulukları da son derece önem taşımaktadır.

Hücre kültürleri kullanılarak, katı olan dental materyallerin biyolojik uyumunun belirlenmesi için çok sayıda *in vitro* test bulunmaktadır. ISO 7405:1997(E) de önerilen *in vitro* test yöntemleri; agar, filtre difüzyon, direkt kontakt (extract) ve dentin bariyer testleridir²⁶.

Agar difüzyon test yönteminden, katı materyallerin ve katı materyallerden süzülen komponentlerin akut sitotoksitesinin saptanmasında yararlanılmaktadır.

Filtre difüzyon testi, test materyallerinin selüloz aseptat filtreden süzülmesinden sonra meydana gelen sitotok-

sik cevabını belirlemek için kullanılan test yöntemlerindedir^{10,26,30}.

Bu çalışmanın amacı; ısı, kimyasal ve mikrodalga enerjisi ile polimerize olan bazı protez kaide materyallerinin primer insan gingival fibroblast hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkilerinin agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemi ile değerlendirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Hazırlanması

Araştırmamızda test edilen 4 protez kaide rezininin karıştırma oranları ve üretici firmaları, Tablo I'de sunulmuştur. Her bir protez kaide rezininden 1 cm çapında 2 mm kalınlığında 12'şer adet olmak üzere toplam 48 adet disk hazırlandı. Mikrodalga ile polimerize edilen protez kaide rezin örnekleri (Acron MC, GC Corporation, USA) için hazırlanan diskler, fiberle güçlendirilmiş plastikten yapılmış mikrodalga muflasına (Acron MC, microwaveable flask, GC USA) alınarak, 25 °C de 20 dk'lık ön polimerizasyondan sonra, 2450 MHz'lik mikrodalga fırınında (Bosch 5870, 6N, Germany) 3 dk 500 W'ta polimerize edildi.

Isı ile polimerize olan protez kaide materyalinden (QC 20, De Trey Dentsply, USA) 1 cm çapında 2 mm kalınlığında hazırlanan 12 adet disk, 20 dk'lık ön polimerizasyondan sonra pirinç muflaya alınıp 70°C lik su banyosuna konuldu. Suyun kaynama ısısına gelmesi beklenip 20 dk kaynar suda bekletildi.

Kimyasal olarak polimerize olan rezinlerden (Takilon; Bayer Dental, Germany ve Meliodent; Rodont, Italy) üretici firmanın önerileri doğrultusunda 1 cm çapında 2mm kalınlığında 12'şer adet disk oda ısısında hazırlandı ve polimerizasyon için 14 dk bekletildi.

Polimerize edilen tüm örnekler konvansiyonel tesviye, polisaj işlemi yapıldı. Hazırlanan örnekler, 20 dk distile suda ultrasonik (Ultrasonic Cleaner, HS Health Sonics Corporation USA) olarak temizlendi. Örnekler; hazırlanması sırasında oluşabilecek kontaminasyonu ortadan kaldırmak için, 20 dk ultraviyole ışığına tabi tutuldu.

Hücrelerin Hazırlanması

Araştırmada PİGF hücre kültürü kullanıldı. Cerrahi kliniğine ortodontik diş çekimi için gelen bir hastanın çekimini takiben diş çevresinden operatif olarak steril şartlarda alınan gingiva dokusu Fosfat Tampon Solusyonu (PBS, Biochrom, Berlin, Germany) içinde laboratuvara ulaştırıldı. Steril bisturi ve makas yardımı ile 1-8 mm³lük boyutlara küçültülen doku parçaları, bir erlenmayer içine alındı. Antibiyotik içeren PBS (Sigma, St. Louis, MO,

USA) ile bir kaç kez yıkanan doku parçalarından fibroblastların elde edilmesi amacıyla enzimatik parçalama tekniği tercih edildi. Daha önce % 1'lik olarak hazırlanan Tripsin enzim solusyonu, PBS yardımıyla son konsantrasyonu % 0.025 olacak şekilde sulandırıldı. Enzim solusyonu doku parçalarının yüzeyini kaplayacak hacimde erlenmayer içine aktarıldıktan sonra, sistem daha önceden 37°C ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle beklemeye bırakıldı. Bu zaman süresince her 10 dk'da bir 15-20 sn süre ile vorteksleme işlemine tabi tutulan sistemde, doku parçalarından hücrelerin serbest kalışı takip edildi. Süre sonunda doku parçaları erlenme kalacak şekilde bir santrifüj tüpüne aktarılan tripsin solusyonu içindeki hücreler 800-1000 devir/dk da 10 dk süre ile santrifüj edilerek, tüp dibinde toplandı. Süpernatant konumundaki tripsin solüsyonunun uzaklaştırılmasını takiben, hücre pelleti % 20 Fötal Dana Serumunu (FDS) içeren Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM Difco, USA) içinde 250.000 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı. Hücreler *in vitro* kültür için 25 cm² tabanlı hücre kültürü şişelerine (Flask, Costar, Cambridge, MA, USA) yerleştirilerek 37°C de inkübe edildi.

Kültür ortamında 24 saatlik mikroskop kontrolleri ile 48 saat sonra hücre çoğalması tespit edilen PİGF hücrelerinin sayısal olarak artırılması amacıyla subkültürleri yapıldı. Kültür ortamındaki hücre üretme ortamı uzaklaştırıldıktan sonra Versen - tripsin solusyonu ile hücre yüzeyleri yıkandı. Hücrelerin üzerine tekrar aynı solüsyon ilave edilerek, hücrelerin flask zemininden ayrılması amacıyla 37°C'de 3-5 dakika beklendi. Hücre üretme ortamı içinde 100.000 hücre/ml olacak şekilde süspanse edilen hücreler, ilave flasklara aktarıldı veya test sistemlerinde kullanılmak üzere değerlendirildi.

Agar Difüzyon Test Yöntemi, ISO standartları 7405:1997(E) bildirilen yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla, 100 mm çaplı petri kutularına 1.5x10⁵ hücre/ml olacak şekilde % 10 FDS içeren DMEM içinde sulandırılan PİGF hücrelerinden 15 ml hacimde konuldu. Hücrelerin çökmesi ve petri zeminine tutunması için kıpırdatmaksızın 30 dk süreyle laboratuvar masası üzerinde beklemeye bırakılan petri kutuları, süre sonunda, 37°C' lik ve % 5 CO₂ içeren etüvlerde inkübasyona bırakıldı. Yapılan 24 saatlik mikroskop kontrollerinde tek tabaka hücre üremesi tamamlanan petri testte kullanıldı. % 2' lik olarak hazırlanarak otoklavda steril edilen Noble agar (Difco, USA) ve 2XDMEM 'un sıcaklıkları 42°C' ye ayarlandıktan sonra eşit hacimlerde karıştırıldılar. Bu karışım, üzerindeki vasatı tamamen aspire edilen ve yüzeyleri PBS ile yıkanan petri kutularında üretilmiş PİGF hücreleri üzerine 15 ml

hacimde yayıldı. Yarı katı vasat özelliğinde olan bu agarın, hücreler üzerinde donması için laboratuvar ısısında 20 dk beklendi. Daha sonra her örnek için bir petri hücre kullanılmak üzere, test örnekleri ve (+,-) kontroller agar yüzeyine, agarda perforasyon yapmadan yerleştirildi. Pozitif kontrol (Toksik) olarak 1 M Amonyum Molibdat (NH₄ MO₇, O₂₇, 4H₂O)(Merck, Germany) çözeltisi steril kurutma kağıdı disklerine emdirilerek agar yüzeyine yerleştirilirken, negatif kontrol amacıyla steril distile su emdirilmiş eşit büyüklükteki kurutma kağıdı diskleri kullanıldı. Nemli ortamda ve % 5 CO₂ li etüvde inkübe edilen sistem, hücresel toksisitenin izlenebilmesi için 72 saat süre ile mikroskopik ve makroskopik kontrollere tabi tutuldu. Süre sonunda bulguların doğrulanması amacıyla, üzerindeki agar tabakası uzaklaştırılan hücreler Giemza ile boyanarak tersine çevrilmiş doku kültürü mikroskopunda (Olympus-CK, Tokyo, Japan) hücre bazında 6, 12, 24, 36, 48, 72. saatlerde toksisite belirtileri değerlendirildi.

Filtre Difüzyon Test Yöntemi, ISO standartları 7405:1997(E)'de bildirilen yöntemine göre yapıldı. Testin gerçekleştirilmesi amacıyla 60 mm çaplı plastik petri kutularına % 10 FDS içeren DMEM içinde 1,5 X 10⁵ hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış PİGF hücrelerinden 6 ml hacimde kondu ve hücrelerin petri zeminine çöküp tutunmaları için kıpırdatmaksızın 20 dakika süre ile beklendi. Süre sonunda % 5 CO₂ etüvde 24 saat süreyle inkübasyona terk edildi. Yeterli hücre üremesinin saptandığı anda etüvden alınan petri kutuları içindeki hücre üretme vasatı uzaklaştırıldıktan sonra hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Daha önceden petri çapına uygun büyüklükte kesilerek otoklavda steril edilen selüloz asetat membran filtreler (0.22 µm, Sigma, St Louis, USA) ıslatılmış oldukları vasat içinden steril bir pens ile alınarak petri kutuları içinde üretilmiş olan hücrelerin yüzeyine yerleştirildi. Bunu takiben membran filtre üzerine hücrelerin beslenmesi amacıyla idame vasatından (% 10 FDS içeren DMEM) 6 ml hacimde konuldu. Her test örneği için altı petri kutusu kullanılmak kaydı ile standart büyüklükteki test maddelerinden membran filtreler üzerine düzenli olarak yerleştirildi ve ileri inkübasyon için sistem % 5 CO₂ içeren 37°C'lik ortama bırakıldı. Örneklerle ilgili toksisite kontrolleri inokulasyonu izleyen 6., 12., 24., 36., 48. ve 72. saatlerde test sistemlerindeki membranların uzaklaştırılarak, hücrelerin mikroskopta incelenmesiyle gerçekleştirildi. Test sırasında kullanılan membran filtrelerle ilgili olası toksisite kontrolleri de yapıldı.

BULGULAR

Test materyallerinin agar difüzyon ve filtre difüzyon

test yöntemi ile sitotoksosite değerlendirmeleri, ISO 7405:1997(E)'de önerilen şekilde gerçekleştirildi (Tablo II, III).

Tablo I. Test edilen protez kaide rezinleri.

Ürün Adı	Polimerizasyon Tipi	Monomer/ Polimer oranı	Üretici Firma
Acron MC	Mikrodalga + ısı	43 ml/100 gr	GC Corporation (USA)
QC-20	Mikrodalga + ısı	10 ml/23 gr	De Trey Dentsply (USA)
Meliudent	Otopolimerizan	3.5 ml/5 gr	Bayer Dental (Germany)
Takilon	Otopolimerizan	3.5 ml/5 gr	Rodont (Italy)

Tablo II. Ağar Difüzyon Testi Değerlendirme Yöntemleri*

Skala	Renk açılma İndeksi	Hücre Erime İndeksi
0	Örneğin altında ya da çevresinde renk açılması yok.	Görülebilir bir erime yok
1	Örneğin sınırları içinde renk açılması var.	Alan çapının %20'sinde erime mevcut
2	Örneğin 5 mm çevresinde renk açılması var.	Alan çapının %20-%40'ında erime var.
3	Örneğin 10 mm çevresinde renk açılması var.	Alan çapının %40-%60'ında erime var
4	Örneğin çevresindeki 10 mm'den fazla uzaklıkta renk açılması var.	Alan çapının %60-%80'inde erime var
5	Petri kutusunun tümünü kaplayan renk açılması var.	Alan çapının %80 ve fazlasında erime var.

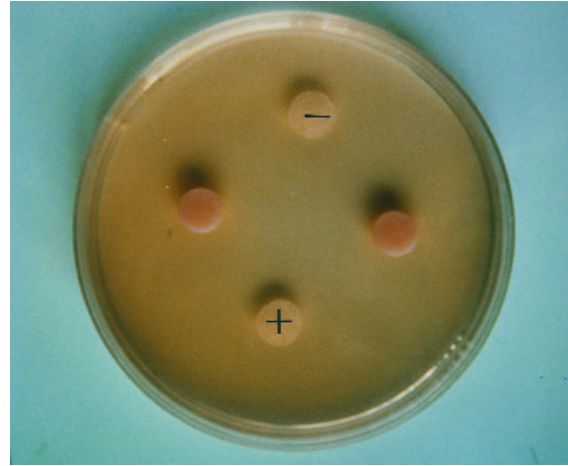
*Hücre cevabı = Renk açılma indeksi / Hücre erime indeksi

Tablo III. Filtre Difüzyon Testi Değerlendirme Yöntemleri

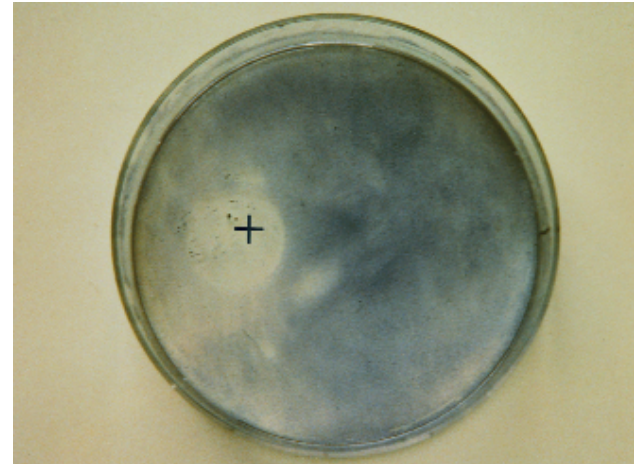
Skala	Derecelendirme Bulguları	Renk Açılma Alanı	Sitotoksosite
0	Filtre üzerinde boyanma yoğunluğu arasında fark yok.	Yok	Sitotoksik değil
1	Boyanma yoğunluğu azalmış alan veya test örneğinin boyanmamış alanı 5 mm çaptan az.	<20 mm ²	Orta derecede sitotoksosite
2	5-7 mm çapta boyanmamış alan.	20-40mm ²	Yüksek derecede sitotoksosite
3	7 mm çaptan fazla boyanmamış alan.	>40 mm ²	Ciddi derecede sitotoksosite

Ağar difüzyon testinde, 6., 12., 24., 36., 48., 72. saatlerde kontrol edilen polimerize edilmiş protez kaide rezin disk örneklerinin hiçbirisinde toksisite bulgusuna rastlanmadı (Renk Açılma indeksi 0, hücre erime indeksi 0) (Resim 1).

Pozitif kontrol (Toksik) olarak kullanılan 1 M Amonyum Molibdat çözeltisi emdirilmiş kurutma kağıdına ait bölgedeki hücrelerde ise %100 oranında toksik etki bulunmuştur (Renk Açılma indeksi 5, hücre erime indeksi 5) (Resim 2).



Resim 1. Agar difüzyon test yönteminde örneklerin yerleştirilmesi + kontrol (amonyum molibdat emdirilmiş steril kurutma kağıdı) - kontrol (distile su emdirilmiş steril kurutma kağıdı)



Resim 2. Agar tabakası kaldırıldıktan sonra + kontrol (Amonyum molibdat) altındaki hücrelerde görülen alan.

Filtre difüzyon testinde, 0.22 µm por ölçüsüne sahip selüloz asetat membran filtre ile hücre yüzeyinden ayrılan örneklerin, 6., 12., 24., 36., 48., 72. saatlerdeki kontrolleri sonunda örneklere ait petri kutularının hiçbirisinde hücresel toksisite bulgusuna rastlanmadı (Skala 0, Renk açılması yok).

TARTIŞMA

Akrilik rezinler; günümüzde protetik tedavide en çok kullanılan kaide materyalleridir. Genellikle akrilik kaide yapımında ısı ile polimerize olan akrilikler kullanılmaktadır. Protez kaide plağı yapımında kullanılan bu akrilik rezinlerin allerjik reaksiyonlara neden olabilen artık monomer miktarı, boyutsal stabilite değişiklikleri ve klinik kullanım ömrünün kısa olması gibi olumsuz özellikleri araştırmacıları daha iyi özellikli akrilik rezinler ve polimeri-

zasyon yöntemleri geliştirmek üzere çalışmalara yöneltmiştir.

Son yıllarda popülerlik kazanan mikrodalga enerjisi ile polimerize olan akrilik rezinlerin, daha homojen kitle oluşturduğu, dokulara daha iyi uyum sağladığı, polimerizasyon süresi bakımından çok ekonomik olduğu ileri sürülmüştür. İlk kez 1968 yılında Masamichi Nishiio tarafından denenen tekniğin ısı ile polimerizasyon yöntemine oranla belirli mekanik üstünlüklere sahip olduğu ileri sürülmektedir^{11,22}. Polimerizasyonu sağlayan mikrodalga, 300-300.000 MHz frekansa sahip elektromanyetik dalga olarak tanımlanır. Bu mikrodalgalar, monomer molekülü tarafından emilerek rezinlerin polimerizasyonunu sağlarlar^{23,29,32}. Isı (sıcak su banyosu) ile yapılan polimerizasyon işlemi sırasında mufla dışındaki ortamın sıcaklığı yüksek olmasına rağmen, bu sıcaklığın mufla ve alçı model gibi yapılardan geçerek rezine ulaşması uzun zaman almaktadır ve rezine ulaşan ısıda büyük oranda kayıp meydana gelmektedir. Oysa mikrodalga ile elektromanyetik ışının molekül tarafından emilmesi ile polimerizasyon başladığı için termal yöntemdeki ısının neden olabileceği yan etkiler görülmemektedir^{20,32}.

Kimyasal olarak polimerize olan rezinlerin partikül yapıları düzensizdir. Düşük molekül ağırlıklı polimer partiküllerinin oranı daha fazla olduğu için yapısı daha zayıf ve esnektir. Daha kısa zamanda plastik deformasyona uğramaktadırlar. Polimerizasyonları hızlıdır, ancak tam olmadığı için polimerizasyonlarından sonra değişik oranlarda artık monomer saptanmıştır³¹.

Farklı yöntemler ile polimerize olan protez kaide rezinlerinden artık monomer, kimyasal reaktif maddeler ve oral mukozada reaksiyona yol açabilecek maddeler süzlebilmektedir. Bu reaksiyonlar, protez kaide rezininde bulunan ve tükürüğe salınan artık metil metakrilat monomerine bağlanmaktadır. Formaldehit, metakrilik asit ve benzoik asit salınımı da görülebilmektedir^{15,27}.

Araştırmacılar, artık monomer miktarının; protez kaide rezininin tipine, polimerizasyon reaksiyonunun tipine, süresine ve rezinin kalınlığına bağlı olduğunu bildirmişlerdir^{22,24}.

Gelişen teknolojiye ve farklı gereksinimlere bağlı olarak giderek çeşitlilik kazanan protez kaide rezinlerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de, temas edecekleri, içinde yer alacakları biyolojik çevre ile uyumlu olmalarıdır. Kullanıma sunulan protez kaide rezinlerinin kullanım klavuzlarında genellikle fiziksel özelliklerine ilişkin bilgiler bulunurken, klinik açıdan önemli olan biyolojik uyumluluk, allerji potansiyeli gibi özellikler bil-

dirilmemektedir. Oysa ki protez kaide rezinlerinin toksik, karsinojenik ve allerjik potansiyele sahip olduğuna ilişkin yayınlar mevcuttur^{9,27}. Bu nedenle farklı yöntemlerle polimerize olan dört değişik protez kaide rezinin biyolojik uyumları hücre kültürü yöntemi olan agar difüzyon ve filtre difüzyon test yöntemleri ile araştırılmıştır.

Ağızda yeni uygulandıkları durumda, henüz tam olarak polimerize olmamış materyallerin test hücreleri ya da dokuları ile herhangi bir immünolojik etkileşim olmadan teması, gerçek akut kimyasal toksitenin belirlenmesinde yararlı olmaktadır. Bu da, hücre kültürü test yöntemlerinin kullanımı ile sağlanabilmektedir⁸.

Agar difüzyon testinde, test materyali, nötral vital boyayla boyanmış hücrelerin bir takabakasını örten agar tabakasının yüzeyine, temasta olacak şekilde yerleştirilmektedir^{15,16,19}. Sitotoksitenin etkinliği, toksik maddelerin difüzyon bölgelerindeki hücrelerde yol açtığı boya kaybıyla gösterilebilmektedir. Hücrelerin erimesi ise, difüze olan toksik maddelerin konsantrasyonun yüksek olduğu bölgelerde izlenebilmektedir^{6,15,16,19,23}. Sitotoksik cevap; renk değiştiren bölgedeki (decolorization index 0-5) difüzyon büyüklüğüne bağlı olarak bir cevap indeksi terimi ile ve erimeye uğrayan bölgedeki hücrelerin yüzdesi ile kaydedilmektedir (lysis index)^{6,15,16,19,23}. Makroskobik olarak yapılan bu değerlendirmenin desteklenmesi ve ayrıntılı incelenmesi için hücre erime indeksi yapılmaktadır. Mikroskobik olarak yapılan bu inceleme, tersine çevrilmiş mikroskopta hücre erimesi çapları ölçülerek gerçekleştirilir^{15,26}.

Filtre difüzyon test yöntemi, özellikle katılar ve patlarda kullanılmaktadır. Likitlerde bu yöntemle değerlendirilebilir. Sıvı materyali test etmek için maddenin 0,45 µm por boyutuna sahip filtre üzerine yerleştirilen selüloz diske emdirilmektedir. Bu metoda boyanan filtrelerin test ortamı, daimi bir kaide olarak saklanabilmektedir²⁶. Filtre difüzyon testinde değerlendirme; hücre materyal temas sahasında ortaya çıkan test hücrelerinin skorlama sistemine göre yapılır. Skorlama sistemi boyanan alanın koyuluk değerine, çapına, genişliğine etkilenen alana göre değişim göstermektedir^{26,30}.

Schmalz²¹, dental materyallerin sitotoksitesini test etmek için kullanılan agar difüzyon yöntemini uygulayan ilk araştırmacılarıdır.

Tsuchiya ve arkadaşları²⁷, ısı, mikrodalga ve kimyasal yolla polimerize olan protez kaide rezinlerinden formaldehit ve metil metakrilat sızıntısını, bunların sitotoksitesite potansiyellerini *in vivo* ve *in vitro* olarak incelemişlerdir. Akrilik rezinlerin her üçünde de *in vivo* ve *in vitro* şartlar

altında formaldehit ve metil metakrilat salındığını ortaya koymuşlar; ancak önemli salınımın otopolimerizan akrilide görüldüğünü bildirmişlerdir. Mikrodalga ve ısı ile polimerize olan rezinlerde; salınım oranını çok daha düşük bulmuşlardır. Total ya da parsiyel protezlerin hastaya takılmadan önce suda bekletilmesinin ön salınım ile hem metil metakrilatı hem de formaldehiti önemli oranda uzaklaştıracağını, özellikle astarlama ve protez kaide maddesi olarak kullanımı sırasında, ağıza yerleştirilmeden önce sitotoksite potansiyelini azaltmak için sıcak suya (50°C) daldırılmasının yararlı olacağını belirtmişlerdir.

Araştırmacılar polimerize olan protez kaide rezinlerinden süzülen artık maddelerin (metil metakrilat, formaldehit) sitotoksitesine yol açtığı konusunda fikir birliğine sahiptirler^{12,14}.

Sheridan ve arkadaşları²², ısı, kimyasal ve mikrodalga yöntemi ile polimerize olan üç değişik protez kaide rezininden kopan parçaların insan gingival fibroblastların mitokondrial fonksiyonları üzerinde etkilerini araştırmışlardır. Isı, mikrodalga ve kimyasal olarak aktive olan protez kaide rezinlerinin gingival fibroblast kültürlerinde sitotoksik bileşikler saldıklarını; kimyasal olarak polimerize olan rezin disklerden kopan parçaların, hem mikrodalga hemde ısı ile aktive edilen rezinlerden önemli derecede daha sitotoksik olduğunu bildirmişlerdir. Ancak mikrodalga ile polimerize olan ACRON-MC'nin 96. saatte önemli derecede sitotoksik etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda ısı, kimyasal ve mikrodalga ile polimerize edilmiş örnek disklerde, agar difüzyon ve filtre difüzyon test yönteminde sitotoksik bir bulguya rastlanmamıştır. Agar difüzyon test yönteminde, test edilen materyallerin sitotoksik bulgu vermemelerini, hücre ile materyal arasında yer alan agar tabakasının, filtre difüzyon testinde ise hücre ile materyal arasındaki filtrenin toksitesine yol açabilecek polimerize olmayan komponentlerin yada polimerizasyonda ortaya çıkan toksik ürünlerin filtrasyonuna yeterli geçişi sağlayamamış olmasını düşündürmektedir.

Hücre kültürü testlerinin en büyük eleştiri alan yönlerinden biri, klinik olarak sıklıkla uygun olmayan direk materyal hücre teması olmasıdır. Kaybedilen diş yapısını restore etmek için kullanılan bir çok materyal hücrelerle direk temasta değildir. Bu nedenle çalışmamızda, materyal ve hücre arasında agar ve filtre bariyerini tercih ettik. Test materyalleri, filtrenin karşıt yüzeyi ile temas halinde yerleştirilmektedir. Böylece süzülen herhangi bir maddenin hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturabilmesi için filtre porlarının içine difüze olması gerekmektedir. Pek çok çalışmada bu teknik önerilmiştir^{10,26,30}.

Bu çalışmanın sonuçlarını, doğrudan kliniğe yansıtılmak mümkün değildir. Sitotoksitesiyi araştıran *in vitro* değerlendirmelerdeki basitleştirilmiş sistemler, karışık değişkenlerin etkisini azaltmaktadır²². Farklı metodların kullanımını rezinlerin toksitesisi üzerine ilave bilgiler verecektir. Çalışmalar akrilik rezinlerin, 48 saat suda bekletildikten sonra, önemsiz derecede sitotoksitesiyi gösterdiğini belirtmişlerdir^{13,25}. Bu nedenle akrilik rezinlerden yapılan protez kaide rezinleri, oral mukozaya üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltmak için hastaya tesliminden önce suda bekletilmesi önerilmektedir¹³.

Çalışmanın sonuçlarının; *in vivo* deneyler, kullanılan test sistemlerindeki moleküler veriler ve ileri test sistemleri ile incelenerek desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental Materials 10th ed., W.B. Saunders Co., 1996, 237-239.
2. Bala O, Gürhan İ, Görgül G. Çeşitli kanal dolgu materyallerinin sitotoksitesilerinin değerlendirilmesi. A.Ü. Dişhek Fak Derg 23:147-152, 1996.
3. Can HE, Bala O, Kayaoğlu G, Alaçam T, Okur H. Yeni bir kök kanal dolgu patının sitotoksitesisi ve genotoksitesisinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. G.Ü. Dişhek Fak Derg 19:23-27,2002.
4. Can HE, Bala O, Kayaoğlu G, Okur H. Cam iyonomer esaslı eki kök kanal dolgusunun sitotoksitesisi ve genotoksitesisinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. G.Ü. Dişhek Fak Derg 19:1-8,2002.
5. Craig RG, Ward ML. Restorative dental materials, 10th ed., The C.V. Mosby Co., St Louis, 1997,146-151.
6. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. Dental Technol 57 : 650-658, 1987.
7. Edgerton M, Levine JM. Biocompatibility: Its future in prosthodontic Research. J Prosthet Dent 69:406-415, 1993.
8. Exbrayat P, Magloire H, Hartman DJ. Evaluation of the biocompatibility of a Ni-Cr-Mo dental alloy with human gingival explant culture *in vitro* morphological study, immunodetection of fibronectin and collagen production. Biomater 8 : 385-392, 1987.
9. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: A Review Dent Mater 12: 186-193, 1996.
10. Hensten-Fetersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity in. End J 21:89-99, 1988.
11. Hochman N, Zalkind M. Hypersensitivity to methyl methacrylate mode of treatment. J Prosthet Dent 77:93-96,1997.
12. Hume WR. A New Technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. J Dent Res 6:1322-1325, 1985.
13. Jøge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: Effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. Int J Prosthodont 17: 340-344,2004.
14. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M. Biological testing of den-

- tal materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 18 :443-446,1986.
15. Lefebvre AC, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent* 72:644-650, 1994.
 16. Lefebvre AC, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent* 71:178-185,1994.
 17. Mckinsty RE, Zini I. How to make microwaveable denture flasks. *J Prosthet Dent* 63 : 104-114, 1990.
 18. O'Brien WJ. *Dental Materials: Properties and selection*, 1st ed., Chicago., Quintessence Publishing Co. Inc, 1989.
 19. Ogle RE, Sorensen SE, Lewis EA. A New visible light-cured resin system applied to removable prosthodontics. *J Prosthet Dent* 56: 497-506, 1986.
 20. Sanders JL, Levin B, Peitz PV. Comparison of the adaptation of acrylic resin cured by microwave anergy and conventional waterbath. *Quint Int* 22 : 181-186, 1991.
 21. Schmalz G. Agar Overlay Method. *Int Endod J* 21: 59-66, 1988.
 22. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre AC, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 10: 73-77, 1997.
 23. Shlos Berg SR, Goodacre CJ, Munoz CA, Moore KB, Schnell RC. Microwave energy polymerization of poly (Methylmethacrylate) denture base resin. *Int J Prosthodont* 2 : 453-458, 1989.
 24. Stysiak DZ. Experimental investigations on the cytotoxic nature of methyl methacrylate *J Prosthet Dent* 44 :13-16,1980.
 25. Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests in situ polymerised resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 45: 214-222, 1999.
 26. Technical Report: Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry, ISO No :7405:1997(E).
 27. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 71: 618-624, 1994.
 28. Turk MD, Richarods MW. Microwave processing for denture relines, repairs, and rebase. *J Prosthet Dent* 69 : 340-343, 1992.
 29. Wei JB, Shidaker T, Hawley MC. Recent progress in microwave processing of polymers and composites. *Polym Sci* 4 : 18-23, 1996.
 30. Wennberg A. In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials the millipore filter method. *Int End J* 21:67-71,1988.
 31. Zaimoğlu A, Can G, Ersoy E, Aksu L. *Diş Hekimliğinde Maddeler Bilgisi*, 1. Baskı, A.Ü. Ankara, 1993.
 32. Winkler S. Denture base resins, *Dent Clin North Am* 28 : 287-297, 1981.

Yazışma adresi

Dr. Gülfem ERGÜN
Süslü sok. No: 14/9
Tandoğan Mebusevleri / ANKARA
Tel: 212 62 20 - 374
E-posta : gulfem@gazi.edu.tr