

METİL METAKRİLAT MONOMERİN FİBROBLASTLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Cemalettin KÖKÜUSLU*, Arife DOĞAN**, Bülent BEK***,
Nalan KARADEMİR****, Erol DEMİREL*****

ÖZET

Saf metil metakrilatın fibroblastlarda sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan bu çalışmada, 10-12 günlük civciv embriyosu kalbi fragmanları kullanıldı. Asılı damla metoduyla hazırlanan doku kültürleri, faz kontrast ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Metil metakrilat monomeri (MM), 0.0025, 0.005 ve 2 mg/ml. olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulandı. İlk doz uygulanımı sonucunda, periferde az sayıda hücre dissosiasyonu ve hücre sitoplazmalarında vakulizasyon gözlemlendi. 0.005 mg/ml. dozajında, hücre üremesinin devam etmesine karşın, hücre dejenerasyonunda artış görüldü. 2 mg/ml. dozajında ise, hücrelerin demetsel biçimde üreme yerine dissosiyeye ve separe hücreler halinde oldukları belirlendi. Bu hücre sitoplazmalarında yoğun vakuolizasyon oluştuğu ve daha sonra nekrotik kütleler haline dönüştükleri gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler : Metil metakrilat monomeri, fibroblast, sitotoksite.

(*) A.Ü. Vet. Fak. Patoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.

(**) G.Ü. Dişhek. Fak. Protetik Diş Ted. Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(***) G.Ü. Dişhek. Fak. Protetik Diş Ted. Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

(****) A.Ü. Vet. Fak. Patoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi.

(*****) G.Ü. Dişhek. Fak. Protetik Diş Ted. Anabilim Dalı, Prof. Dr.

SUMMARY

THE IN VITRO EVALUATION OF THE INFLUENCE OF METHYL METHACRYLATE MONOMER ON FIBROBLASTS

In this study, in order to determine the cytotoxic effect of pure methyl methacrylate on fibroblasts, heart fragments of 10-12 days chick embryos were used. Tissue cultures prepared by hanging drop method were evaluated by phase contrast and light microscopes. Methyl methacrylate were applied in three different concentrations as 0.0025, 0.005, 2 mg/ml. The application with 0.0025 mg/ml. concentration caused small number of celi dissociation on the periphery and vacuolization in these celi cytoplasms. In 0.005 mg/ml. dosage, increase in celi degeneration was reported, however celi reproduction continued. In 2 mg/ml. dosage, instead of bunch-type reproduction, cells dissociated and became separate cells and intensive vacuolisation in their cytoplasms was observed, then they became necrotic debris.

Key "Words : Methyl metacrylate monomer, fibroblast, cytotoxicity.

GİRİŞ

Akrilik resinlerin dişhekimliğinde kullanılmaya başlanmasından bu yana bu materyallerden yapılan protezlere karşı hipersensivite ve lokal doku reaksiyonları bildirilmiş; metil metakrilat monomeri primer irritan olarak sorumlu tutulmuştur. Araştırmalar daha çok polimerize edilmiş akrilik materyaldeki rest monomer miktarı ve onun seviyesini etkileyen faktörleri belirlemek için yapılmıştır (1-7). Klinik olarak reaksiyon gösteren vakalarda epimukoza ve epikütan testler uygulanmış; klinik ve deneysel çalışma bazında canlı dokulara ilişkin monomer sitotoksitesi ile ilişkili çalışmalar sınırlı kalmıştır (7, 8). Oysa dental materyalin kimyasal, fiziksel ve mekanik niteliklerinin yanısıra biyolojik uyumu da önemlidir. 1955'den bu yana araştırmacılar dental maddelerde toksisiteyi değerlendirmek için doku kültürü metodundan faydalanmışlar; biyolojik sistemlerde kullanılan materyalin biyolojik adaptasyonunu tesis etmede değerli olduğu görüşüne varmışlardır (9). Danilewicz-Stysiak (8), 11 günlük civciv embriyosu kalbinden hazırladığı hü-

re kültürlerine değişik dozlarda metil metakrilat ve protetik akril likidi uygulandığında hücre gelişiminde nekroza kadar değişen dejenerasyonlar saptamıştır. Protetik akril likidi ile yaptığı çalışmalarda minimal toksik ve letal doz değerlerini saf metil metakrilat monomerinkinden daha düşük olarak bulmuş ve bunun nedenini protetik akril likidinin üretimi sırasında akril likidine ilave edilen komponentlere bağlamıştır.

Bu araştırmanın amacı, protetik tedavide geniş kullanım alanı olan akrilik resin likidinin esas yapısını oluşturan metil metakrilat monomerinin fibroblastlar üzerindeki etkisini doku kültüründe incelemektir.

MATERYAL VE METHOD

Metil metakrilat monomerin (MM) fibroblastlar üzerindeki etkisini incelemek amacı ile asılı damla metodu uygulandı. Çalışmada 10-12 günlük civciv embriyosu kalbi fragmanları, horoz plazması, Eagle vasatı ve Eagle vasatı ile hazırlanmış olan 0.0025, 0.005 ve 2 mg/ml. dozlarında metil metakrilat monomeri (Aldrich Chemical Co. Ltd.) bu araştırmanın materyalini temin etti. Gerek heparin ve gerekse MM'in ve vasatın explant üzerine ilave edilmesi için 1 no'lu enjektör iğnelerinden yararlanıldı.

Horoz plazmasını elde etmek için, serum fizyolojikle hazırlanmış olan % 0.1'lik heparin solüsyonundan (Sigma Chemical Co., St Louis) 10 cc. kana 0.4 cc. miktarı kullanıldı.

Asılı damla metodu : Lamel üzerine enjektör ile bir damla horoz plazması konulup bunun yayılması sağlandıktan sonra civciv embriyosu kalbinden elde edilen bir fragman (eksplant) plazma koagulumu içine yerleştirildi. Daha sonra eksplant üzerine bir damla vasat ve bir damla da vasatla dilue edilmiş olan MM kondu. Lameller maximov lamalarına ters olarak kapatıldı ve asılı damlanın oluşturulması sağlandı. Lamellerin kenar kısımları sıvı parafinle kapatıldı. Bu şekilde 3 ayrı dozda MM'li kültürler ile kontrol kültürler 37°C'lik etüvde 3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda bütün lameller Giemsa boyası ile boyandılar. Hücrelerin incelenmesi için faz kontrast mikroskobu (PM-7) Olympus-Tokyo, Japan) ve ışık mikroskobu (Leitz Wetzlar, W. Germany) kullanıldı.

METİL METAKRİLAT MONOMERİN FİBROBLASTLAR ÜZERİNE ETKİSİ

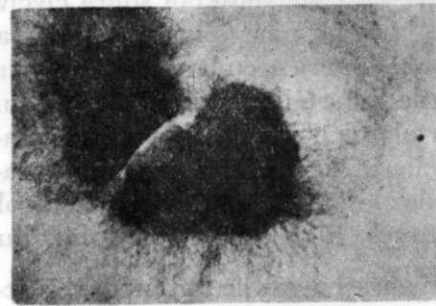
Bu laboratuvar çalışmasında hazırlanan fibroblast kontrol kültürleri ile değişik dozlardaki MM'li fibroblast kültürlerinin sayıları Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1 - Metil metakrilat monomer (MM) ile muamele edilen fibroblast kültürleri.

| MM Dozları | Kontrol kültür sayısı | MM kültür sayısı |
|-----------------|-----------------------|------------------|
| 1 0.005 mg/ml. | 1 | 6 |
| 2 mg/ml. | 1 | 4 |
| 2 0.005 mg/ml. | 2 | 7 |
| 2 mg/ml. | 2 | 5 |
| 3 0.005 mg/ml. | 2 | 9 |
| 2 mg/ml. | 1 | 8 |
| 4 0.0025 mg/ml. | 4 | 10 |
| Toplam | 13 | 49 |

BULGULAR

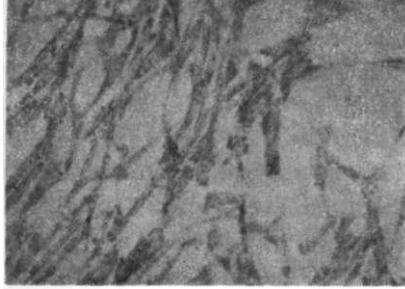
Metil metakrilat monomerin 0.0025 mg/ml'lik dozda uygulanması ile meydana gelen değişiklikler: Fibroblastlarda kontrol kültürlerdekine oranla az belirgin bir dissosiasyon görüldü. Bütün hücre kültürlerindeki üremeler aynı genişlikteki alanlar içerisinde düzenli ve demetsel yapılar şeklinde idi. Hücreler arasında yer yer mitotik figür gösteren hücrelere rastlandı. Ancak periferdeki az sayıda hücrede dissosiasyon ile bu ayrılmış olan hücrelerin sitoplazmalarında vakuolleşme seçiliyordu (Resim 1, 2, 3).



Resim 1 - Fibroblastların ışınal büyümesini gösteren kontrol kültürü, Giemsa. X35.

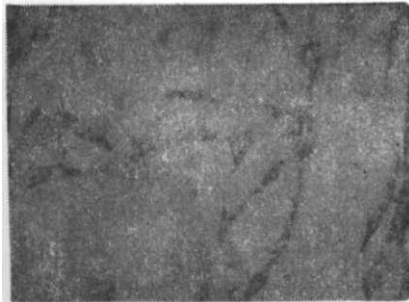


Resim 2 - İğ şekilli hücreleri gösteren normal fibroblastik kültür, Giemsa. X220.

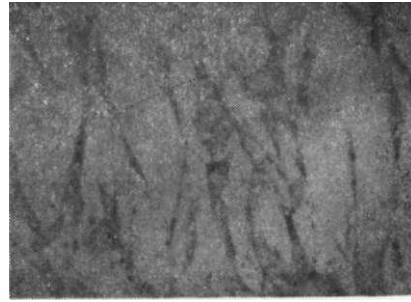


Resim 3 - 0.0025 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. S; to plazmada tek vakuol, Giemsa. X350.

Metil metakrilat monomerin 0.005 mg/ml.'lik dozda uygulanması ile oluşan değişiklikler : Eksplantın periferindeki hücrelerin dissosiyeye olmaya başladıkları görüldü. Bu hücrelerin fusiform yapılarını kayb ettikleri ve geniş sitoplazmalı, poligonal hücreler halini aldıkları dikkati çekti. Sitoplazmalarında çok sayıda vakuol içeren bu hücrelerin, özellikle eksplantın merkezinden uzaklaştıkça dissosiyeye olmaya başladıkları gözlemlendi. Hücrelerin demetsel üreme yerine separe hücreler halinde oldukları gözlemlendi. Bu kültürlerde hücre üremesinin hala devam ettiği ve az sayıda mitotik figür gösteren hücrelerin bulunduğu görüldü (Resim 4, 5).

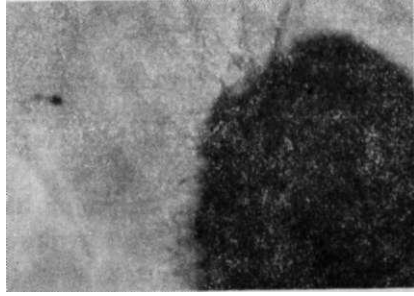


Resim 4 - 0.005 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Dissosiyeye hücrelerde geniş ve poligonal sitoplazma, Giemsa. X220.



Besim 5 - 0.005 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Belirgin vakuolleşme gösteren poligonal hücreler. Giemsa. X350.

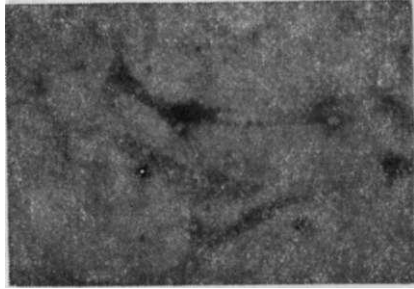
Metil metakrilat monomerin 2 mg/ml.'lik dozda uygulanması ile oluşan değişiklikler : Kültürlerde hücrelerin demetsel biçimde üreme yerine genellikle dissosiasyon gösterdikleri ve separe hücreler halinde oldukları gözlemlendi. Bu hücrelerin genişledikleri ve poligonol sitoplazmah oldukları ve sitoplazmalarında yoğun vakuolizasyon gösterdikleri dikkati çekti. Özellikle merkezden perifer doğru gidildikçe dissosiye olan bu hücrelerin daha sonra yer yer yuvarlak, nekrotik kitleler haline dönüştükleri seçildi, hücre üremesinin durduğu saptandı (Resim 6, 7, 8, 9).



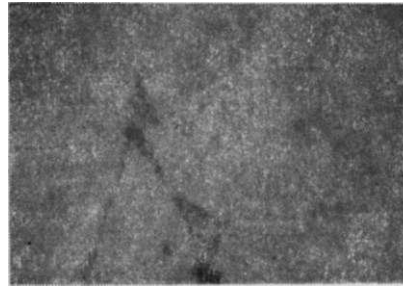
Resim 6 - 2 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Kültür büyümesindeki inhibisyon. Giemsa. X140.



Resim 7 - 2 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Belirgin vakuolleşme dejenerasyonu gösteren geniş sitoplazma». Giemsa. X350.



Resim 8 - 2 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Dissosiasyeye hücrelerde belirgin vakuolleşme dejenerasyonu gösteren çok geniş sitoplazma, Giemsa X560,



Resim 9 - 2 mg/ml. MM içeren fibroblast kültürü. Kültür büyüme işareti yoktur Giemsa. X560.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada fibroblast kültürlerinde metil metakrilat monomerin dozuyla artan oranda hücrelerde görülen dissosiasyon, progresif dejenerasyon, hücre strüktüründe bozulma, sitoplazmalarda vakuol oluşumu, hücre azalması, yıkılanmış hücrelerin nükleuslarında piknozis ile nekrotik değişiklikler, Danilewicz-Stysiak'ın (8) 11 günlük civiv embriolarından hazırladığı kültürlerde görülen bulgularla uyumluluk göstermektedir. MM için minimal toksik doz (0.0025 mg/ml.) ve letal doz (2 mg/ml.) değerleri aynı araştırmacı tarafından da saptanmıştır. Ancak, akril likidi ile aynı çalışmayı tekrarladığında MM için tesbit etmiş olduğu letal ve minimal toksik doz değerlerinin daha düşük olduğunu ve bunun akril likidindeki ilave komponentlerden kaynaklanabildiğini belirtmiştir.

Kallus (4), in vivo çalışmasında monomerin hücre yıkılanması oluşturduğu canlı dokular içinde, kuvvetli bir iritan özelliğe sahip olduğunu saptamıştır. Araştırmacının belirttiği bu dejeneratif bulgularla çalışmamızda saptanan in vitro bulgular arasında benzerlik görülmektedir.

Thomas ve ark. (6), polikarbonat resin, vinil resin ve akrilik resinin biyolojik uyumunu in vivo bir çalışmayla kıyaslamışlar ve histopatolojik değerlendirme sonucunda akrilik resinde en yoğun cevabı almışlardır. Sebebin tam olarak izah edilememesi ile birlikte artık monomer veya akrilik resinin pişirilmesiyle ilgili olabileceğini belirtmişlerdir. Keza, Nakamura ve Kawahara (10), sıcaklık uygulamasıyla polimerize olan resinlerin otopolimerizan materyale oranla biyolojik yönden daha uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuçlar protetik açıdan ele alındığında fazla orandaki rest monomerin doku reaksiyonu başlatması muhtemeldir. Primer iritan olarak bu materyal ve onunla kontaktaki biyolojik fazın etkileşimi hücre anatomisi ve fizyolojisinin değişimine yol açar. Etkileşim ılımlıysa hücreler bunu tolere edebilir, ama eğer daha yüksek konsantrasyonda olduğu gibi şiddetliyse hücreler canlı kalma-yabilir, nekrotik dokuya neden olur (9). Olası reaksiyonlardan rest monomer sorumlu tutulduğunda bunu azaltmak için uygun pişirilmiş sıcak akrilikler, otopolimerizan akrilikle geçici protezler kullanıldığında ise oral mukoza ile yüksek konsantrasyonda monome-

METİL METAKRILAT MONOMERİN FİBROBLASTLAR ÜZERİNE ETKİSİ

rin doğrudan kontağını önlemek için indirekt metodlar direkt metodlara tercih edilmelidir.

K A Y N A K L A R

- (1) Austin AT, Basker RM : The level of residual monomer in acrylic denture base materials. Brit Dent. J. 1980; 149 : 281-86.
- (2) Bitimler VG : Vergleichende untersuchungen über art und menge des restmonomergehaltes bei dem prothesenwerkstoff piacryl IM. Dtsch Stomat 1965 : 651-58.
- (3) Fletcher AM, Purnaveja S., Amin WM, Ritchie GM, Moradians S, Dodd AW : The level of rest monomer in self curing denture base materials. J. Dent. Res. 1983; 62 : 118-20.
- (4) Kallus T : Evalution of the toxicity of denture base polymers after subcutaneous implantation in guinea pigs. J. Prosthet Dent. 1984; 52 : 126-34.
- (5) McCabe JF, Basker RM : Tissue sensitivity to acrylic resin. Brit Dent. J. 1976; 140 : 347-50.
- (6) Thomas GP., Adrian JC, Banks KE., Robinson JA., Peagler FD : Biocompatibility evaluation of resins in hamsters. J. Prosthet Dent., 1985; 53 : 428-30.
- (7) Weaver RE., Goebel WM : Reactions to acrylic resin dental prothesis. J. Prosthet Dent., 1980; 43 : 138-42.
- (8) Danilevicz-Stysiak Z : Experimental investigations on the cytotoxic nature of methyl methacrylate. J. Prosthet Dent. 1980; 44 : 13-16.
- (9) Autian J : The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. Int. Dent. J., 1970; 20 : 481-90.
- (10) Nakamura M., Kawahara H : Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. J., Prosthet Dent., 1984; 42 : 694-99.