

YAPIŞTIRMA AJANI OLARAK KULLANILAN KOMPOZİT RESİNLERİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN AGAR-KAT YÖNTEMİ İLE GİNGİVA HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF COMPOSITE RESIN LUTING AGENTS ON GINGIVAL TISSUE CULTURE BY AGAR OVERLAY METHOD

Gülbin SAYGILI*, Sevil M. ŞAHMALI*, Çakır GÜNEY**

Özet: Restorasyon yapıştırma ajanlarının iç yüzeyleri periodonsiyum ile yakın ilişkide olduğu için bu ajanların biyolojik kabullenimlerinin değerlendirilmesi önemlidir. Bu çalışmada yapıştırma ajanlarının sitotoksik etkileri gingiva fibroblast kültürlerinde direk mikroskopik sitotoksiste ile değerlendirildi. Işınla sertleşen kompozit resinler de ışınlama süresinin sitotoksiste de etkili olduğu görüldü. Kimyasal ve ışınla sertleşen kompozit resinler karşılaştırıldığında mikrofil resin (tam polimerize olmuş) ile kimyasal sertleşen kompozit resinin sitotoksiteleri eş değerde bulundu. En az etki hibrit türü ışınla sertleşen kompozit resinle meydana gelirken en fazla etki tam polimerize olmaması mikrofil resin ile oluştu.

Summary: Because the luting agent interfaces of restorations can approximate the periodontium, it is critical to determine the biocompatibility of luting agents. In this study, the cytotoxic potential of resin luting agents on cultures of gingival fibroblasts was evaluated for direct microscopic cytotoxicity. For light cured composite resin luting agents, the exposure time was found to be significant. To compare the chemically and light cured resins, fully cured microfill resin's cytotoxicity was equal to the chemically cured resin's cytotoxicity. The least cytotoxic effect was occurred with hybrid type composite resin while the profound effect with unpolimerized microfill resin.

G İ R İ Ş

Estetik nedenlere bağlı olarak kompozit resin yapıştırma ajanlarının klinik kullanımı artmıştır (1, 2). Işınla sertleşen yapıştırma sistemleri

* Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi A.B.D. Araştırma Görevlileri.

** GATA Mikrobiyoloji A.B.D., Uzman.

lamine veneer, porselen ve kompozit resin inley veya onleyler için kullanılırken, kimyasal olarak sertleşen ajanlar, resin bağlı sabit bölümlü protezler için endikedir (3). Kompozit resin restoratif materyaller, bakteri mikrosızıntısına veya kompozit resinin toksik ürünlerine bağlı olarak pulpal inflamasyona neden olurlar (3-8). Restorasyonlar için subgingival marjinler yapıştırma alanı olarak seçildiğinde, kompozit resin ve kompozit resinin çözünen komponentleri periodontal dokularla temastadır. Bu temas, marginal uyumsuzluğu olan restorasyonlarda daha da fazladır. Böylece, yapıştırma ajanlarının toksik komponentleri periodonsiyumu da etkilemektedir (3).

Thompson ve ark., polimerize olmamış maddelerin sitotoksik olduğunu göstermişlerdir (7). Kompozit resinlerin materyallerinin çeşitli hücrelere etkisi araştırılmış ve spesifik hücrelerde farklı cevaplar alınmıştır (3).

Çalışmamızda mikrofil ve hibrit türü ışınla sertleşen resinlerle, kimyasal sertleşen resinin ağız dokusundaki gingival fibroblast hücrelerine sitotoksik etkisi incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda yapıştırma ajanı olarak 3 farklı kompozit resin kullanıldı:

1. Işınla sertleşen mikrofil resin (Heliosit 32, Vivadent-Schaan / Liechtenstein).
 - a) Işın süresi 20 sn.
 - b) Işın süresi 40 sn.
2. Işınla sertleşen hibrit resin (Brillant Lux Universal, Coltene A.G. CH-9450, Altstätten / Switzerland).
 - a) Işın süresi 20 sn.
 - b) Işın süresi 40 sn.
3. Kimyasal sertleşen kompozit resin (Express-Alcos Corp. USA).

Yapıştırma ajanlarının örnekleri 1 cm çapında 1 mm kalınlığında diskler şeklinde hazırlandı. Kimyasal sertleşen kompozit resin firmanın önerisine göre yapıldı. Işınla sertleşen kompozit resinler ise, polimerizasyonu tamamlanmamış resinin biyolojik etkilerini de incelemek için iki grup halinde hazırlandı (20 sn, 40 sn). Örnek diskler 24 saat bekletildi ve daha sonra germisidal ultraviyole ile 30 dak. süreyle sterilize edildi.

Gingiva Hücre Kültürünün Hazırlanması:

Yaşları 7-15 arasında değişen genç hastaların sağlam gingiva dokusundan 3-4 mm boyutunda doku alınarak, taşıma vasatı olarak adlandırılan % 2

KOMPOZİT RESİNLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

FCS (Fötal Dana Serum), 200 Unit/ml Penisillin 200 µg/ml Streptomisin içeren Eagle vasatına konuldu. Gingiva hücre kültürünün yapılması için daha önce tarif edilen standart hücre kültüründen yararlanıldı (9). Bunun için önce gingiva dokusu 3 defa PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkanarak steril parçalama tüpüne alındı. Doku ince bir makasla 1-2 mm büyüklüğünde parçalara ayrıldı. Daha sonra kan artıklarından temizlenmek üzere yeniden 3 defa PBS ile yıkandı. % 0.25'lik Tripsin ile karıştırılarak 37 °C'de 1 saat devamlı çalkalanarak tripsinize edildi. Tripsinizasyon sonucunda ayrıışan hücreler santrifüj tüpünde toplanarak üzerine tripsin etkisini azaltmak için % 10 oranında FCS ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek tripsinden kurtarıldı. Tüpün dibinde toplanan hücreler % 10 FCS içeren Eagle MEM vasatında sulandırılarak 100 ml'lik polietilen doku kültürü şişeleri içerisine konularak 37 °C'de inkübe edildi. Gingiva dokusundan ayrılan hücreler 10-14 gün içerisinde yaygın üreme göstererek monolayer oluşturdular. Böylece elde edilen gingiva hücre kültürü seri pasajlar halinde yürütüldü. Agar-Kat yöntemi gingiva hücrelerini 5-10 pasajları sırasında uygulandı.

Şişelerde üretilen gingiva monolayer hücre kültürü tripsinize edilerek Falcon 50 ml hücre kültürü 5 cm çapında petri kutularına hücreler iki günde monolayer yapacak şekilde pasaj edildi. Monolayer hücre kültürü oluştuktan sonra sıvı vasat dökülerek hücreler üzerine aşağıda formülü verilen agar kat vasatı 5 ml olarak ilave edildi.

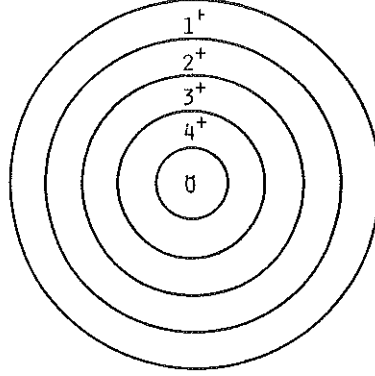
AGAR - KAT VASATI:

2x. eagle MEM vasatı	50 ml.
% 1.8 Noble Agar	50 ml.
Streptomisin Penicillin Sol. (SP)	1ml.
Fötal Dana Serumu (FCS)	5 ml.

Vasatın pH'sı % 8.4'lük NaHCO₃ ile 7.2'ye uyarlandı.

Agar-kat vasatı ilave edildikten sonra ultraviyole altında dezenfekte edilen disklerden herbiri agar vasatının ortasına steril pens yardımı ile yerleştirildi. Kontrol hücrelerine ise herhangi bir madde yerleştirilmedi. Daha sonra hücreler 37 °C'de 5 gün inkübe edildikten sonra mikroskopik olarak incelendiler ve metanol ile fixe edilerek Giemsa Boya Yöntemi ile boyandılar. Herbir petri kutusu, kompozit disk merkezinden petri kutusu duvarına kadar 5 eşit uzaklığa ayrıldı (Şekil 1). Değerler herbir kültür için, parçalanmış hücrelerin kompozit diskten uzaklığına bağlı olarak 0'dan

(toksikite yok) 4⁺e (hücre duvarında maksimum harabiyet) kadar düzenlendi. Meydana gelen toksisite zon çapları bu sisteme göre değerlendirildi.



Şekil 1
Morfolojik toksisite değerleri için doku kültürü şeması.

B U L G U L A R

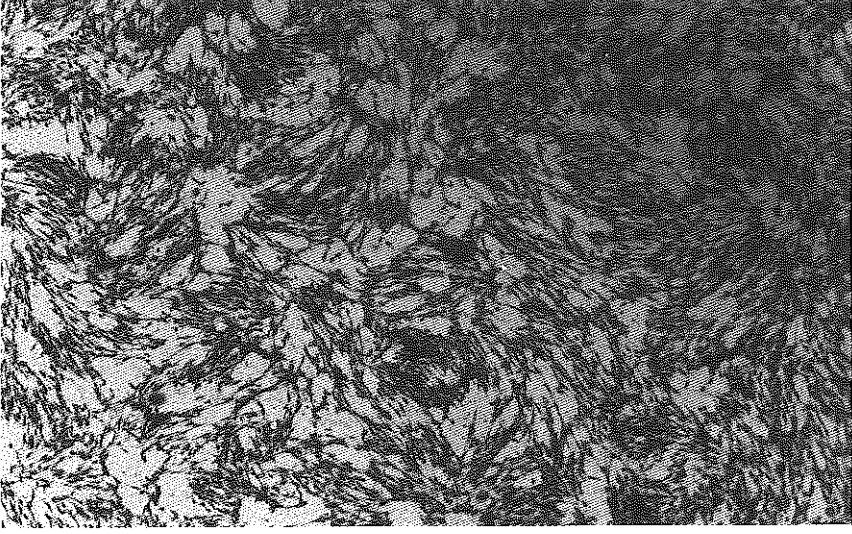
Gingival fibroblastlar üzerine yapıştırma ajanlarının morfolojik toksisite değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1
Gingival Fibroblastlar Üzerine Yapıştırma Ajanlarının
Morfolojik Toksikitesi

Değerler	Örnekler
0	Kontrol
0	Hibrit (40 sn)
0 - 0.5 ⁺	Hibrit (20 sn)
0.5 - + - 1 ⁺	Express
0.5 ⁺ - 1 ⁺	Mikrofil (40 sn)
0.5 ⁺ - 2 ⁺	Mikrofil (20 sn)

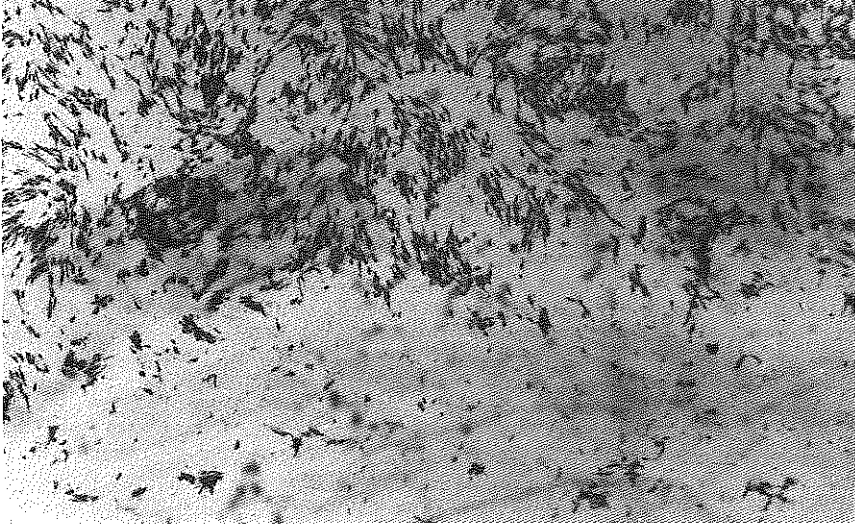
Kontrol grubu fibroblastların mikroskobik görünümü, kimyasal sertleşen kompozit resinin, 20 sn ve 40 sn süreyle ışınlanan mikrofil resinlerin, 20 sn ve 40 sn süreyle ışınlanan kibrit resinlerin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskobik görünümleri sırayla Resim 1, 2, 3, 4, 5 ve 6'da görülmektedir.

KOMPOZİT RESİNLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ



Resim 1

Kontrol grubu fibroblastların mikroskopik görünümü (Orijinal büyütme X 29).



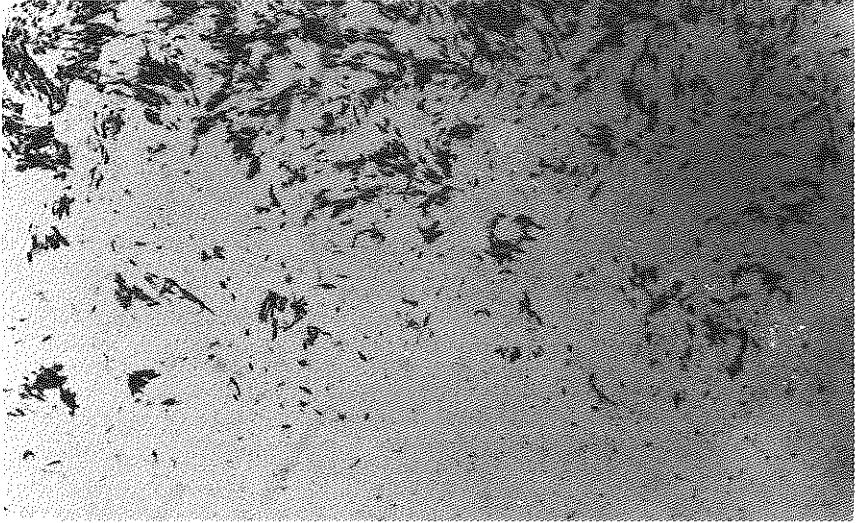
Resim 2

Kimyasal sertleşen kompozit resinin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskopik görünümü (Orijinal büyütme X 29).



Resim 3

20 sn süreyle ışınlanan mikrofil resinin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskopik görünümü (Orijinal büyütme X 29).



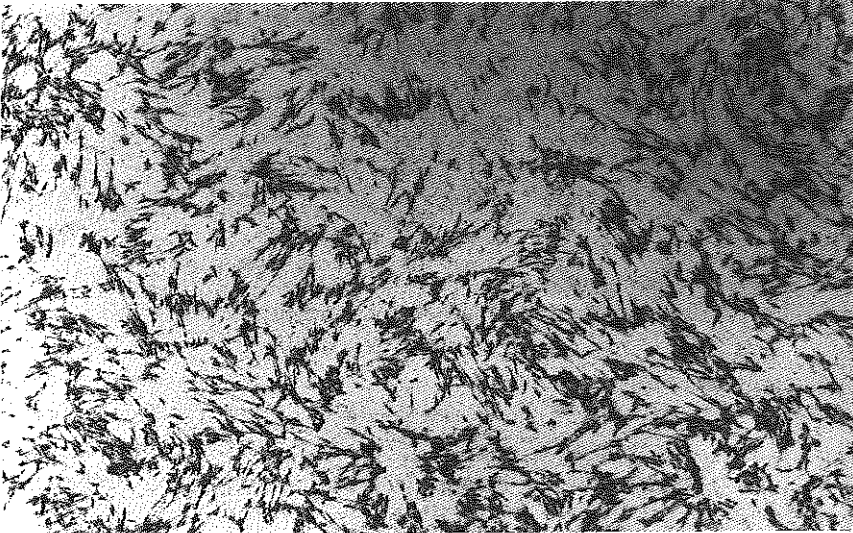
Resim 4

40 sn süreyle ışınlanan mikrofil resinin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskopik görünümü (Orijinal büyütme X 29).

KOMPOZİT RESİNLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ



Resim 5
20 sn süreyle ışınlanan hibrit resinin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskopik görünümü (Orijinal büyüme X 29).



Resim 6
40 sn süreyle ışınlanan hibrit resinin gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik etkilerinin mikroskopik görünümü (Orijinal büyüme X 29).

Test edilen resinlerin toksisite cevaplarına bakıldığında en az toksik etki hibrit türü kompozit resin ile en fazla toksik etki ise tam polimerize olmamış (20 sn) mikrofil resin ile görülmüştür. Kimyasal sertleşen kompozit resin ile tam polimerize olmuş mikrofil resinin toksisite değerleri birbirine yakındır.

T A R T I Ş M A

Restoratif materyallere spesifik hücre tipleri farklı cevaplar vermektedir (3). Sıklıkla yapıştırıcı ajanlar periodonsiyum ile yakın ilişkidedir ve bu nedenle bu dokudaki hücrelere etkileri klinik olarak önemlidir. Sağlıklı periodonsiyum için gingival fibroblastlar kritik hücrelerdir çünkü diş ankraji ve yara iyileşmesi için kollajen yapımını sağlarlar (3).

Çalışmamızda gingival fibroblastlar, genç hastaların sağlıklı dişetinden alınan biopsilerden elde edilen kültürler ile sağlanmışlardır. Bunun amacı, genç sağlıklı diş etinden hazırlanan hücre kültürlerinde fibroblastların erişkinlere oranla daha kolay üremeleri nedeniyledir.

Günümüzde yapıştırma ajanı olarak sıklıkla kompozit resinlerden yararlanılmaktadır. Kimyasal sertleşen kompozitler ve ultraviyole ile sertleşen kompozit resinler incelendiğinde pulpa üzerinde aynı etkileri oluşturduğu gözlenmiştir (7). Bu çalışmada yapıştırma ajanı olarak iki farklı ışınla sertleşen kompozit resin (mikrofil ve hibrit) ile kimyasal sertleşen kompozit resinin sitotoksik etkileri karşılaştırıldı.

Materyallerin sitotoksik etkilerini karşılaştırmak amacıyla hücre kültüründen yararlanıldı. Bu yöntemin seçilme nedeni, materyal tipi ne olursa olsun bu yöntemle incelenebilmesi, çok sayıda test örneğinin kısa bir zaman periodunda test edilebilmesi, sonuçların kısa bir zaman aralığında alınabilmesidir (9).

Işınla sertleşen yapıştırma ajanları 20 ve 40 sn'lik ışınlama süreleri halinde incelendi. Işınlama zamanı faktörünün toksisite üzerindeki etkileri test edildi. Sonuçlar ışınlama süresinin sitotoksisite üzerinde direkt etkili olduğunu gösterdi. Tamamlanmamış polimerizasyon, mikrofil resinlerde derin bir etki oluştururken, hibrit resinin sitotoksitesini çok fazla etkilememiştir. 40 sn'lik ışınlama süresinden sonra hibrit resinlerden fibroblastlar etkilenmezken, mikrofil ve kimyasal sertleşen resinlerden etkilendikleri gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, ışınla sertleşen kompozit resinlerin sitotoksitesisi, ışınlama süresi ile ters orantılı olarak bulunmuştur. Doldurucu (inorganik faz) içeriği düşük olan kompozit resinlerde (mikrofil resin) tamamlanmamış polimerizasyonun etkisi daha fazla iken, doldurucu yüzdesi daha yüksek olan

KOMPOZİT RESİNLERİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İNCELENMESİ

kompozit resinlerde (hibrit resin) tamamlanmamış polimerizasyonun etkisi daha az olarak bulunmuştur. Araştırma sonuçları, Caughman ve ark. yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (3). Tam polimerize olmuş hibrit türü kompozit resin, hücresel ataşmanı bozmayan ve en az sitotoksosite oluşturan kompozit tipi olarak bulunmuşsa da tam inert olduğunu ileri sürmek için morfolojik toksisite deneyleri yanında farklı hücresel cevapların da incelenmesi gerekmektedir.

T E Ş E K K Ü R

Bu çalışmadaki değerli yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Strang R, Mc Crossan J, Muirhead M, Richardson SA: The Setting of Visible-light-cured resins beneath etched porcelain veneers. *Br Dent J*, 156: 209-215, 1985.
2. Blackman R, Barghi N, Duke E: Influence of ceramic thickness on the polymerization of light-cured resin cement. *J Prost Dent*, 63: 295-300, 1990.
3. Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Shuster GS: Glass ionomer and composite resin cements. Effects on oral cells. *J Prost Dent*, 63: 513-521, 1990.
4. Stanley HR, Swerdlow H, Buonocore MG: Pulp responses to anterior restorative materials. *J Am Dent Assoc*, 73: 132-141, 1967.
5. Stanley HR, Bowen RL, Folio J: Compatibility of various materials with oral tissues II: Pulp responses to composite ingredients. *J Dent res*, 58: 1507-1517, 1979.
6. Hanks CT, Anderson M, Craig RG: Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol*, 10: 101-112, 1981.
7. Thompson LR, Miller EG, Bowles WH: Leaching of unpolymerized materials from orthodontic bonding resin. *J Dent Res*, 61: 989-992, 1982.
8. Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvik Kleven IJ: Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res*, 67: 1289-1294, 1988.
9. Autian J: The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. *Int Dent J*, 20: 481-490, 1970.