

## FARKLI TİPTEKİ ALJİNAT DENTAL ÖLÇÜ MADDELERİNİN SİTOTOKSİSİTE YÖNÜNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

### CYTOTOXICITY EVALUATION OF DIFFERENT TYPES OF ALGINATE DENTAL IMPRESSION MATERIALS

Dt.M.Emre COŞKUN\*

Dr.Hakan AKIN\*

Yrd.Doç.Dr.Zübeyde AKIN POLAT\*\*

Prof.Dr.A.Kemal ÖZDEMİR\*

#### ÖZET

**Amaç:** Bu in vitro çalışmanın amacı, farklı tipteki aljinat ölçü maddelerini sitotoksosite yönünden değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Farklı tipteki dört aljinat, Cavex CA37, A3KROM, ALGINPLUS FAST ve ORALGHINE, üretici firmaların talimatları doğrultusunda belirtilen oranlarda, serum fizyolojik ile karıştırılarak aljinat numuneleri hazırlandı. Hazırlanan numuneler etilen oksit gazıyla steril edildi ve L929 fibroblast hücre serisi kullanılarak elde edilen kültüre yerleştirildi. Agar overley testi kullanılarak sitotoksitenin belirlenmesinde ISO 1999 yılı 10993-5 numaralı protokolü takip edildi.

**Bulgular:** Hücrelerin lizis miktarına göre yapılan puanlama değerleri ORALGHINE ve Cavex CA37 için; 4-4-4-5-5, ALGINPLUS ve A3KROM için; 2-3-3-3-2 olarak tespit edildi. Sitotoksosite değerleri de ORALGHINE ve Cavex CA37 için 4,4, ALGINPLUS ve A3KROM için ise 2,6 olarak bulundu.

**Sonuçlar:** İçerik farklılığına bağlı olarak aljinatların sitotoksosite değerleri farklılık göstermiştir. ORALGHINE ve Cavex CA37'nin belirgin derecede sitotoksik olduğu, ALGINPLUS ve A3KROM'un ise makul derecede sitotoksik olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Sitotoksosite, aljinat.

#### SUMMARY

**Purpose:** The aim of this study was to assess the cytotoxicity of different types of alginate impression materials.

**Material and Method:** Cavex CA37, A3KROM, ALGINPLUS FAST ve ORALGHINE alginate impression materials were used. According to the manufacturer's instructions, alginates were mixed with serum physiological to obtain alginate specimens. Specimens were performed in sterile with ethylene oxide gas and then placed on to the L929 fibroblast cell culture. According to the 1999 ISO 10993-5 protocols, cytotoxicity were determined by means of agar overley test.

**Results:** According to the lisis of the cells, ORALGHINE and Cavex CA37; 4-4-4-5-5, ALGINPLUS and A3KROM; 2-3-3-3-2 were determined. Values of the cytotoxicity were determined 4,4 for ORALGHINE and Cavex CA37, whereas 2,6 for ALGINPLUS and A3KROM.

**Conclusion:** Cytotoxicity degree of the alginates were different because of the composition of the alginates. It was determined that ORALGHINE and Cavex CA37 were severely cytotoxic, ALGINPLUS and A3KROM were moderately cytotoxic.

**Key words:** cytotoxicity, alginate.

#### GİRİŞ

Dental ölçü maddeleri sert ve yumuşak dokuların negatiflerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır.<sup>1</sup> Kullanılan bu ölçü maddeleri (EEC) kriterlerine göre sınıf I medikal ekipman sınıfında yer almaktadır. Dolayısıyla sınıf I medikal ekipman sınıfında yer alan bir malzeme grubunun biyoyoumluluk yönünden değerlendirilmesinde sitotoksosite testi en temel unsur olmaktadır.<sup>2,3</sup>

Günümüzde aljinat özellikle anatomik model elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir ölçü maddesidir. İçeriğindeki aljinik asidin Na ve K tuzu esas reaktif maddedir ve su ile sol oluşturup çapraz bağlantı oluşturarak jel haline dönüşür. Alçı taşı (CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)

ise aljinat zincirlerinin çapraz bağlantısına neden olan Ca<sup>+</sup> iyonlarının kaynağıdır. Aljinatın çalışma zamanının ayarlanması amacıyla sodyum fosfat (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) kullanılır. İnert dolgu (diatome toprağı) aljinata kıvamını veren ve manüplasyonunu kolaylaştıran maddedir. Üretici firmalara ve aljinatın tipine göre bu bileşenlerin oranlarında farklılıklar görülebilir. Bazı aljinatlar diğerlerine göre daha akışkandır. Çünkü daha az dolgu maddesi içerirler. Bazıları daha hızlı sertleşirler. Çünkü daha az trisodyum fosfat ihtiva ederler.<sup>4</sup> Bu maddeler diş hekimliğinde birçok alanda sıklıkla kullanılan maddelerdir. Kazara inhale edilmeleri ve yutulmaları sonucunda akciğerlerde ya da sinüslerde enflamasyona neden olabildikleri bilinmesine rağmen sitotoksik özellikleri konusunda çok fazla bir bilgi bulunmamaktadır.<sup>5</sup>

\* Cumhuriyet Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi, Protetik Diş Tedavisi AD. Sivas

\*\*Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma Merkezi. Sivas

Dental aljinat ölçü maddeleri, hızlı sertleşen, tip 1 ve normal sertleşen, tip 2 olmak üzere iki tiptir.<sup>6</sup> Tip 1 aljinatlar, yaklaşık 2 dakika sertleşme süresine sahipken, tip 2 aljinatlarda bu süre çok daha uzundur.

Bu çalışmanın amacı, dental ölçü maddesi olarak kullanılan farklı tiplerdeki aljinatları, sitotoksiste yönünden değerlendirmektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Cavex CA37 (Cavex Holland BV, Haarlem, Hollanda), A3KROM (Vada, San Severo, İtalya), ALGINPLUS FAST (Major Dental, Torino, İtalya) ve ORALGHINE (Tıssı Dental, Milano, İtalya) aljinat ölçü maddeleri kullanıldı. Aljinatların genel özellikleri tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan aljinat ölçü maddelerinin genel özellikleri. (Üretici firmalar tarafından, 23°C’deki deiyonize su ile ölçülmüştür)

	Cavex CA37	A3 KROM	ALGINPLUS	ORALGHINE
Üretici firma	Cavex	Vada	Major	Tıssı
Tip	Tip 2	Tip 1	Tip 1	Tip 1
Toz/su oranı (gr / ml)	21.2 / 46	18 / 40	19 / 40	18 / 40
Karıştırma süresi (sn)	30	45	35	45
Toplam çalışma süresi (dak)	2	1.35	1.20	2.30
Toplam sertleşme süresi (dak)	3.30	2.35	2	3

Aljinatlar, üretici firmaların kullanma talimatlarında belirtilen su ve toz oranları ölçüsünde karıştırıldı. Kullanılan sudaki kimyasal maddelerin testin sonucuna etki etmemesi için izotonik sodyum klorür solüsyonu (Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Karıştırılan aljinatlar, daha önceden hazırlanan akrilik kalıplar içerisine yerleştirildi. Böylece 7 mm × 2 mm boyutlarında diskler şeklinde aljinat örnekler hazırlandı. Aljinatların her birinden 3’er adet toplam 12 adet örnek hazırlandı. Hazırlanan örnekler etilen oksit gazı ile steril edildi.

**Hücre Kültürü:** Çalışmamızda, ŞAP Enstitüsü Hücre Kültür Koleksiyonuna (HÜKÜK) ait L929 fibroblast hücre serisi kullanıldı. Hücrelerin üretildiği besiyeri, Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) içerisine Penicilin-Streptomycin, L-Glutamine ve %10 oranında Fetal Bovine Serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı.

Hücreler, yapışarak çoğaldığı hücre kültür kabında (flask), alanın % 70-80’ini kapladıktan sonra hücreler

steril Fosfat Buffer Saline (PBS) ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. DMEM ilave edilerek hücre süspansiyonu oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonu flasklara bölünerek pasajlandı. Hücre kültür kaplarındaki hücre çoğalması izlenerek bu işlem tekrarlandı ve hücre kültür serisinin devamlılığı sağlandı. Çalışmada, L929 fibroblast hücre serisinin 6 ile 11. pasajları kullanıldı.

**Agar Overlay Testi:** Bu test ile agar tabakası bariyer olarak kullanılarak, aljinat örneklerinden açığa çıkan sızıntı ürünlerinin, indirekt olarak oluşturabilecekleri toksik etkinin belirlenmesi amaçlandı. Agar overlay kullanılarak sitotoksitenin belirlenmesinde ISO 1999 yılı 10993-5 numaralı protokolü takip edildi. Yöntem özetle şu şekilde uygulandı: Her aljinat grubu için etilen oksit ile steril edilmiş 3 adet olmak üzere 12 örnek disk hazırlandı. Bu arada L929 hücreleri yapıştıkları yerden kaldırılarak hücre süspansiyonu hazırlandı. Çapı 3.5 cm olan hücre kültür petrilere  $2.5 \times 10^5$  hücre/ml hücre süspansiyonundan 2 ml ilave edildi. Hücrelerin bulunduğu petrilere  $37\text{ C}^0$  %5  $\text{CO}_2$ ’ li etüvde 24-48 saat süresince inkübe edilerek hücrelerin petri tabanına yapışıp tutunmaları ve petri yüzeyini tamamen kaplayıncaya kadar çoğalmaları beklendi. Daha sonra FBS içermeyen DMEM ile %1’lik agar (Agar, AppliChem GmbH, Almanya) hazırlandı. Agar  $37\text{ C}^0$  ye soğuduktan sonra %20 oranında FBS eklenerek besiyeri aspire edilen petrilere 0.5 ml dağıtıldı. Jel donduktan sonra orta kısmına aljinat örnekleri yerleştirildi. Pozitif örnek olarak fenol emdirilmiş, negatif kontrol olarak DMEM emdirilmiş filter kağıtları kullanıldı.  $37\text{ C}^0$ ’de %5  $\text{CO}_2$ ’ li etüvde 24 saat inkübasyondan sonra hücreler mikroskopik ve makroskopik olarak değerlendirildi.

**Toksik Cevap:** İnkübasyon süresi sonunda sitotoksik cevap inverted mikroskopta değerlendirildi. Hücrelerin lizis miktarına göre puanlama yapıldı. Buna göre:

- 0 = belirlenebilen hücre lizis yok;
- 1 = hücrelerin %20’sinden azı lizis olmuş;
- 2 = %20 ile %40 hücre lizisi var;
- 3 = hücre lizisi 40% ile 60% arasında;
- 4 = hücre lizisi 60% ile 80% arasında;
- 5 = %80’den fazla hücre lizis olmuş.

Her örnek için üç ölçümün ortalaması elde edildi. Sitotoksiste ise aşağıdaki şekilde sınıflandırıldı<sup>7</sup>:

0-0.5=sitotoksik değil; 0.6-1.9=orta derecede sitotoksik; 2.0-3.9=makul derecede sitotoksik; 4.0-5.0=belirgin derecede sitotoksik.

## BULGULAR

Araştırmalarımız sonucunda, hücrelerin lizis miktarına göre elde edilen test sonuçları ve sitotoksiste sonuçları tablo 2' de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Aljinat numunelerinin sitotoksiste test sonuçları.

Aljinat	Lizis sonuçları	Sitotoksiste değeri	Sitotoksiste sonucu
Cavex CA37	4-4-4-5-5	4,4	Belirgin derecede sitotoksik
ORALGHİNE	4-4-4-5-5	4,4	Belirgin derecede sitotoksik
ALGINPLUS	2-3-3-3-2	2,6	Makul derecede sitotoksik
A3KROM	2-3-3-3-2	2,6	Makul derecede sitotoksik

ORALGHİNE ve Cavex CA37'nin belirgin derecede sitotoksik olduğu belirlendi. ALGINPLUS ve A3KROM'un ise makul derecede sitotoksik olduğu görüldü.

Pozitif kontrolün lizis indeks skoru 5 (belirgin derecede sitotoksik) olarak belirlenirken, negatif kontrolün lizis indeks skoru 0 (sitotoksik değil) olarak belirlendi.

## TARTIŞMA

Ölçü maddeleri medikal ekipman sınıfına dahil oldukları için biyoumlulukları yönünden sitotoksik inceleme kaçınılmaz bir gereksinimdir.<sup>2,3</sup> Bütün ölçü maddeleri dışarıda karıştırılıp hazırlandıktan sonra ağız içerisine uygulanıp dokularla temasa geçerler. Bu şartlar altında kullanılan bu maddeler hücrelere toksik olabileceği gibi dokular üzerinde hassasiyet de oluşturabilmektedir. Kullanılan dental materyallerin bioumluluklarını değerlendirmede birçok yol bulunmaktadır. In vitro sitotoksiste test yöntemleri, kolay olması, tekrar edilebilmesi, maliyetinin düşük olması ve dental ölçü maddelerinin temel biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için uygun olması nedenleriyle sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>8</sup> Bu yöntemlerde, L929 fibroblast hücreleri en çok tercih edilen doku tipi olarak karşımıza çıkmaktadır.<sup>9-11</sup>

L929 hücreleri üzerinde 24 saatlik bir inkübasyon süresi sonrasında sitotoksiste yönünden değerlendirilen farklı tipteki aljinatların, kimyasal içeriklerine bağlı

olarak sitotoksiste değerleri de farklılıklar göstermiştir. Aljinatların içerdiği kimyasallar ve oranları üretici firmalar tarafından açıkça belirtilmemiştir. Bu nedenle de bu farkın içerdikleri maddelerin hangisinden kaynaklandığı veya hangisinin daha çok etkili olduğu araştırılmamıştır. Literatürde bu konuya açıklık getirebilecek yeterli çalışma mevcut değildir. Sitotoksiste değerlerinin, toplam sertleşme zamanı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Sertleşme zamanı daha kısa olan aljinatlar daha az sitotoksik olarak bulunmuştur. ORALGHİNE, tip 1 aljinat olmasına karşın sertleşme zamanı tip 2 aljinalara oldukça yakındır. Bu nedenle de Cavex CA37 kadar sitotoksik bulunmuş olabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda aljinatların ağızda kalma sürelerini mümkün olduğunca kısaltmak faydalı olacaktır. Bu nedenle sertleşme zamanı aljinatlar için çok daha önemli bir özellik olmaktadır.

## SONUÇ

ORALGHİNE ve Cavex CA37'nin belirgin derecede, ALGINPLUS ve A3KROM'un ise makul derecede sitotoksik olduğu belirlendi.

## KAYNAKLAR

1. Lloyd CH, Scrimgeour SN. 'dental materials: 1994 Literature review,' J Dent 1996;24:153-184.
2. Roberta T, Federico M, Federica B, Antonietta CM, Sergio B, Ugo C. Study of the potential cytotoxicity of dental impression materials. Toxicology in Vitro 2003;17:657-662.
3. Polyzois GL, Dahl JE, Hensten-Pettersen A. 'Biological Testing of dental materials: Development of national and international standarts,' J Biomater Appl 1995;9:355-361.
4. McCabe JF. Diş hekimliğinde Maddeler Bilgisi, 1999, s.110-112.
5. Sivers JE, Johnson GK. Adverse soft tissue response to impression procedures: report of case. J Am Dent Assoc. 1988;116(1):58-60.
6. American Dental Association Specification No 18-1992. Alginate Impression Material.
7. International Standard ISO 10993-5. 1999. Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization.
8. Liu CM, Huang FM, Yang LC, Chou LSS, Chou MY. Cytotoxic effects of gingival retraction cords on human gingival fibroblast in vitro. J Oral Rehabil 2004;31:368-372.

9. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys. Dent Mater 1993;9(3):172-176.

10. Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. J Dent Res 1995;74(8):1521-1527

11. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Füreder W, Sperr WR, Sperr W, Ellinger A, Slavicek R, Boltz-Nitulescu G, Valent P. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. J Dent Res 1995;74(8):1513-1520.

**Yazışma Adresi :**

Dr.Hakan AKIN

Cumhuriyet Üniversitesi

Diş hekimliği Fakültesi

58140 Sivas, Türkiye

**Tel** : 0 346 2191010-2758

**Fax** : 0 346 2191237

**E-posta** : dthkn@hotmail.com