

Çene-yüz silikonlarıyla kullanılan renklendirme pigmentlerinin sitotoksisiteleri

Arzu Atay (*), Ali Uğur Ural (**)

ÖZET

Çene-yüz protezlerinin temel malzemesi olan silikon, hastanın cilt rengine göre çeşitli pigmentler kullanılarak renklendirilmektedir. Çene-yüz protezlerinin renklendirilmesinde kullanılan pigmentler başlıca silikon bazlı, su bazlı, yağ bazlı ve kuru pigmentler olarak piyasada bulunmaktadır. Çalışmada farklı renk pigmentleri kullanılarak renklendirilen silikonların sitotoksisitelerinin renklendirilmeyen silikonlarla karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmada; A 2000-1 platinum silikon materyali kullanılarak örnek sayısının 10 olduğu 5 ayrı grup oluşturuldu. Bir grup herhangi bir renklendirme yapılmadan kontrol grubu olarak kullanılmak üzere, diğer gruplar ise dört ayrı boya maddesi kullanılarak renklendirildi. Tüm grupların sitotoksisiteleri L 929 fibroblast hücre kültürü- MTT ölçümü ile invivo olarak araştırıldı. Sonuçlar ANOVA ve t testi kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre renklendirilen silikonların renklendirilmeyen örneklerle sitotoksisiteleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.00000002$). MTT hücre canlılığı ölçümü en azdan çoğa doğru; kuru pigment, yağ bazlı, su bazlı ve silikon bazlı olarak sıralanmaktadır. Ancak elde edilen hücre canlılığı değerleri toksik düzeyde olmadığı için, kullanılan renk pigmentlerinin biyoyoumlu olduğu değerlendirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Çene-yüz silikonu, renklendirme pigmenti, sitotoksisite.

ABSTRACT

Cytotoxicity of the coloring pigments used with maxillofacial silicone
Maxillofacial prosthesis silicone base material is colored using various pigments according to the patient's skin color. Primary color pigments are used in the coloring maxillofacial silicones, silicone base, water base, oil base and dry pigments commercially available. In the study the aim was compared of cytotoxicity between colored and noncolored silicones. A 2000-1 platinum silicone material formed five separate groups. Control group without any colorant pigment and other groups using four different colored pigments. The cytotoxicity of all groups of L-929 fibroblast cell culture was investigated in vivo by measurement of MTT. Results were evaluated using ANOVA and t test. According to the results there were statistically differences between colored and noncolored silicones ($p = 0.00000002$). The measurement of MTT cell viability are listed from less to more; dry pigments, oil based, water based and silicone based. Measurements of cell viability are not toxic level so coloring pigments is considered biocompatible.

Key words: Maxillo-facial silicone, colored pigment, cytotoxicity.

Giriş

Çene-yüz defektleri lokalizasyonları nedeniyle hastada ciddi estetik sorun oluştururlar. Bu estetik sorunun çözümünde plastik cerrahi metotların yetersiz kaldığı vakalarda çene-yüz protezleri devreye girer. Bu nedenle çene-yüz protezlerinin başarısında estetik birinci derecede öneme sahiptir (1-4).

Estetik başarıya ulaşabilmek için protezin çevre dokular ile kontur ve renk uyumunun sağlanması gereklidir. Çene-yüz silikonları gözenekli yapısı ve elastikiyeti nedeniyle cilt dokularına yakın bir görünüme sahiptir. Ancak bu malzemenin şeffaf ve renksiz olması, uygulanacak bölgeye göre renklendirilmesi zorunluluğunu oluşturur (4-7).

Çene-yüz silikonları içsel ve dışsal olmak üzere iki sistemle renklendirilirler. Renklendirme işleminde çeşitli boyalar ve renklendirici pigmentlerden yararlanır. Bu boyalar su bazlı, silikon bazlı, yağ bazlı ve kuru pigmentler halinde piyasada yer almaktadır. Boya maddelerinin içerisinde ana rengi oluşturan renk pigmentleri metal atomlarını içerir (8).

Organizmaya uygulanacak herhangi bir malzemenin seçiminde, organizma üzerinde zararlı bir etkisinin olmaması önemli bir kriterdir. Bu durum biyoyoumluluk (sitotoksisite) testleri ile araştırılır. Bir malzemenin biyoyoumluluğu; dokular ile etkileşimi sonucu hücresel seviyede herhangi bir zararlı etki yaratmadan oluşturduğu biyolojik bir yanıt olarak açıklanabilir (9-20). Bu araştırmalarda hücre kültürü yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında, hücre canlılığını ölçmede kullanılan MTT yönteminde, sarı MTT (3-(4,5-dimethyl-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromür) mitokondriyal enzimler ile mor formazon'a indirgenir ve hücre canlılığı kolorimetrik olarak ölçülür. MTT değerinin yüksek olması incelenen malzemenin bulunduğu hücre kültüründe fazla sayıda hücrenin

* GATA HEH Dış Servisi, Üsküdar/İstanbul
**GATA Hematoloji AD, Ankara

Ayrı basım isteği: Arzu ATAY, GATA HEH Dış Servisi Tıbbiye Cad. Üsküdar/İstanbul
E-posta: arzuatay@gmail.com

Makalenin geliş tarihi: 08.08.2012 • **Kabul tarihi:** 25.09.2012 • **Çevrim içi basım tarihi:** 26.09.2013

canlı kaldığını dolayısı ile malzemenin biyoyumlu olduğunu ifade eder. MTT kolorimetrik yöntem yapımının kolay olması, hassas ölçüm yapabilmesi, kolaylıkla tekrarlanabilmesi ve düşük maliyetli olması nedeniyle hücre kültürü çalışmaları içerisinde sıklıkla tercih edilmesine neden olmuştur (10,11).

Renklendirilmiş çene-yüz silikonları ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle renk koruyucu sistemler üzerinde durulmuş, bu maddelerin sitotoksiteleri ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır (5,6). Buradan yola çıkılarak planladığımız çalışmada sıklıkla kullanılan boya maddeleri ile renklendirilmiş silikon malzemenin MTT hücre kültürü yöntemi ile sitotoksitelerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin hazırlanması

Çalışmada farklı pigmentler ile renklendirilmiş silikonlardan oluşan bir grubun renklendirilmemiş silikonlardan oluşan grupla karşılaştırılması kararlaştırıldı. Kullanılacak olan dört farklı pigment ve renklendirilmeden kullanılacak örnekler için her grupta örnek sayılarınının 10 olduğu beş grup oluşturuldu. Toplam 50 örneğin hazırlanmasında boyutsal standardizasyonu sağlamak için ise; 14 mm çapında, 3 mm kalınlığında mum örnekler hazırlandı ve alçıya alındı (ADA tip IV, Silky-Rock, Whip-Mix Co, Louisville, KY, USA). Ardından bilinen yöntemlerle mum buharlaştırılarak alçı model elde edilmiş oldu (Şekil 1).

Çalışmada, A 2000-1 platinum silikon materyali (Factor II, Inc, Lakeside, Arizona, USA) üretici firma önerileri doğrultusunda 1:1 oranında baz ve katalizör renklendirme öncesi karıştırıldı. 10 örnek renklendirilmeden vulkanize edildi ve kontrol grubu hazırlanmış oldu. Renklendirme için; silikon bazlı boya (Factor II, Inc, Lakeside, Arizona, USA), su bazlı boya (Kryolan GmbH d-13409 Berlin) yağ bazlı boya (Kryolan GmbH d-13409 Berlin) ve kuru pigment

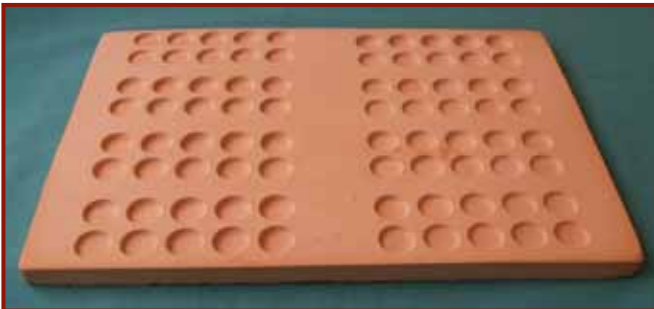
(Kryolan GmbH d-13409 Berlin) malzemelerinden kırmızı renk (magenta) kullanıldı. Boya maddelerine ait detaylı bilgi Tablo I'de yer almaktadır.

Diğer pigmentlerden farklı olan kuru pigmentler ile ilgili standardizasyonu sağlayabilmek için kuru pigment tozu 4/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Hassas tartı ile tüm örnekler hazırlanırken 4 gr silikon malzemeye 4 gr renklendirici katılarak tüm örnekler için standart oran oluşturuldu.

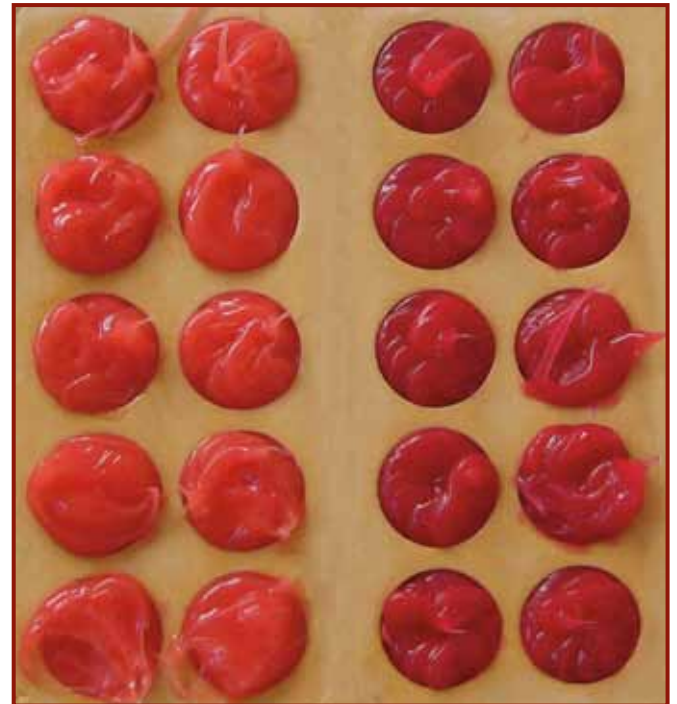
Renklendirme işlemlerinde cam plaka üzerinde paslanmaz çelik siman spatula kullanılarak pigmentler silikon malzemeye karıştırıldı. Elde edilen renklendirilmiş silikon malzemeler özel şırıngalar (Factor2 Inc, Lakeside, AZ) kullanılarak hava boşluğu oluşturulmadan önceden hazırlanan alçı modeldeki boşluklara yerleştirildi (Şekil 2). Alçı modelin üzeri cam plaka ile kapatılarak maksimum yüzey düzgünlüğü elde edildi. Bu şekilde hazırlanan alçı model kuru hava fırınında 165 °C ısıda 4 saat vulkanizasyon amacıyla bekletildi. Vulkanizasyonun ardından silikon örnekler dikkatlice yerlerinden çıkartıldı. Vulkanizasyonla birlikte örneklerin sterilizasyonu da sağlanmış oldu.

Hücre Kültürü Çalışması

Hücre kültürünün oluşturulmasında L-929 maymun fibroblast hücreleri (Alum Institute Culture Collection, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Besi yeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Aldrich



Şekil 1. Standart örnek hazırlamada kullanılan alçı model.



Şekil 2. Renklendirilmiş örneklerin vulkanizasyon öncesi görünümü.

Tablo I. Kullanılan renklendirme pigmentleri ve içerikleri.

Renklendirme pigmentleri	İçerdiği Pigment	Üretici Firma
Silikon bazlı pigment	Demir Oksit	Kryolan GmbH d-13409 Berlin
Su bazlı pigment	Demir Oksit	Kryolan GmbH d-13409 Berlin
Yağ bazlı pigment	Demir Oksit	Kryolan GmbH d-13409 Berlin
Kuru pigment	Demir Oksit	Factor II, Inc, Lakeside, Arizona

Cheme, Germany) içerisine M L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomycin ve fetal bovine serum ilave edildi. Doku kültür kabının ağzı hafif açılarak %5'lik CO₂ atmosferde 37°C'de inkübatöre hücrelerin üremesi için konuldu. Bu şekilde fibroblast hücre kültürü elde edilmiş oldu. Bir sonraki aşamada 24'lük doku kültür kabının her bir kuyucuğuna 5x10⁴ gelecek şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. Hazırlanan örnekler her kuyucuğun tam ortasına gelecek şekilde yerleştirildi. Her bir test örneği üçer kez test edildi. İşlem yapılmamış kültür kontrol grubu olarak değerlendirildi.

MTT Değerlendirmesi

Mitokondriyal aktivitenin göstergesi olan süksinik dehidrogenaz (SDH) aktivitesi histo-kimyasal bir yöntem olan MTT ile ölçüldü (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Biochrom, Berlin, Germany) (6, 26). 24 ve 72 saatlik ünkübasyon süresinin ardından test örnekleri kültür ortamından alındı ve aynı ortama MTT (5 mg mL⁻¹) solüsyonu eklendi ve tekrar 37°C de 4 saat ünkübe edildi. Sürenin sonunda hücre kültürünün bulunduğu her kutucuktan 200 µl sıvı steril pipetle alındı ve 100 µl isopropyl (0.04 N HCl) içine konuldu. Karanlık ortamda 4 saat bekletildi.

Bu sürenin sonunda 570 nm'lik mikroplate okuyucuda (ELISA Reader-el312e, Bio-Tek, Vermont, USA) MTT değerleri okundu ve ölçümler üç kez tekrarlandı. Elde edilen değerler aşağıda belirtilen denklem ile % olarak hesaplandı. Pozitif kontrol değerleri % 100 olarak kabul edilmiştir.

(1-test örneklerine ait değerlerin ortalaması / pozitif kontrol değerlerinin ortalaması) x 100 (13-16).

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı ve Medical version 9.2.0.1, çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotları (ortalama, standart

sapma) kullanıldı. Tekrarlanan verilerin uyumu için Pearson korelasyon katsayısı ve Bland-Altman analizi tercih edildi. Çalışmaya alınan değişkenler Kolmogorov Smirnov testi ve grafiksel gösterimler, varyasyon katsayısı kullanılarak normallik testleri yapıldı. Veriler normal dağılıma uygun olduğu için bağımsız gruplarda test ve ANOVA (PostHoc:Dunnett t test) test kullanılarak analiz edildi.

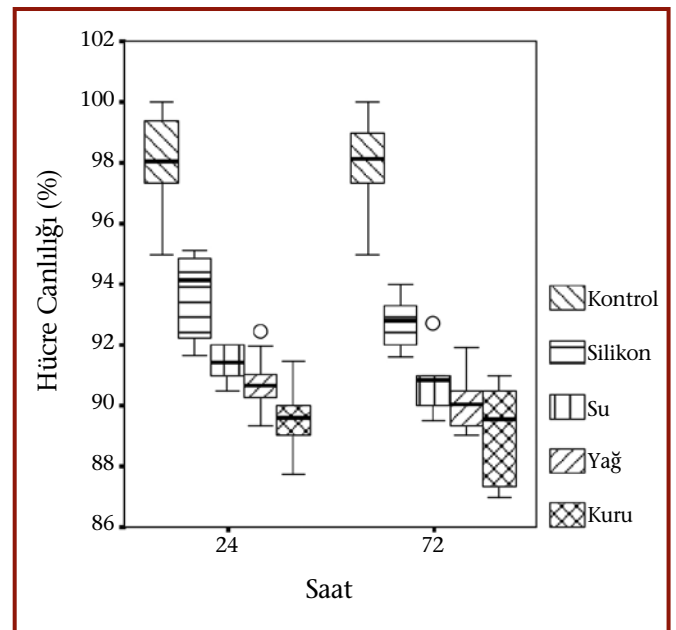
İstatistiksel anlamlılık 0,95 önem düzeyinde p değerinin 0,05'den küçük olması durumunda değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmada tekrarlanan ölçümler istatistiksel olarak incelendiğinde üç tekrarın da uyumlu olduğu görüldü (r>0,85; p<0,05). Tüm tekrarlarda uyum Bland-Altman analizi ile normal sınırlarda bulundu. Elde edilen verilere ait 24 ve 72 saatlik hücre canlılık değerleri Şekil 3'de görülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre bütün pigmentler içerisinde 24 saatte elde edilen hücre canlılık değerlerinin 72 saate göre daha fazla olduğu belirlendi. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo II).

Boya maddeleri içinden kuru pigment ile renklendirilen örneklerde hücre canlılığı en az düzeyde bulundu. Kuru bazlı pigment boyanın 24 saat' te kontrol' e göre % 9,5 değişim görüldü, 72 saatte %9,8 değişim görüldü. Kontrol' e göre değişim yüzdeleri incelendiğinde bunu sırasıyla küçükten



Şekil 3. Elde edilen MTT (hücre canlılık) değerlerinin gruplardaki dağılımı.

Tablo II. Tüm grupların 24 ve 72 saat verilerinin t testi ile karşılaştırılması.

	24 saat	72 saat	p
Kontrol	98,03±1,6	97,9±1,6	0,881
Silikon bazlı pigment	93,65±1,3	92,8±0,9	0,095
Su bazlı pigment	91,40±0,6	90,8±0,9	0,066
Yağ bazlı pigment	90,74±0,9	90,10±1,0	0,153
Kuru bazlı pigment	89,54±1,2	89,1±1,6	0,450

büyüğe doğru yağ bazlı pigment ile renklendirilen örnekler, su bazlı pigment ile renklendirilen ve silikon bazlı pigment ile renklendirilen örneklerdeki hücre canlılığı değerleri takip etmektedir.

Renklendirilmeyen silikonlar ile renklendirilenler arasında hücre canlılık değerleri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo III), (p=0.00000002).

Tartışma

Çene-yüz silikonları, yüz dokularını taklit edebilme ve renklendirilebilme avantajları nedeniyle protez kliniklerinde uzun yıllardır kullanımda olan bir malzemedir (1-7). Saf hali renksiz olan ve renklendirilerek kullanımı zorunlu olan bu tip silikonlar ile yapılan çalışmalar genellikle renk stabilitesi üzerine yoğunlaşmıştır (5,6). Bu nedenle literatürde silikon renklendirilmesinde kullanılan renk pigmentleri ile ilgili yapılmış fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Hekimlerin çene-yüz silikonlarının renklendirilmesinde, genellikle firma önerileri doğrultusunda seçim yapıyor olması ve bu konuda fazla bir araştırma olmaması bizi böyle bir çalışma planlamaya yönlendirmiştir.

Sitotoksikite çalışmalarında MTT hücre canlılığı yöntemi, hassas bir ölçüm yöntemi olması nedeni ile düşük değerlerdeki toksisiteyi bile ölçebilme imkanı

sağlamaktadır. Bunun yanında hızlı sonuç vermesi, uygulanmasının ve dolayısı ile tekrarlanmasının kolay olması gibi avantajlar da taşımaktadır (10,11). Bu nedenle çalışmamızda MTT hücre canlılığı test yönteminin kullanılması tercih edilmiştir.

Literatürde silikonun toksisitesi ile ilgili çalışma sayısı çok azdır. Wolfard (18) ve Polyzois (16,17) fibroblastlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda silikon malzemenin sitotoksik olmadığını belirlemişlerdir. Yine Franca ve ark. (20) ratlar üzerinde farklı silikonlar ile yaptıkları çalışmalarda benzer olarak toksisiteye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak çalışmalarında silikonun renklendirildiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda fibroblast kültüründe sititoksikite çalışması planlamakla beraber bu çalışmalardan farklı olarak pigmentler ile renklendirilmiş silikonlar kullanıldı. Elde edilen sonuçların önceden yapılmış bu çalışmalarla çeliştiği görüldü.

Örneklerin hazırlanmasında içsel renklendirme yapılmış ve ardından ısıyla vulkanizasyonun tamamlanması sağlanmıştır. Nitekim renklendirmeyen silikonlardan oluşan örneklerimizde hücre canlılık değerleri yüksek bulunmuştur. Bu durum silikonun renklendirme pigmenti katılmadan diğer çalışmalarda olduğu gibi biyouyumlu olduğunu desteklemektedir. Ancak renklendirme pigmenti katılan örneklerin hepsinde bu renklendirme yapılmayan grupla istatistiksel anlamlılık düzeyinde fark bulunmaktadır.

Bal ve ark. (19) farklı çene-yüz silikonları ile yaptıkları MTT çalışmasında; hücre canlılık değerlerinin 24 saatte 72 saate göre yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Biz de çalışmada farklı pigmentler ile renklendirilmiş silikonların oluşturduğu, 24 saatlik hücre canlılık değerlerinin 72 saate göre daha yüksek olduğu sonucunu elde ettik. Ancak çalışmamızda Bal ve ark. (19) farklı olarak 24 ile 72 saat arasındaki istatistiksel

Tablo III. Grupların ANOVA ile karşılaştırılması.

			Ortalama Fark	p
24 saat	Silikon bazlı pigment	Kontrol	-4,382	0,00000002
	Su bazlı pigment	Kontrol	-6,63	0,00000002
	Yağ bazlı pigment	Kontrol	-7,297	0,00000002
	Kuru pigment	Kontrol	-8,497	0,00000002
72 saat	Silikon bazlı pigment	Kontrol	-5,169	0,00000002
	Su bazlı pigment	Kontrol	-7,165	0,00000002
	Yağ bazlı pigment	Kontrol	-7,824	0,00000002
	Kuru pigment	Kontrol	-8,875	0,00000002

bir fark bulunmadı. Bu durumun yine renklendirme pigmentlerden kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Çalışma sonuçlarında; renklendirme pigmentlerinin hücrel aktiviteyi engelledikleri ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunun görülmesi ile beraber, hücre kültüründe elde edilen hücre canlılığı değerleri toksik düzeyi (9) ifade etmemektedir. Bu durum renklendirme pigmentlerinin biyoyumlu olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmada; klinik uygulamalarda mutlaka kullanılan ve ana renk malzemelerinde biri olan kırmızı (magenta) tercih edilmiştir. Literatürde renklendirilmiş silikonlarla fazla bir çalışmanın olmaması, elde ettiğimiz sonuçların bu bağlamda önemli olduğunu ve klinisyenlere çalışmalarında yardımcı olacağını düşündürmektedir. Ancak çalışmada kullanılan boyaların aynı etken maddeye sahip olmaları hücrel cevabın benzer olmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Ancak farklı etken maddeli renklendiricilerle detaylı çalışmalar yapılarak renklendirici maddelerin etkinliğinin araştırılması gerektiği değerlendirilmektedir.

Kaynaklar

1. Beumer J, Curtis TA, Marunick MT. Maxillofacial rehabilitation: prosthodontic and surgical considerations. 2nd ed. St. Louis: Elsevier, 1996: 377-436.
2. McKinstry, Robert L. Fundamentals of facial prosthetics. 1st ed. Arlington: ABI Professional Publications, 1995; 1-9.
3. Chen MS, Udagama A, Drane JB. Evaluation of facial prostheses for head and neck cancer patients. J Prosthet Dent 1981; 46: 538-544.
4. Jani RM, Schaaf NG. An evaluation of facial prostheses. J Prosthet Dent 1978; 39: 546-550.
5. Lemon JC, Chambers MS, Jacobsen ML, Powers JM. Color stability of facial prostheses. J Prosthet Dent 1995; 74: 613-618.
6. Haug SP, Andres CJ, Moore BK. Color stability and colorant effect on maxillofacial elastomers. Part III: weathering effect on color. J Prosthet Dent 1999; 81: 431-438.
7. Johnston WM, Ma T, Kienle BH. Translucency parameter of colorants for maxillofacial prostheses. Int J Prosthodont 1995; 8: 79-86.
8. Gary JJ, Smith CT. Pigments and their application in maxillofacial elastomers: a literature review. J Prosthet Dent 1998; 80: 204-208.
9. Edgerton M, Levine JM. Biocompatibility: Its future in prosthodontic research. J Prosthet Dent 1993; 69: 406-415.
10. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. J Prosthet Dent 2000; 84: 229-236.
11. Özen J, Atay A, Topçu F T, Ural A, Dalkız M, Tunca Y. Analysis of the cytotoxicity of four dentin bonding agents on gingival fibroblasts. Turk j Med Sci 2005; 35: 395-399.
12. Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine to dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dent Mater 2002; 18: 318-323.
13. Kokoti M, Sivropoulou A, Koidis P, Garefis P. Comparison of cell proliferation on modified dental ceramics. J Oral Rehabil 2001; 28: 880-887.
14. Polyzois GL, Pettersen AH. Physicomechanical and cytotoxic properties of room temperature vulcanizing silicone prosthetic elastomers. Acta Odontol Scand 1998; 56: 245-248.
15. Tipton DA, Lewis JW. Effects of a hindered amine light stabilizer and a UV light absorber used in maxillofacial elastomers on human gingival epithelial cells and fibroblasts. J Prosthet Dent 2008; 100: 220-231.
16. Polyzois GL, Hensten-Pettersen A, Kullman A. Effects of RTC-silicone maxillofacial prosthetic elastomers on cell cultures. J Prosthet Dent 1994; 75: 505-510.
17. Polyzois GL, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers. J Prosthet Dent 1994; 71: 500-504.
18. Wolfaardt JF, Cleaton-Jones P, Lownie J, Ackermann G. Biocompatibility testing of a silicone maxillofacial prosthetic elastomer: soft tissue study in primates. J Prosthet Dent 1992; 68: 331-338.
19. Bal BT, Yılmaz H, Aydın C, Karakoca S, Yılmaz Ş. In vitro cytotoxicity of maxillofacial silicone elastomers: Effect of accelerated aging. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2009; 89: 122-126.
20. França DCC, Castro AL, Soubhia AMP, Tucci R, Aguiar SMHCA, Goiato MC. Biocompatibility evaluation of 3 facial silicone Elastomers. J Craniofac Surg 2011; 22: 837-840.