

# Citotoksično i genotoksično ispitivanje magnetskih slitina Sm CO<sub>5</sub>

## A Cytotoxic and Genotoxic Study of Magnetic Sm CO<sub>5</sub> Alloys

Vlado Carek  
Magdalena Eger\*  
Ružica Požgaj\*  
Nada Horš\*

Zavod za mobilnu protetiku  
Stomatološkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

\* Institut za medicinska  
istraživanja i medicinu rada,  
Zagreb

### Sažetak

Istraživana je citotoksičnost i genotoksičnost samarij kobalt slitine na eukariotskom indikator organizmu *Saccharomyces cerevisiae* D7 u *in vitro* sistemu i u *in vivo* sistemu mikronukleus-testom na koštanoj srži štakora.

Slitine su inkubirane u 0,01 M fosfatnom puferu na 37°C kroz 48 sati. Stanice iz eksponencijalne i rane stacionarne faze rasta separatno su inkubirane u opisanom puferu na 37°C kroz 2 sata u aerobnim uvjetima. Nakon tretmana stanice su isprane i resuspendirane u puferu, zasijavane na čvrstu hranjivu podlogu za ocjenu preživljavanja i na selektivnu podlogu za ocjenu frekvencije mutacije. Za analizu mikronukleus-testom dvokratno su intraperitonealno injicirani štakori s 2 ml pufera prethodno inkubiranog sa slitinom. Nakon 24 sata životinje su žrtvovane.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ispitivane slitine koje se primjenjuju kao sredstvo retencije u mobilnoj protetici nemaju citotoksične efekte dok su genotoksični efekti u granicama greške eksperimenta.

Ključne riječi: toksičnost slitina, magnetska retencija

Acta Stomatol. Croat.  
1992; 26: 239–244

IZVORNI  
ZNANSTVENI RAD

Primljeno: 27. prosinca 1991.

### Uvod

Dentalnim slitinama mogu se nazvati samo oni materijali koji zadovoljavaju određene uvjete, tj. da su otporni na koroziju u oralnoj sredini i da su netoksični (1). Slitine u odnosu na tkivo mogu pokazivati stanovitu netolerantnost pa ih i iz tog razloga treba podvrgnuti čitavom nizu strogih kontrola kvalitete, kao što je kontrola zajamčene strukture, čvrstoće, elastičnosti, otpornosti na koroziju, dimenzijske analize, netoksičnosti itd. Tek ako udovolji svim tim uvjetima, slitina se može kvalificirati

kao dentalna. Toto i suradnici (2) obratili su posebnu pozornost reakciji kosti i sluznice na implantirane magnete. Becker (3) ističe da nema nikakvih stalnih utjecaja magnetskih slitina na biološke strukture. Ispitujući toksičnost skupine elemenata »rijetka zemlja« autor konstatira da samarij, kao najbitniji element slitine, ne djeluje toksično na tkivo.

Istraživanja Cernyja (4) pokazala su da su magneti i magnetska polja neškodljivi za organizam. Nakon objavljivanja tih rezultata upotreba magneta kao retencijske jedinice postala

je sasvim uobičajena. Iako Sm CO<sub>5</sub> magneti imaju znatno jače privlačne sile od drugih magnetskih retencija (Pt CO, ALNICO magneti), treba im prije kliničke primjene ispitati biokemijska i fizička svojstva da bi se mogli primijeniti u stomatološkoj protetici kao dentalni materijal (4, 5, 6, 7).

Pri odlučivanju o pogodnosti nekoga kemijskog spoja za primjenu u humanoj medicini nužno je testiranje tih supstancija na mutagenost, odnosno genotoksičnost (8). U tu svrhu upotrebljavaju se protokoli atesta koji obuhvaćaju toksičnost spoja i mutagenost na celularnoj razini (bakterije i kvasci) i na razini organizma sisavaca (miševi, štakori) (9).

Iz takvih testiranja dobiva se odgovor na pitanje da li ispitivana supstanca inducira mutacije u neposrednom kontaktu ili putem metabolizma sisavaca, ili ne inducira. Moguće je da supstanca postaje mutagena tek u organizmu sisavaca posredstvom biotransformacijskog procesa. Takva biotransformacija odvija se u stanicama jetre, preko sistema enzima oksidaze.

Ovim radom htjeli smo istražiti djeluje li magnetska slitina Sm CO<sub>5</sub> toksično na stanice kvasca, je li mutagena, odnosno djeluje li toksično na živo tkivo.

## Materijal i postupci

Kao eksperimentalni materijal upotrijebljen je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, D7 (10). To je diploidni mutant stanice kvasca, s dva genetska markera na lokusima *trp 5* (sinteza aminokiseline triptofona) i *Ilv 1* (izoleucin), na kojem se mogu istovremeno pratiti genotoksični učinci kao što su genetska konverzija i reverzna mutacija (9). Životinje, korištene u ovim istraživanjima, bile su albino štakori vlastita uzgoja u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Ispitivane supstancije bile su slitine Sm CO<sub>5</sub>. Ispitivani pripravci slitine imali su oblik valjka, dimenzija 6,85 mm u promjeru i 3 mm visine.

U tu svrhu provedena su slijedeća istraživanja:

### A) citotoksično ispitivanje

1. kinetika diobe stanice tijekom 24 sata u mediju rasta s primjesom slitine primijenjenom u nepoznatoj koncentraciji;

2. koloniformnost tih istih stanica nakon 24-satnog tretmana;

### B) genotoksično istraživanje obuhvatilo je:

1. istraživanje mutagenog efekta citiranih slitina u izravnom kontaktu sa stanicama, bez metaboličke aktivacije;

2. istraživanja na životinjama (štakori), na koštanoj srži femura primjenom mikronukleus-testa.

### A) Eksperimentalni postupak citotoksičnosti

Slitine su najprije oprane u destiliranoj vodi, posušene i stavljene u Erlenmayerove tikvice te sterilizirane u autoklavu na 120°C, pod tlakom od jedne atmosfere, kroz 20 minuta. Nakon hlađenja, na sterilizirane supstancije doliven je hranjivi medij (YEL) za rast mikroorganizama. Medij, zajedno s testiranom slatinom, inkubiran je u termostatskoj tresilici na 37°C kroz 48 sati. Tada je sterilni medij preliven u posude za rast mikroorganizama (aerotore) i odvojen od ispitivane supstancije. U takav sterilni medij inokulirano je 10<sup>6</sup> stanica/ml. Uzorci su stavljani na inkubaciju u termostatsku kupelj na 30°C, u aerobne uvjete, optimalne za rast stanica. Kinetika diobe stanica istraživana je brojenjem stanica u hemocitometru, u vremenskim intervalima od jednog sata tijekom prvih 10 sati i nakon 24 sata inkubiranja (slika 1).

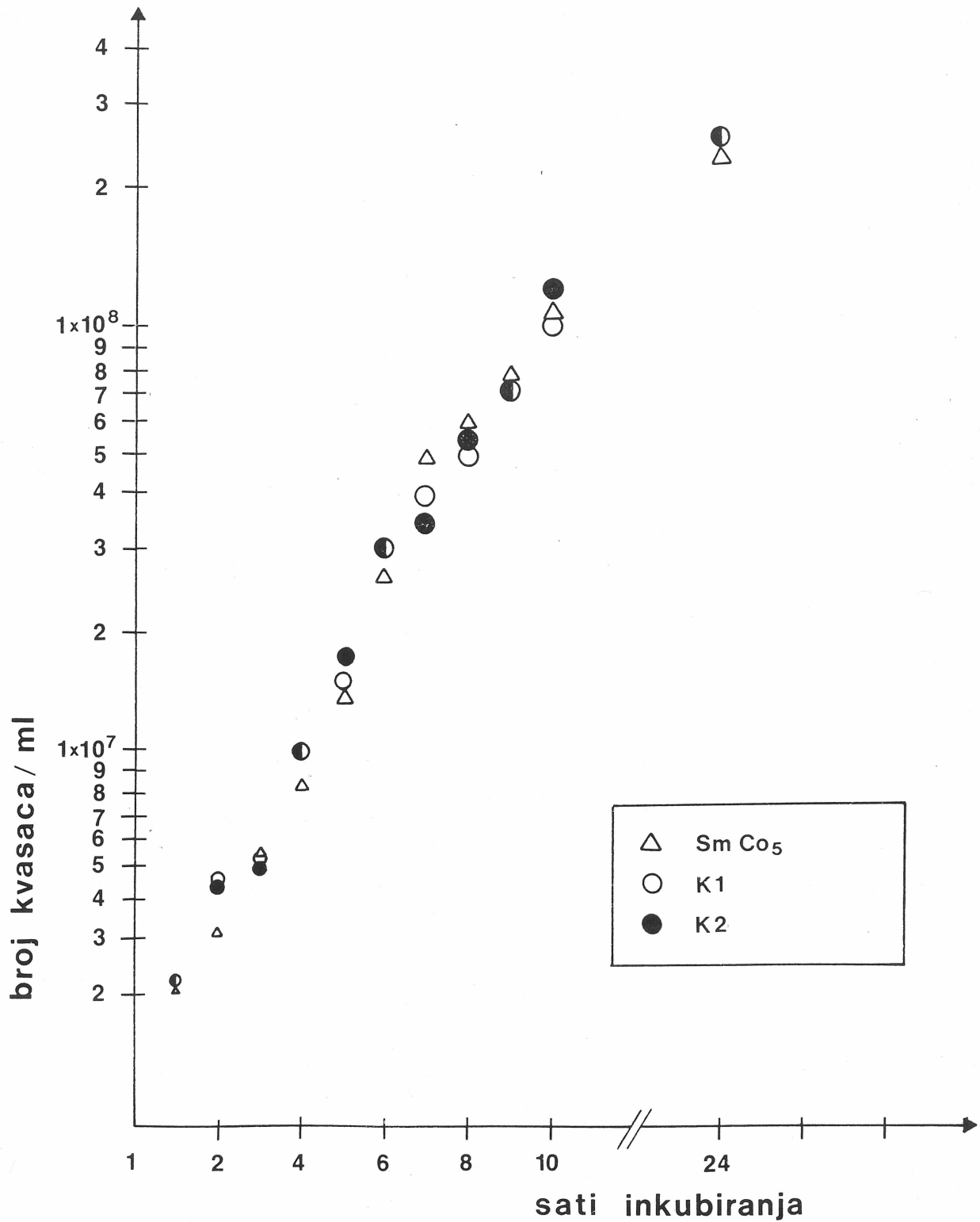
### B) Eksperimentalni postupak genotoksičnosti (mutagenosti)

Slitine su najprije inkubirane separatno u 5 ml 0,01 M sterilnog fosfatnog pufera na 37°C kroz 48 sati. Od svake suspenzije uzeto je 3 x 2 ml, dodane su stanice kvasca prethodno isprane od medija rasta u 0,01 M fosfatnom puferu i svi su uzorci zajedno inkubirani u termostatskoj tresilici na 37°C kroz 2 sata. Da bi se uočile eventualne mutacije, kvasci su se nakon tog tretmana inokulirali na selektivne podloge. Nakon inkubacije u termostatu na 25°C kroz 4–5 dana prebrojene su izrasle kolonije, a matematičkom obradom izražene su kao frekvencija mutacije.

U ovim istraživanjima upotrijebljene su stanice kvasca iz ekspanzionalne i stacionirane faze rasta. Metoda predstavlja istraživanje genotoksičnog efekta supstancije u izravnom kontaktu sa stanicama bez metaboličke aktivacije.

### Mikronukleus-test

Mutageni efekt ispitivanih slitina istraživani su na temelju pojave mikronukleusa u nezrelim



Slika 1. Broj kvasaca u ml. u vremenskom razdoblju od 2–24 sata za Sm CO<sub>5</sub> slitinu

Figure 1. Number of yeasts per ml in a period of 2–24 h for SmCO<sub>5</sub> alloy

eritrocitima u koštanoj srži štakora. Eksperimentalnim životinjama (albino štakori, 200 g teški mužjaci) injicirano je i.p. po 2 ml inkubirane suspenzije slitine. Nakon 24 sata životinje su žrtvovane. Razmazi koštane srži femura preparirani su po Schmidovoj metodi (8). U svakom uzorku pregledano je po 8.000 stanica. Kontrolne životinje dobile su, umjesto suspenzije slitine, 2 ml fiziološke otopine.

## Rezultati

Citotoksičnost Sm CO<sub>5</sub> u usporedbi s netretiranim stanicama nije zamjetljiva u krivuljama rasta kulture. Nijedna od ispitivanih supstancija ne mijenja ritam staničnih dioba od inokuliranja pa do stacionarne faze.

Ima naznaka povišenja frekvencije mutacije za Sm CO<sub>5</sub> kod stanica iz ekspanzijske faze rasta, ali to nije značajno jer se vidi da se i u kontroli 2 (koja je bez ispitivanih supstancija) mutacije neznatno povisuju (tablica 1). Međutim, to je vjerojatno zbog temperature od 37°C, jer povišenja mutacija nema ako se kontrola koloniformnosti inkubira na 30°C. Uspoređujući vrijednosti dobivene sa stanicama iz ekspanzijske faze rasta i stacionarne faze rasta, vidimo da su neznatno osjetljive stanice u ekspanzijskoj fazi rasta.

Tablica 1. Koloniformnost stanice *Saccharomyces cerevisiae* D7 nakon 24-satnog inkubiranja u mediju sa slitinom Sm CO<sub>5</sub>

Table 1. Colonization of *Saccharomyces cerevisiae* D7 cells after 24-h incubation in medium incubated with Sm CO<sub>5</sub> alloys

	Kontrola 1	Kontrola 2	Sm CO <sub>5</sub>
broj stanica	2,6 x 10 <sup>8</sup>	2,6 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>8</sup>
broj kolona	2,2 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>
efikasnost zasijavanja	85%	85%	89%

Isto tako nema razlike u sposobnosti stanica za formiranje vidljivih kolonija koloniformnosti.

Pojava mikronukleusa nešto je povišena, međutim nije značajno pa se stoga ne bi moglo definitivno zaključiti o mutagenosti, već bi to bio prigodan razlog za daljnja istraživanja (tablica 2).

Tablica 2. Pojava mikronukleusa u nezrelim eritrocitima (PCE) u koštanoj srži štakora tretiranih sa slitinom

Table 2. Occurrence of micronuclei in immature erythrocytes (PCE) in bone marrow of alloy-treated rats

Tretman	Ekspozicija (h)	Doza ml/životinji	Broj životinja	Broj stanica	MN/1000 PCE (srednja +/- sd)
Kontrola	24	2 ml fiziol.	4	8.000	1,25 +/- 0,25
Sm CO <sub>5</sub>	24	2 ml	4	8.000	2,25 +/- 0,25

Iz usporedbe vrijednosti frekvencije mutacija koje su prikazane u tablici 3 proizlazi podatak koji pokazuje da ispitivane supstancije ne induciraju mutacije na jednostaničnom sustavu, kvascima.

Tablica 3. Frekvencija induciranih mutacija

Table 3. Frequency of induced mutations

		Eksperimentalne skupine			
		K 1	K 2	Sm CO <sub>5</sub>	S
Frekvencija genske konverzije	Ekspanzijska faza	2,0	2,5	2,80	2,0
	Stacionarna faza	1,8	2,0	1,50	
Frekvencija rezervne mutacije	Ekspanzijska faza	0,02	0,02	0,02	0,2
	Stacionarna faza	0,02	0,03	0,03	

K 1 – kontrola / standardni materijali bez supstancije / inkubirane na 30°C

K 2 – kontrola / standardni materijal bez supstancije / inkubirano na 37°C

S – frekvencija spontanih mutacija

Rezultati su zanimljivi jer su dobiveni na jednostaničnom organizmu (kvascu) koji predstavlja višu organizacijsku formu od bakterija. On je niži eukariot, što znači da se organizacijski nalazi između bakterija i animalnih stanica, pa se i rezultati mogu opravdanije interpolirati na organizam sisavaca odnosno čovjeka.

Ovi rezultati govore posredno da ispitivane supstancije, ovako primijenjene, ne djeluju niti na mehanizam mitoze, niti na mehanizam deoksiribonukleinske kiseline (DNK) tijekom inkubacije od 24 sata (tablica 4).

Tablica 4. Kinetika dioba *Saccharomyces cerevisiae* D7 u mediju inkubiranom sa slitinom  $Sm CO_5$ Table 4. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* D7 fission in medium incubated with  $Sm CO_5$ 

Sati inkubiranja	Kontrola 1	Kontrola 2	
	BROJ STANICA		
0	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
1	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
2	$4,7 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
3	$5,2 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
4	$1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$
5	$1,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
6	$3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
7	$4,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
8	$5 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
9	$7,1 \times 10^7$	$7,2 \times 10^7$	$8 \times 10^7$
10	$1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,07 \times 10^8$
24	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$

## Rasprava

Na temelju ovih ispitivanja može se ustvrditi da  $Sm CO_5$  magneti ne pokazuju ni citotoksičnost ni genotoksičnost odnosno mutagenost.

Obrada i ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti  $Sm CO_5$  magnetske slitine iziskuju posebnu pozornost. Dovodi se u pitanje točnost konačnog rezultata zbog mogućeg utjecaja tehnike pripreme kako eksperimentalnog materijala (*Saccharomyces cerevisiae*), tako i pripreme izbruska ispitivanih dentalnih slitina. Uspoređuju li se ti rezultati s dobivenim vrijednostima što ih iznose Tsutsui i suradnici (12) vidi se da su ispitane slitine netoksične na okolno tkivo. Analizirajući i promatrajući rezultate ovog istraživanja možemo pretpostaviti da ova generacija magnetskih slitina ( $Sm CO_5$ ), koja se primjenjuje kao sredstvo retencije kod stomatoloških mobilnih proteza, ne djeluje ni citotoksično ni genotoksično na živo tkivo.

Ispitivanja koja je obavljao Barnothy (11) sugeriraju da magnetske sile djeluju na živo tkivo te da se ne smije isključiti mogućnost oštećenja dugotrajnim djelovanjem. Već prije je na temelju istraživanja koje je proveo Cerny (4) zapaženo da magneti i magnetska polja ne djeluju toksično na organizam. Rezultati i nalazi dobi-

veni u ovom radu na materijalu pripremljenom po Zimmermannu (13) upućuju na činjenicu da ispitane slitine ne pokazuju niti citotoksične niti genotoksične promjene na organizmima (mutant stanice kvasca, albino štakori). Toto i suradnici (2) obratili su posebnu pozornost reakciji kosti i sluznice na implantirane magnetne.

Danas su, zahvaljujući razvoju tehnologije i tehničkih kao i medicinskih znanosti, otvorene mogućnosti primjene novih materijala i u našoj struci. U mobilnoj stomatološkoj protetici to se posebno odnosi na materijale od kojih se izrađuju mobilne proteze, na primjenu znanstvenih dostignuća u dobivanju sve bolje retencije i stabilizacije proteze, kao i na primjenu najnovijih materijala.

## Zaključak

Na kraju rasprave nameće se neminovnost određenih zaključaka koji proizlaze iz iznesenih podataka pa je nužno sagledati sveukupnost procesa djelovanja fizičkih i bioloških čimbenika uzrokovanih navedenim sredstvima za retenciju mobilnih proteza. Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti da  $Sm CO_5$  ne djeluje ni citotoksično ni genotoksično na živo tkivo. Isto tako nema značajnih razlika u dobivenim vrijednostima između ispitivanog uzorka u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod koloniformnosti broja stanica *Saccharomyces cerevisiae* D7 u in vitro i u in vivo sistemu istovremeno je praćena genska konverzija i reverzna mutacija mikronukleus-testom u koštanoj srži štakora.

Efikasnost zasijanja kod  $Sm CO_5$  slitine iznosi 89%, što je dokaz da  $Sm CO_5$  magneti ne pokazuju ni citotoksičnost ni genetsku toksičnost, odnosno mutagenost.

## A CYTOTOXIC AND GENOTOXIC STUDY OF MAGNETIC SmCO<sub>5</sub> ALLOYS

Adresa za korespondenciju:  
Address for correspondence:

### Summary

*Cytotoxicity and genotoxicity of the samarium cobalt alloys were studied on an eukaryotic indicator organism of Saccharomyces cerevisiae D7 in an in vitro system and by a micronucleus test on rat bone marrow in an in vivo system. Alloys were incubated in a 0.01 M phosphate buffer at 37°C for 48 hours. Cells from exponential and early stationary phases of growth were separately incubated in the buffer at 37°C for 2 hours in aerobic conditions. After treatment, cells were washed and resuspended in the buffer, seeded on solid nutritive medium for survival assessment, and on selective medium for evaluation of the frequency of mutation. For micronucleus test analysis, rats were twice intraperitoneally injected with 2 ml of the buffer previously incubated with the alloy. Animals were sacrificed after 24 hours.*

*Results obtained suggested the alloys, used as a tool of retention in mobile prosthetics, to elicit no cytotoxic effects, whereas genotoxic effects were within the allowed limits of experimental error.*

Key words: alloy, toxicity, magnetic retention

Dr. Vlado Carek  
Stomatološki fakultet  
Gundulićeva 5  
Zagreb  
Hrvatska

### Literatura

- AMES B N, McCANN J, YAMASAKY E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31:347-364.
- TOTO P D W, CHOUKAS N C, SANDERS D D. Reaction of bone and mucose to implanted magnets. *J Dent. Res.* 1962; 41:1438-1449.
- BECKER J J. Permanent magnet based on materials with high crystal aniatropy. *IEEE Trans. Magnetics*; vol. MAG 1968; 4:239-249; Sept.
- CERNY R. The biological effects of implanted magnetic fields. Part. II; mammalian tissues. *Aus. Orthod J.* 1980; 6:114-120.
- CAREK V, KRALJEVIĆ K, BAŠIĆ Z. Ispitivanje korozijske magnetske slitine Sm CO<sub>5</sub>. *Ascro.* 1986; 20:141-46 (Supl).
- GILLINGS B R D. Interradicular anchorage of over-ly dentures using cobalt rare earth magnets. *Aus. Soc. Prosth. Bull.* 1977; 7:27-35.
- Report of Committee of the European Environmental Mutagen Society. *Mutagenicity Screening. General Principles and Minimal Criteria.* *Mutation Res.* 1978; 53:361-367;
- SCHMID W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1973; 3:77-85.
- STANLEY H R. Testing for carcinogens. In *Toxicity Testing of Dental Materials*: str. 23.
- BLECHMAN A. M. Magnetic force systems in orthodontics. *Am. J Orthodont*; 1985; 30:201-211.
- BARNOTHY M F. *Biological Effects of Magnetic Fields.* Plenum New York; 1964.
- TSUTSUI H, KINUCHI A, SASAKI H. Studies of the Sm - Co magnets as a dental materials. *J Dent. Res.* 1979; 58:1597-1612.
- ZIMMERMANN F K. Detection of genetically active chemicals using various yeast systems. In *Hollender (Ed) Chemical Mutagens.* 1973. 3:209-239;