

Citotoksičnost AH Plus i AH26 punila *in vitro* na fibroblastima kineskoga hrčka V79

Ivana Miletić¹
Silvana Jukić¹
Ivica Anić¹
Zoran Karlović¹
Sonja Pezelj-Ribaric²
Maja Osmak³

¹Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

²Zavod za molekularnu genetiku
Institut "Ruđer Bošković"

³Katedra za dentalnu patologiju
Medicinski fakultet
Stomatološki studij
Sveučilišta u Rijeci

Sažetak

Svrha rada bila je utvrditi citotoksičnost AH Plus punila u usporedbi s AH26 *in vitro* na V79 stanicama fibroblasta hrčka. Materijali su zamiješani prema preporuci proizvođača. Nakon početnog stvrdnjavanja ispitivani materijal je razmrvljen i otopljen u dimetil sulfoksidu. Pripremljeni materijali su ekstrahirani tijekom 1 sata, 24 sata i 7 dana na 37°C. Nakon inkubacijskoga razdoblja uzorci su razrijeđeni u hranjivu mediju u koncentracijama od 1,67 µg/ml - 167 µg/ml. Svaka koncentracija dodana je na pločicu s 24 bunarića u kojima je prethodno nasađeno 5x10³ V79 stanica u 1,2 ml medija. Ukupni broj stanica izbrojen je elektroničkim brojačem, a broj živih stanica izbrojen je pod svjetlosnim mikroskopom uz dodatak vitalne nigrosin boje. Kod oba materijala toksičnost je rasla s koncentracijom endodontskoga punila u ekstrakcijskoj otopini. Kritične koncentracije, iznad kojih punila uzrokuju gubitak stanica, jesu između koncentracija od 5,57 µg/ml do 167 µg/ml za AH Plus, te 16,57 µg/ml i 167 µg/ml za AH26. Vrijeme stvrdnjavanja nije statistički znatno utjecalo na citotoksičnost materijala.

Ključne riječi: fibroblasti kineskoga hrčka V79, AH Plus, AH26, citotoksičnost.

Acta Stomat Croat
2000; 251-253

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD

Primljeno: 25. listopada 2000.

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Ivana Miletić
Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

Danas na tržištu postoji niz materijala koji se rabe za punjenje korijenskih kanala. Svi ti materijali moraju zadovoljavati određena svojstva, od kojih je biokompatibilnost osobito važna. Podatci iz litera-

ture navode da velik broj materijala ima visok stupanj toksičnosti. To negativno svojstvo dolazi do izražaja kod prepunjenih korijenskih kanala kad materijal za punjenje uz mehanički podražaj može prouzročiti i citotoksičnu reakciju perapeksnoga tkiva (1).

Veliku skupinu materijala za punjenje korijen-skih kanala čine punila na bazi umjetnih smola. Glavni su im predstavnici AH26 i AH Plus, koji se često rabe u kliničkoj praksi.

AH26 je epoksi smola koja dobro adherira za dentin, ali je jako toksična za vrijeme stvrdnjavanja (2). AH Plus je noviji preparat na tržištu temeljen na epoksi amin smoli. Proizvođač navodi da ima bolja tehnička i klinička svojstva, tj. brže se stvrdnjava, jače je rtg kontrastan i njime se lakše rukuje od konvencionalnog AH26 (3).

Toksični učinak materijala ispituje se *in vivo* (4,5) i na raznim kulturama stanica *in vitro* (6,7), tj. mišjim L929 fibroblastima, humanim HeLa stanicama grlića maternice, VERO stanicama majmuna ili NCTC2544 epitelnim stanicama kože.

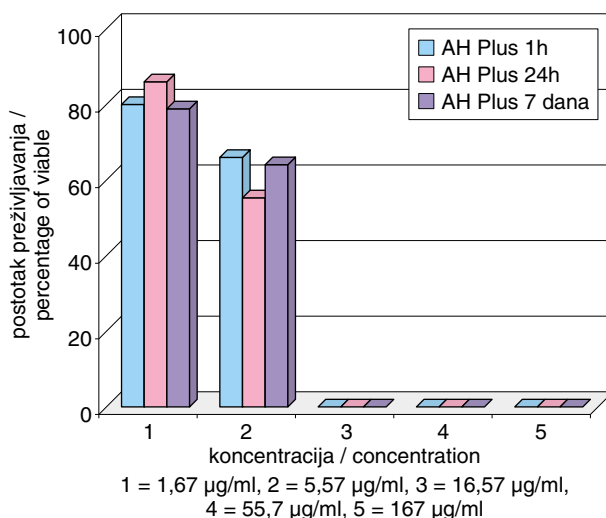
Svrha ovoga rada bila je ispitati citotoksični učinak AH Plus punila u usporedbi s AH26 *in vitro* na plućnim fibroblastima hrčka (V79).

Materijal i postupci

U radu su ispitivani AH26 bez srebra (Dentsply, De Tray, Konstanz, Njemačka) i AH Plus (Dentsply, De Tray). Materijali su zamiješani prema preporuci proizvođača. Nakon početnog stvrdnjavanja ispitivani materijal je razmrvljen i otapan u dimetil sulfoksidu 1g/1ml. Pripremljeni ekstrakti su inkubirani na 37°C tijekom 1 sata, 24 sata i 7 dana. Nakon inkubacijskoga razdoblja uzorci su razrijeđeni u hranjivu mediju u koncentracijama od 1,67 µg/ml, 5,57 µg/ml, 16,57 µg/ml, 55,7 µg/ml i 167 µg/ml. Svaka od navedenih koncentracija dodana je na pločicu s 24 bunarića u kojima je prethodno nasadeno 5×10^3 V79 stanica u 1,2 ml medija. Hranjiv medij (1 ml) dodan je u uzorke kao kontrolna skupina. Za svaku koncentraciju pripremljena su četiri bunarića. Uzorci su inkubirani 72 sata. Nakon toga izbrojen je ukupni broj stanica elektroničkim brojačem u tri bunarića. Iz četvrtog bunarića odstranjen je medij, te dodana nigrosin boja u omjeru s vodom (1:1), koja ne ulazi u žive stanice. Za svaki uzorak izbrojeno je 100 stanica. Postotak preživljavanja (%) izračunan je prema formuli $\% = (A/B) \times 100$ u kojoj je A broj živih stanica u eksperimentalnom bunariću, a B je broj živih stanica u kontrolnoj skupini. Eksperiment je ponovljen dva puta. Za statističku raščlambu rabljen je Student *t*-test.

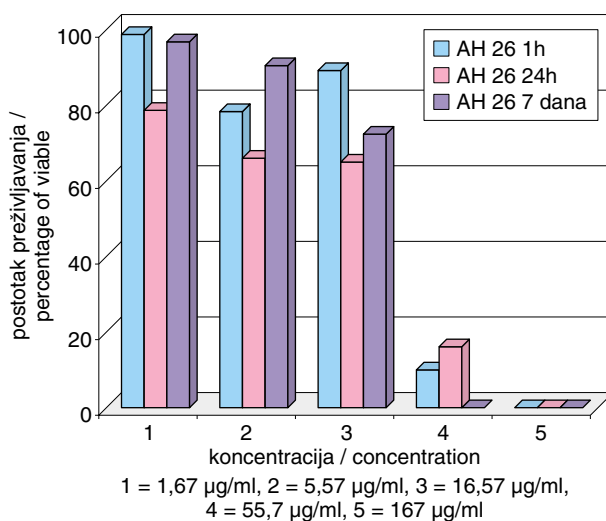
Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani su na Slikama 1 i 2. Kod oba materijala toksičnost je rasla s koncentracijom endodontskoga punila u ekstrakcijskoj otopini. Kritične koncentracije, iznad kojih punila inhibiraju rast V79 stanica, jesu između koncentracija od 5,57 µg/ml i 167 µg/ml za AH Plus, te 16,57 µg/ml i 167 µg/ml za AH26. Naime, kod većih koncentracija postotak živih stanica bio je ili jednak ili vrlo blizu ničtici. Ovi rezultati potvrđuju veću citotoksičnost AH Plus punila.



Slika 1. Postotak preživljavanja uz AH Plus (1h, 24h i 7 dana)

Figure 1. Percentage of viable cells with AH Plus



Slika 2. Postotak preživljavanja uz AH26 (1h, 24h i 7 dana)

Figure 2. Percentage of viable cells with AH26

Postotak preživljavanja u kontrolnoj skupini bio je u svim uzorcima 100%. Vrijeme stvrdnjavanja nije statistički znatno utjecalo na citotoksičnost materijala ($p < 0,05$).

Rasprava

Ispitivanja citotoksičnog učinka materijala koji se rabe za punjenje korijenskoga kanala mogu se provoditi na tri načina (8). Prvo je utvrditi inicijalni toksični učinak u *in vitro* uvjetima, zatim se ispituje *in vivo* na eksperimentalnim životinjama kako bi se utvrdio odgovor tkiva, i naposljetku se provode klinička ispitivanja.

Svrha ovoga istraživanja bila je utvrditi početnu toksičnost novijega materijala na tržištu AH Plus-a i usporediti ju s AH26 punilom za koji se zna toksični učinak. Ovaj je rad proveden kao dio istraživanja koja se bave biološkim učincima materijala (9). Koncentracija punila u ekstrakcijskoj otopini utjecala je na toksičnost materijala, tj. s porastom koncentracije rasla je i toksičnost. Naprot tome, vrijeme stvrdnjavanja u ekstrakcijskoj otopini nije utjecalo na citotoksična svojstva. Visoke koncentracije obaju punila vrlo su toksične, jer je postupak ekstrakcijskim otopinama koncentracije 167 $\mu\text{g/ml}$ prouzročio potpun gubitak nasađenih V79 stanica. AH Plus je toksičniji jer ima nižu kritičnu koncentraciju od AH26 punila.

Toksičnost AH26 punila pripisuje se formaldehidu koji nastaje tijekom stvrdnjavanja materijala (10, 11), što nije dokazano kod AH Plusa. Zato se toksičnost AH Plus punila može objasniti postojanjem amina u sastavu materijala koji poboljšavaju polimerizaciju (12). Naši su rezultati u skladu s podacima Al-Hazhana i Spangberga (13) koji su, mjereći toksičnost AH26 punila oslobađanjem kroma iz membrane, utvrdili visoku toksičnost ispitivanoga materijala. Suprotno tome, Leyhausen i sur. (14) nisu utvrdili citotoksičnost AH Plusa na 3T3 stanicama i stanicama fibroblastasta. Razlika u rezultatima objašnjiva je uporabom različita eksperimentalnog modela za ispitivanje toksičnosti. Leyhausen i sur. (14) određivali su citotoksičnost mjerenjem DNA - sinteze te uporabom različitih stanica.

Rezultati ovoga rada pokazuju citotoksičnost AH Plus i AH26 punila na plućnim fibroblastima

hrčka V79 ovisno o njegovoj koncentraciji u ekstrakcijskoj otopini. Potrebna su daljnja ispitivanja za konačnu ocjenu biokompatibilnosti materijala.

Literatura

1. WAYMAN BE, MURATA SM, ALMEIDA RJ, FOWLER CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endodon* 1992; 18:152-5.
2. BRISENO MB, WILLERHAUSEN B. Root canal sealers cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II Silicone and resin-based sealers. *J Endodon* 1991; 17:537-40.
3. KOULAOUZIDOU EA, PAPAISIS KT, BELTES P, GEROMICHALOS GD, KORTSARIS AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an *in vitro* evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14:182-5.
4. TAGGER M, TAGGER E. Effect of implantation of AH26 silver-free in subcutaneous tissue of guinea pigs. *Int Endod J* 1986; 19:90-7.
5. WENBERG A. Biological evaluation of root canal sealers using *in vitro* and *in vivo* models. *J Endodon* 1980; 6:784-7.
6. BRISENO MB, WILLERSHAUSEN B. Root canal sealers cytotoxicity with human gingival fibroblasts I. Zinc oxide-eugenol basis sealers. *J Endodon* 1990; 16:383-6.
7. SAFAVI KE, SPANGBERG LSW, COSTA NS, SAPOUNAS G. An *in vitro* method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. *J Endodon* 1989; 15:484-6.
8. TRONSTAD L, WENBERG A. *In vitro* assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J* 1980; 13:131-8.
9. JUKIĆ S, MILETIĆ I, ANIĆ I, BRITVIĆ S, OSMAK M, SISTIG S. The mutagenic potential of AH Plus and AH26 by Salmonella/microsome assay. *J Endodon* 2000; 26:321-4.
10. ECONOMIDES N, KOTSAKI-KOVATSI VP, POULOUPOULOS A, KOLOKURIS I, ROZOS G, SHORE R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endodon* 1995; 21:122-7.
11. SPANGBERG L, BARBOSA SV, LAVIGNE GD. AH26 releases formaldehyde. *J Endodon* 1993; 19:596-7.
12. MILETIĆ I, ANIĆ I, KARLOVIĆ Z, MARŠAN T, PEZELJ-RIBARIĆ S, OSMAK M. Cytotoxic effects of the four root filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: (u tisku).
13. AL-HAZHAN S, SPANGBERG S. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental materials: an electron microscopical study on human periodontal ligament fibroblasts and L 929 cells. *J Endodon* 1990; 16:129-34.
14. LEYHAUSEN G, HEIL J, REIFFERSCHIED G, WALDMANN P, GEURTSSEN W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealers AH Plus. *J Endodon* 1999; 25:109-13.