

# Ispitivanje mutagenog potencijala kloroforma, narančina ulja, eukaliptusova ulja i halotana *Salmonella*/mikrosomskim testom

Zoran Karlović  
Silvana Jukić  
Ivana Miletić  
Smiljana Britvić<sup>1</sup>  
Maja Osmak<sup>1</sup>  
Ivica Anić

Zavod za bolesti zuba  
Stomatološkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu  
<sup>1</sup>Institut "Ruđer Bošković"  
Zagreb, Hrvatska

## Sažetak

Svrha rada bila je ispitati mutagenu aktivnost četiriju komercijalno dostupnih otapala gutaperke *Salmonella*/mikrosomskim testom. Ispitana su bila otapala: kloroform, narančino ulje, eukaliptusovo ulje i halotan u količinama od 10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl i 200 µl. Upotrijebljen je standardni Ames test inkorporacije na ploči pri čemu su rabljene bakterije *Salmonella typhimurium* soja TA 98 i TA 100 s metaboličkom aktivacijom enzimom S9. Rezultati istraživanja pokazuju citotoksičnu aktivnost eukaliptusova ulja u svim koncentracijama, narančina ulja u koncentracijama od 50 µl i većima. Kloroform je pokazao citotoksičnost u koncentracijama od 100 µl i 200 µl. Niti jedno otapalo gutaperke nije pokazala mutagenu aktivnost Ames testom u ispitivanim koncentracijama.

Ključne riječi: Ames test, kloroform, narančino ulje, eukaliptusovo ulje, halotan.

Acta Stomat Croat  
2004; 39-42

IZVORNI ZNANSTVENI  
RAD  
Primljeno: 24. studenoga 2003.

Adresa za dopisivanje:

Zoran Karlović  
Zavod za bolesti zuba  
Stomatološki fakultet  
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb  
e-mail:  
zoran.karlovic@zg.hinet.hr  
fax: +385 1 4802 159

## Uvod

Gutaperka se iz korijenskoga kanala može ukloniti instrumentima za strojnu obradbu kanala, ručnim instrumentima s dodatkom otapala ili bez njega (1, 2) i laserom (3, 4). Otapalo podmazuje stijenke kanala te tako smanjuje mogućnost loma instrumenta, perforacije korijena i izravnivanja zakrivljenih kanala (2).

Najčešće upotrebljavano i najpoznatije otapalo, kloroform klasificiran je kao mogući humani karcinogen (5, 6). Zato su provedena brojna istraživanja učinkovitosti mnogih drugih kemikalija kao zamjena kloroformu u postupku revizije ispunjenih korijen-

skih kanala (7). Među njima se ističu halotan i eukaliptusovo ulje (2,8). Narančino ulje zagrijano na 37°C također je predloženo kao djelotvorno otapalo gutaperke (2).

U literaturi se navode moguća mutagena i kancerogena svojstva materijala ili kemikalije koja dolaze u dodir s ljudskim tijelom, pa tako i materijala za punjenje korijenskih kanala (9). Stomatološki materijali, lijekovi i otopine ne utječu samo na pacijenta, nego svakodnevni i ponavljani doticaj stomatološkog osoblja s istim tvarima mogu prouzročiti profesionalne bolesti (10). Jedan od testova preporučenih kao pretraživajući test mutagenosti za kemikalije i uzorke iz okoliša jest kratkotrajni Ames test.

On se izvodi na bakterijama roda *Sallmonela* zbog njegove široke baze podataka i dobre korelacije s kancerogeneom. Uzgojeni soj roda *Sallmonela* ima mutirani histidinski gen pa ne može sam sintetizirati histidin nego ga je potrebno dodati hranilištu. Ako je kemikalija kojom se djeluje na ispitivane bakterije mutagena, izaziva zamjenu para baza GC i AT i pomak okvira čitanja te histidinski gen postaje funkcionalan. Porast broja kolonija bakterija na hranilištu siromašnim histidinom spram broja spontanih revertanata, mutacija koje se događaju bez utjecaja vanjskih čimbenika, govori o mutagenim svojstvima ispitivane tvari (11). Iako su mehanizmi uključeni u mutaciju složeni i često se razlikuju između organizama, rezultati dobiveni Ames testom na bakterijama imaju svoju vrijednost zbog slične građe DNA u svim organizmima (12, 13).

Svrha rada bila je ispitati mutagenu aktivnost četiriju različitih otapala za gutaperku pomoću *Sallmonela*/mikrosomskim (Ames) testom.

### Materijal i postupci

Ispitivane otopine bile su: Chloroform (Kemika, d.o.o., Zagreb, Hrvatska), Narančino ulje (Aromara, d.o.o., Zagreb, Hrvatska), Eucalypti aetherolum (Kemig, d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i Fluothane (halotan) (Zeneca Ltd, MacClesfield, Chesire, UK). Test mutagenosti proveden je kao standardni test inkorporacije na ploči koji su opisali Maron i Ames (14). Dva testirana soja *Sallmonela typhimurium* TA 98 i TA 100, sa Sveučilišta u Kaliforniji, Berkley, SAD, rabljena su za otkrivanje pomaka okvira čitanja odnosno mutacije para baza. Ispitivane tvari u količini od 10 µl, 30 µl, 50 µl, 100 µl i 200 µl postavljene su na ploču s Vogel- Bonnerovim bazičnim agarom i 2 ml mekog agara kojem je prethodno dodana 0,5 mM otopina L-histidina s 0,5 mM otopinom biotina. Nakon toga dodana je prekonocna kultura *Salmonella typhimurium* TA 98 ili TA 100 (0,1 ml) s metaboličkim aktivatorom (0,5 ml S9 mješavine).

Mješavina S9 sadržavala je 50 µl jetrenog S9 pripremljenog od jetre Wistar štakora koji su prije toga tretirani peritonealnom injekcijom Aroclara 1254 (500 mg/kg) otopljenog u kukuruznom ulju. Neposredno prije testiranja mutagenosti S9 frakcija je pročišćena filtriranjem kroz Millipore membranskim

filterom (0,45 µm i 0,22 µm filterskih jedinica) kako bi se uklonili mikroorganizmi.

Svaki se je uzorak ispitivao tri puta, a broj bakterija revertanta određen je nakon 48 sati inkubacije na 37°C. Za pozitivnu kontrolu poslužio je 2-aminofluoren (2-AF) u koncentraciji od 25 µg/ploči u svrhu kontrole osjetljivosti bakterijskoga soja i aktivnosti štakorskoga jetrenog S9. Mutagenost je izražena kao broj revertanata po ploči za svaku ispitivanu količinu otapala gutaperke.

### Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani u Tablici 1 srednje su vrijednosti triplikata za svaki ispitivani soj i količinu otapala (SD<10%). Negativan odgovor u Ames testu na oba soja (TA98 i TA100) u odnosu prema pozitivnoj kontroli 2-aminofluoren (dijagnostički mutagen) pokazala su sva testirana otapala. Eukalptusovo ulje u svim ispitivanim količinama (10 µl/ploči, 30 µl/ploči, 50 µl/ploči, 100 µl/ploči i 200 µl/ploči) djelovalo je toksično. Broj revertanata po ploči bio je isti kao i u pločama s negativnom kontrolom (broj spontanij revertanata) za narančino ulje u količini od 10 µl/ploči i 30 µl/ploči i kloroform u količini od 10 µl/ploči, 30 µl/ploči i 50 µl/ploči. Veće koncentracije narančina ulja i eukalptusova ulja uzrokovale su toksični učinak. Halotan nije izazvao mutagene promjene i nije pokazao toksični učinak bez obzira na koncentraciju.

### Rasprava

Potreba za ispitivanjem biokompatibilnosti otapala gutaperke proistječu iz velikoga broja revizija u svakodnevnom endodontskom radu. U ovom je istraživanju u tu svrhu rabljen Ames test kao pretraživajući test mutagenosti za četiri otapala gutaperke zbog svoje pouzdanosti i pristupačne cijene (13).

Premda je kloroform klasificiran kao mogući kancerogen (15), još uvijek postoji neslaganje znanstvenika o njegovoj karcinogenosti. Premda je utvrđeno da potiče nastanak tumora u pokusnih životinja, još nije pouzdano dokazano kancerogeno djelovanje kloroforma na ljudski organizam (16). Istraživanjem mutagenosti kloroforma kao dezificijensa vode za

Tablica 1. Srednja vrijednost revertanata po ploči izražena brojem naraslih kolonija za otapala i kontrolni mutagen

Table 1. Comparison of mutagenicity in the plate incorporation test of the tested solutions and control mutagens

Otopina / Solutions	μl/ploča / μl/plate	TA98	TA100
Narančino ulje / Orange oil	10	45	156
	30	35	142
	50	tox	tox
	100	tox	tox
	200	tox	tox
Kloroform / Chloroform	10	44	156
	30	46	148
	50	42	152
	100	tox	tox
	200	tox	tox
Eukaliptusovo ulje / Eucalyptus oil	10	tox	tox
	30	tox	tox
	50	tox	tox
	100	tox	tox
	200	tox	tox
Halotan / Fluothane	10	45	152
	30	42	154
	50	46	144
	100	44	135
	200	40	146
Negativna kontrola* / Negative control*		45	152
2-aminofluoren / 2-aminofluorene	25μg/ploča / 25μg plate	2500	2500

piće Ames testom na sojevima TA 100 i 98 nisu opažena mutagena svojstva (17) ni povezanost između kolorektalnoga karcinoma i kloroformom onečišćene vode za piće (18).

Raščlambom zraka iz zone disanja stomatološkog tima Allard i Andersson (10) su pronašli da je koncentracija kloroforma za vrijeme punjenja korijenskih kanala pet postotnom rozinom u kloroformu u sigurnim granicama ako se je pri tome postupalo pažljivo i ako su se rabile prikladne tubice. Ipak, s obzirom na to da postoje sumnje o kancerogenim svojstvima kloroforma i mogućnost njegove metabolizacije u visoko hepatotoksičan fozgen posredstvom citokroma P-450 reduktaze, treba ga izbjegavati (19).

Narančino ulje jedno je od predloženih zamjenjivih sredstava za kloroform. U istraživanju Hansena (20) nije uočena znatna razlika u otapanju gutaperke između narančina ulja i drugih otapala. Nedavno je objavljen nalaz supresije stvaranja pulmonarnog adenoma nakon dijete u čijem je sastavu bilo narančino ulje bez terpentina (21). Negativni Ames test potvrđuje njegova nemutagena svojstva, premda je pokazao određeni toksični učinak.

Američka Udruga za javno zdravstvo (PHS) eukaliptusovo ulje ne smatra kancerogenim (6). K tome, mnoga su istraživanja potvrdila njegovu sposobnost otapanja gutaperke (7, 8). Premda eukaliptusovo ulje u ovom istraživanju nije pokazalo mutagenost, opažen je toksični učinak na bakteriju roda *Salmonella typhimurium*.

Halotan je u ovom istraživanju pokazao neutralni učinak, ni mutageni ni toksični, na bakterijama roda *Salmonella typhimurium* upotrijebljenim u ovom istraživanju. Rezultati ovog istraživanja, zajedno s rezultatima istraživanja Wourmsa i sur. (2) koji je pronašao da halotan otapa uzorke gutaperke dva puta brže od eukaliptusova ulja, pokazuju da bi to otapalo moglo biti najprikladnije, s minimalnim nuspojavama i relativnom učinkovitošću. No tijekom rada treba izbjegavati preveliko izlaganje stomatološkog tima i pacijenata parama halotana zbog moguće respiratorne depresije.

U ovom su istraživanju upotrijebljene dvije od pet bakterijaskih vrsta preporučenih od Marona i Amesa (14), što odgovara istraživanju Örstavika i sur (9). Ames test je pokazao da ispitivane otopine nemaju mutageni učinak, što treba potvrditi dodatnim ispitivanjima.

## Literatura

- HULSMANN, M, STOTZ S. Efficacy, cleaning ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment. *Int Endod J* 1997; 30: 227.
- WOURMS DJ, CAMPBELL AD, HICKS ML, PELLEU GB. Alternative solvents to chloroform for gutta-percha removal. *J Endodon* 1990; 16: 224.
- FARGE P, NAHAS P, BONIN P. *In vitro* study of a Nd: YAG laser in endodontic retreatment. *J Endodon* 1998; 24: 359.
- VIDUČIĆ D, JUKIĆ S, KARLOVIĆ Z, BOŽIĆ Ž, MILETIĆ I, ANIĆ I. Removal of gutta-percha from root canals using an Nd:YAG laser. *Int End J* 2003; 36: 670-3.

5. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Second Annual Report on Cancerogens. PB 82-229808, 1981.
6. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Fourth Annual Report on Cancerogens, PB 85-134663, 1985.
7. KARLOVIĆ Z, ANIĆ I, AZINOVIĆ Z, MARŠAN T, MILETIĆ I, CIGLAR I. Retreatment of endodontic filling by eucalyptol and chloroform. *Acta Stom Croat* 1998; 32: 399.
8. UEMURA M, HATA G, TODA T, WEINE FS. Effectiveness of eucalyptol and d-limonene as gutta-percha solvents. *J Endodon* 1997; 23: 739.
9. ÖRSTAVIK D, HANGSLO JK. Mutagenicity of endodontic sealers. *Biomaterials* 1985;6:129.
10. ALLARD U, ANDERSSON L. Exposure of dental personnel to chloroform in root-filling procedure. *Endod Dent Traumtol* 1992; 8: 155.
11. KETTERING JD, TOREBINEJAD M. Investigation of Mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endodon* 1995; 21: 537-9.
12. BRITVIĆ S, LUCIĆ D, KURELEC B. Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics, *Environ Toxicol Chem* 1993;12: 765.
13. JUKIĆ S, MILETIĆ I, ANIĆ I, BRITVIĆ S, OSMAK M, SISTIG S. The mutagenic potential of AH+ and AH26 By *Salmonella*/Microsome assay. *J Endodon* 2000;26:321.
14. MARON DM, AMES BN. Revised method for the *Salmonella* test. *Mutat Res* 1983;113:173.
15. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *Int Agency for Res Cancer* 1987; 7 (Suppl): 152.
16. RUBER MD: Carcinogenicity of chloroform. *Environ Health Perspect* 1979; 31: 171-82.
17. KARGALIOGLU Y, MCMILLAN BJ, MINEAR RA, PLEWA MJ. Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in *Salmonella typhimurium*. *Terat Carcin Mutag* 2002; 22: 113-28.
18. LAWRENCE CE, TAYLOR PR, TROCK BJ, REILLY AA. Trihalomethanes in drinking water and human colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 563-8.
19. ANDERS MW, POHL LR. Halogenated alkanes. In: Anders MW. (eds) *Bioactivation of foreign compounds*. New York: Academic Press, inc. 1985: 283.
20. HANSEN MG. Relative efficiency of solvents used in endodontics. *J Endodon* 1998; 24: 38.
21. WATTENBERG L. Chalcones, Myo-inositol and other novel inhibitors of pulmonary carcinogenesis. *J Cell Biochem* 1995; 22 (Suppl): 162.