

# Ispitivanje biokompatibilnosti glas-jonomer cementa - test citotoksičnosti

YU ISSN 0039-1743  
UDK 616.31

## Biocompatibility assessment of glas ionomer cement-test of cytotoxicity

### KRATAK SADRŽAJ

Ispitivanje citotoksičnosti prvi je korak u ocenjivanju biokompatibilnosti stomatoloških materijala. Potreba za ujednačavanjem kriterijuma za ovakva istraživanja rezultirala je postavljanjem internacionalnih standarda uobičenih u ISO metodologiju. Cilj ovih istraživanja bio je da se ispita citotoksičnost četiri restaurativna materijala (tri glasjonomer cementa, i jednog kompomera) i da se definišu prednosti i nedostaci aktuelne ISO metodologije za ispitivanje ovog aspekta biokompatibilnosti stomatoloških materijala. Istraživanje je dizajnirano prema ISO/TC 106/1995 i ISO 10993-5/1994. Ispitivanjem su obuhvaćeni Fuji LC II, Vitremer (3M), Ionosit fil (DMG- Hamburg), Luxat (DMG- Hamburg). Ispitivanje citotoksičnosti sprovedeno je na standardizovanoj humanoj diploidnoj ćelijskoj liniji WI-38. Rezultati istraživanja pokazali su izražen citotoksičan efekat svih ispitivanih materijala bez statistički značajne razlike. Ocena biokompatibilnosti ovih materijala kao i vrednovanje dobijenih rezultata mogu se doneti tek nakon uspostavljanja korelacije sa rezultatima testova primene. Preporučena ISO metodologija jednostavna je za izvođenje i reprodukovanje, a korišćenje ćelijske kulture u istraživanju je najbezbolnije, najjeftinije i pri tom oslobođeno moralnih i etičkih dilema.

**Ključne reči:** glas-jonomer cement, biokompatibilnost, citotoksičnost

### Dejan Marković

Stomatološki fakultet u Beogradu  
Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju

**ORIGINALNI RAD (OR)**  
Stom Glas S, 2002; 49:75-80

Testiranje citotoksičnosti jedan je od prvih koraka u ispitivanju biokompatibilnosti materijala. Toksičnost stomatoloških materijala može biti ocenjena pomoću *in vitro* testova, pomoću eksperimenata na životinjama i kroz klinička ispitivanja. *In vitro* studije se uglavnom izvode da ocene citotoksičnost ili genotoksičnost stomatoloških materijala.<sup>1</sup>

Postoji veliki broj različitih test metoda, koji ponekad mogu da daju različite rezultate za isti materijal<sup>2,3</sup> što je i bio podsticaj da se standardizuju test procedure, a sve u cilju poboljšanja njihove reproduktivnost. Trenutno za ovu oblast postoje nacionalni standardi (YUS, ADA, DIN itd.) ali se teži da se svi uklupe u internacionalne standarde koji pokrivaju medicinske (ISO 10993) i stomatološke (ISO-TR 7405) instrumente i materijale.<sup>4,5,6,7,8</sup>

Analize potencijalnih bioloških rizika polaze od činjenice da su dentalni ispuni u kontaktu sa živim tkivom (pulpa/dentin i gingiva) duži vremenski period. Zato delići ispuna njihovi ekstrati ili rastvori mogu da budu prugutani ili na drugi način potencijalno negativno uticati na pacijenta.<sup>9</sup> Prema nacionalnim ili internacionalnim zakonskim regulativama za ovu vrstu medicinskog rizika preporučuje se nekoliko vrsta testova, uključujući i testiranje citotoksičnosti.<sup>10,11</sup>

Biološki sistemi korišćeni *in vitro* testovima citotoksičnosti mogu biti kulture organa, kulture ćelija ili ćelijske organele. Najšire korišćeni biološki sistemi za testiranje toksičnosti dentalnih ispuna *in vitro* su ćelije u kulturi.

Najčešće se koriste dva tipa ćelija: 1) kontinuirane ćelijske linije koje potiču iz komercijalnih kolekcija i 2) primarne ćelije koje potiču iz donor tkiva i formiraju se u laboratoriji individualno za svako, ili više srodnih, istraživanja<sup>12</sup>. U standardnim *in vitro* testovima najčešće se koriste permanentne ćelijske linije (npr. L-929, 3T3 mišji fibroblasti, humani diploidni fibroblasti WI-38, i dr.) ili primarne ćelije, uglavnom gingive, mukoze i pulpnih fibroblasta.<sup>13,14,15,16</sup>

**Glas-jonomer cementi** u direktnom kontaktu daju malu do umerenu reakciju pulpe zbog čega je većina istraživača preporučivala, u slučaju dubokih preparacija, aplikaciju Ca(OH)<sub>2</sub> na mestu najbližem pulpi.<sup>17</sup> Kako su se modifikacije razvijale, glas-jonomer cemenati su prilagođeni svim funkcionalnim zahtevima i ispunjavali postavljene kriterijume biokompatibilnosti, odnosno postali su neutralni za pulpu kao materijali za ispune.<sup>18,19</sup>

Svetlosno plimerizujući ili kako ih još nazivaju smolom ojačani glasjonomer cementi uveli su nove potencijalno toksične elemente u ovu vrstu materijala. Tu su prvenstveno svi sastojci kompozitnih smola ali i agensi za pripremu dentina i dr. Ovi kvalitativno novi materijali zahtevali su i kliničko ali i eksperimentalno ispitivanje njihove biokompatibilnosti.

Specifičan momenat u toksičnosti glasjonomer cemenata predstavlja dužina inicajnog vezivanja i činjenica da se kiselost iznad pH 3,0 postigne tek za 10min., što je još uvek

u zoni citotoksičnih vrednosti. Kiselost ali i koncentracija  $F_i$  ili  $Al^{+++}$  mogu imati uticaja na pulpno-dentinski kompleks u fazi nevezanog materijala.<sup>20,21,22</sup> Svetlosno inicirani glas-jonomer cementi ostvaruju brži mehanizam vezivanja pa je sledstveno tome i stepen stvaranja kiselih produkata manji, pri čemu efekat na odontoblaste i pulpu nepoznat.<sup>23</sup>

**Cilj** rada bio je da se ispita citotoksičnost četiri restaurativna materijala (tri glas-jonomer cementa, i jednog kompomera) i da se definišu prednosti i nedostaci aktuelne ISO metodologije za ispitivanje ovog aspekta biokompatibilnosti stomatoloških materijala.

## Materijal i metod

Istraživanje je sprovedeno prema savremenim preporukama Internacionalne Organizacije za standarde i to ISO/TC 106/1995 i ISO 10993-5/ 1994.

U ispitivanje su uključeni sledeći materijali: 1. Fuji LC II; 2. Vitremer; 3. Ionosit fil; 4. Luxat. (Tabela 1.)

Tabela 1. Materijali korišćeni u istraživanju

Table 1. Materials used in research

Materijal	Proizvođač	Vrsta
Fuji LC II	GC Internacional	Glas-jonomer (LC)
Vitremer	3M	Glas-jonomer (LC)
Ionosit fil	DMG- Hamburg	Glas-jonomer (LC)
Luxat	DMG- Hamburg	Kompomer

Ispitivanje citotoksičnosti svetlosno polimerizujućih glas-jonomer cemenata sprovedeno je metodom testiranja ekstrata ispitivanih materijala u hranljivoj podlozi. Test je dizajniran da prikaže biološki odgovor ćelijske kulture na ekstrate stomatoloških materijala.

### Priprema ćelijske kulture

U eksperimentu je korišćena human diploidna ćelijska linija WI-38 (Human Diploid Lung WI-38; ATCC Referenca Strain CCL 75) koja predstavlja normalnu diploidnu kulturu embrionalnih humanih fibroblasta. Čelije su gajene u standardnoj podlozi - *Minimum Essential Medium-Eagle* (MEM), sa dodatkom 5% govedeg fetalnog seruma. Kontrola ćelijske proliferacije rađena je na svetlosnom mikroskopu pod faznim kontrastom. Negativna kontrola sastojala se od konfluentne jednoslojne ćelijske kulture sa hranjivom podlogom, bez ikakvih dodataka. Pozitivna kontrola sastojala se od konfluentne jednoslojne ćelijske kulture sa hranjivom podlogom u koju je dodat 1000mg/l *neomicin sulphate*, što predstavlja 20 puta veću dozu od dozvoljene (50mg/l) za kulturu ćelija.

### Priprema uzoraka

Priprema glas-jonomer materijala za ispitivanje rađena je prema preskripciji proizvođača. Priprema materijala obav-

ljena je sterilnim instrumentima u laboratorijskim strogo kontrolisanim, sterilnim uslovima aseptične komore. Ukupna površina pripremljenog uzorka je 60mm<sup>2</sup>, a debljina 0,5mm. Nakon pripreme, uzorak je, isitnjen na manje komadiće, potopljen u plastičnu centrifugirnu tubu zapremine 50ml sa 20ml 5%-nog MEM-a. U zatvorenim posudama, na temperaturi od 37° ± 1°C vršena je ekstrakcija uzorka 24h. Nakon predviđenog vremena ekstrakcione posude su centrifugirane 10 minuta na 1000 rpm da bi se istaložila čvrsta materija i sprečilo mehaničko oštećenje ćelijskih kultura. Svaki uzorak pripremljen je tri puta, kao i pozitivna i negativna kontrola.

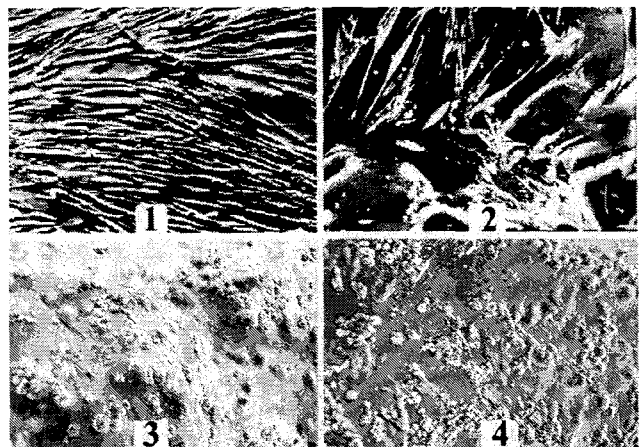
Svaki test uzorak, kao i pozitivna i negativna kontrola, ocenjivani su nakon svakog observacionog perioda a karakteristična mesta fotografisana na fotomikroskopu. Karakteristični uzorci pripremljeni su i analizirani skening elektronskom mikroskopijom (SEM).

### Evaluacija istraživanja

Promena pH vrednosti ispitivanih uzorka identifikovana je na osnovu promene boje medijuma i upoređivana sa referentnom tablicom.

Observacioni periodi u praćenju uticaja ekstrata na ćelijske kulture bili su 24<sup>h</sup>, 48<sup>h</sup>, 96<sup>h</sup> i 7 dana. Ocenjivanje ispoljenih promena vršeno je nakon posmatranja na svetlosnom inverzionom mikroskopu a kao kriterijum su korišćene kvantitativne i kvalitativne promene ćelijske kulture. Kvalitativne promene su podrazumevale promene u generalnoj morfologiji, vakuolizaciju, odlepljivanje, ćelijsku lizu i promene na membrani. Kvantitativne promene podrazumevaju procentualno smanjenje ćelijske proliferacije i ocenjivane su opisno i numerički prema sledećim kriterijumima:

0 = Nema promena (0%); 1 = Slaba redukcija ćelija (do 20%); 2 = Umerena redukcija (do 20-50%); 3 = Umereno jaka redukcija (50-80%); 4 = Jaka redukcija proliferacije (preko 80%); (Slika 1)



Slika 1. Referentne fotografije stepena ćelijske proliferacije za svaku opisnu ocenu  
Figure 1. Photos of cell proliferation level for every score

Na osnovu dobijenih podataka kvalitativne i kvantitativne analize za svaki uzorak data je opisna ocena. Dobijene brojčane ocene bile su osnov za statističku analizu citotok-

sličnosti ispitivanih materijala u poređenju sa kontrolnim testiranjem i uzorcima međusobno. Dobijeni rezultati su obrađeni Mann-Whitney-evim neparametrijskim testom. Za pojedine pokazatelje određivana je srednja vrednost i standardna devijacija.

## Rezultati

Ispitivani materijali pokazali su promenu pH u smislu sniženja vrednosti neposredno nakon potapanja u hranljivu podlogu. Svi ispitivani materijali pokazali su značajnu promenu boje kao indikatora promene pH, a posebno Vitramer čija je limun-žuta boja govori o izrazito kiseloj reakciji. Kod Luxat-a nije došlo do značajnog pomeranja pa se promena nije registrovala ni pehametrom niti je bilo promene boje u značajnijoj meri. (Tabela 2)

Tabela 2. Vrednosti pH ispitivanih materijala

Table 2. pH values of evaluated materials

	Kontrola MEM	L	F	V	IF	Pozitivna kontrola
1h	Boja Crvena	Crvena	Žuta	Limun žuta	Narandžasto žuta	Žuta
	pH 7.3	7.3	6.8	3.8	7.1	7.0
24h	Boja Crvena	Ljubicasta	Crvena	Limun žuta	Crvena	Žuta
	pH 7.3	8.3	7.6	5.7	7.6	7.0

Nakon 24h došlo je do "oporavka" u smislu vraćanja vrednosti pH na prvobitne neutralne vrednosti ili čak skretanja ka baznim vrednostima. Promenjena boja medijuma ostala je približno ista postignutom nivou neposredno nakon kontakta tj. u zoni kisele reakcije, kod svih uzoraka osim Luxat-a.

Tabela 3. Prosečna ocena testa citotoksičnosti

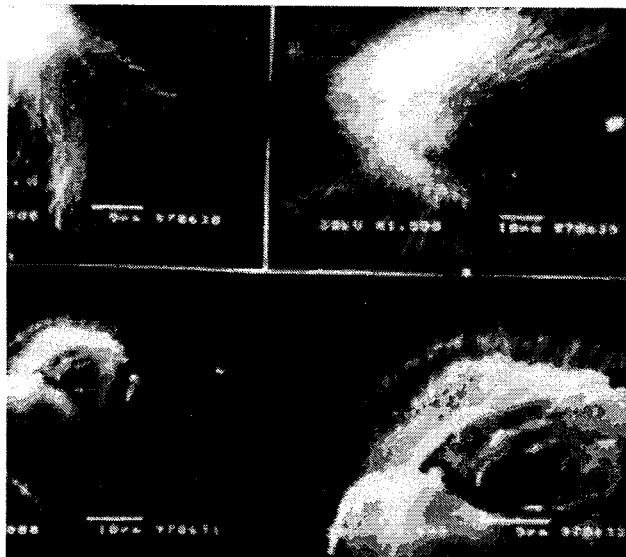
Table 3. Mean cytotoxicity test score

	24h	48h	96h	7dana
V	3.7	4.0	4.0	4.0
L	2.7	3.0	3.7	4.0
F	1.0	2.0	3.0	3.0
IF	3.0	3.0	3.7	4.0

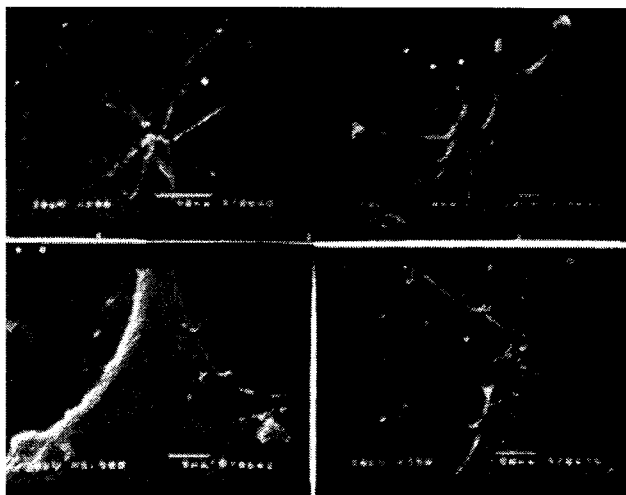
U prvih 24 časa u ispitivanim uzorcima Vitramera ćelijska liza prema postavljenim kriterijuma bila je 70% i ocenjena je ocenom 4. U istom opservacionom periodu Fuji LC II je ocenjen ocenom 1-blag toksičan efekat sa redukcijom ćelija

20-50% i promenama na ćelijama u vidu njihovog pojedinačnog zaokrugljivanja u manjem broju. Ionosit fil i Luksat pokazali su za 24 sata isti, jako izražen toksični efekat ocenje ocenom 3, sa redukcijom ćelijskog rasta 50-80% i izraženim većim brojem uvećanih, baloniranih ćelija. (Tabela 3)

Skening elektronskom mikroskopijom ispitana je morfologija karakterističnih uzoraka i konstatovani su mnogi deformiteti preživelih ćelijskih kultura. (Slike 2 i 3)



Slika 2. Balonirane mrtve fibroblastne ćelije-SEM  
Figure 2. Non-vital fibroblast cells-SEM



Slika 3. Retke očuvane fibroblastne ćelije normalne morfologije-SEM  
Figure 3. Rare fibroblast cells with normal morphology-SEM

## Diskusija

Za sve stomatološke materiale kao i njihove modifikacije koji se mogu danas naći na tržištu, testovi provere su neizbežni deo u programu njihovog biološkog ocenjivanja.

Danas postoje jednostavne, brze i ne tako skupe metode provjere koje daju važne informacije kako o generalnoj toksičnosti, tako i o lokalnoj iritaciji tkiva (Magnusson and Kligman, 1969, Ames et al. 1973, Purchase et al, 1976, Tronstad et al, 1978b, Wannberg et al, 1978, 1979). Međutim, testovi prekliničke provjere ne mogu zameniti klinička ispitivanja, posebno kada se radi o dentalnim materijalima. Ipak treba naglasiti da jednostavan test *in vitro* može da redukuje i delimično zameni druge, malo detaljnije, ali i skuplje i komplikovanije testove na životinjama.<sup>24,12</sup>

Pri tome treba imati u vidu da ovi testovi ne daju biološku ocenu materijala već samo ocenu citotoksične aktivnosti. Ako bi se ovo apstrahovalo, došlo bi se do pogrešnog zaključka da su neki medikamenti nepodobni za upotrebu iako se pouzdano zna da je njihova pozitivna uloga u terapiji "nezamenjiva". Konkretni primer za to su paste na bazi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ili Zn-oksida-eugenola.<sup>24</sup>

Ćelijske kulture, kao biološki sistemi za testiranje, našli su široku primenu u savremenim istraživanjima iz više razloga. U prvom redu veoma je značajna mogućnost dobre reproduktivnosti ispitivanja. Kontinuirane ćelijske linije, standardizovane i dostupne svim laboratorijama koje se bave ovim poslom, omogućavaju da se eksperiment pod istovetnim uslovima više puta ponovi, a dobijeni rezultati se mogu uporediti sa istraživanjima drugih istraživača i/ili laboratorija koje su primenile istu metodologiju.<sup>25,26,27,12</sup>

U ovom eksperimentu je korišćena human diploidna ćelijska linija WI-38 (Human Diploid Lung WI-38; ATCC Referenca Strain CCL 75) koja predstavlja normalnu diploidnu permanentnu ćelijsku liniju fibroblasta. Ćelijska kultura je bila u 30-oj pasazi što je čini srednje starom kulturom. Kultura ovih ćelija iako nema neke od specifičnosti pulpnih fibroblasta poseduje sve karakteristike fibroblastne humane kulture pa je zbog toga i pogodna za praćenje toksičnih efekata<sup>28</sup>. Na osnovu toga može se izvesti korelacija između dobijenih rezultata i pulpne reakcije *in vivo*.

Ispitivanje efekata glas-jonomer cementata na ćelijsku kulturu primer su različitih i često kontradiktornih literaturnih podataka. Dok su Dahl i Tronstad (1976) i Meryon i saradnici (1983) pokazali da su sveže umešani konvencionalni glas-jonomer cementi toksični, Kawahara i saradnici (1979) ističu da, sveže umešani materijali inhibišu ćelijsku proliferaciju, ali ne pokazuju citotoksičan efekat na ćelijske kulture.<sup>25</sup> Takodje, Miler i saradnici konstatuju da testovi na kulturama ćelija ukazuju na citotoksičnost konvencionalnih glas-jonomer cementata i da stoga treba koristiti podloge na bazi  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , dok Kanaoka i sar. 1991 nisu našli nepovoljne odgovore na ćelijskim kulturama.<sup>14</sup>

Ovakvi rezultati donekle su u suprotnosti sa rezultatima dobijenim tokom ovog istraživanja. Testirani svetlosno polimerizujući glas-jonomer cementi pokazali su citotoksičan efekat u svim opservacionim periodima počev od blagog do veoma izraženog citotoksičnog efekta do potpune destrukcije ćelijskog materijala. Sa druge strane Leyhausen i sar. i Stea i sar.<sup>29,30</sup> potvrđuju dobijene rezultate dok Babich i Sisensky osim citotoksičnog navode i izraženi genotoksični efekat pojedinih smolom modifikovanih glas-jonomer cementata.<sup>31</sup>

Smatra se da je povećanje koncentracije  $\text{H}^+$  jona jedan od najvažnijih faktor koji dovodi do ispoljavanja citotoksičnog efekta. Promena boje medijuma, kao indikator promene vrednosti pH tokom našeg istraživanja pokazalo je povećanje kiselosti svetlosno polimerizujućih glas-jonomer cementata u prvim trenucima nakon kontakta. Zadržavanje promenjene boje verovatno je posledica ireverzibilnih promena u indikatoru koje sadrži MEM iako je, kasnije, došlo do promene apsolutne vrednosti pH medijuma i približavanje neutralnim vrednostima. U metodologiji većine citiranih radova nisu primenjeni ISO standardi već neka od standardnih laboratorijskih metoda. Nisu navedeni podaci o tome dali su istraživači korigovali vrednosti  $\text{H}^+$  pre nalivanja ćelijske kulture čime bi bio ublažen i toksičan efekat ekstrahovanih materijala u prvim satima eksperimenta. U ovom eksperimentu to nije rađeno iz razloga prvobitne ideje da se istraživanje sprovede prema ISO metodologiji, bez modifikacija, ali se ovako možda mogu objasniti potencijalne razlike u dobijenim rezultatima.

Promena pH sredine sigurno je uticala na stepen ćelijske proliferacije i konfluentnost ćelijske kulture. Ovo se naročito odnosi na inicijalne rezultate (u okviru prvih 24h) mada ne treba zanemariti ni činjenicu da eventualni rastvorljivi produkti materijala mogu imati uticaja na ćelijsku kulturu. Tokom ovog istraživanja nije rađena hemijska analiza ekstrata da bi se ustanovile potencijalno citotoksične komponente, već je ispitivan materijal u celini u obliku pripremljenom prema preskripciji proizvođača.

Otpuštanje jona  $\text{F}^-$  takođe može biti jedan od dodatnih faktora koji su uticali na rast ćelijske kulture. Ovo tim pre što je zapremina i kontaktna površina ispitivanog materijala relativno velika u odnosu na zapremnu medijuma, a poznato je da je otpuštanje  $\text{F}^-$  najintenzivnije u prvim satima tj. prvog dana<sup>31</sup>. Hemijska analiza ekstrata sigurno bi dala potpuniju sliku o sastavi ekstrata i verovatno otkrilo još neke potencijalne citotoksične supstance. Sam efekat na ćelije sigurno je da bi mogao daleko bolje biti objašnjen na osnovu biohemijskih istraživanja i na nivou molekularne biologije ali to nije bio predmet ovog istraživanja, s obzirom da se radi o preliminarnim testovima u ispitivanju stomatoloških materijala.<sup>32</sup>

Jednostrano posmatrajući mogli bi se konstatovati da prema rezultatima primarnih testova na ćelijskoj kulturi ispitivani svetlosno plimerizujući glas-jonomer cementi predstavljaju umereno do jako toksične materijale. Upravo zbog toga veoma je važna pravilna interpretacija rezultata i sagledavanje svih faktora koji su uticali na dobijanje postignutog rezultata i koji su od značaja za konačnu ocenu. U tom smislu treba imati na umu da li je količina primenjenog materijala adekvatna *in vivo* uslovima, kao i da li koncentracija analiziranog uzorka odgovara kliničkim vrednostima.<sup>26,33</sup>

Druga činjenica koji treba naglasiti je neadekvatan kontakt ćelijske kulture sa testiranim materijalima. U *in vivo* uslovima ne postoji direktan kontakt pulpe i restorativnog materijala, izuzimajući slučajeve direktnog prekrivanja i amputacije pulpe, već je on uvek posredan preko preostalog sloja dentina. Ovaj sloj predstavlja svojevrsnu zaštitu pulpe sa svim karakteristikama selektivne polupropustljive membrane. Određene test metode pokušale su da ublaže direktno

dejstvo materijala (ili njihovog ekstrakta) na ćelijsku kulturu postavljanjem različitih polupropustljivih ili propustljivih membrana kao što su agar ili acetatni filteri. Ovakav način testiranja još uvek ne omogućava simuliranje *in vivo* uslova ali je bolji od direktnog kontakta. Napredak je postignut kada je u eksperimentalnu proceduru uveden dentinski disk (Tyas, Hanks, Shmalz, Stenly 1990 i dr.) dobijen iz govedih ili humanih ekstrahovanih zuba. Na taj način simulirani su uslovi *in vivo* sa većinom zaštitnih funkcija dentina. Ovaj metod iako predložen još uvek nije uvršten u važeće ISO standarde, pa tako nije primenjen i u uvom istraživanju.<sup>14</sup>

Drugi problem predstavlja rast ćelijske kulture. U tehnikama predloženim od strane Tyas-a, Meryon-a, i Hume-a, ćelije su gajene na dnu suda za kulturu ćelija. Takav način ne simulira situaciju *in vivo* gde su ćelije u bliskom kontaktu sa dentinom. To može voditi do pogrešnih rezultata zbog rastvorljivosti toksikanta i difuzije, koja se dešava kada ćelije nisu u bliskom kontaktu sa dentinom. Ako se ovome doda i smanjenje štetnog efekta zbog uticaja puferskog kapaciteta dentina može se o dobijenim ekperimentalnim rezultatima razgovarati samo kao orijentacionim pokazateljima. Ipak ovi testovi su i zamišljeni da daju polaznu informaciju o akutnom toksičnom efektu bez pretenzija da daju konačnu ocenu o materijalu.<sup>10</sup>

Postoje mnogobrojni podaci o biološkom testiranju stomatoloških materijala *in vitro* tehnikama ćelijske kulture kao i različitim *in vivo* metodama. Ove tehnike, kao i rezultati kliničkih istraživanja omogućavaju upoređivanje materijala na osnovu njihove toksičnosti.<sup>27</sup> Zbog toga sa aspekta generalnih toksičnih efekata, posebno kada se radi o materijalima za dentalne ispune, jednostavan i jeftin test *in vitro* može da zameni druge, obimnije testove na životinjama. Relativno malo studija je pokušalo da poredi rezultate nekoliko različitih tehnika ispitivanja, što prestavlja limitirajući faktor za postavljanje etalona u ispitivanjima novih materijala ili kontroli kvaliteta postojećih. Ako su takva poređenja i pravljena, često je, ali ne uvek, konstatovana slaba korelacija između rezultata različitih metodologija ali je registrovana mogućnost uspostavljanja korelacija između različitih nivo

istraživanja (Mjor i dr., 1977a, 1977b).<sup>24</sup> Na taj način moguće je nakon kvantifikovanja dobijenih rezultata ispitivanja i ustanovljenja korelacionih odnosa redukovati broj i obim *in vivo* eksperimenata kao i kliničkih istraživanja. Ukratko u poređenju sa ekperimentima na životinja i kliničkim studijama, prednosti testiranja toksičnosti *in vitro* testovima uključuju: kontrolisane eksperimentalne uslove, nisku cenu, brzo izvođenje i nepostojanje etičkog problema. Od ograničenja koja se nameću treba istaći nedostatak simuliranja *in vivo* situacije, i teškoće u izvođenju verodostojnih zaključaka iz dobijenih podataka.

## Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata tokom ovog istraživanja, kao i na osnovu njihove detaljne analize može se zaključiti sledeće:

1. Test procedure preporučene ISO standardima koje su korišćene tokom ovog istraživanja pokazale su da se mogu lako izvesti, da se mogu jednostavno i verno reprodukovati i da se njihovi rezultati mogu jasno prezentovati. Zato su pogodne za masovna i rutinska istraživanja.
2. Test citotoksičnosti pokazao je izražen citotoksičan efekat svih ispitivanih materijala bez statistički značajne razlike. Ovakvi rezultati mogu se posmatrati samo kao orijentacioni dok se ne ustanovi jasna korelacija stepena citotoksičnog efekta i rezultata dobijenih testovima primene.
3. Ćelijske kulture mogu biti korisne u kontroli kvaliteta stomatoloških materijala na najbezbolniji, najbrži i najjeftiniji način.

**Zahvalnost** Na nesebičnoj pomoći u uvom radu zahvaljujem se Dr. sci. Branislavi Keserović, Dipl. biologu Olgi Popović i profesionalnom osoblju Odeljenja za kulturu tkiva Instituta za virusologiju Torlak.

## Literatura

1. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, van Horn JR. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 1997; Vol. 18 (16): 1115-20.
2. Hotz P.R. Adverse clinical reactions to dental filling materials, clinical procedures; Abss book of simposium : Dental filling materials: Hazards to patient and to environment? p:7; in 33-rd CED IADR, Berlin 1996.
3. Sjögren 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; Vol. 84 (2): 229-36.
4. ISO/DIS 10993-10: In Biological evaluation of medical devices: Tests for irritation and sensitization. 1994
5. ISO/DIS 10993-5: In Biological evaluation of medical devices: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. 1992.
6. ISO/DIS 10993-6: In Biological evaluation of medical devices: Tests for local effects after implantation. 1994.
7. ISO/TC 106 Dentistry- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry- Test methods. (Revision of ISO/TR-7405/84) 1995 g.
8. ISO/TR 7405 : Biological evaluation of dental materials. 1984.
9. Oilo G.: Biodegradation of Dental Composites and Glass-ionomer Cements G.; *Adv. Dent. Res.* 1992;6:50-54.
10. Marković D. : Biokompatibilnost glas-jonomer cemenata. Biblioteka disertatio-Zadužbina Andrejević, 2001
11. Schmalz G, Browne RM. The biological evaluation of medical devices used in dentistry. *International Dental Journal* 1995, 45:275-278.
12. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *J.Dent. Suppl.* 1994;(2) 22: S6-S11,
13. Pucar A, D. Marković. Analisys of cell culture of human fibroblasts for citotoxicity examination by SEM. 3rd BaSS. Booc of abstr. 1997. (abst.No 84).

14. Schmalz G., Schweikl H., Eibl M.: Growth kinetics of fibroblasts on bovine dentin. *Journal of Endodontics*, Vol.20, No 9, 435-456, 1994.
15. Bratel J, Jontell M; Dahlgren U; Bergenholtz G: Effects of root canal sealers on immunocompetent cells in vitro and in vivo. *Int Endod J*, 1998; Vol.31(3),178-88.
16. Schmalz G: The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 1998; Vol. 106 (2): 696-706.
17. Raščanin V.: Mogućnost poboljšanja atezije ispuna i zaštite pulpe kod primjene atezivnih kompozitnih materijala. Doktorska disertacija, Beograd 1990.
18. Stenly H.R.: Pulpal responses to ionomer cement - biological characteristics. *JADA* 1990; Vol.120:25-29.
19. Mount GJ: Clinical performance of glass-ionomers. *Biomaterials*, 1998; Vol. 19 (6): 573-9.
20. Kasten FH, Pineda LF, Schneider PE, Rawls HR, Foster TA: Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1989;25(1):57-62.
21. Stanislawski L; Daniau X; Lauti A; Goldberg M: Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*, 1999; Vol. 48 (3):277-88.
22. Savarino L; Cervellati M; Stea S; Cavedagna D; Donati ME; Pizzoferrato A; Visentin M: In vitro investigation of aluminum and fluoride release from compomers, conventional and resin-modified glass-ionomer cements: a standardized approach. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2000; Vol. 11 (3): 289-300.
23. Schedle A; Franz A; Rausch-Fan X; Spittler A; Lucas T; Samorapoompichit P; Sperr W; Boltz-Nitulescu G: Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater*, 1998 Nov; Vol. 14 (6), pp. 429-40.
24. Tronstad, L., A. Wennberg. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *International Endodontic Journal*, 1980;13: 131-138.
25. Yamagata N, Oshima H: Cytotoxic effects of restorative materials on early passage cultured cells derived from human gingiva. *Shika Zairyo Kikai*;9(4):541-554 Jul 1990
26. Marković D.: Biocompatibility- prerequisite for successful therapeutic procedure. *Booc of abstr.* p-66.1997.
27. Mjor I. A.: A comparison of in vivo and in vitro methods for toxicity testing of dental materijals. *Internacional Endodontic Journal* 13,139-142, 1980.
28. van Wyk CW; Olivier A; Maritz JS: Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing? *J Oral Pathol Med*, 2001 Mar; Vol. 30 (3), pp. 168-77.
29. Leyhausen G; Abtahi M; Karbaksch M; Sapotnick A; Geurtsen W: Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials*, 1998 Mar; Vol. 19 (6), pp. 559-64.
30. Stea S; Visentin M; Cervellati M; Verri E; Cenni E; Savarino L; Stea S; Pizzoferrato A: In vitro sister chromatid exchange induced by glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*, 1998 Jun 15; Vol. 40 (4), pp. 545-50.
31. Babich H; Sinensky MC: Indirect cytotoxicity of dental materials: a study with Transwell inserts and the neutral red uptake assay. *Altern Lab Anim*, 2001 Jan-Feb; Vol. 29 (1), pp. 9-13.
32. Ciapetti G; Granchi D; Verri E; Savarino L; Stea S; Savioli F; Gori A; Pizzoferrato A: False positive results in cytotoxicity testing due to unexpectedly volatile compounds. *J Biomed Mater Res*, 1998 Feb; Vol. 39 (2), pp. 286-91.
33. Mjor I.A.: Problems and Benefits Associated with Restorative Materials: Side-effects and Long-term Cost. *Adv.Dent.Res*, 6, 7-16, Sep.1992.
34. Mjor I.A.: Current views on biological testing of restorative materials. *J. Oral Rehabilitation*, vol.17,503-507,1990.

#### BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF GLAS IONOMER CEMENT-TEST OF CYTOTOXICITY

##### SUMMARY

Evaluation of cytotoxicity is a first step in assessment of dental materials biocompatibility. Necessity for unique criteria in researches resulted in international standard methodology (ISO). The aim of this study was to assess the cytotoxicity of four restorative materials (three glass ionomer cements and one composite material) and to define advantages and disadvantages of common ISO methodology for evaluation of this aspect of dental materials biocompatibility. Research was designed according to ISO/TC 106/1995 and ISO/ 10993-5/1994 methodology. Materials used in this investigation were Fuji II LC (GC), Vitremer (3M), Ionosit fill (DMG-Hamburg), Luxat (DMG-Hamburg). Evaluation of cytotoxicity was carried out on standardized Human Diploid Cell Lung WI-38. Obtained results showed expressive cytotoxic effect of all investigated materials without statistically significant difference. Estimation of material biocompatibility and assessment of obtained results can be made only after establishment of correlation with test results. Common ISO methodology is simple for conductance and reproduction, and use of cell cultures in researches is painless, cost effective and without moral or ethical dilemma.

**Key words:** glass-ionomer cement, biocompatibility, cytotoxicity

Dejan Markovic

#### Address for correspondence

Faculty of Stomatology  
Clinic for Pediatric and Preventive Dentistry  
Dr. Subotica 11  
11000 Belgrade  
tel +381 11 684 581