

In vitro ispitivanje potencijalne toksičnosti oralno tkivnih kondicionera

Nebojša Krunic¹, Ljubiša Nikolić², Milena Kostić³, Stevo Najman⁴, Vesna Nikolić², Jelena Najdanović⁴

¹Klinika za stomatologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

²Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac, Srbija

³Odjeljenje za stomatološku protetiku, Klinika za stomatologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

⁴Institut za biologiju sa humanom genetikom, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

Izvod

Oralno tkivni kondicioneri predstavljaju materijale koji se povremeno aplikuju na gingivalnu površinu pločaste zubne proteze, a radi eliminacije mehaničkih iritacija i ozdravljenja oštećene i inflamirane sluzokože. Po hemijskom sastavu mogu se podeliti na metakrilatne i silikonske kondicionere. Cilj istraživanja bio je ispitivanje potencijalne toksičnosti jednodnevnih, sedmnodnevnih i tridesetodnevnih ekstrakata oralno tkivnih kondicionera različitih koncentracija. U istraživanju su korišćeni ekstrakti dva silikonska i četiri metakrilatna materijala različitih efektivnih koncentracija (5, 12,5, 25 i 50%). Količina toksičnih supstanci i dinamika njihovog oslobađanja iz metakrilatnih kondicionera praćeni su tačnom hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC). Ova analiza nije mogla da se primeni na silikonske kondicionere jer se oni sastoje od polimernih i neorganskih supstanci. Ocena proliferativnosti ćelijske kulture, kao parametara citotoksičnosti, vršena je Mosmann-ovim MTT testom, koji se zasniva na redukciji žute tetrazolijumove soli (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid – MTT) mitohondrijalnom sukcinat dehidrogenazom metabolički aktivnih ćelija, pri čemu nastaje plavi formazan. Sa porastom dužine ekstrakcionog perioda raste i količina oslobođenih potencijalno toksičnih supstanci iz uzoraka metakrilatnih kondicionera. Citotoksičnost ispitivanih materijala značajno raste sa porastom koncentracije ispitivanih ekstrakata, kao i sa povećanjem dužine trajanja ekstrakcionog perioda. S ciljem poboljšanja bioloških karakteristika pločastih zubnih proteza podloženih mekim materijalima preporučuje se njihovo potapanje u vodu dan pre predaje pacijentu. Silikonski kondicioneri su pokazali manju citotoksičnost u odnosu na metakrilatne kondicionere, što ih preporučuje za primenu u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

Ključne reči: citotoksičnost; oralno tkivni kondicioneri; MTT test; HPLC.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Oralno tkivni kondicioneri pripadaju grupi mekih materijala za podlaganje koji se povremeno aplikuju na gingivalnu površinu pločaste zubne proteze, s ciljem eliminacije mehaničkih iritacija i ozdravljenja oštećene ili inflamirane sluzokože [1]. Reakcija vezivanja oralnih kondicionera odvija se u ustima pacijenta. Nakon polimerizacije ostaju ugipljivi, rezilijentni, nekoliko dana do nekoliko nedelja. Zahvaljujući svojim viskoelastičnim svojstvima, ovi materijali omogućavaju podjednaku raspodelu mastikatornih sila na potporna tkiva, te na taj način uklanjaju bol i razne tegobe kod nosioca zubnih proteza sa veoma redukovanim, ostrim ili podminiranim alveolarnim grebenima [2,3].

Oralno tkivni kondicioneri se po svom hemijskom sastavu mogu podeliti na metakrilatne i silikonske kondicionere.

Osnovni polimer (prah) metakrilatnih kondicionera obično je poli(etilmetakrilat) (PEMA), a ređe poli(metil-

STRUČNI RAD

UDK 616.314-77:547:678.84

Hem. Ind. 65 (6) 697–706 (2011)

doi: 10.2298/HEMIND110627056K

metakrilat) (PMMA). Tečni metakrilni monomer najčešće se može naći u smeši sa estarskim plastifikatorima (ftalati, najčešće di-*n*-butil-ftalat) i etanolom [4,5]. Etanol se iz materijala u usnu duplju oslobađa u toku prvih 24 časa, te se može očekivati njegovo iritirajuće dejstvo na već traumatizovanu sluzokožu [3]. Oslobađanje plastifikatora je sporije, a kao posledica njegovog gubitka materijal vremenom postaje čvrst i neupotrebljiv, pa ga je potrebno zameniti [1,6].

Silikoni su najčešće u osnovi hidroksilovani poli(dimetilsiloksani) i poli(vinilsiloksilani). Silikonski kondicioneri sadrže do 40% silikatnih punila što im povećava otpornost na dejstvo različitih sila [7]. Karakteristika silikonskih kondicionera je rastvorljivost punila u oralnim tečnostima [2].

Postoje brojni dokazi da pojedine komponente metakrilatnih materijala mogu delovati štetno na organizam i izazvati promene na lokalnom, a ređe na sistemskom nivou [8,9]. Smatra se da čak 17% korisnika pločastih zubnih proteza pokazuje preosetljivost na metakrilate [10]. Potencijalno toksično dejstvo metakrilatnih kondicionera pripisuje se tzv. rezidualnim monomerima, posledici nepotpune polimerizacije materijala [11–13]. Dosadašnja *in vitro* istraživanja pokazala su

Prepiska: N. Krunic, Klinika za stomatologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Bulevar dr Zorana Đinđića 52, 18000 Niš, Srbija.

E-pošta: krunic@ni.ac.rs

Rad primljen: 27. jun, 2011

Rad prihvaćen: 2. avgust, 2011

citotoksičan i kancerogeni efekat ftalatnih plastifikatora i inicijatora polimerizacije, benzoil peroksida [14–19].

Cilj istraživanja bio je ispitivanje potencijalne toksičnosti jednodnevnih, sedmodnevnih i tridesetodnevnih ekstrakata oralno tkivnih kondicionera različitih koncentracija. Pomoću HPLC analize izvršena je identifikacija potencijalno toksičnih niskomolekularnih supstanci iz metakrilatnih kondicionera, dok kod silikonskih HPLC analiza ne bi bila pouzdana, jer se silikonski kondicioneri sastoje, uglavnom, od polimernih i neorganskih supstanci.

MATERIJAL I METODE

Reagensi

– Metilmetakrilat, MMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$, $M = 100,12$ g/mol, 98,5%, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, SAD.

– *n*-Butilmetakrilat, BuMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOC}_4\text{H}_9$, $M = 142,20$ g/mol, 99%, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemačka.

– Etilmetakrilat, EMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOC}_2\text{H}_5$, $M = 114,14$ g/mol, 99%, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, SAD.

– Etilenglikol-dimetakrilat, EGDM, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{OCOC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $M = 198,22$ g/mol, 98%, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka.

– Benzoil-peroksid, BP, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}_2$, $M = 242,23$ g/mol, 99%, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka.

– Dibutil-ftalat, dBuFt, $\text{C}_6\text{H}_4-1,2-[\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_2$, $M = 278,34$ g/mol 99%, Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, SAD.

– Metanol, CH_3OH , $M = 32,04$ g/mol, Chromasolv 99,9%, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemačka.

Materijali

Ispitivani materijali prikazani su u tabeli 1.

Korišćenjem kalupa od kondenzacionih silikona (Optosil, Heraeus, Nemačka) napravljeni su uzorci ispitivanih materijala jednakih dimenzija (15 mm×10 mm×2 mm) i polimerizovani u inkubatoru (Binder, Nemačka) na temperaturi tela (37 ± 1 °C).

Ekstrakti su dobijeni inkubacijom uzoraka materijala

u veštačkoj pljuvački (tabela 2) (0,1 g materijala : 1 cm³ ekstrakcionog rastvarača, ISO 0993-12), u zatvorenim plastičnim epruветama na temperaturi od 37 ± 1 °C i u vodenom kupatilu (GFL, Nemačka). Dužina ekstrakcionog perioda iznosila je jedan, sedam i trideset dana.

Tabela 2. Korišćeni model veštačke pljuvačke [20]

Table 2. Used artificial saliva model [20]

Komponente	g Komponente/dm ³ dejonizovane vode
Natrijum-hidrogen-karbonat	4,2
Natrijum-hlorid	0,5
Kalijum-karbonat	0,2

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

Radi kvalitativnog i kvantitativnog određivanja količine potencijalno toksičnih supstanci u ekstraktima metakrilnih materijala nakon svih predviđenih ekstrakcionih perioda korišćena je HPLC analiza. Uzorci ekstrakata su filtrirani na ekono-filiteru prečnika pora 0,45 μm, nakon čega je po 0,02 cm³ injektirano u HPLC uređaj Agilent 1100 Series (SAD), sa DAD 1200 detektorom i analitičkom kolonom Supelco Discovery HS C18 250 mm×4,6 mm, 5 μm (Sigma-Aldrich, SAD). Mobilna faza bila je metanol a njen protok iznosio je 1 cm³/min. Termostatiranje kolone obavljeno je na 25 °C.

Detektovane supstance i reagensi korišćeni za izradu kalibracionih kriva prikazani su u tabeli 3. Kalibracione krive su izrađivane od serije rastvora svake od ispitivanih supstanci u metanolu. Početna koncentracija ispitivanog jedinjenja bila je oko 1 mg/cm³, od koje je, zatim, razblaživanjem metanolom pravljen serija rastvora manjih koncentracija. Iz dobijenih hromatograma očitavani su potrebni podaci: retenciono vreme svakog jedinjenja, R_t i površina pika, A . Uređaj očitava UV/Vis spektar u svakoj tački pika na hromatogramu, tako da se iz spektara može odrediti i vrednost λ_{max} , tj. talasna dužina na kojoj jedinjenje ima maksimalnu apsorbanu (tabela 3). Kako sva ispitivana jedinjenja imaju maksimum apsorbanice oko 205 nm, ova talasna dužina je izabrana za izradu kalibracionih kriva i za kasnija ispitivanja uzoraka. U tabeli 3 su prikazani još i koeficijenti linearne zavisnosti površine pika i koncentracije ispitivanog jedinjenja prema jednačini (1):

Tabela 1. Ispitivani materijali

Table 1. Tested materials

Materijal	Proizvođač	Sastav
GC Reline Soft	GC Reline Products Corp. Japan	Silikonski kondicioneri
Ufigel P	Voco, Cuxhaven, Nemačka	
Lang Flexacryl	Lang Dental Manufacturing Co, SAD	Metakrilatni kondicioneri
Lang Immediate		
Vertex Soft	Vertex-Dental B.V., Holandija	
Bosworth Trusoft	Bosworth Company, SAD	

Tabela 3. Vrednosti retencionih vremena, maksimalnih apsorbanci, opsega koncentracija za koje postoji linearna zavisnost površina pikova i koncentracija i koeficijenti linearne korelacije, R, detektovanih supstanci
 Table 3. Values of retention time, maximal absorbances, concentration range for which linear dependence of peak surface exists and concentration and coefficients of linear correlation, R, for determined compounds

Potencijalno toksična supstanca	R_t / min	λ_{max} / nm	Linearna zavisnost za koncentracije C (mg/cm ³)	a	b	R
MMA	2,637	207	0 do 0,14	660,8	74193,8	0,988
BuMA	2,946	208	0 do 0,10	255,6	60871,9	0,999
EMA	2,289	207	0 do 0,14	690,5	77532,5	0,991
BP	3,332	204 i 236	0 do 0,12	418,9	43996,2	0,998
dBuFt	3,514	205 i 225	0 do 0,10	1046,1	56541,8	0,996
EGDM	3,049	208	0 do 0,10	789,5	67892,5	0,995

$$A = a + bC \quad (1)$$

gde je A - površina pika, mAU*s, C - koncentracija ispitivanog jedinjenja, mg/cm³.

Mosmann-ov MTT test

Materijali su ispitivani na permanentnoj humanoj ćelijskoj liniji HeLa. Čelije su gajene u DMEM-u (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, PAA Laboratories GmbH) sa dodatkom L-glutamina, 100 IU/cm³ penicilina, 100 GU/cm³ streptomocina i 10% fetalnog goveđeg seruma (Foetal Calf Serum, Gibco, Velika Britanija). Rad u ćelijskoj kulturi obavljan je u vertikalnoj sterilnoj komori (Bioair Instruments, Italija). Čelijska kultura održavana je u inkubatoru, u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ na 37 °C.

Čelije su zasađene u tri sterilne ploče za kultivaciju ćelija sa 96 mesta, za svaki od ekstrakcionih perioda. U svakom od pojedinačnih mesta zasađeno je po 10⁴ ćelija u 0,1 cm³ medijuma, nakon čega je sledila prekultivacija kulture u trajanju od 24 časa. Nakon tog perioda u svako od pojedinačnih mesta dodato je još 0,1 cm³ ekstrakata kondicionera različitih koncentracija. Kontrola je sadržala 10⁴ ćelija u 0,2 cm³ medijuma. Test je rađen u tetraplikatu.

Za ispitivanje dejstva materijala na ćelijsku kulturu napravljene su 10, 25, 50 i 100% koncentracije ekstrakata. Efektivne koncentracije ekstrakata su bile dvostruko manje jer su ekstrakti dodavani na isti volumen medijuma sa ćelijama. Svi ekstrakti sterilisani su filtracijom kroz 0,2 µm filter.

Nakon inkubacije od 72 sata urađen je MTT test, zasnovan na redukciji žute tetrazolijumove soli (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid – MTT) mitohondrijalnom sukcinat dehidrogenazom metabolički aktivnih ćelija, pri čemu nastaje plavi formazan.

Medijum u kome su inkubirane ćelije izvučen je, ćelije su isprane sa 0,1 cm³ PBS-a (fosfatna puferisana so), nakon čega je dodato je 0,02 cm³ MTT-a (Sigma, SAD). Posle četvorosatne inkubacije na 37 °C, nastali kristali formazana rastvoreni su dodatkom 0,1 cm³ kiselog izopropanola (0,04 mol HCl/dm³ izopropanola). Spektrofotometrijsko merenje redukcije MTT-a vršeno je na 540

nm na višekanalnom fotometru (Multiskan Ascent N 354, Thermo Labsystems, Finska). Postoji direktna proporcionalnost između rasta ćelijske kulture i intenziteta plave boje utvrđenim spektrofotometrijskim merenjem apsorbance rastvora.

Eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su predstavljeni kao intenzitet redukcije MTT-a u odnosu na kontrolu. Sa smanjenjem intenziteta redukovanog MTT-a raste citotoksičnost ispitivanih materijala. Razlika u nivou citotoksičnog efekta posmatrana je u odnosu na vrstu materijala, dužinu ekstrakcionog perioda i koncentraciju ekstrakata. Statistička obrada rezultata vršena je analizom varijanse (ANOVA) i Post Hoc analizom (paket SPSS 15.0).

REZULTATI

Smanjenjem količine svih merenih toksičnih supstanci u čvrstim uzorcima oralno tkivnih kondicionera srazmerno se povećava njihova koncentracija u dobijenim ekstraktima. Sa porastom dužine ekstrakcije povećava se i količina detektovanih supstanci u ispitivanim ekstraktima. Vrednosti količine i dinamike promene toksičnih komponenti oralnih kondicionera u rastvoru veštačke pljuvačke prikazane su u tabelama 4–6. Gubitak plastifikatora doveo je do očvršćavanja uzoraka metakrilatnih kondicionera.

Na slikama 1–3 prikazane su srednje vrednosti intenziteta redukovanog MTT-a, u zavisnosti od vrste i efektivne koncentracije ekstrakata silikonskih kondicionera u odnosu na kontrolu, nakon ekstrakcionog perioda od jednog, sedam i trideset dana.

Iako ANOVA analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost pada intenziteta redukcije MTT-a, sa porastom koncentracije ekstrakata silikona, bez obzira na dužinu ekstrakcionog perioda, očigledno je da ta povezanost postoji.

Na osnovu podataka iz tabele 7, ANOVA analizom utvrđeno je da intenzitet redukcije MTT-a, a stoga i ćelijska vijabilnost i proliferativnost opadaju sa vremenom, pri čemu statistička značajnost postoji jedino u slučaju 25% ekstrakata Ufigel P ($p < 0,05$).

Tabela 4. Srednje vrednosti i standardne devijacije količine ekstrahovanih rezidualnih monomera iz uzoraka metakrilatnih kondicionera

Table 4. Average values and standard deviations of the extracted residual monomers of methacrylic conditioners

Ispitivani materijal	Rezidualni monomer	Koncentracija jedinjenja u veštačkoj pljuvački, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		
		1 dan	7 dana	30 dana
Lang Flexacryl	EMA	29,64±1,79	51,71±3,40	86,29±4,64
	BuMA	1,14±0,09	7,39±0,45	30,65±1,75
Lang Immediate	MMA	48,32±3,18	75,85±4,02	119,78±7,15
	EMA	16,43±0,56	21,99±1,85	32,65±3,35
Vertex Soft	MMA	46,40±3,56	73,80±4,62	116,44±6,55
	EGDM	1,245±0,121	1,658±0,133	2,137±1,254
Bosworth Trusoft	EMA	7,06±0,49	29,28±1,41	49,38±92,12

Tabela 5. Srednje vrednosti i standardne devijacije količine ekstrahovanog benzoil peroksida iz uzoraka metakrilatnih kondicionera

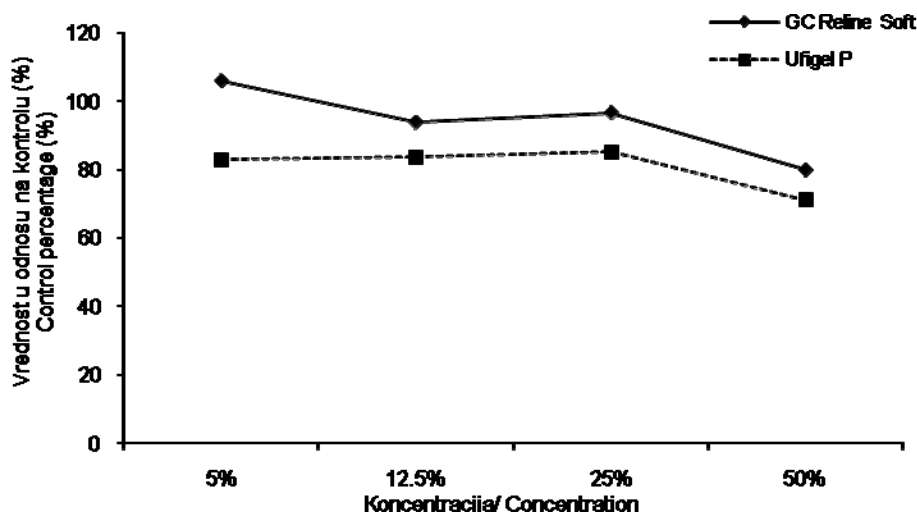
Table 5. Average values and standard deviations of the extracted benzoyl peroxide of methacrylic conditioners

Ispitivani materijal	Koncentracija BP u veštačkoj pljuvački, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		
	1 dan	7 dana	30 dana
Lang Flexacryl	0,44±0,05	3,69±0,39	10,17±0,76
Lang Immediate	0,46±0,07	3,11±0,30	11,25±0,84

Tabela 6. Srednje vrednosti i standardne devijacije količine ekstrahovanog plastifikatora iz uzoraka metakrilatnih kondicionera

Table 6. Average values and standard deviations of the extracted plasticizer of methacrylic conditioners

Ispitivani materijal	Koncentracija dBuFt u veštačkoj pljuvački, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		
	1 dan	7 dana	30 dana
Lang Flexacryl	1,30±0,09	2,15±0,20	11,64±0,85
Lang Immediate	1,98±0,11	5,73±0,24	7,53±0,62



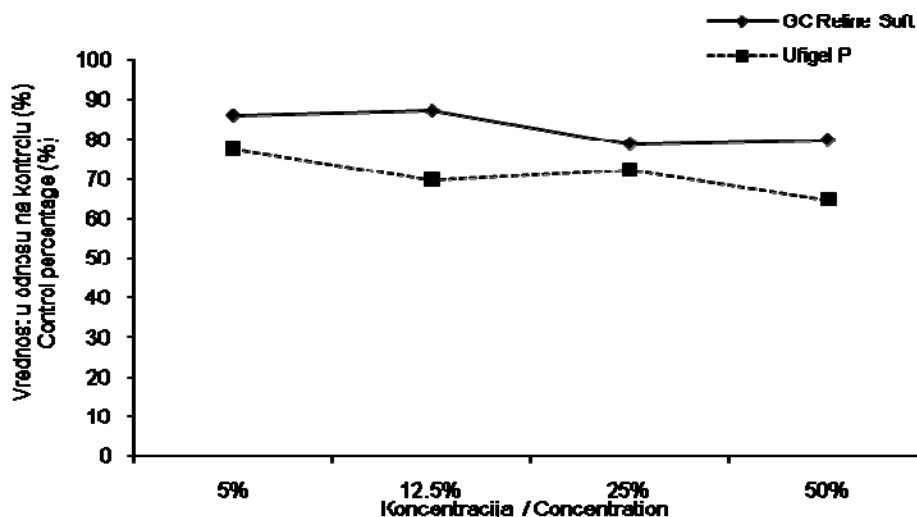
Slika 1. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon jednodnevne ekstrakcije silikonskih kondicionera.

Figure 1. Average values of MTT reduction intensity after one day extraction period of silicon conditioners.

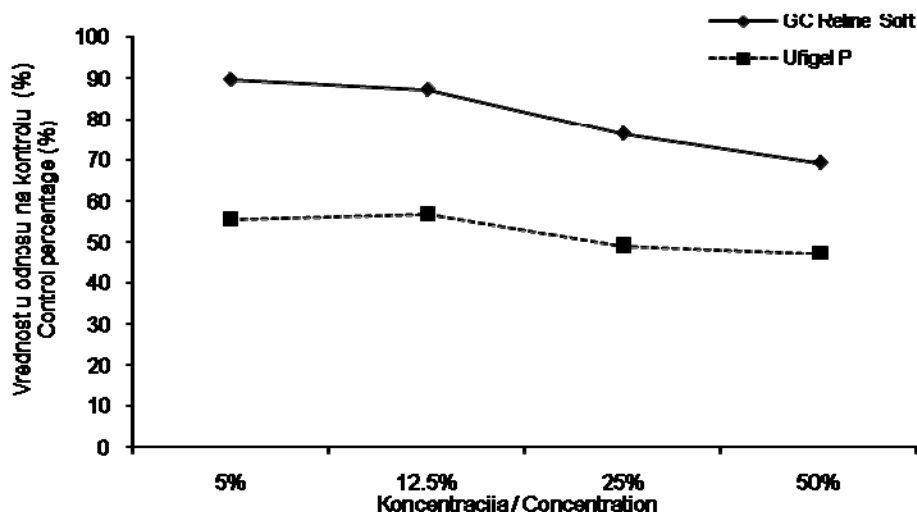
Naknadnom Post Hoc analizom utvrđene su statistički značajno niže prosečne vrednosti intenziteta redukcije MTT-a tridesetog u odnosu na prvi dan ekstrakcije pri upotrebi ekstrakta Ufigel P koncentracije 12,5% ($p < 0,01$) i 25% ($p < 0,05$).

Srednje vrednosti intenziteta redukovano MTT-a u zavisnosti od vrste i efektivne koncentracije ekstrakata

metakrilatnih kondicionera u odnosu na kontrolu, nakon različitih ekstrakcionih perioda prikazane su na slikama 4–6. Evidentno je smanjenje intenziteta redukcije MTT-a sa porastom koncentracija, iako ANOVA analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost, osim u slučaju primene tridesetodnevnih ekstrakata Lang Immediate ($p < 0,05$).



Slika 2. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon sedmodnevne ekstrakcije silikonskih kondicionera.
Figure 2. Average values of MTT reduction intensity after seven day extraction period of silicon conditioners.



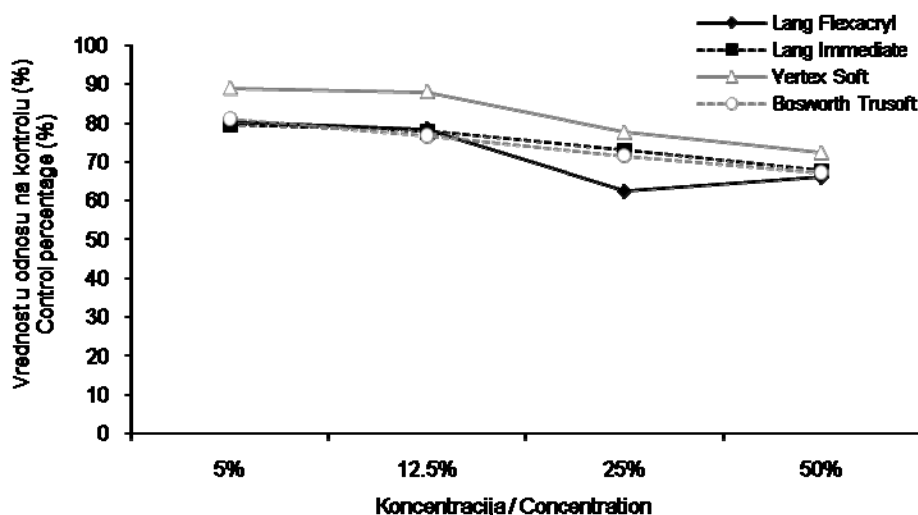
Slika 3. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon tridesetodnevne ekstrakcije silikonskih kondicionera.
Figure 3. Average values of MTT reduction intensity after one thirty extraction period of silicon conditioners.

Iz tabele 8 može se uočiti da intenzitet redukcije MTT-a opada sa vremenom za sve ispitivane koncentracije ekstrakata, a ANOVA analizom utvrđeno je da statistička značajnost postoji kod 5 i 12,5% ekstrakta metakrilata tipa Lang Flexacryl i Vertex Soft ($p < 0,05$).

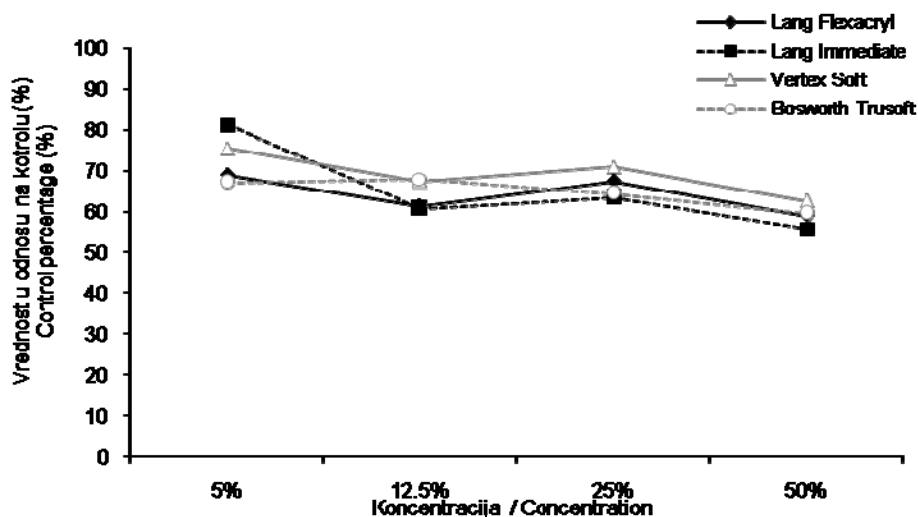
Sledstvenom Post Hoc analizom utvrđene su statistički značajno niže prosečne vrednosti intenziteta redukcije MTT-a tridesetog u odnosu na prvi dan ekstrakcije pri korišćenju oba navedena tipa metakrilata koncentracije 5 i 12,5% ($p < 0,05$). Post Hoc analizom dobijena je statistički značajno viša prosečna vrednost intenziteta redukcije MTT-a prvog u odnosu na trideseti dan ekstrakcije i u slučaju 5% koncentracije ekstrakta Bosworth Trusoft metakrilata ($p < 0,01$).

DISKUSIJA

Ispitivanje količine komponenti oslobođenih iz protetskih nadoknada u pljuvačku značajno je kako zbog njenog lokalnog dejstva na oralnu sluzokožu, tako i sa aspekta njenog sistemskog dejstva, jer u njoj rastvorene supstance gutanjem dospevaju u sistem organa za varenje. Oralno tkivni kondicioneri su u kontaktu sa tkivom usne duplje posredstvom pljuvačke. U istraživanju je, dakle, bilo neophodno ostvariti uslove koji uspešno kombinuju delimično oslobađanje toksičnih supstanci i indirektni kontakt materijala i tkiva, kako bi se što vernije simulirali uslovi u usnoj duplji [21]. *In vitro* ispitivanja mogu se sprovoditi korišćenjem prirodne ali su mnogo češća sa veštačkom pljuvačkom, zbog ujednačavanja uslova eksperimenata i zbog sprečavanja kontaminacije uzoraka. Predviđeni su ekstrakcioni periodi od



Slika 4. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon jednodnevne ekstrakcije metakriltnih kondicionera.
Figure 4. Average values of MTT reduction intensity after one day extraction period of methacrylic conditioners.



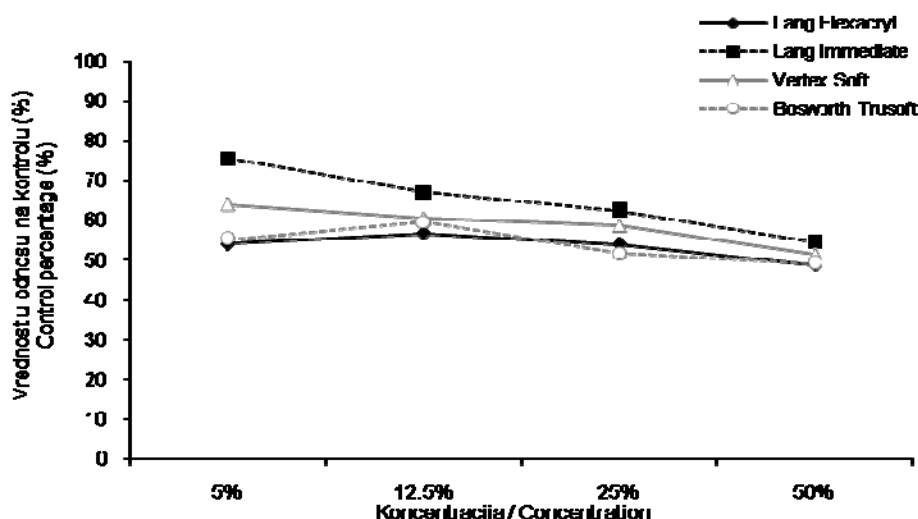
Slika 5. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon sedmodnevne ekstrakcije metakrilatnih kondicionera.
Figure 5. Average values of MTT reduction intensity after seven days extraction period of methacrylic conditioners.

jednog, sedam i trideset dana, a s ciljem sagledavanja ritma oslobađanja i količine potencijalno toksičnih materija iz materijala u pljuvačku u jasno ograničenom vremenskom intervalu njihove kliničke upotrebljivosti.

Vezivanje ispitivanih materijala obavljeno je na temperaturi tela (37 ± 1 °C). Manja koncentracija rezidualnog monomera u slučaju ekstrakcije materijala na bazi PEMA posledica je niže vrednosti tačke ostaklivanja PEMA ($T_g = 65$ °C) u odnosu na PMMA ($T_g = 115$ °C) [22,23]. Najveća količina nevezanih monomera oslobođena je u toku prvog dana ekstrakcije. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima Bayaktar i sar. i Baker i sar. [24,25]. Nasuprot tome, najveći pad BuMA u uzorcima ispitivanih metakrilata zabeležen je nakon sedmodnevne ekstrakcije. Sa produženjem trajanja ekstrakcionog perioda, povećava se i količina ekstrahovanih neizre-

agovalih monomera iz svih ispitivanih metakrilatnih materijala.

Rezultati su pokazali da se količina benzoil-peroksida u polimerizovanim materijalima neznatno smanjuje potapanjem u rastvor veštačke pljuvačke sa vremenom, što je u korelaciji sa istraživanjem Hausteina i sar. [26]. Naime, povećanje koncentracije BP u veštačkoj pljuvački za 30 dana je veličine od 10 do 11 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Cabe i Basker preporučuju potapanje u destilovanu vodu kao efikasan način smanjenja količine BP u pločastim zubnim protezama [27,28]. Nasuprot rezultatima ove studije, Boeckler i sar. ne nalaze smanjenje BP nakon potapanja u rastvor veštačke pljuvačke temperature tela u trajanju od 192 h, ni za jednu od ispitivanih vrsta metakrilata. Prema njihovim saznanjima, količina BP može se redukovati isključivo toplom postpolimerizacijom [28].



Slika 6. Srednje vrednosti intenziteta redukcije MTT-a nakon tridesetodnevne ekstrakcije metakrilatnih kondicionera.
Figure 6. Average values of MTT reduction intensity after thirty days extraction period of methacrylic conditioners.

Tabela 7. Rezultati poređenja statističke značajnosti, *p*, u smanjenju intenziteta redukcije MTT-a ANOVA analizom za različite koncentracije ekstrakta silikonskih kondicionera nakon ekstrakcionih perioda od jednog, sedam i trideset dana
Table 7. Results of comparison of statistical significance, *p*, of MTT reduction intensity decreasing using ANOVA analysis for different concentrations of silicon conditioner extracts after extraction periods of one, seven and thirty days

Konzentracija ekstrakta, %	GC Reline Soft	Ufigel P
5	0,6178	0,0973
12,5	0,9375	0,0607
25	0,6325	0,0345
50	0,7017	0,1771

Tabela 8. Rezultati poređenja statističke značajnosti, *p*, u smanjenju intenziteta redukcije MTT-a ANOVA analizom za različite koncentracije ekstrakta metakrilatnih kondicionera nakon različitih ekstrakcionog perioda od jednog, sedam i trideset dana
Table 8. Results of comparison of statistical significance of MTT reduction intensity decreasing using ANOVA analysis for different concentrations of methacrylic conditioner extracts after extraction periods of one, seven and thirty days

Konzentracija ekstrakta, %	Lang Flexacryl	Lang Immediate	Vertex Soft	Bosworth Trusoft
5	0,0401	0,5849	0,0300	0,0756
12,5	0,0127	0,2636	0,0413	0,3172
25	0,4387	0,0507	0,2609	0,1274
50	0,0593	0,0982	0,2386	0,2366

Hashimoto i sar. u uslovima *in vitro* dokazali su toksičan efekat plastifikatora iz grupe ftalata [3]. Sa povećanjem koncentracije ftalata u veštačkoj pljuvački metakrilatni kondicioneri su postali čvrsti i neupotreb-
ljivi.

Upotreba MTT testa indicovana je u slučaju ispitivanja materijala koji sadrži potencijalno toksične supstance rastvorljive u fiziološkim tečnostima, što predstavlja indirektni, šire upotrebljavan način utvrđivanja njihove potencijalne toksičnosti. Radi biološkog ocenjivanja stomatoloških materijala, koriste se brze, efikasne i ne tako skupe *in vitro* metode koje daju važne informacije o njihovoj citotoksičnosti [29–31]. Sa stano-
višta interpretacije rezultata, analize testova koji procenjuju stomatološke materijale pokazale su da većina

ovih testova samo delimično imitira kliničku situaciju, s obzirom na to da ne sagledava protok pljuvačke i njen puferski kapacitet.

U traženju korelacije između uslova koji postoje u usnoj duplji i *in vitro* istraživanja postoji problem relevantne koncentracije primenjenog materijala. Ispitane su različite koncentracije dobijenih ekstrakata, s obzirom na heterogenu strukturu i različitu rastvorljivost potencijalno toksičnih sastojaka tkivnih kondicionera [32]. Rezultati dobijeni MTT testom ukazuju na najveći pad ćelijske proliferativnosti nakon prvog dana ekstrakcije kod obe ispitivane vrste oralno tkivnih kondicionera.

Sa porastom dužine ekstrakcionog perioda i koncentracije ekstrakata raste i citotoksični efekat ispitivanih

oralnih kondicionera, što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora [4,31,33]. Rezultati istraživanja su ukazali da se toksične supstance kontinuirano oslobađaju u okolni medijum i da, na taj način, njihova koncentracija u veštačkoj pljuvački raste. Okita i sar. pokazuju veću toksičnost metakrilatnih kondicionera u odnosu na hladnopolimerizujuće metakrilate za podlaganje zubnih proteza [4]. Rezultati ove studije pokazali su manju citotoksičnost silikonskih u odnosu na metakrilatne kondicionere. Među ispitivanim metakrilatnim kondicionerima, Lang Immediate je pokazao najmanju toksičnost.

Nije moguće precizno odrediti standardne vrednosti minimalnih količina analiziranih hemijskih komponenti materijala koje bi mogle dovesti do toksične reakcije ili senzibilizacije tkiva. Kako je njihovo štetno delovanje već dokazano, treba težiti njihovom maksimalnom smanjenju strogim poštovanjem odnosa praha i težnosti, polimerizacionog postupka propisanog od strane proizvođača i potapanjem nadoknada podloženih oralnim kondicionerima u vodu jedan dan pre predaje pacijentu.

ZAKLJUČAK

Oslobađanje toksičnih supstanci iz uzoraka oralno tkivnih metakrilatnih kondicionera praćeno je pomoću HPLC metode i srazmerno je sa dužinom ekstrakcionog perioda. Najveća količina oslobođena je u toku prvog dana ekstrakcije, što je praćeno najmanjom proliferacijom ćelijske kulture u prisustvu ekstrakata materijala. Sa porastom dužine ekstrakcionog perioda i koncentracije ekstrakata ispitivanih oralno tkivnih kondicionera raste i njihov toksični efekat na ćelijsku kulturu. Pri tom, manja je količina oslobođenog rezidualnog monomera etilmetakrilata iz uzoraka oralno tkivnih metakrilatnih kondicionera u odnosu na metilmetakrilat, što daje prednost poli(etilmetakrilatnim) materijalima za ovu svrhu iz grupe metakrilatnih kondicionera.

Sa druge strane, silikonski kondicioneri su pokazali manju citotoksičnost u odnosu na metakrilatne kondicionere, što ih preporučuje u svakodnevnoj stomatološkoj praksi.

LITERATURA

- [1] M. Braden, P.S. Wright, S. Parker, Soft lining materials—a review. *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.* **3** (1995) 163–174
- [2] S.D. Stanišić, Kondicioniranje oralnih tkiva mekim metakrilatnim polimerima, *Stom. Prot. YU* **1** (1997) 3–12
- [3] Y. Hashimoto, J. Tanaka, K. Suzuki, M. Nakamura, Cytocompatibility of a tissue conditioner containing vinyl ester as a plasticizer, *Dent. Mater. J.* **26** (2007) 785–791
- [4] N. Okita, A. Hensten-Pettersen, *In vitro* cytotoxicity of tissue conditioners, *J. Prosthet. Dent.* **66** (1991) 656–659
- [5] Y. Hashimoto, M. Kawaguchi, K. Miyazaki, M. Nakamura, Estrogenic activity of tissue conditioners *in vitro*, *Dent. Mater.* **19** (2003) 341–346
- [6] M. Kawaguchi, H. Takahashi, T. Fukushima, Y. Inoue, T. Habu, K. Miyazaki, Leaching of plasticizer into water from denture soft lining materials, *Jpn. J. Dent. Mater.* **32** (1998) 47
- [7] P.S. Wright, Composition and properties of soft lining materials for acrylic dentures, *J. Dent.* **9** (1981) 210–223
- [8] J.H. Jorge, E.T. Giampaolo, C.E. Vergani, A.L. Machado, A.C. Pavarina, I.Z. Carlos, Effect of post-polymerization treatments on cytotoxicity of two denture base acrylic resins, *J. Appl. Oral. Sci.* **14**(3) (2006) 203–207
- [9] H. Tsuchiya, Y. Hoshino, K. Tajima, N. Takagi, Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resins denture base materials, *J. Prosthet. Dent.* **71** (1994) 618–624
- [10] C. Sipahi, J. Ozen, A. U. Ural, M. Dalkiz, B. Beydemir, The effect of two fibre impregnation methods on the cytotoxicity of glass and carbon fibre-reinforced acrylic resin denture base material on oral epithelial cells and fibroblasts, *J. Oral. Rehabil.* **33** (2006) 666–673
- [11] V.M. Urban, A.L. Machado, R.V. Oliveira, C.E. Vergani, A.C. Pavarina, Q.B. Cass, Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments, *Dent. Mater.* **3** (2007) 363–368
- [12] P.K. Vallitu, I.E. Ruyter, S. Buykuilmaz, Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers, *Eur. J. Oral. Sci.* **106** (1998) 588–593
- [13] M. Kostić, N. Krunić, Lj. Nikolić, V. Nikolić, S. Najman, J. Kocić, Određivnje količine rezidualnog monomera u pojedinim akrilatima za bazu proteze i mogućnosti njegove redukcije, *Vojnosanitarni Pregled* **66** (2009) 223–227
- [14] P.W. Albro, The biochemical toxicology of di(2-ethylhexyl) and related phthalates: testicular atrophy and hepatocarcinogenesis, *Rev. Biochem. Toxicol.* **8** (1986) 73–119
- [15] J.A. Thomas, M.J. Thomas, Biological effect of di(2-ethylhexyl) phthalates and other phthalic acid esters. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **13** (1984) 283–317
- [16] C.A. Harris, P. Henttu, M.G. Parker, J.P. Sumpter, The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*, *Environ. Health Perspect.* **105** (1997) 802–811
- [17] Y. Nomura, N. Mitsui, U.K. Bhawal, M. Sawajiri, O. Tooi, T. Takahashi, M. Okazaki, Estrogenic Activity of phthalate esters by *in vitro* VTG assay using primary-cultured xenopus hepatocytes, *Dent. Mater. J.* **25** (2006) 533–537
- [18] E. Bellei, C. Rota, S. Bergamini, P. Manfredini, A. Albertazzi, A. Tomasi, A. Iannone, Effect of alpha-tocopherol and N-acetylcysteine on benzoyl peroxide toxicity in human keratinocytes, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **18** (2004) 107–114
- [19] H. Babich, H.L. Zuckerbraun, B.J. Wurzbürger, Y.L. Rubin, E. Borenfreund, L. Blau, Benzoyl peroxide cytotoxicity evaluated *in vitro* with the human keratinocyte cell line, RHEK-1, *Toxicity* **106** (1996) 187–196

- [20] B. Kaličanin, Z. Ajduković. Influence of saliva medium on freeing heavy metal ion from fixed dentures, *Sci. Total Environ.* **397** (2008) 41–45
- [21] A.T. H. Tang, J. Li, J. Ekstrand, Y. Liu, Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of tissue culture insert as a testing device, *Int. Biomed. Mater. Res.* **45** (1999) 214–222
- [22] J.A. Roetling, Yield stress behaviour of poly(ethyl methacrylate) in the glass transition region, *Polymer* **6** (1965) 615–619
- [23] M. Mudarra, R. Diaz-Calleja, J. Belana, J.C. Canadas, J. Sellares, M.J. Sanchis, Sublinear dispersive conductivity in polymethyl methacrylate at temperatures above the glass transition, *Polymer* **45** (2004) 2737–2742
- [24] G. Bayraktar, O. Duran, C. Bural, B. Guvener, Effects of water storage of E- glass fiber reinforced denture base polymers on residual methyl methacrylate content, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater* **70B** (2004) 161–166
- [25] S. Baker, S.C. Brooks, D.M. Walker, The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in human mouth: An assay for monomer in saliva, *J. Dent. Res.* **67** (1988) 1295–1299
- [26] U.F. Hausteil, L. Tegetmeyer, V. Ziegler, Allergic and irritant potential of benzoyl peroxide, *Contact Dermatitis* **4** (1985) 252–257
- [27] J.F. McCabe, R.M. Basker, Tissue sensitivity to acrylic resin, *Br. Dent. J.* **140** (1976) 347–350
- [28] A.F. Boeckler, D. Morton, S. Poser, K.E. Dette, Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation, *Dent. Mater.* **24** (2008) 1602–1607
- [29] M. Kostić, S. Najman, J. Kocić, N. Krunić, Z. Ajduković, D. Petrović, M. Anđelković, Efekat ekstrakata akrilata za bazu pločaste zubne proteze na rast HeLa ćelija in vitro, *Hem. ind.* **62** (2008) 217–222
- [30] J.E. Dahl, M.J. Frangou-Ployzois, G.L. Ployzois, In vitro biocompatibility of denture relining materials, *Gerodontology* **23**(1) (2006) 17–22
- [31] J.H. Jorge, E.T. Giampaolo, A.L. Machado, E.V. Vergani, Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review, *J. Prosthet. Dent.* **90** (2003) 190–193
- [32] M.R. Cimpan, L.I. Cressey, N. Skaung, A. Halstensen, S.A. Lie, B.T. Gjeertsen, R. Matre, Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells, *Eur. J. Oral. Sci.* **108** (2000) 59–69
- [33] M. Nakamura, H. Kawahara, Long-term biocompatibility test of denture base resins *in vitro*, *J. Prosthet. Dent.* **52** (1984) 694–698.

SUMMARY***IN VITRO* EXAMINATION OF ORAL TISSUE CONDITIONERS POTENTIAL TOXICITY**Nebojša Krunić¹, Ljubiša Nikolić², Milena Kostić³, Stevo Najman⁴, Vesna Nikolić², Jelena Najdanović⁴¹*Clinic of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia*²*Faculty of Technology, University of Niš, Leskovac, Serbia*³*Department of Prosthodontics, Clinic of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia*⁴*Institute of Biomedical Researches, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia*

(Professional paper)

Oral tissue conditioners are applied temporarily to the gingival surface of a denture for the purpose of reconditioning the abused denture supporting tissues, allowing them to return to a normal, healthy state. According to chemical composition they can be classified into methacrylic and silicon conditioners. The objective of this research was to examine the potential toxicity of one, seven and thirty day extracts of different concentrations. Different effective concentrations (5, 12.5, 25 and 50%) of two silicone and four methacrylic conditioners extracts were used after extraction period of one, seven and thirty days. Amount of toxic substances and dynamics of their release were monitored by high-pressure liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis could not be applied to the silicone conditioners because they consist of polymeric and inorganic substances. Evaluation of cell proliferation, as cytotoxic parameters, was done by Mosmann's MTT assay based on reduction of yellow tetrazole (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide – MTT) to purple formazan by mitochondrial succinate dehydrogenase of metabolic active cells. With increasing of extraction period, the amount of released potential toxic substances increased. The cytotoxicity of tested materials significantly increased with extract concentration increase and duration of extraction period. To improve the biological characteristics of mobile dentures relined by soft materials, soaking in water the day before insertion into patient's mouth was recommended. Silicone conditioners showed less cytotoxicity compared to the methacrylic conditioners, so they are more appropriate for daily dental practice.

Keywords: Cytotoxicity • Oral tissue conditioners • MTT assay • HPLC