# Streszczenie

Materiały do ostatecznego wypełnienia kanałów korzeniowych powinny trwale zamykać przestrzeń po chemo-mechanicznym opracowaniu jamy zęba. Obok szczelności wypełnienia, także biokompatybilność ma decydujące znaczenie w powodzeniu leczenia endodontycznego. Preparaty obturacyjne pozostają przez długi czas w kontakcie z tkankami okołowierzchołkowymi, a ich działanie toksyczne może uszkadzać tkanki lub utrudniać gojenie zmienionych zapalnie struktur przyszczytowych. W ostatnim czasie na rynku stomatologicznym pojawiło się wiele nowych materiałów, a w fachowym piśmiennictwie istnieją sprzeczne doniesienia na temat ich biokompatybilności.

Celami pracy były:

1) porównawcza ocena cytotoksycznego działania współcześnie używanych materiałów obturacyjnych bezpośrednio po zarobieniu i po związaniu

2) próba wyjaśnienia udziału stresu oksydacyjnego w zjawisku cytotoksyczności materiałów endodontycznych

3) ustalenie, czy do śmierci komórek po ekspozycji na badane materiały, dochodzi na drodze apoptozy czy nekrozy

W pracy wykorzystano ludzkie fibroblasty ozębnej (Human Ligament Fibroblasts Cell System HPdLF Clonetics TM). Komórki hodowano na podłożu Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) w temperaturze 37°C, 5% CO2 i 95% wilgotności.

Doświadczenie przeprowadzono z użyciem materiałów do ostatecznego wypełnienia kanałów korzeniowych- peletek gutaperki (GP) i resilonu (RLN) oraz następujących uszczelniaczy: MTA Fillapex (FL), RealSeal SE (RSEAL), Meta Seal Soft (META), AH Plus (AH), Roeko Seal Automix (RSA), Gutta-Flow (GF), Apexit Plus (AP), Sealapex (SP), Endomethasone N (EN), Tubliseal (TS).

Po zarobieniu materiały aplikowano do plastikowych pierścieni. I grupę stanowiły uszczelniacze badane bezpośrednio po zarobieniu; II grupę – materiały po stwardnieniu, pozostawione do związania przez 24 h w temp. 37°C, 5% CO2 i 95% wilgotności. Pierścienie z preparatami umieszczono w insertach, które przenoszono do płytek hodowlanych, zawierających ludzkie fibroblasty ozębnej. Czas inkubacji fibroblastów z materiałami („świeżymi” i „twardymi”) wynosił 24h. Peletki gutaperki i resilonu badano, jako materiały twarde.

Ocenę działania cytotoksycznego materiałów przeprowadzono z wykorzystaniem testu badającego aktywność– dehydrogenazy bursztynianowej (MTT). Pomiaru poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT) dokonano metodą cytometrii przepływowej przy użyciu 2’,7’-dioctanu dichlorofluoresceiny. Ilościowe oznaczenie komórek będących w stanie apoptozy lub nekrozy oceniono metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem testu Annexin V-FITC Apoptosis Kit. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu SPSS 21.0. Ustalony poziom istotności wynosił p<0,05.

Oceniając cytotoksyczność materiałów metodą MTT przyjęto kryteria wg Dahla i wsp.: brak cytotoksyczności > 90 % żywotności komórek w stosunku do kontroli; niska cytotoksyczność - 60 % - 90 %; umiarkowana–30 % – 59 %; wysoka < 30 %.

W grupie I żaden z preparatów nie wykazał wysokiej cytotoksyczności. Umiarkowaną cytotoksycznością charakteryzowały się META (34,36% ± 3,26), EN (48,59% ± 1,01), RSEAL (48,59% ± 3,73). Istotne statystycznie różnice w przeżywalności komórek stwierdzono między wszystkimi materiałami o umiarkowanej cytotoksyczności, a pozostałymi uszczelniaczami (p<0,05). Niską cytotoksyczność odnotowano przy materiałach AH (71,24% ± 7,45), SP (71,39% ± 4,63) i TS (71,39% ± 7,07), co było znamienne statystycznie w stosunku do pozostałych uszczelniaczy z grupy I (p<0,05). Brak cytotoksyczności wykazały GF (143,44% ± 12,84), RSA (127,06% ± 16,57 oraz AP (95,68% ± 8,62) i FL (92,11% ± 12,44). Statystycznie istotne różnice w przeżywalności fibroblastów ozębnej, stwierdzono między wszystkimi materiałami cechującymi się brakiem cytotoksyczności, a pozostałymi uszczelniaczami (p<0,05). Porównując ze sobą formę „świeżą” i „związaną” uszczelniaczy istotnie niższy odsetek żywych komórek w hodowli stwierdzono po stwardnieniu w odniesieniu do: SP, AH, TS, FL, GF (p<0,05). Odwrotną i statystycznie istotną różnice w przeżywalności komórek zaobserwowano w przypadku RSEAL (p<0,001), który okazał się bardziej toksyczny bezpośrednio po zarobieniu niż po związaniu.

W grupie II żaden z badanych materiałów nie wykazał wysokiej cytotoksyczności. Umiarkowaną cytotoksycznością charakteryzowały się: META (35,71 ± 1,98), SP (45,24% ± 2,71), EN (50,61% ± 4,41), AH (51,33% ± 8,54) oraz TS (58,04% ± 7,77). Istotne statystycznie różnice odnotowano między prawie wszystkimi materiałami o umiarkowanej cytotoksyczności (z wyjątkiem TS), a pozostałymi uszczelniaczami (p<0,05). Niską cytotoksyczność odnotowano przy FL (70,50% ± 2,45) i RSEAL (67,52% ± 3,57), co okazało się znamienne statystycznie w odniesieniu do pozostałych preparatów (p<0,05), z wyjątkiem RSEAL i TS. Brak cytotoksyczności wykazały GF (110,49% ± 6,02), RSA(103,08% ± 6,17) oraz AP (102,41% ± 2,01), co było istotne statystycznie w porównaniu pozostałymi uszczelniaczami (p<0,05). GP (111,58% ± 5,06) cechowała się statystycznie istotnie niższą cytotoksycznością w porównaniu z RLN (53,14% ± 2,9) (p<0,001).

W komórkach eksponowanych na badane materiały, jedynie „świeża” forma uszczelniaczy (grupa I) indukowała istotnie wyższy poziom RFT, w porównaniu z materiałami „związanymi” (grupa II) (p<0,001). Najwyższy poziom RFT był obserwowany po ekspozycji komórek na „świeżą” formę META i EN. Nie odnotowano natomiast żadnych, znamiennych różnic w poziomie stresu oksydacyjnego pomiędzy poszczególnymi uszczelniaczami związanymi, jak i między GP i RLN (p>0,05).

Cytotoksyczność uszczelniaczy opartych na salicylanach (FL, SP) i eugenolu (EN i TS) oraz META była związana głównie z procesem nekrozy, a materiałów na bazie żywic (AH i RSEAL) oraz AP – apoptozy. Nie wykazano istotnie statystycznych różnić między indukowaniem procesu apoptozy i nekrozy pomiędzy GP i RLN (p>0,05)

Wnioski:

1. Działanie cytotoksyczne materiałów do ostatecznego wypełnienia kanałów korzeniowych („świeżych” i „twardych”), wobec ludzkich fibroblastów ozębnej, było zróżnicowane.

2. Największą cytotoksycznością, ocenioną testem MTT, charakteryzowały się uszczelniacze metakrylowe, tlenkowo-cynkowo-eugenolowe i resilon. Brak działania cytotoksycznego wykazały uszczelniacze siloksanowe i gutaperka.

3. Uszczelniacze kanałowe w obu formach, a także gutaperka i resilon były zdolne do wywoływania działania toksycznego, indukując procesy apoptozy i/lub nekrozy w ludzkich fibroblastach ozębnej.

4. Działanie toksyczne uszczelniaczy Endomethasone N, RealSeal, Sealapex, MTA Fillapex, testowanych bezpośrednio po zarobieniu, może być spowodowane indukcją stresu oksydacyjnego w ludzkich fibroblastach ozębnej. Cytotoksyczność pozostałych badanych materiałów wydaje się być związana z udziałem innych mechanizmów.

5. Ze względu na ryzyko utrzymywania się cytotoksycznego działania uszczelniaczy, podczas leczenia endodontycznego należy przestrzegać zasad, umożliwiających uniknięcie kontaktu materiału z tkankami okołowierzchołkowymi.