

Jorunn Bjørnsen  
Marit Hansen  
Liv Mette Harboe  
Asbjørn Jokstad  
Svein Roseth

Biologisk institutt.  
Universitetet i Oslo.

*Cytotoksisitet av  
glassionomersementer anvendt  
som tannfyllingsmateriale.*

Prosjektoppgave 6.2, BIO 241.

Vår 1989

## BIO 241 Prosjektoppgave 6.2

### Cytotoksisitet av Glassionomersementer (Glass Polyalkenoat-sement) anvendt som tannfyllingsmateriale

Jorunn Bjørnsen  
Marit Hansen  
Liv Harbo  
Asbjørn Jokstad  
Svein Roseth

Glassionomersement benyttes i økende grad til å erstatte tapt hardvæv i tennene. Materialet består av:

1. En polyalkenoid syre, vanligvis en polyakrylsyre
2. Finpulverisert aluminiumsilikatglass (ionekilde)  
(Består av ulike oksyder av Si, Al og Na, P, Ca, F)
3. Vann (reaksjonsmedium)
4. Vinsyre (for forbedring av arbeidsegenskapene)

Når pulveret blir blandet med en syre oppstår det etter 1.5-2 min. en gel som etter 5-10 min blir hard. Stivningsmekanismene er:

1. Glasset løses opp av syren
2. Kationer i det ytre skikt (Na, Al og Ca) utløses og vandrer ut i den vandige fasen og reagerer med polyanionkjedene
3. Etterhvert nøytraliseres syren og dermed mengden av utløste kationer
4. Kationene danner ioniske tverrbindinger (F.o.f Ca-) mellom de polyanioniske kjedene og det oppstår en gel som stivner.
5. Opprinnelige glasskjerne omgitt av et skikt med en hydratisert polykiseltsyre som er bundet med hydrogenbindinger til gelen.
6. Økende antall tverrbindinger gjør at materialet blir hardt

Den ferdige sement inneholder mellom 14-27 vekt% vann, enten koordinert til metallionene og karboksylgruppene i gelen, eller være ubundet.

#### Løselighet

I vann og syre er det påvist løselighet av Ca, Al i de første 30 dager etter stivningsfasen, mens kiseltsyre, Na, og F avgis kontinuerlig. Utløsning av F<sup>-</sup> kan være større enn for silikatsement (Forsten 77)

#### Biokompatibilitet

Ved direkte kontakt med pulpa vil materialet forårsake lokal nekrose og inflammasjon. Materialet kan derfor karakteriseres som noe cytotoxisk. Denne prosjektoppgaven vil belyse hvilke mekanisme for toksisitet som kan være relevant.

## METODE

### Fyllingsmateriale

Den anvendte glassionomersement var Fuji type II F, (GC Dental Ind. Corp., Tokyo, Japan), ordinært innkjøpt som forbruksmaterieell fra et dentaldepot. Dette materialet har en noe høyere elementutløsning enn de 6 andre kommersielt tilgjengelige produktene på det skandinaviske marked, målt etter en konduktometrisk metode. (Øilo, 1988)

Materialet ble blandet etter fabrikantens bruksanvisning, og polymeriserte etter ca. 3.5 minutt i en form laget av Teflon under en matrise. Prøvelegemene hadde en diameter på 6 mm og høyde på 2 mm. Prøvene fikk deretter polymerisere i 10 min før diskene ble veid før oppbevaring. Det ble laget 12 diskere ved 4 ulike tidspunkter; 1 måned før cellekulturforsøket, og hhv. 1 uke før, 1 dag før og 1 time før cellekulturforsøkene. Totalt ble det således laget 48 diskere. Diskene ble oppbevart etter 3 ulike lagringsalternativer (Fig 1).

Prøvelegemene ble ca. 15 minutter før cellekulturforsøket tatt ut av oppbevaringsmediet, tørket og veid. Oppbevaringsmediet ble deretter gjemt.

### Cellekultur

For vurdere materialets cytotoxicitet ble den s.k Millipore-teknikken anvendt (Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L 1979). I denne metoden benyttes et filter med .45 µm porer i mellom et materiale og en cellekultur, slik at den direkte kontakt mellom disse unngås. Cellene som ble anvendt var humane fibroblastceller dyrket ved Odontologisk institutt for mikrobiologi, Oslo.

### Nødvendig Utstyr:

#### Prøvelegemer

Glassionomersement  
Teflonform  
Oppbevaringsglass  
Vekt  
Destillert vann  
Saltvann

#### Kulturmedium:

Vekst: Dulbeccos MEM tilsatt 10% føtalt kalveserum  
100 µg/ml streptomycin  
Buffret med 10 mM Na-bikarbonat

Agarose: Dulbeccos MEM x 2 tilsatt 10% føtalt kalveserum  
1.5% Agarose  
100 µg/ml streptomycin  
Buffret med 10 mM Na-bikarbonat

### Test

15 Milliporefiltre Ø 47 mm  
30 Plast Petri skåler Ø 50 mm  
Fosfat-buffret saline (PBS)  
100 ml Succinate-dehydrogenase løsning  
Destillert vann

### Reagenser

Farging for succinat-dehydrogenase.

Til 30 ml:

250 mg Natriumsuccinat

30 mg Nitroblue terazolium

30 ml Fosfatbuffer pH 7.8 :

0.132 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

1.630 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

aq dest ad 100 ml

Blandingen ble benyttet fersk.

### PROSEDYRE ( I hht. FDI, 1980)

Et milliporefilter (Ø = 47 mm) ble plassert på bunnen av en plast Petri skål (50 mm).

Fra stamcellekultur ble det tilsatt 10 ml .25% trypsin, inkubert 10 min, sentrifugert og resuspendert i 20 ml medium. Celledetthet ble estimert med Bürkes tellekammer.

$1.5 \times 10^5$  celler/ml i 6 ml Dulbeccos medium MEM, tilsatt 10% føtalt kalveserum ble tilsatt. Glassringer ble benyttet for å holde filteret på plass på bunnen av skålen.

Kulturene ble deretter inkubert ved 37 °C i en  $\text{CO}_2$  inkubator med 5%  $\text{CO}_2$ . Etter 48 timer var milliporefiltrene dekket av et konfluent celledag.

5 ml agarose medium, oppbevart ved 40 °C (Dulbeccos MEM x 2 + 1.5% Agarose) ble pipettert i en tom Petriskål og solidifiserte ved romtemperatur.

Milliporefiltrene ble vasket en gang med et fosfatbuffret salin (PBS), forvarmet til 37 °C.

Filteret med celledaget vendt nedover ble lagt på agarosemediet.

På hvert filter ble det plassert 4 prøvelegemer av materialet.

Som kontroll ble det benyttet et filter med celledag, men uten prøvelegemer, og et filter med prøvelegemer laget av teflon.

Filtrene ble inkubert i 2 timer ved 37 °C i en  $\text{CO}_2$  inkubator med 5%  $\text{CO}_2$  før prøvelegemene og filteret med celledaget ble fjernet skånsomt fra agar-laget.

Filtrene ble deretter videre inkubert i 3 timer ved 37 °C for cytokjemisk analyse av succinate-dehydrogenase (EC 1.3.99.1) aktivitet (Barka & Andersson 1963). Dette fargestoffet bindes i mitochondriene, uten å ødelegge membraner i cellen.

Filtrene ble vasket med destillert vann, tørket og avlest for fargeforandringer. Filtrene scores mht fargeintensiteten i området rundt prøvelegemene, samt diameteren av denne. Ikke påvirket celledaget er mørk blå-farget. Responsen klassifiseres som:

0: Ikke-cytotoksisk: Ingen forskjell i fargeintensiteten sammenliknet med resten av celledaget.

1: Mild cytotoksisk: En sone med redusert fargeintensitet, eller uten farge som er mindre enn prøvelegemet < 6mm.

2: Moderat cytotoksisk: En sone uten farge som er 6-11 mm.

3: Tydelig cytotoksisk: En sone uten farge som er >11 mm.



## RESULTAT

### Vekt

Prøvelegemene som var blitt oppbevart i hhv destillert vann og fysiologisk saltvann hadde absorbert væske (Fig 2). Prøvene som var 1 uke gamle hadde relativt mer væskeopptak enn de 1 mnd gamle prøvene. (Statistisk test ikke utført).

### Cellekultur

Et fargeomslag i agarosemediet under milliporefilteret indikerte at pH mediet var sunket. Dette forekom sterkest for den ferske prøven, de 1 time gamle prøvene, og svakt for de 1 dag gamle prøvene. Moderat toksisk effekt på cellekulturen kunne observeres når materialet var nylig blandet (Fig 3, nederst). Når prøvene var 1 time gamle utviste materialet en mild cytotoxisk effekt, både når prøvene var blitt oppbevart tørt og i væske. Dette kunne også sees meget svakt under de 1 dag gamle prøvene oppbevart i vann. Når prøvene var eldre enn 1 dag kunne det ikke registreres noen cytotoxisk effekt av materialet, uansett oppbevaringsmetode.

## DISKUSJON

Cellelaget på milliporefiltrene kunne med fordel vært tettere. Dette var sannsynligvis forårsaket av valget av cellekultur i dette forsøket. I originalbeskrivelsen av metoden benyttes fibroblastceller fra mus (L929); celler som har raskere vekst. I tillegg var det i praksis vanskelig å unngå at cellekulturen klumpet seg sammen midt i skålen. Dette var sannsynligvis forårsaket av at operatørene manglet rutine i celledyrking.

Den cytotoxiske effekten har sammenheng med pH. Det er mulig dette er en direkte effekt av polyakrylsyren, før denne har dannet tverrbindinger i sementen. En annen effekt som ikke kan utelukkes er en synergistisk effekt av polyakrylsyren og en eller flere av de andre komponentene, f.eks Al- eller F-ioner. Dette kan eventuelt undersøkes ved hjelp av røntgenmikroanalyse av cryopreparater fra kulturene. En annen prosedyre som kan bidra med å klargjøre mekanismene for toksisitet av materialet er atomabsorpsjon av oppbevaringsmediet for å estimere lekkasje av ioner fra materialet.

## REFERANSER

1. Barka T, Andersson P.I. Histochemistry, theory, Practice, and bibliography. New York, Harper & Row, p.313.
2. FDI Commission on Dental Mat, Instr, Equip, Therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Stanford JW chairm. Int Dent J 1980;30:140-188.
3. Forsten L. Fluoride release from a glass ionomer cement. Scand J Dent Res 1977;85:503-504.
4. Knibbs P.J. Glass ionomer cement: 10 years of clinical use. J Oral Rehabil 1988;15:103-115.
5. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. J Biomed Mater Res 1979;13:109-120.
6. Øilo G. Characterization of glass ionomer filling materials. Dent Mater 1988; 4(3):129-133.

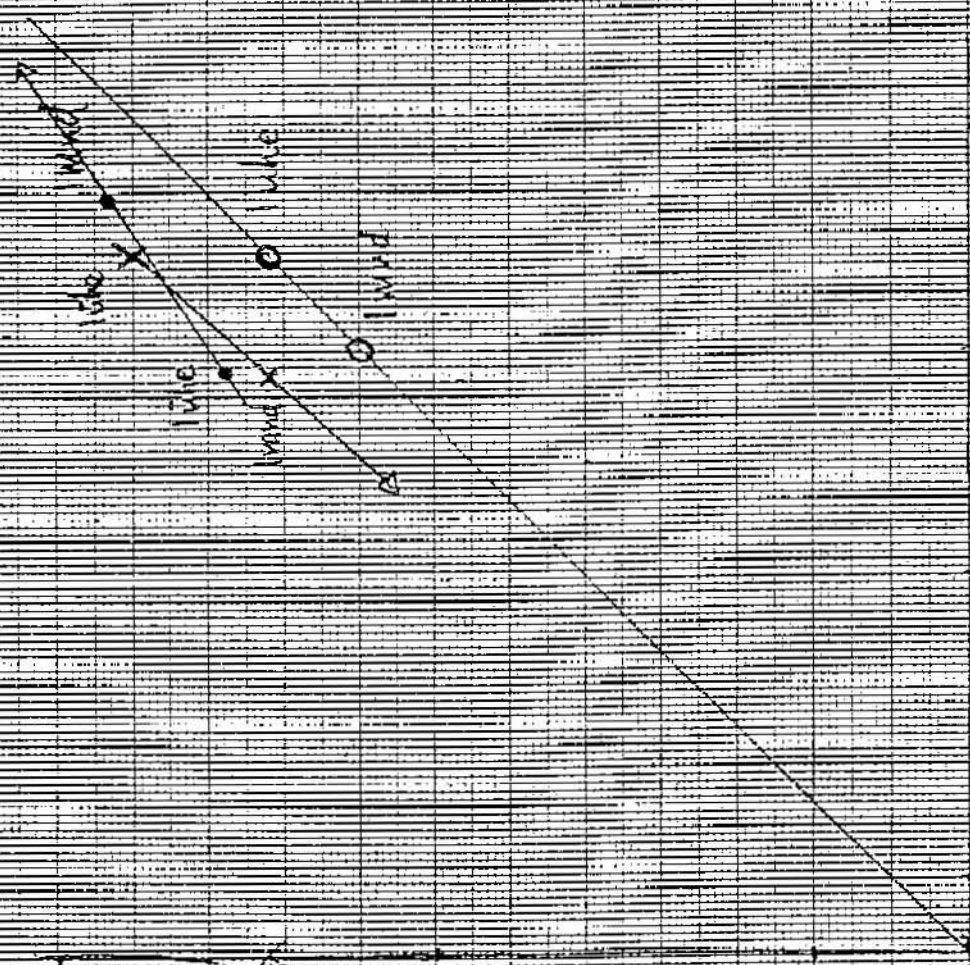
	Dest.Vann	Fys.Saltvann	Tørt
1 Måned	4	4	4
1 Uke	4	4	4
1 Dag	4	4	4
1 Time	4	-	4
0 tid:		1	

Figur 1. Antall disker laget ved forskjellige tidspunkt

Elder

Velux and  
Vidokkewene  
box of elder  
explaining  
course

Glassgow



For

of

11 11 11



