

Cytotoxicita keramických materiálů

(Původní práce – experimentální studie)

Cytotoxicity of Ceramic Materials

(Original Article – Experimental Study)

Vavříčková L.¹, Dostálová T.², Ulrichová J.³

¹Stomatologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové

²Dětská stomatologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Laboratoř buněčných kultur LF UP, Olomouc

SOUHRN

Práce se zabývá testováním cytotoxicity in vitro vybraných vzorků dentálních celokeramických materiálů. Materiály byly podrobeny testu přímého kontaktu a testu extraktu. Testy byly prováděny na populaci buněčné linie myších fibroblastů NIH 3T3 v buněčné kultuře. Z výsledků je patrné, že všechny materiály mohou být považovány za netoxické kromě lithium disilikátové keramiky.

Klíčová slova: cytotoxicita, keramické dentální materiály

SUMMARY

Paper presents cytotoxicity testing procedure in vitro of preselected dental ceramics. Direct contact test and extract test were monitored. A population of mouse fibroblasts NIH 3T3 was used for both tests. Results show all tested dental ceramics can be considered non-cytotoxic, except the lithium disilicate material.

Key words: cytotoxicity, dental ceramics

Čes. Stomat., roč. 111, 2011, č. 2, s. 46-52

ÚVOD

Keramické materiály jsou v současné době považovány ve stomatologii za materiál první volby pro kvalitní protetické fixní rekonstrukce chrupu. Nejenže mají dokonalé estetické vlastnosti, ale i jejich vlastnosti mechanické jsou nyní srovnatelné s kovokeramickými náhradami [8, 10]. Mezi jejich další výhody patří i biologická netečnost keramiky. Na rozdíl od kovových náhrad neuvolňují v prostředí ústní dutiny ionty kovů, které mohou pak cytotoxicky [14] nebo alergogenně působit na okolní tkáň. Keramické materiály můžeme rozdělit podle chemického složení nebo podle technologie výroby [15]. Klasifikace keramiky podle chemického složení je pro zhodnocení vlastností materiálu vhodnější. V současné době keramiku dělíme na křemičitou skelnou, oxidovou sklem infiltrovanou a oxidovou či polykrystalickou [7]. Keramika křemičitá vyniká estetickými vlastnostmi, ovšem její vlastnosti mechanické poněkud zaostávají za keramikou oxidovou. Keramika oxidová je dnes v popředí zájmu, zvláště keramika obsahující oxid zirkoničitý. Ten lze stabilizovat přidáním oxidů: CaO, MgO, Y₂O₃ nebo CeO₂. Vzniká slitina, která má tetragonální strukturu i při pokojové teplotě [3, 11]. Tento materiál dobře odolává ohybu a málo

mění své vlastnosti vlivem stárnutí [4, 12]. Nejvíce je dnes používán oxid zirkoničitý v podobě 3Y-TZP (yttrium cation-doped tetragonal zirconia polycrystals) s obsahem 3 mol % Y_2O_3 , který slouží jako stabilizátor (např. Cercon[®], Noritake atd.) [6] (obr. 1).



Obr. 1 Keramická jádra Procera[®] Al_2O_3

TOXICKÉ A CYTOTOXICKÉ ÚČINKY

Přestože je keramika považována za bioinertní materiál, je však nutné podotknout, že i mezi keramickými materiály existují rozdíly v jejich cytotoxickém působení na buňky gingivy a jiných tkání. Rozdílná cytotoxicita je podmíněná rozdílným chemickým složením jednotlivých materiálů.

Podle Bracketta a kol. [1] není možné považovat lithium disilikátovou keramiku za biologicky inertní. Stejný poznatek uvádějí též Messer a kol. [9]. Dle nich lithium disilikátová keramika, konkrétně Empres II, má horší biologické vlastnosti než většina dentálních slitin a kompozitních materiálů. Ovšem většina keramických materiálů je z hlediska cytotoxicity akceptovatelná stejně dobře jako dentální slitiny nebo kompozitní materiály. Uo a kol. [13] ve své práci publikovali cytotoxické působení některých 3Y-TZP materiálů (oxid zirkoničitý s obsahem 3 mol % Y_2O_3) na fibroblasty gingivy. Tyto materiály lze považovat za biologicky inertní.

Elshahawy a kol. [5] ve své práci uvádějí téměř nulové cytotoxické působení oxidové keramiky ve srovnání s vysoce ušlechtilými slitinami chromniklovými a slitinami obsahujícími ušlechtilou ocel. Covacci a kol. [2] vyloučili jakékoliv mutagenní a onkogenní účinky 3Y-TZP materiálů na fibroblasty.

CÍL STUDIE

Naším cílem bylo ověřit, zda dochází k cytotoxickému působení námi vybraných keramických materiálů na buněčnou kulturu.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo vybráno jedenáct nejvíce používaných druhů keramických materiálů (tab. 1, tab. 2). Z každého druhu keramiky jsme vyrobili přesně definovaná jádra (10 kusů). Jednalo se o horní střední řezák, síla jádra byla 0,4 mm, hmotnost byla 0,22 g. Většina vzorků byla připravena CAD/CAM technologií, resp. technologií (MAD/MAM).

Zkouška sledovala cytotoxické působení pevného vzorku – jádra vybrané dentální keramiky na buněčnou linii myších fibroblastů NIH 3T3 v buněčné kultuře (European Collection of Cell Cultures (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SPG OJG United Kingdom (free from mycoplasma)). Testování cytotoxicity bylo založeno na aplikaci normy ČSN EN ISO 10993 část 5 (1999) – Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky; dále

Tab. 1 Testované skelné nebo oxidové infiltrované keramické materiály

	Skelná	Oxidová-infiltrovaná
Chemické složení keramických materiálů	IPS e. max® Press (lithium disilikátová) Ivoclar, Vivadent Inc., USA	In-Ceram® Alumina (Al ₂ O ₃) Vita, SRN
	Vitablocs® Mark II CEREC (živcová) Degudent, SRN	In-Ceram® Spinell (Al ₂ O ₃ +MgO ₂) Vita, SRN
		In-Ceram® Zirkonia (Al ₂ O ₃ +ZrO ₂) Vita, SRN

Tab. 2 Testované polykrystalické keramické materiály

	Oxidová keramika ZrO ₂	Oxidová keramika Al ₂ O ₃
Chemické složení keramických materiálů	LAVA™ (ZrO ₂) 3M ESPE, Německo	Procera® Al ₂ O ₃ Nobel Biocare™, Švédsko
	Procera® ZrO ₂ Nobel Biocare™, Švédsko	
	Zirkon-Zahn (3Y-TZP ZrO ₂) Upcera Dental, Čína	
	Noritake (3Y-TZP ZrO ₂) Katana, Japonsko	
	Cercon® (3Y-TZP ZrO ₂) DeguDent, SRN	

pak dle ČSN EN ISO 7405 (1998) Stomatologie – Preklinické hodnocení biologické snášenlivosti prostředků zdravotnické techniky používaných ve stomatologii.

Pro zkoušení cytotoxicity *in vitro* byl sledován test přímého kontaktu a test extraktu.

TEST PŘÍMÉHO KONTAKTU

Princip:

Zdravé buňky NIH 3T3 se v kultuře dělí, množí a adherují k vhodným kultivačním povrchům. Cytotoxická látka narušuje tyto procesy, což vede k poškození buněk, jejich odlučování z kultivačního povrchu a snížení jejich počtu v kultuře. Hodnocení cytotoxicity je při této metodě založeno na vizuálním – makroskopickém sledování inkorporace barviva krystalové violeti do živých buněk a mikroskopickém posouzení změn morfologie buněčné vrstvy (vakuolizace, odlučování buněk, cytolýza). Pokud se cytotoxický materiál uvede do kontaktu s buněčnou vrstvou, vytváří ve svém okolí zónu poškozených buněk, do které se barvivo neinkorporuje. Základem pro určení stupně cytotoxicity jsou šířka zóny – vzdálenost hranice nezbarvené zóny od okraje vzorku, popis změn stavu buněčné vrstvy a numerický odhad podílu poškozených buněk.

Pracovní postup:

Vzorky jsme před zahájením každého testu sterilizovali buď ponořením do 96% ethanolu, nebo v autoklávu po dobu 60 min. a analyzovali je v duplikátech. Test byl třikrát nezávisle opakován. Fibroblasty (7 ml suspenze, 10⁵ buněk/ ml), které byly naneseny na Petriho misky, poté jsme do středu misky umístili sterilizovaný vzorek tak, aby nedošlo k porušení buněčné vrstvy. Po 24 hodinách v inkubátoru jsme kulturu hodnotili pomocí inverzního mikroskopu. Poté jsme vzorky kultury obarvili a změny jsme sledovali opět v inverzním mikroskopu. Pozorování jsme současně vyfotografovali.

Hodnocení:

1. Plochu misky jsme dle šablony rozdělili na čtyři kvadranty.
2. Posuvným měřidlem bylo možné změřit vzdálenost hranice živých obarvených buněk od okraje testovaného vzorku.

3. S použitím inverzního mikroskopu při zvětšení 200x jsme posuzovali stav buněčné vrstvy (tab. 3).

Tab. 3 Hodnocení cytotoxicity vzorku v testu přímého kontaktu

Index zóny	Šířka zóny v mm	Index lýzy	Stav buněčné vrstvy
0	0	0	Nedochází k destrukci buněk, Zachován původní tvar
1	<5	1	Méně než 20 % buněk je kulatých, uvolněných Ojedinelé buňky jsou lýzovány
2	5-10	2	20-80 % buněk je kulatých, uvolněných Pozorovatelná lýza
3	>10	3	Více než 80 % buněk je kulatých, uvolněných Pozorovatelná rozsáhlá lýza

Hodnocení stupně cytotoxicity:

Cytotoxicita vzorku je charakterizována poměrem Index zóny/Index lýzy (tab. 4).

Tab. 4 Hodnocení stupně cytotoxicity vzorku v testu přímého kontaktu

Stupeň	Index zóny/Index lýzy	Interpretace
0	0/0	Netoxický
1	1/1	Lehce toxický
2	2/2	Mírně toxický
3	3/3	Silně toxický

TEST EXTRAKTU

Princip:

K přesnému zjištění množství živých buněk v kultuře se používá fotometrická metoda – MTT test. Tento test je založen na schopnosti živých buněk redukovat tetrazoliové soli na barevné formazanové produkty. Množství vytvořeného barviva, stanovené fotometricky při vlnové délce 540 nm a vyjádřené absorbancí, je přímo úměrné metabolické aktivitě a počtu buněk v analyzovaném vzorku. Stupeň cytotoxicity je vyhodnocen na základě životnosti buněk, která je vyjadřována v % absorbance naměřené v kultuře v přítomnosti testované látky, vůči kontrolní kultuře bez daného vzorku.

Pracovní postup:

Vzorky jsme před zahájením každého testu sterilizovali buď ponořením do 96% ethanolu nebo v autoklávu po dobu 60 min. a analyzovali je opět v duplikátech. Extrakt jsme připravili v poměru 0,1 g vzorku na 1 ml extrakčního činidla. Extrakce probíhala za aseptických podmínek v kulturační láhvi v inkubátoru. Po ukončení extrakce byl extrakt pipetou přenesen do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugován. Poté jsme testování cytotoxicity prováděli pro extrakt neředěný – 100% a při ředění 1:1 a 1:3. Test byl prováděn minimálně ve dvou nezávislých opakovacích cyklech.

Výpočet životnosti kultury:

Životnost kultury se stanovila výpočtem z průměru hodnot absorbance nalezených pro vzorek a pro kulturu buněk (kultura v nepřítomnosti vzorku):

$$\text{Životnost kultury (\%)} = \frac{\text{průměr } A_{\text{vzorek}} - \text{průměr } A_{\text{blank}}}{\text{průměr } A_{\text{kontrola reagensů}} - \text{průměr } A_{\text{blank}}} \times 100$$

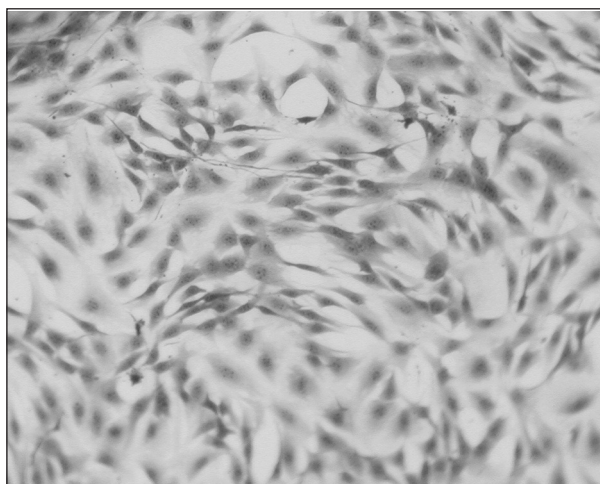
Hodnocení stupně cytotoxicity ukazuje tabulka 5.

Tab. 5 Hodnocení stupně cytotoxicity vzorku v testu extraktu

Stupeň	Životnost buněk	Interpretace
0	80 % a více	Netoxický
1	60-80 %	Lehce toxický
2	40-60 %	Mírně toxický
3	Méně než 40 %	Silně toxický

Výsledky:

Test přímého kontaktu byl ve všech případech negativní. Na obrázku 2 je zachycen mikroskopický obraz kultury fibroblastů při testování s keramickým materiálem LAVA™.

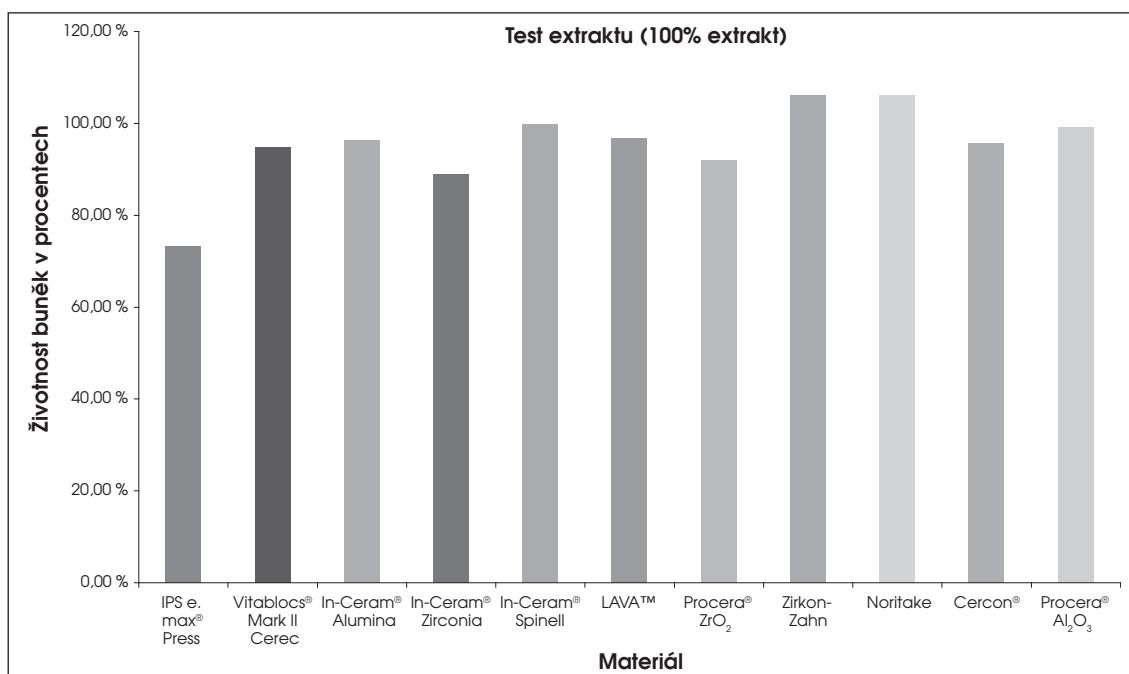


Obr. 2 Test přímého kontaktu - LAVA™

Životnost buněk v testu extraktu ukazují tabulky 6 a 7 a graf 1.

V případě lithium disilikátové keramiky a v několika případech u oxidové keramiky infiltrované sklem (ZrO₂), klesla v testu extraktu životnost pod osmdesát procent.

V průběhu testování došlo u některých vzorků ke změně barvy.



Graf 1 Živoťnost buněk v testu extraktu

Tab. 6 Výsledky testu extraktu skelné nebo oxidové infiltrované keramiky

Keramika/ % životnost buněk při ředění	IPS e. max® Press	Vitablocs® Mark II CEREC	In-Ceram® Alumina	In-Ceram® Zirkonia	In-Ceram® Spinell
Extrakt 100%	73.2	94.7	96.3	88.8	99.8
Ředění 1:1	75.3	97.7	102.6	93.7	106.6
Ředění 1:3	79.4	95.7	102.5	97.3	105.4

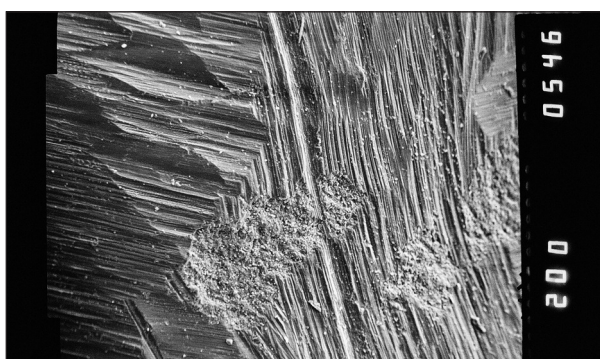
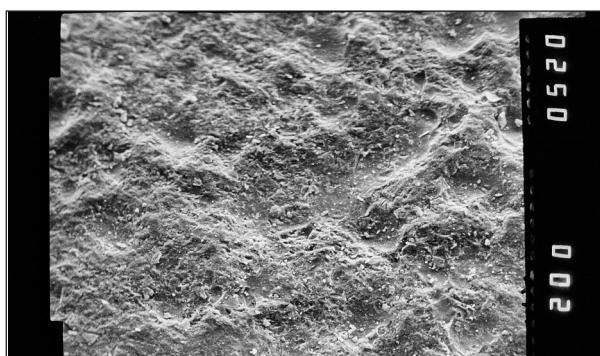
Tab. 7 Výsledky testu extraktu polykrystalické keramiky

Keramika/ % životnost při ředění	LAVA™ (ZrO ₂)	Procera® ZrO ₂	Zirkon-Zahn (3Y-TZP ZrO ₂)	Noritake (3Y-TZP ZrO ₂)	Cercon® (3Y-TZP ZrO ₂)	Procera® Al ₂ O ₃
Extrakt 100%	96.8	92.04	106	106.04	95.62	99.2
Ředění 1:1	101.8	92.15	101.6	101.68	97.12	94.9
Ředění 1:3	99.5	94.22	97.2	105.53	97.66	97.2

DISKUSE

Výsledky ukazují, že všechny testované dentální materiály je možné považovat v testu přímého kontaktu za netoxické, s nulovým výsledkem cytotoxicity a Indexem zóny/ Indexu lýzy 0/0. V testu extraktu je stupeň cytotoxicity různý. Lithium disilikátová keramika IPS e. max® Press se jevila jako lehce toxická. Výsledky této studie jsou podpořeny i výsledky výzkumu zahraničních autorů [1, 9], z nichž plyne, že lithium disilikátovou keramiku není možné považovat za biologicky inertní. Cytotoxicita této keramiky byla dokonce větší než cytotoxicita chromniklových slitin testovaných v předchozí studii [14]. U dvou vzorků keramiky In-Ceram® Zirkonia byla životnost buněk nižší než 80 %. Při statistické analýze všech testovaných vzorků této keramiky je však životnost buněk celkově vyšší než 80 %.

U keramiky LAVA™, IPS e. max® Press, In-Ceram® Alumina, In-Ceram® Zirkonia a Cerec® došlo při testování u všech vzorků ke změně odstínu testovaného jádra, přičemž nejvýraznější změna byla u keramiky In-Ceram® Zirkonia (obr. 3, obr. 4, obr. 5).

**Obr. 3** Povrch keramického jádra Cercon®**Obr. 4** Povrch keramického jádra IPS e. max® Press



Obr. 5 Povrch keramického jádra In-Ceram® Alumina

Závěr

Všechny námi testované dentální materiály lze považovat za netoxické v testu přímého kontaktu. V testu extraktu se keramika lithium disilikátová - IPS e. max® Press jevila jako lehce cytotoxická a za určitých podmínek i keramika In-Ceram® Zirconia. V některých případech došlo při testu extraktu ke změně barvy jádra (vznik tmavšího odstínu), nejvíce u keramiky In-Ceram® Zirconia.

LITERATURA

1. **Brackett, M. G., Lockwood, P. E. et al.:** In vitro cytotoxicity response to lithium disilicate dental ceramics. *Dent. Mater.*, 24, 2008, 4, s. 450-456.
2. **Covacci, V., Bruzzese, N. et al.:** In vitro evaluation of mutagenic and cancerogenic power of high purity zirconia ceramic. *Biomaterials*, 20, 1999, 4, s. 371-376.
3. **Denry, I., Kelly, J. R.:** State of the art of zirconia for dental applications. *Dent. Mater.*, 24, 2008, s. 299-307.
4. **Deville, S., Chevalier, J., Gremillard, L.:** Influence of surface finish and residual stresses on the ageing sensitivity of biomedical grade zirconia. *Biomaterials*, 27, 2006, s. 2186-2192.
5. **Elshahawy, W. M., Watanabe, I. a kol.:** In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent. Mater.*, 25, 2009, 12, s. 1551-1555.
6. **Garvie, R. C., Nicholson, P. S.:** Phase analysis in zirconia systems. *J. Am. Ceram. Soc.*, 55, 1972, s. 303-305.
7. **Hammerle, Ch., Sailer, I. et al.:** Dental ceramics. Quintessence Publishing, ISBN 987-1-85097-181-8.
8. **Chong, K. H., Chai, J., Takahashi, Y., Wozniak, W.:** Flexural strength of In-Ceram alumina and In-Ceram zirconia core materials. *Int. J. Prosthodont*, 15, 2002, s. 183-188.
9. **Messer, R. L., Lockwood, P. E. et al.:** In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics. *J. Prosthet. Dent.*, 90, 2003, 5, s. 452-458.
10. **Ryge, G., Cvar, J. F.:** Criteria for clinical evaluation of dental restorative materials. US Dental health Center, Publication No.7902244, San Francisco, USA.
11. **Sato, T., Ohtaki, S., Shimada, M.:** Transformation of yttria-partially-stabilized zirconia by low-temperature annealing in air. *J. Mater. Sci.*, 20, 1985, s. 1466-470.
12. **Sato, T., Shimada, M.:** Crystalline phase-change in yttria-partially-stabilized zirconia by low-temperature annealing. *J. Am. Ceram Soc.*, 67, 1984, s. 212-213.
13. **Uo, M., Sjogren, G. et al.:** Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent. Mater.*, 19, 2003, 6, s. 487-492.
14. **Vavříčková, L., Dostálová, T., Vahalová, D., Šrámková, J., Ulrichová, J.:** Cytotoxicita dentálních slitin. *Čes. Stomat.*, 107, 2007, 6, s. 138-143.
15. **Vavříčková, L., Pilathadka, S., Dostálová, T.:** Celokeramické systémy v klinické praxi. *LKS.*, 18, 2008, 10 (Suppl.), s. A5-A11.

Studie byla podporována projektem GAUK č. 81508 a projektem IGA MZČR 9744-3.

MUDr. Lenka Vavříčková
Stomatologická klinika LF UK a FN
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: vavrickova.l@seznam.cz