

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑ

IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΟΥ
ΥΛΙΚΟΥ ΓΙΑ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ ΤΡ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ-ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑ

IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΒΙΟΚΕΡΑΜΙΚΟΥ
ΥΛΙΚΟΥ ΓΙΑ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΑ ΤΡ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ-ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑΣ

2. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΝΔΟΔΟΝΤΙΑΣ

3. ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΡΟΥΣΗΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΦΙΕΡΩΣΗ
Στον Τριαντάφυλλο,
Στη Μαρία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΕΜΦΡΑΞΗΣ ΡΙΖΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	19
3.1. Η <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητα	21
3.2. Τελικά σημεία της <i>in vitro</i> κυτταροτοξικότητας	22
3.3. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	26
4.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης	26
4.2. Ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης με τη χρήση δύο φθορίζουσών ουσιών (FDA/PI)	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	27
5.1. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης	27
5.2. Έλεγχος οστικής διαφοροποίησης	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30

ΣΚΟΠΟΣ-ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31
ΥΛΙΚΑ –ΜΕΘΟΔΟΣ	31
Υλικά	31
Έλεγχος βιοσυμβατότητας	32
Πρωτόκολλο διατήρησης της κυτταροκαλλιέργειας	32
-Απόψυξη κυττάρων	32
-Διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας	33
-Μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου	34
- Έλεγχος βιωσιμότητας με trypan blue	36
-Καλλιέργεια των κυττάρων MG63	36
Έλεγχος κυτταροτοξικότητας	37
-MTT test	37
-Ανίχνευση ζωντανών/νεκρών κυττάρων με τη χρήση των φθορίζουσών ουσιών	
FDA και PI.	38
Ποιοτικός προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας	39
-Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	39
-Πρωτόκολλο Μονιμοποίησης	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	53
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	54
SUMMARY	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ενδοδοντική θεραπεία αποτελεί σήμερα ακρογωνιαίο λίθο στην οικοδόμηση επιτυχημένων αποκαταστάσεων και τη διατήρηση των φυσικών δοντιών στον οδοντικό φραγμό. Ένας σημαντικότατος παράγοντας για την αποτελεσματική έκβαση μιας ενδοδοντικής θεραπείας είναι η ερμητική έμφραξη του ακρορριζικού τρήματος του δοντιού, η οποία δεν θα επιτρέψει την επικοινωνία με τους περιρριζικούς ιστούς και την απαρχή φλεγμονωδών εξεργασιών στην περιοχή. Πρωτεύοντα ρόλο στην ερμητική έμφραξη του ακρορριζίου παίζει μεταξύ των άλλων, το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για το λόγο αυτό. Ιδιαίτερα στην χειρουργική ενδοδοντία η επιλογή του κατάλληλου υλικού ανάστροφης έμφραξης είναι στοιχείο εκ των «ουκ άνευ».

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει ενταθεί για την εξέλιξη υλικών τα οποία, πέρα από τη βιοσυμβατότητα και την έλλειψη κυτταροτοξικότητας, θα πρέπει να διαθέτουν και οστεογενετικές ιδιότητες και ασφαλώς όλες τις φυσικές ιδιότητες που θα τα επιτρέψουν να παίξουν αποφασιστικό ρόλο στην ερμητική απόφραξη του ακρορριζικού τρήματος με θετικές επιπτώσεις και στη δημιουργία νέου οστίτη ιστού στην περιοχή.

Το υλικό το οποίο φαίνεται ότι κάλυψε σε μεγάλο βαθμό τις απαιτήσεις για την προαναφερθείσα χρήση είναι το MTA, στις διάφορες μορφές του, το οποίο μετά και από

πολύχρονη ερευνητική έρευνα, αλλά και κλινική εφαρμογή, αποτελεί σήμερα το κατ' εξοχήν υλικό επιλογής για την ανάστροφης έμφραξης του ακρορριζίου.

Επειδή η έρευνα αναζητά συνεχώς τη βελτίωση των ιδιοτήτων και της κλινικής αποτελεσματικότητας των υλικών, τα τελευταία χρόνια καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια για την εισαγωγή στην χειρουργική ενδοδοντία νέων υλικών. Η ερευνητική προσπάθεια λοιπόν σήμερα στοχεύει στην εισαγωγή για τον προαναφερθέντα σκοπό βιοκεραμικών υλικών που να προσφέρουν κάτι περισσότερο στις ήδη καλές ιδιότητες του υλικού MTA. Ένα από τα νέα βιοκεραμικά υλικά είναι το Total Fill το οποίο βρίσκεται στο επίκεντρο της παρούσης μελέτης τόσο από την άποψη της βιολογικής συνύπαρξης με τους περιβάλλοντες ιστούς του ακρορριζίου (βιοσυμβατότητα) και την έλλειψη κυτταροτοξικότητας, όσο και με τη δυνατότητα του υλικού αυτού να ενεργοποιεί οστεογενετικές διαδικασίες από μέρους των οστεοβλαστών για τη δημιουργία νέου οστού.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε το υλικό Total Fill σε σύγκριση με δύο καταξιωμένα υλικά έμφραξης του ακρορριζίου των δοντιών, το MTA και το Biodentine, ενώ όλα συγκρίθηκαν όσον αφορά τις ιδιότητες τους *in vitro* με την καλλιέργεια άωρων μορφών οστεοβλαστών.

Με την ευκαιρία της κατάθεσης της παρούσης διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ένα σύνολο ανθρώπων, οι οποίοι άμεσα ή έμμεσα συνέβαλαν στη δημιουργία της επιστημονικής μου και όχι μόνο παρουσίας όλα τα χρόνια της εκπαίδευσής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Οδοντιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ξεκινώ από την καθηγήτρια μου κ. Μαρία Γεωργοπούλου στην οποία οφείλω πάρα πολλά, τόσο για τις γνώσεις που μου έχει μεταλαμπαδέψει, όσο και για την έμπνευση που μου εμφυσεί μέχρι σήμερα για την συνεχή μου εξέλιξη και ισορροπία επιστημονικά, αλλά και σε

προσωπικό επίπεδο. Μετά από αυτή την σχέση, γνωρίζω πλέον βιωματικά την έννοια του μέντορα.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του διδακτικού και ερευνητικού προσωπικού της Ενδοδοντίας με επικεφαλής τους καθηγητές κ. Π.

Πανόπουλου και κ. Μ. Χαμπάζ για την άριστη συνεργασία καθώς και τους επιστημονικούς συνεργάτες της μεταπτυχιακής κλινικής για μεγάλη τους συμβολή στην εκπαίδευση όλων μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Βιολόγο κ. Κυριακή Κυριακίδου για την υπομονή της και τη βοήθεια της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της έρευνας, αλλά και για τη διδασχία των μεθοδολογιών έρευνας σχετικά με την καλλιέργεια και την ανάπτυξη κυττάρων, καθώς και τον Αν. Καθηγητή της Περιοδοντολογίας κ. Ι.Καρούση για την υποστήριξή του και βελτίωση του πρωτοκόλλου μου.

Ευχαριστώ πολύ την διδάκτωρα κ. Κέλλυ Διαμαντή για την μεγάλη της βοήθεια και τις εύστοχες παρατηρήσεις της.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη, εάν δεν έλεγα ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους και φίλους μου πια στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Ενδοδοντίας, την Εύη, τη Μαρία, τον Γιώργο και τον Ταξιάρχη αλλά και 6 των λοιπών μεταπτυχιακών προγραμμάτων για την άψογη συνεργασία μας, τη φιλική συμπεριφορά τους σε όλα τα επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια των χρόνων εκπαίδευσης μας.

Οι μητέρα, η αδερφή και ο σύντροφος μου αξίζουν ένα μεγάλο ευχαριστώ από την καρδιά μου για την υποστήριξή τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη και αγάπη στον πρώτο μου και δια βίου δάσκαλο, τον πατέρα μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η διατήρηση των δοντιών στον οδοντικό φραγμό αποτελεί το κεντρικό ενδιαφέρον της σύγχρονης Οδοντιατρικής. Πέρα από την πρόληψη, προς την κατεύθυνση αυτή πρωτεύοντα ρόλο παίζουν η περιοδοντική και η ενδοδοντική θεραπευτική αντιμετώπισή τους. Ειδικότερα η σωστή ενδοδοντική αντιμετώπιση των δοντιών παρέχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν και για τη στήριξη προσθετικών εργασιών, μέσω των οποίων θα αποκατασταθεί η μασητική λειτουργία και η αισθητική. Επομένως η σωστή ενδοδοντική θεραπεία θα αποτελέσει το πιστοποιητικό για την μακροβιότητα των δοντιών στον οδοντικό φραγμό, χωρίς παρενέργειες και συμπτωματολογία, επιβαρυντική πολλές φορές ακόμα και για τη γενική υγεία του ασθενούς.

Η ενδοδοντική θεραπεία πέρασε από το στάδιο της αρχικής αμφισβήτησης στη σημερινή καταξίωση, διερχόμενη πολλά εξελικτικά στάδια, ξεκινώντας από τη χρήση ισχυρών τοξικών παραγόντων για την νέκρωση των ζωντανών πολφικών στοιχείων, μέχρι τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου για την άσκηση της μικροχειρουργικής ενδοδοντίας.

Οι πρώτες προσπάθειες για επεμβάσεις στον πολφό προέκυψαν στις αρχές του περασμένου αιώνα όταν αναπτύχθηκαν προσθετικές τεχνικές οι οποίες απαιτούσαν πρόσθετη ενδομυλική συγκράτηση όπως ήταν οι στεφάνες Richmond, οι στεφάνες Davies, τα ηλοπαγή Peesco και άλλα. (Stanley, 1985). Για μεγάλο χρονικό διάστημα η νέκρωση του πολφού δεν συνδυαζόταν με θεραπείες επεξεργασίας και απολύμανσης των ριζικών σωλήνων, γεγονός το οποίο κατέγραψε ο Hunter το 1911 (Smith και Williams 1982) , ο οποίος διαπίστωσε ότι το περιβάλλον πολύ συχνά ήταν σηπτικό όταν οι στεφάνες επεκτείνονταν στην πολφική κοιλότητα για πρόσθετη στήριξη. Το 1918 ο Billings (Smith και Williams 1982)

πραγματοποίησε καλλιέργειες σε άπολφα εξαχθέντα δόντια και συμπέρανε ότι αποτελούσαν πηγές μικροβίων υπεύθυνες για τις περισσότερες φλεγμονές που παρατηρούνταν στη στοματική κοιλότητα. Πέρασαν δεκαετίες μέχρι τα μέσα του 1930 όταν ένα σύνολο από ερευνητές (Hatton 1931, Coolidge 1936, Dixon και Rickett 1938) όπως αναφέρουν οι Smith και Williams (1982) απέδειξαν ιστολογικά ότι άπολφα δόντια κατάλληλα επεξεργασμένα και εμφραγμένα δεν αποτελούσαν πηγή μικροβίων. Τη θεωρία αυτή ουσιαστικά τελειοποίησαν και επέβαλαν σαν ενδοδοντική θεραπεία οι Sommer και συν. (1961) με την εισαγωγή της τεχνικής της επιμελούς απολύμανσης των ριζικών σωλήνων. Τη διαδικασία μιας πλήρους ενδοδοντικής θεραπείας, όπως την εννοούμε σήμερα, ασφαλώς βοήθησε σημαντικά αφενός η ανακάλυψη των ακτίνων X και αφετέρου η εισαγωγή νέων φαρμάκων και υλικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΕΜΦΡΑΞΗΣ ΡΙΖΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ

Ένα σημαντικό πρόβλημα στη γενική Οδοντιατρική είναι η αναζήτηση υλικών ικανών να παρεμποδίσουν διαχρονικά την επικοινωνία μεταξύ της στοματικής κοιλότητας και των οδοντικών ιστών, οι οποίοι έχουν υποστεί κάποιου είδους οδοντιατρική παρέμβαση. Στην ενδοδοντία το πρόβλημα αφορά τα εμφρακτικά υλικά των ριζικών σωλήνων, τα οποία θα πρέπει να αποκλείουν την επικοινωνία του συστήματος των ριζικών σωλήνων με το γειτονικό περιβάλλον (περιοδοντικοί ιστοί, στοματική κοιλότητα). (Khabbbaz και Papadopoulos 1999). Από το σύνολο των κλινικών καταστάσεων, ορισμένες εμφανίζουν σαφείς ιδιαιτερότητες στην εν γένει ενδοδοντική τους αντιμετώπιση αλλά και στην αναγκαιότητα για ανεύρεση του καταλληλότερου εμφρακτικού υλικού. Στις περιπτώσεις αυτές συγκαταλέγονται δόντια με αδιάπλαστο ακρορρίζιο, ιατρογενείς διατρήσεις κάτω από το ύψος της φατνιακής απόφυσης, απορροφήσεις ρίζας, έμφραξη ακρορριζίου, άμεση κάλυψη πολφού

(τερηδόνα, κάταγμα), πολφοτομή νεογιλών δοντιών. (Bergenholtz και συν. 2010, Khabbaz και Serefoglou 1996, Lagisetti και συν. 2018). Στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι περισσότερο από 24 εκατομμύρια ενδοδοντικές διαδικασίες πραγματοποιούνται ετησίως και πάνω από το 5,5% από αυτές είναι χειρουργική ακρορριζίου, αποκατάσταση διατρήσεων και διαδικασίες ακρορριζοποίησης. (AlAnezi και συν. 2010).

Η ιδιαιτερότητα των περιπτώσεων αυτών έγκειται στη δυσκολία πλήρους απομόνωσης του πεδίου εργασίας από τα βιολογικά υγρά της στοματικής κοιλότητας (σάλιο, αίμα, υγρά ιστών), με αποτέλεσμα τα χρησιμοποιούμενα εμφρακτικά υλικά να βρίσκονται αναπόφευκτα σε άμεση επαφή μαζί τους. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς η υγρασία μπορεί να επηρεάσει την εμφρακτική τους ικανότητα αλλά και τις μηχανικές ιδιότητες (Benezra και συν. 2017, Georgoroulou και συν. 1993, Georgoroulou και συν. 1994). Επίσης η πλούσια μικροβιακή χλωρίδα της στοματικής κοιλότητας κυρίως όσον αφορά παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να παίζει καθοριστικό αρνητικό ρόλο στην έκβαση μιας ενδοδοντικής θεραπείας (Lovato και Sedgley 2011). Για το λόγο αυτό τα εμφρακτικά υλικά πρέπει να διαθέτουν και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Iordanoglou και συν. 1998). Σημαντικό ρόλο προς την κατεύθυνση αυτή παίζει και η χρήση των ακτίνων Laser (Καρούσης 2015).

Ο Grossman (1776) κατέταξε τα εμφρακτικά υλικά σε πλαστικά, στερεά, κόνιες και πάστες. Προσδιόρισε ότι ένα ιδανικό υλικό απόφραξης του ριζικού σωλήνα θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

1. Να αποφράσσει το σωλήνα πλάγια και ακρορριζικά.
2. Να μην συστέλλεται μετά την τοποθέτησή του.
3. Να είναι ανθεκτικό στην υγρασία.
4. Να είναι βακτηριοστατικό ή τουλάχιστον να μην ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων.

5. Να μην ερεθίζει τους περιρριζικούς ιστούς.
6. Να μην προκαλεί ανοσολογική αντίδραση στους περιρριζικούς ιστούς.
7. Να μην είναι μεταλλαξιογόνο ή καρκινογόνο.

Το φύραμα το οποίο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη γουταπέρκα, έχει σαν σκοπό αφενός την πλήρωση των μικρών κενών μεταξύ του κώνου και των οδοντικών τοιχωμάτων και αφετέρου την απόφραξη των πολλαπλών τρημάτων. Επί μέρους παράγοντες οι οποίοι μπορούν να παίξουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματική απόφραξη έχουν πειραματικά εξετασθεί (Kontakiotis και συν. 1997).

Η γουταπέρκα είναι μακράν το καλύτερο εμφρακτικό υλικό ριζικών σωλήνων και μπορεί να χαρακτηριστεί ως πλαστικό υλικό. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η έμφραξη του ριζικού σωλήνα πρέπει να υπολείπεται ελάχιστα του ακτινογραφικού ακρορριζίου παρά να γίνεται υπερέμφραξη. Ερευνητικά έχει αποδειχθεί ότι το διάστημα μεταξύ του ακρορριζίου και του τέλους της έμφραξης πληρώνεται από συνδετικό ιστό και παρουσιάζεται η ελάχιστη δυνατή αντίδραση σε σχέση με την υπερέμφραξη, όπου η αντίδραση είναι χρόνια. (Vertucci 2005). Ο Khabbaz και συν. 2010 θεωρούν αποδεκτή την έμφραξη του ριζικού σωλήνα, κατά την οποία το υλικό υπολείπεται κατά 0-2 χιλ από το ακτινογραφικό ακρορριζίο του δοντιού και δεν καταγράφονται κενά τόσο μέσα στη μάζα του υλικού, όσο και μεταξύ του υλικού και των τοιχωμάτων του σωλήνα.

Παρά το γεγονός ότι όλα τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα υλικά παρουσιάζουν κάποιου βαθμού διαλυτότητα που οδηγεί σε μικροδιείσδυση, υπάρχει ένα κριτικό σημείο πέραν του οποίου η ενδοδοντική θεραπεία οδηγείται σε αποτυχία. Η μικροδιείσδυση μπορεί να συμβεί στη διεπιφάνεια της οδοντίνης με το συγκολλητικό υλικό, στη διεπιφάνεια μεταξύ του στερεού εμφρακτικού υλικού και του συγκολλητικού υλικού, μέσα στο ίδιο το συγκολλητικό υλικό ή να οφείλεται σε πλήρη διάλυση του τελευταίου. Όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του συγκολλητικού υλικού τόσο ευκολότερα επιτελείται η διάλυσή του. Επίσης πρέπει να

υπολογισθεί και η συστολή την οποία παρουσιάζει το συγκολλητικό υλικό κατά την πήξη του. (Phillips 1996).

Όσον αφορά τη χειρουργική ενδοδοντία, το αμάλγαμα αποτέλεσε το κατεξοχήν υλικό ανάστροφης έμφραξης, καθώς παρουσίαζε ευκολία χειρισμού, ακτινοσκοπιότητα και ήταν άμεσα διαθέσιμο. Ωστόσο, στις μη επιθυμητές ιδιότητές του, συγκαταλέγονται η εμφάνιση μικροδιείσδυσης, διάβρωσης, ογκομετρικές μεταβολές μετά την τοποθέτησή του, πρόκληση μικροκαταγμάτων στο ακρορρίζιο και δυσχρωμία στα ούλα (Aqgabawi 2000). Για τους λόγους αυτούς το αμάλγαμα αντικαταστάθηκε από υλικά με καλύτερες ιδιότητες, όπως το IRM, το Super EBA, τις σύνθετες ρητίνες και τις υαλοϊονομερείς κονίες (Hauman 2003).

Τα υλικά που βασίζονται στο οξείδιο του ψευδαργύρου (IRM, Super EBA) έχουν έντονη τοξική δράση στους ιστούς αμέσως μετά την ανάμιξή τους και μέχρι την πήξη τους. Το Super EBA έχει ουδέτερο pH και εμφανίζει τη μικρότερη διαλυτότητα από όλα τα σκευάσματα οξειδίου του ψευδαργύρου. Είναι ακτινοσκοπικό, έχει μεγάλη αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης και παρέχει πιο ερμητική έμφραξη σε σχέση με το αμάλγαμα και την υαλοϊονομερή κονία. (Jiang και συν. 2014, Asrari και Lobner 2003, Al-Sa'eed και συν. 2008). Μειονέκτημα του υλικού αποτελεί η δυσκολία χειρισμού εξαιτίας του μικρού χρόνου πήξης και της τάσης προσκόλλησής του σε επιφάνειες με αποτέλεσμα να καθίσταται συχνά δύσκολη η τοποθέτηση και συμπίκνωσή του. Επιπλέον επηρεάζεται σημαντικά από την υγρασία (Hauman 2003).

Το 1993 εισήχθη για χρήση στην ενδοδοντία από τον Torabinejad και τους συνεργάτες του, στο πανεπιστημίου Loma Linda των ΗΠΑ, ένα νέο εμφρακτικό υλικό με την ονομασία MTA (ProRoot MTA, Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, USA), το οποίο χημικά ήταν ένα σύμπλοκο τριοξειδίων του ασβεστίου (Mineral Trioxide Aggregate). Το MTA εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) το 1998 ως υλικό που αποφράσσει όλες τις διόδους επικοινωνίας μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού των ριζικών σωλήνων

(Schwartz και συν. 1999, Agraftoti και συν. 2016, Μελίτου και Ιντζές 2014).

Η χημική σύσταση του MTA είναι παρόμοια με εκείνη του τσιμέντου τύπου Portland. (Kocak και συν. 2014). Πρόκειται για υλικό με τη μορφή σκόνης τα κύρια συστατικά της οποίας είναι οξείδιο του ασβεστίου, οξείδιο του πυριτίου, οξείδιο του βισμούθιου, δισθενές πυριτικό ασβέστιο, τρισθενές πυριτικό ασβέστιο, τρισθενές αργιλούχο ασβέστιο, διυδρικό θειούχο ασβέστιο, ίχνη στοιχείων (σίδηρος, μαγνήσιο, χλώριο, φώσφορος) (Bordumlu 2008).

Τα υδρόφιλα συστατικά (δισθενές πυριτικό ασβέστιο, τρισθενές πυριτικό ασβέστιο, τρισθενές αργιλούχο ασβέστιο) είναι υπεύθυνα για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του υλικού, τα οποία πηζουν παρουσία υγρασίας. (Piazza και συν. 2017). Η ανάμιξη της σκόνης με αποστειρωμένο νερό (συνήθως σε αναλογία 3:1) έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας κολλοειδούς γέλης με pH 10,2. Η γέλη πηζει σε σκληρή μάζα μέσα σε 3 με 4 ώρες με τελικό pH 12,5. (Camilleri 2006, Pitt Ford και συν. 1996).

Η κλινική επιτυχία του MTA οφείλεται στη βιοσυμβατότητά του, στην απουσία κυτταροτοξικότητας (Koh και συν. 1998, Mitchell και συν. 1999, Steforoulos και συν. 2008), στην ικανότητά να εμποδίζει τη βακτηριακή μικροδιδείσδυση, στην ικανότητα να αναγεννά τους εμπλεκόμενους ιστούς (οδοντίνη, οστεΐνη, περιοδοντική μεμβράνη, οστούν) και να τους επαναφέρει στην κατάσταση τους πριν την βλάβη, με μηχανισμό που βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη (Shabahang και συν. 1999, Farrugia και συν. 2017). Ερευνητές (Wismayer και συν.

2016) εξέτασαν το χρόνο πήξης και τις ιστολογικές αντιδράσεις που προκαλεί το υλικό MTA *in vitro* και *in vivo* σε ποντίκια όταν έρχεται σε επαφή με αίμα και σωματικά υγρά. Οι παρατηρήσεις έγιναν μετά από 3 μήνες και έδειξαν ότι το MTA προκαλεί χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση όταν εμφυτεύεται υποδορίως.

Τα αποτελέσματα μελέτης σχετικά με τις αναγεννητικές ιδιότητες του MTA για τη δημιουργία οστού και οδοντίνης έδειξαν ότι οστεοβλάστες και οδοντινοβλάστες ανθρώπινης

και ζωικής προέλευσης που καλλιεργήθηκαν σε επαφή με MTA πολλαπλασιάστηκαν ταχύτερα από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς επαφή με MTA (Koh και συν. 1997). Επίσης δεν επηρεάζεται καθόλου από την υγρασία αντιθέτως μάλιστα η παρουσία της υγρασίας είναι απαραίτητη προκειμένου το υλικό να πήξει (Torabinejad και συν. 1994, 1995). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως το MTA είναι ανώτερο από παλαιότερα χρησιμοποιούμενα υλικά όπως το αμάλαμα, η κονία Super EBA, η κονία IRM, αλλά και από τις σύνθετες ρητίνες και τις υαλοϊονομερείς κονίες, γιατί παρέχει πιο ερμητική έμφραξη σε σχέση με τα υλικά αυτά και εμφανίζει μικρότερη τοξικότητα. (Guimaraes και συν. 2017, Hansen και συν. 2011, Nair και συν. 2011). Μάλιστα μία μελέτη έδειξε ότι κατά την τοποθέτηση του στην οστική κοιλότητα η δύναμη συμπίκνωσης είναι περίπου δέκα φορές μικρότερη από αυτή που χρησιμοποιείται για την κονία Super EBA (Aqrabawi 2000, Asgary και συν. 2008). Σε άλλη εργασία (Koulaouzidou και συν. 2005) έγινε συγκριτική μελέτη της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης (antiproliferative effect) του MTA, του οξειδίου του ψευδαργύρου και της υαλοϊονομερούς κονίας σε τρεις σειρές ινοβλαστών για 12h, 24h και 48h όπου απεδείχθη ότι την καλύτερη συμπεριφορά, και επομένως την μικρότερη τοξικότητα, είχε το υλικό MTA.

Το MTA διατίθεται σε μορφή φαιάς και λευκής σκόνης. Το φαιό MTA ήταν το πρώτο που χρησιμοποιήθηκε, ενώ το λευκό εμφανίστηκε μεταγενέστερα με σκοπό να προσομοιάζει το χρώμα των φυσικών δοντιών κυρίως σε περίπτωση πολφοτομής και άμεσης κάλυψης του πολφού. Το λευκό χρώμα οφείλεται στη μικρότερη περιεκτικότητα του υλικού σε οξείδιο του σιδήρου (FeO) που επιτυγχάνεται κατά τη διαδικασία παρασκευής του (Alsalleeth και συν. 2014). Διάφοροι ερευνητές (Tziafas και συν. 2002) εξέτασαν την επίδραση του υλικού MTA σε διάφορα χρονικά διαστήματα στην οδοντιογένεση σε δόντια σκύλων μετά από παρασκευή βαθιών κοιλοτήτων και αποκάλυψη πολφού. Από την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο διερχόμενου φωτός και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης προέκυψε ότι το

MTA είναι αποτελεσματικό υλικό κάλυψης πολφού ικανό να προκαλέσει οδοντινογένεση. Επίσης μελέτες αναφέρουν το MTA ως ιδιαίτερος αποτελεσματικό υλικό για την αναδόμηση των περιακρορριζικών ιστών (Economides και συν. 2003)

Παρόλα αυτά, πολλοί κλινικοί αναφέρουν ότι η ευκολία κλινικής χρήσης του MTA απέχει από το ιδανικό. Η σύσταση είναι δύσκολο να παραμείνει σταθερή λόγω της αντίδρασης πήξης, η οποία επιδρά στην αποξήρανση του υλικού. Ένα άλλο αρνητικό στοιχείο είναι ο παρατεταμένος χρόνος πήξης του υλικού, λόγω του οποίου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υλικό εύκολα για τη δημιουργία ακρορριζικού φραγμού, είτε για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία σε μία συνεδρία. (Jeevani και συν. 2014, AlAnezi και συν. 2010).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μία μεγάλη προσπάθεια ανάπτυξης νέων υλικών απόφραξης του ακρορριζίου με κύρια στόχευση τα βιοκεραμικά υλικά. Τα κεραμικά υλικά είναι ανόργανα, μη μεταλλικά υλικά τα οποία κατασκευάζονται με θέρμανση των αρχέγονων υλικών σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα υλικά αυτά διαθέτουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα λόγω της ομοιότητας στη σύνθεσή τους με τον βιολογικό υδροξυαπατίτη (Almeida και συν. 2017, Kontakiotis και συν. 1995). Επίσης επιτυγχάνουν απόλυτη απόφραξη του ακρορριζίου σχηματίζοντας χημικό δεσμό με τη δομή του δοντιού και έχουν καλή ακτινοσκιερότητα (Debelian και Trope 2016). Διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες και αποτελούνται από πορώδεις σκόνες οι οποίες περιέχουν νανοκρυστάλλους διαμέτρου 1-3nm, που προλαμβάνουν την προσκόλληση των βακτηρίων (Raghavendra και συν. 2017, Candeiro και συν. 2012, Antunes και συν. 2016, Eldiniz και συν. 2006).

Πρόσφατα έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο τα υλικά Endosequence Root Repair Material Putty (ERRM Putty; Brasseler USA) και Endosequence Root Repair Material Paste (ERRM Paste; Brasseler USA) τα οποία είναι προαναμιγμένα και έτοιμα για χρήση (Alsoubait και συν. 2016). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή και τα δύο υλικά έχουν παρόμοια χημική σύνθεση. Έχουν εξαιρετικές φυσικές και βιολογικές ιδιότητες και είναι ευκόλοχρηστα. Τα

υλικά αυτά είναι υδρόφιλα, αδιάλυτα, ακτινοσκιερά, δεν περιέχουν αλουμίνιο και εμφανίζουν υψηλό pH. Η παρουσία υγρασίας είναι απαραίτητη για την πήξη και σκλήρυνση τους (Al-Haddad και συν. 2017). Ο χρόνος εργασίας είναι περισσότερος από 30min σε κανονικές συνθήκες, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την πήξη τους είναι 4h (Camilleri 2017, Charland και συν. 2013).

Το Total Fill putty (FKG Dentaire, Suisse) είναι προαναμιγμένο βιοκεραμικό υλικό, το οποίο διατίθεται έτοιμο προς χρήση στην χειρουργική του ακρορριζίου, για ακρορριζική απόφραξη, αλλά και κάλυψη μετά από πολφοτομή. Το υλικό αυτό σε *in vitro* μελέτη έδειξε παρόμοια βιοσυμβατότητα με το υλικό MTA ([Saxena](#) και συν. 2013, Hirshberg και συν. 2013). Το υλικό Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) αποτελείται από σκόνη και υγρό. Η σκόνη συνίσταται από πυριτικό τριασβέστιο, ανθρακικό ασβέστιο, οξείδιο του ζirkονίου το οποίο δίνει την ακτινοσκιερότητα στο υλικό. Το υγρό περιέχει χλωριούχο ασβέστιο ως καταλυτικό παράγοντα και νερό ως αναγωγικό παράγοντα. Το Biodentine σχηματίζει απατίτη αμέσως μόλις έρθει σε επαφή με φωσφορικό διάλυμα, ενδεικτικό της βιοενεργότητας του. Η στοιχειακή προσρόφηση (Ca, Si) στην οδοντίνη της ρίζας βρέθηκε να είναι περισσότερο έντονη απ' ότι στην περίπτωση του MTA. Σε άλλη *in vitro* μελέτη βρέθηκε ότι το Biodentine διαθέτει χαμηλότερη αποφρακτική ικανότητα, στατιστικά σημαντική, συγκρινόμενο με τα υλικά MTA και IRM, όταν χρησιμοποιήθηκε ως υλικό ανάστροφης έμφραξης μετά από ακρορριζεκτομή (Soundarpan και συν. 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Με τον όρο βιοσυμβατότητα εννοούμε, αφενός την μη ερεθιστική, τοξική, αλλεργιογόνο, μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση ενός υλικού όταν αυτό εμφυτευθεί ή έλθει σε επαφή

με ζώντες ιστούς αλλά και τη ικανότητα του τελευταίου να διεγείρει ή/και να μεταλλάσσει αρχέγονους κυτταρικούς σχηματισμούς για τη παραγωγή νέου ιστού. (Παυλίδης 2006). Η βιοσυμβατότητα κάθε υλικού ελέγχεται με ένα συνδυασμό μεθόδων. Κάθε μέθοδος διερευνά τον κίνδυνο για έναν μόνο τύπο ανεπιθύμητης αντίδρασης ανάμεσα σε μια μεγάλη ποικιλία πιθανών αντιδράσεων (Murray και συν, 2007) . Η διερεύνηση των μηχανισμών αντίδρασης και οι βιολογικές επιδράσεις από την επαφή των υλικών με τους ιστούς, όπως εμφανίζονται στην Εικόνα 1, γίνεται με κυτταροκαλλιέργειες (prescreening tests) και με μελέτες σε μικρά ζώα (τρωκτικά, ινδικά χοιρίδια). Για εφαρμογή σε ασθενείς γίνονται δοκιμασίες προσομοίωσης με δοκιμές χρήσης (usage tests) σε μεγάλα ζώα (πρωτεύοντα, σκύλοι).

(Murray και συν. 2007).

Όσον αφορά τις κυτταροκαλλιέργειες, τα προς μελέτη κυτταρικά στοιχεία μπορεί να προέρχονται απευθείας από ζώντα οργανισμό ή να παρέχονται από ειδικές τράπεζες μετά από ανακαλλιέργεια. Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στις πρώτες ανακαλλιέργειες (passages) διατηρούν την φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια που έχει και ο ζωντανός ιστός. Αντίθετα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην εικοστή ανακαλλιέργεια έχουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογική δραστηριότητα από αυτά που βρίσκονται πριν την έβδομη ανακαλλιέργεια (Goseki και συν. 1996, Sawa και συν. 2000). Συστήνεται λοιπόν για την αξιοπιστία μιας ερευνητικής εργασίας η χρήση κυττάρων που βρίσκονται πριν την τέταρτη ανακαλλιέργεια. Τόσο η μελέτη της κυτταροτοξικότητας του υλικού όσο και η επίδραση στην αναγεννητική τους συμπεριφορά εξετάζονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα με βάση το ISO 10993-6 έως και 78h.



Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης ενδοδοντικών εμφρακτικών υλικών και κυτταρικών στοιχείων. (Schmalz και συν. 2009).

3.1. Η *in vitro* κυτταροτοξικότητα

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας περιλαμβάνει την χρήση κυτταρικών καλλιεργειών στις στοχευμένες έρευνες κυτταροτοξικολογίας. Τα προς μελέτη κύτταρα μπορεί να προέρχονται από καλλιέργειες είτε πρωτογενών κυττάρων είτε αθανатоποιημένων και μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών ή βλαστικών κυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ορθή εκτίμηση των αποτελεσμάτων της εν λόγω δοκιμασίας είναι να υπάρχουν

βασικές γνώσεις για την τοξικολογία των χημικών ουσιών που μελετώνται, όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκρισή τους.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των *in vitro* μελετών είναι (α) η δυνατότητα χρήσης κυττάρων του ανθρώπου, (β) η συγκριτική ευκολία στον χειρισμό των κυττάρων σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα και η ευκολότερη λήψη αποτελεσμάτων, (γ) η ευκολότερη εφαρμογή σύγχρονων βιοχημικών, κυτταρικών και μοριακών τεχνικών σε μηχανιστικές μελέτες και (δ) η δυνατότητα ανάλυσης μειγμάτων χημικών ουσιών.

Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και περιορισμοί στις εφαρμογές των *in vitro* μεθόδων, οι οποίες αφορούν (α) στο γεγονός ότι οι κυτταρικές καλλιέργειες είναι πολύ πιο απλοποιημένα συστήματα συγκριτικά με τον οργανισμό, (β) στην αδυναμία μελέτης και εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικών με την ακριβή λειτουργία κρίσιμων συστημάτων του οργανισμού (π.χ. ορμονικό, ανοσοποιητικό, νευρικό σύστημα) και (γ) στον περιορισμό των περισσότερων *in vitro* δοκιμασιών σε δοκιμές οξείας τοξικότητας που είναι απόρροια των (α) και (β) προαναφερθέντων παραγόντων. Απόρροια των παραπάνω είναι η έλλειψη σαφήνειας των *in vitro* αποτελεσμάτων τοξικότητας συγκριτικά με τις αναμενόμενες επιδράσεις των εξεταζόμενων υλικών στον οργανισμό του ανθρώπου (Ciasca και συν. 2012, Damas και συν. 2011, De-Deus και συν. 2009). Μεγάλη έρευνα διεξάγεται στις μέρες μας με τη χρήση βλαστικών κυττάρων για τη δημιουργία μοντέλων τοξικότητας για την *in vitro* αξιολόγηση φαρμακευτικών ουσιών με σαφή προσανατολισμό να χρησιμοποιηθούν στο εγγύς μέλλον και στην διερεύνηση της τοξικότητας των διαφόρων βιοϋλικών (Κατσαούνου και συν. 2016).

3.2. Τελικά σημεία της *in vitro* κυτταροτοξικότητας

Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά τελικά σημεία (endpoints) για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας, τα οποία περιλαμβάνουν μετρήσεις διαφόρων βιολογικών παραμέτρων, όπως είναι οι παρακάτω:

(α) *Κυτταρικός θάνατος*: μη ειδικό τελικό σημείο, με το οποίο δεν παρέχεται η δυνατότητα διερεύνησης των μηχανισμών που τον προκάλεσαν. Οι διάφορες χημικές ουσίες θανατώνουν τα κύτταρα είτε με άμεση βλάβη των δομικών συστατικών τους είτε με έμμεση παρεμβολή στην κανονική φυσιολογία και τον μεταβολισμό του κυττάρου.

(β) *Κυτταρική βιωσιμότητα*: τελικό σημείο είναι η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων. (γ) *Διαρροή της μεμβράνης*: τελικό σημείο μέτρησης της κυτταρικής βλάβης είναι η εκτίμηση της εξωκυττάρωσης κυτταρικών συστατικών ή προϊόντων.

(δ) *Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των κυττάρων*: τελικό σημείο είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μείωσης της σύνθεσης του DNA. (ε) *Μορφολογία των κυττάρων*: άρρηκτα συνδεδεμένες με την κυτταροτοξικότητα είναι οι μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου. Τελικό σημείο είναι η εκτίμηση των αλλαγών στο μέγεθος, στο σχήμα ή στην ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

(στ) *Κυτταρική λειτουργία*: τελικό σημείο μέτρησης είναι η αποτίμηση της θερμοδυναμικής και της μεταβολικής λειτουργίας. Το ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κυτταροτοξικότητας, αφού αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου.

Ως δείκτες κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν, επίσης, η αναστολή των μεταβολικών διεργασιών, η εξάντληση συνπαραγόντων και η ελάττωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (π.χ. MTT, MTS και XTT: δοκιμασίες άλατος τετραζολίου).

(ζ) *Κυτταρική προσκόλληση*: ως δείκτης κυτταροτοξικότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η προσκόλληση στην επιφάνεια της καλλιέργειας, η αποκόλληση από την επιφάνεια καλλιέργειας και η προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου.

3.3. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας

Τρεις είναι οι βασικοί μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας: Η βασική κυτταροτοξικότητα, η οργανοειδική κυτταροτοξικότητα και η τοξικότητα των οργανιδίων.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1994, ο Garle και συν. εισήγαγαν για πρώτη φορά τον όρο «βασική κυτταροτοξικότητα», η οποία αναφέρεται στις βλάβες των βασικών λειτουργιών των κυττάρων, ως αποτέλεσμα της δράσης των χημικών ουσιών σε αυτά. Εξ αιτίας της συγκεκριμένης επίδρασης, αναπόφευκτα θα επηρεαστούν και πιο εξειδικευμένες κυτταρικές λειτουργίες. Ως «βασική κυτταρική τοξικότητα» ορίζονται οι δυσμενείς επιπτώσεις στα λειτουργικά και στα δομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Μελέτες αναφορικά με τη βασική κυτταρική τοξικότητα μπορούν να διεξαχθούν μόνο σε αδιαφοροποίητα κύτταρα. Σε επίπεδο κυττάρου, η επίδραση της «βασικής κυτταροτοξικότητας» παρατηρείται στους παρακάτω δομικούς και λειτουργικούς παράγοντες:

- (α) Στην ακεραιότητα των μεμβρανών και του κυτταρικού σκελετού.
- (β) Στον κυτταρικό μεταβολισμό (π.χ. ως συνάρτηση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας).
- (γ) Στη σύνθεση του DNA και των πρωτεϊνών.
- (δ) Στη σύνθεση/αποικοδόμηση/ απελευθέρωση συστατικών ή προϊόντων του κυττάρου.
- (ε) Στην ιοντική ρύθμιση (π.χ. αντλίες Na/K και αντλία Ca/K).
- (στ) Στην κυτταρική διαίρεση και (ζ) στις κυτταρικές διεργασίες, όπως μετάφραση/ πρωτεϊνοσύνθεση (ριβοσώματα) ή κατάτμηση/φαγοκυττάρωση (λυσοσώματα).

Με βάση όσα περιγράφηκαν παραπάνω, οι *in vitro* δοκιμές κυτταροτοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι για τη συγκριτική μελέτη της τοξικότητας πολλών ουσιών και ενδεχομένως να αποτελέσουν μεθόδους που θα αντικαταστήσουν τις *in vivo* δοκιμές τοξικότητας, και πιο συγκεκριμένα τις δοκιμές οξείας θανατηφόρου τοξικότητας (*acute lethal toxicity*).

Εν τούτοις, η *in vitro* τοξικότητα δεν αποτελεί αποτελεσματική δοκιμή για χημικές ουσίες οι οποίες απαιτούν βιομετατροπή, δηλαδή ενδοκυττάριο μεταβολισμό. (Loushine και συν.

2011).

Η «οργανοειδική τοξικότητα» ουσιαστικά αποτελεί τμήμα της βασικής κυτταροτοξικότητας, η οποία εμφανίζεται στα όργανα-στόχους. Η μελέτη της οργανοειδικής κυτταροτοξικότητας απαιτεί καλλιέργειες πρωτογενών, πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων προερχόμενων από διαφορετικά όργανα.

Τέλος, η τοξικότητα των οργανιδίων θα μπορούσε να μελετηθεί έμμεσα σε κυτταρικές καλλιέργειες με εξέταση των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων.

Τα τελευταία 20 έτη όπως αναφέρουν οι Κατσαούνου και συν. (2016) και Thamaraiselvi και συν. (2004) υπάρχει μια αλματώδης ανάπτυξη στις τεχνικές καλλιέργειας βλαστικών κυττάρων, που απομονώνονται από ανθρώπινα έμβρυα (hESCs) ή από ενήλικες ανθρώπους. Η βελτιστοποίηση των συγκεκριμένων τεχνικών κυτταρικής καλλιέργειας καθιστά πλέον τα παραπάνω κύτταρα ευρέως διαθέσιμα. Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε πλειοδύναμα (pluripotent) και πολυδύναμα (multipotent). Το δυναμικό διαφοροποίησης που τα χαρακτηρίζει (pluri-/multipotency), τα καθιστά «τα πλέον ειδικά» για χρήση σε *in vitro* δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας, καθώς και αναπτυξιακής τοξικότητας.

Οι έρευνες πλέον προσανατολίζονται τόσο στην ανακάλυψη νέων, όσο και στην εξέλιξη των ήδη υπάρχουσών τεχνικών τοξικότητας. Πιστεύεται ότι το αποτέλεσμα αυτών των ερευνών θα συμβάλει στην καλύτερη αξιολόγηση των υλικών και των φαρμάκων, αλλά και των επιπτώσεών τους στην ανάπτυξη του οργανισμού, γεγονός το οποίο είναι δύσκολο να διερευνηθεί στον άνθρωπο, αφού εγείρονται θέματα βιοηθικής. Συμπερασματικά, η αυξανόμενη χρήση των βλαστικών κυττάρων σε *in vitro* μελέτες της τοξικότητας θα διευκολύνει την έρευνα γιατί θα μειώσει τη χρήση πειραματόζωων, ενώ ταυτόχρονα θα

συμβάλλει στην καλύτερη αξιολόγηση των κινδύνων και της πρόβλεψης της βιολογικής απόκρισης στις φαρμακευτικές ουσίες και τα υλικά.

Οι κυτταροκαλλιέργειες είναι διαδικασίες χαμηλού κόστους μερικώς απαλλαγμένες από νομικούς και ηθικούς ενδοιασμούς που συνοδεύουν τα πειράματα σε ζώα και ανθρώπους.

Ένα από τα πλεονεκτήματα των *in vitro* μελετών είναι η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, η οποία εξαρτάται από τις επιλεγμένες πειραματικές διαδικασίες, τον αριθμό επαναληψιμότητας των πειραμάτων και την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (πρόβλημα στην αναγωγή συμπερασμάτων σε ασθενείς, μειωμένη κλινική σημασία).

Η πληροφορία που προκύπτει μπορεί να κατευθύνει τις *in vivo* μελέτες που θα ακολουθήσουν και συνεισφέρει στην κατανόηση και στην ανάλυση των δεδομένων τους.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες χωρίζονται ανάλογα με την προέλευση των κυττάρων σε πρωτογενείς καλλιέργειες, όταν τα κύτταρα προέρχονται από υγιείς βιοψίες (ανθρώπινης προέλευσης ή από τρωκτικά) και σε αθάνατες καλλιέργειες όταν τα κύτταρα προέρχονται από βιοψίες καρκινικών όγκων ή έχουν τροποποιηθεί μέσω της γενετικής μηχανικής (μετασηματισμένα) ώστε να συμπεριφέρονται σαν τα νεοπλαστικά κύτταρα. Στα κύτταρα που είναι αθάνατα είναι δυνατή η ανακαλλιέργειά τους για απεριόριστο αριθμό γενεών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

4.1. Μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983. Βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών (μεταβολικά ενεργών) κυττάρων να ανάγουν ένα άλας του τετραζολίου το 3{4,5-διμέθυλθειαζολ-2-yl}-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλο-τετραζολίου με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (succinic dehydrogenase), με αποτέλεσμα να παράγονται ιώδεις κρύσταλλοι. Οι κρύσταλλοι αυτοί

είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με τη βοήθεια κατάλληλων οργανικών διαλυτών, οπότε προσδιορίζεται στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 570-600nm. Επομένως η δοκιμασία MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση τη ζωτικότητα (viability) και το ρυθμό αύξησης (growth rate) ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Το MTT ανάγεται από τα ζωντανά κύτταρα σε φορμαζάνιο (formazan) ιώδους χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη βιωσιμότητα των κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού (Fabre και συν. 2001, Jiang και συν. 2014, Mosmann 1983).

4.2. Ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης με τη χρήση δύο φθορίζουσών ουσιών (FDA/PI)

Προκειμένου να εκτιμηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων προστίθεται στα υλικά 5ml διαλύματος δισοξικής φθορεσεΐνης και ιωδιούχου προπιδίου (Fluoresceine DiAcetate /Propidium Iodide-FDA/PI). Το διάλυμα διατηρείται επί 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα σκοτεινό και υγρό μέρος. Στο μικροσκόπιο φθορισμού τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται με πράσινο χρώμα (βαφή FDA) κάτω από το μπλε φως διέγερσης FITC, ενώ τα νεκρά κύτταρα παρατηρούνται με πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα με βαφή PI κάτω από το πράσινο φως διέγερσης TEXAS RED. Λαμβάνονται φωτογραφίες από 5 τυχαίες περιοχές του δείγματος οι οποίες εν συνεχεία επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image J. Για κάθε δείγμα μετριοούνται τα ζωντανά και νεκρά κύτταρα κάθε μιας από τις 5 τυχαίες περιοχές και υπολογίζεται ο μέσος όρος βιωσιμότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ

ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

5.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Με τον όρο ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης εννοείται η διαδικασία κατά την οποία για την παρατήρηση ενός δείγματος σε μεγέθυνση, χρησιμοποιούνται μικροσκόπια που βασίζουν τη λειτουργία τους σε δέσμες ηλεκτρονίων. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τις μικρογραφίες του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (ΗΜΣ) είναι κριτικής σημασίας όσον αφορά τη συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με την επιφάνεια επαφής και την μορφολογία που έχουν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης.

Για την παρατήρηση στο ΗΜΣ τα δείγματα πρέπει να περάσουν από τις φάσεις της μονιμοποίησης, της ξήρανσης και στη συνέχεια της κάλυψης συνήθως με χρυσό προκειμένου να γίνουν αγώγιμα. Με την μονιμοποίηση επιτυγχάνεται η αναστολή όλων των κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα να καταγράφεται στο ΗΜΣ η κυτταρική κατάσταση στην φάση της μονιμοποίησης.

Τα δοκίμια τοποθετούνται σε ειδικούς υποδοχείς (stubs) διαφορετικούς για κάθε τύπο τράπεζας του ΗΜΣ, είτε με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας διπλής όψης είτε υγρής κόλλας αργύρου.

Οι υποδοχείς τοποθετούνται σε συσκευή επιχρύσωσης και καλύπτονται με 100-200 E Au-Pd με ένα ή και περισσότερα στρώματα, ανάλογα με το πόσο αγώγιμο είναι από τη φύση του το δοκίμιο. Μετά την κάλυψη, τα δείγματα είναι έτοιμα για παρατήρηση στο ΗΜΣ. Συνιστάται η ένταση της δέσμης των ηλεκτρονίων να μην είναι ιδιαίτερα υψηλή, προκειμένου να μην καταστραφεί η επιφάνεια του δείγματος.

Για βιολογικά δείγματα η συνιστώμενη τάση πρέπει να κυμαίνεται περί τα 20KV.

5.2. Έλεγχος της οστικής διαφοροποίησης

Η ικανότητα οστικής διαφοροποίησης των άωρων οστεοβλαστών εξετάζεται χρησιμοποιώντας έναν από τους πρωταρχικούς βιοχημικούς δείκτες οστικής διαφοροποίησης,

το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (ALP). Για την ποσοτικοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδο QUANTI-Blue (Invivogen, USA), η οποία καθορίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου σε κάποιο βιολογικό δείγμα, όπως το υπερκείμενο υλικό καλλιιεργειών οστεοβλαστικών κυτταρικών. Παρουσία της αλκαλικής φωσφατάσης, το υπόστρωμα QUANTI Blue αλλάζει χρώμα και από ροζ γίνεται μπλε. Με το πέρας των κυτταρικών καλλιιεργειών προστίθενται 200ml από το διάλυμα QUANTI-Blue και 20ml υπερκείμενου υλικού από κάθε δείγμα και αφήνονται για επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 620-655nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA reader (Miller και συν. 2017).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ-ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας και κυτταροτοξικότητας του σύγχρονου βιοκεραμικού υλικού για ενδοδοντική χρήση Total Fill putty σε κυτταροκαλλιέργειες άωρων ανθρώπινων οστεοβλαστών.

Ως μηδενική υπόθεση εργασίας καθορίστηκε ότι το εξεταζόμενο βιοκεραμικό υλικό είναι βιοσυμβατό, δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα και διαθέτει και οστεογενετικές ιδιότητες.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικά

Το προς εξέταση σύγχρονο βιοκεραμικό υλικό είναι το Total Fill putty (FKG Dentaire S, Switzerland) το οποίο συνιστάται για την ανάστροφη έμφραξη ακρορριζίου, την αποκατάσταση διατρήσεων ρίζας και απορροφήσεων καθώς και την άμεση κάλυψη πολφού. Σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία, το υλικό αποτελείται από πυριτικά άλατα ασβεστίου, μονοβασικό φωσφορικό ασβέστιο, οξείδιο του ζirkονίου, οξείδιο του τανταλίου, ενισχυτικές ουσίες και παράγοντες πήξης. Οι κατασκευαστές ισχυρίζονται ότι το υλικό είναι υψηλής βιοσυμβατότητας, υδρόφιλο, με υψηλό pH(12), δεν χρωματίζεται, έχει χρόνο εργασίας περίπου 30min, ενώ είναι και εξαιρετικά ακτινοσκιερό, πιστοποιημένο με τους ευρωπαϊκούς κανόνες ελέγχου (CE 0470).

Εκτός από το προς εξέταση υλικό μελετήθηκαν με τις ίδιες διαδικασίες για λόγους σύγκρισης και αναφοράς τα προτεινόμενα για την ίδια χρήση παλαιότερα βιοϋλικά Mineral Trioxide Aggregate-MTA Angelus white, (Tulsa Dental, Tulsa, OK) (Malhotra και συν. 2013) και Biodentine (Septodont, Lancaster, PA) (Özyürek και Demiryürek 2016).

Έλεγχος βιοσυμβατότητας

Για να αξιολογηθεί η βιοσυμβατότητα του εξεταζόμενου βιοκεραμικού υλικού, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων MG63 (άωροι ανθρώπινοι οστεοβλάστες). Η προμήθεια της κυτταρικής σειράς MG63 έγινε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection, LGC, Germany) σε συνθήκες σύμφωνα με το ISO 10993-5:2009(E). Τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια μέσα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -80°C, σε θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε το υλικό κρυοπροστασίας διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη χωρίς ερυθρή φαινόλη θρεπτικό υλικό, συμπληρωμένο με 10% v/v ορό αίματος βοείου εμβρύου, FBS (Fetal Bovine Serum). Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενες συνθήκες με θερμοκρασία 37°C και υγρασία 95% παρουσία CO₂ (5%) (Thermo Fisher Scientific Waltham MA).

Για την προστασία των καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά διαλύματα πενικιλίνης σε συγκέντρωση των 100 IU/mL και στρεπτομυκίνης σε συγκέντρωση των 100 µg/mL (Pen/ strep solution, Gibco, Thermo Fisher Scientific Waltham MA). Οι κυτταρικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν για 24, 48 και 72h. Όλες οι δοκιμές εκτελέστηκαν εις τριπλούν σε ανεξάρτητα πειράματα.

Πρωτόκολλο διατήρησης της κυτταροκαλλιέργειας

Απόψυξη κυττάρων

Τα φιαλίδια με τα παγωμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, όπου και παρέμεναν για λίγη ώρα μέχρι να αρχίσει η απόψυξη τους. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν μέσα στην απαγωγό, σε φλάσκα 75cm³ που περιείχε θρεπτικό μέσο (DMEM/10% FBS) και απλώθηκαν σε αυτήν με ήπια ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας. Η φλάσκα με τα κύτταρα μεταφέρθηκε στον κλίβανο επώασης στους 37°C. Επάνω στη φλάσκα σημειώθηκαν ο κωδικός της κυτταρικής σειράς, η ημερομηνία απόψυξης και το εργαστηριακό στάδιο ανακαλλιέργειας στο οποίο ευρίσκοντο τα κύτταρα. Την επόμενη ημέρα, έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

Διατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας

Η καλλιέργεια των κυττάρων διατηρήθηκε στον κλίβανο επώασης στους 37°C και σε περιβάλλον 5% CO₂. Κάθε δύο ημέρες πραγματοποιείτο αλλαγή του θρεπτικού μέσου των

κυττάρων, ως εξής: α) αφαιρείτο το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, β) ακολουθούσαν δύο πλύσεις με 5 ml διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline, 1x) και γ) μετά την αφαίρεση του PBS προστίθετο 12 ml φρέσκου θρεπτικού διαλύματος στη φλάσκα και αυτή επανατοποθετείτο στον κλίβανο επώασης.

Η κατάσταση των κυττάρων που αναπτύσσονταν στη φλάσκα ελέγχονταν καθημερινά στο οπτικό μικροσκόπιο. Για να παραμείνουν τα κύτταρα υγιή και σε διαδικασία πολλαπλασιασμού, ανά τακτά χρονικά διαστήματα υφίσταντο τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την υποδιαίρεση (split) του πληθυσμού κυττάρων του τρυβλίου βάσει συγκεκριμένου παράγοντα διαίρεσης (split ratio), μέχρι τη διαπίστωση ότι κάλυπταν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου.

Ο διαχωρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ως εξής: α) αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, β) έγιναν δύο γρήγορες πλύσεις με 5 ml PBS (1x), γ) προστέθηκαν 2000 μl διαλύματος θρυψίνης/EDTA (1x). Η φλάσκα τοποθετήθηκε στον κλίβανο επώασης στους 37°C για 3min και ελέγχθηκε η κατάσταση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Όταν αυτά ανασηκώθηκαν, προστέθηκαν στη φλάσκα 6ml θρεπτικού μέσου, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη. Έγινε καλή ανάμειξη των κυττάρων με την πιπέτα, έτσι ώστε να ανασηκωθούν όλα τα κύτταρα και να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Ένα ml από τα κύτταρα αυτά (split ratio 1:8) μεταφέρθηκε σε 2 νέες φλάσκες που περιείχαν 11ml φρέσκου θρεπτικού μέσου και επανατοποθετήθηκε στον κλίβανο επώασης.

Μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού με τη χρήση αιματοκυτταρομέτρου

Για την μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού που περιέχει η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer®.

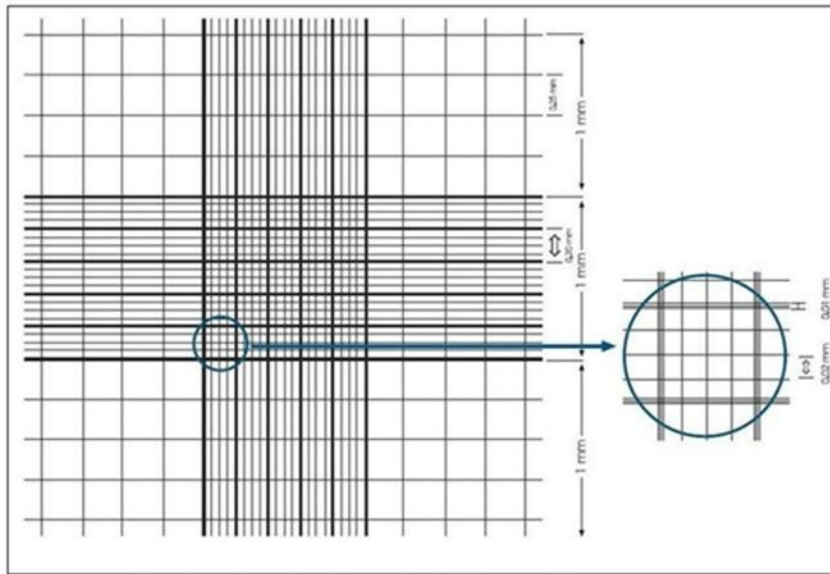
Το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer® αποτελείται από μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου, η οποία φέρει ορθογώνιο οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο. Με τη

βοήθεια ακτίνων λέιζερ χαράζεται επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα πλέγμα κάθετων και οριζόντιων γραμμών, που οριοθετεί τον θάλαμο. Κάθε θάλαμος αποτελείται από 4 τεταρτημόρια και μια κεντρική περιοχή (Εικ. 2).

Η επιφάνεια όπως και το βάθος του θαλάμου οριοθετούνται από τις γραμμές, οπότε είναι δυνατόν να μετρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο ρευστού και να γίνει αναγωγή στο συνολικό όγκο του εναιωρήματος και επομένως να υπολογιστεί έμμεσα η συγκέντρωση των κυττάρων στο υγρό συνολικά.

Για τη μέτρηση του πληθυσμού στο αιματοκυτταρόμετρο ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια: α) αφαιρείτο από τη φλάσκα το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, β) ακολουθούσαν δύο γρήγορες πλύσεις με 5 ml PBS (1x), γ) προστίθεντο 2000 μl διαλύματος θρυψίνης/EDTA (1x) και δ) τοποθετήθηκε η φλάσκα στον κλίβανο επώασης στους 37°C για 3min. Κατόπιν ελέγχονταν η κατάσταση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x. Όταν αυτά ανασηκώνονταν, προστίθεντο στο τρυβλίο 8ml θρεπτικού μέσου, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη και ο χηλικός παράγοντας (EDTA).

Πλάκα Neubauer



"Reticulo Neubauer", από SantiBadia διαθέσιμο με άδεια CC BY-SA 3.0

$4 \times 16 = 64$ τετράγωνα

Κάθε τετράγωνο έχει επιφάνεια 1 mm^2

Το βάθος της πλάκας είναι $1/10 \text{ mm}$

Εικόνα 2. Το δείγμα εισέρχεται στο θάλαμο, κάτω από την αντικειμενοφόρο πλάκα. Ένα πλέγμα γραμμών οριοθετεί το θάλαμο, όπου μετράται ο αριθμός των κυττάρων σε συγκεκριμένο όγκο ρευστού.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας μία μικροπιπέτα, τοποθετήθηκαν 10ml του διαλύματος με το εναιώρημα κυττάρων στην ειδική περιοχή του κυτταρόμετρου, προσέχοντας να μη γίνει υπερπλήρωση. Με την τοποθέτηση της επικαλυπτρίδας στην επιφάνεια δημιουργήθηκε κενός χώρος, οπότε το διάλυμα απλώνονταν μέσω του τριχοειδικού φαινομένου. Μετρήθηκαν τα κύτταρα που βρίσκονταν εντός των πλαισίων του κάθε τεταρτημόριου στο οπτικό μικροσκόπιο. Πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν επί 1000, προέκυπτε ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος. Πολλαπλασιάζοντας έπειτα επί τα ml του εναιωρήματος καθορίζονταν ο συνολικός αριθμός κυττάρων που εμπεριέχονταν στο εναιώρημα της καλλιέργειας.

Έλεγχος βιωσιμότητας με trypan blue

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων πριν αρχίσει το πείραμα η γνώση της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι απαραίτητη για να γνωρίζουμε από τον ολικό αριθμό κύτταρων που καλλιεργούνται πόσα είναι ζωντανά. Μια γενική στρατηγική που ακολουθείται είναι η χρήση χρωστικών που βάφουν είτε μόνο τα νεκρά είτε μόνο τα ζωντανά κύτταρα. Η χρωστική trypan blue είναι μία χρωστική που βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα και αυτό γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Βιωσιμότητα \%} = \frac{\text{ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων}}{\text{ολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα κύτταρα που βρίσκονται στις πρώτες ανακαλλιέργειες (passages) διατηρούν την φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια που έχει και ο ζωντανός ιστός. Αντίθετα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην εικοστή ανακαλλιέργεια έχουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογική δραστηριότητα από αυτά που βρίσκονται πριν την έβδομη ανακαλλιέργεια. Η χρήση των κυττάρων για την παρούσα έρευνα βρίσκονταν πριν την τέταρτη ανακαλλιέργεια, προκειμένου να διατηρηθεί η φαινοτυπική και λειτουργική τους ετερογένεια.

Καλλιέργεια των κυττάρων MG63

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν άωροι ανθρώπινοι οστεοβλάστες της σειράς MG63, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν πάνω στα τρία υλικά και σε θρεπτικό υλικό (ομάδα ελέγχου) για 24, 48 και 72h. Η επιλογή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς έγινε βάσει 2 κριτηρίων. Το πρώτο είναι γιατί τα συγκεκριμένα κύτταρα συνιστώνται για μελέτες κυτταροτοξικότητας

από το ISO 10993 και δεύτερον γιατί μας ενδιαφέρει η επίδραση του εξεταζόμενου υλικού στην αναγεννητική συμπεριφορά των οστεοβλαστών. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο μετρήθηκε και η αλκαλική φωσφατάση. Για την κατασκευή όμοιων διαστάσεων δοκιμίων χρησιμοποιήθηκε σύστημα μεταφοράς (τύπου σύριγγας) παράγωγης δοκιμίων ίδιου τύπου σε όλες τις περιπτώσεις. Το δισκίο που προέκυψε για κάθε υλικό, ενέθηκε στην επιφάνεια του κάθε πηγαδιού του πολυτρυβλίου. Τα υλικά αφού αποστειρώθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης 70% ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και εν συνέχεια μια φορά με θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα MG63 τα οποία βρίσκονταν στο 4ο στάδιο ανακαλλιέργειας, θρυψινοποιήθηκαν, μετρήθηκαν με trypan blue και καλλιεργήθηκαν σε όλα τα δοκίμια καθώς και στο πλαστικό του τρυβλίου καλλιέργειας, το οποίο αντιπροσωπεύει την ιδεατή συνθήκη καλλιέργειας και θεωρείται ο μάρτυρας (control). Όλες οι μελέτες έγιναν κατά ομάδες τριών ίδιων δειγμάτων (τριπλέτα), και επαναλήφθηκαν από 3 φορές η κάθε μια, για κάθε δοκίμιο και κάθε χρονική στιγμή, δίνοντας έτσι στατιστικό δείγμα για κάθε δοκίμιο ίσο με 9.

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας το βιοϋλικό υποβλήθηκε σε ποσοτική δοκιμασία MTT και ποιοτικό έλεγχο χρώση με FDA και PI καθώς και ποιοτικό προσδιορισμό της βιοσυμβατότητας μέσω ΗΜΣ.

MTT test

Ο έλεγχος της δοκιμασίας MTT (MTT assay) είναι η συνηθέστερη μέθοδος αξιολόγησης κυτταρικής βιωσιμότητας μετά την έκθεση κυττάρων σε κάποιο υλικό. Μετράει τη

μεταβολική δραστηριότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας γίνεται μέσω μιας αντίδρασης μεταβολής χρώματος μιτοχονδριακών ενζύμων. Τα μιτοχονδριακά NAD(P)H-εξαρτώμενα κυτταρικά ένζυμα οξειδοεδοουκτάσης

(oxidoreductase), μπορούν να μετατρέψουν τη χρωστική MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyletrazolium bromide) στην αδιάλυτη και με μωβ/μπλε χρώμα φορμαζάνη, μεταβολή η οποία αντανάκλα τον αριθμό των εναπομεινάντων ζωντανών κυττάρων. Η απορρόφηση του διαλύματος της φορμαζάνης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση σε μήκος κύματος 570nm σε φασματοφωτόμετρο με τη βοήθεια καταγραφέα Elisa (Infinite® 200 PRO, Tecan Switzerland).

Ανίχνευση ζωντανών/νεκρών κυττάρων με τη χρήση των φθορίζουσών ουσιών

FDA και PI.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων έγινε έλεγχος των δοκιμίων σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DM 4000B Wetzlar, Germany). Στα κύτταρα προστέθηκαν 15μl διαλύματος δισοξικής φθορεσεΐνης και ιωδιούχου προπιδίου (FDA/PI) σε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline-PBS). Το FDA προσλαμβάνεται από τα κύτταρα τα οποία μετατρέπουν το μη φθορίζον FDA σε πράσινο φθορίζοντα μεταβολίτη. Το μετρηθέν σήμα αποτελεί ένδειξη βιωσιμότητας των κυττάρων, καθώς η μετατροπή είναι εστερασοεξαρτώμενη. Αντίθετα, η χρωστική πυρηνικής βαφής PI δεν μπορεί να περάσει μέσα από την μεμβράνη του ζωντανού κυττάρου. Φτάνει στον πυρήνα του κυττάρου μέσω διαταραγμένων περιοχών των νεκρών μεμβρανών και εμπλέκεται με τη διπλή έλικα του DNA του κυττάρου.

Τα ζωντανά κύτταρα λοιπόν αναγνωρίζονται με πράσινο χρώμα με βαφή FDA (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) κάτω από το μπλε φως διέγερσης, ενώ τα νεκρά κύτταρα αναγνωρίζονται με πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα με βαφή PI (Sigma Aldrich, Darmstadt,

Germany) κάτω από το πράσινο φως διέγερσης.

Ποιοτικός προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας

Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Για την ποιοτική αξιολόγηση των μορφολογικών αλλαγών που προκλήθηκαν στα κύτταρα από το υλικό ή κάποιο συστατικό του στο τέλος της περιόδου της καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ).

Για την παρατήρηση των δειγμάτων στο ΗΜΣ, τα τελευταία υπέστησαν τις επεξεργασίες της μονιμοποίησης, της ξήρανσης και στη συνέχεια της επικάλυψης με χρυσό όπως ήδη έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο. Με την μονιμοποίηση επιτυγχάνεται η αναστολή όλων των κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα ότι απεικονίστηκε στο ΗΜΣ να αφορά τη φάση των κυττάρων τη στιγμή που μονιμοποιήθηκαν. Οι πληροφορίες από τις μικροφωτογραφίες του ΗΜΣ είναι κριτικής σημασίας όσον αφορά τη συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με την επιφάνεια επαφής και την μορφολογία που έχουν στο εκάστοτε χρονικό διάστημα καλλιέργειας.

Πρωτόκολλο Μονιμοποίησης

Το πρωτόκολλο μονιμοποίησης περιελάμβανε δύο στάδια.

Στο πρώτο στάδιο για την μονιμοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μίγμα γλουτερικής αλδεϋδης 2% σε 0,1M ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου pH7,4 στους 4°C για 60min.

Μετά το τέλος της πρώτης μονιμοποίησης ακολούθησε ξέπλυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο έγινε ισοτονικό με μη πολικό μόριο σακχαρόζης 4% σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος κακοδυλικού νατρίου στους 4°C για 10min. Το στάδιο αυτό αποσκοπούσε στην αφαίρεση του αδέσμευτου μονιμοποιητή.

Στο δεύτερο στάδιο ή στάδιο μεταστερέωσης ως μονιμοποιητής χρησιμοποιήθηκε το τετροξείδιο του οσμίου (OsO_4) σε υδατικό διάλυμα 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου. Τα κύτταρα παρέμειναν στον δεύτερο μονιμοποιητή για 60min και σταθερά στους 4°C , γιατί σε υψηλότερη θερμοκρασία η αντίδραση των κυτταρικών συστατικών με το τετροξείδιο του οσμίου είναι τόσο γρήγορη, ώστε προκαλούνται σοβαρές αλλοιώσεις. Μετά το τέλος της δεύτερης μονιμοποίησης ακολουθήθηκε ξέπλυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα όπως ακριβώς περιγράφηκε για την έκπλυση στην πρώτο στάδιο μονιμοποίησης.

Μετά την ολοκλήρωση των σταδίων της μονιμοποίησης ακολούθησε το στάδιο της αφυδάτωσης. Η αφαίρεση του νερού από τα κύτταρα έγινε σταδιακά και αντικαταστάθηκε συνήθως με αιθυλική αλκοόλη στους 4°C . Ανά 10min έγιναν αλλαγές με αυξανόμενη συγκέντρωση αλκοόλης (25%, 50%, 70%, 80% 95%, 100%), δύο φορές για κάθε συγκέντρωση πλην της συγκέντρωσης 100% που έγινε 4 φορές για 15min η κάθε μία. Όταν η συγκέντρωση αλκοόλης έφτασε στο 95% χρησιμοποιήθηκαν τα φακελάκια διηθητικού χαρτιού όπου αναγράφονταν ο αύξων αριθμός του δείγματος. Κατόπιν τα φακελάκια βυθίστηκαν σε αλκοόλη 100% μέχρι το τελευταίο στάδιο της αφυδάτωσης που είναι η πλήρης απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης και έγινε ξήρανση για 12h σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δοκίμια τοποθετήθηκαν σε ειδικούς υποδοχείς (stubs), διαφορετικούς για κάθε τύπο τράπεζας του ΗΜΣ, με τη βοήθεια υγρής κόλλας αργύρου. Οι υποδοχείς τοποθετήθηκαν σε ειδική συσκευή επιχρύσωσης (BAL-TEC SCD 004 LA, CA) και καλύφθηκαν με 100-200E Au-Pd (sputter coated) προκειμένου αφενός να σταθεροποιηθούν τα κύτταρα για να ανταπεξέλθουν το υψηλό κενό και αφετέρου για να γίνουν τα δοκίμια αγωγά. Μετά έγινε παρατήρηση στο ΗΜΣ (Quanta 200 FEI Co, Hillsboro, Ore) σε συνθήκες υψηλού κενού και ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές SEI (Secondary Electron Image) και BEI (Backscattered

Electron Image) εικόνες σε μεγεθύνσεις 500x, 1000x έως και 2000x με χαμηλή ένταση δέσμης ηλεκτρονίων, τάσης 20KV.

Εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων διερευνήθηκε επίσης η μείωση ή η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων που προσκολλώνται στο υπόστρωμα μετά την έκθεσή τους στο υπό μελέτη υλικό.

Έλεγχος οστικής διαφοροποίησης

Η ικανότητα οστεογενετικής διαφοροποίησης των κυττάρων, τα οποία καλλιεργήθηκαν στα δοκίμια των υπό εξέταση βιοϋλικών, εξετάστηκε χρησιμοποιώντας έναν από τους πρωταρχικούς βιοχημικούς δείκτες οστικής διαφοροποίησης των πρώιμων οστεοβλαστών, το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (ALP). Για την ποσοτικοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιήθηκε το QUANTI-Blue (Invivogen, USA). Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο, η οποία καθορίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου σε κάποιο βιολογικό δείγμα, όπως το υπερκείμενο οστεοβλαστικών κυτταρικών καλλιεργειών. Παρουσία της αλκαλικής φωσφα-τάσης, το υπόστρωμα QUANTI Blue αλλάζει χρώμα και από ροζ γίνεται μπλε. Με το πέρας των κυτταρικών καλλιεργειών προστίθενται 200ml από το διάλυμα QUANTI-Blue και 20ml υπερκείμενου από κάθε δείγμα και αφήνονται για επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 620 έως 655nm σε φασματο-φωτόμετρο ELISA reader. Οι πρώιμοι οστεοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε όλα τα δοκίμια καθώς και στο πλαστικό του τρυβλίου καλλιέργειας, το οποίο αντιπροσωπεύει την ιδεατή συνθήκη καλλιέργειας και θεωρείται ο μάρτυρας (control)

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε two-way Anova test με μεταβλητές τα εξεταζόμενα υλικά και το χρόνο επώασης ενός εκάστου από αυτά. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων για καταγραφή στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε με το Tuckey's test με επίπεδο σημαντικότητας $P < .05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

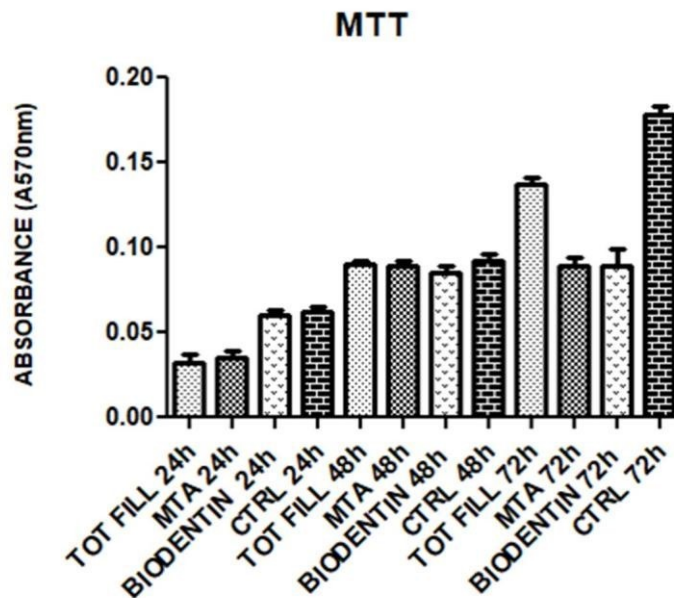
Στον πίνακα 1 και την εικόνα 3 καταγράφεται αριθμητικά και διαγραμματικά η βιωσιμότητα του υλικού που ελέγχεται στην παρούσα μελέτη (Total Fill) σε σχέση με τα κατοχυρωμένα βιοσυμβατά υλικά MTA και Biodentine, καθώς και με την καλλιέργεια άωρων οστεοβλαστικών κυτταρικών σχηματισμών σε θρεπτικό υλικό (μάρτυρας).

Παρατηρείται μία βελτιούμενη βιωσιμότητα για το υλικό Total Fill συναρτήσει του χρόνου, με σαφώς καλύτερες τιμές στις 72h ($0,240\pm 0.07$) τόσο σε σχέση με τα άλλα υλικά όσο και με τον μάρτυρα. Καταγράφεται στατιστικά σημαντική ($P=0.002$) αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων σε επαφή με το υλικό Total Fill, μεταξύ των 24h και 72h καλλιέργειας, ενώ δεν καταγράφονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ 24h και 48h και 48h και 72h. Παρόμοια συμπεριφορά επέδειξαν και τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, σε αντίθεση με τα άλλα δύο υλικά, όπου η αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική μετά τις 24h καλλιέργειας και κατόπιν παρέμεινε σταθερή μέχρι τις 72h καλλιέργειας.

Πίνακας 1. Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις ποιοτικού προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητα συναρτήσει του χρόνου επώασης.

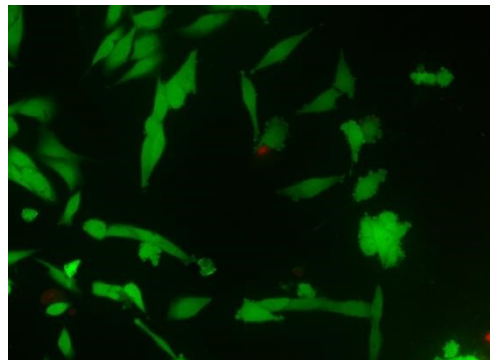
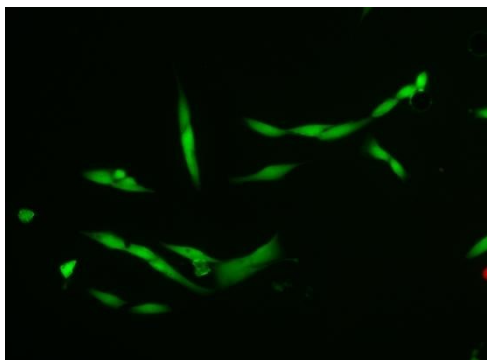
ΥΛΙΚΑ	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ MTT		
	24h	48h	72h
TOTAL FILL	0.030 ± 0.02^a	$0.081\pm 0.03^{a,b}$	0.240 ± 0.07^b
MTA	0.037 ± 0.01^a	0.076 ± 0.03^b	0.197 ± 0.05^b
BIODENTINE	0.037 ± 0.009^a	0.732 ± 0.02^b	0.140 ± 0.09^b
CONTROL	0.056 ± 0.006^a	$0.084\pm 0.01^{a,b}$	0.093 ± 0.06^b

Τίδιοι εκθέτες δείχνουν μη σημαντικά στατιστικά διαφορές ($P > .05$), ενώ διαφορετικοί εκθέτες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < .05$).

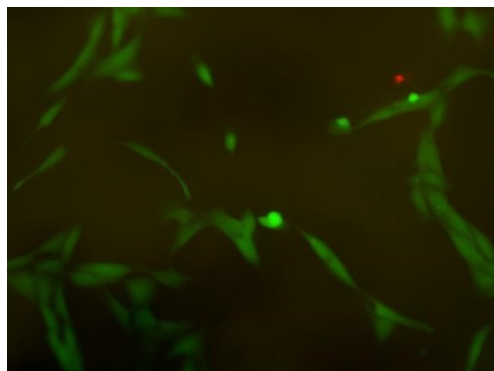
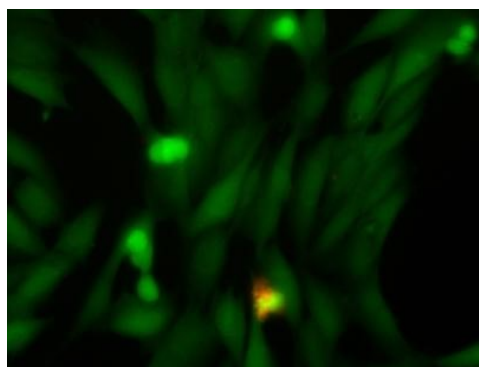


Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της συμπεριφοράς των κυττάρων επί των τριών ομάδων υλικών και της ομάδας ελέγχου στη δοκιμασία MTT, μετά από καλλιέργεια για 24 h, 48 h και 72 h.

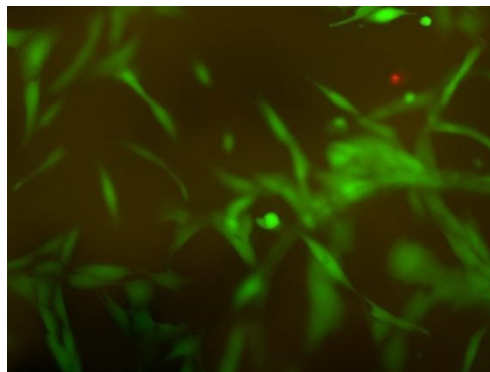
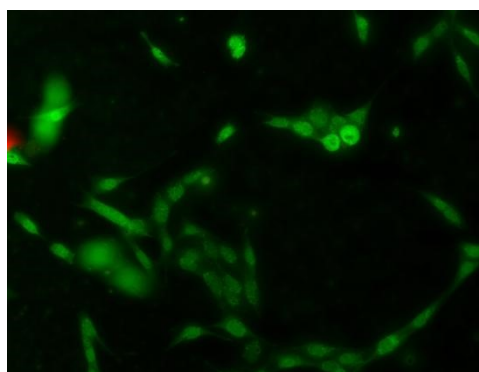
Στις εικόνες 4, 5 και 6 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της πυκνότητας των άωρων οστεοβλαστικών κυτταρικών στοιχείων στο Total Fill σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα στο θεραπευτικό υλικό, μετά από 24, 48 και 72h επώασης αντίστοιχα. Παρατηρείται αυξημένη παρουσία ζωντανών κύτταρων (πράσινο χρώμα), ενώ τα νεκρά κύτταρα (πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα) εμφανίζονται περιορισμένα στις 48 και 72h επώασης.



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από δοκίμια της ομάδας ελέγχου (αριστερά) και της ομάδας Total Fill (δεξιά) σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 24h παραμονής στο θρεπτικό υλικό. (Μεγέθυνση 20x).

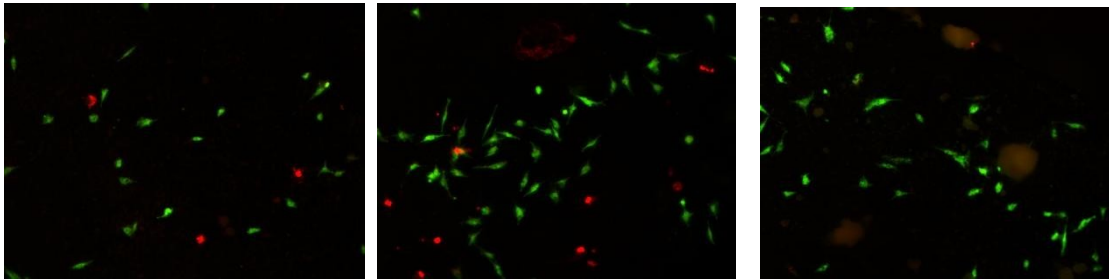


Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από δοκίμια της ομάδας ελέγχου (αριστερά) και της ομάδας Total Fill (δεξιά) σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 48h παραμονής στο θρεπτικό υλικό. (Μεγέθυνση 20x).

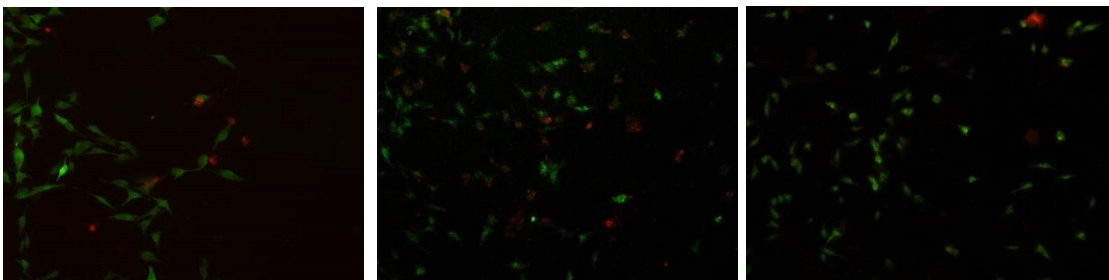


Εικόνα 6. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από δοκίμια της ομάδας ελέγχου (αριστερά) και της ομάδας Total Fill (δεξιά) σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 72h παραμονής στο θρεπτικό υλικό. (Μεγέθυνση 20x).

Στις εικόνες 7 και 8 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της πυκνότητας των άωρων οστεοβλαστικών κυτταρικών στοιχείων στα υλικά MTA και Biodentine αντίστοιχα μετά από 24, 48 και 72h επώασης. Στην καλλιέργεια του MTA παρατηρείται μια σταθερή αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης με σταθερό ποσοστό νεκρών κυττάρων σε όλους τους χρόνους. Στην καλλιέργεια του υλικού Biodentine, στις 48h καταγράφεται μεγάλη αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας. Παρατηρείται επίσης αυξημένη παρουσία νεκρών κύτταρων (κόκκινο χρώμα) στις 24h και κυρίως στις 48h επώασης, ενώ καταγράφεται σταθεροποίηση του κυτταρικού πληθυσμού στις 72h επώασης (πράσινο χρώμα).



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από δοκίμια της ομάδας Biodentine σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 24h (αριστερά), 48h (μέσον) και 72h (δεξιά) παραμονής στο θρεπτικό υλικό. (Μεγέθυνση 10x).



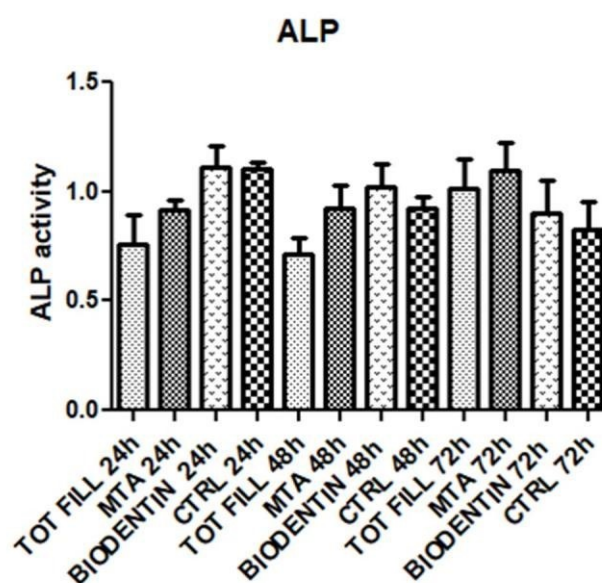
Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από δοκίμια της ομάδας MTA σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 24h (αριστερά), 48h (μέσον) και 72h (δεξιά) παραμονής στο θρεπτικό υλικό. (Μεγέθυνση 10x).

Στον πίνακα 2 και την εικόνα 9 καταγράφεται αριθμητικά και διαγραμματικά η οστεογενετική διαφοροποίηση των υλικών και του μάρτυρα συναρτήσει του χρόνου. Γίνεται εμφανές ότι το Total Fill παρουσιάζει τη μέγιστη οστεογενετική διαφοροποίηση μετά από 72h καλλιέργειας με στατιστικά σημαντική διαφορά από τις τιμές που καταγράφονται μετά από 24h και 28h καλλιέργειας ($P=.0051$), ενώ δεν καταγράφεται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τα άλλα δύο υλικά και την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 2. Μέσες τιμές και σταθερές αποκλίσεις οστεογενετικής διαφοροποίησης των κυττάρων.

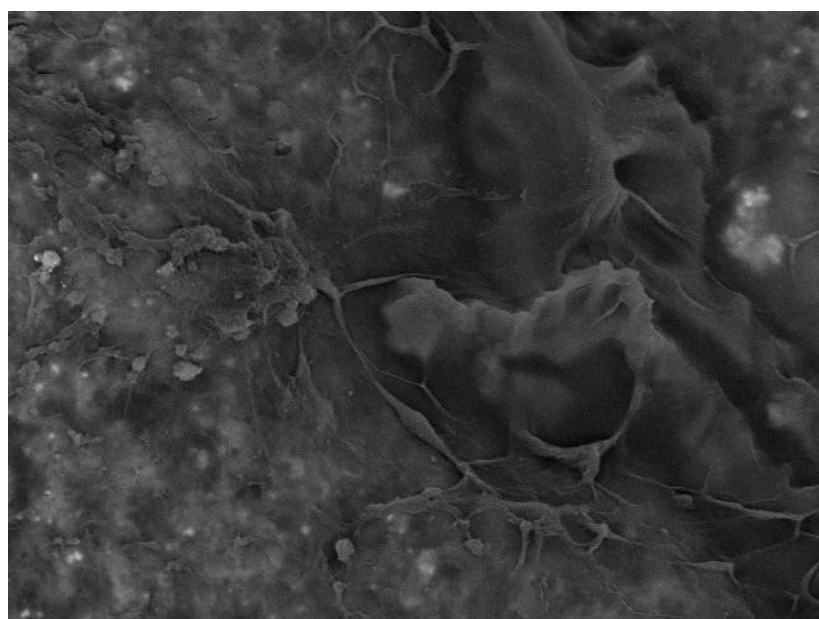
ΥΛΙΚΑ	ΔΡΑΣΗ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ		
	24h	48h	72h
TOTAL FILL	0,421±0.2 ^α	0,342±0.1 ^α	0,249±0.2 ^β
MTA	0,596±0.1 ^α	0,781±0.2 ^α	0,797±0.3 ^α
BIODENTINE	0,524±0.08 ^α	0,653±0.1 ^α	0,616±0.2 ^α
CONTROL	0,582±0.01 ^α	0,633±0.02 ^α	0,811±0.4 ^α

Ίδιοι εκθέτες δείχνουν, μη σημαντικά στατιστικά διαφορές ($P>.05$), ενώ διαφορετικοί εκθέτες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<.05$).



Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης των κυττάρων επί των τριών ομάδων υλικών και της ομάδας ελέγχου στη δοκιμασία MTT, μετά από καλλιέργεια για 24h, 48h και 72h.

Στις εικόνες 10, 11, 12 και 13 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά δείγματα του ποιοτικού προσδιορισμού της βιοσυμβατότητας των οστεοβλαστών στα διάφορα εξεταζόμενα υλικά.

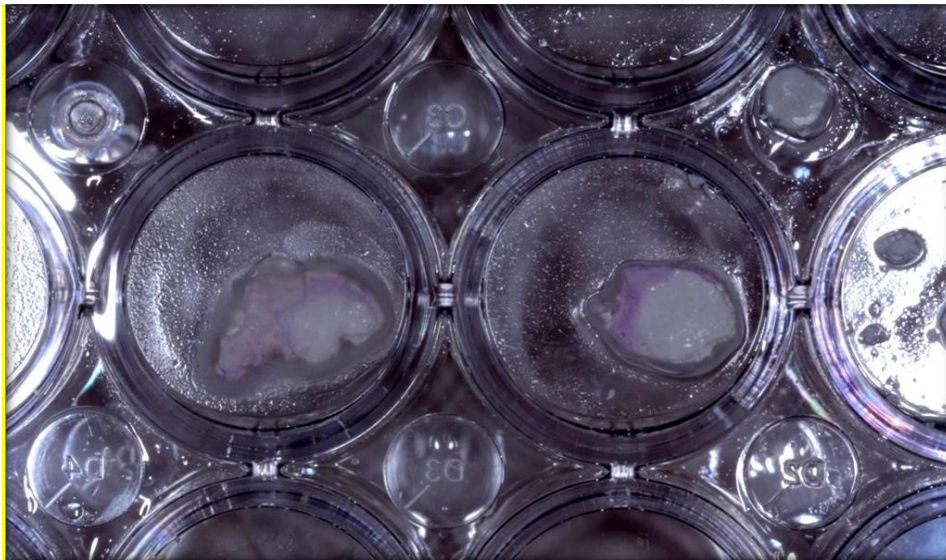


Test0694 2017/02/03 NL D8.5 x2.0k 30 μm
Hitachi TM3030Plus

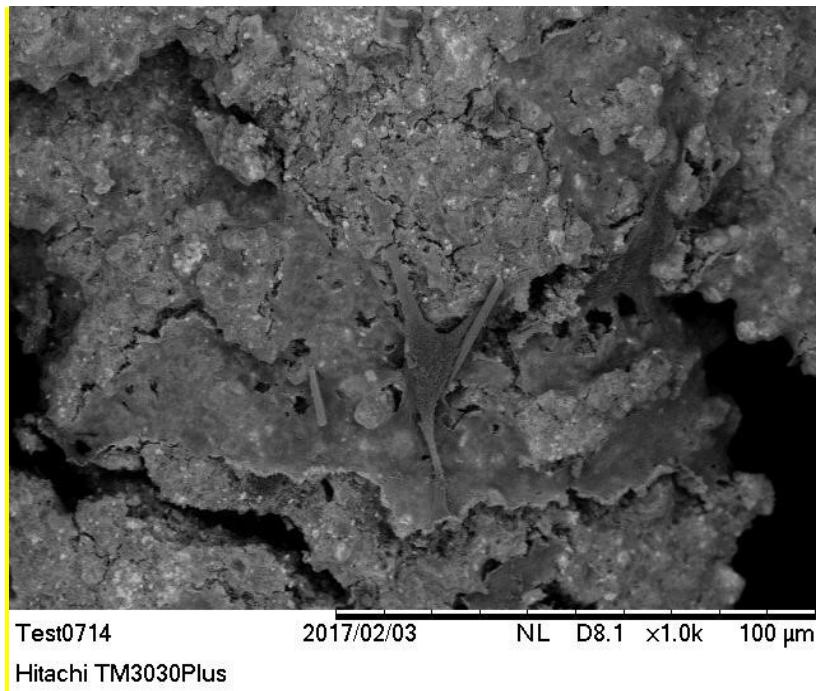
Εικόνα 10. Μικροφωτογραφία από το ΗΜΣ για το δείγμα Total Fill (1000x), το οποίο έχει καλλιεργηθεί για 48h με πρώιμους οστεοβλάστες σε ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.

Από τις μικρογραφίες που προέκυψαν από την παρατήρηση των δειγμάτων στο ΗΜΣ είναι εμφανές ότι στο υλικό Total Fill τα κύτταρα MG63 έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού διατηρώντας την τυπική μορφολογία αυτής της κυτταρικής σειράς. Δεν υπάρχουν δείγματα καταπόνησης των κυττάρων στην προσπάθειά τους να αποικήσουν το υλικό αντιθέτως δείχνουν να βρίσκονται σε ένα φιλικό προς αυτά περιβάλλον. Η ίδια η επιφάνεια του υλικού φαίνεται να είναι ομοιογενής με μια συνέχεια πόρων τέτοια που να επιτρέπει όχι μόνο την προσκόλληση των κυττάρων αλλά και την μεταξύ τους επικοινωνία μέσω των

κυτταροπλασματικών προεκτάσεων που αναπτύσσονται κατά την επαφή τους με αυτήν. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύεται και από την εικόνα που έδωσαν τα κύτταρα κατά την ανίχνευση της αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού. Τα άλατα του τετραζολίου δεν είχαν περιοριστεί μόνο στην επιφάνεια του Total Fill. Τα κύτταρα είχαν διαπεράσει όλο το υλικό και με την επαφή των αλάτων του τετραζολίου με την ισοπροπανόλη φάνηκαν έντονα «στεφάνια» φορμαζάνης και στον πυθμένα του τρυβλίου, όπου βρισκόταν προσκολλημένο το υλικό σε αντίθεση με τα υλικά MTA και Biodentine, όπου η μικροδιείσδυση ήταν περιορισμένη.

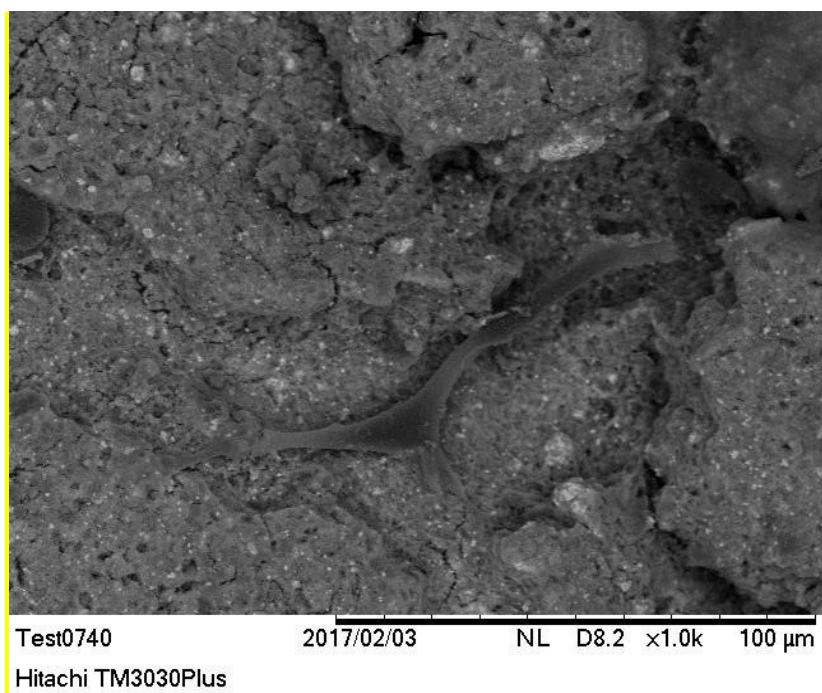


Εικόνα 11. Τρυβλίο καλλιέργειας το οποίο φέρει το υλικό Total Fill και στο οποίο έχει γίνει το MTT test. Στην εικόνα φαίνεται η κάτω επιφάνεια του τρυβλίου στην οποία παρατηρούμε ότι τα κύτταρα έχουν διαπεράσει πλήρως το υλικό με αφετηρία την άνω επιφάνεια του.



Εικόνα 12. Μικροφωτογραφία από το ΗΜΣ για το δείγμα ΜΤΑ (1000x), το οποίο έχει καλλιεργηθεί για 48h με πρώιμους οστεοβλάστες σε ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.

Στην περίπτωση του υλικού ΜΤΑ (Εικ. 12) η επιφάνεια του υλικού είναι ανομοιογενής και παρουσιάζει μεγάλα κενά, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να πρέπει να καταβάλλουν προσπάθεια κατά την διαδικασία της προσκόλλησης. Αυτό έχει αντίκτυπο στον μεταβολισμό τους με αποτέλεσμα να έχουν πολλαπλασιαστεί και διαφοροποιηθεί λιγότερο σε σχέση με αυτά που ήρθαν σε επαφή με το Total Fill. Μια παρόμοια κατάσταση παρουσιάζει και η επιφάνεια του Biodentine (Εικ. 13) όπου παρατηρούνται λίγα και καταπονημένα κύτταρα.



Εικόνα 13. Μικροφωτογραφία από το ΜΣ για το δείγμα Biodentine (1000x), το οποίο έχει καλλιεργηθεί για 48h με πρώιμους οστεοβλάστες σε ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η μηδενική υπόθεση εργασίας διότι το υλικό Total Fill επέδειξε βιοσυμβατότητα, δεν παρουσίασε κυτταροτοξική συμπεριφορά για όλα τα χρονικά διαστήματα που ελέγχθηκε, ενώ έδειξε και οστεογενετικές ιδιότητες.

Στη διαθέσιμη, μέχρι τη συγγραφή αυτής της μελέτης, βιβλιογραφία, δεν καταγράφηκε κάποια πειραματική εργασία με την εμπορική ονομασία του υλικού Total Fill, αλλά υπάρχει ένα σύνολο δημοσιευμένων εργασιών του ίδιου υλικού με την εμπορική ονομασία Endosequence Root Repair Material (ERRM). Οι έρευνες με το ERRM αφορούν αυτογενείς

μελέτες, αλλά κυρίως συγκρίσεις με παρόμοια υλικά, όσο αναφορά τη βιοσυμβατότητα τους, την κυτταροτοξικότητα τους, την οστεογενετική τους δραστηριότητα και άλλες ιδιότητες, όπου χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των παραπάνω διάφορες κυτταρικές σειρές (Alanezi και συν. 2010, Alsalleeth και συν. 2014, Alsubait και συν. 2016, Bordumlu 2008, Charland και συν. 2013, Debelian και Trope 2016)

Δύο χαρακτηριστικές μελέτες, οι οποίες προσομοιάζουν με την παρούσα έρευνα και με τις οποίες μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι των Alanezi και συν. (2010) και των Ma και συν. (2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αναφορά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του υλικού Total Fill, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Alanezi και συν. (2010) στην οποία το αντίστοιχο υλικό ERRM χρησιμοποιήθηκε σε σειρά κυτταροκαλλιέργειών L929 (ινοβλάστες μυών) και μετά από 24h καλλιέργειας ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα με τη μέθοδο MTT. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα μεταξύ του ERRM και του υλικού MTA.

Την καλή συμπεριφορά του υλικού ERRM κατέγραψαν σε μελέτη τους οι Ma και συν.

(2010), οι οποίοι το συνέκριναν μάλιστα με το υλικό MTA διαπιστώνοντας παρόμοια συμπεριφορά του σε καλλιέργειες σε ανθρώπινους ουλικούς ινοβλάστες, τόσο όσον αφορά τη βιωσιμότητα των κυττάρων με τη μέθοδο MTT όσο και στον έλεγχο της προσκόλλησής τους με παρατήρηση σε ΗΜΣ. Τα αποτελέσματα αυτά, αλλά και οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν στην επιφάνεια των βρίσκονται σε πλήρη αρμονία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης για το υλικό Total Fill.

Την χρήση των ανθρώπινων πρώιμων οστεοβλαστών της κυτταρικής σειράς MG63 τόσο για τα οδοντιατρικά βιοϋλικά, όσο και τα ορθοπεδικά έχουν επισημάνει πολλοί ερευνητές (Rad και συν. 2017, Ciasca και συν. 2012).

Την κυτταροτοξικότητα και τη δράση της ALP του ERRM εξέτασαν οι Modareszadeh και συν. (2012) σε κύτταρα που προσομοιάζουν με οστεοβλάστες, σε σύγκριση με το MTA. Οι ερευνητές κατέγραψαν μείωση της βιοενεργότητας και της ALP δράσης μετά από έκθεση στο ERRM για όλα τα χρονικά διαστήματα και για τις δύο συνθέσεις, ενώ η συμπεριφορά του MTA δεν άλλαξε αυτές τις δύο παραμέτρους των κυττάρων. Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων αυτών σε σχέση με άλλους ερευνητές, αλλά και με τα αποτελέσματα της μελέτης μας για το υλικό Total Fill, μπορεί να αποδοθεί στις ιδιαίτερες συνθήκες εκτέλεσης των πειραμάτων στην προαναφερθείσα μελέτη.

Ερευνητική εργασία στην οποία εξετάστηκε η επίδραση των και MTA σε συνδετικό ιστό ποντικών είναι η εργασία του Taha (2016), όπου διαπιστώθηκε ότι το υλικό ERRM ήταν περισσότερο ερεθιστικό από το MTA και το δείγμα αναφοράς για έκθεση 1 και 3 εβδομάδων στους ιστούς, ενώ επέδειξε περισσότερο βιοσυμβατή συμπεριφορά μετά τις 6 εβδομάδες έκθεση.

Η ποιοτική συμπεριφορά των βιοϋλικών απέναντι και σε επαφή με τους κυτταρικούς πληθυσμούς που τους «φιλοξενούν» εν πολλοίς αποδεικνύεται τόσο από τον απρόσκοπτο πολλαπλασιασμό τους, συναρτήσει του χρόνου, αλλά όσο και από την ποιότητα και τις ιδιότητες αυτών καθ' αυτών των κυττάρων. Η τελευταία καταδεικνύεται από εικόνες υψηλής ευκρίνειας και σχετικά υψηλής ανάλυσης σε ΗΜΣ, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Τα στοιχεία τα οποία αξιολογούνται από τις παρατηρήσεις αυτές συνοψίζονται στην διατήρηση της τυπικής μορφολογίας των κυττάρων, όπως αυτή καταγράφηκε στην κυτταρική σειρά πριν οποιαδήποτε επαφή με υλικό ή προϊόν του, στην παρουσίαση καταπόνησης τους και από τη δυνατότητά τους να διεισδύουν και να προσκολλώνται αποτελεσματικά σε βιοικριώματα (Tziourvas και συν. 2016).

Από την παρατήρηση των δειγμάτων του υλικού Total Fill στο ΗΜΣ είναι εμφανές ότι τα κύτταρα της σειράς MG63 που ήλθαν σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού διατήρησαν την

τυπική μορφολογία της σειράς. Η παρατηρηθείσα δομή των άωρων οστεοβλαστών δεν κατέγραψε δείγματα καταπόνησης των κύτταρων στην προσπάθεια τους να αποικήσουν το υλικό, ενώ τα τελευταία φαίνεται να είναι καλά προσκολλημένα στο υλικό και κυρίως να έχουν διεισδύσει μέσα σε αυτό, σε βαθμό που να ενώνονται μεταξύ τους οι κυτταροπλασματικές τους προεκτάσεις. Στο συγκεκριμένο πείραμα αυτό που εντυπωσιακά καταγράφηκε ήταν ότι τα κύτταρα είχαν διαπεράσει όλο το υλικό Total Fill, σε αντίθεση με ότι καταγράφηκε για τα άλλα δύο υλικά που ελέγχθηκαν, γεγονός που αποδεικνύει ότι το υλικό Total Fill διαθέτει υψηλή διαπερατότητα, άρα υψηλό εκατοστιαίο ποσοστό και κατάλληλη κατανομή πορώδους.

Όσον αφορά την βιοενεργότητα του βιοκεραμικού ERRM σε μελέτη (Shokouhinejad και συν. 2012) κατά την οποία έγινε βύθιση οδοντικών τομών που είχαν εμφραχθεί με το υλικό αυτό, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος για 1 εβδομάδα και για 2 μήνες αποκαλύφθηκε ότι δημιουργήθηκαν σύμπλοκα απατίτη, τα οποία ήταν περισσότερα όσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος παραμονής των δοκιμίων στο διάλυμα, επιβεβαιώνοντας την βιοενεργότητα του υλικού, στοιχείο το οποίο είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης. Την οστεγενετική ικανότητα του υλικού ERRM εξέτασαν σε μελέτη τους οι Machado και συν. (2016), σε πολφικά κύτταρα χρησιμοποιώντας μεταξύ των άλλων και τη μέθοδο καταγραφής των ποσοστών της ALP. Από τα αποτελέσματα της έρευνας συνάγεται ότι το ERRM είχε παρόμοια συμπεριφορά με το MTA όταν καλλιεργήθηκαν σε πολφικά κύτταρα.

Οι Miller και συν. (2017) εξέτασαν τα υλικά ERRM, MTA και Biodentine σε βλαστικά κύτταρα και σε επαφή με δίσκους οδοντίνης για να ελέγχουν τις αναγεννητικές τους ιδιότητες. Τα υλικά ERRP-P και Biodentine πέτυχαν γρηγορότερη βιωσιμότητα των βλαστικών κυττάρων της ακρορριζικής θηλής, η διαφοροποίηση σε ασβεστοποιό φαινότυπο

αυξήθηκε από όλα τα βιοκεραμικά υλικά, το MTA προώθησε την οστεογενετική συμπεριφορά των κυττάρων, ενώ το ERRM και το Biodentine προώθησαν την οδοντοβλαστική συμπεριφορά τους. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη αρμονία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης για το υλικό Total Fill.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς της παρούσης εργαστηριακής μελέτης συνάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

Το βιοκεραμικό υλικό Total Fill επέδειξε σταθερά αυξανόμενη κυτταρική βιωσιμότητα συναρτήσει του χρόνου με μικρή μειούμενη ελεγχόμενη κυτταροτοξικότητα παρόμοια με αυτή την οποία επέδειξε το καταξιωμένο για την ίδια χρήση υλικό MTA. Ιδιαίτερα για τα χρονικά διαστήματα από τις 24 έως τις 72 ώρες, το υλικό Total Fill παρουσίασε αριθμό κυττάρων στατιστικά σημαντικότερο ($P=.002$) από αυτόν που παρουσίασαν τα υλικά MTA και Biodentine. Επίσης το υλικό Total Fill αποδίδει την μέγιστη οστεογενετική του δραστηριότητα μέσα στο πρώτο 24h από τη στιγμή της χρήσης του, σε αντίθεση με τα βιοϋλικά MTA και Biodentine τα οποία την αποδίδουν μέσα στο πρώτο 48h.

Από την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φάνηκε ότι τα κύτταρα MG63 διατήρησαν την τυπική τους μορφολογία στο υλικό Total Fill χωρίς εμφανή παρουσία καταπονημένων (stressed) κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό τους, σε σχέση με τα υπόλοιπα υπό εξέταση υλικά.

Τα επίπεδα ALP δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στους εφαρμοζόμενους χρόνους ανάμεσα στα εξεταζόμενα υλικά. Η μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά καταγράφηκε για το Total Fill ανάμεσα στις 24 και 72 ώρες της καλλιέργειας ($P=.0051$).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα μεγάλα προβλήματα της ενδοδοντικής θεραπείας είναι η ερμητική απόφραξη του ακρορριζίου των δοντιών με τη χρήση υλικών τα οποία ταυτόχρονα με την ιδιότητα αυτή να είναι βιοσυβατά χωρίς τοξικές επιπτώσεις αλλά και με ιστογενετικές επιδράσεις στους κυτταρικούς σχηματισμούς με τους οποίους θα έλθουν σε επαφή. Τις τελευταίες δεκαετίες καταβάλλεται μια μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη τέτοιων υλικών με σημαντικότερη και αποτελεσματικότερη την ανάπτυξη του υλικού MTA, το οποίο βελτίωσε ουσιαστικά τις απαιτήσεις που περιγράφηκαν παραπάνω για μια ερμητική και βιολογικά ενεργή απόφραξη του ακρορριζίου των δοντιών. Το υλικό αυτό κατοχυρωμένο πλέον από πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες αλλά και τη μακροχρόνια πλέον κλινική εφαρμογή, βελτίωσε κατά πολύ την αποτελεσματικότητα των υλικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά το παρελθόν για την απόφραξη του ακρορριζίου των δοντιών.

Οι προσπάθειες εξέλιξης των υλικών όμως δεν σταμάτησαν. Τα τελευταία χρόνια σύγχρονα σκευάσματα υλικών έμφραξης και απόφραξης των ριζικών σωλήνων και του ακρορριζίου προωθήθηκαν στην οδοντιατρική αγορά από εταιρείες του χώρου σαν απόρροια μακροχρόνιας στοχευμένης έρευνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσέλκυσαν τα βιοκεραμικά υλικά. Ένα από τα υλικά αυτά είναι και το βιοκεραμικό Total Fill, της εταιρείας FKG Dentaire S, το οποίο προορίζεται για την ανάστροφη έμφραξη ακρορριζίου, επιδιόρθωση

διατρήσεων ρίζας και απορροφήσεων, ακρορριζοποίηση, άμεση κάλυψη πολφού και πλήρωση μικρών οστικών ελλειμμάτων.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η βιοσυμβατότητα καθώς και η κυτταροτοξικότητα του υλικού αυτού με μάρτυρες αναφοράς δύο γνωστά και κατοχυρωμένα από πολλές ερευνητικές μελέτες και την πολυετή τους κλινική χρήση ανάλογα βιοϋλικά, το MTA και το Biodentine.

Για τον έλεγχο της βιοσυμβατότητας έγιναν κυτταροκαλλιέργειες των προαναφερθέντων υλικών σε άωρους ανθρώπινους οστεοβλάστες της σειράς MG63, οι οποίοι βρίσκονταν στο 4ο στάδιο ανακαλλιέργειας, σε συνθήκες σύμφωνα με το ISO 10993-5:2009(E). Παράλληλη καλλιέργεια των προαναφερθέντων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Όλες οι κυτταρικές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν για 24h, 48h και 72h. Μετά την ολοκλήρωση της ανακαλλιέργειας έγινε διασπορά των κύτταρων σε πλάκα Neubauer, όπου μετρήθηκαν σε ενδεικτικά τεταρτημόρια στο οπτικό μικροσκόπιο, και έγινε αναγωγή του αριθμού τους για ολόκληρη την επιφάνεια της πλάκας.

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας, τα βιοϋλικά υποβλήθηκαν σε δοκιμασία MTT και χρώση με FDA και PI .

Επίσης έγινε έλεγχος της ικανότητας οστικής διαφοροποίησης των κυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν στα δοκίμια των υπό εξέταση βιοϋλικών, χρησιμοποιώντας έναν από τους πρωταρχικούς βιοχημικούς δείκτες οστικής διαφοροποίησης την αλκαλική φωσφατάση (ATP). Τέλος έγινε ποιοτικός προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε η ικανοποιητική βιοσυμβατότητα του εξεταζόμενου βιοκεραμικού Total Fill, η οποία ήταν παρόμοια με αυτή των κατοχυρωμένων βιοϋλικών MTA και Biodentine, αυξανόμενη βιωσιμότητα συναρτήσει του χρόνου επώασης και μικρή ελεγχόμενη κυτταροτοξικότητα, ανάλογη των άλλων εξετασθέντων υλικών. Τέλος η μέγιστη οστεογενετική δράση του Total Fill καταγράφηκε μέσα στο πρώτο 24h από την έναρξη της

επώασης με κατιούσα απόδοση συναρτήσει του χρόνου, ενώ για τα άλλα συνεξεταζόμενα υλικά η μέγιστη απόδοση έγινε στις 48h και στη συνέχεια σταθεροποιήθηκε.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι το νέο βιοκεραμικό υλικό Total Fill επέδειξε εξαιρετική βιοσυμβατότητα παρόμοια με αυτή την οποία επέδειξαν τα καταξιωμένα για την ίδια χρήση υλικά MTA και Biodentine είχε κυτταρική βιοσυμβατότητα συναρτήσει του χρόνου με μικρή μειούμενη ελεγχόμενη κυτταροτοξικότητα και αποδίδει την μέγιστη οστεογενετική του δραστηριότητα μέσα στο πρώτο 24h από τη στιγμή της χρήσης του, σε αντίθεση με τα βιοϋλικά MTA και Biodentine τα οποία την αποδίδουν μέσα στο πρώτο 48h.

SUMMARY

In vitro evaluation of the bioactivity and cytotoxicity of a new bioceramic material for endodontic use

Chara Papadopoulou

Dentist-Post graduate student in Endodontics

One of the main problems in endodontic therapy is the absolute sealing of the foramen of teeth using biocompatible and non toxic materials which can simultaneously to act as tissue regenerated for the tissues with which they come in contact.

Last two decades a huge research effort had been addressed to develop such materials the most effective of which was the development of MTA material. MTA substantially improve all the above demands for a successful and biological active appendix sealing of endodontically treated teeth. This material globally accepted due to the multiple research studies, but also from its long term clinical use, has improved the effectiveness of the materials used for tooth foramen sealing.

Evolution of endodontic materials is a non-stopped procedure. Latest years, contemporary commercial filling and sealing of root canals and foramen endodontic products introduced in the dental market as a long term targeted experimental result. One of these new products is the bioceramic material under the trade mark Total Fill, of FKG Dentaire S Company, which use is oriented to reverse filling of foramen, for repairing perforated roots and root absorptions, for radical section, immediate the covering of pulp and as small bone defects filling material.

In present study the bioavailability and the cytotoxicity of Total Fill was tested in comparison with two well-known and well documented similar commercial bioceramic materials, MTA and Biodentine.

To test bioavailability cell cultures of the above mentioned materials were performed using premature human osteoblasts of line MG63, which were in the 4th stage of re-cultivation, in conditions according with ISO 10993-5:2009(E). As control group received the cultivation of the MG63 cells in nutritious medium. All cell cultures made for 24h, 48h and 72h respectively. After the of cultivation time the number of proliferated cells was counted in the

optical microscope, after dispersion in a Neubauer plaque, recording the cells of indicative quadrants and making the induction in the number of cells for all the plaque surface.

For cytotoxicity test the biomaterials were submitted in MTT assay and FDA and PI colouring processes.

Also a test of the ability for bone differentiation of osteoblasts cultivated on the tested biomaterials was performed, using one of the primary biochemical indexes of bone differentiation.

At the end a qualitative determination of the cellular viability was made, using scanning electron microscopy.

Conclusively within the limitations of this *in vitro* study the new bioceramic material Total Fill bioceramic material displayed excellent bioampatibility. In particular there was a statistical significant increase ($P=.002$) of the cell number of Total Fill, compared to both MTA and Biodentine, from the 24h to the 72h. However no significant differences of the cell population have been at the 48h and 72h respectively.

From the observation of SEM micrographs, it is evident that in the Total Fill bioceramic material the MG63 cells maintain their typical morphology. Additionally, there are no signs of stressed cells during their effort to populate the material, in contrast to the others examined materials.

ALP levels presented no statistical significant differences among the implemented time points for all the tested materials. The only statistical significant increase was recorder for Total Fill between 24h and 72h of culture ($P=.0051$).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg L, Zhu Q.** Cytotoxicity evaluation of ERRM. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: e122-e125.
- 2. Al-Haddad AY, Kutty MG, Abu Kasim NH, Ab Aziz ZAC.** The effect of moisture conditions on the constitution of two bioceramic root canal sealers. *J Dent Scie* 2017; 12: 340-346.
- 3. Al-Sa'eed OR, Al-Hiyasat AS, Darmani H.** The effect of six root-end materials and their leachable components on cell viability *JOE* 2008; 34: 1410-1414.

4. **Alsalleeth F, Chung N, Stephenson L.** Antifungal of Endosequence root repair material and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2014; 40(1): 1815-1819.
 5. **Alsubait S, Al-Haidar S, Al-Saryan N.** A comparison of the discoloration potential for Endosequence bioceramic root repair material fast set putty and proroot MTA in human teeth: an in vitro study. *J Esthet Rest Dent* 2016; 29(1): 59-67.
 6. **Agrafioti A, Tzipoulas N, Chatzithoeodoridis E, Kontakiotis E.** Comparative evaluation of sealing ability and microstructure of MTA and Biotendine after exposure to different environments. *Clin Oral Invest* 2016; 20: 1535-1540.
 7. **[Almeida LHS](#), [Moraes RR](#), [Morgental RD](#), [Pappen FG](#).** [Are premixed calcium silicate-based endodontic sealers comparable to conventional materials? A systematic review of in vitro studies.](#) *JOE* 2017; 43: 527-535.
 8. **Antunes H, Gominho L, Andrade-Junior C, Dessaune-Neto N, Rocas I, Siquera J.** Sealing ability of two root-end filling materials in a bacterial nutrient leakage model. *Int Endod J* 2016; 49: 960-965.
-
9. **Aqrabawi J.** Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *British Dent J* 2000; 188: 266 – 268.
 10. **Arvaniti IS, Khabbaz MG.** Influence of root canal taper on its cleanliness: a scanning electron microscopic study. *J Endod* 2011; 37: 871-874.
 11. **Asgary A, Eghbal MJ, Parirokh M.** Sealing ability of a novel endodontic cement as a root-end filling material. *J Biomed Mater Res Part A*. 2008; 87A: 706–709.
 12. **Asgarya S, Ehsani S.** MTA resorption and periradicular healing in an open-apex incisor: A case report. *Saudi Dent J* 2012; 24(1): 55–59.
 13. **Asrari M, Lobner.** In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials. *J Endod* 2003; 29: 743-746.

14. **Beltes P, Koulaouzidou E, Kotoula V, Kortsaris AH.** In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 245-249.
15. **Benezra MK, Wismayer PS, Camilleri J.** Influence of environment on testing of hydraulic sealers. *Scie Reports* 2017; doi:10.1038/s41598-017-17280-7.
16. **Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, REit C.** *Textbook of Endodontology.* Wiley-Blackwell, Second Ed. 2010.
17. **Bordumlu E.** Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. *Aust Endod J.* 2008; 34: 30-35.
18. **Candeiro GT1, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G.** Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod* 2012; 38(6): 842-845.
19. **Camilleri J.** Will bioceramics be the future root canal filling materials? *Curr Oral Health Rep* 2017; 4: 228-238.
20. **Camilleri J, Pitt Ford T.** Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006; 39(10): 747-754.
21. **CE 0470.** Certificate of conformity with European directive for the production quality of medical devices. Certificate: EU0807405, Order No.: 107856
22. **Charland T, Hartwell G, Hirschberg C, Patel R.** An evaluation of setting time of mineral trioxide aggregate and endosequence root repair material in the presence of human blood and mineral essential media. *J Endod* 2013; 39(80): 1071-1074.
23. **Ciasca M, Aminosharae A, Jin G, Montagnese T, Mickel A.** A comparison of the cytotoxicity and pointinflammatory cytokine production of Endosequence root repair material and Proroot mineral trioxide aggregate in human osteoblastic culture using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *JOE* 2012; 38(4): 486-489.

24. **Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM.** Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and Endosequence bioceramic root repair materials. *J Endod* 2011; 37: 372-375.
25. **Debelian G, Trope M.** The use of premixed bioceramic materials in endodontics. *Giornale Italiano di Endodonzia* 2016; 30: 70-80.
26. **De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM.** Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod.* 2009; 35(10): 1387-1390.
27. **Diamanti E, Mathieu S, Jeanneau C, Kitraki E, Panopoulos P, Spyrou G, About I.** Endoplasmic-reticulum stress and mineralization inhibition mechanism by resinous monomers. *Int Endod J* 2013; 46: 160–168.
28. **Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D.** Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *Int Endod J* 2003; 36: 44–48.
29. **Eldeniz A-U, Hadimli H-H, Ataoglu H, Ostravik D.** Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *JOE* 2006; 32(4): 345-349.
30. **Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J.** Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrometry* 2001; 12(6): 707-715.
31. **Farrugia C, Baca P, Camilleri J, Arias Moliz MT.** Antimicrobial activity of ProRoot MTA in contact with blood. *Sci Reports* 2017; doi:10.1038/s41598-01717280-7.
32. **Garle MJ, Fentem JH, Fry JR.** In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. *Toxicology in vitro* 1994; 8 (6): 1303-1312.

- 33. Goseki T, Iwasawa T, Shimizu N, Abiko Y.** Effects of in vitro cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 1996; 91(3):171-183.
- 34. Grossman LI.** Endodontics 1776-1996: a bicentennial history against the background of general dentistry. *JADA* 1976; 93: 78-87.
- 35. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M.** In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 249-53.
- 36. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M.** Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J* 1994; 27: 139-143.
- 37. [Guimarães BM, Vivan RR, Piazza B, Alcalde MP, Bramante CM, Duarte MAH.](#)** Chemical-physical Properties and Apatite-forming Ability of Mineral Trioxide Aggregate Flow. *J Endod* 2017; 43(10): 1692-1696.
- 38. Hansen SW, Marshall JG, Sedgley CM.** Comparison of intracanal Endosequence Root Repair Material and Pro Root MTA to induce pH changes in simulated root resorption defects over 4 weeks in matched pairs of human teeth. *J Endod* 2011; 37: 502-505.
- 39. Hauman C.H.J, Love R.M.** Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36: 75-85.
- 40. Hirschberg CS, Patel NS, Patel LM, Kadouri DE, Hartwell GR.** Comparison of sealing ability of MTA and Endosequence bioceramic root repair material: a bacterial leakage study. *Quintessence Int.* 2013; 44(5): 157-162.
- 41. Iordanoglou E, Panopoulos P, Nakou M.** In vivo antibacterial effect of calcium hydroxide and camphorated paramonochlorophenol. *Int Endod J* 1998; 31: 198-199.

- 42. ISO 10993-6.** Biological evaluation of medical devices- Part 6: Tests for local effects after implantation. 2nd edition. Geneva 2007.
- 43. Jeevani E, Jayaprakash T, Bolla N, Vemuri S, Sunil CR, Kalluru RS.** Evaluation of sealing ability of MM-MTA, Endosequence and biodentine as furcation repair materials: UV spectrometric analysis. *J Conserv Dent* 2014; 17(4): 340-343.
- 44. Jiang Y, Zheng Q, Zhou X, Gao Y, Huang D.** A comparative study on root canal repair materials: A cytocompatibility assessment in L929 and MG63 cells. *The Scie World J*, 2014; DOI 10.1155/2014/463826..
- 45. Καρούσης Ι.** Επίδραση της ακτινοβολίας στη βιολογική συμπεριφορά των οστεοβλαστών που καλλιεργούνται σε επιφάνειες τιτανίου. Ερευνητική Μονογραφία. Αθήνα 2015.
- 46. Κατσαούνου Κ, Τάκη Ε, Ζουμπουρλής Β.** Η χρήση των βλαστικών κυττάρων στη δημιουργία μοντέλων τοξικότητας φαρμακευτικών ουσιών. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2016; 33(1):8-21.
- 47. Khabbaz M, Serefoglou M.** The application of buccal object rule for the determination of calcified root canals. *Inter Endod J* 1996; 29: 284-287.
- 48. Khabbaz M, Papadopoulos P.** Deposition of calcified tissue around an overextended gutta-percha cone: case report. *Inter Endod J* 1999; 32: 232-235.
- 49. Khabbaz MG, Kerezoudis NP, Aroni E, Tsatsas V.** Evaluation of different methods for the root-end cavity preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 237-242.
- 50. Khabbaz MG, Protogerou E, Douka E.** Radiographic quality of root fillings performed by undergraduate students. *Int Endod J* 2010; 43: 499-508.

- 51. Koçak S, Erten H, Baris E, Türk S , Alaçam T.** Evaluation of the biocompatibility of experimentally manufactured portland cement: An animal study. *J Clin Exp Dent* 2014; 6(10): e17-21.
- 52. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F.** Mineral Trioxide Aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 432–439.
- 53. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M.** Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998; 24: 543–547.
- 54. Kontakiotis E, Chaniotis A, Georgopoulou M.** Fluid filtration evaluation of 3 obturation techniques. *Quintessence international* 2007; 38(7): 410-416.
- 55. Kontakiotis E, Georgopoulou M, Nakou M.** In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide in the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J* 1995; 28: 285-289.
- 56. Kontakiotis EG, Georgopoulou MK, Morfis AS.** Dye penetration in dry and waterfilled gaps along root fillings. *Int Endod J* 2001; 34(2): 133-136.
- 57. Kontakiotis E, Lagoudakos T, Georgopoulou M.** The influence of root-end resection and root-end cavity preparation on microleakage of root filled teeth in vitro. *Int Endod J* 2004; 37(6): 403-407.
- 58. Kontakiotis EG, Wu MK, Wesselink PR.** Effect of sealer thickness on long-term sealing ability: a two years follow-up study. *Int Endod J* 1997; 30: 307-312.
- 59. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH.** Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide–eugenol cement, and glass– ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod* 2005; 31: 44–46.

- 60. Lagisetti AK, Hedge P, Hedge MN.** Evaluation of bioceramics and zirconia reinforced glass ionomer cement in repair of furcation perforations: An *in vitro* study. 2018; 21(2): 184-189.
- 61. Lovato KF, Sedgley CM.** Antibacterial Activity of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2011; 4: 1–5.
- 62. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR.** Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. Endod 2011; 37(5): 673-677.
- 63. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M.** Biocompatibility of two novel root repair materials. Endod 2010; 37(6): 793-798.
- 64. Machado J, Johnson J, Paranjpe A.** The effects of Endosequence root repair material on differentiation of dental pulp cells. JOE 2016; 2(1): 101-105.
- 65. Malhotra N, Agarwal A, Mala K.** Mineral Trioxide Aggregate: A Review of Physical Properties. Compendium 2013; 34(2): e25-32.
- 66. Μελίτου ΠΔ, Ιντζές ΛΔ.** Εναλλακτικά υλικά στην ενδοδοντική έμφραξη. Ελλ Στομ Χρον 2014; 58: 61-78.
- 67. Millan HL.** Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine ...Wiley CA 2006.
- 68. Miller AA, Takimoto K, Wealeans J, Diogenis A.** Effect of 3 bioceramic materials on stem cells of the apical papilla proliferation and differentiation using a dentin disk model. J Endod 2017; 44(4): 599-603.
- 69. Mitchell PC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F.** Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. Biomaterials 1999; 20: 167–173.

- 70. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N.** Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod* 2012; 38(8):1101-1015.
- 71. Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55–63.
- 72. Murray P, Godoy GG, Godoy FG.** How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12: 258-266.
- 73. Nair U, Ghattas S, Saber M, Natera M, Walker C, Pileggi R.** A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faesalis*. 2011; 112(2): e74-e77.
- 74. Nekoofar MH, Adusei G, Sheykhrezae MS, Hayes SJ, Bryant ST, Dummer PMH.** The effect of condensation pressure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Inter Endod J* 2007; 40: 453–461.
- 75. Özyürek T, Demiryürek EÖ.** Comparison of the antimicrobial activity of direct pulpcapping materials: Mineral trioxide aggregate-Angelus and Biodentine. *J Conserv Dent* 2016; 19(6): 569-572.
- 76. Παυλίδης Π.** Βιοσυμβατότητα και κοχλιακά εμφυτεύματα. Μελέτη της απόπτωσης του κοχλία. Διδακτορική Διατριβή. Ιατρική Σχολή ΑΠΘ. 2006.
- 77. Phillip’s Science of Dental Materials.** Biocompatibility of Dental Materials. Philadelphia W.B Saunders Company 1996.
- 78. Piazza B, Rivera-Pena ME, Alcalde MP, Vasconcelos BC, Duarte MAH, Moraes IG, Vivan RR.** The influence of humidity on intra-tubular penetration and bond strength of AH 26 and MTA Fillapex: an in vitro study. *Eur Endod J* 2017; doi: 10.5152/ej.2017.17036.

- 79. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP.** Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *JADA* 1996; 127: 1491–1494.
- 80. Rad ED, Mostofi S, Katschnig M, Schmutz P, Pawelkiewicz M, Willumeit-Römer R, Schäfer U, Weinberg A.** Differential apoptotic response of MC3T3-E1 preosteoblasts to biodegradable magnesium alloys in an in vitro direct culture model. *J Mater Sci: Mater Med* 2017; 28:155 DOI 10.1007/s10856-017-5969-5.
- 81. Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P.** Bioceramics in endodontics- a review. *J Instabul Univ Fac Dent* 2017; 51(3): 128-135.
- 82. Saxena P, Gupta Saurabh K, Newaskar V.** Biocompatibility of root-end filling materials: recent update. *Restor Dent Endod.* 2013; 38(3): 119–127.
- 83. Sawa H, Kouike H, Okano H.** Components of the SWI/SNF Complex Are Required for Asymmetric Cell Division in *C. elegans*. *Molecular Cell* 2000; 6 (3): 617-624.
- 84. Schwartz R.S, Mauger M, Clement D.J, Walker III W.** Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *JADA* 1999; 130(7): 967–975.
- 85. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P.** A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 1999; 25: 1–5.
- 86. Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Razmi H, Sajadi S, Davies TE, Saghiri MA, Gorjestani H, Dummer PMH.** Bioactivity of Endosequence Root repair Material and Bioaggregate. *Int Endod J* 2012; 45: 1127-1134.
- 87. Schmalz G, Arenholt Bindslev D.** Biocompatibility of Dental Materials. Springer, Berlin 2009.
- 88. Smith CD, Williams FD.** Biocompatibility of dental materials. Vol. I. CRC Press. Florida 1982.
- 89. Sommer R, Ostrander D, Crowley M.** Clinical Endodontics. W.B. Saunders. Second

- Ed. Philadelphia 1961.
90. **Soundappan S, Sundaramurthy J-L, Raghov S, Natanasabapathy V.** Biodentine versus MTA versus intermediate restorative material for retrograde root-end-filling : An in vitro study. 2014; 11(2): 143-147.
 91. **Stanley RH.** Toxicity testing of dental materials. CRC Press. Florida 1985.
 92. **Stefopoulos S, Tsatsas D, Kerezoudis NP, Eliades G.** Comparative in vitro study of the sealing efficiency of white vs grey ProRoot mineral trioxide aggregate formulas as apical barrier. Dent Traumatol 2008; 24: 207-213.
 93. **Taha N, Safadi R, Alwedaie M.** [Biocompatibility Evaluation of EndoSequence Root Repair Paste in the Connective Tissue of Rats.](#) JOE 2016; 42: 1523-1528.
 94. **Thamaraiselvi T.V, Rajeswari S.** Biological evaluation of bioceramic materials-A review. Trends Biomater Artif Organs. 2004; 18(1): 9-17.
 95. **Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR.** Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995a; 21: 349–353.
 96. **Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR.** Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. JOE 1993; 19 (12): 591–595.
 97. **Tsatsas D, Melliou H, Kerezoudis NP.** Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation. Int Dent J 2005; 55: 133-141.
 98. **Tsiourvas D, Sapalidis A, Papadopoulos T.** [Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries.](#) Materials Today Communications 2016; 7: 59-66.
 99. **Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S.** The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. Inter Endodontic J 2002; 35: 245–254.

100. Vertucci F. Root Canal Morphology and its relationship to endodontic procedures.

Endodontic Topics 2005; 10: 3-29.

101. Wismayer PS, Lung CYK, Rappa F, Cappello F, Camilleri J. Assessment of the interaction of Portland cement-based materials with blood and tissue fluids using an animal model. Scie Reports 2016; doi: 10.1038/srep34547.