

*T. V. Gorlacheva, K. I. Pavlov, T. N. Terekhova*

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ МАТЕРИАЛОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ФИКСАЦИИ БРЕКЕТ-СИСТЕМ

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*В статье представлены результаты исследования цитотоксического действия композитных материалов, используемых для фиксации брекет-систем: Transbond color change adhesive (3M), Heliosit orthodontic (Ivoclar Vivadent), а также адгезива Single bond universal (3M), на культуру клеток кератиноцитов HaCaT.*

*Авторами выявлена значительная цитотоксичность Single Bond Universal (3M) и Transbond plus Color Change adhesive и умеренная цитотоксичность Heliosit Orthodontic на культуру клеток кератиноцитов HaCaT.*

*Согласно полученным результатам авторы подчеркивают необходимость обеспечения ряда мер по минимизации негативного воздействия композитов как на пациента, так и врача-ортодонта.*

**Ключевые слова:** *цитотоксичность композитных материалов для фиксации брекет-систем.*

*T. V. Gorlacheva, K. I. Pavlov, T. N. Terekhova*

## CYTOTOXICITY OF MATERIALS USED FOR FIXING BRACKET SYSTEMS

*The article presents the results of a study of the cytotoxic effect of composite materials used to fix braces: Transbond color change adhesive (3M), Heliosit orthodontic (Ivoclar Vivadent), as well as Single bond universal adhesive (3M), on HaCaT keratinocyte cell culture.*

*The authors revealed significant cytotoxicity of Single Bond Universal (3M) and Transbond plus Color Change adhesive and moderate cytotoxicity of Heliosit Orthodontic on HaCaT keratinocyte cell culture.*

*According to the results obtained, the authors emphasize the need to provide a number of measures to minimize the negative impact of composites on both the patient and the orthodontist.*

**Key words:** *cytotoxicity of composite materials for fixing braces.*

Создание композитных стоматологических материалов и установление существенного улучшения их адгезии к тканям зуба после предварительной обработки эмали фосфорной кислотой способствовало развитию не только терапевтической стоматологии, но и ортодонтии. Благодаря превосходным рабочим, физическим и эстетическим качествам композитных материалов с их помощью осуществляется фиксация несъёмных ортодонтических аппаратов (брекет-системы, небных расширителей), ретейнеров, аттачменов, используемых для фиксации элайнеров [9].

Композит состоит из органической полимерной матрицы, неорганического наполнителя (плавленого и кристаллического кварца, алюмосиликатного и борсиликатного стекла, алмазной пыли), силанов (связывают компоненты материала) и добавок (инициаторов, ингибиторов, стабилизаторов). Органическая матрица представлена метакрилатами: Bis-GMA (бисфенол А глициролметакрилат), UDMA (уретандиметакрилат), TEGMA (триэтиленгликольдиметакрилат), НЕМА (гидроксиэтилметакрилат) и других [1].

Одним из требований, предъявляемых стоматологическим материалам является биосов-

местимость – способность материала выполнять свои функции, не вызывая существенных негативных реакций в организме.

В настоящее время, несмотря на огромную популярность стоматологических композитов, имеется достаточное количество научных работ, авторы которых проявляют озабоченность потенциальной цитотоксичностью и генотоксичностью компонентов композитов [4, 8].

Композиты способны выделять компоненты, оказывающие значительное (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, DMBZ, DMDTA) или умеренное (HEMA, BEMA, CQ, DMPT и DMAPE) цитотоксическое действие, заключающееся в изменении базовых клеточных функций – клеточного метаболизма, морфологии и пролиферации, активности ферментов, синтеза ДНК и РНК. Установлено, что Bis-GMA оказывает значительный эмбриотоксический и тератогенный эффект. HEMA, TEGDMA и EMPME не влияют на процесс дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, а также не оказывают значительного цитотоксического действия. [1].

Кроме того, бисфенол А относят к эндокринным деструкторам, поскольку из-за своего сходства с эстрогеном и гормонами щитовидной железы он способен связываться с гормональными рецепторами или ферментами, участвующими в метаболизме гормонов, и таким образом изменять гормональный баланс у позвоночных, ускоряя половое созревание девочек и повышая риск развития диабета и рака молочной железы [3, 6, 10].

С 2010 года FDA (Food and Drug Administration) в сотрудничестве с Национальным центром токсикологических исследований США провело углубленные исследования с целью прояснения рисков воздействия бисфенола А на здоровье человека. Отмечено беспокойство присутствием бисфенола А в стоматологических пломбировочных материалах и пищевом пластике. Временное допустимое суточное потребление этого вещества, рассчитанное Европейским агентством по безопасности пищевых продуктов, было снижено с 50 мкг/кг/день до 4 мкг/кг/день в 2015 году, что повышает важность контроля высвобождения этого соединения или даже его включения в состав различных материалов [10].

Для большинства материалов процент связывания мономеров в органической матрице после фотоотверждения составляет от 55 до 75 %

и может увеличиваться до 80 % при проведении полимеризации в лабораторных условиях. Установлено, что на поверхности полимеризованного композита, в слое, ингибированном кислородом, полимеризация происходит только на 25–35 %, при этом значительно увеличивается количество свободного мономера.

Бисфенол А и бисфенол А диметакрилат (Bis-DMA) в чистом виде не входят в состав композиционных материалов, а выделяются из них в результате гидролиза ферментами слюны и обнаруживаются в слюне сразу после постановки пломбы [7].

Однако, ряд исследователей показали, что концентрация бисфенола А, выделяемого из стоматологических полимерных материалов, довольно низкая и не способна оказывать негативное воздействие на человека. Тем не менее, в связи с возможным влиянием бисфенола А на репродуктивную систему, большинство авторов рекомендуют ограничить применение композиционных пломбировочных материалов, содержащих Bis-GMA и Bis-DMA, во время беременности.

Цитотоксическое действие HEMA гораздо менее выражено по сравнению с TEGDMA и Bis-GMA. Bis-GMA и UDMA в концентрации более 0,001 мМ и 0,05 мМ, соответственно, оказывают цитотоксическое действие *in vitro* на различные типы клеток: фибробласты десны и пульпы человека, моноциты периферической крови, кератиноциты человека.

Еще более неблагоприятные последствия воздействия этих веществ можно ожидать на персонал, работающий в тесном контакте с ними (стоматологи, зубные техники или рабочие в промышленности по производству смолистых материалов) [10].

Во время установки брекет-системы в полости рта пациента, когда адгезив гомогенизируется с помощью давления воздуха, мономеры могут вступить в тесный контакт со слизистой оболочкой полости рта или растворится в ротовой жидкости пациента. Поэтому исследование влияния неполимеризованных материалов представляет интерес из-за возможного негативного влияния на здоровье не только пациента, но и врача.

Что касается токсичности различных ортодонтических адгезивов, было подтверждено, что химически отверждаемые жидкие пасты и системы с двойным отверждением более цито-

Таблица 1. Состав композитов, используемых в ортодонтии

Композит	Состав матрицы
Grenglo (Ormco)	TEGDMA, UDMA, HEMA, Bis-EMA6, GMA, EO-TMPTA, 3-trimethoxysilylpropyl methacrylate
Blugloo (Ormco)	UDMA, Bis-EMA6, GMA, EO-TMPTA, 3-trimethoxysilylpropyl methacrylate
Transbond XT (3M)	Bis-GMA, Bis-MEPP
Transbond LR (3M)	Bis-GMA, TEGDMA
Heliosit orthodontic (Ivoclar Vivadent)	Bis-GMA, UDMA, декандиола диметакрилата

токсичны, чем светоотверждаемые материалы. Клиническая значимость цитотоксических и генотоксических свойств ортодонтических клеев остается неясной из-за короткого времени воздействия и резкого снижения концентрации в результате эффектов разбавления в водной среде [9].

Так, было установлено, что количество остаточного мономера в TEGMA и UDMA-содержащих композитах достоверно снижается при увеличении времени фотополимеризации (более 20 секунд) и уменьшении расстояния от световода лампы до материала (менее 10 мм).

Попытка производителей перейти на композиционные материалы, не содержащие бис-ГМА чтобы минимизировать цитотоксический потенциал своей продукции стала представлять особый интерес.

Однако простое исключение одного специфического и потенциально цитотоксического мономера из рецептуры материала, такого как Bis-GMA, не может постоянно обеспечивать успешный подход к улучшению их свойств, что зависит от всего химического состава материала [5].

Наибольшее выделение остаточного мономера наблюдается в первые 24 часа после полимеризации композита. На основе полученной научной информации были разработаны следующие рекомендации для стоматологов, направленные на минимизацию влияния бисфенола А и его производных на пациента при стоматологических манипуляциях. При реставрации зубов или герметизации их фиссур необходимо использовать коффердам, чтобы свести к минимуму растворение композита в ротовой жидкости. Для предотвращения образования слоя композита, ингибированного кислородом, перед полимеризацией необходимо нанести барьер из глицеринового геля или, в качестве альтернативы, отполировать поверхность пемзовым или хлопковым аппликатором, или следует провести по крайней мере одну промывку рас-

пылением воздухом/водой в течение 30 с. Использовать умеренный абразив при обработке пломб (удаляет 93–95 % остаточного мономера). Пациент должен полоскать рот в течение 30 секунд после лечения, потому что важно принять меры по разбавлению жидкости для большей безопасности пациента. Необходимо выбирать фотополимеризуемые композиты вместо самоотверждающихся.

Особое внимание следует уделять лечению детей, подростков и беременных женщин из-за высокого эстрогенного и тератогенного воздействия бисфенола А. Для этих пациентов все предлагаемые клинические меры предосторожности должны быть приняты одновременно. Для беременных женщин отсрочка лечения должна быть клинически обоснованной, особенно в первом триместре беременности. Необходимо сокращать возможное количество процедур за одно посещение, чтобы уменьшить потенциальное увеличение высвобождения бисфенола А (не более четырех реставраций или герметизаций) [10].

В современной практике врача-ортодонта довольно часто используются композитные материалы (таблица 1) [2].

По данным различных исследователей генотоксический эффект представленных материалов отсутствует. А цитотоксический эффект подтвержден большим количеством исследований [4].

**Цель исследования.** Определить цитотоксичность неполимеризованных композитов, используемых для фиксации брекет-системы.

#### Материал и методы

Исследована цитотоксичность композитов для фиксации брекет-системы Transbond color change adhesive (3M), Heliosit orthodontic (Ivoclar Vivadent), а также адгезива Single bond universal (3M).

Исследуемые образцы растворяли в 0,9 % растворе хлорида натрия до образования рас-

твора или суспензии, добавляя 400 мкл исследуемого препарата в культуру кератиноцитов HaCaT. Кератиноциты HaCaT выращивали в планшетах для клеточных культур вместимостью 25 см<sup>2</sup>. Для этого клетки культивировали в среде F12/DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 4,5 мг/мл глутамина при температуре (37 ± 1) °C в 5 % атмосфере CO<sub>2</sub>. Смену среды производили ежедневно. При пассировании среду выливали, клетки 2 раза промывали раствором Версена для удаления следов сыворотки, затем заливали смесью растворов трипсина и ЭДТА (0,25 % трипсина, 0,53 ммоль ЭДТА). Клетки, потерявшие контакт с пластиковой поверхностью, отбирали с помощью автоматической пипетки, помещали в пробирку с 50 мкл сыворотки для нейтрализации трипсина и центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин. Затем выливали супернатант, ресуспендировали клетки в полной ростовой среде и рассаживали на новые флаконы. Клетки культивировали без добавления антибиотика. Кератиноциты HaCaT пересеивали в 12-луночный планшет до образования монослоя в течение 3-х суток. Объем культуральной

бавляли в 2 лунки. После суточной инкубации в каждую исследуемую лунку вносили рабочие растворы флуоресцентных красителей в следующих объемах: акридиновый жёлтый – 200 мкл; Dapi – 20 мкл; Actin red 555 – 40 мкл. Планшет с красителями инкубировали 1 час в темноте в термостате при температуре (37 ± 1) °C. Выполняли флуоресцентную микроскопию под увеличением ×200. Для каждой лунки исследовали 1 поле зрения в центре. Каждое поле зрения фотографировали для каждого из трёх красителей. На фотографиях выполняли подсчёт клеток, рассчитывая среднее количество клеток, флуоресцирующих для каждого из трёх красителей из 2 фото. Количество флуоресцирующих DAPI и Actin red 555 клеток не должно превышать 5 % от общего числа, определяемого на фотографии с использованием акридинового жёлтого. Превышение значения в 5 % клеток, флуоресцирующих DAPI и Actin red 555 в исследуемом препарате, свидетельствовало о непосредственном токсическом действии на культуры клеток кератиноцитов HaCaT [11].

Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследования цитотоксичности материалов

Название материала	Цитотоксичность	Описание	Заключение
Single Bond Universal	Клетки полностью разрушены, 100 % мёртвых клеток	Клетки преимущественно разрушены. Нарушена проницаемость цитоплазматической мембраны. Актиновые волокна полностью разрушены	Значительная цитотоксичность
Heliosit Orthodontic	Клетки частично разрушены, 20 % мёртвых клеток	Клетки с уменьшенными размерами. Несколько повышено количество мёртвых клеток. Проницаемость цитоплазматической мембраны не нарушена. Актиновые волокна не нарушены	Умеренная цитотоксичность
Адгезив Transbond PLUS Color Change	Клетки полностью разрушены, 100 % мёртвых клеток	Клетки полностью разрушены. Хроматин деформирован. Актиновые волокна полностью разрушены	Значительная цитотоксичность

среды: 1,8 мл в каждую лунку. Температура культивации: (37 ± 1) °C, относительная влажность воздуха (90 ± 10) %, содержание CO<sub>2</sub> в воздухе (5,0 ± 1,0) %. В качестве отрицательного контроля использовали 400 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия. В качестве положительного контроля использовали 400 мкл раствора кадмия серноокислого 8-водного. После добавления положительного и отрицательного контроля и исследуемого химического вещества кератиноциты HaCaT культивировали в 12 луночном планшете в течение 24 часов. Каждое исследуемое химическое вещество, а также положительный и отрицательный контроли до-

### Выводы

Выявлена значительная цитотоксичность Single Bond Universal (3M) и Transbond plus Color Change adhesive и умеренная цитотоксичность Heliosit Orthodontic на культуру клеток кератиноцитов HaCaT.

Согласно полученным результатам необходимо обеспечение ряда мер по минимизации негативного воздействия композитов в практике врача-ортодонта как для пациента, так и для врача. Не допускать контакта материала со слизистыми оболочками и кожей. Работать с обязательным использованием индивидуальных средств защиты (масок, перчаток, очков, за-

щитных экранов). Использовать минимальное количество материала для установки брекет-системы, производить установку брекет-системы в одно посещение на одну челюсть. Проводить полную полимеризацию композита за счет увеличения её время в 2 раза и сокращения расстояния от источника света до композита. После завершения полимеризации необходимо промыть рабочую область водой с использованием слюноотсоса.

### Литература

1. Корневская, Н. А. Биосовместимость композиционных пломбирочных материалов / Н. А. Корневская // УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь // Вестник ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 7-17.
2. Adham, R. M. Genotoxicity and Cytotoxicity of Orthodontic Bonding Adhesives: A Review / R. M. Adham, N. A. Rahman, T. P. Kannan // Sains Malaysiana. – 2019. – Vol. 48(8). – P. 1685-1695.
3. Bisphenol A in infertile patients: impact on assisted reproductive technologies outcomes / A. G. Syrkasheva [et al.] // Int J Environ Res Public Health. – 2019. – Vol. 16(9). – P. 1627.
4. Clinical and Experimental Dental Research Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins / R. Bationo [et al.] // Materials (Basel). – 2021. – Vol. 14(18). – P. 5225.
5. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Composite Resins on Cultured Human Gingival Fibroblasts / F. De Angelis [et al.] // Materials (Basel). – 2021. – Vol. 14(18). – P. 5225.
6. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Composite Resins on Cultured Human Gingival Fibroblasts / F. De Angelis [et al.] // Physiol Res. – 2020. – P. S295-S304.
7. Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins / R. Bationo [et al.] // Clin Exp Dent Res. – 2021. – № 7(1). – P. 40-48.
8. Dental Composites – a Low-Dose Source of Bisphenol A? / M. Šimková [et al.]. – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8603723/>.
9. Genotoxic and cytotoxic potential of methacrylate-based orthodontic adhesives / A. Taubmann [et al.] // Oral Investigations. – 2021. – Vol. 25. – P. 2569-2581.
10. Resin Composites and Dental Sealants Release Bisphenol-A, How Might This Affect Our Clinical Management? – A Systematic Review / A. B. Paula // Int J Environ Res Public Health. – 2019. – Vol. 16(9). – P. 1627.
11. Метод исследования цитотоксичности химических веществ *in vitro*: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 10.06.2022, рег. № 018-1221 /

сост. канд. мед. наук К. И. Павлов, С. В. Арабей, Л. А. Хватова, А. М. Наборовская, Л. М. Кундельская, Г. А. Курклинская, Т. Г. Метелица, Е. В. Чегодаева, М. А. Матлакова, канд. мед. наук, доцент А. В. Гиндюк. – Минск: Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», 2022. – 19 с.

### References

1. Korenevskaya, N. A. Biosovmestimost kompozicionnyh plombirovochnyh materialov / N. A. Korenevskaya // УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь // Vestnik VGMU. – 2016. – Vol. 15, № 3. – С. 7-17.
2. Adham, R. M. Genotoxicity and Cytotoxicity of Orthodontic Bonding Adhesives: A Review / R. M. Adham, N. A. Rahman, T. P. Kannan // Sains Malaysiana. – 2019. – Vol. 48(8). – P. 1685-1695.
3. Bisphenol A in infertile patients: impact on assisted reproductive technologies outcomes / A. G. Syrkasheva [et al.] // Int J Environ Res Public Health. – 2019. – Vol. 16(9). – P. 1627.
4. Clinical and Experimental Dental Research Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins / R. Bationo [et al.] // Materials (Basel). – 2021. – Vol. 14(18). – P. 5225.
5. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Composite Resins on Cultured Human Gingival Fibroblasts / F. De Angelis [et al.] // Materials (Basel). – 2021. – Vol. 14(18). – P. 5225.
6. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Composite Resins on Cultured Human Gingival Fibroblasts / F. De Angelis [et al.] // Physiol Res. – 2020. – P. S295-S304.
7. Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins / R. Bationo [et al.] // Clin Exp Dent Res. – 2021. – Vol. 7(1). – P. 40-48.
8. Dental Composites – a Low-Dose Source of Bisphenol A? / M. Simkova [et al.]. – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8603723/>.
9. Genotoxic and cytotoxic potential of methacrylate-based orthodontic adhesives / A. Taubmann [et al.] // Oral Investigations. – 2021. – Vol. 25. – P. 2569-2581.
10. Resin Composites and Dental Sealants Release Bisphenol-A, How Might This Affect Our Clinical Management? – A Systematic Review / A. B. Paula // Int J Environ Res Public Health. – 2019. – Vol. 16(9). – P. 1627.
11. Метод исследования цитотоксичности химических веществ *in vitro*: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 10.06.2022, рег. № 018-1221 /

Поступила 11.01.2024 г.