

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rita  
TRUMPAITĖ–VANAGIENĖ

Protezų cementavimo medžiagų  
dėvėjimasis ir jų biosuderinamumas  
su periodonto audiniais

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai  
Odontologija M 002

---

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2009–2019 metais Vilniaus universitete.  
Disertacija ginama eksternu.

**Mokslinė konsultantė – prof. dr. Alina Pūrienė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija, M 002).

**Gynimo taryba:**

**Pirmininkė – prof. dr. Vytautė Pečiulienė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija, M 002).

**Nariai:**

**prof. dr. Nomeda Basevičienė** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija, M 002);

**prof. dr. Genė Biziulevičienė** (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija, N 010);

**prof. dr. Tomas Linkevičius** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija, M 002);

**prof. dr. Monika Lukomska-Szymanska** (Lodzės medicinos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, odontologija, M 002).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. gegužės 29 d. 12 val. Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinikos didžiojoje auditorijoje.  
Adresas: Žalgirio g. 117, Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 272 7589; el. paštas mf.@mf.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Rita  
TRUMPAITĖ–VANAGIENĖ

# Wear Resistance and Biocompatibility of Dental Luting Cements

**DOCTORAL DISSERTATION**

Medicine and Health Sciences  
Odontology M 002

---

VILNIUS 2020

This dissertation was written at Vilnius University between 2009 and 2019.  
The dissertation is defended on an external basis.

**Academic consultant – Prof. Habil. Dr. Alina Pūrienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Odontology, M 002).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman – Prof. Habil. Dr. Vytautė Pečiulienė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Odontology, M 002).

**Members:**

**Prof. Dr. Nomeda Basevičienė** (Lithuanian University of Health sciences, Medicine and Health Sciences, Odontology, M 002);

**Prof. Dr. Genė Biziulevičienė** (State Research Institute Center for Innovative Medicine, Nature Sciences, Biology N 010);

**Prof. Dr. Tomas Linkevičius** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Odontology, M 002);

**Prof. Dr. Monika Lukomska-Szymanska** (Medical University of Lodze, Medicine and Health Sciences, Odontology, M 002).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12 a.m. on 29<sup>th</sup> of May 2020 in the Main hall of Žalgiris Clinic of Vilnius University Hospital. Address: Žalgirio str., 117, Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 5 2727589; e-mail: mf.@mf.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	9
ĮVADAS .....	10
Tiriamoji problema ir jos aktualumas .....	10
Darbo tikslas ir uždaviniai .....	11
Mokslinio darbo naujumas .....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
1.1. Dantų protezų cementavimo medžiagos .....	13
1.2. Cementavimo medžiagų klasifikacijos .....	14
1.3. Cementavimo medžiagų savybės .....	15
1.4. Fiksuoti protezai ir periodonto sveikata .....	17
1.4.1. Protezų ribų įtaka periodonto audiniams .....	18
1.4.2. Palikto cemento įtaka periodonto audiniams .....	19
1.5. Medžiagų biosuderinamumo tyrimai .....	21
1.6. Cemento pertekliaus pašalinimas .....	27
1.7. Cementavimo medžiagų parinkimas .....	28
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI .....	30
2.1 Cementavimo medžiagų dėvėjimasis .....	30
2.1.1. Eksperimentiniai ruošiniai .....	31
2.1.2. Dėvėjimosi testas .....	33
2.1.3. Dėvėjimosi matavimai .....	34
2.2. Tyrimai naudojant kietas cementavimo medžiagas .....	35
2.2.1. Cementų pavyzdžių paruošimas .....	35
2.2.2. Ląstelių kultūros paruošimas .....	36
2.2.3. Testavimo sąlygos .....	37
2.2.4. Citotoksiškumo tyrimai .....	37
2.2.4.1. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas MTT metodu .....	37
2.2.4.2. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas dažymo metodu .....	38
2.2.4.3. Ląstelių morfologijos įvertinimas SEM .....	38
2.2.4.4 Cementų rūgštingumo įvertinimas .....	39

2.3. Tyrimai su cementavimo medžiagų ekstraktais.....	39
2.3.1. Cementų ekstraktų paruošimas.....	39
2.3.2. Ląstelių kultūros paruošimas.....	39
2.3.3. Ląstelių metabolinių pokyčių įvertinimas .....	40
2.3.4. Ląstelių žūties būdo įvertinimas.....	40
2.4. Statistinė analizė.....	41
3. REZULTATAI .....	43
3.1. Cementavimo medžiagų dėvėjimasis ir jo priklausomybė nuo cemento sluoksnio dydžio .....	43
3.1.1. Cementų dėvėjimasis 100 µm ir 250 µm tarpuose .....	43
3.1.2. Cementų dėvėjimasis skirtingose tarpo vietose.....	44
3.1.3. Cementų paviršiaus įvertinimas .....	50
3.2. Kietų cementavimo medžiagų citotoksiškumo tyrimai .....	51
3.2.1. Ląstelių išgyvenamumas skirtingų cementų aplinkoje (MTT testas) .....	51
3.2.1.1. Lyginamos plautų ir neplautų cementų grupės.....	51
3.2.1.2. Nenuplautų cementų poveikis ląstelėms .....	54
3.2.1.3. Nuplautų cementų poveikis ląstelėms .....	56
3.2.2. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas mikroskopu.....	58
3.2.3. Cementų rūgštingumo įvertinimas .....	59
3.2.4. Cemento rūšies ir nuplovimo įtaka ląstelių išgyvenamumui....	61
3.3. Cementų ekstraktų poveikis periodonto ląstelių metaboliniam aktyvumui ir jų žūties būdai .....	64
3.3.1. Ląstelių metabolinio aktyvumo įvertinimas .....	64
3.3.2. Ląstelių morfologinių pakitimų ir žūties būdo įvertinimas .....	66
3.3.2.1. Morfologiniai pakitimai .....	66
3.3.2.2. Ląstelių žūties būdo įvertinimas.....	69
4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS.....	71
4.1. Cementų dėvėjimosi priklausomybė nuo cemento sluoksnio dydžio..	71
4.2. Cementų biosuderinamumas .....	72
4.3. Cementų ekstraktų poveikis periodonto ląstelių metaboliniam aktyvumui ir jų žūties būdai .....	74

IŠVADOS.....	77
PRAKTINĒS REKOMENDACIJOS.....	78
LITERATŪROS SARAŠAS.....	79
SANTRAUKA .....	90
Abbreviations.....	90
INTRODUCTION.....	91
The research question .....	93
Main objectives.....	93
The significance and novelty of the research.....	93
METHODOLOGY .....	95
Project 1: Wear resistance of luting cements and the influence of marginal gap width on substance loss.....	95
Cements tested .....	95
Specimens design .....	95
Wear test.....	97
Measurement locations.....	98
Project 2: Cytotoxicity of different types of luting cements .....	99
Cements tested .....	99
Preparation of specimens .....	99
Establishment of the primary cell line (cell culture) .....	100
Testing conditions (evaluating the effect of pre-washing) .....	100
Cell viability testing (with colorimetric assay) .....	101
Cell viability testing (with MTT assay) .....	101
Scanning Electron Microscopy (SEM).....	102
pH measurements .....	102
Assessments of cytotoxicity .....	102
Project 3: Metabolic changes and cell death induced by extracts derived from different types of luting cements.....	103
Preparation of extracts.....	103
Culturing human gingival fibroblasts.....	103
Assessment of metabolic activity and viable cells counts.....	104
Preparation for live cell imaging.....	104
Quantification of apoptotic and necrotic cells.....	105

RESULTS .....	106
Project 1: Wear resistance of luting cements and the influence of marginal gap width on substance loss.....	106
Differences in wear between two gap widths.....	106
Differences in wear dependent upon the cement type.....	107
Project 2: Cytotoxicity of different types of luting cements .....	109
Cell survival - SEM evaluations.....	109
Cell viability - colorimetric evaluations.....	109
Acidity of the cements (pH changes) .....	110
Cell survival - MTT test.....	112
Predictors of cell survival.....	114
Project 3: Metabolic changes and cell death induced by extracts derived from different types of luting cements .....	115
Changes in cell metabolic activity.....	115
Viable cell counts .....	116
Real-time monitoring of morphology changes.....	117
Real-time monitoring of apoptosis and necrosis .....	119
DISCUSSION.....	121
CONCLUSIONS.....	127
REFERENCES .....	128
CURRICULUM VITAE .....	133
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....	134
PADĖKA.....	161
UŽRAŠAMS .....	162



## SANTRUMPOS

AO	– akridino oranžas
CFC	– cinko fosfatinis cementas
DC	– dervinis cementas
DMEM	– mitybinė terpė (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSJC	– derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas
DNR	– deoksiribonukleino rūgštis
DTR	– daugialypė tiesinė regresija
EB	– etidžio bromidas
EDTA	– etileno diamino tetraacto rūgštis
FVS	– fetalinis veršelio serumas
HEMA	– 2-hidroksietilo metakrilatas
ISO	– tarptautinė standartizacijos organizacija (angl. <i>International Organization for Standardization</i> )
KC	– kompomerinis cementas
LIR%	– ląstelių išgyvenamumo rodiklis (procentais)
MOD	– triplokštuminės (mezialinės, okliuzinės, distalinės) restauracijos
MTT	– 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
OT	– gyvybingų ląstelių optinis tankis
PBS	– fosfatais papildytas fiziologinis tirpalas
pH	– vandenilio jonų koncentracija
RNR	– ribonukleino rūgštis
7-AAD	– 7-amino-aktinomicinas D
SEM	– skenuojamasis elektroninis mikroskopas / mikroskopija
SJC	– stiklo jonomerinis cementas
SDH	– sukcinato dehidrogenazės
TEGDMA	– trietileno glikolio dimetakrilatas
TLS	– tiesioginė ląstelių stebėjimo sistema
ŽDF	– žmogaus dantenu fibroblastai

## ĮVADAS

### Tiriamoji problema ir jos aktualumas

Dantų ligos ir dantų netekimas tebėra aktuali problema. Dantų protezai yra plačiai naudojama suirusių ar prarastų dantų atstatymo priemonė. Protezai prie danties audinių fiksuojami cementavimo medžiagomis, dažniausiai vadinamomis cementais (1, 2). Populiariausi cementai pastoviam dantų protezų fiksavimui yra derva modifikuoti stiklo jonomeriniai ir derviniai cementai. Klasikiniai, cinko fosfatinis bei stiklo jonomerinis, cementai taip pat vis dar naudojami odontologinėje praktikoje. Cementavimo medžiaga, užpildanti mikrotarpą tarp protezo ir danties, turi būti netirpi, atspari dėvėjimuisi, ilgą laiką išlikti nepakitusi ir užtikrinti nepriekaištingą vientisą protezo ir danties jungtį (3). Dėl cemento dėvėjimosi atsiradę nelygumai gali skatinti dantų apnašų užsilaikymą ir eduonies, periodontito ir (ar) periimplantito atsiradimą bei progresavimą (4). Ankstesnės mokslinės studijos apie cementavimo medžiagų dėvėjimąsi dažniausiai nagrinėjo vienos rūšies, būtent dervinių cementų, naudotų įklotams cementuoti, okliuzinio dėvėjimosi ypatumus (5-8). Tačiau danties kaklelio srityje cementavimo medžiagos dėvisi ne tik dėl okliuzinės apkrovos bei kramtymo, bet ir dėl kitų priežasčių (9, 10). Viena iš jų yra dantų valymas šepetėliu. Skirtingų cementų rūšių dėvėjimosi ypatumai, imituojant dantų valymą šepetėliu, iki šiol nagrinėti nebuvo.

Protezavimo medžiagos ilgą laiką kontaktuoja su burnos audiniais, todėl jos turi būti biologiškai saugios: nedirginti periodonto audinių ir periimplantinių struktūrų, nesukelti toksinių, alerginių reakcijų, netrukdyti gijimo procesams. Cementuose negali būti tirpių toksinių medžiagų, kurios, patekusios į kraujotakos sistemą, gali sukelti kenksmingas organizmo reakcijas. Taigi cementai turi būti ne tik atsparūs dėvėjimuisi, bet ir biologiškai suderinti su burnos audiniais – t. y. atlikti numatytas funkcijas, nesukeldami aplinkinių audinių pažeidimo (11). Tyrimai rodo, kad kai kurie protezams cementuoti naudojami cementai, pvz., derviniai, pasižymi citotoksiškumu (12-14). Todėl tikslinga būtų nustatyti, kokį poveikį tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis periodonto ląstelėms turi skirtingų rūšių cementavimo medžiagos.

Medžiagų citotoksiškumui vertinti taikomi įvairūs tyrimo metodai, fiksuojantys ląstelių gyvybingumo, dauginimosi ir funkcinius pakitimus. Dažniausiai tiriamas ląstelių kultūrų atsakas *in vitro* (15). Svarbu nustatyti ne tik skirtingų cementavimo medžiagų citotoksinio poveikio intensyvumą, bet ir citotoksinio poveikio pobūdį, todėl šiame tyrime nagrinėjame ir pagrindinius ląstelių žūties būdus – nekrozę ir apoptozę. Panaudotas tiesioginis ląstelių stebėjimo metodas suteikia naujų žinių apie citotoksinį efektą turinčių medžiagų sukeltus ląstelių pokyčius ir žūties būdus.

Tiesioginis ląstelių stebėjimas ilgesnį laiką padeda įvertinti dinامينius procesus ląstelių kultūrose normaliomis ir eksperimentinėmis sąlygomis, nustatyti ląstelių morfologinius pakitimus bei migracinį aktyvumą (16). Taigi gyvų ląstelių stebėjimas kartu su kitais dažniausiai naudojamais citotoksiškumo tyrimais suteikia papildomos svarbios informacijos apie įvairių cementavimo medžiagų citotoksines savybes.

## Darbo tikslas ir uždaviniai

### *Darbo tikslas*

Ištirti dantų protezų cementavimo medžiagų atsparumą mechaniniam dėvėjimuisi ir jų biosuderinamumą su periodonto audiniais.

### *Darbo uždaviniai*

1. Palyginti dantų protezams cementuoti naudojamų medžiagų atsparumą dėvėjimuisi.
2. Ištirti cemento sluoksnio dydžio įtaką cementavimo medžiagos dėvėjimuisi.
3. Palyginti dantų protezams cementuoti naudojamų medžiagų citotoksiškumą.
4. Ištirti cementų nuplovimo įtaką cementų citotoksiškumui.
5. Įvertinti dantų protezų cementavimo medžiagų ekstraktų poveikį metaboliniam periodonto ląstelių aktyvumui ir gyvybingumui.
6. Nustatyti cementavimo medžiagų ekstraktais paveiktų periodonto ląstelių žūties pobūdį.

## Mokslinio darbo naujumas

Ankstesnės mokslinės studijos apie cementų, dėvėjimąsi daugiausia nagrinėjo tik vienos grupės, t. y. išskirtinai dervinių cementų dėvėjimąsi ir pagrindinis dėmesys buvo skiriamas okliuzinio paviršiaus dėvėjimosi ypatumams (5, 10, 17). Mus domino kita protezuoto danties ilgaamžiškumui reikšminga vieta – danties kaklelio sritis. Šioje srityje cementavimo medžiagos dėvėjimuisi didelę įtaką turi ne tik okliuzinės apkrovos, bet ir kitos priežastys, viena iš jų – dantų valymas šepetėliu. Cementų dėvėjimasis, panaudojant protezuoto danties fragmento valymo dantų šepetėliu modelį *in vitro*, iki šiol nenagrinėtas. Taip pat nebuvo nagrinėta, ar cementu užpildyto tarpo dydis, t. y. kraštinis protezo tikslumas, turi įtakos cementų dėvėjimosi intensyvumui.

Medžiagos, naudojamos pastoviam protezų cementavimui, turi būti ne tik mechaniškai tvirtos, bet ir biologiškai saugios periodonto audiniais. Atlikti

cementų citotoksiškumo tyrimai dažniausiai lygino tos pačios rūšies cementus, pvz., skirtingus dervinius cementus. Mes savo eksperimentuose *in vitro* palyginome skirtingų rūšių cementavimo medžiagas. Siekdami kuo išsamiau įvertinti medžiagų citotoksiškumą, taikėme keletą skirtingų metodų, atskirai testavome kietų cementų ir jų ekstraktų (cementų ištraukų) poveikį ląstelių kultūroms. Taip pat, taikydami inovatyvų metodą – ilgalaikį tiesioginį ląstelių stebėjimą – nagrinėjome ląstelių žūties pobūdį.

Tomis pačiomis sąlygomis skirtingas cementavimo medžiagas testuojantys ir lyginantys tyrimai, turėtų padėti gydytojams klinikinėje praktikoje pasirinkti tinkamiausią medžiagą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Dantų protezų cementavimo medžiagos

Odontologinės medžiagos, naudojamos netiesioginių restauracijų fiksavimui prie danties audinių, vadinamos cementavimo medžiagomis (1, 2). Apžvelgsime nuolatiniam cementavimui dažniausiai naudojamas cementavimo medžiagas.

Cinko fosfatinis cementas (CFC) yra ilgiausiai odontologijos praktikoje naudojama medžiaga (18). Cementas buvo sukurtas 1878 metais ir, nepaisant jo trūkumų – tirpumo seilėse, cheminio jungimosi stokos ir žemo pH, jau daugiau kaip 140 metų naudojamas dantų protezų cementavimui (19).

1903 metais paskelbta apie silikatinių cementų sukūrimą. Silikatiniai cementai yra modernesnių produktų – kompozitų ir stiklo jonomerinių cementų – pirmtakai. Silikatinių cementų savybės ir patvarumas ypač priklauso nuo tikslaus cemento komponentų dozavimo ir maišymo (20).

D. C. Smith 1968 metais, naudodamas cinko oksido miltelius ir polikarboksilinę rūgštį išrado naujos kartos cementavimo medžiagą – polikarboksilatinių cementą – pirmąją cementavimo medžiagą, pasižyminčią adhezinėmis savybėmis (20, 21). Polikarboksilatiniai cementai, lyginant su fosfatiniais, sunkiau maišosi, yra klampesni, po sukietėjimo pasižymi didesne plastine deformacija nei kiti cementai. Didžiausias polikarboksilatinio cemento klinikinis pranašumas yra jo biologinis suderinamumas (22).

Wilson ir Kent 1969 metais išrado stiklo jonomerinius cementus (SJC) (23). Jie buvo sukurti sujungiant geriausias silikatinių ir polikarboksilatinių cementų savybes. Taigi, stiklo jonomerinis cementas yra generinis medžiagų, sudarytų iš silikatinio stiklo miltelių ir vandeninio poliakrilinės rūgšties tirpalo, pavadinimas. Šis pavadinimas susijęs su sudėtinėmis dalimis – stiklo milteliais ir jonomerine rūgštimi, turinčia karboksilo (-COOH) grupių, padedančių cementavimo medžiagai chemiškai susijungti su danties audiniais. Stiklo jonomeriniai cementai taip pat vadinami polialkanoatiniais cementais arba ASPA (aliuminio silikato poliakrilinės rūgšties) cementais (24). Pagrindiniai šių cementų pranašumai yra fluoro išsiskyrimas ir cheminė jungtis su danties audiniais (25), o pagrindiniai trūkumai – jautrumas drėgmei (ypač kietėjimo metu) bei prastesnės mechaninės savybės: mažas elastingumas ir nepakankamas atsparumas dėvėjimuisi (26, 27).

1986 metais buvo sukurti derva modifikuoti stiklo jonomeriniai cementai (DMSJC) (20). Vėliau atsirado naujų dervų pagrindu sukurtų cementų, buvo atrasti dervų papildai, pagerinantys medžiagos savybes, pvz., ėsdinimo rūgštimi metodika, skirta dervų prijungimui prie emalio, ir molekulių kompleksai, galintys susijungti su kondicionuotu dentinu (su organine arba neorganine rūgštimi) (20).

1990-ųjų pabaigoje rinkoje pasirodė kompomerinės medžiagos, žinomos kaip polirūgštimis modifikuotos kompozicinės dervos (angl. *poly acid-modified composite resins*). Jos apibūdinamos kaip sudėtinės medžiagos, t. y. dervos ir stiklo jonometro deriniai, turintys abiejų medžiagų savybių. Mechaninės kompomerų savybės labiau panašios į kompozicinių dervų, nei stiklo jonomerų. Kompomerai pasižymi didesniu atsparumu spaudimui ir lenkimui nei derva modifikuoti stiklo jonomeriniai cementai. Norint pasiekti reikiamą danties ir šios medžiagos sukibimą, buvo pasiūlyta papildomai naudoti dervinius rišiklius (28-30).

Derviniai cementai (DC) yra panašūs į kompozicines plombavimo medžiagas. Jie populiarūs dėl didelio atsparumo spaudimui ir tempimui, mažo tirpumo ir gerų estetinių bei adhezinių savybių. Naudojant šios grupės medžiagas būtinas geras sudėtingos, daugiaetapės, ypač tikslios cementavimo technikos valdymas ir jie yra santykinai brangūs (31). Derviniai cementai skirstomi į šviesoje kietėjančius, savaimė kietėjančius ir dvigubo kietėjimo. Tvirtas ryšys tarp dervinio cemento ir danties audinių bei restauracijos užtikrinamas adhezinių sistemų pagalba, kurios gali būti cemento sudėtyje arba naudojamos atskirai (32).

Adhezinių dervinių cementų sukūrimas stipriai pakeitė fiksuoto protezavimo praktiką, praplėtė estetinių keraminių restauracijų bei dalinių protezų panaudojimo galimybes (3).

## 1.2. Cementavimo medžiagų klasifikacijos

Literatūroje siūlomos įvairios cementavimo medžiagų klasifikacijos (33).

1. Pagal pagrindinę sudedamąją medžiagą cementai skirstomi į (27):
  - a. Cinko fosfatinius
  - b. Cinko silikofosfatinius
  - c. Cinko oksido eugenolinius
  - d. Cinko poliakrilatinius
  - e. Stiklo jonomerinius
  - f. Dervinius
2. Pagal jungties tipą (angl. *matrix bond type*) cementai skirstomi į (34):
  - a. Fosfatinius
  - b. Fenolatinus (angl. *phenolate*)
  - c. Polikarboksilatinius
  - d. Dervinius
  - e. Derva modifikuotus stiklo jonomerinius
3. Pagal vyraujančią kietėjimo reakcijos tipą cementai skirstomi į (35):
  - a. Rūgštinius – bazinius (angl. *acid-based cements*)
  - b. Polimerizacijos reakcijos būdu kietėjančius cementus

4. Pagal Donovan cementai skirstomi į (36):

- a. Tradicinius (cinko fosfatiniai, polikarboksilatiniai, stiklo jonomeriniai cementai)
- b. Šiuolaikinius (derva modifikuoti stiklo jonomeriniai, derviniai cementai)

Klinikinėje praktikoje labiausiai paplitęs cementų skirstymas pagal pagrindinę sudedamąją medžiagą bei jungties tipą.

### 1.3. Cementavimo medžiagų savybės

Ideali dantų protezų cementavimo medžiaga turėtų pasižymėti geromis biologinėmis, fizinėmis/mechaninėmis savybėmis (turi būti kieta, netirpi, nepralaidi, pasižymėti gera adhezija), būti patogi dirbti (pakankamas takumas, kietėjimo laikas, lengvas pertekliaus pašalinimas), estetiška bei nebrangi. Cementavimo medžiagos parinkimas turi priklausyti nuo konkrečios klinikinės situacijos ir remtis išsamiais žiniomis apie cementavimo medžiagų savybes (28).

Deja, nei viena iš cementavimo medžiagų neatitinka visų keliamų reikalavimų ir idealios medžiagos nėra (3).

Tinkamos cementavimo medžiagos parinkimas svarbus sėkmingam restauracijos funkcionavimui. (3). Todėl, norint pasirinkti optimaliausią kiekvienai klinicinei situacijai variantą, reikia įvertinti visas, fizines (mechanines), chemines ir biologines, cementavimo medžiagos savybes. Svarbios cementų mechaninės savybės yra medžiagos tvirtumas, kietumas, trintis bei jos dėvėjimasis. Cheminės medžiagų savybės parodo kietėjimo reakcijas, irimo procesus. Biologinės medžiagų savybės nagrinėja poveikį gyviems audiniams (37).

Pagrindinė cementavimo medžiagos funkcija – fiksuoti dantų restauraciją (pvz. vainikėlių) ir užpildyti tarpą tarp danties ir restauracijos. Cemento tarpo dydis priklauso nuo kraštinio restauracijos tikslumo. Taip pat yra duomenų, kad kraštinis tikslumas priklauso ir nuo cementavimo medžiagos mechaninių savybių (38).

Netikslus protezo kraštas ir/ar defektinis cemento sluoksnis, atsiveriantis vainikėlio krašto srityje, palengvina dantų apnašų kaupimąsi, dirgina periodonto audinius, palaiko uždegimą. Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad protezo krašto vieta (lokalizacija), protezo tikslumas (kraštinė adaptacija) bei kontūras yra reikšmingi periodontito (39) ir antrinio ėduonies profilaktikai (40) ir tiesiogiai veikia periodonto audinių sveikatą (41-44).

Tarp gydytojų odontologų nėra sutarimo, koks kraštinis tikslumas turėtų būti (45). Mokslinių studijų rezultatai apie restauracijų kraštinį tikslumą yra skirtingi. Fransson ir kt. (46) tyrė metalo keramikos vainikėlių tikslumą, t. y. tarpelį tarp restauracijos krašto ir danties audinių, ir nustatė vidutinį 100 μm tikslumą, tuo

pačiu buvo stebima didelė įvairovė (variacija), kai kurių vainikėlių kraštinis tikslumas buvo didesnis kaip 200  $\mu\text{m}$ . Kitoje *in vivo* fiksuotų protezų studijoje buvo nustatytas vidutinis 60  $\mu\text{m}$  tikslumas, kraštinio tikslumo vertės variavo nuo 5 iki 430  $\mu\text{m}$  (47). Distaliniuose restauracijų paviršiuose cementuojant visų rūšių cementais randamas mažesnis kraštinis tikslumas nei kituose paviršiuose (48). Rekomenduojama, kad kliniškai priimtinas kraštinis tikslumas turėtų būti ne didesnis kaip 100  $\mu\text{m}$  (48). Fiksuojant vainikėlį ar kitą dantų restauraciją, cementui kietėjant vyksta medžiagos susitraukimas ir atsiranda susitraukimo įtampos. Eksperimentiniu modeliu nustatyta, kad mažiausios plastinės deformacijos ir mažiausios susitraukimo įtampos formuojasi tuomet, kai cemento sluoksnis yra ploniausias (49).

Svarbu ne tik cemento sluoksnio dydis, bet ir jo ilgalaikis stabilumas, t. y. sandarumas, atsparumas tirpumui, dėvėjimuisi bei paviršiaus savybės (17, 50). Cemento jungties tarp protezo ir danties sandarumas yra svarbus mikroorganizmų invazijos prevencijai ir endodontinio gydymo kokybei užtikrinti (51). Hooshmand ir kt. lygino kelis dervinius ir derva modifikuotą stiklo jonomerinį cementus ir didžiausią mikropalaidumą nustatė pilnus tauriųjų metalų vainikėlius cementuojant Panavia F 2.0 derviniu cementu, toliau sekė derva modifikuotas stiklo jonomerinis GC Fuji Plus cementas (52). Dervinių cementų mažesni mikropalaidumą ir atsparumą tirpumui rodo kitų studijų rezultatai (31, 53, 54). Kitoje *in vitro* studijoje buvo ištirtas skirtingų cementų jungties atsparumas tempimui (angl. *tensile bond strength*) ir kraštinio tikslumo pokyčiai prieš ir po cementavimo skirtingais cementais. Šios studijos rezultatai parodė, kad po cementavimo kraštinis tikslumas ypač sumažėjo cinko fosfatinio cemento mėginiuose, kiek mažiau – dervinio cemento, mažiausiai – cinko polikarboksilatino ir stiklo jonomerinio cementų mėginiuose (55).

Skirtingų cementų tirpumą nagrinėjusioje studijoje, rasta, kad mažiausiai tirpus buvo polirūgštinis modifikuotas dervinis cementas, po to sekė polikarboksilatino, cinko fosfatinis ir stiklo jonomerinis cementai (Karkera, et al. 2016). Didžiausias dervinių cementų atsparumas tirpumui nustatytas ir kituose panašiuose tyrimuose (56, 57). Apibendrinant, tirpumo mažėjimo tvarka cementavimo medžiagos gali būti išdėstytos taip: DC  $\rightarrow$  DMSJC  $\rightarrow$  SJC  $\rightarrow$  CFC.

Cemento irimas (tirpumas, porėtumas, dėvėjimasis) lemia toksinių medžiagų išsiskyrimą ir formuoja cemento paviršiaus nelygumus (nišas, įtrūkius). Šiurkštūs defektiniai paviršiai skatina mikrobinio apnašo užsilaikymą ir gingivito ar periodontito išsivystymą.

Milutinovic-Nikolic ir kt. lygino įvairių protezų cementų: cinko fosfatinio, polikarboksilatino, stiklo jonomerinio ir derva modifikuoto kompozicinio cemento porėtumą ir nustatė, kad polikarboksilatino cementas buvo ypač porėtas, o



dervinis – mažiausiai porėtas (58). DC poros buvo < nei 20 nm (58, 59). Skysčio ir miltelių maišymas ranka didina cementų porėtumą (59). Sudėtingi biologiniai mechanizmai padeda bakterijoms prikibti prie įvairių paviršių, taip pat ir prie cementavimo medžiagų bei jų mikroporų, ir skatina didesnę bakterijų kolonijų kaupimąsi (60).

Be reikiamų fizinių savybių, protezų cementavimo medžiagos turi būti ir biologiškai suderintos, t.y. nekenksmingos nei minkštiesiems, nei kietiesiems burnos audiniams. Tačiau daugelis cementavimo medžiagų yra rūgščios, t.y. turi skirtingą pH nei burnos audiniai, todėl gali sukelti besiliečiančių audinių dirginimą (61). Cinko fosfatiniai cementai yra ypač rūgštūs, todėl, pricementavus protezą ant gyvo danties, gali dirginti pulpos audinius ir sukelti danties jautrumą. Cinko polikarboksilatiniai cementai, nors jų sudėtyje yra didelės molekulinės masės poliakrilo rūgštis, yra mažiau kenksmingi pulpai, nes jų pH greitai neutralizuojamas, kai skystis sumaišomas su milteliais (20, 62). Dėl mažo pradinio pH bei jautrumo drėgmei stiklo jonomeriniai cementai po cementavimo taip pat gali sukelti dantų jautrumą (63, 64). Prieš paruošiant dantį, ant kurio vainikėlis bus cementuojamas cinko fosfatinium ar stiklo jonomeriniu cementu, rekomenduojama naudoti pooperacinį danties jautrumą mažinančias medžiagas (nujautrintojus). Restauracijos laikomumui jautrumą mažinančios medžiagos neigiamo poveikio neturi (65). Stiklo jonomerams būdingas fluoro išsiskyrimas yra naudingas dėl galimo kariostatinio poveikio (66, 67). Dervų pagrindu gaminami cementai taip pat gali dirginti pulpos ir periodonto audinius. Laisvų monomerų išsiskyrimas gali sukelti toksines burnos audinių reakcijas. Eksperimentiniai ir klinikiniai tyrimai rodo, kad monomerai taip pat gali sukelti neigiamą poveikį bendrai sveikatai, pvz., odos, akių ir gleivinių dirginimą, alerginį dermatitą, stomatitą, astmą, neuropatiją, centrinės nervų sistemos sutrikimus, toksinį poveikį kepenims (68, 69).

#### 1.4. Fiksuoti protezai ir periodonto sveikata

Dantenu vageleje ar periodonto kišenėje besibaigiantis protezo kraštas tiesiogiai kontaktuoja su periodonto audiniais, todėl turi įtakos dantenu ir kitu periodonto audiniu būklei. Bloga protezo krašto adaptacija, per giliai į dantenu vagele patalpintas protezas, šiurkštus protezo paviršius, netinkamas restauracijos kontūras gali prisidėti prie vietinio periodonto audiniu uždegimo atsiradimo ir (ar) progresavimo (70-76). Įrodyta, kad supragingivinės (esančios virš dantenu krašto) restauracijos yra palankesnės periodonto sveikatai. Kuo arčiau epitelinės jungties yra restauracijos ribos, tuo didesnė dantenu uždegimo tikimybė (41, 77).

Dantų protezų gamybai naudojamos medžiagos pasižymi skirtingu poveikiu epitelinėms ląstelėms (78) ar dantenu fibroblastams (79). *In vitro* studijoje

nustatyta, kad titanas neturėjo citotoksinio efekto, lauko špato keramika ir aukso lydinys – trumpalaikį, o chromo-kobalto lydinio citotoksinius poveikis dantenu fibroblastams buvo stipriausias (79). Kawai ir kt. palygino įvairių restauracinių medžiagų (Ag amalgamos, aukso lydinio, kompozito ir trijų skirtingų keramikų) savybes kaupti dantų apnašą (80). Rasta, kad daugiausiai mikroorganizmų ir apnašo buvo prie amalgamos, mažiau prie kompozito ir aukso restauracijų, o mažiausiai – prie keramikos restauracijų. (80). Nors dauguma *in vitro* studijų, lyginančių apnašo kaupimąsi ant skirtingų protezavimo medžiagų, nustatė skirtumus (71, 81), apibendrinus *in vitro* ir *in vivo* studijų rezultatus, konstatuota, kad dantenu uždegimas, nepriklausomai nuo protezo medžiagos, gali būti kontroliuojamas esant tinkamai asmeninei burnos higienai ir profesionaliai priežiūrai (82).

#### 1.4.1. Protezų ribų įtaka periodonto audiniams

Nekokybiškų „kabančių“ restauracijos kraštų neigiamas poveikis periodonto audiniams šiandien yra žinomas ir nekeliantis abejonių. (70, 71). Tačiau ir kokybiškos kliniškai priimtinos restauracijos, esančios žemiau dantenu krašto (subgingivaliai), ilgainiui kenkia dantenu ir periodonto sveikatai. Periodonto jungties praradimas dėl subgingivinių restauracijų yra lėtinis procesas ir kliniškai gali būti aptiktas po 1–3 metų (83).

Kalbant apie dantų protezus, protezinės restauracijos riba gali baigtis virš dantenu (supragingivaliai), ties dantenu kraštu ar žemiau dantenu krašto (subgingivaliai). Virš dantenu cementuojamas vainikėlis turi mažiausią neigiamą poveikį periodonto audiniams. Kadangi dauguma protezavimo restauracijų baigiasi žemiau dantenu krašto (t. y. subgingivaliai), jų poveikis periodonto audinių sveikatai yra neišvengiamas. Klinikinėje praktikoje fiksuotų dantų protezų ribos dažnai baigiasi po dantenomis dėl kariozinių pažeidimų, danties audinių trūkumo arba dėl estetinių priežasčių siekiant paslėpti vainikėlio ir danties ribą. Dantenu vagelėje (t. y. žemiau dantenu krašto) besibaigiantis protezas, net ir labai tikslus, net esant nepriekaištingai protezo krašto adaptacijai, dirgina periodonto audinius (84). Protezo riboje atsiveriančios cementavimo medžiagos kiekis tiesiogiai priklauso nuo protezo tikslumo. Kuo tikslesnis protezas, tuo siauresnis atsiveriančio cemento, kaip papildomo periodonto audinių dirgiklio, sluoksnis. Deja, klinikinėje praktikoje dažniau susiduriame su defektiniu nei idealiu protezų kraštiniu tikslumu, kuris dirgina danteną, kaupia apnašą ir gali sukelti gingivitą ar periodontitą. Ties subgingivaliai pricementuotais pilnais vainikėliais stebimas didesnis dantenu kraujavimas bei dantenu recesija (atsitraukimas) nei prie virš dantenu esančiais vainikėliais (70, 85).

Protezo ribų lokalizacija ypač reikšminga protezuojant ant implantų, kai protezai fiksuojami cementavimo, o ne prisukimo, būdu.

#### 1.4.2. Palikto cemento įtaka periodonto audiniams

Svarbus protezų cementavimo aspektas yra sukietėjusio cemento pertekliaus (likučių) pašalinimas. Kuo giliau po dantenomis yra restauracijos kraštas, tuo sunkiau šį procesą kontroliuoti, todėl didesnis cemento kiekis gali būti neaptinkamas ir nepašalintas (86). Aplink subgingivaliai pricementuotus vainikėlius rastas didesnis apnašų kiekis, gilesnės periodonto kišenės, dantenu vagelėje aptikta daugiau spirochetų, fuzobakterijų, bacilų ir filamentinių bakterijų, lyginant su virš dantenu pricementuotais dantų vainikėliais (87).

Į periodonto audinius – dantenu vagelę arba apie implantą esančius periimplantinius audinius – patekęs nepašalintas cemento perteklius tiesiogiai veikia šiuos audinius ilgą laiką (88). Tai gali lemti uždegiminio atsako išsivystymą ir apie dantį, ir periimplantiniuose audiniuose, todėl protezavimas ir (ar) periodontologinis gydymas gali baigtis nesėkme (89-91). Wilsonas nustatė, kad net 81 proc. atvejų periimplantito požymiai buvo susiję su cemento likučiais. Praėjus 4 savaitėms po cemento likučių pašalinimo, net 74 proc. atvejų, uždegimo požymiai išnyko (90).

Skirtingų cementų poveikis periodontui nėra vienodas. Klinikinėje studijoje nustatyta, kad aplink metakrilatinu cementu (*Premier Implant Cement*) ant implantų fiksuotus vainikėlius, kur buvo nepašalinto cemento likučių, kraujavimas po zondavimo buvo nustatytas net 80 proc., pūliavimas – 20 proc. atvejų (92). Studijoje, lyginusioje skirtingais cementais ant implantų fiksuotus vainikėlius, cementinės medžiagos pertekliaus nerasta, kai vainikėliai ant implantų buvo pritvirtinti cinko oksido eugenoliniu cementu (*Temp Bond*), tačiau ties metakrilato cementu cementuotais vainikėliais cemento perteklius buvo rastas 61 proc. atvejų. Ties metakrilatinu cementu fiksuotais vainikėliais aptiktas pūliavimas: 33 proc. atvejų, kur cemento pertekliaus nebuvo ir net 100 proc. – kai cemento perteklius buvo nustatytas. Mikrobinių mėginių taksonominė analizė atskleidė patogeninių mikroorganizmų kaupimąsi metakrilato cemento tiriamųjų grupėje, nepriklausomai ar cemento perteklius buvo nustatytas, ar ne. Statistiškai reikšmingai mažiau burnos patogenų buvo rasta, kai vainikėliai fiksuoti laikinu *Temp Bond* cementu (89). Taigi, situacijose, kai cemento pertekliaus pašalinimas yra sunkiai kontroliuojamas, dervinių cementų rinktis nereikėtų.

Cemento likučiai per pirmas keturias savaites po nuolatinio cementavimo gali sukelti periimplantinį mukozitą, t.y. gleivinės apie implantą uždegimą, pasireiškiantį dantenu paraudimu, paburkimu, kraujavimu zonduojant, kišenės

formavimusi bei periimplantitą, pasireiškiantį kaulo apie implantą destrukcija (93, 94). Periimplantinio mukozito rizikos veiksniai yra burnos bakterinis apnašas, rūkymas, cukrinis diabetas, keratinizuotų dantenu trūkumas bei cementavimo medžiagos likučių buvimas (95). Burbanas ir kt. nustatė, kad perimplantitu sergančių pacientų periimplantinių audinių biopsijose buvo rasta cementavimui naudotų medžiagų dalelių (96).

Protezų cementavimui ant implantų naudojamos tos pačios medžiagos kaip ir protezų cementavimui ant dantų. Priklausomai nuo cementų rūšies, skiriasi cementų pertekliaus pašalinimo metodikos ir galimybės. Lengviausiai pašalinamas cinko fosfatinis cementas, sunkiausiai – derviniai cementai (97). Jei šalinant cemento perteklių pažeidžiamas implanto paviršius, jis taip pat veikia kaip dantų apnašo retenciją ir bakterijų adheziją skatinantis veiksnys (98). Neištirta, kuris cementas – stiklo jonomerinis, fosfatinis ar dervinis – sukelia didesnę uždegiminę periimplantinių audinių reakciją, bet akivaizdu, kad visų cementų likučiai gali sukelti uždegimą (90). Cemento likučiai, esant generalizuotai periodonto patologijai, greičiau sukelia periimplantitą bei gali lemti implanto netekimą, o nesant periodonto patologijos, periimplantinių audinių reakcija į cemento likučius gali būti minimali (99).

Cementų neigiamą poveikį periodonto ir kitiems burnos audiniams gali lemti tokios toksiškos medžiagos kaip formaldehidas, metakrilo rūgštis, kiti monomerai, užpildai ir aktyviekiai, atsiradę polimerizacijos metu (100). Skirtingų paliktų cementavimo medžiagų poveikis periodontui nevienodas. Caughman ir kt. parodė, jog derviniai cementai yra itin citotoksiški dantenu fibroblastams ir epitelinėms ląstelėms, lyginant su stiklo jonomeriniais cementais (101). Tačiau pastarieji, nors nesukelia morfologinių ląstelių pokyčių, slopina makromolekulių (proteinų, RNR) sintezę ląstelėse (101). Bozini su bendraautoriais teigia, kad, tiek derviniai, tiek derva modifikuoti stiklo jonomeriniai cementai, sukelia įvairių ląstelių (pulpos ląstelių, osteoblastų, žmogaus dantenu fibroblastų bei keratinocitų) augimo sulėtėjimą ar net žūtį (102) ir derva modifikuotus stiklo jonomerinius cementus įvardino kaip labiau citotoksiškus lyginant su derviniais cementais. Akivaizdūs skirtumai stebimi ir tarp skirtingų tos pačios rūšies cementų.

Periimplantiniai audiniai jautresni cemento likučių sukeltam uždegimui todėl, kad, priešingai nei prie danties paviršiaus, epitelinis bei jungiamasis audinys tiesiogiai su implantu nesijungia ir neveikia kaip barjeras, saugantis nuo mikroorganizmų patekimo (103). Todėl cemento likučiai gali būti lengvai įstumiami į periimplantinius audinius (104). Akivaizdu, kad cementuojant protezines konstrukcijas ant dantų, cemento perteklius sukelia mažiau komplikacijų, nei cementuojant ant implantų, nes dantį supa natūralios periodonto struktūros – dantenu vagelė, įvairiomis kryptimis išsidėsčiusios periodonto raiščio

skaidulos, epitelinė jungtis. Taigi, cemento perteklių lengviau pašalinti aplink dantį, nes dantenu vagelė ir periodonto raiščio skaidulos neleidžia cementui prasiskverbti apikalčiai. O aplink implantą susiformavęs periodonto raištis pasižymi kitokiomis savybėmis – vyrauja lygiagrečios danties paviršiui periodonto raiščio skaidulos, nepasižyminčios cemento sulaikymu (88).

Kuo giliau po dantenomis yra cementuojamo protezo riba (protezuojant ant danties ar implanto), tuo daugiau medžiagos likučių po cementavimo aptinkama periodonto audiniuose, ypač cementuojant ant implantų. Rentgenogramos nėra patikimas būdas įvertinti likusiam cemento kiekiui periodonto audiniuose (86, 105).

Nustatyta, jog didesnė periimplantito išsivystymo dėl likusio cemento tikimybė yra periodontitu anksčiau sirgusiems/sergantiems pacientams (99, 106). Taigi nors cementuojant protezus ant implantų, cemento į periimplantinius audinius patenka visada, tačiau periimplantitas išsivysto ne visais atvejais (99). Bet kokiu atveju, likusio cemento poveikis kraštinio periodonto audiniams nėra teigiamas ir vienodas, restauracijas cementuojant skirtingais cementais. Įrodyta, kad reikšmingai mažiau burnos patogenų rasta, cementuojant cinko oksido eugenolio cementu lyginant su cementu, turinčiu metakrilato (107). Įvertinus cementų neigiamą poveikį, atrodytų, kad fiksavimo būdas prisukant protezus ant implantų, turėtų būti palankesnis periodonto audiniams. Tačiau mokslinėje literatūroje yra prieštarų šiuos du metodus vertinančių duomenų. Jain su kolegomis atliko sistemine apžvalgą analizuodami cementuojamų ir prisukamų protezų ant implantų trumpalaikius ir ilgalaikius atkiauosius rezultatus. Metaanalizės rezultatai parodė, kad cementuojami protezai turėjo statistiškai reikšmingai mažiau komplikacijų dėl protezų retencijos praradimo (atsicementavimo) nei prisukami protezai ant implantų (108). Visgi, kita sistemine apžvalga įvardino cemento perteklių kaip galimą rizikos faktorių periimplantito išsivystymui (109). Apibendrinant mokslines studijas akivaizdu, kad protezinių konstrukcijų fiksavimo ant implantų problema iki šiol neišspręsta. Tiek vienas, tiek kitas fiksavimo metodas turi trūkumų. Pasirinkus cementavimo būdą, būtina stengtis išvengti cemento patekimo į periodonto audinius, o patekus, kuo kruopščiau cementą pašalinti, siekiant išvengti kraštinio periodonto patologijos, kuri gali atsirasti ir po kelių mėnesių, ir po kelių ar keliolikos metų, nepriklausomai nuo palikto cemento rūšies (99, 107, 110).

### 1.5. Medžiagų biosuderinamumo tyrimai

Biologinio suderinamumo sąvoka suprantama kaip medžiagos gebėjimas atlikti numatytas funkcijas, nesukeliant nepageidaujamo aplinkinių audinių atsako (111). Dantų protezai ir juos fiksuojantys cementai ilgą laiką glaudžiai kontaktuoja su

minkštaisiais burnos audiniais, todėl jų biosuderinamumas yra svarbus. Biosuderinamumo tyrimai padeda išaiškinti galimas dantų restauracijų cementavimo medžiagų pašalines reakcijas (13, 112).

Biosuderinamumo tyrimai atliekami remiantis Tarptautinės standartų organizacijos (ISO, Ženeva, Šveicarija) nustatytais tyrimo metodais. Šie standartai taikomi tiriant odontologines medžiagas (113) bei medicininės priemonės (114). Kiekviena priemonė ar medžiaga, skirta naudoti žmonėms, turi būti atitinkamai įvertinta (115). Vertinimas susideda iš kelių etapų:

- bendro toksiškumo vertinimo,
- vietinės audinių reakcijos vertinimo,
- preklinikinių tyrimų su gyvūnais,
- klinikinių tyrimų su žmonėmis.

Pradiniai medžiagų toksiškumo tyrimai (1, 2 etapai) atliekami ląstelių ir audinių kultūrose. Jie yra greiti, tikslūs, santykinai nesudėtingi ir nebrangūs. Atliekant tyrimus *in vitro*, galima kontroliuoti tyrimo sąlygas bei tam tikrus įtakos turinčius veiksnius ir išaiškinti atskirą dominančio veiksnio įtaką. Tyrimai su ląstelių kultūromis gali išaiškinti medžiagų poveikį specifinėms ląstelių funkcijoms. Atlikta daug odontologinių medžiagų biologinio suderinamumo tyrimų naudojant įvairių tipų ląstelių kultūras, taip pat žmogaus dantenu fibroblastus (101), dantų pulpos ląsteles (116, 117) ir pelių fibroblastus (118). Dantų medžiagų citotoksiškumą galima vertinti tiesiogiai arba tiriant medžiagų sudedamąsias dalis (115). Svarbus yra ląstelių ir tiriamosios medžiagos santykis. Ląstelės su tiriamosiomis medžiagomis gali sąveikauti tiesiogiai, netiesiogiai (per filtrą) arba su medžiagų ištraukomis (ekstraktais) (119). Modeliuojat tiesioginį kontaktą, tiriamosios medžiagos pavyzdys gali būti:

- uždedamas ant audinio gabaliuko,
- uždedamas ant vienasluoksnės ląstelių kultūros,
- patalpinamas į ląstelių kultūrų indą ir užpilama ląstelių suspensijos,
- ląstelės auginamos tiesiogiai ant tiriamosios medžiagos pavyzdžio.

Tiesioginio kontakto tyrimai imituoja situaciją, kai protezų ir cementavimo medžiagos dantenu vagelėje tiesiogiai liečiasi su periodonto audiniais. Taikant ląstelių/tiriamosios medžiagos netiesioginio kontakto metodą, medžiaga atskiriama nuo ląstelių, pvz. filtru. Šiuo metodu galima tirti ir nesukietėjusias medžiagas, nes tiriamasis pavyzdys nenardinamas į ląstelių kultūrą. Tiriant medžiagų ištraukų (ekstraktų) poveikį ląstelių kultūroms, imituojama klinikinė situacija, kai po medžiagos sukietėjimo išsiskyre cheminiai junginiai veikia periodonto ląsteles.

Pavyzdžiui, protezuojant virš dantėnų krašto besibaigiančiais vainikėliais tiesioginio protezavimo medžiagų kontakto su dantenomis nėra, bet iš jų išsiskyrusios cheminės medžiagos gali prasiskverbti į periodonto audinius ir sukelti nepageidaujamas reakcijas. Tiriamosios medžiagos gali būti ištirpintos įvairiuose tirpikliuose, ląstelių kultūrų terpėje, distiliuotame vandenyje ar fiziologiniame tirpale (119).

Citotoksiniam odontologinių medžiagų ar jų ekstraktų poveikiui nustatyti naudojami įvairūs metodai, kuriais įvertinami morfologiniai ir ląstelių gyvybingumo, dauginimosi bei funkciniai pakitimai. Ląstelių gyvybingumo tyrimo metodai gali būti skirstomi į (120):

- Membranų vientisumo tyrimai (dažymas tripano mėliu, fluorescuojančiais dažais; LDH (laktatdehidrogenazės) išsiskyrimo testas).
- Ląstelės funkcijų tyrimai (testai su tetrazolio druskomis: MTT, XTT).
- DNR žymėjimas (fluorescuojantys konjugatai).
- Morfologijos tyrimas (mikroskopinis stebėjimas).
- Reprodukcijos tyrimai (kolonijų formavimas).

Dažniausiai atliekami ląstelių membranos vientisumo ir ląstelės funkcijų tyrimai (121). Ląstelių membranos vientisumą vertinantys metodai paremti ląstelės gebėjimu neišleisti netirpių ekstraląstelinių molekulių. Šie metodai gali būti kolorimetriniai ir fluorescenciniai. Tyrimuose naudojami įvairūs dažai (tripano mėlis, propidžio jodidas, akridino oranžas). Pažeistos ląstelės dėl pakitusio membranos pralaidumo nusidažo, o nepažeistos – nenusidažo. Propidžio jodidas yra fluorescuojantis dažas ir, prisitvirtinęs prie ląstelės DNR, fluorescuoja. Nusidažiusios ir nenusidažiusios ląstelės skaičiuojamos šviesiniu ar fluorescenciniu mikroskopu ir tūkmės citometru.

Ląstelės funkcijų tyrimai matuoja fermentų aktyvumo ar metabolitų koncentracijos pokyčius dėl toksinio tiriamosios medžiagos poveikio (115). Plačiausiai tarp funkcinių ląstelės gyvybingumo tyrimų naudojamas MTT (-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo) tyrimas (122). Kolorimetriniu MTT tyrimu nustatomas ląstelių gyvybingumas, vertinant mitochondrijų sukcinato dehidrogenazės aktyvumą. Šis tyrimas paremtas vandenyje tirpios metiltiazolio tetrazolio druskos vartimu netirpiu formazanu. Pastarasis ištirpinamas ir jo koncentracija nustatoma spektrofotometru. Susidariusio formazano kiekis tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių skaičiui. Negyvos ląstelės nesugeba skaidyti įvairių tetrazolio druskų (122).

Medžiagų citotoksiškumo tyrimuose svarbu nustatyti ir koku būdu žūsta pažeistos ląstelės.

### *Ląstelių žūtis (119, 121, 123)*

Svarbiausias ląstelių žūties tyrimų uždavinys – atpažinti, kuri ląstelė yra gyva, o kuri jau žuvusi. Žuvusiomis laikomos ląstelės, turinčios bent vieną šių požymių: 1) ląstelė prarado membranos integralumą (kitai – „prakiuro“ ląstelę gaubianti plazminė membrana); 2) ląstelė ir jos branduolys subyrėjo į atskirus kūnelius; 3) ląstelės liekaną (-as) prarijo kita ląstelė *in vivo* (123). Pastaruosius du požymius galima aptikti mikroskopu, o membranos integralumą galima įvertinti biocheminiais metodais arba, kaip jau buvo minėta, dažant tam tikrais dažais.

Apoptozė – tai vadinamoji I tipo programuota žūtis, kuriai prasidėjus ląstelėje aktyvuojami saviti fermentai ir imamos skaidyti ląstelę sudarančios medžiagos (123). Skaidymo produktai pasiskirsto tarp membrana apgaubtų kūnelių ir taip citoplazmos medžiagos nepatenka už plazminės membranos ribų į tarpląstelinę medžiagą. Apoptozę lengva atpažinti nesudėtingu optiniu mikroskopu iš ryškių ląstelės sandaros pokyčių. Baigiantis apoptozei, ląstelė suskyla į membrana apgaubtus apoptozinius kūnelius, į kuriuos „supakuojamos“ branduolio, mitochondrijų ir kitų organelių liekanos. Apoptozinius kūnelius fagocituoja aplinkinės ląstelės ar makrofagai. Dažniausiai apoptozė nustatoma nudažius gyvas ląsteles fluorescuojančiais dažais, kurie prisijungia prie DNR. Pro fluorescencinį mikroskopą matomos ryškios kondensuoto ir fragmentuoto chromatino sancaupos. Taip pat apoptozę galima nustatyti ir įvertinant kaspazių aktyvumą (119).

Nekrozė yra apibrėžiama kaip ląstelės žūtis be apoptozės ar autofagijos (II tipo programuotos žūties formos) požymių (123). Dažnai nekrozė laikoma atsitiktine, pasyvia ląstelės žūtimi, kuri ištinka ląstelę tuomet, kai kenksmingas poveikis būna itin stiprus ir viršija ląstelės galias išgyventi arba žūti. Tada plazminė membrana prakiūra ir citoplazma išsilieja už ląstelės ribų. Gyvame organizme to neturi būti, todėl prasideda uždegimas, kurį skatina citoplazmoje buvusios uždegiminės molekulės (123). Lengviausia nekrozę aptikti dažant ląsteles fluorescenciniais dažais. Kai kurie iš jų, pavyzdžiui, akridino oranžas, lengvai ir greitai patenka į gyvas ląsteles, o kiti, pavyzdžiui, propidžio jodidas, į ląstelę patekti gali tik tada, kai jos plazminė membrana pažeidžiama. Tad nudažius ląsteles tokių dviejų dažų mišiniu, galima lengvai atskirti gyvas ir negyvas ląsteles bei nustatyti apoptozę. Neapoptozinės negyvos ląstelės paprastai laikomos nekrozinėmis.

### *Citotoksiškumo tyrimų apžvalga*

Naujai sukurtų kompozicinių medžiagų ir stiklo jonomerų galimas kenksmingas poveikis pulpos audiniams tyrinėtas jau seniai (124). Vertinant įvairių cementavimo medžiagų biosuderinamumą daugiausiai buvo naudojami ląstelių gyvybingumo tyrimai (125). Cementų biosuderinamumas gali būti nustatomas taip pat naudojant citokinų išsiskyrimo matavimo metodą. Taip siekiama imituoti



uždegimines reakcijas eksperimentiniuose modeliuose, kai naudojamos dvi skirtingos ląstelių grupės: dantenu fibroblastai ir burnos keratinocitai (13). Reikia paminėti, kad skirtingų donorų ląstelės gali sukelti skirtingus citotoksiškumo rezultatus (126), be to, gali būti skirtumai net toje pačioje ląstelių linijoje (127). Visgi, dauguma tyrėjų pripažįsta, kad fibroblastai yra tinkamos ląstelės pirminiam medžiagų citotoksinių poveikio įvertinimui (115), nes jie turi didelį diferenciacijos laipsnį ir jų reakcijos modelis yra panašesnis į reakcijas stebimas *in vivo* (128).

Stiklo jonomerinių cementų citotoksiškumas buvo tirtas naudojant skirtingas ląstelių rūšis (pulpos bei dantenu ląsteles). Nustatyta, kad stiklo jonomerų citotoksiškumas yra panašus į kitų cementų ir taip pat priklauso nuo kietėjimo stadijos. Nesukietėjęs cementas yra itin citotoksiškas, o sukietėjęs – necitotoksiškas ar tik silpnai citotoksiškas. Priešingai nei cinko fosfatinis cementas, stiklo jonomerai nesukėlė jokių uždegiminių reakcijų net po kelėtos dienų, kontaktuodami su žiurkėnų burnos gleivine (62). Periodonto audinių reakcija į kokybišką podanteninį stiklo jonomerinį užpildą buvo panaši kaip reakcija į sveiko danties (be restauracijų) paviršių (129). Svarbi yra stiklo jonomerų savybė išskirti fluorą ir stabdyti dantų ėduonies aktyvumą (129, 130).

De Boever ir kt. cementų citotoksiškumą tyrė dantenu fibroblastų kultūrose. Nustatyta, kad kompozitai turėjo didesnę citotoksiškumą nei stiklo jonomeriniai ar cinko fosfatiniai cementai (131). Tik ką sumaišytų dvigubo kietėjimo ir šviesoje kietėjančių dervinių cementų pirminis citotoksiškumas buvo didelis, bet po 7 dienų sumažėjo. Schmid-Schwap ir kt. nustatė, kad adheziniai derviniai cementai buvo mažiau citotoksiški nei savaiminio prisirišimo (*self-adhesive*) cheminio ir dvigubo kietėjimo cementai. Dvigubo kietėjimo savaiminio prisirišimo derviniai cementai buvo reikšmingai mažiau citotoksiški nei cheminio kietėjimo. Siekiant sumažinti šviesoje kietėjančių cementų citotoksiškumą, rekomenduojama prailginti cemento polimerizaciją, t. y., ilgiau polimerizuoti šviesa (118).

Nustatyta, kad kai kurie ortodontijoje naudojamų stiklo jonomerinių cementų (Vidrion C, OptiBand ir Band-Lok) komponentai pasižymėjo ir citotoksiniu, ir genotoksiniu poveikiu (132, 133).

Bakopoulou ir kt. ištyrė citotoksinį ir genotoksinį šešių skirtingų cementavimo medžiagų ekstraktų poveikį žmogaus limfocitams. Didžiausiu citotoksiškumu ir genotoksiškumu pasižymėjo derva modifikuoti stiklo jonomeriniai ir derviniai cementai, nors keli stiklo jonomeriniai cementai sukėlė tik nežymius citogenetinius pokyčius (134). Stiklo jonomerinių ir derva modifikuotų stiklo jonomerinių cementų genotoksiškumą ir citotoksiškumą tyrė ir kiti mokslininkai (135-137), galima citotoksiškumo priežastimi įvardindami metakrilato monomerus, tokius kaip 2-hidroksietilmetakrilatas (HEMA) ir trietilenglikolio dimetakrilatas (TEGDMA). Dervinių medžiagų komponentai dėl ne visiškos polimerizacijos

nesusijungia ir, patekę į burną, pasižymi citotoksiškumu ir genotoksiškumu (138). Citotoksinu veikimu pasižymi ne tik monomerai HEMA, TEGDMA, Bis-GMA (bisfenol A-glicidil methakrilatas), bet ir kitos medžiagos, pvz. cheminių reakcijų iniciatoriai (138). Randama nemažai tyrimų, kurių metu nustatyta, kad derva modifikuoti stiklo jonomeriniai cementai į vandeninę terpę išskiria daugiau nei 30 įvairių junginių, tarp jų nepolimerizuotus monomeras, fotoaktyvacijos metu susidarančius reakcijos produktus, įvairius degradacijos produktus, susidarančius dėl sąveikos su maistu, seilėmis ir bakterijomis (139). Žinoma, kad metakrilato monomerai (TEGDMA ir HEMA) yra ir genotoksiškos, ir citotoksiškos medžiagos – sukelia pirmines DNR pažeidimus, mikrobranduolių susidarymą, ląstelių ciklo stabdymą ar net apoptozę. Pagrindinis šių reiškinių mechanizmas – oksidacinis stresas, susidarantis dėl ląstelės redukuoto glutationo atsargų išsekimo ir reaktyvių deguonies formų susidarymo (140, 141).

Įvairių dervinių monomerų citotoksinis poveikis priklauso nuo cheminės medžiagos struktūros ir koncentracijos (140). Kuo daugiau susidaro lipofilinių monomerų, tuo didesnis citotoksinis poveikis. Mažesnės monomerų koncentracijos slopina ląstelių metabolinį aktyvumą, blokuodamos mitochondrijų dehidrogenazių aktyvumą, o, esant didesnėms koncentracijoms, šie monomerai sąveikauja su fosfolipidais, pakeisdami jų vientisumą ir didindami ląstelių membranų pralaidumą (142). Moksliniai tyrimai parodė, kad dervų monomerai, pirmiausia mažindami ląstelių glutationo koncentraciją, sukelia oksidacinį stresą (143, 144). Oksidacinio streso sukeltas citotoksinis poveikis slopinamas reaktyviuoju deguonimi, pvz., N-acetilcisteinu, askorbatu (vitaminu C) (145). Tikslus mechanizmas, kuriuo dervos monomerai sukelia oksidacinį stresą ląstelėse nėra visiškai aiškus. Kitas tyrimas parodė, kad HEMA/Bis-GMA sukelia DNR dvigubos grandinės pertrūkius, kurie bent jau iš dalies paaiškina oksidacinius mechanizmus (146). Be to, metakrilato rūgštis, HEMA degradacijos produktas, taip pat pasižymi genotoksiškumu (147).

Dervų monomerų citotoksinis poveikis pasireiškia per apoptozę ir nekrozę – du pagrindinius ląstelių žūties būdus (148).

## 1.6. Cemento pertekliaus pašalinimas

### *Cinko fosfatinis cementas (CFC)*

CFC, palyginus su kitais cementais, yra tirpus seilėse, todėl dažnai jis naudojamas kaip laikinas cementas. Cementuojant restauracijas šiuo cementu, jam sukietėjus, cemento perteklius pašalinamas zonu ieškikliu bei tarpdančių siūlu. Reikia leisti cementui pilnai sukietėti (CFC kietėjimo laikas yra pakankamai ilgas), nes pernelyg ankstyvas CFC pertekliaus pašalinimas sudaro sąlygas drėgmės patekimui ir defektinio cemento sluoksnio formavimuisi (3, 149).

### *Stiklo jonomerinis cementas (SJC)*

SJC yra populiarūs dėl kariostatinio poveikio. Yra duomenų, kad iš cemento išsiskyrę fluoridai stabdo ir periodontitą sukeliančių bakterijų (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ir *Tannerella forsythia*) prisitvirtinimą prie restauracijos paviršiaus, jų metabolizmą ir dauginimąsi. (149). Šios rūšies cementas gerai prisijungia ir prilimpa prie danties audinių, tačiau dėl jų žemo pH galimas jautrumas pricementavus restauraciją ant gyvų dantų. Įvairių tyrėjų duomenimis, danties jautrumo galimybė po pricementavimo gali būti nuo 3 proc. iki 34 proc. atvejų (150).

### *Dervinis cementas (DC)*

Įrodyta, kad DC cementai sukelia uždegimą periodonte, net nesant cementavimo medžiagos pertekliaus (151). DC pertekliaus pašalinamas yra ypač sudėtingas, gamintojai siūlo naudoti cementus su prepolimerizacijos galimybe – šviesoje kietėjantis arba dvigubo kietėjimo cementas keletą sekundžių polimerizuojamas šviesa ir tuomet cemento perteklius pašalinamas lengviau. Cementavimo metu galimas deguonies inhibicinis poveikis derviniams cementams, todėl po cemento pertekliaus pašalinimo naudojamas apsauginis gelis, kuris tepamas ant restauracijos danties ribos.

### *Cemento pertekliaus pašalinimas, kai vainikėlis tvirtinamas ant implanto*

Be klinikinių metodų, cementavimo medžiagos likučiai gali būti nustatomi rentgenologiškai ar taikant optinės koherencinės tomografijos metodą (152). Norint, kad rentgenologiškai būtų lengviau nustatyti cemento perteklių prie implanto, cementas turi būti pakankamai rentgenokontrastiškas (153). Tačiau rentgeno kontrolė ne visada yra patikimas metodas cementų likučiams nustatyti (105, 154).

Nustatyta, kad cemento pertekliaus pašalinimo metodai (mikrošepetėlių, šepetėlių, zonu, skalpelio geležte) buvo mažiau svarbūs nei paviršiaus poliravimas po pertekliaus pašalinimo (155).

Cementuojant vainikėlius (ar tiltus) ant implantų nerekomenduojama naudoti dervinių cementų dėl to, kad šiuos cementus sunku pamatyti tiek kliniškai, tiek rentgenologiškai. Ypač sunku pašalinti cemento perteklių esant podanteninei vainikėlio krašto lokalizacijai ir išreikštam vainikėlio kontūrai (angl. *undecut*) (86, 93, 105, 156). Nepriklausomai nuo cementavimo medžiagos pertekliui pašalinti naudojamo instrumento ar metodikos, paprastai randami pastebimi implanto atramos įbrėžimai ir likę cemento likučiai (156, 157).

Suformuluotos šios protezų ant implantų cementavimo taisyklės (E. Vindašiūtė-Narbutė) (105):

- Cementuojant vainikėlių cementavimo linija turėtų būti matoma, kad būtų galima tinkamai pašalinti cemento likučius. Tam naudojamos individualios implantų atramos.
- Rentgenologinis cemento likučių vertinimas neturėtų būti laikomas visiškai patikimu metodu, jei cementavimo linija yra periodonto vagelėje/kišenėje.
- Jei tik įmanoma, siekti, kad sutaptų cementavimo krašto ir išorinė vainikėlio linijos (93) .

Nustatyta, kad po cementavimo po dantenomis liekančio cemento kiekis priklauso nuo cemento rūšies, vainikėlio tipo, danties paviršiaus morfologijos, bet ne nuo cemento likučių šalinimo metodo (158, 159).

Taigi, dantenu vagelė po cementavimo turi būti atidžiai patikrinta ir gerai išplauta vandens ir oro srove. Pacientai, turintys fiksuotų restauracijų, profilaktiškai apsilankyti pas gydytoją ortopedą ar periodontologą turėtų kas 6 mėnesius. Retesni vizitai padidina eduonies ar periodonto ligos atsiradimo ir progresavimo riziką (84). Profilaktinių patikrinimų dažnumas, ypač pacientams, sergantiems periodonto ligomis, turi būti koordinuojamas protezuojančio gydytojo ir gydytojo periodontologo (160).

### 1.7. Cementavimo medžiagų parinkimas

Parentant cementavimo medžiagą reikia įvertinti cementų fizines (mechanines) savybes, biosuderinamumą ir klinikinės situacijos ypatumus. Apibendrintos cemento parinkimo rekomendacijos pateiktos 1 pav. schemeje (2, 3, 12, 18, 28, 33, 140, 161).

	CFC	SJC	DMSJC	DC	Sav. ėsd. DC
Pavienis vainikėlis ar nedidelis DFP / nėra dantų jautrumo / gera retencija	✓	✓	✓	✓	✓
Pavienis vainikėlis ar nedidelis DFP / yra dantų jautrumas / gera retencija	✗	✗	✓	✗	✓
Pavienis vainikėlis ar nedidelis DFP / nėra dantų jautrumo / bloga retencija	✗	✓	✓	✓	✓
Pavienis vainikėlis ar nedidelis DFP / yra dantų jautrumas / bloga retencija	✗	✗	✓	✗	✓
Didelės apimties DFP/nėra dantų jautrumo/gera retencija	✓	✓	✓	✓	✓
Didelės apimties DFP / yra dantų jautrumas / gera retencija	✗	✗	✓	✗	✓
Didelės apimties DFP / nėra dantų jautrumo / bloga retencija	✗	✗	✓	✗	✓
Keramikos protezai	✗	✗	✗	✓	✓
Protezai ant implantų	✓	✓	✓	✓	✓
Dantų atstatymas: (1) KKĮ	✓	✓	✓	✓	✓
(2) SP	✗	✗	✓	✓	✓
Cirkonio keramikos protezai	✗	✓	✓	✓	✓

✓ – labiausiai tinkamas, ✓ – tinkamas, ✗ – nerekomenduojamas.

CFC – cinko fosfatinis cementas, SJC – stiklo jonomerinis cementas, DMSJC – derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas, DC – dervinis cementas.

DFP – dalinis fiksuotas protezas, KKĮ – kaištinis kultinis įklotas, SP – stiklo pluošto kaištis.

### 1 pav. Cementavimo medžiagų parinkimas

## 2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

### 2.1 Cementavimo medžiagų dėvėjimasis

Tyrimas buvo atliktas Šiaurės šalių odontologinių medžiagų tyrimo institute NIOM (*Nordic Institute of Dental Materials*, Oslas, Norvegija). Tyrimui buvo pasirinktos penkios skirtingos cementų rūšys. Kiekvienos rūšies cementas pristatytas 1 lentelėje.

**1 lentelė.** Dėvėjimosi tyrime testuoti dantų protezų cementai

<b>Cemento rūšis</b>	<b>Cemento kodas</b>	<b>Produkto pavadinimas</b>	<b>Gamintojas</b>
Cinko fosfatinis cementas	CFC	DeTrey®Zinc Crown & Bridge Fixodont ® Plus	Dentsply De Trey GmbH
Stiklo jonomerinis cementas	SJC	GC Fuji I	GC Corporation
Derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas	DMSJC	GC Fuji Plus	GC Corporation
Kompomerinis cementas	KC	Dyract®Cem	Dentsply De Trey GmbH
Dervinis cementas	DC	Panavia®21	Kuraray Co, Ltd.

Toliau tekste cementavimo medžiagai apibūdinti bus nurodomas tik cemento kodas.

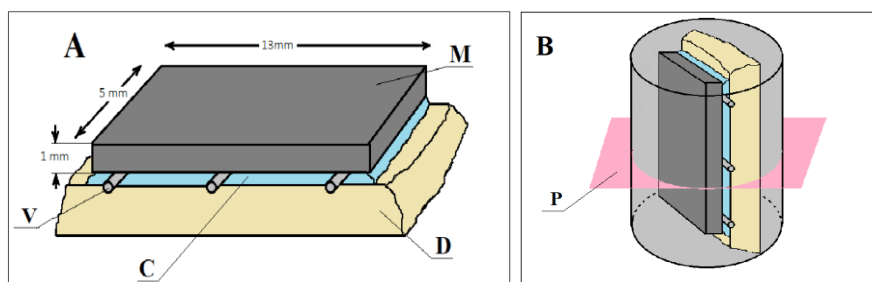
Tyrimo naudotas dantų valymo dėvėjimosi modelis *in vitro*, imituojantis trijų paviršių dėvėjimąsi, vykstantį burnoje dantų valymo metu. Ruošiniai buvo testuojami automatiname dantų valymo įrenginyje, toks pagal standartinę metodiką naudojamas dantų pastų abrazyvumo tyrimuose (162).

### 2.1.1. Eksperimentiniai ruošiniai

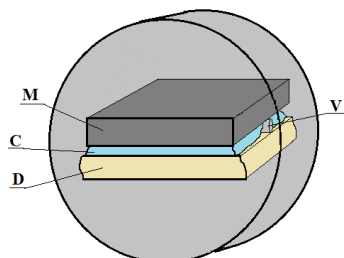
Eksperimentinis ruošinys, imituojantis vainikėlio krašto perėjimą į dantį, buvo pagamintas restauracinę medžiagą (paladžio-sidabro lydinio plokštelę) cementuojant prie dentino blokelių. Dentino blokeliai (~ 15 × 5 × 3 mm) buvo išpjauti iš sveikų priekinių raguočių dantų rotuojančiu deimantiniu disku (*Accutom, Struers*, Danija) gausiai aušinant vandeniu ir nugludinti šlifavimo bei poliravimo popieriumi (*Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers*, Danija. Grūdelių dydis 500). Dentino paviršiaus lygumas buvo patikrintas profiline projektoriumi (6C-2, *Nikon, Nippon-Kogaku*, Japonija). Ruošinių gaminimui buvo naudojami blokeliai, turintys plokščią lygią dentino sienelę. Paladžio-sidabro lydinio plokštelė (*Will-Ceram® W-1, Williams®*, Ivoclar Šiaurės Amerika, Niujorkas, JAV), naudojama metalo keramikos vainikėlių gamybai, buvo naudojama kaip dantų protezas. Standartinė lydinio plokštelė (13×5×1 mm) buvo nulyginta ir nupoliruota drėgnu šlifavimo bei poliravimo popieriumi (*Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers*, Danija. Grūdelių dydis 500). Metalo paviršiaus lygumas taip pat buvo patikrintas profiline projektoriumi (6C-2, *Nikon, Nippon-Kogaku*, Japonija). Paruoštos metalo plokštelės buvo pricementuotos prie dentino blokelių.

Cementavimo medžiagos buvo dozuojamos ir maišomos pagal gamintojų rekomendacijas. Siekiant užtikrinti tikslų rekomenduojamą miltelių ir skysčio santykį, milteliai buvo sveriami kiekvienai maišymo porcijai. Cementai buvo maišomi ranka.

Protezo tikslumo įtakai cementų dėvėjimuisi įvertinti imituoti skirtingi cementu užpildyto tarpo dydžiai – 100 μm ir 250 μm. Siekiant užtikrinti tikslų cemento sluoksnio storį, cementuojant metalo plokštelę prie dentino paviršiaus kaip tarpinės buvo panaudotos 100 μm ir 250 μm skersmens vielutės (2 pav., A.). Cemento



**2 pav.** Ruošinio paruošimas: A – 1 etapas, B – 2 etapas (P – pjūvis).  
M – metalo plokštelė, C – cementas, D – dentinas, V – viela (Ø 100/250 μm)

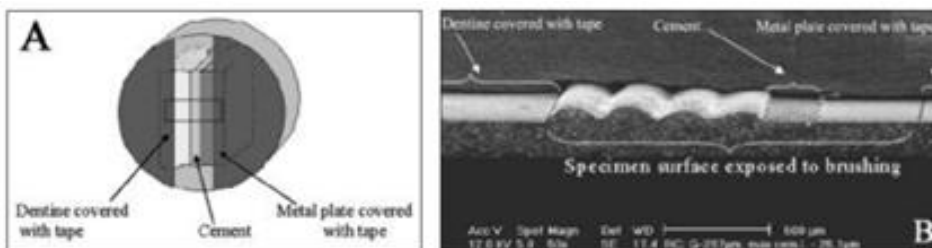


**3 pav.** Ruošinio struktūra:

M – metalo plokštelė, C – cementas, D – dentinas, V – viela (Ø 100/250 µm)

kietėjimo metu ant metalinės plokštelės buvo uždėtas 2 kg svoris. Sukietėjus cementui, dantino-cemento-metalo blokelis dvi valandas laikytas 37°C temperatūros distiliuotame vandenyje. Po to blokelis buvo panardintas į šaltos polimerizacijos epoksidinį plastiką (*Epofix, Struers, Danija*) (2 pav., B). Plastikui sukietėjus, blokelis deimantiniu disku supjaustytas į kelias dalis. Tokiu būdu buvo gauti eksperimentiniai ruošiniai dėvėjimosi testui atlikti (3 pav.).

Kiekvieno ruošinio paviršius nugludintas palaispniui drėgnai šlifuojant vis švelnesniu šlifavimo ir poliravimo popieriumi (grūdelių dydis 500, 1 000 ir 4 000). Paviršiaus lygumas patikrintas optiniu mikroskopu. Cemento sluoksnio storis, rodantis kraštinį vainikėlio tikslumą, padidinus 50 kartų profiliniu projektoriumi, buvo tikrinamas kiekvieno ruošinio trijuose taškuose (kiekviename gale ir per vidurį). Tolesniam tyrimui buvo atrinkti tik tie ruošiniai, kurių cemento sluoksnio storis buvo  $100 \pm 25 \mu\text{m}$  ir  $250 \pm 25 \mu\text{m}$  ribose. Atrinkta 60 tikslumo reikalavimus atitinkančių ruošinių (po 12 kiekvienam cementui, po 6 kiekvieno storio cemento sluoksnio). Prieš testavimą ruošiniai dvi savaites laikyti 37 °C distiliuotame vandenyje. Prieš atliekant dėvėjimosi testą, dalis ruošinio paviršiaus iš abiejų pusių



**4 pav.** A - testavimo zonos paruošimas (ruošinio šonai padengti adhezine juostele).

B – ruošinio fragmento atspaudas.

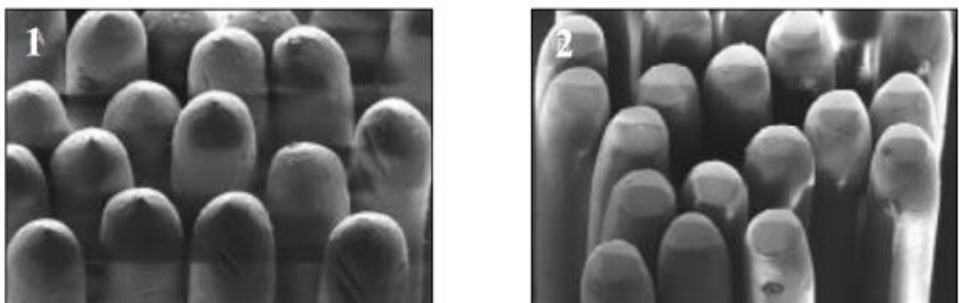


padengta plona adhezine juostele taip, kad nepadengtas ruošinio paviršius, t. y. 2–3 mm pločio ruošinio fragmentas, susidedantis iš metalo, cemento sluoksnio ir dentino, būtų apribotas nesidėvinčia medžiaga ir būtų lengvai matomas dėvėjimosi efektas (4 pav.).

### 2.1.2. Dėvėjimosi testas

Ruošiniai buvo testuojami automatiniame dantų valymo įrenginyje naudojant standartizuotą dantų pastą (162) ir vidutinio kietumo lygios šerelių formos dantų šepetėlius (*Jordan\*Classic, Jordan*). Šepetėlių šerelių skersmuo – ~ 200 μm, šerelių galai – užapvalinti. Šepetėliai buvo keičiami po trijų ruošinių testavimo, t. y. kiekvienoje eksperimentinėje šešių ruošinių grupėje kiekvienam atskiram cementui ir tarpo dydžiui, du ruošiniai buvo testuojami nauju šepetėliu, du – šepetėliu, naudotu antrą kartą, ir du ruošiniai trečią kartą naudotu šepetėliu. Dantų pastos ir vandens mišinys (25g/40 ml) kiekvienam ruošiniui buvo keičiamas nauju. Dantų šepetėlis, tolygiai liesdamas ruošinio paviršių judėjo pirmyn atgal lygiagrečiai cemento sluoksniui 150 judesių/min. greičiu. Valymo ciklas truko dvi valandas. Dantų šepetėlio šerelių skenuojamojo elektroninio mikroskopo (SEM) nuotraukos prieš valymo ciklą ir po jo matyti 5 paveiksle.

Mūsų skaičiavimais, remiantis vidutine dantų valymo trukme – 60 sek., dažnumu bei intensyvumu – 2 x dieną, 4–6 brūkštelėjimai/sek. (163), vidutiniu 30 mm dantų šepetėlio galvutės dydžiu bei vidutiniu valymo plotu (164), eksperimente naudotos dvi nepertraukiamos valymo valandos gali atitikti 3,5 metų įprastinio dantų valymo burnoje.

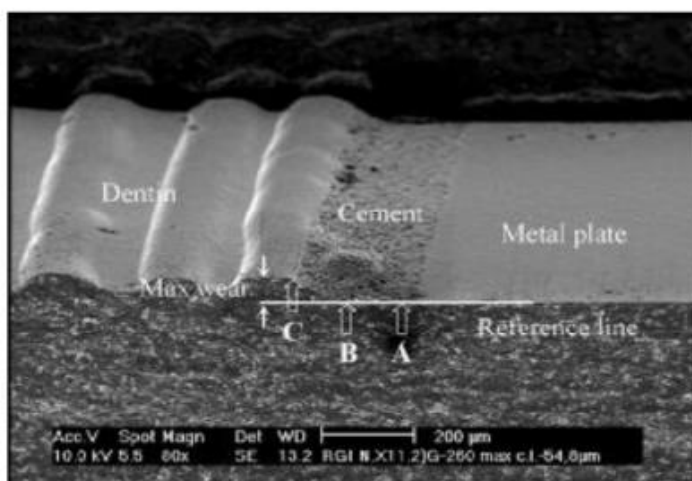


5 pav. Dantų šepetėlio šereliai prieš (1) ir po (2) valymo ciklo (SEM)

### 2.1.3. Dėvėjimosi matavimai

Po testavimo dantų valymo įrenginyje, nuėmus adhezinę juostelę, nuo ruošinio paviršiaus elastine atspaudine mase (*Permadyne Garant 2:1, ESPE, Seefeld, Vokietija*) nuimtas atspaudas (165), kuris toliau buvo analizuojamas skenuojamuoju elektroniniu mikroskopu (SEM) (*Philips XL 30, Philips Electron Optics, Eindhovenas, Nyderlandai*). Kiekvieno ruošinio 2-3 mm pločio atspaudu fragmentai buvo padengti 20 nm aukso paladžio lydinio sluoksniu (*SCD 050 Sputter Coater, Balzers AG, Balzeris, Lichtenšteinas*) tolesnei analizei SEM.

Bandomojo eksperimento duomenys parodė, kad cementas atskirose tarpo vietose dėvėjosi skirtingai. Todėl cemento dėvėjimasis buvo matuojamas trijuose skirtinguose taškuose: metalo ir cemento riboje (matavimo taškas A), cemento sluoksnio viduryje (matavimo taškas B) ir cemento ir dentino riboje (matavimo taškas C) (6 pav.). Cemento dėvėjimasis, t. y. cemento ištrupėjimas  $\mu\text{m}$ , matuotas trijuose minėtuose taškuose (A, B ir C) plokštumoje, statmenoje nesidėvinčio metalo plokštelės paviršiui. Visi matavimai atlikti vieno tyrėjo mikroskopu padidinus 300 kartų. SEM vaizdai, reprezentuojantys skirtingų cementų dėvėjimąsi, buvo nufotografuoti.



**6 pav.** Cemento dėvėjimasis po valymo ciklo matavimo taškuose  
A – metalo/cemento riboje; B – cemento viduryje; C – cemento/dentino riboje

Cementavimo medžiagų biosuderinamumo tyrimai buvo atliekami bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriumi ir Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centru. Cementavimo medžiagų biosuderinamumui įvertinti buvo atlikti tyrimai, imituojantys ir tiesioginį, ir netiesioginį periodonto ląstelių santykį su tiriamaisiais cementais. Citotoksiškumo tyrimams buvo pasirinktas *in vitro* ląstelių kultūros metodas, panaudojant žmogaus dantenu fibroblastus (ŽDF) (166-169). Tyrimui atlikti gautas Vilniaus universiteto Biomediciniųjų tyrimų Etikos komiteto leidimas (Nr. 158200-11-116-28).

Pirmiausia buvo tiriamas kietų cementavimo medžiagų poveikis ŽDF, po to – šių cementų ekstraktų poveikis ląstelių gyvybingumui ir žūties pobūdžiui.

## 2.2. Tyrimai naudojant kietas cementavimo medžiagas

### 2.2.1. Cementų pavyzdžių paruošimas

Biosuderinamumo tyrimuose buvo testuojamos trys pastoviam dantų protezų cementavimui naudojamos medžiagos, priskiriamos trimis skirtingoms cementų rūšims: Hoffmanno cinko fosfatinis cementas (cinko fosfatinų cementų (CFC) grupė), GC Fuji PLUS derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas (derva modifikuotų stiklo jonomerinių cementų (DMSJC) grupė) ir 3M ESPE RelyX Unicem dervinis cementas (dervinių cementų (DC) grupė) (2 lentelė). Toliau tekste, apibūdinant cementavimo medžiagą, bus nurodomas tik cemento kodas.

Visos cementavimo medžiagos buvo maišomos pagal gamintojų rekomendacijas. Hoffmanno CFC, Fuji Plus DMSJC buvo maišomi ranka, o RelyX Unicem DC – specialiaame automatiname maišymo įrenginyje. Sumaišyta cementavimo medžiaga įlieta į laboratorinės plokštelės šulinėlius (įdubimus). DC mėginiai polimerizuoti odontologine polimerizavimo lempa (*3M ESPE Elipar FreeLight*). Ląstelių gyvybingumo tyrimui buvo naudotos 96 šulinėlių laboratorinės plokštelės, pH matavimams ir analizei SEM – 24 šulinėlių plokštelės (*Orange Scientific*, Belgija).

Skirtingų cementų citotoksiškumui vertinti pagaminti 144 tiriamieji pavyzdžiai. Vienas iš tyrimo tikslų buvo įvertinti, ar sukietėjusių cementų paviršiaus nuplovimas gali turėti įtakos ląstelių išgyvenamumui, todėl pusės – 72 tiriamųjų pavyzdžių – cementų paviršius buvo nuplautas fiziologiniu tirpalu (20 × 200 μl). Likusių 72 pavyzdžių cementai nuplauti nebuvo. Cementų poveikis ląstelėms buvo vertinamas po 1, 6 ir 12 valandų.

**2 lentelė.** Tirtos cementavimo medžiagos ir jų cheminė sudėtis

<b>Cemento pavadinimas (kodas)</b>	<b>Gamintojas</b>	<b>Cheminė sudėtis</b>
Hoffmann cinko fosfatinis cementas (CFC)*	Hoffmann Dental Manufactur, Berlynas, Vokietija	Milteliai: cinko oksidas, magnio oksidas. Skystis: ortofosforo rūgštis.
GC Fuji PLUS derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas (DMSJC)**	GC CORPORATIO N, Tokijas, Japonija	Kondicionierius: citrinų rūgštis, distiliuotas vanduo, geležies chloridas, maistiniai dažai. Milteliai: fluoro aliuminio silikatas (amorfinis). Skystis: 2 hidroksietilmetakrilatas, distiliuotas vanduo, poliakrilo rūgštis, uretano dimetakrilatas.
RelyX Unicem dervinis cementas (DC)***	3M ESPE, Sent Polas, Minesota, JAV	Milteliai: šarminiai, silanuoti užpildai, polimerizacijos iniciatoriai, pigmentai. Skystis: metakrilato monomerai, turintys fosforo rūgšties, polimerizacijos iniciatoriai ir stabilizatoriai.

\* Produkto informacija.

\*\* GC Materials Safety Data List: <http://www.gcamerica.com/downloads/sds/index.php>

\*\*\* Technical Product Profile RelyX Unicem: RelyX Unicem\_TPP\_EBU\_final.pdf

### 2.2.2 Ląstelių kultūros paruošimas

Žmogaus dantų fibroblastai (ŽDF) buvo išskirti iš dantų biopsinės medžiagos, paimtos iš sveikos moters taikant eksplanto metodą (170). Dantų gabalėlis (2–4 mm<sup>3</sup>) transportavimui įdėtas į mitybinę terpę (DMEM, *Invitrogen/Life Technologies*, JAV), papildytą fetaliniu veršelio serumu (FVS), 250 U/ml penicilinu, 0,25 mg/ml streptomycinu ir 200 U/ml nistatinu. Dantų gabalėlis steriliai susmulktas, perfiltruotas per nailono filtrą ir augimui įdėtas į Iskove DMEM mitybinę terpę, papildytą 10 proc. FVS bei antibiotikais, inkubuotas 37° C, 5 proc. CO<sub>2</sub> atmosferoje termostate. Išaugusių dantų fibroblastų ląstelės padaugintos persėjimo būdu. Eksperimentui buvo naudojamos 6 – 10 generacijos fibroblastų ląstelės.

### 2.2.3. Testavimo sąlygos

Cementavimo medžiagos buvo testuojamos dvejomis skirtingomis sąlygomis – nuplovus cemento paviršių (pirma sąlyga) ir nenuplovus (antra sąlyga). Cemento paviršiams plauti buvo naudotas fiziologinis tirpalas. Taigi, nuplautų cementų grupėje, prieš užsėjant fibroblastus, cementų paviršius buvo gausiai nuplautas fiziologiniu tirpalu (pirma testavimo sąlyga), o neplautų cementų grupėje fibroblastai buvo užsėti ant neplautų cementų paviršių (antra testavimo sąlyga).

### 2.2.4. Citotoksiškumo tyrimai

#### 2.2.4.1. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas MTT metodu

Prieš užsėjant ląstelių kultūrą, laboratorinės ląstelių auginimo plokštelės su cementais 15 min. buvo sterilizuojamos ultravioletine šviesa. 100 ml paruoštos žmogaus dantenų fibroblastų (ŽDF) suspensijos ( $6-7 \times 10^4$  ląst./ml) buvo užsėtos ant cementų paviršių. Ląstelės inkubuotos vienai, šešioms ir 12 val. Kontrolinėje grupėje ŽDF buvo užsėti į šulinėlius be cemento.

Toksinis cementų poveikis buvo vertinamas panaudojant tetrazolio druską MTT (3-(4,5-dimetiltiazolio-2-il-)-2,5-difeniltetrazolio bromidas) (MTT; *SigmaAldrich Inc.*, JAV) tiesioginio kontakto metodika pagal tarptautinį standartą (ISO-10993-5:1999) (171). MTT testas priklauso ląstelės funkcijų tyrimo metodų grupei ir yra paremtas gyvybingų ląstelių mitochondrijų sukcinato dehidrogenazės (SDH) pajėgumu vandenyje tirpią geltonos spalvos metiltiazolio tetrazolio druską skaidyti į netirpų mėlynos spalvos formazaną. SDH aktyvumas parodo ląstelių mitochondrijų funkciją. Susidaręs formazano nuosėdų kiekis yra tiesiogiai proporcingas ląstelių gyvybingumui. Gyvybingų ląstelių kiekis eksperimente buvo nustatomas po 1-os, 6-ių ir 12 val. Po inkubacijos, nuosėdos tirpinamos ir gauto spalvoto tirpalo optinis tankis (OT) matuojamas spektrofotometru (TECAN *Infinite* 200 PRO) esant 570 nm bangos ilgiui. Optinio tankio duomenis cemento aplinkoje adaptavus pagal kontrolę (ruošiniai be cementų) buvo apskaičiuotas ląstelių išgyvenamumo rodiklis (LIR%). LIR% – tai cemento aplinkoje išgyvenusių ląstelių santykis su kontrolinio ruošinio ląstelių kiekiu, išreikštas procentais ( $LIR\% = OT_{\text{cemento}}/OT_{\text{kontrolės}} \times 100$ ) Taigi, LIR% parodo ląstelių išgyvenamumą tiriamojo cemento aplinkoje, adaptavus jį pagal kontrolę, t. y. ląstelių išgyvenamumą aplinkoje be cemento. Didesnė LIR% reikšmė reiškia didesnę ląstelių išgyvenamumą, vadinasi ir mažesnę citotoksiškumą (172). Ląstelių išgyvenamumo rodiklis (LIR%) buvo apskaičiuotas kiekvienam cementui ir kiekvienam stebėjimo laikui (po 1, 6 ir 12 val.) nuplautų ir nenuplautų cementų grupėse.

#### 2.2.4.2. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas dažymo metodu

Ląstelių gyvybingumas taip pat buvo įvertintas dažymo metodu. 100 µl ŽDF ląstelių suspensijos buvo paskirstyta ant cementų paviršių 96-ių šulinėlių ląstelių auginimo plokštelėje. Po 1, 6 ir 12 val., ląstelių monosluoksnis buvo atskirtas tripsino/EDTA (*Life Technologies Corp.*, JAV) mišiniu (1:9), suspensija centrifuguota ir gautos ląstelės patalpintos į augimo terpę (25 µl). Po to, 2 µl akridino oranžo (AO) ir etidžio bromido (EB) (*Life Technologies Corp.*, JAV) dažų mišinio (100 µg/µl kiekvieno dažo ištirpdyto fiziologiniame tirpale ir sumaišyto lygiomis dalimis) buvo įdėta į 10 µl testuojamos ląstelių suspensijos ruošinį. Akridino oranžas (AO) prasiskverbia pro ląstelės sienelės ir jungiasi su DNR bei RNR. AO susijungus su DNR, gyvybingų ląstelių branduoliai įgauna fluorescuojančią žalią taisyklingos apvalios formos struktūrą. Etidžio bromidui (EB) prisijungus prie DNR, matoma fluorescuojanti raudonai oranžinė spalva. EB nedažo gyvybingų ląstelių, todėl jis identifikuoja ląsteles, kurių membranos pralaidumas yra pažeistas. Taigi šių dviejų dažų kombinacija padeda identifikuoti gyvybingas ląsteles (žalia spalva) ir žuvusias, t. y. nekrozinės ar apoptozinės ląsteles (oranžinė spalva) (173). Vaizdai analizuoti inversiniu šviesiniu mikroskopu (*Eclipse TS100, Nikon*, Japonija) ir nufotografuoti.

#### 2.2.4.3. Ląstelių morfologijos įvertinimas SEM

Dantenu fibroblastų ląstelės (6–7 x 10<sup>4</sup> ląstelių/ml) buvo patalpintos į 24 šulinėlių laboratorinės ląstelių auginimo plokštelės šulinėlius ant cementų paviršiaus. Šulinėliai su fibroblastais, bet be cemento dugne, buvo naudojami kaip kontroliniai mėginiai. Po 6 valandų inkubacijos pavyzdžiai buvo paruošti analizei SEM (*Hitachi, TM-1000*). Augimo terpė pašalinta ir šulinėliai skubiai pripildyti fiksatoriaus (2,5 proc. glutaraldehido) vandeniniu tirpalu (*Sigma-Aldrich Inc.*, JAV). Pavyzdžiai inkubuoti kambario temperatūroje 60 min., po to 15 min. skalauti distiliuotu vandeniu. Toliau 60 min. pavyzdžiai buvo fiksuoti OsO<sub>4</sub> (*Sigma-Aldrich Inc.*, JAV), tris kartus po 15 min. skalauti distiliuotu vandeniu ir dehidratuoti etanolium (pradedant 25 proc. tirpalu, vėliau 50 proc. ir 75 proc. po 10 min. ir 2 val 96 proc. etanolio tirpalu). Paskiausiai, pavyzdžiai išdžiovinti kritinio taško drėkintuve (K850, *Quorum Technologies*), padengti 20 nm aukso sluoksniu naudojant purškiamąjį padengiklį (Q150R, *Quorum Technologies*) ir analizuoti SEM.

#### 2.2.4.4 Cementų rūgštingumo įvertinimas

Cementų paviršiaus rūgštingumo pokyčiams įvertinti sukietėjusių cementų, nenuplautų ir nuplautų, paviršiaus pH matavimai buvo atliekami pH matavimo aparatu (Knick 766, Calimatic, Vokietija) po 1-os, 3-jų, 6-ių, 12, 24 ir 48 valandų.

pH matavimams cementai buvo patalpinti į 24-ių šulinėlių laboratorines plokšteles. Kiekvieno cemento paviršius buvo užlietas 500 µl laštelių augimo terpe (Iskove modifikuota Dulbeko mitybinė terpė, IDMEM; *SigmaAldrich Inc.*, JAV).

### 2.3. Tyrimai su cementavimo medžiagų ekstraktais

Šiuose tyrimuose buvo testuojamos tos pačios cementavimo medžiagos, kaip ir ankstesniuose eksperimentuose (2 lentelė), tik buvo naudojami šių cementų ekstraktai. Buvo testuojami dviejų koncentracijų, 100 proc. ir 50 proc., cementų ekstraktai.

#### 2.3.1. Cementų ekstraktų paruošimas

Tiriamieji cementai, paruošti detaliai laikantis gamintojų instrukcijų, buvo patalpinti į 12 šulinėlių laštelių auginimo plokšteles (*Orange Scientific*, Bren l'Alè, Belgija). Cementai buvo sterilizuojami ultravioletine šviesa 1 val. Tada į kiekvieną šulinėlį su cementu buvo patalpinta 3 ml laštelių kultūrų mitybinės terpės (1 g/L gliukozės DME papildyta 10 proc. FVS, 100 U/ml penicilinu, 100 ug/ml streptomycinu ir 2 mM L-gliutaminu) (*Biochrom*, Berlynas, Vokietija) ir inkubuota drėgnoje 37 °C 5 proc. CO<sub>2</sub> atmosferoje termostate 1 val. Po inkubacijos, ekstraktai buvo surinkti ir filtruojami pro 0,2 µm porų dydžio filtrą (Sarstedt, Niumbrechtas, Vokietija). Citotoksiškumo tyrimams buvo naudojami 100 proc. ir 50 proc. ekstraktai, atskiesti laštelių mitybine terpe.

#### 2.3.2. Laštelių kultūros paruošimas

Laštelių kultūra tyrimams su cementų ekstraktais buvo ruošiama panašiai kaip ir testuojant kietas cementavimo medžiagas.

Pirminiai žmogaus dantenų fibroblastai (ŽDF) buvo gauti iš sveiko dantenų audinio taikant eksplanto metodą. Naudojantis chirurgine mentele, dantenų audinys buvo atskirtas nuo dantenų epitelio, padalytas į tris (3–4 mm<sup>3</sup> dydžio) dalis, kurių kiekviena patalpinta į 35 mm skersmens laštelių auginimo lėkštelę su anksčiau aprašyta laštelių mitybine terpe. Laštelės kultivuojamos drėgnoje 5 proc. CO<sub>2</sub> atmosferoje, 37 °C termostate, terpę keičiant du kartus per savaitę. Persėjant, laštelės buvo tris kartus plaunamos fosfatiniu buferiu (PBS, Sigma Aldrich), atskirtos nuo kultivavimo paviršiaus 0,25 proc. tripsino/1 mM EDTA tirpalu

(Gibco, Life technologies), suspenduojamos su šviežia ląstelių kultūrų mitybine terpe ir patalpinamos į ląstelėms auginti skirtus plastikinius indus. Tolesniems eksperimentams buvo naudojami 4-o, 5-o ir 6-o pasažo ŽDF.

### 2.3.3. Ląstelių metabolinių pokyčių įvertinimas

Šiam eksperimentui žmogaus dantenų fibroblastai (ŽDF) buvo pasėti į 96-ių šulinėlių ląstelių auginimo laboratorinę plokštelę (Orange Scientific) ( $2 \times 10^3$  ląst./šul. tankumu) ir inkubuoti 72 val. 37°C drėkinamoje aplinkoje, turinčioje 5 proc. CO<sub>2</sub>. Po to vietoj mitybinės terpės į kiekvieną šulinėlį su ląstelėmis įpilta po 200 μl skirtingų cementų ekstraktų. Eksperimente naudoti dviejų koncentracijų – 100 proc. ir 50 proc. – cementų ekstraktai. Ląstelių kultūra be cementų ekstraktų naudojama kaip kontrolė. Kontroliniuose šulinėliuose ląstelių kultūrų mitybinė terpė atitinkamai buvo pakeista tokia pat šviežia terpe.

Cementų ekstraktų citotoksiškumas nustatytas *PrestoBlue* ląstelių gyvybingumo reagentu (*Life Technologies*), laikantis gamintojo protokolo. Fluorescencija buvo įvertinta *Fluoroskan Ascent FL* mikroplokštelių skaitytuvu (*Termo Labsystems*, Franklinas, Masačūsetsas) (sužadinimas esant 544 nm bangos ilgiui, emisija – esant 620 nm bangos ilgiu). Fluorescencijos intensyvumas matuojamas po 1, 6, 12 ir 24 val. inkubacijos su skirtingų cementų ekstraktais.

Rezultatai pateikti atlikus du nepriklausomus eksperimentus.

### 2.3.4. Ląstelių žūties būdo įvertinimas

Tiesioginiam ląstelių stebėjimui (TLS) konfokaliniu mikroskopu, ŽDF buvo užsėti į 24-ių šulinėlių ląstelių auginimo laboratorines plokšteles (*Greiner Bio-One*, Frikenhauzenas, Vokietija)  $10^4$  ląst./šul. tankumu ir auginti 37°C temperatūroje, 5 proc. CO<sub>2</sub> termostate. Po 72 val terpė iš šulinėlių nusiurbta ir į kiekvieną šulinėlį įpilta po 600 μl 100 proc. arba 50 proc. tiriamųjų cementų ekstrakto. Kontroliniuose šulinėliuose ląstelių kultūrų mitybinė terpė buvo pakeista ne cementų ekstraktais, o tokiau pat kiekiu šviežios mitybinės terpės.

Ląstelių apoptozė ir membranos vientisumo pokyčiai buvo tiesiogiai stebimi konfokaliniu mikroskopu naudojant apoptozės detekcijos rinkinį *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* (*Life technologies*) ir 7-amino-aktinomiciną D (7-AAD) (*BD Bioscience*, San Chozė, Kalifornija). *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* detekcijos reagentas yra aktyvuotų kaspazių-3/7 fluorogeninis substratas, indukuojantis apoptozę. Maksimali šio dažo fluorescencijos emisija yra maždaug ties 520 nm bangos ilgiu. 7-AAD patenka į ląstelės vidų per pažeistą membraną, įsiterpia tarp dvigubos DNR grandinės ir pasiekia maksimalią fluorescencijos emisiją ties 647 nm bangos ilgiu. *CellEvent™ Caspase-3/7 Green* apoptozės detekcijos reagento



(koncentracija parinkta pagal gamintojo nurodymus) ir 7-AAD (galutinė koncentracija 250 ng/ml) buvo pridėta į ląstelių kultūras iš karto, kai tik ant jų buvo užpilti tiriamųjų cementų ekstraktai. Taip ląstelės buvo inkubuojamos 30 min. ir iš karto analizuojamos mikroskopu. Tiesioginis gyvų ląstelių stebėjimas buvo atliktas *Leica SP8 (Leica Microsystems)* konfokalinio mikroskopu. Ląstelių stebėjimas truko 24 val., fotografuojant kas 10 min.

Fluorescencinės nuotraukos iš tiesioginio ląstelių stebėjimo buvo analizuojamos *ImageMaster 2D Platinum 7.0* programine įranga. Fluorescuojančios apoptozės būdu žuvusios ląstelės ir 7-AAD-teigiamos nekrozės būdu žuvusios ląstelės buvo aptinkamos kaip taškai, naudojant *ImageMaster* algoritmą.

Skirtingų tiriamųjų cementų citotoksinis poveikis pateiktas grafiškai, palyginant apoptozės arba nekrozės būdu žuvusias ląsteles su kontroline grupe. Šiuo tyrimu buvo aiškinamas pirminis ląstelių žūties būdas.

## 2.4. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta IBM SPSS 25.0 programa (*Statistical Package for Social Sciences for Windows*, Čikaga, Ilinojus, JAV). Visoms statistinėms analizėms pasirinktas reikšmingumo lygmuo  $\alpha = 0,05$ . Priklausomųjų kintamųjų normalumo prielaida tikrinta naudojant Kolmogorovo ir Smirnovo (*Kolmogorov–Smirnov*) bei Šapiro ir Viko (*Shapiro–Wilk*) testus. Ši prielaida buvo laikoma patenkinta, jei šių testų  $p > 0,050$ . Lyginant dvi ar daugiau grupių, buvo patikrinta dispersijų lygybė. Buvo laikoma, kad dispersijų lygybės prielaida tenkinama, jeigu Levene'o testo  $p > 0,050$ .

Dviejų nepriklausomų grupių vidurkiams palyginti (pvz., palyginti cemento dėvėjimasi 100  $\mu\text{m}$  ir 250  $\mu\text{m}$  tarpuose) buvo naudotas parametrinis Stjudento  $t$  testas arba neparametrinis Mano ir Vitnio (*Mann–Whitney*) testas. Dviejų priklausomų grupių duomenims palyginti naudotas Stjudento kriterijus priklausomoms imtims.

Daugiau nei dviems grupėms palyginti (pvz., palyginti skirtingų cementų dėvėjimuisi) buvo naudotas parametrinis testas – vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir *post hoc* Bonferonio (*Bonferroni*) kriterijus arba neparametrinis Kruskalo ir Voliso (*Kruskal–Wallis*) testas. Jeigu dispersijų lygybės prielaida nebuvo tenkinama, papildomai buvo naudotas Velšo (*Welsh*) kriterijus. Daugiau nei dviejų priklausomų grupių duomenims palyginti (dėvėjimosi skirtumams tarp trijų matavimo taškų: metalo/cemento riboje, cemento viduryje ir cemento/dentino riboje) naudota blokuotų duomenų ANOVA ir *post hoc* Tjukio kriterijus.

Tiesinė daugelio kintamųjų regresija (angl. *linear multiple regression*) buvo taikyta ištirti kelių nepriklausomųjų kintamųjų įtaką priklausomojo kintamojo

prognozavimui. Prognostinių kintamųjų nepriklausomos įtakos prielaida priklausomajam kintamajam buvo patikrinta multikolinearumo diagnostika. Ši prielaida buvo patenkinta, jei tolerancijos koeficiento reikšmės buvo  $> 0,600$  ir dispersijos mažėjimo daugiklis buvo  $< 3,5$ .

### 3. REZULTATAI

#### Duomenų analizavimo seka

Pirmiausia bus pristatyti cementų dėvėjimosi tyrimo rezultatai, po to – citotoksiškumo tyrimų rezultatai. Cementavimo medžiagų biosuderinamumas buvo vertintas analizuojant visų atliktų tyrimų, naudojant kietas cementavimo medžiagas ir cementų ekstraktus, rezultatus.

Kietų cementavimo medžiagų citotoksiškumo vertinimai:

- cementų poveikis ląstelių gyvybingumui, išreikštas ląstelių išgyvenamumo rodikliu (LIR%);
- morfologiniai ląstelių pakitimai;
- cementų rūgštingumas (pH).

Cementų ekstraktų citotoksiškumo vertinimai:

- cementų ekstraktų poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui;
- morfologiniai ląstelių pakitimai;
- ląstelių žūties būdo vertinimas.

#### 3.1. Cementavimo medžiagų dėvėjimasis ir jo priklausomybė nuo cemento sluoksnio dydžio

Pirmiausia buvo lyginamas kiekvieno cemento dėvėjimasis 100  $\mu\text{m}$  ir 250  $\mu\text{m}$  tarpuose (3 lentelė). Toliau nagrinėjamas kiekvieno cemento dėvėjimasis skirtinguose matavimo taškuose (3 lentelė).

##### 3.1.1. Cementų dėvėjimasis 100 $\mu\text{m}$ ir 250 $\mu\text{m}$ tarpuose

Trečioje lentelėje stulpeliuose išdėstyti rezultatai rodo cementų dėvėjimąsi skirtinguose tarpuose. Cinko fosfatinis cementas (CFC) metalo/cemento riboje (matavimo taške A) dėvėjosi panašiai 100  $\mu\text{m}$  ir 250  $\mu\text{m}$  tarpuose ( $p = 1,000$ ). Cemento viduryje (matavimo taške B) CFC vidutinis dėvėjimasis buvo statistiškai reikšmingai ( $p = 0,032$ ) didesnis 100  $\mu\text{m}$  nei 250  $\mu\text{m}$  tarpuose. Cemento/dentino riboje (matavimo taške C) priešingai – CFC stipriau dėvėjosi 250  $\mu\text{m}$  nei 100  $\mu\text{m}$  tarpuose, bet šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,286$ ).

Stiklo jonominio cemento (SJC) dėvėjimasis metalo/cemento riboje (matavimo taške A) statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p = 0,444$ ) tarp dviejų tarpo dydžių. Panaši tendencija buvo ir cemento viduryje (matavimo taške B) ( $p = 0,108$ ). Ties cemento/dentino riba (matavimo taške C) SJC stipriau dėvėjosi 250  $\mu\text{m}$  tarpelyje nei 100  $\mu\text{m}$  tarpelyje, bet šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,161$ ).

Derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas (DMSJC) dėvėjosi panašiai metalo/cemento riboje (matavimo taške A) ( $p = 0,223$ ) ir cemento tarpo viduryje (taške B) ( $p = 0,120$ ). Stipriausiai DMSJC dėvėjosi cemento/dentino riboje (matavimo taške C). Tačiau dėvėjimosi skirtumas tarp dviejų tarpo dydžių šiame taške (cemento/dentino riboje) nebuvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,848$ ).

Kompomerinio cemento (KC) statistiškai patikimų dėvėjimosi skirtumų tarp dviejų tarpo dydžių nebuvo nė viename matavimo taške.

Dervinio cemento (DC) dėvėjimosi tendencijos buvo panašios kaip KC ir statistiškai reikšmingų skirtumų tarp dėvėjimosi 100  $\mu\text{m}$  ir 250  $\mu\text{m}$  tarpuose nebuvo.

### 3.1.2. Cementų dėvėjimasis skirtingose tarpo vietose

Cementų dėvėjimosi skirtumus skirtingose cementu užpildyto tarpo vietose rodo 3 lentelėje horizontaliai išdėstyti duomenys.

Cinko fosfatinis cementas (CFC) stipriausiai dėvėjosi ties dentinu (matavimo taške C) ir skirtumai tarp CFC dėvėjimosi cemento/dentino riboje ir kituose matavimo taškuose buvo statistiškai reikšmingi abiejų dydžių tarpuose.

Stiklo jonomerinio cemento (SJC) statistiškai reikšmingų dėvėjimosi skirtumų 100  $\mu\text{m}$  tarpelyje tarp skirtingų matavimo taškų nebuvo, tačiau 250  $\mu\text{m}$  tarpelyje SJC statistiškai reikšmingai stipriau dėvėjosi cemento/dentino riboje (matavimo taške C) ( $p=0,006$ ).

Derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas (DMSJC) ir 100  $\mu\text{m}$  ir 250  $\mu\text{m}$  tarpuose, statistiškai reikšmingai stipriau dėvėjosi taip pat cemento/dentino riboje (matavimo taške C).

Kompomerinio cemento (KC) ir dervinio cemento (DC) dėvėjimosi tendencijos taip pat buvo panašios: didžiausias medžiagos praradimas abiejų dydžių tarpuose užfiksuotas cemento/dentino riboje (matavimo taške C), skirtumai tarp dėvėjimosi šiame ir kituose matavimo taškuose buvo statistiškai reikšmingi.

**3 lentelė.** Testuotų cementų dėvėjimasis skirtinguose tarpuose ir trijuose matavimo taškuose

Cementų rūšys#	Cemento tarpo dydis (µm)	Cementų dėvėjimasis (µm)			p reikšmės^
		Metalų/cemento riboje (A) vidurkis (sn)	Cemento viduryje (B) vidurkis (sn)	Cemento /dentino riboje (C) vidurkis (sn)	
<b>CFC</b>	100	8 (11)	15 (9)	37 (11)	A/C 0,001 B/C<0,001
	250	18 (8)	5 (4)	50 (26)	A/C 0,009 B/C<0,001
p reikšmės*		1,000	0,032	0,286	
<b>SJC</b>	100	12 (7)	20 (13)	27 (16)	Nėra skirtumų
	250	9 (6)	9 (8)	48 (30)	A/C 0,006 B/C 0,006
p reikšmės*		0,444	0,108	0,161	
<b>DMSJC</b>	100	7 (4)	8 (6)	31 (16)	A/C 0,003 B/C 0,004
	250	4 (4)	3 (4)	29 (19)	A/C 0,005 B/C 0,004
p reikšmės*		0,223	0,120	0,848	
<b>KC</b>	100	2 (2)	1 (2)	21 (15)	A/C 0,005 B/C 0,004
	250	3 (5)	0 (1)	26 (11)	A/C 0,005 B/C 0,004
p reikšmės*		0,659	0,300	0,525	
<b>DC</b>	100	3 (2)	2 (2)	22 (12)	A/C <0,001 B/C 0,001
	250	7 (7)	1 (2)	19 (11)	A/C 0,004 B/C 0,003
p reikšmės*		0,208	0,407	0,661	

# CFC – cinko fosfatinis cementas, SJC – stiklo jonominis cementas, DMSJC – derva modifikuotas stiklo jonominis cementas, KC – kompomerinis cementas, DC – dervinis cementas.

^ Blokuotų duomenų ANOVA ir *post hoc* Tjukio kriterijus.

\* Stjudento kriterijus nepriklausomoms imtims.

Duomenys, pateikti 4 lentelėje, rodo skirtingų cementų dėvėjimąsi 100 µm tarpelyje trijuose matavimo taškuose. Metalo/cemento riboje (taške A) stipriausiai dėvėjosi CFC ir SJC; CFC dėvėjimasis tarp CFC ir DMSJC ( $p = 0,038$ ), tarp CFC ir KC ( $p = 0,001$ ) ir tarp CFC ir DC ( $p = 0,003$ ) skyrėsi statistiškai reikšmingai. Cemento viduryje (taške B) tradiciniai – CFC ir SJC – cementai taip pat dėvėjosi stipriausiai. Statistiškai reikšmingai dėvėjimasis skyrėsi tarp CFC ir KC ( $p = 0,030$ ), tarp CFC ir DC ( $p = 0,050$ ), tarp SJC ir KC ( $p = 0,002$ ) bei tarp SJC ir DC ( $p = 0,004$ ). Cemento/dentino riboje (taške C) visi cementai dėvėjosi stipriau negu kituose dviejuose matavimo taškuose, bet statistiškai reikšmingų skirtumų tarp skirtingų cementų dėvėjimosi nenustatyta.

**4 lentelė.** Skirtingų cementų, užpildančių 100 µm tarpą, dėvėjimasis 3 matavimo taškuose

Cementų rūšys#	Cementų dėvėjimasis (µm)			p reikšmės <sup>^</sup>
	Metallo/cemento riboje (A) vidurkis (sn)	Cemento viduryje (B) vidurkis (sn)	Cemento/dentino riboje (C) vidurkis (sn)	
CFC	18 (11)	15 (9)	37 (11)	<0,001
SJC	12 (7)	20 (13)	27 (16)	<0,001
DMSJC	7 (4)	8 (6)	31 (16)	<0,001
KC	2 (2)	1 (2)	21 (15)	<0,001
DC	3 (2)	2 (2)	22 (12)	<0,001
p reikšmės*	CFC/DMSJC 0,038 CFC/KC 0,001 CFC/DC 0,003	CFC/KC 0,030 CFC/DC 0,050 SJC/KC 0,002 SJC/DC 0,004	Reikšmingų skirtumų nerasta	

# CFC – cinko fosfatinis cementas, SJC – stiklo jonomerinis cementas, DMSJC – derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas, KC – kompomerinis cementas, DC – dervinis cementas.

<sup>^</sup> Blokuotų duomenų ANOVA.

\* Vienfaktorinė ANOVA ir *post hoc* Bonferonio kriterijus.

Penktoje lentelėje pateikti skirtingų cementų, užpildančių 250 µm tarpą, dėvėjimosi ypatumai trijuose matavimo taškuose. Metallo/cemento riboje (taške A) buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp CFC ir DMSJC ( $p = 0,005$ ) bei tarp CFC ir KC ( $p = 0,002$ ). Cemento viduryje (taške B) dėvėjimasis statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp CFC ir KC ( $p = 0,015$ ) bei tarp SJC ir DC ( $p = 0,036$ ).

Cemento/dentino riboje (taške C) visų cementų dėvėjimasis buvo gerokai didesnis nei kitose dviejose matavimo vietose (taškuose A ir B), tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų tarp skirtingų cementų dėvėjimosi nebuvo.

**5 lentelė.** Skirtingų cementų, užpildančių 250 µm tarpą, dėvėjimasis 3 matavimo taškuose

Cementų rūšys#	Cementų dėvėjimasis (µm)			p reikšmė^
	Metallo/cemento riboje (A) vidurkis (sn)	Cemento viduryje (B) vidurkis (sn)	Cemento/dentino riboje (C) vidurkis (sn)	
CFC	18 (8)	5 (4)	50 (26)	<0,001
SJC	9 (6)	9 (8)	48 (30)	<0,001
DMSJC	4 (4)	3 (4)	29 (19)	<0,001
KC	3 (5)	0 (1)	26 (11)	<0,001
DC	7 (7)	1 (2)	19 (11)	<0,001
p reikšmės*	CFC/DMSJC 0,005; CFC/KC 0,002.	CFC/KC 0,015 SJC/DC 0,036	Reikšmingų skirtumų nerasta	

# CFC – cinko fosfatinis cementas, SJC – stiklo jonomerinis cementas, DMSJC – derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas, KC – kompomerinis cementas, DC – dervinis cementas.

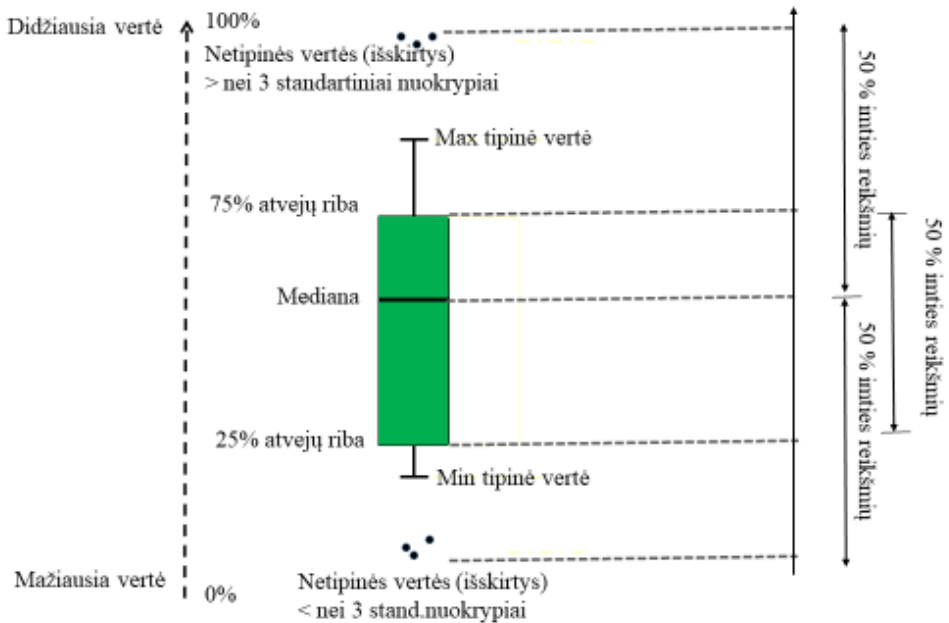
^ Blokuotų duomenų ANOVA.

\* Vienfaktorinė ANOVA su *post hoc* Bonferonio kriterijus.

Cementų dėvėjimosi skirtumai ir bendros cementų dėvėjimosi tendencijos pateiktos ir stačiakampėse diagramose. Tokios diagramos paaiškinimas parodytas 7 pav. Stačiakampės diagramos rodo duomenų pasiskirstymą: stačiakampio ribos rodo 50 proc. atvejų, viršutinis stačiakampio „ūsas“ rodo maksimalias, apatinis „ūsas“ – minimalias tipines vertes. Viršutiniai ir apatiniai apskritimai parodo labiausiai netipiškus atvejus, t. y. tokius, kurių vertės nutolusios iki 3 standartinių nuokrypių nuo vidurinės vertės.

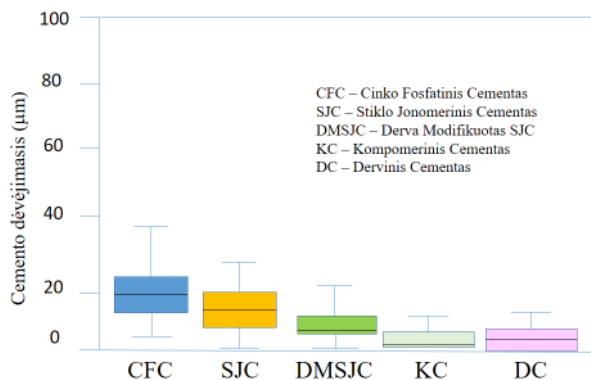
Cementų dėvėjimosi ypatumai skirtinguose matavimo taškuose pateikti stačiakampėse diagramose (8 A, B, C pav.) 8 A pav. matome, kad cementai metalo/cemento riboje mažėjimo tvarka dėvėjosi taip: CFC → SJC → DMSJC → DC → KC. Didžiausia dėvėjimosi įvairovė buvo stebima tarpuose, užpildytuose CFC ir SJC. Palyginę stačiakampes diagramas 8 A ir 8 B pav., matome, kad visi

cementai, išskyrus SJC, cemento sluoksnio viduryje dėvėjosi mažiau nei metalo/cemento riboje. Taške B cementai dėvėjimosi mažėjimo tvarka išsidėstė taip: SJC → CFC → DMSJC → DC, KC. Iš 6 C pav. matyti, kad cemento/dentino riboje (taške C) visi cementai dėvėjosi kur kas stipriau nei kituose dviejuose matavimo taškuose, t. y. cemento/metalu riboje (taške A) arba cemento viduryje (taške B). Taip pat cemento/dentino riboje buvo didžiausia visų tirtų cementų dėvėjimosi įvairovė.

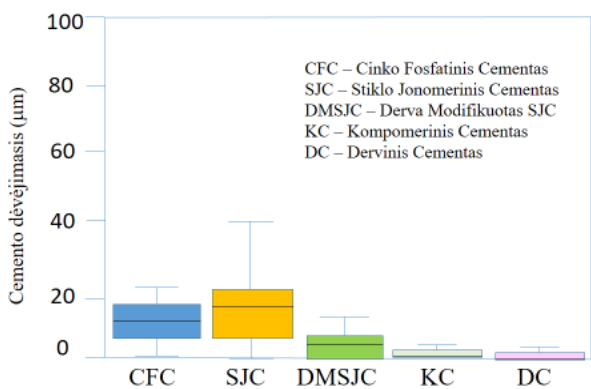


7 pav. Stačiakampės diagramos paaiškinimas

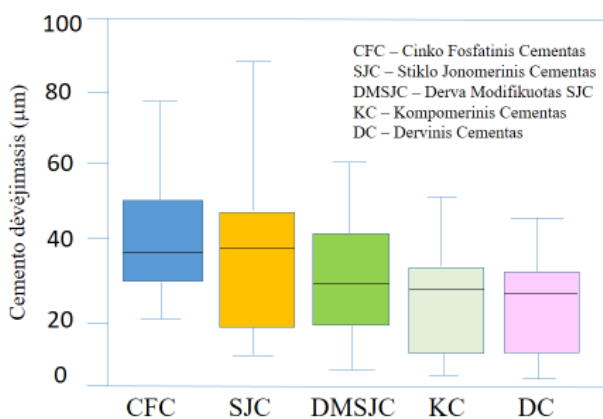




**8A pav.** Dėvėjimasis metalo/cemento riboje (taške A)



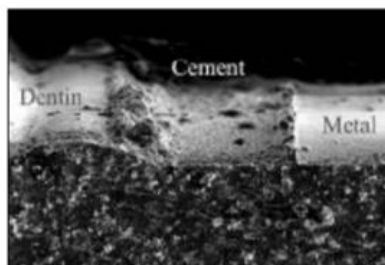
**8B pav.** Cementų dėvėjimasis cemento viduryje (taške B)



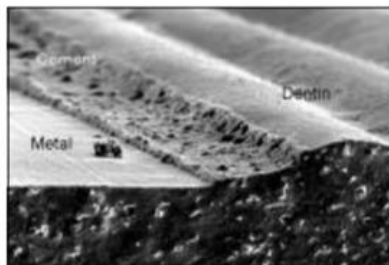
**8C pav.** Dėvėjimasis cemento/dentino riboje (taške C)

### 3.1.3. Cementų paviršiaus įvertinimas

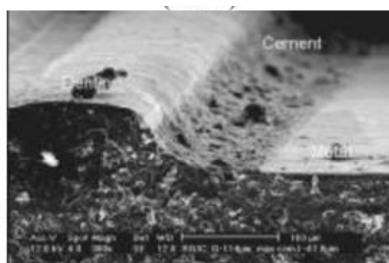
Po valymo dantų šepetėliu cementų paviršiai buvo įvertinti SEM. Reprezentuojančios cementų paviršius SEM nuotraukos matyti 9–13 pav. Remiantis vaizdine SEM nuotraukų analize, cementai didėjančio paviršiaus šiurkštumo seka galėtų būti išdėstyti taip: DC/KC < SJC, DMSJC < CFC.



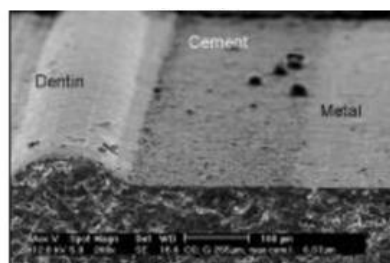
**9 pav.** CFC paviršiaus atspaudas po 2 val. trynimo šepetėliu (SEM)



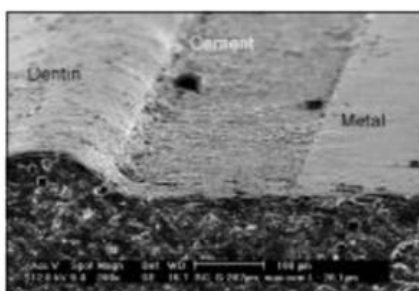
**10 pav.** SJC paviršiaus atspaudas po 2 val. trynimo šepetėliu (SEM)



**11 pav.** DMSJC paviršiaus atspaudas po 2 val. trynimo šepetėliu (SEM)



**12 pav.** KC paviršiaus atspaudas po 2 val. trynimo šepetėliu (SEM)



**13 pav.** DC paviršiaus atspaudas po 2 val. trynimo šepetėliu (SEM)

## 3.2. Kietų cementavimo medžiagų citotoksiškumo tyrimai

Cementavimo medžiagų biosuderinamumui įvertinti atlikti keli eksperimentai, įvertinantys periodonto ląstelių gyvybingumą skirtingų cementų aplinkoje esant tiesioginiam kontaktui (tyrimai naudojant kietas cementavimo medžiagas) ir netiesioginiam kontaktui (tyrimai naudojant cementų ekstraktus). Taip pat išmatuotas cementų rūgštingumas (pH).

Rezultatų pristatymo schema:

- Ląstelių išgyvenamumo rodiklis (LIR%) palygintas tarp eksperimentinių grupių po 1-os, 6-ių ir 12-os val. inkubacijos (plautų ir neplautų cementų grupėse kartu ir kiekvienoje atskirai). LIR% rezultatai pristatyti lentelėse ir stačiakampėse diagramose.
- Ląstelių morfologiniai pokyčiai pristatyti nuotraukose.
- pH pokyčiai skirtingų cementų aplinkoje skirtingų stebėjimų metu pristatyti linijinėse diagramose.

### 3.2.1. Ląstelių išgyvenamumas skirtingų cementų aplinkoje (MTT testas)

#### 3.2.1.1. Lyginamos plautų ir neplautų cementų grupės

Ląstelių išgyvenamumo pokyčiai tam tikru metu skirtingų cementų aplinkoje parodyti 6 lentelėje. Bendra tendencija - ląstelių išgyvenamumo mažėjimas vėlesniuose stebėjimuose visų cementų aplinkoje, išskyrus CFC, kur po 6-ių val., palyginti su 1-os val. Rezultatais, užfiksuotas nedidelis ir statistiškai nereikšmingas LIR% padidėjimas.

Lygindami 6 lentelėje vertikalčiai išdėstytus duomenis, matome, kad po 1-os val. CFC aplinkoje ląstelių išgyvenamumas buvo didžiausias ir statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kitų tiriamųjų cementų. DC aplinkoje ląstelių išgyvenamumo rodikliai buvo mažiausi, DMSJC užėmė tarpinę poziciją. Skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ( $p < 0,001$ ). Apibendrinant pirmos valandos rezultatus, tirtieji cementai didėjančio citotoksiškumo tvarka gali būti išdėstyti taip: CFC → DMSJC → DC.

Eksperimente po 6-ių val. (6 lentelė) buvo matyti panašios tendencijos. CFC grupėje, lyginant 6-os val. ir 1-os val. rezultatus, užfiksuotas statistiškai nereikšmingas ląstelių išgyvenamumo padidėjimas. DMSJC ir DC grupėse matyti ląstelių išgyvenamumo mažėjimo tendencija, didžiausias LIR% mažėjimas užfiksuotas DC aplinkoje. Statistiškai reikšmingi skirtumai buvo tarp CFC ir DMSJC ( $p = 0,003$ ) ir tarp CFC ir DC grupių ( $p < 0,001$ ).

Eksperimente po 12 val. (6 lentelė), lyginant su ankstesnių laikotarpių rezultatais, toliau matyti LIR% mažėjimas visų tiriamų cementų grupėse. Didžiausias LIR% mažėjimas matyti DC grupėje, didelis – DMSJC, mažiausias – CFC aplinkoje. Skirtumai tarp CFC ir DMSJC ( $p = 0,001$ ) bei DC ( $p < 0,001$ ) buvo statistiškai reikšmingi.

**6 lentelė.** Ląstelių išgyvenamumas plautų ir neplautų cementų aplinkoje

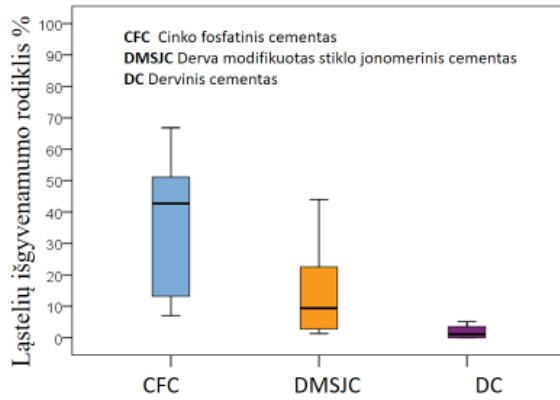
Cementų rūšys#	Ląstelių išgyvenamumo rodiklis (proc.) po			p reikšmės *
	1 val.	6 val.	12 val.	
	vidurkis(sn)	vidurkis (sn)	vidurkis (sn)	
CFC	31,1 (10,5)	35,1 (21,7)	27,2 (20,5)	Nėra skirtumų
DMSJC	19,7 (13,3)	13,5 (12,9)	4,3 (2,3)	1val./12val. 0,004
DC	3,9 (3,6)	1,8 (1,2)	1,2 (1,5)	1val./12val. 0,022
p reikšmės^	Skirtumai tarp visų grupių 0,001	CFC/DMSJC 0,003 CFC/DC 0,001	CFC/DMSJC 0,001 CFC/DC <0,001	

# CFC - cinko fosfatinis cementas, DMSJC - derva modifikuotas stiklo jonominis cementas, DC - dervinis cementas.

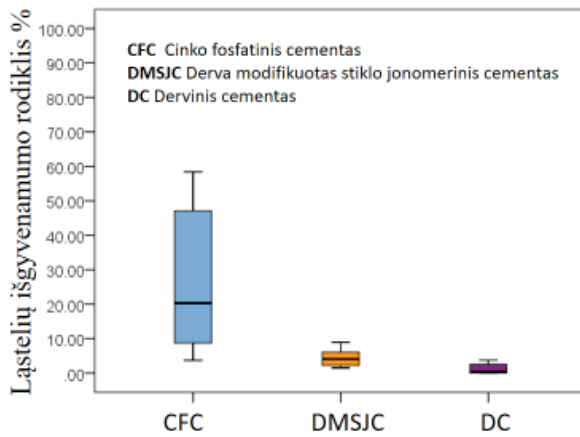
^ Palyginimai tarp grupių: vienfaktorinė ANOVA ir *post hoc* Bonferonio kriterijus.

\* Palyginimai toje pačioje grupėje tarp skirtingų laikų – Stjudento kriterijus priklausomoms imtims.

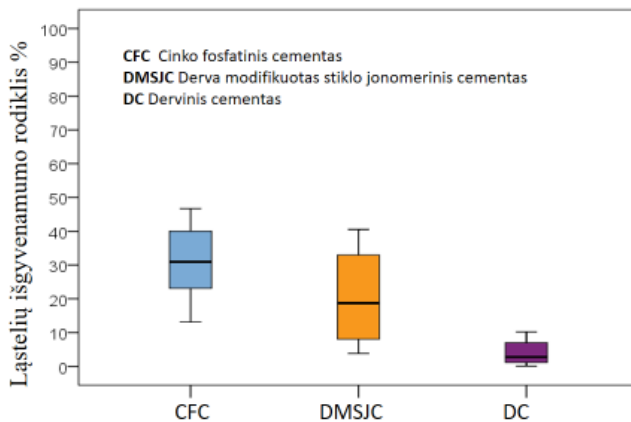
Ląstelių išgyvenamumo tendencijos pateiktos stačiakampėse diagramose (14 A, B, C pav.). Visais stebėjimo laikais, t. y. po 1-os, 6-ių ir 12-os val., CFC aplinka buvo mažiausiai, o DC – labiausiai citotoksiška. Taip pat matome, kad po 12 val. DMSJC ir DC aplinkoje ląstelės neišgyveno.



14 A pav. Ląstelių išgyvenamumas cementų aplinkoje po 1 val.



14 B pav. Ląstelių išgyvenamumas cementų aplinkoje po 6 val.



14 C pav. Ląstelių išgyvenamumas cementų aplinkoje po 12 val.

### 3.2.1.2. Nenuplautų cementų poveikis laštelėms

Lyginome lašelių išgyvenamumą tarp nenuplautų cementų (7 lentelė). *Horizontalūs palyginimai:* po 1-os val. CFC grupėje LIR% vidurkis buvo 37,2 proc. gyvybingų lašelių, po 6-ių val. jų sumažėjo iki 17,7 proc. ir po 12-os val. šio cemento aplinkoje liko tik 10,9 proc. gyvybingų lašelių. Šio cemento grupėje statistiškai reikšmingi skirtumai rasti tarp 1-os val. ir 6-ių val. ( $p = 0,001$ ) ir tarp 1-os val. ir 12 val. ( $p = 0,001$ ). Palyginus su CFC grupe, DMSJC grupėje lašelių išgyvenamumas buvo mažesnis. DC grupėje laštelės neišgyveno. *Vertikalūs palyginimai:* po 1-os val. matome statistiškai reikšmingus skirtumus tarp visų cementų, taip pat matyti, kad mažiausiai lašelių išgyveno DC aplinkoje. Bendra 6-os val. stebėjimo tendencija – lašelių išgyvenamumo sumažėjimas CFC ir DMSJC grupėse. Statistiškai reikšmingi skirtumai rasti tarp šių cementų: CFC ir DMSJC ir tarp CFC ir DC. Po 12 val. nustatytas tolesnis lašelių išgyvenamumo mažėjimas ir statistiškai patikimi skirtumai tarp šių cementų: CFC ir DMSJC ir tarp CFC ir DC ( $p < 0,001$ ).

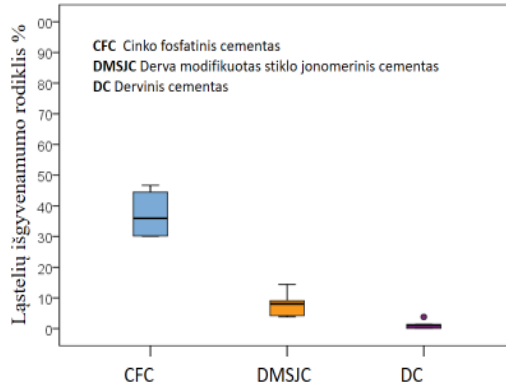
**7 lentelė.** Lašelių išgyvenamumas nenuplautų cementų aplinkoje

Cementų rūšys#	Lašelių išgyvenamumo rodiklis (proc.) po			p reikšmės^
	1 val. vidurkis (sn)	6 val. vidurkis (sn)	12 val. vidurkis (sn)	
CFC	37,2 (7,4)	17,7 (13,3)	10,9 (6,4)	1val/6val 0,001 1val/12val 0,001
DMSJC	7,9 (3,9)	3,5 (2,2)	3,1 (1,3)	1val/6val 0,001 1val/12val 0,001
DC	1,3 (1,4)	0,3 (0,5)	0,0 (0,0)	1val/6val 0,002 1val/12val 0,001
p reikšmės*	CFC/DMSJC 0,001 CFC/DC 0,001 DMSJC/DC 0,050	CFC/DMSJC <0,001 CFC/DC 0,001	CFC/DMSJC 0,001 CFC/DC 0,001	

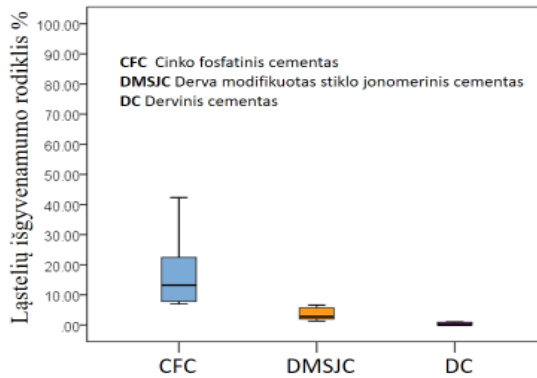
# CFC - cinko fosfatinis cementas, DMSJC - derva modifikuotasSJC, DC - dervinis cementas. ^ Stjudento kriterijus priklausomoms imtims.

\* Vienfaktorinė ANOVA ir *post hoc* Bonferonio kriterijus.

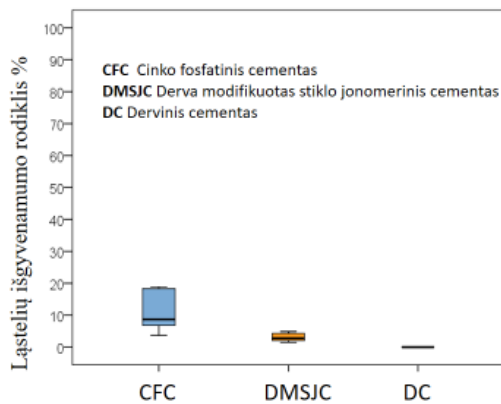
Ląstelių išgyvenamumo iliustracija stačiakampėse diagramose (15 A, B, C pav.) taip pat aiškiai rodo, kad nenuplautų cementų aplinkoje ypač daug ląstelių žuvo DMSJC ir DC grupėse.



15 A pav. Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 1 val.



15 B pav. Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 6 val.



15 C pav. Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 12 val.

### 3.2.1.3. Nuplautų cementų poveikis laštelėms

Aštuntoje lentelėje lyginami nuplautų cementų LIR% vidurkiai. Palyginus nenuplautų cementų poveikį laštelėms (7 lentelė) su nuplautų cementų poveikiu (8 lentelė) stebima aiški tendencija, kad lašelių išgyvenamumas kur kas mažesnis nenuplautų cementų grupėje nei nuplautų cementų grupėje. Vienos valandos palyginimai tarp nuplautų cementų (8 lent.) parodė panašias tendencijas, kaip ir palyginimai tarp nenuplautų cementų (7 lent.), t. y. didžiausias lašelių išgyvenamumas buvo stebimas CFC grupėje ir mažiausiais DC grupėje. Statistiškai reikšmingi skirtumai rasti tarp šių nuplautų cementų: tarp CFC ir DC ( $p < 0,001$ ) ir tarp DMSJC ir DC ( $p < 0,001$ ). Stebėjome lašelių kiekio padidėjimą CFC aplinkoje nuo 1-os val. iki 6-os val. Po 6 val. reikšmingi skirtumai rasti tarp CFC ir DMSJC ( $p < 0,001$ ), tarp CFC ir DC ( $p < 0,001$ ) ir tarp DMSJC ir DC ( $p < 0,001$ ). Po 12 val. stebėjimo rezultatai (palyginus skirtingus nuplautus cementus) parodė panašias tendencijas, kaip ir po 6-ių valandų. Statistiškai reikšmingi skirtumai ( $p < 0,001$ ) buvo rasti tarp šių cementų: CFC ir DMSJC, CFC ir DC.

**8 lentelė.** Lašelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje

Cementų rūšys#	Lašelių išgyvenamumo rodiklis (proc.) po			p reikšmės^
	1 val. vidurkis (sn)	6 val. vidurkis (sn)	12 val. vidurkis (sn)	
CFC	52,6 (8,3)	43,6 (15,7)	25,0 (9,9)	1val/6val 0,001 1val/12val 0,001
DMSJC	31,5 (6,1)	23,5 (11,0)	5,6 (2,5)	1val/6val 0,032 1val/12val <0,001 6val/12val <0,001
DC	6,5 (3,3)	3,3 (1,7)	2,4 (1,2)	1val/6val 0,004 1val/12val 0,001
p reikšmė*	CFC/DC <0,001	CFC/DMSJC <0,001	CFC/DMSJC <0,001	
	DMSJC/D C 0,001	CFC/DC <0,001 DMSJC/DC <0,001	CFC/DC <0,001	

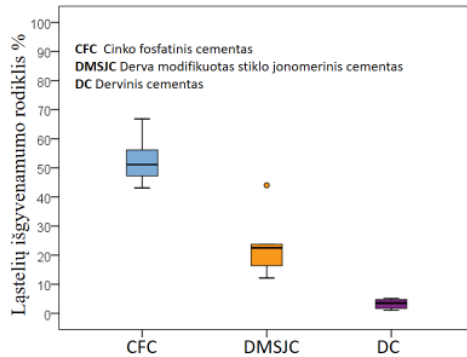
# CFC - cinko fosfatinis cementas, DMSJC - derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas; DC - dervinis cementas.

\* Vienfaktorinė ANOVA ir *post hoc* Bonferonio kriterijus.

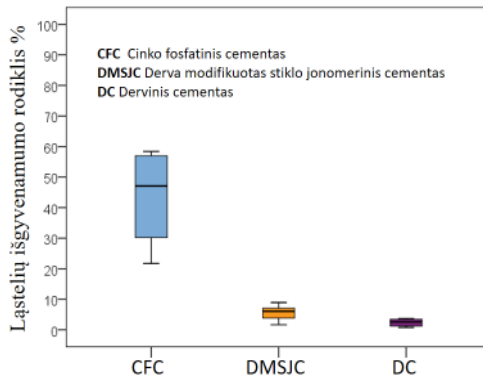
^ Stjudento kriterijus priklausomoms intims.



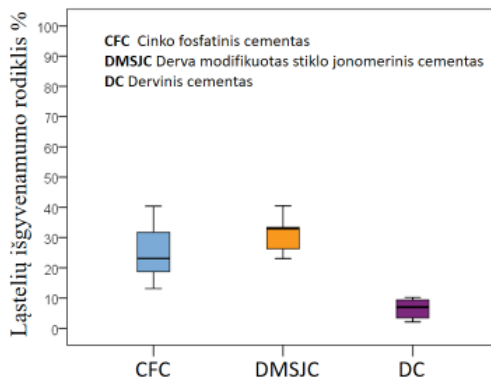
Vizualūs LIR% palyginimai stačiakampėse diagramose (16 A, B, C pav.) iliustruoja minėtas statistinės analizės tendencijas. Didžiausia įvairovė buvo CFC grupėje po 6 val.



**16 A pav.** Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 1 val.



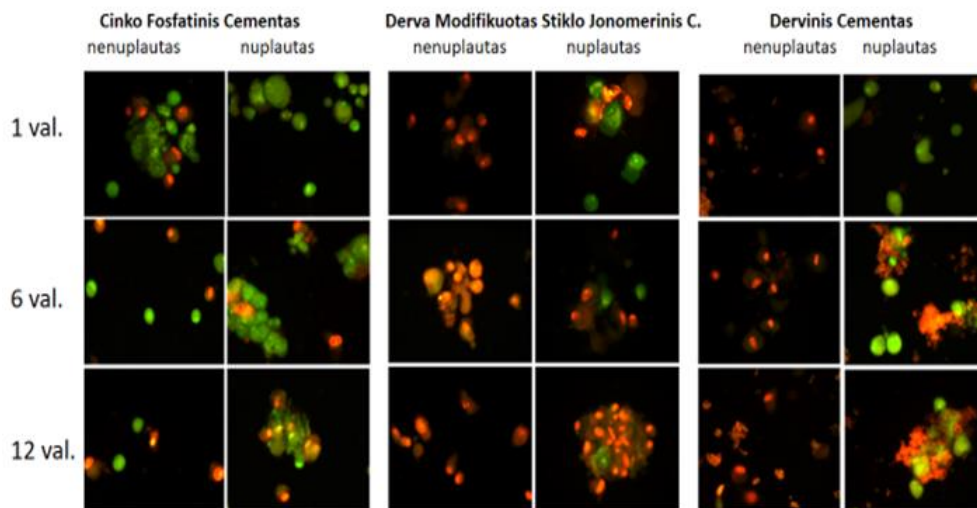
**16 B pav.** Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 6 val.



**16 C pav.** Ląstelių išgyvenamumas nuplautų cementų aplinkoje po 12 val.

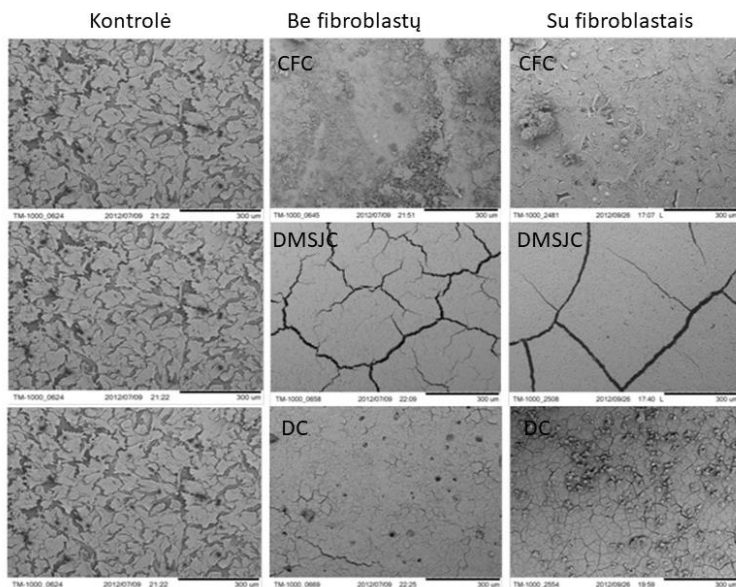
### 3.2.2. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas mikroskopu

Ląstelių gyvybingumą vertinant vizualiai buvo taikytas dažymo metodas. Optinės mikroskopijos vaizdai parodyti 17 pav. Ląstelių dažymas padeda matyti gyvybingas ląsteles (žalia spalva) ir žuvusias ląsteles (oranžinė spalva). Šiose nuotraukose matome, kad daugiausia gyvybingų ląstelių liko nuplauto CFC aplinkoje po 1-os ir 6-ių val. Tačiau po 12 val., tiek nenuplautų, tiek nuplautų cementų aplinkoje dominavo žuvusios ląstelės.



**17 pav.** Ląstelių gyvybingumas įvairių cementų aplinkoje (akridino oranžu/etidžio bromidu dažytos ląstelės)

Žmogaus dantenu fibroblastų morfologija analizuota ir skenuojamuoju elektroniniu mikroskopu (SEM) (18 pav.). SEM vaizdai iliustruoja skirtingų cementų paviršius su fibroblastais ir be jų po 6-ių val. inkubacijos. Ištemptos formos fibroblastai matyti tik ZPC paviršiuje, o DMSJC bei DC pavyzdžiuose jokių ląstelių nematyti. Kontroliniame pavyzdyje, kur ląstelės pasėtos ant švaraus plastiko, be cementavimo medžiagų, matyti išsitempusios ryškios geometrinės formos fibroblastų ląstelės. Ištįsusios ląstelės vertinamos kaip gyvybingi fibroblastai, o susisukusios, apvalios ląstelės rodo ląstelių žūtį.



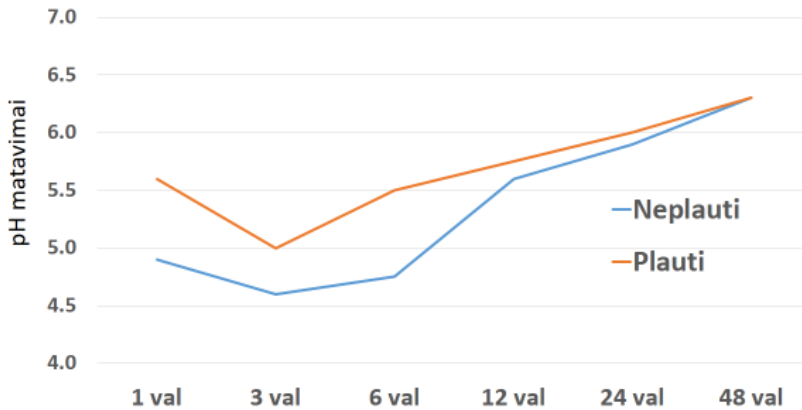
**18 pav.** Ląstelių morfologija cementų ir kontroliniuose mėginiuose (SEM nuotraukos): CFC – cinko fosfatinis cementas, DMSJC – derma modifikuotas stiklo jonomerinis cementas, DC – dervinis cementas

### 3.2.3. Cementų rūgštingumo įvertinimas

Cementų aplinkos pH buvo matuotas po 1, 3, 6, 12, 24 ir 48 valandų. pH pokyčiai viso stebėjimo laikotarpiu buvo palyginti tarp nenuplautų ir nuplautų cementų (19 – 21 pav.)

#### *pH CFC aplinkoje (19 pav.)*

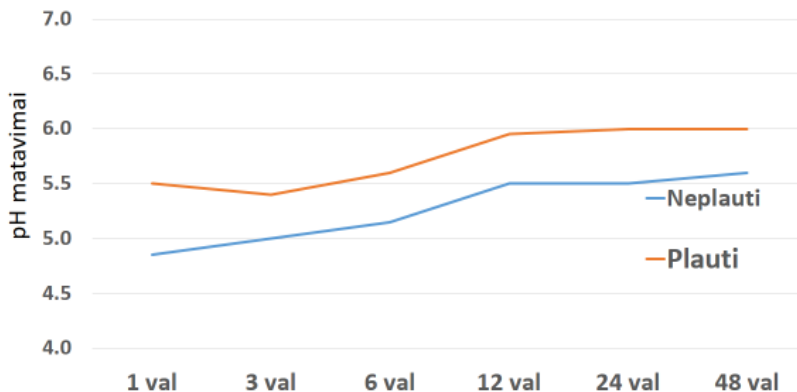
19 pav. 1-os val. stebėjime matome, kad nenuplautų ir nuplautų CFC cementų ruošinių aplinka buvo rūgštinė (nenuplautų ruošinių pH  $\approx$  5,8; nuplautų ruošinių pH  $\approx$  4,8). Po trijų val. tiek nenuplautų, tiek nuplautų cementų grupėje buvo stebimas tolesnis pH mažėjimas (nenuplautų CFC ruošinių pH  $\approx$  5,0; nuplautų CFC ruošinių pH  $\approx$  4,6). Pirmasis pH grįžimas neutralaus pH link pastebėtas po 6-į val. abiejose nenuplautų ir nuplautų cementų grupėse. Po 12 ir po 24 val. stebėtas tolesnis pH didėjimas. Tarp 24 ir 48 stebėjimo valandų ryškaus pH didėjimo CFC ruošinių aplinkoje nestebėta. Po 48 val. nenuplautų ir nuplautų cementų aplinkoje pH buvo vienodas.



19 pav. pH pokyčiai cinko fosfatinio cemento aplinkoje

*pH DMSJC aplinkoje (20 pav.)*

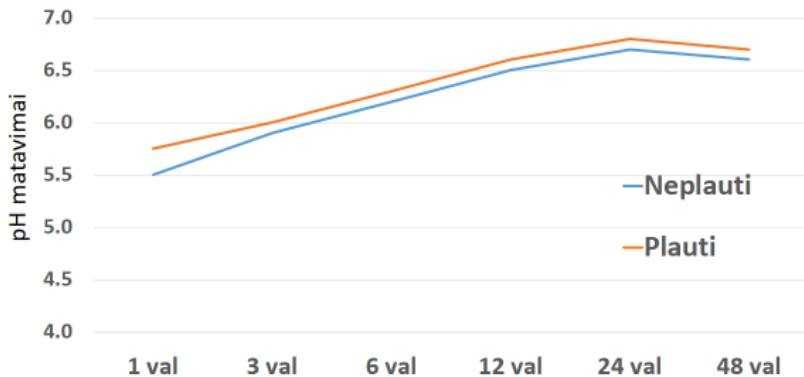
Po 1-os val. nustatyta, kad nuplautų ir nuplautų DMSJC cementų ruošinių aplinka buvo stipriai rūgštinė (nuplautų ruošinių pH  $\approx$  4,8; nuplautų ruošinių pH  $\approx$  5,5). Po 3-jų ir 6-ių val. tiek nuplautų, tiek nuplautų cementų grupėse ryškių pH pokyčių nestebėta. Šio cemento aplinkoje pirminis grįžimas neutralaus pH link buvo po 6-ių valandų abiejose nuplautų ir nuplautų cementų ruošinių grupėse. Po 12 ir 24 val. tolesnio pH padidėjimo nebuvo. Po 48 val. pH skirtumai tarp nuplautų ir nuplautų cementų aplinkos išliko.



20 pav. pH pokyčiai derva modifikuoto stiklo jonomerinio cemento aplinkoje

*pH DC aplinkoje (21 pav.)*

Šiame paveiksle matome 1-os val. rezultatus: nenuplautų ir nuplautų DC ruošinių aplinka buvo rūgštinė (nenuplautų ruošinių pH  $\approx 5,5$ ; nuplautų ruošinių pH  $\approx 5,8$ ). Po 3-jų val. abiejų nenuplautų ir nuplautų cementų aplinkose pH = 6,0. Po 3-jų val. ir vėliau nenuplautų ir nuplautų cementų grupėse buvo matyti lėtas pH didėjimas iki 24 val. stebėjimo. Tarp 24 ir 48 val. neryškus pH sumažėjimas buvo nenuplautų ir nuplautų cementų aplinkoje.



**21 pav.** pH pokyčiai dervinio cemento aplinkoje

### 3.2.4. Cemento rūšies ir nuplovimo įtaka ląstelių išgyvenamumui

Gyvybingų ląstelių išgyvenamumui (LIR%) prognozuoti buvo pasirinktas tiesinės daugelio kintamųjų regresijos statistinis modelis. Buvo nagrinėta trijų prognostinių kintamųjų (cemento tipo, plovimo ir stebėjimo laiko) bendra įtaka ląstelių išgyvenamumui. Kadangi cemento tipas buvo kokybinis nominalinis kintamasis, sudarytas iš trijų reikšmių, iš šio kintamojo buvo paruošti du pseudokintamieji (angl. *dummies*). Ankstesnioji analizė parodė, kad CFC aplinkoje LIR% vidurkis buvo didesnis nei kitų dviejų cementų aplinkoje, todėl CFC buvo pasirinktas kaip palyginamoji cemento kategorija. Pseudokintamųjų kodavimas parodytas 9 lentelėje.

**9 lentelė.** Pseudokintamųjų kodavimas

	Pseudokintamasis 1	Pseudokintamasis 2
Cinko fosfatinis cementas (palyginamoji kategorija)	0	0
Derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas	1	0
Dervinis cementas	0	1

Tiesinės daugelio kintamųjų regresijos rezultatai parodyti 10 lentelėje. Šioje lentelėje pristatyti regresijos ir multikolinearumo testavimo rezultatai. Regresijos modelis ištyrė prognostinių nepriklausomųjų kintamųjų (angl. *predictors*) ryšį su priklausomuoju kintamuoju LIR% (ang. *dependent variable*). Buvo tenkinamos šios regresijos modelio prielaidos: priklausomojo kintamojo pasiskirstymas pagal normalųjį dėsnį, dispersijų lygybė ir neaptiktas multikolinearumas. Kad tenkinama multikolinearumo nebuvimo (nepriklausoma kintamųjų įtaka priklausomajam kintamajam) prielaida rodo didelės tolerancijos vertės ( $> 0,700$ ) ir mažos dispersijos mažėjimo daugiklio (angl. *Variance Inflation Factor*) reikšmės [186].

Šis regresijos modelis su trimis prognostiniais kintamaisiais (cemento tipas, plovimas ir stebėjimo laikas) išaiškino 62,8 proc. (koreguotas determinacijos koeficientas =  $0,62 \times 100$  proc.) variacijos (LIR%). Šis regresijos modelis buvo statistiškai patikimas ( $p < 0,001$ ). Šiame regresijos modelyje visi prognostiniai nepriklausomieji kintamieji buvo statistiškai reikšmingi. Ląstelių išgyvenamumas DMSJC aplinkoje buvo vidutiniškai 19 proc. mažesnis negu ląstelių išgyvenamumas CFC aplinkoje, net kai buvo kontroliuojami kiti du prognostiniai kintamieji (nuplovimas ir stebėjimo laikas). DC neigiama įtaka buvo dar didesnė, nes ląstelių išgyvenamumas DC cemento aplinkoje buvo apie 10 proc. mažesnis nei DMSJC aplinkoje. Regresijos modelio testavimas parodė, kad visi prognostiniai faktoriai turėjo nepriklausomą statistiškai reikšmingą įtaką ląstelių išgyvenamumui. Tiesinės regresijos modelis parodė, kad stipriausia įtaka buvo susijusi su cemento rūšimi ir nuplovimu. Gyvybingų ląstelių išgyvenamumui dervinis cementas turėjo ypač kenksmingą įtaką ( $B = -0,79$ ,  $p < 0,001$ ), nuplovimas turėjo teigiamą įtaką ( $B = 12,5$ ,  $p < 0,001$ ) ir laikas neigiamą įtaką ( $B = -3,7$ ,  $p = 0,004$ ).

**10 lentelė.** Cemento rūšies, nuplovimo ir stebėjimo laiko įtaka ląstelių išgyvenamumui

Tiesinės daugelio kintamųjų regresijos modelis

**Modelis.** Priklausomasis kintamasis – ląstelių išgyvenamumo rodiklis. Koreguotas determinacijos koeficientas (*Adj. R Square*) = 0,628;  $p < 0,001$ 

Nepriklausomieji kintamieji	Nestand. koeficientas B	Stand. koeficientas $\beta$	p reikšmė	Multikolinearumo patikrinimas Tolerancija	VIF#
DMSJC su CFC (pseudokint. 1)	-18,6	-0,51	<0,001	0,750	1,333
DC su CFC (pseudokint. 2)	-28,9	-0,79	<0,001	0,750	1,333
Nuplovimas	12,5	0,36	<0,001	1,000	1,000
Laikas	-3,7	-0,17	0,004	1,000	1,000

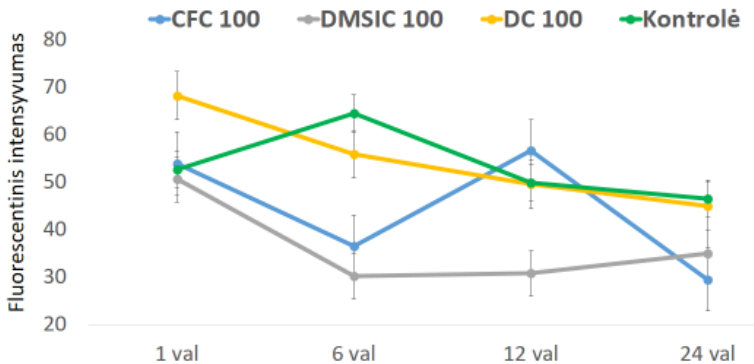
# VIF (*Variance Inflation Factor*) – dispersijos mažėjimo daugiklis. CFC - cinko fosfatinis cementas, DMSJC - derva modifikuotas stiklo jonomerinis cementas, DC - dervinis cementas.

### 3.3. Cementų ekstraktų poveikis periodonto ląstelių metaboliniam aktyvumui ir jų žūties būdai

Šio tyrimo metu vertinome cementavimo medžiagų ekstraktų poveikį žmogaus dantenu fibroblastų (ŽDF) metaboliniam (mitochondrijų) aktyvumui ir pirminį cementų sukeltos ląstelių žūties mechanizmą. Buvo įvertintas kiekvieno cemento dviejų skirtingų koncentracijų – 50 proc. ir 100 proc. – ekstraktų poveikis ŽDF.

#### 3.3.1. Ląstelių metabolinio aktyvumo įvertinimas

Visų tirtų cementų ekstraktai sumažino ląstelių mitochondrijų aktyvumą. Resazurino testo fluorescencijos analizės rezultatai (22 pav.) parodo 100 proc. koncentracijos ekstraktų citotoksinį poveikį, 23 pav. – 50 proc. ekstraktų poveikį. DMSJC ekstraktai turėjo stipriausią citotoksinį efektą ir per pirmas 6-as inkubacijos valandas sumažino ŽDF metabolinį aktyvumą DMSJC 100 proc. ekstrakto aplinkoje iki 30 fluorescencinio intensyvumo vienetų (22 pav.), o DMSJC 50 proc. ekstrakto aplinkoje – iki 36 vienetų (23 pav.).

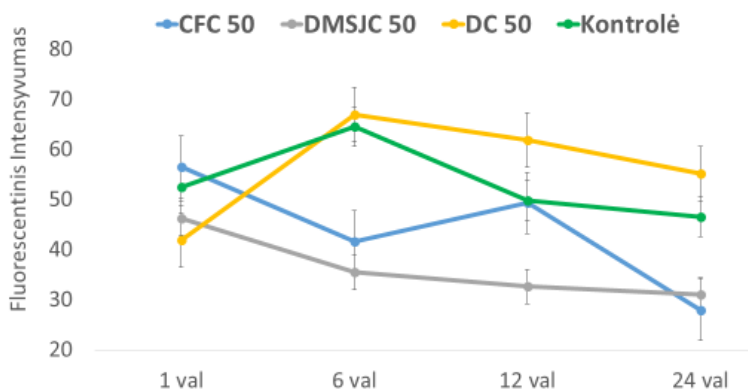


**22 pav.** Ląstelių metabolinio aktyvumo mažėjimas po poveikio 100 proc. cementų ekstraktais

	Fluorescencijos intensyvumas (vnt.)			
	1 val.	6 val.	12 val.	24 val.
Kontrolė	53	65	50	47
CFC 100	54	36	57	29
DMSJC 100	51	30	31	35
DC 100	68	56	50	45



CFC ekstraktai taip pat sumažino ląstelių metabolinį aktyvumą. Po 6 val. inkubacijos 100 proc. CFC ekstraktu paveiktų ląstelių aktyvumas sumažėjo iki 36 fluorescencinio intensyvumo vienetų (22 pav.), o CFC-50 proc. aplinkoje iki – 42 vienetų (23 pav.). Po 12 val. ląstelių aktyvumas CFC aplinkoje sugrįžo į pradinę būseną ir buvo panašus kaip kontrolinėje grupėje. Po 24 val. ląstelių metabolinis aktyvumas vėl sumažėjo ir 100 proc. CFC (22 pav.), ir 50 proc. CFC ekstraktų aplinkose (23 pav.).



**23 pav.** Ląstelių metabolinio aktyvumo mažėjimas po poveikio 50 proc. cementų ekstraktais

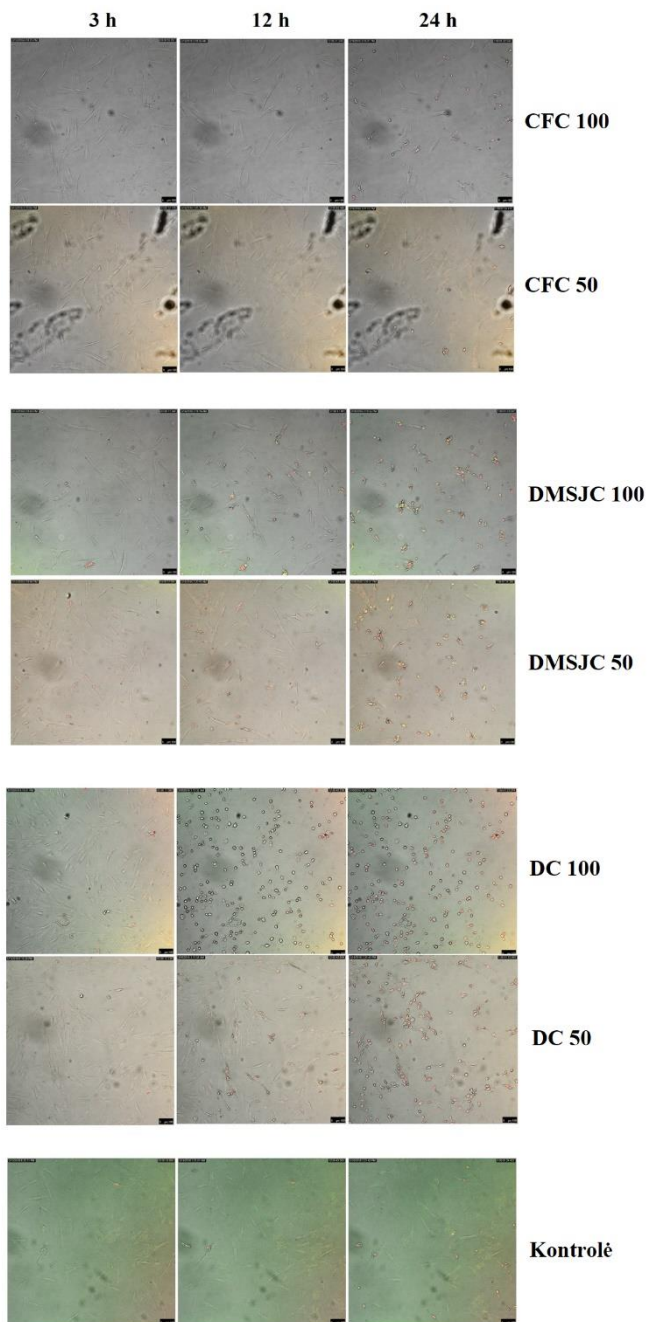
	Fluorescencijos intensyvumas (vnt.)			
	1 val.	6 val.	12 val.	24 val.
Kontrolė	53	65	50	47
CFC 50	57	42	49	28
DMSJC 50	46	36	33	31
DC 50	41,9	67	62	55

DC aplinkoje vyko mažiau ryškūs ląstelių metabolinio aktyvumo pakitimai nei CFC ar DMSJC aplinkose. DC–100 proc. ekstrakto aplinkoje nedidelis ląstelių aktyvumo sumažėjimas buvo matomas po 6 val., o po 12 ir po 24 val. ląstelių aktyvumas buvo panašus į kontrolinės grupės ląstelių aktyvumą (37 pav.). DC–50 proc. aplinkoje po 12 ir 24 val. ląstelių aktyvumas buvo netgi didesnis nei kontrolinėje grupėje.

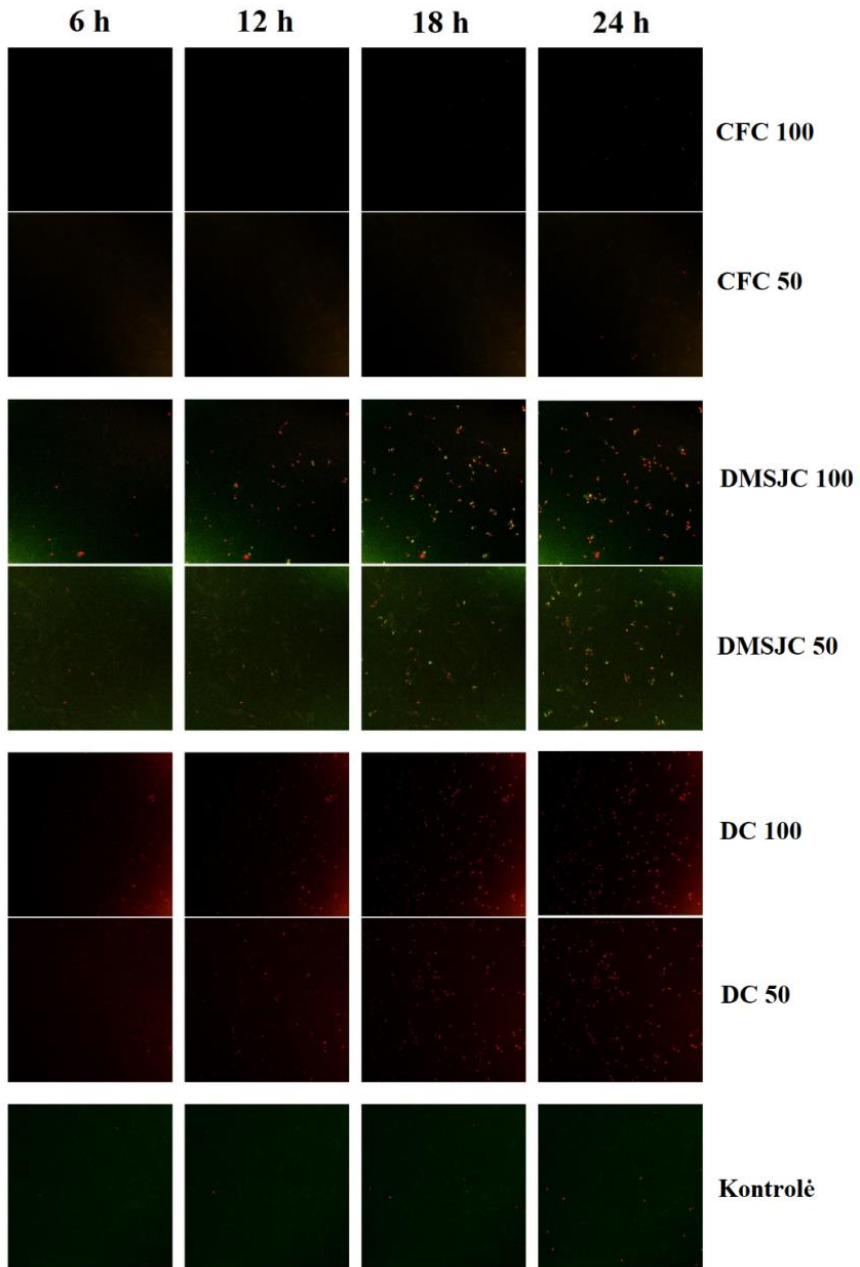
### 3.3.2. Ląstelių morfologinių pakitimų ir žūties būdo įvertinimas

#### 3.3.2.1. Morfologiniai pakitimai

Ląstelių morfologiniai pakitimai buvo stebėti ištisinio stebėjimo metodu. Šis metodas leido įvertinti ankstyvus dinامينius ir morfologinius ląstelių pakitimus, t.y. ląstelių neigiamą reakciją į skirtingus cementų ekstraktus (24 pav.). Greiti ir akivaizdūs ląstelių morfologijos pakitimai vyko paveikus jas 100 proc. DC ekstraktu. Po 3 val. šio cemento aplinkoje buvo stebimas stiprus ląstelių susitraukimas, o po 12 val. visos ląstelės atrodė negrįžtamai pažeistos. 50 proc. DC aplinkoje ląstelių morfologiniai pokyčiai buvo panašūs, bet vyko vėliau nei 100 proc. DC aplinkoje (24 pav.). DMSJC sukėlė ląstelių pokyčius, būdingus apoptozei: ląstelės susitraukė, suapvalėjo ir sutrūkinėjo į mažas pūsleles (24 pav.). Pirmieji pokyčiai pastebėti po 11 val. 100 proc. DMSJC grupėje ir po 15 val. 50 proc. DMSJC grupėje (24 pav.). Jokių ryškių morfologinių pakitimų CFC aplinkoje nebuvo matyti.



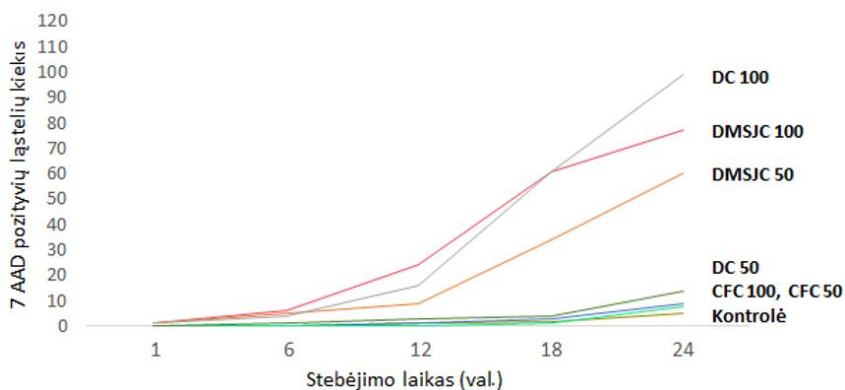
**24 pav.** Ląstelių morfologija paveikus cementų ekstraktais



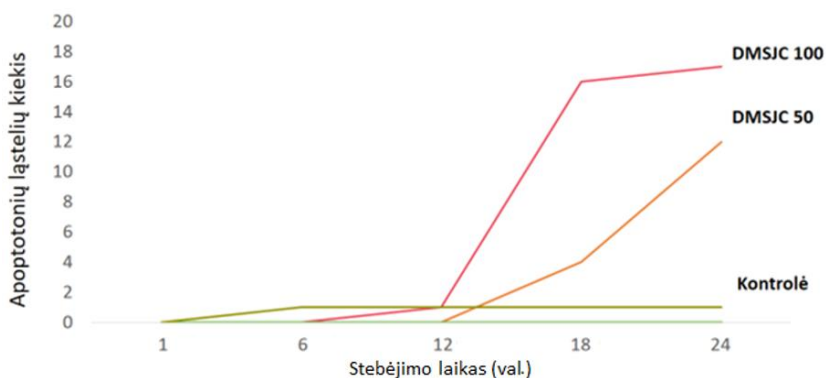
**25 pav.** Tiesioginis ląstelių stebėjimas paveikus skirtingų cementų ekstraktais

### 3.3.2.2. Ląstelių žūties būdo įvertinimas

Pagal stipriai padidėjusį ląstelių membranos pralaidumą 7-AAD nustatyta, kad DC ekstraktai sukėlė ŽDF žūtį nekrozės būdu (26 pav., 11 lentelė). Efektas priklausė nuo dozės (24, 25, 26 pav.). Tuo pačiu metu šio cemento aplinkoje ląstelių kultūrose nebuvo aptikta jokio kaspazės-3/7 aktyvumo (27 pav., 12 lentelė). Šie rezultatai indikuoja, kad DC sukelia ląstelių žūtį tik nekrozės būdu. DMSJC ekstraktų, priešingai nei DC, poveikis sukėlė ŽDF apoptozę (27 pav.). Reikia pažymėti, kad kaspazių-3/7 aktyvumas atsirado iš karto, kai tik padidėjo ląstelių membranos pralaidumas 7-AAD. Šie rezultatai rodo, kad pirminis veiksnys DMSJC ekstraktų inicijuotame apoptozės procese visgi yra ląstelės membranos pralaidumo padidėjimas (26 pav.). Tiesioginis gyvų ląstelių, paveiktų CFC ekstraktais, stebėjimas parodė, kad CFC nesukelia apoptozės ir tik menkai inicijuoja ląstelių nekrozę (26 pav.).



26 pav. Ląstelių nekrozė (7-AAD teigiamos ląstelės) paveikus cementų ekstraktais



27 pav. Ląstelių apoptozė (kaspazių-3/7 teigiamos ląstelės) paveikus cementų ekstraktais

**11 lentelė.** Cementų ekstraktais paveiktų ŽDF nekrozė

7-AAD teigiamų ląstelių skaičius skirtingu stebėjimo laiku

	<b>DMSJC 50</b>	<b>DMSJC 100</b>	<b>DC 100</b>	<b>DC 50</b>	<b>CFC 100</b>	<b>CFC 50</b>	<b>Kontrolė</b>
<b>Val.</b>	Mediana min,max P reikšmė#	Mediana min,max P reikšmė#	Mediana min,max P reikšmė#	Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max
<b>1</b>	1 (0,16)	1 (0, 13) 0,189	1 (0, 20) 0,261	0 (0, 1)	0 (0, 2)	0 (0, 2)	0 (0, 3)
<b>6</b>	6 (0,21) 0,021	5 (0, 16) 0,075	4 (0, 22) 0,064	0 (0, 1)	0 (0, 2)	0 (0, 2)	1 (0, 4)
<b>12</b>	24 (9,38) 0,003	9 (0, 20) 0,074	16 (0,30) 0,100	1 (0, 2)	1 (0, 3)	0 (0, 2)	3 (1, 6)
<b>18</b>	61 (47,76) 0,003	34 (23,45) 0,003	61 (40, 80) 0,003	2 (1, 3)	3 (1, 5)	1 (0, 3)	4 (2, 8)
<b>24</b>	77 (62,93) 0,003	60 (48,71) 0,003	99 (80,120) 0,003	5 (4, 6)	9 (7, 11)	8 (6, 10)	14 (11, 17)

# Mano ir Vitnio testas; cementų ekstraktai lyginami su kontrole tuo pačiu stebėjimo laiku.

**12 lentelė.** Cementų ekstraktais paveiktų ŽDF apoptozė

Apoptotinių ląstelių skaičius skirtingu stebėjimo laiku #

	<b>DMSJC</b>		<b>DC 100</b>	<b>DC 50</b>	<b>CFC 100</b>	<b>CFC 50</b>	<b>Kontrolė</b>
<b>Val.</b>	<b>DMSJC 50</b> Mediana min,max	<b>100</b> Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max	Mediana min,max
<b>1</b>	0 (0, 4)	0 (0, 2)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)
<b>6</b>	0 (0, 4)	0 (0, 2)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1 (0, 1)
<b>12</b>	1 (0, 5)	0 (0, 2)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1 (0, 1)
<b>18</b>	16 (12, 20)	4 (2, 6)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1 (0, 1)
<b>24</b>	17 (13, 21)	12 (10, 14)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1 (0, 1)

# Statistinė analizė neatlikta dėl variacijos lyginamose grupėse nebuvimo.

## 4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Disertaciniame darbe buvo nagrinėtos cementavimo medžiagų savybės – atsparumas dėvėjimuisi ir cementų biosuderinamumas su periodonto audiniais.

### 4.1. Cementų dėvėjimosi priklausomybė nuo cemento sluoksnio dydžio

Protezų cementavimo medžiagų dėvėjimasis yra sudėtingas procesas, priklausantis nuo įvairių priežasčių: kontaktuojančių medžiagų savybių, šio kontakto trukmės, sąveikos tarp skirtingų medžiagų greičio ir aplinkos, kurioje šis kontaktas vyksta (seilės, maisto dalelės, dantų pasta). Visų galimų veiksnių įtaka natūraliomis *in vivo* sąlygomis gali skirtis. Todėl, norėdami išaiškinti atskirų dėvėjimosi veiksnių įtaką, pasirinkome *in vitro* eksperimentą ir, standartizuodami tam tikrus parametrus, tyrėme nepriklausomą atskirų veiksnių – cemento rūšies ir cemento sluoksnio dydžio – įtaką. Ankstesnės studijos apie cementavimo medžiagų dėvėjimąsi naudojo okliuzinio dėvėjimosi modelius (174-176), kitos – kombinuotą medžiagų dėvėjimosi modelį, kuriame kartu vertinamas okliuzinis dėvėjimasis ir dėvėjimasis valant dantų šepetėliu (177). Mus dominanti vieta – danties kaklelio ir dantėnų vagelės sritis, kur baigiasi pilnas vainikėlis ir atsiveria cementu užpildytas mikrotarpelis. Šioje vietoje dėvėjimasis vyksta ne dėl okliuzinės apkrovos, todėl imitavome šioje srityje vykstantį dantų valymą šepetėliu. Taip pat buvo įvertintas nuo protezo tikslumo priklausantis cementu užpildyto tarpo dydis. Buvo testuojama, kaip cementai dėvisi dviejų skirtingų dydžių tarpuose. Tyrimo rezultatai parodė, kad įvairios cementavimo medžiagos 100 μm ir 250 μm tarpuose dėvėjosi nevienodai. Cementai skirtingai dėvėjosi ne tik skirtingo pločio tarpuose, bet akivaizdus dėvėjimosi netolygumas buvo matyti ir skirtingose cemento sluoksnio vietose. Didžiausias visų tirtų cementavimo medžiagų dėvėjimasis buvo cemento dentino riboje, mažiausias – cemento metalo riboje. Šie rezultatai rodo, kad cementavimo medžiagos dėvėjimuisi įtakos turi ir šalia esančių medžiagų kietumas, ir cemento adaptacija prie gretimų audinių, t.y. adhezinės cemento savybės. Tokiu atveju cementų dėvėjimasis tarpo viduryje turėtų labiausiai atspindėti pačios cementavimo medžiagos dėvėjimąsi, o dėvėjimasis tarpo pakraščiuose yra veikiamas šalia esančios medžiagos, ypač šalia esančio dentino.

Apibendrinant pabrėžtina, kad eksperimento rezultatai nerodo aiškaus ryšio tarp cemento dėvėjimosi intensyvumo ir cemento sluoksnio dydžio, nors mokslinėje literatūroje yra duomenų, rodančių tiesioginę priklausomybę tarp intensyvesnio cemento dėvėjimosi ir cementu užpildyto tarpo dydžio (6, 178, 179). Manome, kad didesnė minkštesnio dentino įtaka mūsų eksperimente galėjo paslėpti skirtumus

tarp dėvėjimosi skirtinguose cementų tarpuose. Todėl, renkantis cementavimo medžiagą, reikėtų įvertinti ir šalia esančių medžiagų, ir danties audinių kietumą bei atsparumą dėvėjimuisi.

Lyginant penkių skirtingų cementų rūšių dėvėjimąsi, gautų rezultatų duomenimis, cinko fosfatinis (CFC) ir stiklo jonomerinis (SJC) cementai buvo mažiausiai atsparūs dėvėjimuisi, derva modifikuoto stiklo jonomerinio cemento (DMSJC) dėvėjimosi intensyvumas buvo vidutinis, o kompomerinis (KC) ir dervinis (DC) cementai buvo atspariausi dėvėjimuisi. Lyginome skirtingas cementavimo medžiagų rūšis, tad atsparumo dėvėjimuisi skirtumai tarp skirtingos cheminės sudėties cementų buvo tikėtini. Dervinių cementų dėvėjimasis priklauso nuo polimero tipo, silanizacijos metodo, užpildo kiekio ir užpildo dalelių dydžio (5, 7). Šie veiksniai galėjo turėti įtakos DMSJC, KC, DC cementų dėvėjimosi skirtumams. Mažesnis nei kitų tirtų cementų CFC ir SJC atsparumas dėvėjimuisi gali būti paaiškintas skirtingomis jų fizinėmis ir struktūrinėmis savybėmis, t. y. šių cementų sudėtyje yra vandens, jie yra trapesni nei polimerų pagrindu sudarytos medžiagos, jiems būdingas didesnis porėtumas (180). Panašios cementų dėvėjimosi tendencijos, t. y. didesnis dervinių cementų atsparumas dėvėjimuisi nei SJC, buvo nustatytos ir kitoje cementų dėvėjimąsi nagrinėjusioje studijoje (179).

Reikėtų paaiškinti, kodėl mes stebėjome gana didelę dėvėjimosi įvairovę ne tik tarp skirtingų cementų, bet ir to paties cemento ruošiniuose, ypač cemento dentino riboje. Ši variacija (dėvėjimosi verčių įvairovė) galėjo būti dėl to, kad ruošiniams pagaminti naudojome didelį kiekį raguočių dantų. Žinoma, kad raguočių dentino struktūra yra panaši į žmonių (174, 175), o mokslinėje literatūroje yra aprašytas atvirkštinis ryšys tarp dentino kietumo ir dentino tubulių tankio (181). Mėginių dentino savybės galėjo skirtis dėl skirtingo raguočių amžiaus ar dentino blokelių išpjovimo vietos (emalio dentino riba, dentinas arčiau pulpos). Kita galima variacijos priežastis – to paties šepetėlio naudojimas trimis ruošiniams. Tikėtina, kad naudoto šepetėlio šereliai lėmė silpnesnį trynimo efektą ir mažesnę cemento dėvėjimąsi, palygint su nauju šepetėliu. Naudotų šepetėlių šerelių suplokštėjimą rodo SEM nuotraukos.

Nepaisant šių trūkumų, dėvėjimosi tyrimo rezultatai rodo aiškias cementavimo medžiagų dėvėjimosi tendencijas – tradiciniai cementai yra mažai atsparūs, o dervų turintys cementai – pasižymi didesniu atsparumu dėvėjimuisi.

#### 4.2. Cementų biosuderinamumas

Klinikinėje situacijoje, kai cementuojamas vainikėlis baigiasi po dantenomis ar ties dantenų kraštu, cementavimo medžiaga liečiasi su dantenomis, t. y. su dantenų ląstelėmis kontaktuoja tiesiogiai. Virš dantenų besibaigiančio vainikėlio atveju –



cementas neturi tiesioginio kontakto su periodonto audiniais. Todėl cementavimo medžiagų biosuderinamumui ištirti buvo naudojamas ir tiesioginis cementavimo medžiagos kontaktas su dantenu fibroblastais, ir netiesioginis, t. y. dantenu ląstelės buvo veikiamos cementų ekstraktais. Tyrimui pasirinkti klasikinis CFC ir – dažniausiai dabar naudojamų cementų rūšys – DMSJC ir DC.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė visų tirtų cementų (CFC, DMSJC, DC) citotoksiškumą, t. y. šių medžiagų aplinkoje žmogaus dantenu fibroblastų išgyvenamumas buvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei aplinkoje, neturinčioje cementų (kontroliniuose ruošiniuose). Skirtingų rūšių cementavimo medžiagų citotoksiškumas skyrėsi: CFC buvo mažiausiai citotoksiškas, palygint su labiau citotoksiškais DMSJC ir DC. Mūsų eksperimentų rezultatai dalinai panašūs į kitų *in vitro* studijų, patvirtinančių įvairių odontologinių medžiagų neigiamą įtaką ląstelių išgyvenamumui ir skirtumus tarp įvairių gamintojų medžiagų (137, 168, 182, 183), rezultatus.

Literatūros duomenimis citotoksiškumo priežastys gali būti kelios. Fosfatinių cementų neigiamas poveikis gali būti susijęs su Zn jonais ir kitomis cheminėmis medžiagomis (184). Stiklo jonomerų citotoksiškumas siejamas su fluoro išsiskyrimu (116), nors Stanislavskis ir kt. teigė, kad  $F^-$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  koncentracijos *in vitro* studijų ruošiniuose yra per mažos norint sukelti citotoksinius reiškinius (185) ir DMSJC citotoksiškumą aiškino laisvųjų monomerų išsiskyrimu (185). Goldberg patvirtino, kad laisvieji monomerai išsiskiria dviem etapais: 1) pirminės monomero-polimero konversijos metu ir 2) vėlyvuju laikotarpiu dėl ilgalaikio ir pastovaus medžiagų irimo (186). Viena iš cementų citotoksiškumo priežasčių gali būti ir rūgštinė cementų aplinka. Ypač ankstyvieji protezų cementavimo medžiagų citotoksiniai poveikiai gali būti susiję su cementų rūgštingumu (187), (188). Tai patvirtina ir mūsų rūgštingumo tyrimo rezultatai. Visų mūsų tirtų sukietėjusių cementų aplinkoje susidarė rūgštinis pH. Maždaug po trijų valandų buvo matyti grįžimo neutralaus pH link tendencija, bet net ir po 48 val. nė vieno cemento pH nebuvo neutralus. Rūgštys ir kiti chemikalai gali prasiskverbti į dantiną ir sukelti kenksmingas pulpos ir periodonto audinių reakcijas (21, 187, 188). Ankstesni tyrimai parodė, kad net mažos monomerų, pvz., HEMA, koncentracijos gali pakeisti žmogaus dantenu fibroblastų ir pulpos ląstelių morfologiją (145). Kita *in vitro* studija pademonstravo laisvųjų monomerų sukeltą makrofaginių ląstelių žūtį (189). Nepakankamas medžiagų kietinimas arba ilgas jų kietėjimo laikas taip pat gali padidinti cementavimo medžiagų citotoksines savybes, pvz., buvo rasta, kad dvigubo kietėjimo medžiagos turi mažesnę citotoksiškumą nei cheminio kietėjimo medžiagos (118). Todėl, renkantis dervos pagrindu sukurtas cementavimo medžiagas, svarbu įvertinti ir jų kietėjimo ypatumus (182, 190).

Mūsų eksperimento rezultatai taip pat parodė, kad stipriausias cementų citotoksiškumas buvo tyrimo pradžioje, o vėliau citotoksiškumas mažėjo. Panašios tendencijos buvo rastos ir kituose tyrimuose (168, 191). Šie pokyčiai aiškinti intensyvesniu monomerų išsiskyrimu kietėjimo pradžioje (192). Literatūroje jau aprašomos eksperimentinės cementavimo medžiagos, kurios pasižymi mažesniu nopolimerizuotų monomerų išsiskyrimu (193-195).

Svarbus mūsų eksperimento rezultatas – teigiamas cementų nuplovimo efektas (citoloksiškumo sumažinimui). Cementų nuplovimas turėjo teigiamą poveikį ir ląstelių išgyvenamumui, ir cementų rūgštingumo mažinimui – nuplautų cementų (ypač CFC ir DMSJC) aplinka buvo mažiau rūgštinė nei nenuplautų. Taigi gausus visiškai sukietėjusio cemento paviršiaus nuplovimas sumažina cemento citotoksiškumą ir turėtų būti atliekamas po kiekvienos cementavimo procedūros.

#### 4.3. Cementų ekstraktų poveikis periodonto ląstelių metaboliniam aktyvumui ir jų žūties būdai

Cementavimo medžiagų poveikiui periodonto ląstelėms įvertinti, kai nėra tiesioginio kontakto tarp cemento ir dantėnų audinio, citotoksiškumo tyrimus atlikome su cementų ekstraktais.

Tetrazolio ir rezozurino redukcijos testai tebėra plačiai naudojami potencialiam odontologinių medžiagų toksiškumui nustatyti. Šie testai yra paremti tam tikrų substratų konversija spalviniais ar fluorescuojančiais produktais. Spalvos arba fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas gyvybingų ląstelių skaičiui. Šiame tyrime buvo panaudotas rezazurinu paremtas komercinis ląstelių gyvybingumo rinkinys *PrestoBlue (Life technologies)*. Metaboliškai aktyvių ląstelių fermentai pakeičia rezazuriną į stipriai fluorescuojantį resorufiną (angl. *resorufin*), kuris gali būti išmatuotas fluorometriškai (196). Šis testas rodo ląstelių kultūros metabolinę būseną tam tikrame laiko taške, tačiau nenurodo konkretaus gyvybingų ląstelių kiekio. Žinoma, kad ląstelių metabolinis aktyvumas ypač priklauso nuo tokių veiksnių kaip ląstelių tankumas kultūroje, tarpląstelinio užpildo tipo ir ne visada rodo tikrąją proliferacijos dažnį. Pavyzdžiui, viename tyrime buvo nustatyta, kad metabolinio aktyvumo ir ląstelių tankio koreliacija nėra tiesinė, taip pat ji skiriasi 2D ir 3D ląstelių kultūrose (15). Kitame tyrime buvo parodyta, kad kiekybiškai įvertinant fluoroforais (angl. *fluorophores*) žymėtą DNR, galima tiksliau nustatyti ląstelių dauginimosi dinamiką negu rezazurinu paremtu metabolinio aktyvumo testu (197). Todėl atskiri metabolinio aktyvumo testų rezultatai turi būti interpretuojami atsakingai ir pageidautina juos patikrinti lygiagrečiai naudojant alternatyvius metodus, tokius kaip tiesioginis ląstelių skaičiaus įvertinimas hemocitometru, tripano mėlio testu ar pasirenkant tiesioginį

gyvų ląstelių stebėjimą mikroskopu. Cementų ekstraktų citotoksiškumo tyrime (resozurino testu) nustatėme, kad DC ekstraktai turėjo minimalų poveikį ŽDF ląstelių metaboliniam aktyvumui (22, 23 pav.). Tačiau ląstelių stebėjimas mikroskopu parodė priešingus rezultatus, kur DC ekstraktai, priklausomai nuo laiko ir dozės, sumažino gyvybingų ląstelių skaičių ir iniciavo ŽDF žūtį nekrozės būdu (24 pav., 26 pav.). Tuo tarpu DMSJC ir CFC ekstraktais paveiktų ląstelių metabolinis aktyvumas buvo proporcingas gyvybingų ląstelių skaičiui.

Mūsų atlikti tyrimai su kietomis cementavimo medžiagomis, taip pat patvirtino citotoksišią DMSJC ir DC poveikį ŽDF gyvybingumui. Manome, kad rezultatų neatitikimus galėjo lemti DC cemento komponentų ir resozurino tarpusavio sąveika. Kita tikėtina prielaida, kad DC komponentai galėjo stimuliuoti fermentus, susijusius su resozurino redukcija. Dėl to siūlome, kad metabolinio aktyvumo testų rezultatai turi būti lygiagrečiai validuojami kitais alternatyviais metodais.

Tiesioginė ląstelių stebėjimo sistema yra pranašesnė už įprastinius ląstelių būseną įvertinančius metodus dėl keleto priežasčių. Mes galėjome stebėti realiu laiku vykstančius ląstelių morfologinius pokyčius, migracinį aktyvumą, proliferacijos dažnį ir kt., o fiksuodami aktyvių kaspazių-3/7 išraišką ir ląstelių membranos vientisumo pokyčius, taip pat galėjome nustatyti cementų sukeltą ląstelių pirminį žūties būdą (nekrozė arba apoptozė). Mūsų žiniomis, tai pirmas tokio pobūdžio tyrimas, kai buvo vertinamas plačiai naudojamų cementų citotoksiškumas panaudojant tiesioginę gyvų ląstelių stebėjimo sistemą.

Tiesioginis gyvų ląstelių stebėjimas parodė, kad ekstraktai, gauti iš skirtingų cementų, sukelia ląstelių žūtį skirtingais būdais. Apoptozė (nustatyta pagal aktyvintą kaspazę-3/7) ŽDF kultūroje sukelia tik DMSJC ekstraktų aplinkoje (27 pav.). Pastebėta, kad kaspazės 3-/7 aktyvinamos iš karto po to, kai padidėja ląstelių membranos pralaidumas 7-AAD (26 pav.). Tai rodo, kad prieš kaspazių aktyvaciją įvyksta membranos integralumo praradimas. Kita vertus, DC sukėlė greitus ląstelių morfologijos pasikeitimus ir stiprų ląstelių membranų pralaidumą 7-AAD, bet neaktyvino kaspazių. Tai rodo, kad ŽDF DC aplinkoje žūsta nekrozės būdu (27 pav.). Nekrozė susijusi su nekontroliuojamu uždegiminių komponentų išsiskyrimu iš ląstelės ir uždegimo formavimusi aplinkiniuose audiniuose, o apoptozė vyksta nesukeldama uždegimo (198). Taigi tolesniuose tyrimuose būtų tikslinga palyginti uždegiminio atsako eigą ląstelėse po poveikio DMSJC ir DC eksperimentiniuose modeliuose *in vitro* bei *in vivo*. Apibendrinant, šiuo eksperimentu parodėme, kad DMSJC ekstraktai sukelia ląstelių žūtį apoptozės būdu, o ekstraktai gauti iš DC ir CFC inicijuoja ląstelių nekrozę.

Taip pat, remiantis mūsų pastebėjimais, plačiai naudojami metabolinio aktyvumo testai citotoksiškumui nustatyti, turėtų būti kontroliuojami lygiagrečiai atliekamais alternatyviais metodais.

Mūsų eksperimentai parodė aiškias cementavimo medžiagų citotoksiškumo tendencijas, tačiau klinikinis šių rezultatų pritaikymas turi išlygų. Citotoksiškumo pasireiškimas klinikinėmis sąlygomis gali būti skirtingas, nes burnos aplinka skiriasi nuo eksperimentinių sąlygų. Apsauginės funkcijos, vykstančios periodonto audiniuose, gali bent iš dalies neutralizuoti cementų sukeltus citotoksinius reiškinius.

Cementavimo medžiagų pasiūla yra didelė, atsiranda vis naujų produktų. Akivaizdu, kad nėra idealios visoms klinikinėms situacijoms tinkančios medžiagos. Gydytojo odontologo pareiga yra visapusiškai įvertinti situaciją ir, remiantis moksliniais tyrimais, konkrečiam klinikiniam atvejui parinkti optimaliausią medžiagą.

## IŠVADOS

1. Cinko fosfatinis ir stiklo jonomerinis cementai pasižymėjo mažiausiu, derva modifikuotas – vidutiniu, o kompomerinis ir dervinis cementai – didžiausiu atsparumu dėvėjimuisi.
2. Aiškių cementavimo medžiagų dėvėjimosi tendencijų, susijusių su cemento sluoksnio dydžiu, nenustatyta. Visų tirtų cementavimo medžiagų didžiausias dėvėjimasis buvo cemento ir dentino riboje.
3. Visos tirtos cementavimo medžiagos, tiesiogiai kontaktuodamos su žmogaus dantų fibroblastais, sukėlė citotoksines reakcijas. Cinko fosfatinis cementas buvo mažiausiai citotoksiškas, palyginti su labiau citotoksiškais derva modifikuotu stiklo jonomeriniu ir derviniu cementais.
4. Cementų paviršiaus nuplovimas turėjo teigiamą poveikį – nuplautų cementų citotoksiškumas buvo mažesnis nei nenuplautų.
5. Derva modifikuoto stiklo jonomerinio ir dervinio cementų ekstraktai sumažino žmogaus dantų fibroblastų metabolinį aktyvumą; derva modifikuoto stiklo jonomerinio cemento neigiamas poveikis buvo didžiausias, o dervinio cemento aplinkoje buvo matyti neryškus ląstelių metabolinio aktyvumo sumažėjimas. Didesnių morfologinių pakitimų cinko fosfato aplinkoje nestebėta.
6. Derva modifikuoto stiklo jonomerinio cemento ekstraktai sukėlė ląstelių morfologinius pakitimus būdingus apoptozei, o dervinio cemento ekstraktai skatino ląstelių nekrozę. Cinko fosfatinio cemento ekstraktai tik menkai inicijavo ląstelių nekrozę.

## PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Fiksuotų protezų cementavimo medžiagoms būdingas mechaninis dėvėjimasis. Dantų valymas šepetėliu – viena iš galimų dėvėjimosi danties kaklelio srityje priežasčių. Renkantis protezo cementavimo medžiagą, reikėtų įvertinti jos atsparumą dėvėjimuisi. Atspariausi dantų valymui šepetėliu turėtų būti derviniai cementai, o daugiausia dėvisi – cinko fosfatinis ir stiklo jonomerinis cementai. Rekomenduojama protezuotus dantis (kaip ir neprotezuotus) valyti minkštu dantų šepetėliu danties kaklelio srityje neatliekant horizontalių valymo judesių, o tik vidutinio stiprumo, sukamuosius ar šluojamuosius valymo judesius.
2. Nuolatiniai dantų protezų cementai gali sukelti citotoksines reakcijas. Gausus sukietėjusio cemento paviršiaus nuplovimas iš karto po cementavimo galėtų padėti išvengti citotoksinio cementų poveikio periodontui ar bent jį sumažinti.
3. Visi tirti cementai po sukietėjimo pasižymėjo rūgštiniu pH. Rekomenduojama po cementavimo darbo lauką gausiai nuplauti vandens srove.
4. Parenkant cementavimo medžiagą reikėtų vertinti tiek fizines, tiek biologines medžiagos savybes.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. The Glossary of Prosthodontic Terms. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2005;94(1):10-92.
2. Ladha K, Verma M. Conventional and contemporary luting cements: an overview. *J Indian Prosthodont Soc*. 2010;10(2):79-88.
3. Sita Ramaraju DV, Alla RK, Venkata Ramaraju Alluri RM. A Review of Conventional and Contemporary Luting Agents Used in Dentistry. *American Journal of Materials Science and Engineering*. 2014;2(3):28-35.
4. Sirajuddin S, Narasappa KM, Gundapaneni V, Chungkham S, Walikar AS. Iatrogenic Damage to Periodontium by Restorative Treatment Procedures: An Overview. *Open Dent J*. 2015;9:217-22.
5. Frazier KB, Sarrett DC. Wear resistance of dual-cured resin luting agents. *Am J Dent*. 1995;8(4):161-4.
6. Kawai K, Isenberg BP, Leinfelder KF. Effect of gap dimension on composite resin cement wear. *Quintessence Int*. 1994;25(1):53-8.
7. Peutzfeldt A. Dual-cure resin cements: in vitro wear and effect of quantity of remaining double bonds, filler volume, and light curing. *Acta Odontol Scand*. 1995;53(1):29-34.
8. Suzuki S, Leinfelder KF, Shinkai K. Wear resistance of resin cements. *Am J Dent*. 1995;8(2):83-7.
9. Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Latta MA, Miayazaki M. Relationship Between Simulated Gap Wear and Generalized Wear of Resin Luting Cements. *Oper Dent*. 2017;42(5):E148-E58.
10. Braga RR, Condon JR, Ferracane JL. In vitro wear simulation measurements of composite versus resin-modified glass ionomer luting cements for all-ceramic restorations. *J Esthet Restor Dent*. 2002;14(6):368-76.
11. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Ebsco Publishing; 2014. 364 p.
12. Caldas IP, Alves GG, Barbosa IB, Scelza P, de Noronha F, Scelza MZ. In vitro cytotoxicity of dental adhesives: A systematic review. *Dent Mater*. 2019;35(2):195-205.
13. Kwon JS, Piao YZ, Cho SA, Yang SY, Kim JH, An S, et al. Biocompatibility Evaluation of Dental Luting Cements Using Cytokine Released from Human Oral Fibroblasts and Keratinocytes. *Materials (Basel)*. 2015;8(11):7269-77.
14. Soares DG, Brito CA, Tavares da Silva RH, Ribeiro AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytocompatibility of HEMA-free resin-based luting cements according to application protocols on dentine surfaces. *Int Endod J*. 2016;49(6):551-60.
15. Ng KW, Leong DT, Hutmacher DW. The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):182-91.
16. Shi H, Kwok RT, Liu J, Xing B, Tang BZ, Liu B. Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics. *J Am Chem Soc*. 2012;134(43):17972-81.
17. Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Watanabe H, Johnson WW, Latta MA, et al. Simulated localized wear of resin luting cements for universal adhesive systems with different curing mode. *J Oral Sci*. 2018;60(1):29-36.
18. K.J. A. Phillip's *Science of Dental Materials*. 11th ed. Philadelphia: WB Saunders Co.; 2003 2003.

19. Nayakar RP, Patil NP, Lekha K. Comparative evaluation of bond strengths of different core materials with various luting agents used for cast crown restorations. *J Indian Prosthodont Soc.* 2012;12(3):168-74.
20. Alla RK. *Dental Materials Science.* New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2013 2013.
21. Smith DC. A new dental cement. *Br Dent J.* 1968;124(9):381-4.
22. Diaz-Arnold AM, Vargas MA, Haselton DR. Current status of luting agents for fixed prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1999;81(2):135-41.
23. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Br Dent J.* 1972;132(4):133-5.
24. Sakaguchi RL, Powers JM. *Craig's Restorative Dental Materials.* 12th ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby; 2011 2011.
25. Almuhaiza M. Glass-ionomer Cements in Restorative Dentistry: A Critical Appraisal. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17(4):331-6.
26. Bagheri R, Taha NA, Azar MR, Burrow MF. Effect of G-Coat Plus on the mechanical properties of glass-ionomer cements. *Aust Dent J.* 2013;58(4):448-53.
27. R.G. C. *Restorative Dental Materials.* 10th ed. St. Louis: Mosby; 1997 1997.
28. Lad PP, Kamath M, Tarale K, Kusugal PB. Practical clinical considerations of luting cements: A review. *J Int Oral Health.* 2014;6(1):116-20.
29. Cildir SK, Sandalli N. Fluoride release/uptake of glass-ionomer cements and polyacid-modified composite resins. *Dent Mater J.* 2005;24(1):92-7.
30. Mount GJ. *An atlas of glass-ionomer cements: a clinicians guide.* 3rd ed. New York: Martin Duntiz; 2002. 224 p.
31. Marghalani HY. Sorption and solubility characteristics of self-adhesive resin cements. *Dent Mater.* 2012;28(10):e187-e98.
32. Milward PJ, Adusei GO, Lynch CD. Improving some selected properties of dental polyacid-modified composite resins. *Dent Mater.* 2011;27(10):997-1002.
33. Rickman LJ, Satterthwaite JD. Considerations for the selection of a luting cement. *Dent Update.* 2010;37(4):247-2, 55.
34. O'Brien W. *Dental materials and their selection.* 3rd ed. Chicago: Quintessence; 2002 2002.
35. Wilson AD, J.W. N. *Acid-base cements, their biomedical and industrial applications.* New York: Cambridge University Press; 1993 1993.
36. Donovan TE, Cho GC. Contemporary evaluation of dental cements. *Compend Contin Educ Dent.* 1999;20(3):197-8, 210.
37. Stewart MG, Bagby M. *Clinical Aspects of Dental Materials. Theory, Practice, and Cases.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2013 2013.
38. Irie M, Suzuki K. Current luting cements: marginal gap formation of composite inlay and their mechanical properties. *Dent Mater.* 2001;17(4):347-53.
39. Kosyfaki P, del Pilar Pinilla MM, Strub JR. Relationship between crowns and the periodontium: a literature update. *Quintessence Int.* 2010;41(2):109-26.
40. Reeves J. Periodontal health--challenges in restorative dentistry. *Prim Dent J.* 2014;3(2):73-6.
41. Moretti LA, Barros RR, Costa PP, Oliveira FS, Ribeiro FJ, Novaes AB, Jr., et al. The influence of restorations and prosthetic crowns finishing lines on inflammatory levels after non-surgical periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol.* 2011;13(3):65-72.



42. Halperin-Sternfeld M, Saminsky M, Machtei EE, Horwitz J. The association between dental proximal restorations and periodontal disease: A retrospective 10-18 years longitudinal study. *Quintessence Int.* 2016;47(3):249-59.
43. Juloski J, Koken S, Ferrari M. Cervical margin relocation in indirect adhesive restorations: A literature review. *J Prosthodont Res.* 2018;62(3):273-80.
44. Jei JB, Mohan J. Comparative Evaluation of Marginal Accuracy of a Cast Fixed Partial Denture Compared to Soldered Fixed Partial Denture Made of Two Different Base Metal Alloys and Casting Techniques: An In vitro Study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2014;14(1):104-9.
45. Bronson MR, Lindquist TJ, Dawson DV. Clinical acceptability of crown margins versus marginal gaps as determined by pre-doctoral students and prosthodontists. *J Prosthodont.* 2005;14(4):226-32.
46. Fransson B, Oilo G, Gjeitanger R. The fit of metal-ceramic crowns, a clinical study. *Dent Mater.* 1985;1(5):197-9.
47. Felton DA, Kanoy BE, Bayne SC, Wirthman GP. Effect of in vivo crown margin discrepancies on periodontal health. *J Prosthet Dent.* 1991;65(3):357-64.
48. Pilathadka S, Slezak R, Vahaloa D, Kudiyirickal MG, Sukumar S. Influence of different luting agents on the marginal discrepancy of Procera Allceram alumina crown copings--an experimental study. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2008;51(1):13-8.
49. De Jager N, Pallav P, Feilzer AJ. Finite element analysis model to simulate the behavior of luting cements during setting. *Dent Mater.* 2005;21(11):1025-32.
50. Ms T, J D, B R. Evaluation of Compressive Strength and Sorption/Solubility of Four Luting Cements. *J Dent Biomater.* 2017;4(2):387-93.
51. Al-Madi EM, Al-Saleh SA, Al-Khudairy RI, Aba-Hussein TW. Influence of Iatrogenic Gaps, Cement Type, and Time on Microleakage of Cast Posts Using Spectrophotometer and Glucose Filtration Measurements. *Int J Prosthodont.* 2018;31(6):627-33.
52. Hooshmand T, Mohajerfar M, Keshvad A, Motahhary P. Microleakage and marginal gap of adhesive cements for noble alloy full cast crowns. *Oper Dent.* 2011;36(3):258-65.
53. Al-Haj Ali SN, Farah RI. In vitro comparison of microleakage between preformed metal crowns and aesthetic crowns of primary molars using different adhesive luting cements. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2018;19(6):387-92.
54. Giti R, Vojdani M, Abduo J, Bagheri R. The Comparison of Sorption and Solubility Behavior of Four Different Resin Luting Cements in Different Storage Media. *J Dent (Shiraz ).* 2016;17(2):91-7.
55. Parameswari BD, Rajakumar M, Lambodaran G, Sundar S. Comparative study on the tensile bond strength and marginal fit of complete veneer cast metal crowns using various luting agents: An *in vitro* study. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(Suppl 1):S138-S43.
56. Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M. In-vitro solubility of three types of resin and conventional luting cements. *J Oral Rehabil.* 1998;25(4):285-91.
57. Bharali K, Das M, Jalan S, Paul R, Deka A. To Compare and Evaluate the Sorption and Solubility of Four Luting Cements after Immersion in Artificial Saliva of Different pH Values. *J Pharm Bioallied Sci.* 2017;9(Suppl 1):S103-S6.
58. Milutinovic-Nikolic AD, Medic VB, Vukovic ZM. Porosity of different dental luting cements. *Dent Mater.* 2007;23(6):674-8.

59. Malkoc MA, Sevimay M, Tatar I, Celik HH. Micro-CT Detection and Characterization of Porosity in Luting Cements. *J Prosthodont.* 2015;24(7):553-61.
60. Orstavik J, Orstavik D, Kommisar J. Preferential affinity of oral bacteria for homologous salivary films on dental materials. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(1):49-56.
61. Duymuş ZY. An investigation of pH changes of various cements. *Quintessence Int.* 2004;35(9):753-7.
62. Charlton DG, Moore BK, Swartz ML. Direct surface pH determinations of setting cements. *Oper Dent.* 1991;16(6):231-8.
63. Gupta N, Reddy UN, Vasundhar PL, Ramarao KS, Varma KP, Vinod V. Effectiveness of desensitizing agents in relieving the pre- and postcementation sensitivity for full coverage restorations: a clinical evaluation. *J Contemp Dent Pract.* 2013;14(5):858-65.
64. Shetty RM, Bhat S, Mehta D, Srivatsa G, Shetty YB. Comparative analysis of postcementation hypersensitivity with glass ionomer cement and a resin cement: an in vivo study. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13(3):327-31.
65. Swift EJ, Jr., Lloyd AH, Felton DA. The effect of resin desensitizing agents on crown retention. *J Am Dent Assoc.* 1997;128(2):195-200.
66. Hosida TY, Delbem ACB, Morais LA, Moraes JCS, Duque C, Souza JAS, et al. Ion release, antimicrobial and physio-mechanical properties of glass ionomer cement containing micro or nanosized hexametaphosphate, and their effect on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 2018.
67. Unosson E, Cai Y, Jiang X, Loof J, Welch K, Engqvist H. Antibacterial properties of dental luting agents: potential to hinder the development of secondary caries. *Int J Dent.* 2012;2012:529495.
68. Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK. Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dent Res J (Isfahan).* 2010;7(2):82-7.
69. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater.* 2008;24(12):1702-8.
70. Padbury A, Jr., Eber R, Wang HL. Interactions between the gingiva and the margin of restorations. *J Clin Periodontol.* 2003;30(5):379-85.
71. Matthews DC, Tabesh M. Detection of localized tooth-related factors that predispose to periodontal infections. *Periodontol 2000.* 2004;34:136-50.
72. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease - PDF Free Download. [epdfpub](#).
73. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology 2000.* 2003;32:11-23.
74. Saldanha DV, Gomes SC, Souza DM, Cavagni J, Oppermann RV. Periodontal response to subgingival restorations in dogs with periodontitis. *Acta Odontol Latinoam.* 2012;25(1):45-52.
75. Oppermann RV, Gomes SC, Cavagni J, Cayana EG, Conceicao EN. Response to Proximal Restorations Placed Either Subgingivally or Following Crown Lengthening in Patients with No History of Periodontal Disease. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2016;36(1):117-24.
76. Paolantonio M, D'ercole S, Perinetti G, Tripodi D, Catamo G, Serra E, et al. Clinical and microbiological effects of different restorative materials on the periodontal tissues adjacent to subgingival class V restorations. *J Clin Periodontol.* 2004;31(3):200-7.

77. Isler SC, Ozcan G, Akca G, Kocabas Z. The effects of different restorative materials on periodontopathogens in combined restorative-periodontal treatment. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170154.
78. Forster A, Ungvari K, Gyorgyey A, Kukovecz A, Turzo K, Nagy K. Human epithelial tissue culture study on restorative materials. *J Dent.* 2014;42(1):7-14.
79. Sabaliauskas V, Juciute R, Bukelskiene V, Rutkunas V, Trumpaite-Vanagiene R, Puriene A. In vitro evaluation of cytotoxicity of permanent prosthetic materials. *Stomatologija.* 2011;13(3):75-80.
80. Kawai K, Urano M. Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent.* 2001;26(4):396-400.
81. Schmalz G, Bindeslev DA. *Biocompatibility of Dental Materials.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009 2009.
82. Litonjua LA, Cabanilla LL, Abbott LJ. Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent.* 2011;32(4):e69-72.
83. Schätzle M, Land NP, Anerud A, Boysen H, Bürgin W, Loe H. The influence of margins of restorations of the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol.* 2001;28(1):57-64.
84. Rosenstiel SF. *Contemporary Fixed Prosthodontics - 5th Edition.* 2016(5 edition).
85. Sood S, Gupta S. Periodontal-Restorative Interactions: A Review. *Indian Journal of Clinical Practice* 2013April;23(11):707-13.
86. Linkevicius T, Vindasiute E, Puisys A, Linkeviciene L, Maslova N, Puriene A. The influence of the cementation margin position on the amount of undetected cement. A prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(1):71-6.
87. Korsch M, Walther W, Marten S-M, Obst U. Microbial analysis of biofilms on cement surfaces: An investigation in cement-associated peri-implantitis. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12(2):70-80.
88. Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontology 2000.* 2018;76(1):116-30.
89. Korsch M, Marten S-M, Dötsch A, Jáuregui R, Pieper DH, Obst U. Effect of dental cements on peri-implant microbial community: comparison of the microbial communities inhabiting the peri-implant tissue when using different luting cements. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(12):e161-e6.
90. Wilson TG. The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J Periodontol.* 2009;80(9):1388-92.
91. Wilson TG, Valderrama P, Burbano M, Blansett J, Levine R, Kessler H, et al. Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. *J Periodontol.* 2015;86(1):9-15.
92. Korsch M, Obst U, Walther W. Cement-associated peri-implantitis: a retrospective clinical observational study of fixed implant-supported restorations using a methacrylate cement. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):797-802.
93. Vindasiute E, Puisys A, Maslova N, Linkeviciene L, Peciuliene V, Linkevicius T. Clinical Factors Influencing Removal of the Cement Excess in Implant-Supported Restorations. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(4):771-8.
94. Korsch M, Robra B-P, Walther W. Predictors of excess cement and tissue response to fixed implant-supported dentures after cementation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17 Suppl 1:e45-53.
95. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S257-S66.

96. Burbano M, Wilson TG, Valderrama P, Blansett J, Wadhvani CPK, Choudhary PK, et al. Characterization of Cement Particles Found in Peri-implantitis-Affected Human Biopsy Specimens. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(5):1168-73.
97. Agar JR, Cameron SM, Hughbanks JC, Parker MH. Cement removal from restorations luted to titanium abutments with simulated subgingival margins. *J Prosthet Dent*. 1997;78(1):43-7.
98. Dmytryk JJ, Fox SC, Moriarty JD. The effects of scaling titanium implant surfaces with metal and plastic instruments on cell attachment. *J Periodontol*. 1990;61(8):491-6.
99. Linkevicius T, Puisys A, Vindasiute E, Linkeviciene L, Apse P. Does residual cement around implant-supported restorations cause peri-implant disease? A retrospective case analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(11):1179-84.
100. Pearson GJ, Longman CM. Water sorption and solubility of resin-based materials following inadequate polymerization by a visible-light curing system. *J Oral Rehabil*. 1989;16(1):57-61.
101. Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. *J Prosthet Dent*. 1990;63(5):513-21.
102. Bozini T, Theocharidou A, P K. Biologic Profile of Resin-modified Glass-ionomer and Resin-based Cements. *Balk J Stom*. 2009;13:131-40.
103. Pette GA, Ganeles J, Norkin FJ. Radiographic appearance of commonly used cements in implant dentistry. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33(1):61-8.
104. Wilson TG. Letter to the Editor: Re: Investigation of the Association Between Cement Retention and Prevalent Peri-Implant Diseases: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol*. 2016;87(9):998-9.
105. Vindašiūtė-Narbutė E. Cemento pertekliaus šalinimo nuo vainikėlių, cementuojamų ant dantų implantų, vertinimas. Vilnius: VU; 2018. 40 p.
106. Pesce P, Canullo L, Grusovin MG, de Bruyn H, Cosyn J, Pera P. Systematic review of some prosthetic risk factors for periimplantitis. *J Prosthet Dent*. 2015;114(3):346-50.
107. Korsch M, Marten S-M, Walther W, Vital M, Pieper DH, Dötsch A. Impact of dental cement on the peri-implant biofilm-microbial comparison of two different cements in an in vivo observational study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20(5):806-13.
108. Jain JK, Sethuraman R, Chauhan S, Javiya P, Srivastava S, Patel R, et al. Retention failures in cement- and screw-retained fixed restorations on dental implants in partially edentulous arches: A systematic review with meta-analysis. *J Indian Prosthodont Soc*. 2018;18(3):201-11.
109. Staubli N, Walter C, Schmidt JC, Weiger R, Zitzmann NU. Excess cement and the risk of peri-implant disease - a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(10):1278-90.
110. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S267-S90.
111. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
112. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*. 2003;24(21):3853-8.
113. 7405 ISI. Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices used in Dentistry - Test Methods for Dental Materials. 1997.

114. 10993-12 ISI. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 12: Sample preparation and reference materials. 2002.
115. Murray PE, Garcia GC, Garcia GF. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(3):E258-E66.
116. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, Markovic D, et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem*. 2012;8(1):40-5.
117. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater*. 2006;22(10):954-62.
118. Schmid-Schwab M, Franz A, Konig F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E, et al. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater*. 2009;25(3):360-8.
119. Moharamzadeh K, Brook IM, Noort RV. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* (Basel). 2009 Jun; 2(2):514-48.
120. Park JC, Hwang YS, Suh H. Viability evaluation of engineered tissues. *Yonsei Med J*. 2000;41(6):836-44.
121. Lodienė G. Dantų šaknų kanalų užpildų biologinio suderinamumo ir sandarumo vertinimas in vitro 2012.
122. Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of tissue culture methods*. 1988;11(1):15-7.
123. Edinger AL, CB T. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):663-9.
124. Stanley HR. Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res*. 1992;6:55-64.
125. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials--does it have a role? *Int Endod J*. 1988;21(2):50-8.
126. Tan JL, Nelson CM, Gray DS, Chen CS, editors. Approaches to organize cells on surfaces. 2nd Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology Proceedings (Cat No02EX578); 2002 2002/05//.
127. Wataha JC, Lockwood PE. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mater*. 1998;14(2):158-63.
128. Willershausen B, Marroquín BB, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod*. 2000;26(12):703-7.
129. Santos VR, Lucchesi JA, Cortelli SC, Amaral CM, Feres M, Duarte PM. Effects of glass ionomer and microfilled composite subgingival restorations on periodontal tissue and subgingival biofilm: a 6-month evaluation. *J Periodontol*. 2007;78(8):1522-8.
130. Eliades G, Watts DC, Eliades T. *Dental Hard Tissues and Bonding: Interfacial Phenomena and Related Properties*: Springer Science & Business Media; 2005 2005/12/06/. 201 p.
131. De Boever JA, De Boever AL, De Vree HM. [Periodontal aspects of cementation: materials, technics and their biologic reactions]. *Rev Belge Med Dent* (1984 ). 1998;53(4):181-92.
132. Angelieri F, Joias RP, Bresciani E, Noguti J, Ribeiro DA. Orthodontic cements induce genotoxicity and cytotoxicity in mammalian cells in vitro. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(4):393-8.

133. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(6):495-500.
134. Bakopoulou AA, Trivaii IN, Tsiftoglou AS, Garefis PD. In vitro assessment of cytotoxicity of resin-based dental restorative materials on WEHI 13 var fibroblasts. *Int J Prosthodont.* 2006;19(1):13-6.
135. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility of glass-ionomer cements using mouse lymphoma cells in vitro. *J Oral Rehabil.* 2006;33(12):912-7.
136. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PPC, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006;22(9):864-9.
137. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006;22(9):838-44.
138. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85(10):870-7.
139. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater.* 2007;23(1):40-4.
140. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater.* 2008;24(3):362-71.
141. Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2012;100(2):391-9.
142. Schuster GS, Caughman GB, Rueggeberg FA, Lefebvre CA, Cibirka R. Alterations in cell lipid metabolism by glycol methacrylate (HEMA). *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999;10(11):1121-33.
143. Engelmann J, V J, Volk J, Leyhausen G, N N, B S, et al. Effects of BisGMA on Glutathione Metabolism and Apoptosis in Human Gingival Fibroblasts in Vitro - PubMed. *Biomaterials.* 2004;25 (19):4573-80
144. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2006;22(6):499-505.
145. Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2006;27(9):1803-9.
146. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7487-96.
147. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, et al. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1561-74.
148. Nikolettoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3448-59.
149. Pameijer CH, Zmener O, Alvarez Serrano S, Garcia-Godoy F. Sealing properties of a calcium aluminate luting agent. *Am J Dent.* 2010;23(2):121-4.

150. Denner N, Heydecke G, Gerds T, Strub JR. Clinical comparison of postoperative sensitivity for an adhesive resin cement containing 4-META and a conventional glass-ionomer cement. *Int J Prosthodont.* 2007;20(1):73-8.
151. Korsch M, Walther W, Bartols A. Cement-associated peri-implant mucositis. A 1-year follow-up after excess cement removal on the peri-implant tissue of dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017;19(3):523-9.
152. Sanda M, Shiota M, Imakita C, Sakuyama A, Kasugai S, Sumi Y. The effectiveness of optical coherence tomography for evaluating peri-implant tissue: A pilot study. *Imaging Sci Dent.* 2016;46(3):173-8.
153. Antonijevic D, Obradovic-Djuric K, Rakocevic Z, Medigovic I. In vitro radiographic detection of cement overhangs on cement-retained implant restorations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(4):1068-75.
154. Tatullo M, Marrelli M, Mastrangelo F, Gherlone E. Bone Inflammation, Bone Infection and Dental Implants Failure: Histological and Cytological Aspects Related to Cement Excess. *J Bone Jt Infect.* 2017;2(2):84-9.
155. Pereira S, Anami LC, Pereira CA, Souza R, Kantorski KZ, Bottino MA, et al. Bacterial Colonization in the Marginal Region of Ceramic Restorations: Effects of Different Cement Removal Methods and Polishing. *Oper Dent.* 2016;41(6):642-54.
156. Bhushan P, Aras MA, Chitre V, Mysore AR, Daswani SR. A Novel Universal Cementation Technique for Implant-Supported Crowns with Subgingival Margins. *Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists.* 2017;26(7):628-32.
157. Dahiya A, Baba NZ, Kattadiyil MT, Goodacre CJ, Mann A. Comparison of the effects of cement removal from zirconia and titanium abutments: An in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2019;121(3):504-9.
158. Pauletto N, Lahiffé BJ, Walton JN. Complications associated with excess cement around crowns on osseointegrated implants: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(6):865-8.
159. Mitchell CA, Pintado MR, Geary L, Douglas WH. Retention of adhesive cement on the tooth surface after crown cementation. *J Prosthet Dent.* 1999;81(6):668-77.
160. Duong A, Dudley J. Twenty-year analysis of implant treatment in an Australian public dental clinic. *Aust Dent J.* 2018;63(2):177-86.
161. Buchalla W, Attin T, Hellwig E. Brushing abrasion of luting cements under neutral and acidic conditions. *Oper Dent.* 2000;25(6):482-7.
162. Institution. BS. BS 5136:1981 - Specification for toothpastes. 1981
163. Heath JR, Wilson HJ. Forces and rates observed during in vivo toothbrushing. *Biomed Eng.* 1974;9(2):61-4.
164. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ, Berkovitz BKB. A colour atlas & text of oral anatomy, histology, and embryology. London: Wolfe Pub.; 1992 1992.
165. Lambrechts P, Vanherle G, Davidson C. An universal and accurate replica technique for scanning electron microscope study in clinical dentistry. *Microsc Acta.* 1981;85(1):45-58.
166. Franz A, Konig F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, et al. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater.* 2003;19(5):382-92.
167. Lonroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(1):34-9.

168. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* 1998;14(6):429-40.
169. Sigusch BW, Volpel A, Braun I, Uhl A, Jandt KD. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater.* 2007;23(11):1342-8.
170. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988;67(1):66-70.
171. ISO 10993-5:2009 1997.
172. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008;50(4):397-402.
173. Mercille S, Massie B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng.* 1994;44(9):1140-54.
174. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res.* 1983;62(10):1076-81.
175. Saunders WP. The shear impact retentive strengths of four dentine bonding agents to human and bovine dentine. *J Dent.* 1988;16(5):233-8.
176. Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent.* 1999;12(2):92-6.
177. Wakamatsu Y, Kakuta K, Ogura H. Wear test combining simulated occlusal wear and toothbrush wear. *Dent Mater J.* 2003;22(3):383-96.
178. Guzman AF, Moore BK, Andres CJ. Wear resistance of four luting agents as a function of marginal gap distance, cement type, and restorative material. *Int J Prosthodont.* 1997;10(5):415-25.
179. Shinkai K, Suzuki S, Leinfelder KF, Katoh Y. Effect of gap dimension on wear resistance of luting agents. *Am J Dent.* 1995;8(3):149-51.
180. Li ZC, White SN. Mechanical properties of dental luting cements. *J Prosthet Dent.* 1999;81(5):597-609.
181. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(5):176-9.
182. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):333-55.
183. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):361-5.
184. Tyas MJ. In vitro toxicity tests of zinc phosphate cement. *J Oral Rehabil.* 1978;5(4):339-47.
185. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(3):277-88.
186. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008;12(1):1-8.
187. Bapna MS, Mueller HJ. Leaching from glass ionomer cements. *J Oral Rehabil.* 1994;21(5):577-83.



188. Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J, Nomura S. Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. *Int Endod J*. 2003;36(9):622-8.
189. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater*. 2006;22(7):630-40.
190. Sigusch BW, Pflaum T, Volpel A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater*. 2009;25(11):1446-52.
191. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater*. 2003;19(1):25-31.
192. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*. 1994;21(4):441-52.
193. Brackett MG, Bouillaguet S, Lockwood PE, Rotenberg S, Lewis JB, Messer RL, et al. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;81(2):397-402.
194. Khashaba RM, Moussa M, Koch C, Jurgensen AR, Missimer DM, Rutherford RL, et al. Preparation, physical-chemical characterization, and cytocompatibility of polymeric calcium phosphate cements. *Int J Biomater*. 2011;2011:467641.
195. Xie D, Chung ID, Wu W, Lemons J, Puckett A, Mays J. An amino acid-modified and non-HEMA containing glass-ionomer cement. *Biomaterials*. 2004;25(10):1825-30.
196. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6.
197. Quent VMC, Loessner D, Friis T, Reichert JC, Huttmacher DW. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):1003-13.
198. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:99-126.

# SANTRAUKA

## Abbreviations

ZPC	– Zinc Phosphate Cement
GIC	– Glass Ionomer Cement
RMGIC	– Resin-Modified Glass Ionomer Cement
CC	– Compomer Cement
RC	– Resin Cement
OD	– Optical Density of Vital Cells
LMR	– Linear Multiple Regression
HEMA	– 2-hydroxyethylmethacrylate
TEGDMA	– Triethyleneglycoldimethacrylate
Bis-GMA	– Bisphenol A-glycidyl methacrylate
CSR%	– Cell Survival Ratio (%)
MOD	– Mesial-Occlusal-Distal restorations
SEM	– Scanning Electron Microscopy/Microscope
HGF	– Human Gingival Fibroblasts
7-AAD	– 7-Amino Actinomycin D
pH	– Acidity measured in pH units

## INTRODUCTION

The clinical success of fixed prosthodontics is influenced by many factors, including the choice of an appropriate luting material. Materials used for the cementation of fixed prosthodontics are defined as luting materials or luting cements (1). A wide variety of luting cements are currently available, from conventional water-based ones to contemporary adhesive resin cements. There are several prerequisites for luting cements including requirements for mechanical properties, sufficient working time, stability, and biocompatibility with biological tissues (2). However, there is no single luting material capable of meeting all the desired requirements (3).

Zinc phosphate cement, one of the oldest materials still used, is traditionally applied as a luting material or a temporary restorative (3). Resin-modified glass ionomer cements are the latest generation of glass ionomers which contain various resins that improve their mechanical properties. However, these modifications may affect their biocompatibility (4). Self-adhesive resin cements, based on filled polymers designed to adhere to a tooth structure without a separate adhesive or etchant, have gained popularity due to the simplicity of their application, improved mechanical properties, and adhesion to various substrates (5).

A narrow film of luting cement, together with a restoration margin, is responsible for an uninterrupted, smooth transition between a fixed prosthesis and a tooth. Dental luting cements are exposed to the oral environment along the crown margin and are susceptible to dissolution and wear. The transition space between the prosthesis and tooth, as a potential plaque-retaining area, is of clinical relevance for the long-term success of fixed dental prostheses.

Dental caries at the cervical junction between a restoration and a tooth has been reported as the major reason for the failure of fixed partial dentures (FPDs) and crowns (6-12). Periodontal complications related to the cervical region are another reported, but less frequent, reason for failure of FPDs (7, 9, 11). Gaps or niches created by cement wear may become a potential plaque trap and, consequently, this increases patients' risk for caries and periodontal disease. Luting cement, therefore, should have an adequate resistance to wear in order to maintain the marginal integrity. Resistance to wear of dental materials commonly used in dental practices is a complex phenomenon resulting from the interaction of many contributing factors such as the type of material, specific properties of the materials opposing each other, the contact load and its duration, and the environment (saliva, food, toothpaste) where such interactions occur (13).

The occlusal wear rate of luting cements has been empirically related to the marginal gap size, i.e. to an area of the exposed cement (14-16). The width of the

cement film along the margin is determined by the fit (the size of marginal discrepancy or gap) of the cemented restoration and may vary considerably.

Fransson et al. (17) reported a mean marginal gap of 100  $\mu\text{m}$  for metal-ceramic crowns, with large variation including some above 200  $\mu\text{m}$ . In another *in vivo* study, the marginal discrepancies for crowns and FPDs varied from 5  $\mu\text{m}$  to 430  $\mu\text{m}$  (18). Studies examining the importance of gap width reported inconsistent findings, i.e. the reported relationships between the cement wear and the gap size varied considerably (correlation coefficient  $r=0.3$  to  $r>0.9$ ). Additionally, no clear pattern of cement disintegration in relation to the gap size could be elucidated (19). Thus, there is a need to examine the influence of the size of the exposed cement area (gap size) on the loss of luting cement materials.

Another important consideration is the biocompatibility of dental cements, which, when in contact with oral soft tissues including the periodontium, may evoke adverse clinical reactions of a toxic and allergic nature (20, 21). Cytotoxicity may be induced due to chemical irritation from the materials themselves, as well as by pH changes occurring in the vicinity of the materials during their setting (22). Dental materials vary in the release of substances before and/or after setting (23) or in their surface characteristics (24). Consequently, one should expect varying biological responses from different cement types. Acidity of the dental materials may also contribute to general cytotoxicity (22); therefore, it is important to determine which luting cements produce the most acidic environments.

Resin cements (GIC) and resin-modified glass ionomer cements have been widely used in modern clinical dentistry as luting agents. Despite the recent improvements of resin-based restorative materials, their lack of biocompatibility with oral tissues still represents a problem (3). Unreacted components of resin-based materials are released into the oral cavity due to incomplete polymerization and, therefore, they are cytotoxic and genotoxic (25). These elutable substances represent residual monomers such as 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA), triethyleneglycoldimethacrylate (TEGDMA), and bisphenol A-glycidyl methacrylate (Bis-GMA), as well as other components including initiating substances (25).

Contemporary dental resins release a complex mixture of different methacrylates; therefore, it is difficult to precisely evaluate their cytotoxic mechanisms. The cytotoxic properties of different resin monomers depend on their chemical structure and concentration, with more lipophilic monomers being most cytotoxic (26). Lower concentrations of monomers suppress the metabolic activity of cells by blocking the activity of mitochondrial dehydrogenases, while at higher concentrations these monomers interact with phospholipid bilayers by altering the integrity and increasing the permeability of cellular membranes (27).

Several studies have demonstrated that resin monomers induce oxidative stress primarily *via* a depletion of intracellular levels of glutathione (28, 29). Cytotoxic effects are partly inhibited in the presence of reactive oxygen species (ROS) scavengers (30). However, the exact mechanism by which resin monomers induce the generation of ROS in cells is not clear. Another study demonstrated that HEMA/Bis-GMA induced DNA double-strand breaks through oxidative mechanisms (31). Furthermore, methacrylic acid, a product of HEMA degradation also displayed genotoxic effects (32).

Apoptosis and necrosis represent two major mechanisms of cell death and both are involved in the cytotoxic action of resin monomers. Although initially considered as mutually exclusive states, apoptosis and necrosis are frequently regulated by similar signalling pathways; thus, they may act in a complementary fashion (33). Therefore, it is also important to discriminate between different mechanisms of cell death potentially exhibited by different luting cements.

### The research question

To examine wear and biocompatibility of commonly used dental luting cements.

### Main objectives

Objective 1: Examine the resistance to wear of commonly used luting cements (Project 1).

Objective 2: Examine the influence of marginal gap width on wear of commonly used luting cements (Project 1).

Objective 3: Evaluate the cytotoxicity of commonly used luting cements (Project 2).

Objective 4: Evaluate pre-washing effect on cements' cytotoxicity (Project 2)

Objective 5: Examine changes in cells' metabolic activity induced by extracts of different luting cements (Project 3).

Objective 6: Identify cell death mechanisms induced by extracts of different luting cements (Project 3).

### The significance and novelty of the research

Laboratory *in vitro* studies allow for the standardization/control of experimental conditions; consequently, such controlled experiments help us to discriminate independent effects of various factors. These experimental studies are important for understanding the performance of dental materials, their mechanical properties, and their biocompatibility with periodontal tissues. Therefore, the current study chose

several controlled experiments *in vitro* to study the wear and biocompatibility of the commonly used luting cements.

Rationale for Project 1: Many methods, with varying degrees of sophistication, have been designed to predict wear of dental materials *in vivo*. However, the majority of these tests focused on occlusal wear. The luting materials used for sealing crowns are only exposed to the oral environment in the cervical region, where wear due to toothbrushing is the predominant wear mechanism. There is scarce research done on the topic of the wear of luting cements from toothbrushing.

Rationale for Project 2: Cytotoxicity from dental materials may be invoked due to the chemical irritation of biological tissues in the oral cavity. Given that different luting cements vary in their release of substances before and/or after setting, as well as in their surface characteristics, one should expect varying biological responses to different cement types. Research comparing the cytotoxic effects among different types of luting cements is also scarce.

Rationale for Project 3: Luting cements do not always have a direct contact with periodontal tissues; therefore, Project 3 used extracts derived from luting cements to represent indirect toxic effects of luting cements when they are placed supragingivally. Apoptosis and necrosis represent two major mechanisms of cell death due to the cytotoxic action of materials. It is important to discriminate between various mechanisms of cell death that different luting cements may potentially induce.

## METHODOLOGY

This dissertation comprises three projects consisting of several experiments conducted to achieve the study objectives. Given that different methodologies were used, the methods, results, and discussion are presented separately for each project.

### Project 1: Wear resistance of luting cements and the influence of marginal gap width on substance loss

#### Cements tested

Five commonly used types of luting cements were chosen for the current experiment: Zinc Phosphate (ZPC), Glass Ionomer (GIC), Resin Modified Glass Ionomer Cement (RMGIC), Compomer (CC) and Resin Cement (RC). Their specifications are listed in Table 1.

**Table 1.** Tested luting cements

Luting cement type	Cement code	Product name	Manufacturer	Batch no.
Zinc phosphate	ZPC	DeTrey® Zinc Crown & Bridge Fixodont® Plus	Densply De Trey GmbH	9802001013
Glass ionomer	GIC	GC Fuji I	GC Corporation	050871
Resin-modified glass ionomer	RGIC	GC Fuji PLUS	GC Corporation	171271
Compomer	CC	Dyract® Cem	Densply De Trey GmbH	9804001534
Adhesive resin cement	RC	Panavia®21	Kuraray Co.,Ltd.	41225

The cements were handled and portioned according to the manufacturers' instructions in a climate-conditioned room ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ) with controlled humidity ( $50 \pm 5\%$ ). In order to achieve the recommended powder to liquid ratio, both were weighed for each cement mix. All cements were mixed manually.

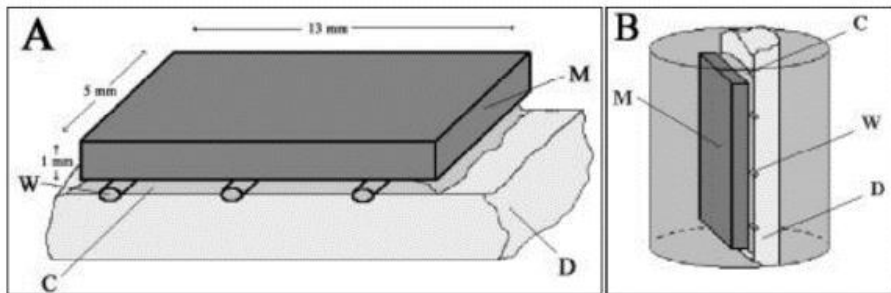
#### Specimens design

A specimen simulating the cervical region of a crown-cement-tooth area was designed by cementing specific luting cement to a tooth structure. A standard palladium-silver ceramic alloy (Will-Ceram® W-1, Williams®, Ivoclar North America, New York, US) was used as the restorative material to be cemented to bovine dentin and served as the proxy for a tooth structure.

Plates of the alloy (13×5×1 mm) were planed and polished by wet grinding (on a rotating wheel) with 500-grit silicon-carbide abrasive paper (Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers, Denmark). The flatness of the surface was controlled using a profile projector (6C-2, Nikon, Nippon-Kogaku, Japan).

A total of 50 sound bovine front teeth were extracted, from which the pulp tissue and remaining periodontal ligaments were removed. Prior to the experiment, these teeth were refrigerated in a 0.9% sodium chloride solution. Blocks with two parallel walls (~ 15×5×3 mm) were cut out from the teeth using a rotating diamond saw under water cooling in a laboratory cutting machine (Accutom, Struers, Denmark), and flattened by wet grinding using silicon carbide abrasive paper (500-grit). Care was taken to assure that the entire surface facing the luting cement consisted only of dentin.

The wear of luting cements was tested in two gap widths: 100 µm and 250 µm. In order to create these two widths, a specific luting cement and a dentin plate were separated from each other by a stainless steel wire of the predetermined diameter (100 µm or 250 µm); this wire served as a space holder to create the specific size gap width between the metal plate and dentin (Image 1A).



**Image 1.** Preparation of a specimen: A – Stage 1 and B – Stage 2

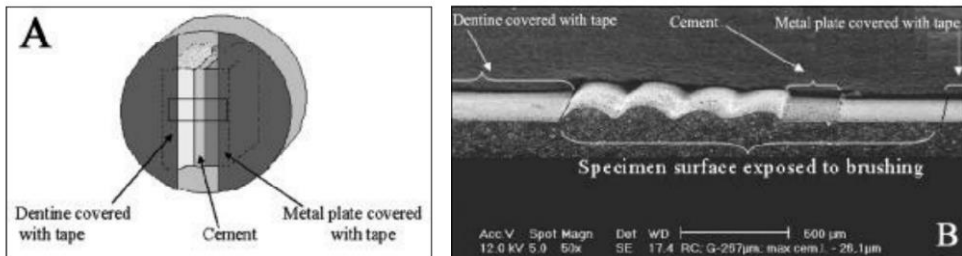
M – metal plate, C – luting cement, D – dentin; W – spacer (wire of specific diameter).

For setting, a 2 kg load was applied on the top of the metal plate. After complete setting occurred, the entire assembly was immersed in distilled water (37°C) for 2 hours. Thereafter, it was embedded in a cold-curing epoxy resin (Epofix, Struers, Denmark), see Figure 1B. The mounted block was then cut into sections with a diamond saw under running water and experimental specimens were obtained. In order to create flat and smooth test surfaces, each specimen was planed gradually by wet grinding on 500-, 1000-, and 4000-grit silicon carbide abrasive papers. Subsequently, the surface quality was evaluated with an optical microscope. The marginal gap width of each specimen was controlled using the profile projector at 50× magnification at three points (both ends and in the middle). Only the



specimens with a gap distances within the range of  $100 \pm 25 \mu\text{m}$  (to represent a  $100 \mu\text{m}$  width) and  $250 \pm 25 \mu\text{m}$  (to represent a  $250 \mu\text{m}$  width) were used for the experiment. The prepared specimens were stored in distilled water ( $37^\circ\text{C}$ ) for 2 weeks prior to wear testing.

A total of 60 specimens (12 specimens for each cement, six for each gap width) were obtained. In order to acquire a reference surface and a distinct outline of the abraded (exposed to wear) surface, parts of the metal plate and the dentine were covered with resin adhesive tape ( $\approx 50 \mu\text{m}$  thick), exposing a 2 to 3-mm wide test track (Image 2).



**Image 2.** A – Schematic representation of a specimen illustrating an exposed test track; B – Replica of a specimen after the wear test (SEM).

### Wear test

A toothbrushing wear test was selected to simulate the three body type of wear expected in the mouth (toothbrush, toothpaste, teeth). The specimens were tested in an automatic tooth-brushing machine (34) using flat profile toothbrushes with medium bristle stiffness (Jordan\*Classic, Jordan, Oslo, Norway). The bristle diameters were  $\sim 200 \mu\text{m}$ , with rounded ends. The toothbrushes were changed after brushing of three specimens.

Each specimen was affixed to a hole in the bottom of a trough. The brushing surface of the toothbrush head was adjusted parallel to the test surface to ensure full contact over the total length of the head. The toothbrush rested on the test surface with a load of 2N. The direction of the reciprocating brushing motions (150 cycles/min) was parallel to the dentin-cement-restorative interface. The specimens were brushed with a slurry of the standard reference paste (34). The slurry was prepared by mixing 40 ml distilled water with 25 g of reference paste and was renewed for each specimen.

In order to obtain observable wear, two hours of continuous brushing corresponding to 18000 double strokes were employed in the study. This represents

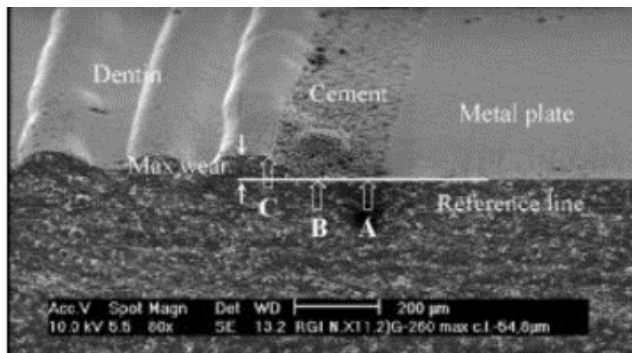
about three and a half years of brushing twice daily according to our calculations based on the average toothbrushing time (60 s) (35-36).

### Measurement locations

All specimens were examined (exemplified in Image 2) by means of a negative replica technique (37) in a scanning electron microscope (SEM) (Philips XL 30, Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands).

After brushing, the covering tape was removed and the test surface was replicated with an elastomeric impression material (Permadyne Garant 2:1, ESPE, Seefeld, Germany). The impressions were viewed directly. The reliability and accuracy of the replicating technique were verified by comparing an SEM image of the impression of a standard ruled test block with the actual structure of the block (ISO 4823:1992(E)) (38).

In order to account for possible variations in the toothbrushing effect, the wear was measured at three locations along the cement film in each specimen. Each negative replica was cut at three different places transversely to the direction of the luting cement interface, and three different slices of each replica were then obtained for wear measurements. Each section was mounted and coated with 20 nm of a gold-palladium alloy (SCD 050 Sputter Coater, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) for SEM inspection and measurements. The wear (cement loss in  $\mu\text{m}$ ) was defined as the vertical difference between the abraded cement surface and the non-affected metal plate used as a reference line (Image 3).



**Image 3.** Locations of wear measurements:

A - cement/metal interface, B - middle of cement, C - cement/dentin interface

A pilot study showed that the wear of luting cements was not consistent across the whole marginal gap. Therefore, in order to obtain a more comprehensive picture of wear pattern, the wear was measured at three locations: at the

metal/cement interface (measurement point A), in the middle of the cement (measurement point B) and at the cement/dentin interface (measurement point C), as exemplified in Image 3.

All measurements were conducted by one examiner at 300× magnification and 10° tilt with an accuracy of ± 1 µm. SEM images were photographed in order to examine the surface topography for each of the luting cements studied.

A t-test was used to assess the effect of marginal gap width on each cement's wear. The aggregated data on wear, which combined information from both the 100 µm and 250 µm gaps, were used to compare five luting cements by applying a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Post Hoc Bonferroni adjustment. The level of significance for all tests was set at  $p < 0.050$ .

## Project 2: Cytotoxicity of different types of luting cements

The *in vitro* cell culture model provides a controllable and reproducible method to examine the potential toxicity of dental materials (39-45). We chose fibroblast cell cultures for our experiments because these cells represent a common cell type in pulp and gingival tissues and because fibroblasts have reproducible growth rates.

### Cements tested

Three most common types of luting materials were selected:

1. Hoffmann's Zinc Phosphate (Hoffmann Dental Manufaktur GmbH, Berlin, Germany) (ZPC).
2. GC Fuji Plus Resin-Modified Glass Ionomer (Fuji Plus RMGI), (GC Corporation, Tokyo, Japan) (RMGIC).
3. 3M ESPE RelyX Unicem Resin Cement (RelyX Unicem RC) (3M ESPE) (RC).

All three types of luting materials were handled and portioned according to the manufacturers' instructions; Hoffmann's ZP and Fuji Plus RMGI were mixed manually, while RelyX Unicem RC was mixed in a high-frequency mixing unit.

Subsequently, luting materials were placed at the bottom of 24- and 96-well cell culture plates (Orange Scientific, Belgium) insert wells. The RelyX Unicem RC specimens were light-cured from one side with a curing unit (3M ESPE Elipar FreeLight).

### Preparation of specimens

Each specimen included a specific luting cement, medium, and fibroblast cells, except for the control specimens where cements were not added. A 96-well cell

culture plate was used for cell viability tests. A total of 144 specimens were prepared. Six sample sets of 24 specimens were prepared separately for each testing condition and for each of the follow-up times of 1, 6, and 12 hours. Each sample set included six specimens each for the Hoffmann's ZP, Fuji Plus RMGI, and RelayX Unicem RC materials and six negative controls. A total of 72 specimens were used to test the cytotoxicity of luting cements without pre-washing, and a total of 72 specimens to test the cytotoxicity of pre-washed luting cements.

A 24-well cell culture plate was used for the pH measurements and for scanning electron microscopy (SEM). To test the acidity of the cements, pH measurements of the hardened luting materials were taken at 1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours.

### Establishment of the primary cell line (cell culture)

Human gingival fibroblasts (HGFs) were obtained from a gingival biopsy of a healthy female patient using the explant method (44). Immediately after the biopsy, a sample of tissue 2–4 mm<sup>3</sup> in size was placed in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen/Life Technologies, USA) enriched with 250 U/mL Penicillin (Invitrogen/Life Technologies, USA), 0.25 mg/mL Streptomycin (Invitrogen/Life Technologies, USA), and 200 U/mL Nystatin (Sigma-Aldrich Inc., USA) for transportation. Then, the subepithelial tissue specimen was minced under sterile conditions, the suspension diluted in Iscove's modified Dulbecco's media (IDMEM; Sigma-Aldrich Inc., USA), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Invitrogen/Life Technologies, USA) and antibiotics, and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity atmosphere. HGFs which grew out of the explants were sub-cultured and maintained, subsequently the cells from passages six to ten were used for our experiments.

### Testing conditions (evaluating the effect of pre-washing)

Two experimental conditions were created, condition 1: exposing fibroblasts to pre-washed cements and condition 2: exposing fibroblasts to non-washed luting cements. For the pre-washing, copious rinsing of the cement surface with saline solution was applied prior to exposing them to fibroblasts cell suspensions. Half of the test specimens were pre-washed 20 times with 200 µL saline solution (PBS). All specimens were sterilized with ultraviolet (UV) light for 15 min. The HGF cell suspension ( $6-7 \times 10^4$  cells/mL) was prepared and 100 µL was placed onto cement specimens. Then, the cells were incubated for 1, 6, and 12 hours. HGFs maintained in the control polystyrene plate wells without luting cements served as controls.

### Cell viability testing (with colorimetric assay)

Half of the test specimens were washed with 20x200 $\mu$ L saline solution (PBS). A total of 100  $\mu$ L of the HGF cell suspension was placed onto cement specimens in the 96-well cell culture plate. After 1, 6, and 12 hours, the cell monolayer was dispersed by a trypsin-EDTA (Life Technologies Corp., USA) mixture (1:9), then the suspension was centrifuged and the pellet suspended in 25  $\mu$ L of growth medium. Furthermore, 2  $\mu$ L of acridine orange (AO) and ethidium bromide (EB) (Life Technologies Corp., USA) dye mix (100  $\mu$ g/mL) of each was prepared in PBS and mixed in equal proportions) was added to 10  $\mu$ L of test cell suspension. AO is cell-permeable and interacts with DNA and RNA. When bound to DNA, viable cell nuclei look like well-formed, round fluorescent green structures. EB intercalates DNA, providing a fluorescent red-orange stain. EB does not stain healthy cells, thus it is used to identify cells that have permeable membranes. This EB/AO combined staining enables us to distinguish between the vital cells (green color) and the dead ones, i.e. apoptotic and necrotic cells (orange color) (45). The images were viewed using an Eclipse TS100 (Nikon) inverted microscope and pictures taken with a Nikon digital camera.

### Cell viability testing (with MTT assay)

The cytotoxicity of luting cements on human gingival fibroblasts (HGFs) was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT; Sigma-Aldrich Inc., USA) according to ISO-10993-5:1999 specifications (46). After 1-, 6- and 12-hour exposure to luting materials, the number of viable HGF cells was detected using the MTT test. This test is based on the ability of a vital cell's mitochondrial succinate dehydrogenase to reduce yellow MTT dye into insoluble blue formazan crystals. The amount of formazan is directly proportional to the number of vital cells. After adding the solvent, the optical density (OD) of the resulting solution was measured with a microtiter plate reader (TECAN Infinite 200 PRO) at 570 nm. The cell survival, expressed as an optical density (OD), was indicated by the proportion of viable cells. The ODs were measured for both luting cements and control samples.

The cell survival ratio (CSR%) was calculated based on the OD differences between the ODs of luting cements and the ODs of control specimens. The CSR% is a percent ratio, where the cell survival in wells containing a cement and fibroblasts (ODs of test samples) is expressed as the percent proportion of the cell survival observed in the control wells (corresponding to ODs of control samples). This way, a higher CSR% value indicates higher cell survival, consequently

indicating less cytotoxicity. The CSR% were calculated for each cement type and for each follow-up time.

### Scanning Electron Microscopy (SEM)

The HGF cell suspension ( $6-7 \times 10^4$  cells/mL) was placed into each well (24-well cell culture plate) on the cement surface. HGFs maintained in polystyrene plate wells without luting cements served as control specimens. After 6 hours of exposure, the specimens were prepared for SEM examination (Hitachi, TM-1000). The cell growth medium was removed, and the wells rapidly filled with glutaraldehyde fixative (2.5% in water; Sigma-Aldrich Inc., USA). The samples were incubated for 60 min at room temperature and rinsed three times for 15 min with distilled water. Subsequently, the samples were fixed in  $\text{OsO}_4$  (Sigma-Aldrich Inc., USA) for 60 min at room temperature, then rinsed with distilled water three times (for 15 min each time), followed by dehydration with an ethanol series beginning at 25% and changing to solutions of 50% and 75% over 10 min periods, and ending with a 96% solution for 2 hours. Finally, the samples were dried in a critical point dryer (K850, Quorum Technologies) and coated with 20 nm of gold using a sputter coater (Q150R, Quorum Technologies).

### pH measurements

Half of the test specimens were washed  $20 \times 1,000 \mu\text{L}$  of PBS. Then,  $500 \mu\text{L}$  of cell growth medium (IDMEM) was poured over each cement specimen, as well as into the control wells without luting cements. The pH measurements were taken at 1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours using a pH-meter (Knick, type 766 Calimatic).

### Assessments of cytotoxicity

The potential cytotoxicity of luting cements was assessed analysing both quantitative and qualitative (visual) methods.

Two quantitative outcomes were used to assess each cement's cytotoxicity: the cell survival ratio (CSR%) and the level of acidity of cement's surfaces.

Morphology of HGFs was evaluated microscopically.

Microscopic cell images were examined visually. In the SEM images, the viable fibroblasts appeared as outstretched cells indicating surviving cells, while the absence of outstretched cells or rounded cells implied the cells' death. Another visual assessment of cytotoxicity was microscopic images of stained cells distinguishing between the vital cells (green) and dead cells (orange).

## Statistical analyses

As the distribution of the CSR% values was approximately normal, parametric tests were chosen for analyses. One-way ANOVA with a Post Hoc Bonferroni adjustment was used to compare the CSR% of the cements tested under two different testing conditions. Linear multiple regression (LMR) was used to test the combined effect of cement type and pre-washing. The threshold for significance for all tests was set at  $p < 0.050$ .

### Project 3: Metabolic changes and cell death induced by extracts derived from different types of luting cements.

#### Preparation of extracts

Dental luting cements do not always have a direct contact with periodontal tissues. In this project extracts derived from different luting cements were tested for their cytotoxicity to HGF.

The luting cements used were the same as in Project 2 and they were prepared in the same way. Luting materials were placed at the bottom of a 12-well cell culture plate (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium). The amount of luting cement used to cover the bottom of each well and to get 3 ml of extract was comparable to the amount needed to cement three single crowns in routine clinical practice.

The prepared luting cements were sterilized with an ultraviolet (UV) light for 1 hour. Then, each well containing a test specimen was covered with 3 ml of cell culture medium (low glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine all from Biochrom, Berlin, Germany) and incubated for 1 hour in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After incubation, the extracts were collected and filtered through 0.2 µm filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). For the cytotoxicity studies, we used an undiluted (100%) concentration of extract and a half-diluted (50%) concentration of extract (dilution with cell culture medium; final concentration of 10% FBS).

#### Culturing human gingival fibroblasts

Primary human gingival fibroblast (HGF) cells were derived from healthy gingival tissue obtained, with her written informed consent, from a 21-year-old female undergoing canine tooth exposure surgery because of an orthodontic treatment. Primary HGFs were isolated, cultured and maintained as described in

Project 2. The HGFs from the fourth, fifth, and sixth passages were used for the experiments.

### Assessment of metabolic activity and viable cells counts

The HGF cells were seeded at a density of  $2 \times 10^3$  cells into each well of a 96-well plate (Orange Scientific) and incubated for 72 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Then, the culture medium was removed and the cells were exposed to 200 µL extracts of the different cements (ZPC, RMGIC, RC) at concentrations of either 100% or 50%, or to fresh culture medium without cement (control group).

The cytotoxicity was assessed with PrestoBlue Cell Viability Reagent (Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Fluorescence was detected with the Fluoroskan Ascent FL plate-reader (Thermo Labsystems, Franklin, MA) at an excitation of 544 nm and emission of 620 nm. The mitochondrial reducing activity assessed by the resazurin assay. The fluorescence intensity was examined at 1, 6, 12, and 24 hours after incubation with extracts of different luting cements.

In parallel, under identical conditions, viable cells were counted by a hemocytometer (Fast-Read 102, Biosigma) using the trypan blue (Sigma, St Louis, MO) exclusion test.

### Preparation for live cell imaging

Live-cell imaging has several advantages over traditional end-point cell-based assays allowing real-time monitoring of cell reactions, such as changes in their morphology, migration, proliferation, etc. This approach has recently been employed for cytotoxicity evaluation of luting resin cements on bovine dental pulp-derived cells (47).

Live-cell imaging was employed for the detection of dynamic changes in cellular morphology. For confocal microscopy imaging, the HGF cells were seeded on 24-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) at a density of  $10^4$  cells per well and incubated for 72 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Then, the culture medium was removed and 600 µL of the extracts (100% or 50% concentrations) derived from different luting cements (ZPC, RMGIC, RC) were added into the wells. The same amount of fresh culture medium was used for the control group.

The real-time monitoring of apoptosis and assessment of the membrane integrity of the cells was performed using the CellEvent™ Caspase-3/7 green detection reagent for apoptosis (Life technologies) and 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences, San Jose, CA). CellEvent™ Caspase-3/7 green



detection reagent is a fluorogenic substrate for activated caspases 3 and 7 that produces a fluorogenic response indicative of apoptosis. The maximum fluorescence emission of the dye is at approximately 520 nm. The 7-AAD enters into cells with compromised membranes and intercalates with double-stranded DNA that has a maximum fluorescence emission at 647 nm. The CellEvent™ Caspase-3/7 green detection reagent and 7-AAD (final concentration of 250 ng/ml) were added to the cell culture immediately after exposure to extracts derived from the luting cements, incubated for 30 min, and subsequently, live-cell imaging was performed. Live-cell imaging was performed using a Leica SP8 (Leica Microsystems) confocal microscope, during a time-lapse of 24 hours with images taken every 10 minutes.

### Quantification of apoptotic and necrotic cells

The fluorescent-channel images taken from the live imaging experiments were analyzed by ImageMaster 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The fluorescent apoptotic and 7-AAD-positive necrotic cells were counted as spots in each image using the ImageMaster algorithm. The same spot detection parameters (smooth-2; saliency-5; min. area-5) were applied for each image. The ratio between the numbers of apoptotic or necrotic cells in the control and those in the cement-treated cell cultures was used for the graphical representation of the cytotoxic effects of extracts derived from different luting cements.

## RESULTS

### Project 1: Wear resistance of luting cements and the influence of marginal gap width on substance loss

Results of analyses related to Project 1 are presented in Table 2 and Figures 1-3, where two types of comparisons are presented.

#### Differences in wear between two gap widths

*Analytical setting:* These comparisons used a series of independent sample t-tests to compare the means of wear between the 100  $\mu\text{m}$  and 250  $\mu\text{m}$  gap widths of a specific luting cement at a specific measurement location (at point A, point B, or point C) (Table 2).

**Table 2.** Cement wear in different gap widths and different locations

Cements#	Gap, $\mu\text{m}$	Wear of luting cements ( $\mu\text{m}$ )			p values <sup>^</sup>
		Point (A) mean (sd)	Point (B) mean (sd)	Point (C) mean (sd)	
<b>ZPC</b>	100	18 (11)	15 (9)	37 (11)	A/C .001 B/C .001
	250	18 (8)	5 (4)	50 (26)	A/C .009 B/C <.001
p value*		1.000	.032	.286	
<b>GIC</b>	100	12 (7)	20 (13)	27 (16)	No difference
	250	9 (6)	9 (8)	48 (30)	A/C .006 B/C .006
p value*		.444	.108	.161	
<b>RMGIC</b>	100	7 (4)	8 (6)	31 (16)	A/C .003 B/C .004
	250	4 (4)	3 (4)	29 (19)	A/C .005 B/C .004
p value*		.223	.120	.848	
<b>CC</b>	100	2 (2)	1 (2)	21 (15)	A/C .005 B/C .004
	250	3 (5)	0 (1)	26 (11)	A/C .005 B/C .004
p value*		.659	.300	.525	
<b>RC</b>	100	3 (2)	2 (2)	22 (12)	A/C <.001 B/C .001
	250	7 (7)	1 (2)	19 (11)	A/C .004 B/C .003
p value*		.208	.407	.661	

# ZPC – Zinc Phosphate Cement, GIC – Glass Ionomer Cement, RMGIC – Resin-Modified Glass Ionomer, CC – Compomer Cement, RC – Resin Cement.

<sup>^</sup> ANOVA with Post Hoc adjustment.

\* Independent sample t-test.

*Findings:* The only significant difference ( $p=.032$ ) comparing wear patterns between the two gap widths was found for ZPC, where greater wear was observed at a narrower 100  $\mu\text{m}$  gap width at point B (middle of the cement). An increased wear at the narrower gaps was seen for all luting materials at this measurement point (in the middle of the cement film). Contrarily, the observations at the measurement point C (wear at the cement/dentin interface) indicated a greater cement loss for ZPC, GIC and CC at 250  $\mu\text{m}$  compared with the 100  $\mu\text{m}$  gap. However, the differences were not statistically significant.

To sum up, no consistent pattern of wear between two different gap widths was observed.

#### Differences in wear dependent upon the cement type

*Analytical setting:* The comparisons employed One-way ANOVA with Post Hoc adjustment for multiple comparisons and were done separately for each cement type. A specific cement's wear among different locations (measurement Points A-C) was presented.

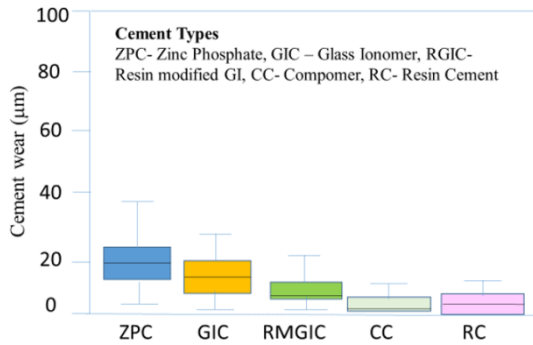
*Findings:* The results pooled from two gap widths are displayed in box-and-whisker plots (Figures 1-3). The distributional wear-related patterns were compared among five luting cements for each measurement location separately: wear at the metal/cement interface is demonstrated in Figure 1, in the middle of the cement in Figure 2, and at the dentin/cement interface in Figure 3.

The wear values at the metal/cement interface (measurement point A) ranged from 0  $\mu\text{m}$  to 38  $\mu\text{m}$  (Figure 1). The largest wear and the biggest variation was observed for ZPC, while CC and RC demonstrated the least of both, wear and variation. The analysis of variance (ANOVA) followed by multiple pairwise comparisons revealed that ZPC demonstrated significantly more loss of substance than all other cements, i.e. GIC, RGIC, CC and RC ( $P < 0.001$ ). GIC showed more wear than RGIC, CC and RC ( $P = 0.014$ ,  $P < 0.001$ ,  $P = 0.003$  respectively).

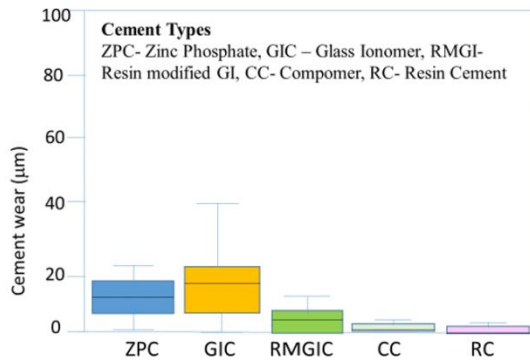
The cements' wear in the middle of the cement (measurement point B) ranged from 0  $\mu\text{m}$  to 40  $\mu\text{m}$  (Figure 2). GIC was found to have the least, while CC and RC - the highest resistance to wear. The largest variation was also observed for GIC. The analysis of variance (ANOVA) revealed statistically significant differences in the wear of the luting materials studied ( $P < 0.001$ ). The wear of GIC was significantly greater than that of RGIC, CC and RC ( $P < 0.001$ ). ZPC demonstrated more loss of substance than CC and RC ( $P < 0.001$ ).

The largest wear for all luting materials was observed at the cement/dentin interface (measurement point C) (Figure 3). The wear ranged from 4 $\mu\text{m}$  to 90  $\mu\text{m}$  among the different luting cements. GIC and ZPC were found to have the least resistance to wear

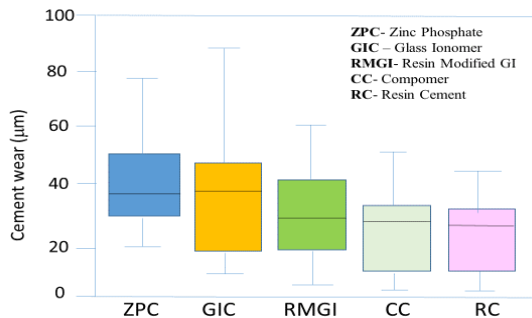
(median 37 $\mu$ m and 35  $\mu$ m respectively), as well as the largest variation, while RC and CC presented the highest resistance to wear (median wear values of 28  $\mu$ m and 29  $\mu$ m respectively). Statistical analysis revealed that ZPC demonstrated significantly more substance loss than RGIC, CC and RC ( $P = 0.022$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$  respectively) and GIC showed more wear than CC and RC ( $P = 0.022$ ,  $P = 0.009$ ).



**Figure 1.** Wear of cements at the metal/cement interface (point A).



**Figure 2.** Wear of cements in the middle of cement (point B).

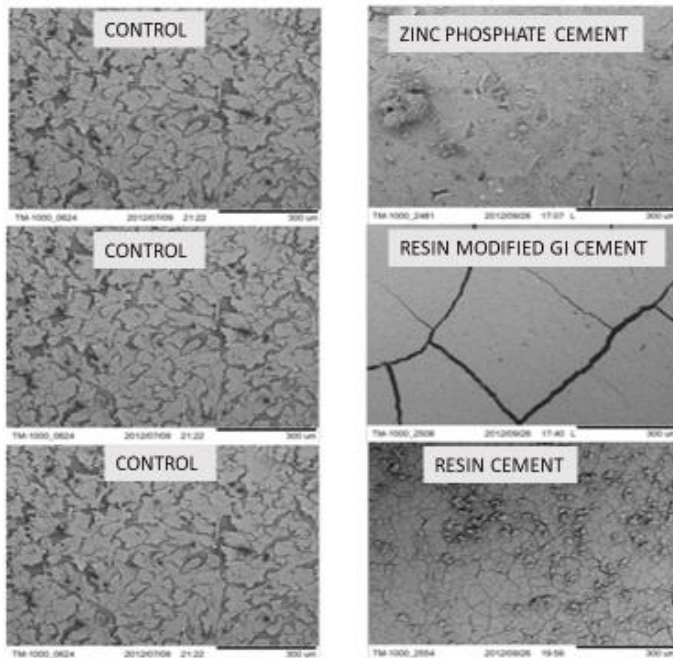


**Figure 3.** Wear of cements at the cement/dentin interface (point C).

## Project 2: Cytotoxicity of different types of luting cements

### Cell survival - SEM evaluations

SEM assessments of cell survival (Image 4) illustrate an example of SEM images taken 6 hours after exposure of the HGF culture to luting cements in the cell growth medium. SEM images of the control samples show numerous fibroblasts, while some outstretched cells (indicating viable cells) were found only on the ZPC surfaces, but not on the RMGIC or RC surfaces.

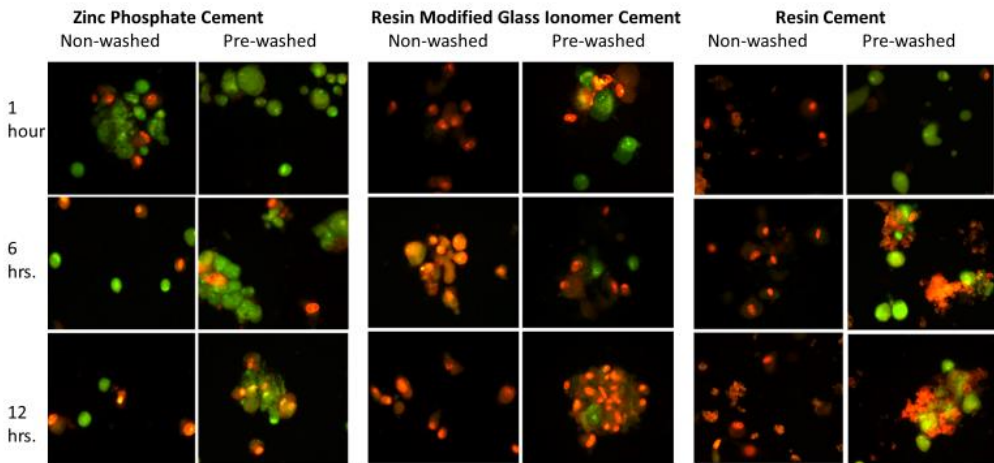


**Image 4.** Fibroblasts after 6 hours in cement and control specimens (SEM images)

### Cell viability - colorimetric evaluations

The cell viability test, a visual colorimetric assessment of cell vitality and the effect of the cement pre-washing are demonstrated in Image 5. Cell survival was evaluated under two testing conditions (pre-washed vs non-washed cements). The overall finding was that pre-washing of the cements had some protective effects, particularly at the early stages of observation. As can be observed in Image 5, a bigger number of viable cells (green) are seen in the images of pre-washed samples

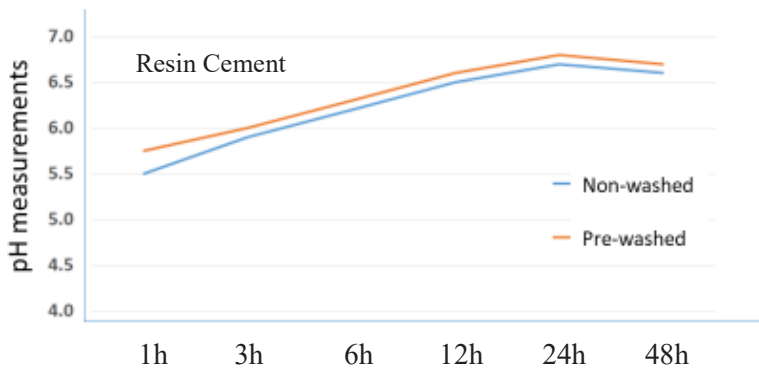
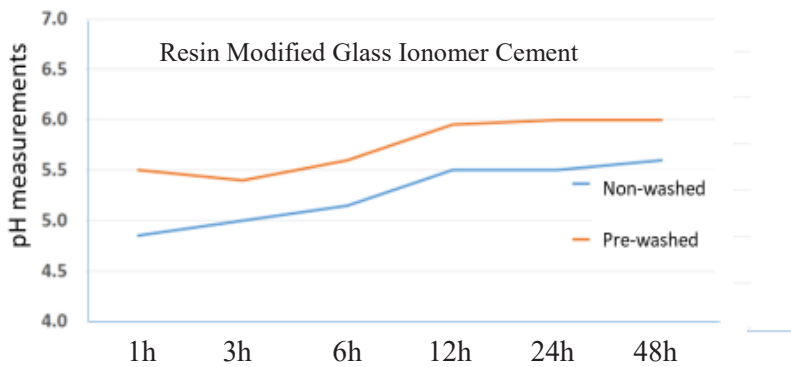
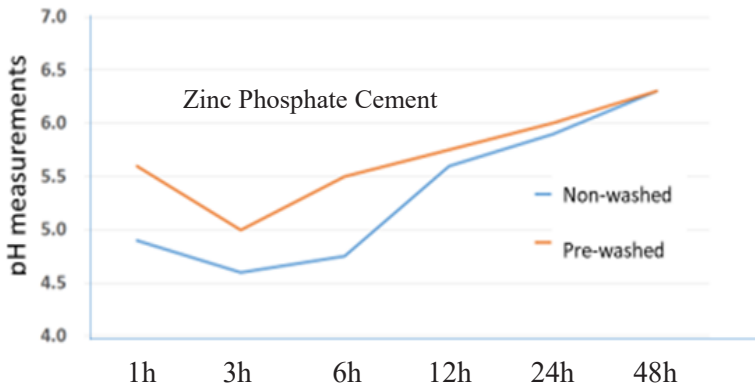
than in the non-washed samples. However, after 12 hours of incubation, dead cells (red) were dominant in almost all cement samples.



**Image 5.** Viability of human gingival fibroblasts (stained with AO/EB) on surfaces of the non-washed and pre-washed cements

### Acidity of the cements (pH changes)

The acidity of cement surfaces at different follow-up times is presented in Figure 4. As shown, all cements tested created acidic environments on their surfaces. The pH values in the vicinity of the cements were below neutral (pH=7.0) throughout the entire observation period (1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours). Pre-washing had a protective effect (lower acidity as indicated by higher pH values) for the ZPC and RMGIC samples compared to the RC samples. As an overall pattern, the pH values on the cement surfaces were lower in earlier observations (e.g. 1 hour and 3 hours) than at later timepoints. The pH started to be less acidic after approximately three hours. ZPC cement samples took the longest time towards restoring their pH levels.



**Figure 4.** Acidity (pH) on the surfaces of different luting cement

## Cell survival - MTT test

The cell survival ratio (CSR%) was used to compare the cell survival rates among different types of luting cements. A higher CSR% value indicates a higher cell survival rate. Table 3 compares the cell survival rates in the non-washed cements group and Table 4 compares the cell survival rates in the pre-washed cements group. In both tables, horizontal and vertical comparisons are presented. The horizontal comparisons evaluate time-dependent survival in the group of a specific cement (analysis: dependent sample t-test) and vertical comparisons make comparisons among different types of luting cements at a specific observation time (analysis: ANOVA with the Post Hoc Bonferroni adjustment). Comparing findings presented in Tables 3 & 4 we see substantially higher cell survival rates in the pre-washed cements group than in the non-washed cements group.

**Table 3.** Cell survival in the non-washed cements group

	<b>Cell Survival Ratio %</b>			<i>p</i> values <sup>^</sup>
	1 hour mean (sd)	6 hours mean (sd)	12 hours mean (sd)	
<b>ZPC</b>	37.2 (7.4)	17.7 (13.3)	10.9 (6.4)	1h/6h 0.001 1h/12h 0.001
<b>RMGIC</b>	7.9 (3.9)	3.5 (2.2)	3.1 (1.3)	1h/6h 0.001 1h/12h 0.001
<b>RC</b>	1.3 (1.4)	0.3 (0.5)	0.0 (0.0)	1h/6h 0.002 1h/12h. 0.001
<i>p</i> *	ZPC/RC 0.001 ZPC/RC 0.001 RMGIC/RC 0.050	ZPC/RMGIC<0.001 ZPC/RC<0.001 RMGIC/RC<0.001	ZPC/RMGIC<0.001 ZPC/RC <0.001	

ZPC - Zinc Phosphate Cement, RMGIC - Resin Modified Glass Ionomer, RC - Resin Cement

\* ANOVA with Post Hoc Bonferroni adjustment.

<sup>^</sup> Dependent sample t-test.

Table 4 compares the cell survival in the group of pre-washed cements. The survival-related trend for the pre-washed cements group was similar to the one observed for the non-washed cements, where better survival rates were observed for ZPC than for RMGIC or RC. At the 6-hour observation, the CSR% mean for the pre-washed ZPC cement was 52.6%, for the RMGIC it was of 31.5%, and for the RC it was 6.5%. Some of these differences were statistically significant (refer to Table 4).



At the 12-hour observation, the CSR% mean for the ZPC was 25.0%, for the RMGIC it was of 5.6%, and for the RC it was 2.4%. These differences were statistically significant.

**Table 4.** Cell survival in the pre-washed cements' group

	Cell Survival Ratio %			<i>p</i> <sup>^</sup>
	1 hour mean (sd)	6 hours mean (sd)	12 hours mean (sd)	
ZPC	52.6 (8.3)	43.6 (15.7)	25.0 (9.9)	1h/6h .001 1h/12h .001
RMGIC	31.5 (6.1)	23.5 (11.0)	5.6 (2.5)	1h/6h .032 1h/12h<.001 6h/120h<.001
RC	6.5 (3.3)	3.3 (1.7)	2.4 (1.2)	1h/6h .004 1h/12h .001
<i>p</i> <sup>*</sup>	ZPC/RMGIC .001 ZPC/RC <.001 RMGIC/RC .001	ZPC/RMGIC<.001 ZPC/RC<.001 RMGIC/RC <.001	ZPC/RMGIC <0.001 ZPC/RC <0.001	

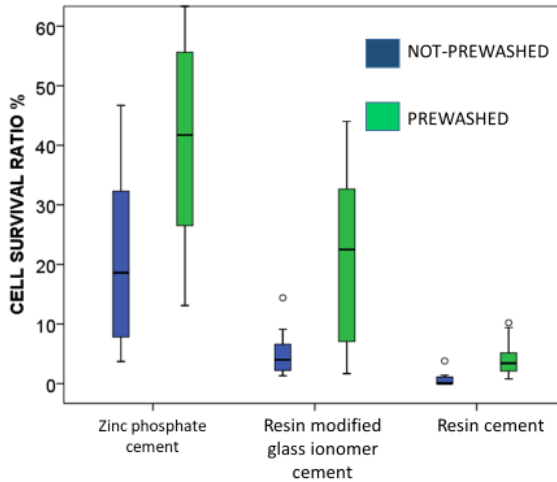
ZPC – Zinc Phosphate Cement, RMGIC – Resin Modified Glass Ionomer Cement, RC – Resin Cement.

\* ANOVA with Post Hoc Bonferroni adjustment.

<sup>^</sup> Dependent sample t-test.

*Visual comparisons of cell survival:*

Figure 5 demonstrates a visual comparison of cell survival depending upon the type of the luting cement and the pre-washing. In this figure, distributional patterns of the CSR% scores are presented, and each of the tested cements is represented with two box-plots, one to demonstrate the cytotoxicity of non-washed cement and one to illustrate how cytotoxicity is reduced when the cement is pre-washed. One can see a clear trend that pre-washing improved cell survival. The highest variation and the most considerable improvement from pre-washing was observed for ZPC. The overall trend was that ZPC cement is less cytotoxic to cell survival than the other two cements. One can also observe a wide variation in the cell survival rates, particularly in the ZPC and RMGIC groups.



**Figure 5.** Cell survival in the non-washed and pre-washed cements

### Predictors of cell survival

**Table 5.** Cytotoxicity as a function of luting cement type and exposure to cement pre-washing

PREDICTORS	Outcome: Cell Survival Ratio % <sup>^</sup>		Collinearity diagnostics	
	$\beta$ coeff.	<i>P</i> values	Tolerance	VIF#
ZPC vs. RMGIC/RC*	.543	<.001	.667	1.5
RMGIC vs. ZPC/RC*	.042	.481	.667	1.5
RC vs. RMGIC/ZPC*	-.169	.006	.667	1.5
Pre-washing	.599	<.001	.400	2.5

<sup>^</sup>Summary: Method: enter; Adjusted R Square=0.898; *p*<.001

\* ZPC – Zinc Phosphate Cement, RMGIC – Resin Modified Glass Ionomer Cement, RC – Resin Cement.

# Variance Inflation Factor.

To study the joint effect of the cement type and the pre-washing, we employed linear multiple regression (LMR) analysis. In order to enable the simultaneous inclusion of information regarding three different cements (nominal variable with 3 categories) into the LMR analysis, we created three dummy variables – one for each type of luting cement. To ensure that the inclusion of three dummy variables did not violate the important assumption of independence among predictors, multicollinearity diagnostics was employed, which showed that the assumption was not violated as indicated by tolerance and VIF not reaching critical values.

The overall LMR model was statistically highly significant ( $p<.001$ ) and two out of three individual predictors were statistically significant ( $p<.050$ ). Jointly, the type of cement and pre-washing explained 90% of the variation in the CSR% (adjusted R Square=0.898).

According to their decreasing cytotoxicity, the cements tested, could be ranked as follows: RC, followed by RMGIC and ZPC. For the overall cell survival, pre-washing had the strongest independent positive effect ( $\beta=.599$ ,  $p<.001$ ). The type of cement was also important; ZPC showed higher levels of cell survival compared to the two other cements ( $\beta=.543$ ;  $p<.001$ ). These findings indicate that ZPC was substantially less cytotoxic than RMGIC or RC.

Concomitantly, when compared to the two other cements and controlled for pre-washing, RC still had an independent statistically significant negative effect on the cell survival ( $\beta=-.169$ ,  $p<.001$ ).

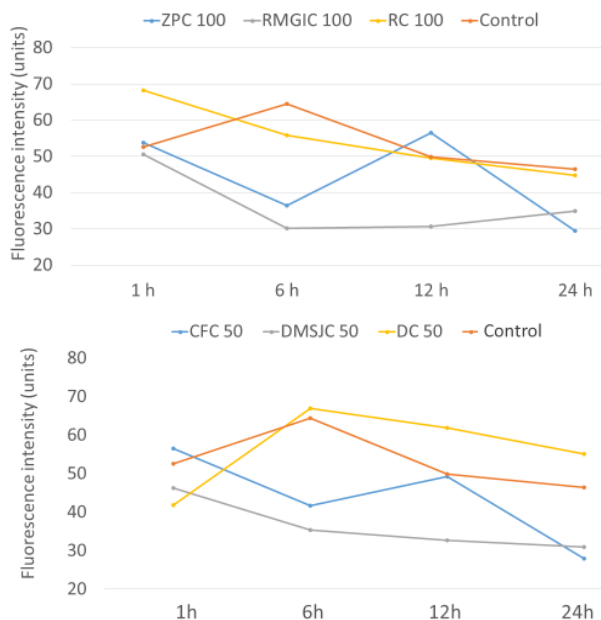
### Project 3: Metabolic changes and cell death induced by extracts derived from different types of luting cements

#### Changes in cell metabolic activity

The mitochondrial reducing activity (assessed with PrestoBlue Cell Viability Reagent by the resazurin assay) was inhibited by all extracts tested (Figure 6). The RMGIC 100% and 50% concentration extracts showed the highest cytotoxic effects by decreasing the metabolic activity of HGFs during the first 6 hours of incubation by 53% and 45%, respectively (Figure 6).

The extracts derived from ZPC also reduced the metabolic activity of HGFs by 44% (ZPC 100%) and 35% (ZPC 50%) after the first 6 hours of incubation. However, during the next 6 hours, metabolic activity returned to the initial levels that were comparable to the control group. This temporary increase was followed by the reduction of metabolic activity after 24 hours of incubation (Figure 6).

Extracts derived from the RC luting cement showed minimal effect on the metabolic activity of the HGF cells. Thus, we observed only a modest decrease (13%) in the RC 100%-treated cells after 6 hours of incubation, while after 12 and 24 hours of incubation the levels of metabolic activity were similar to the controls (Figure 6).



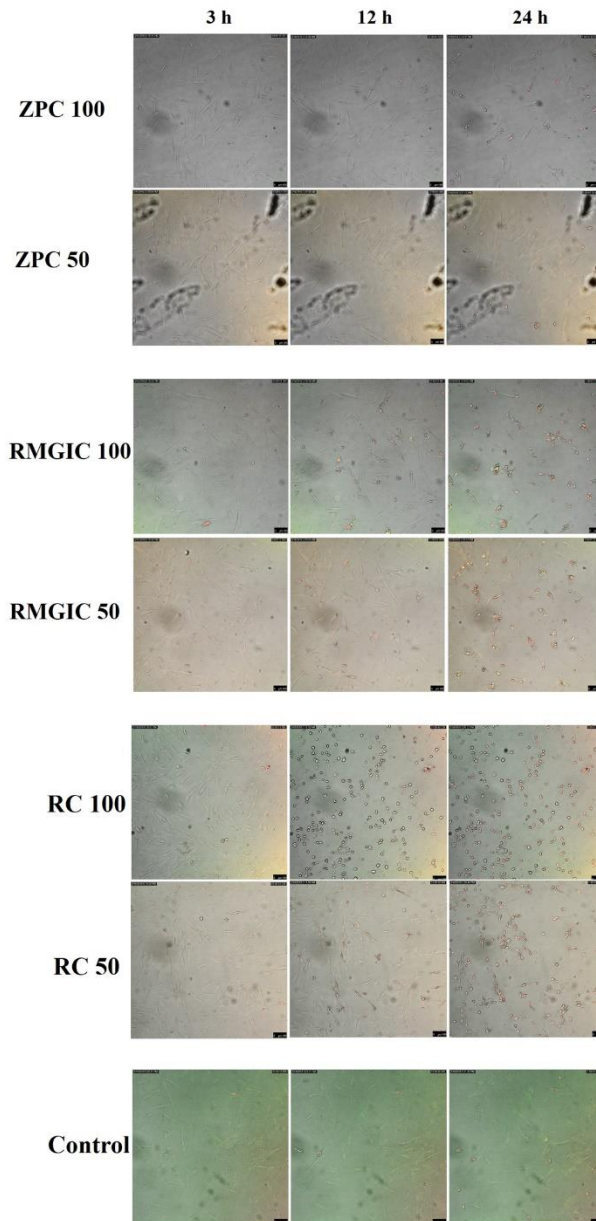
**Figure 6.** Comparison of the metabolic activity of human gingival fibroblasts treated with extracts derived from different luting cements.

### Viable cell counts

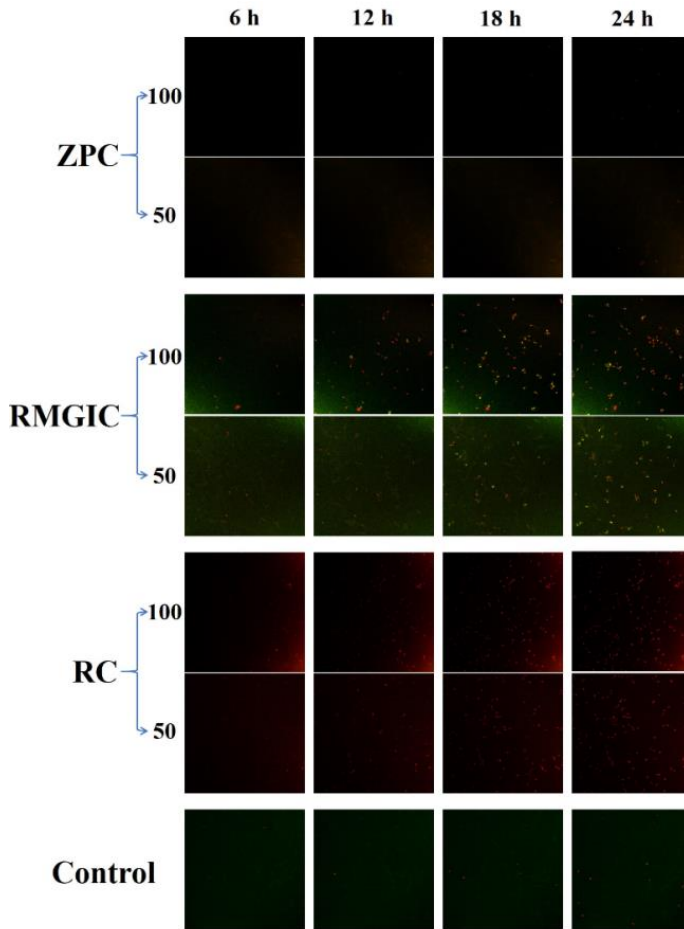
Treatment with RMGIC decreased viable HGFs in a dose-dependent manner. After 6 hours of incubation with the 100% and 50% RMGIC extracts, proportions of viable cells decreased by 65% and 35%, respectively; after 12 hours of incubation viable cells reduced by 75% and 50%, respectively. The number of viable RGIC- and ZPC-treated HGFs were proportional to the level of the metabolic activity (a fluorescent signal generated during the resazurin assay) registered earlier. Treatment with the RC 100% extract decreased the number of viable cells by 62%, 58%, and 67% after 6, 12, and 24 hours, respectively. Treatment with the RC 50% extract caused a delayed, but prominent response by reducing the number of viable cells by 15%, 75%, and 79% after 6, 12, and 24 hours, respectively. However, we did not observe an expected association between the number of viable cells and their metabolic activity after treatment with the extracts derived from the RC luting cement.

## Real-time monitoring of morphology changes

The long-term real time monitoring allowed the detection of early and dynamic changes in the morphology of HGFs in response to the extracts derived from different luting cements (Image 6). The RC 100 induced rapid and dramatic changes in the cellular morphology. An early change such as a severe shrinkage was detected at the 3 h observation, while after 12 hours all cells seemed irreversibly injured. The RC 50-treated HGFs demonstrated a delayed response showing that the effect was dose-dependent. By contrast, the RMGIC induced the morphological changes that are typical of apoptosis (shrinkage, rounding and blebbing of cells). These effects were also dose-dependent, because early changes were detected after 11 h and 15 h for the RMGIC 100 and for the RMGIC 50, respectively. The extracts from the ZPC did not induce significant changes in the HGF morphology.



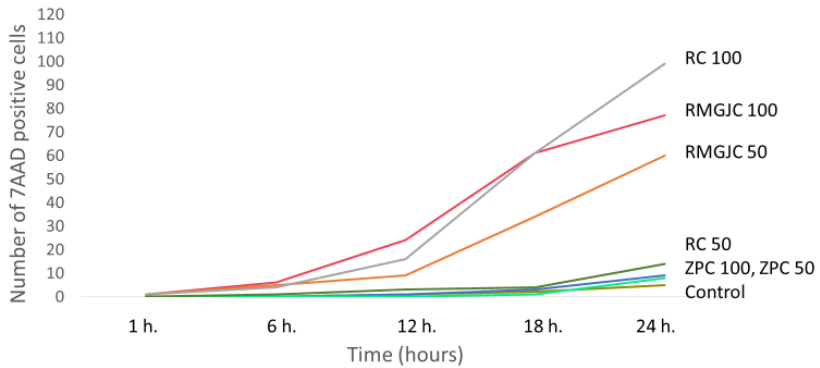
**Image 6.** Morphological appearance of HGFs after the treatment with extracts derived from different luting cements. Representative images from the live cell imaging taken after 3, 12 and 24 h.



**Image 7.** Real-time monitoring of necrosis and apoptosis of HGFs after the treatment with extracts derived from different luting cements

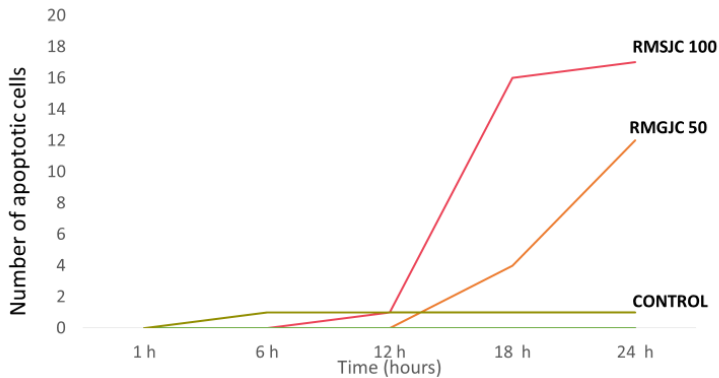
### Real-time monitoring of apoptosis and necrosis

Necrotic pathway of cell death is visualized in Figure 7. Exposure to the RC extracts induced a necrotic response in the HGF cells as indicated by a severe increase of membrane permeability to 7-AAD (Image 6,7; Figure 7). This effect was dose-dependent. Concurrently, we did not detect any caspase-3/-7 activity in the cell cultures. This indicates that the RC induces cell death solely via a necrotic pathway.



**Figure 7.** Necrotic response of human gingival fibroblasts to the extracts of luting cements

Apoptotic pathway of cell death is visualized in Figure 8. In contrast to the RC samples, RMGIC induced an apoptotic response in HGFs. Interestingly, the caspase-3/-7 activation followed immediately after an increase in membrane permeability for the 7-AAD, suggesting that loss of membrane integrity is a primary event during RMGIC-induced apoptosis (Figure 8). On the other hand, real-time monitoring of ZPC-treated cultures revealed no apoptotic and only a moderate necrotic response.



**Figure 8.** Apoptotic response of human gingival fibroblasts to the extracts of luting cements



## DISCUSSION

### Project 1

Previous *in vitro* studies examined wear of dental luting cements with different wear testing devices, but these studies mainly focused on occlusal wear. This type of wear, however, does not represent the type of wear the luting materials used for cementing fixed prostheses actually exhibit. The present experiment focused on cervical wear which is not influenced by occlusal forces. Although dissolution in saliva and other wear modalities might contribute to substance loss (diminishing luting cement), cervical wear, especially at the facial and buccal surfaces, is predominantly caused by toothbrushing.

We chose bovine teeth for our experiment due to practical reasons (easy availability and adequate size), and previous *in vitro* experimental studies used bovine dentin was used as a substitute for human dentin (48-50).

Several previous studies did not specify an exact measurement location within the gap. The advantage of the current experiment was that it examined wear at three different locations, this way a more comprehensive picture of wear could be obtained.

Our experiment clearly demonstrated that resistance to wear is substantially different and is dependent upon the location of the cement and its proximity to metal and dentin. In the present experiment, more intense wear was observed at the cement/dentin interface than in the middle of the cement or at the metal/cement interface. Seemingly, cement wears more the closer it is placed to the dentin, which is less resistant to wear than metal or the luting cements themselves. Wear in the middle of the cement is most indicative for the material itself, since wear at the two other measurement points could be influenced by the amount of wear in the neighboring materials, especially dentin.

The effect of marginal gap width on the wear of different luting cements was not consistent across different measurement locations. A tendency towards larger substance loss, particularly for water-based cements, at narrower gaps was observed in the middle of the cement. These unexpected findings should be interpreted with caution as, due to the different distances from the dentin to measurement point B (50  $\mu\text{m}$  and 125  $\mu\text{m}$ ), the wear of dentin itself might have contributed to the overall wear we observed. Specifically, the middle of the cement in the 100  $\mu\text{m}$  gap was closer to, and probably more affected by, the dentin than the mid-point of the wider 250  $\mu\text{m}$  gap.

The effect of gap width on substance loss could not be defined with certainty, as we did not observe a consistent systematic pattern of wear in the two different gap widths. The differences in wear between the two different marginal gap widths

were obtained from three measurement points. These inconsistencies might indicate that the marginal gap width either has no effect on cement wear or that some other unidentified factors, or possible interactions, between various factors may have contributed to wear.

Previous studies, however, presented the importance of gap width on wear of luting cements, i.e. the vertical wear of the materials under study increased with the marginal gap width (51-52). Kawai et al. reported a strong relationship (correlation > 0.9) between substance loss due to wear and the width of the horizontal gap (53). This could be a confounding finding since the wear, calculated as the vertical surface area of lost material ( $\mu\text{m}$ ), was not adjusted for the width of a gap.

The second objective of the study was to compare the wear resistance among five different luting materials. Under the conditions of this experiment, ZPC and GIC showed the least resistance to wear, CC and RC exhibited the greatest resistance, and RMGIC exhibited intermediate wear resistance compared to the other four tested materials.

The wear process is very complex, and the resistance to wear of a specific dental material reflects many interplaying factors of the entire process, including the properties of a specific material (54). The filler content and the degree of conversion in resinous types of luting cements were found to be among these factors (55), as well as the type of filler and polymer, the method of silanization, and the filler size distribution (56).

These factors might be responsible for the differences in wear of RGIC, CC, and RC observed in the current study. The lower wear resistance of ZPC and GIC might be attributed to differences in their physical properties and the structure of water-based, as opposed to polymer-based, luting materials (57). Water-based cements are inherently brittle and, because of their powder-liquid formulation, they are also more prone to porosity – both may lead to increased wear of such materials.

Our findings are in accordance with the findings reported by Shinkai and Suzuki (51), where wear resistance of a microfilled resin cement was superior to that of a glass ionomer. Guzman et al. (52), however, found the resin-modified glass ionomer cement to be more wear-resistant than the other four resin cements studied.

A wide range of variation in the wear of luting cements, especially at the cement/dentin interface was found. Several explanations should be considered for this variation. First, the bovine dentin we used could have been of varying quality. It was reported that dentin structure depends on its location (occlusal or buccal) and the depth of the dentin i.e. distances from the enamel/dentin junction and from the pulp (48-49). This dentin structure-related explanation might be supported by

an inverse association between dentin microhardness and its tubular density (57). In addition, as the age of the donor animals was not specified, a varying extent of calcification of their teeth might also have influenced the physical properties of the dentin we used for our experiment.

The wear-related variation we observed at the metal/cement interface might also be explained by the cement's adaptation to a metal. In contrast to a smooth and uninterrupted transition producing lower levels of wear, cement defects (slits or small grooves that might increase the effect of brushing) at the metal interface might result in considerably higher wear values.

The manual mixing of cement and the manual fixation of the specimens into the brushing devices should also be considered, as even minor inclinations might create protruded areas; consequently, these areas might be more impacted by toothbrushing.

Extrapolation of evidence acquired from *in vitro* studies to clinical applications is not always possible. However, the ranking of the cements tested under standardized experimental conditions may be used as a guideline for the selection of luting materials. The present experimental design, resembling wear due to toothbrushing, may be suitable for *in vitro* wear testing of any type of dental material exposed at the cervical area.

## Project 2

To thoroughly assess the potential cytotoxicity of commonly used luting cements, cross-validation of findings can be achieved by employing several experiments and comparing their results both qualitatively and quantitatively. When findings from different tests produce similar patterns of findings, the results are more valid.

The cytotoxicity of commonly used luting cement types (ZPC, RMGIC, RC) was evaluated as a function of three factors: cement type, cement pre-washing, and time. Our findings support the importance of all three factors. These findings will be further discussed in more detail.

Project 1 demonstrated substantial cytotoxicity for all luting cements tested, namely Hoffmann's ZP, Fuji Plus RMGIC, and RelyX Unicem RC. This inference is based on the observation that survival of human gingival fibroblasts in all the cement-containing specimens was substantially lower than in control specimens. These findings are in accordance with other *in vitro* experiments reporting that numerous dental materials exhibit cytotoxic effects and that cytotoxicity varies among the brands of dental materials (20, 39, 42, 58-62).

There may be several reasons for variations in the cytotoxicity we observed. Cytotoxicity of phosphate cements has been attributed to the release of zinc ions

and other chemical substances (63). Similarly, it has been suggested that GICs releasing fluorides that are toxic to human dental pulp stem cells (64). Contrarily, Stanislawski et al. reported that concentrations of  $F^-$ ,  $Sr_2^+$ , and  $Al_3^+$  in the elutes of GICs are too low to be cytotoxic and suggested that the principal compounds responsible for the cytotoxicity of RMGICs are unpolymerized resin monomers (20). Furthermore, Goldberg et al. reported that the mechanisms of cytotoxicity relate firstly to the short-term release of free monomers occurring during the monomer-polymer conversion and, secondly, to long-term release of leachable substances generated by erosion and degradation over time (65).

Early cytotoxic effects of luting cements could also be attributed to the acidity of the materials (66, 67). This initial acidity, involving a prolonged period of acidic pH and acid diffusions from luting cements through dentin coupled with the cytotoxicity of chemicals, may lead to damaging effects particularly when tooth preparation and cementation procedures are less than ideal (22, 66, 67).

The detrimental effect from dental materials to biological tissues were related to the monomers they contained. It has been demonstrated that even low concentrations of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) can significantly alter the morphology of human gingival fibroblasts (68). Comparable observations were reported by Becher et al., where monomers such as TEGMA, HEMA, and GDMA have the capacity to induce cell death in macrophages (69).

It is also important to consider that insufficient curing or long setting time of materials may increase their cytotoxicity. For example, dual-cured specimens of resin-based cements showed significantly lower toxicity than chemically cured specimens (20). The importance of a setting mode, as well as its timing, should not be underestimated when examining the biocompatibility of resin-based materials (21,70).

The present experiment found that the cytotoxicity of luting cements was highest in the first hours after setting. This trend toward decreasing cytotoxicity over time has also been observed in previous studies (39, 41, 42), This was attributed to reduced leakage, as most of the leachable components are released within the first few hours (23). Our experiment demonstrated that pre-washing of cements helped cells survive better. We can speculate that this positive effect may be explained by the fact that substantial amounts of leaking substances were washed away. A promising trend is that new materials are under development and several new formulations claim to reduce unpolymerized residual mass (71-74).

Although our findings clearly point to substantial cytotoxicity of all the luting cements tested, it is important to acknowledge the limited nature of our *in vitro* experiment. Due to the experimental nature of the present study, the clinical relevance of the present findings can only be speculated. In contrast to the

conditions of the present experiment, oral environments contain various protective mechanisms that could counterbalance the cytotoxic effects experienced due to luting cements, particularly during their setting stage.

However, we should still be aware of the potential cytotoxicity of luting cements; consequently, clinicians should handle these materials with caution and follow handling instructions with utmost care.

Further clinical follow-up studies are needed to answer the question of whether the cytotoxicity observed in the present *in vitro* experiment also has clinical implications.

### Project 3

Resazurin is converted by enzymes of metabolically active cells into a highly fluorescent resorufin that can be measured fluorometrically (75). However, this test reflects the metabolic state of a cell culture at a given timepoint, instead of measuring the exact number of viable cells. Therefore, the current project employed two types of tests to evaluate the cytotoxicity of different luting cements: 1) counting viable cells and 2) assessing the cell metabolic activity.

It is known that the metabolic activity of cells depends on different factors, such as the cell culture density or the extracellular matrix and does not always associate with an actual cell proliferation rate. It was demonstrated that the metabolic activity did not correlate linearly with increasing cell densities (76). Another study demonstrated that the quantification of DNA using fluorophores more accurately assessed the cellular proliferation than the resazurin based metabolic activity assay (77).

These considerations warrant our choice for validation by alternative methods such as direct visual cell counting using a hemocytometer and the trypan exclusion test, or the microscopical inspection of viable cells. We found that the extracts derived from the RC luting cement showed little effect on the metabolic activity of the HGF cells. This was in contradiction to the results obtained from the viable cell counting and live-cell imaging studies which showed that the RC decreased the number of viable HGFs in a dose- and time-dependent manner, and that it also induced necrotic cell death. By contrast, levels of the metabolic activity of the RGIC- and ZPC-treated HGFs were proportional to the viable cell numbers.

Our data demonstrated that an increase of membrane permeability to 7-AAD is an early event that precedes cellular shrinkage. In our study, we used live-cell imaging to monitor dynamic changes of cellular morphology and, simultaneously, to detect caspase-3/-7 activity and membrane integrity. To the best of our knowledge, this is the first time such an approach was used for the evaluation of the cytotoxic action of extracts derived from commonly used luting cements.

Live-cell imaging revealed that the extracts from different luting cements induced cell death through different pathways. An apoptotic response (as determined by means of caspase-3/-7 activation) was detected only in the RMGIC-treated HGFs. By contrast, RC treatment induced rapid changes in the cellular morphology and a severe increase in membrane permeability for 7-AAD, but no activation of the executionary caspases, which indicates that cell death occurred via a necrotic pathway. Necrotic cell death is associated with an uncontrolled release of the inflammatory cellular contents and the stimulation of inflammation in surrounding tissues, whereas apoptosis occurs without inducing an inflammatory response (78). Thus, in future studies, it would be informative to compare the pro-inflammatory effects of the RMGIC- and the RC-treated cells using *in vitro* and *in vivo* experimental models.

In summary, we demonstrated that apoptosis was the primary mechanism of cell death induced by extracts derived from the RMGIC luting cement, whereas extracts from the RC and the ZPC luting cements induced cell death via a necrotic pathway.

In addition, we suggest that the metabolic assays commonly used to assess the cytotoxicity of luting cements should be validated by alternative methods.

## CONCLUSIONS

### Project 1

Objective 1: A considerable variation in wear resistance among different luting cements was observed. Zinc Phosphate (ZPC) and Glass Ionomer (GIC) cements were least resistant to wear, Resin Modified Glass Ionomer (RMGIC) cement had a moderate level of wear, and Resin Cement (RC) had the best resistance to wear. The wear of cements at different locations varied, with the highest level of wear being observed at the cement/dentin interface for all cements tested.

Objective 2: The effect of gap width on substance loss could not be defined with certainty, as no consistent systematic pattern (of wear in the two different gap widths) was observed.

### Project 2

Objective 3: There were substantial differences among the luting cements studied in the induction of cytotoxicity. The most favorable cement-related environment for cell survival was found in the vicinity of ZPC (highest cell survival) and the least favorable environment was in the vicinity of RC (lowest cell survival).

Objective 4: Pre-washing of cements had a positive effect on cell survival. The observation time had a negative effect on cell survival, i.e. there were more viable cells observed at earlier timepoints than at later ones.

The pH values at the vicinity of the cements were below neutral (pH=7.0) throughout the whole 24-h observation

### Project 3

Objective 5: RMGIC and ZPC extracts reduced cell metabolic activity, but the RC extracts showed little effect on the metabolic activity of the human gingival fibroblasts.

Objective 6: Apoptosis was a common cell death mechanism due to GIC extracts, while the main cell death mechanism due the RC and ZPC extracts was necrosis.

## REFERENCES

1. The Academy of Prosthodontics. The glossary of prosthodontic terms. *J Prosthet Dent.* 2005;94(1):21-38.
2. Sita Ramaraju DV, Rama Krishna A, Venkata Ramaraju A, Raju M. A Review of Conventional and Contemporary Luting Agents Used in Dentistry. *American Journal of Materials Science and Engineering.* 2014;2(3):28-35.
3. Lad PP, Kamath M, Tarale K, Kusugal PB. Practical clinical considerations of luting cements: A review. *J Int Oral Health.* 2014;6:116-120.
4. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;48:277-288.
5. Ferracane JL, Stansbury JW, Burke FJ. Self-adhesive resin cements —chemistry, properties and clinical considerations. *J Oral Rehabil.* 2011;38:295-314.
6. Schwartz NL, Whittsett LD, Berry TG, et al. Unserviceable crowns and fixed partial dentures: Life-span and causes for loss of serviceability. *J Am Dent Assoc.* 1970;81:1395-1401.
7. Walton JN, Gardner FM, Agar JR. A survey of crown and fixed partial denture failures: length of service and reason for replacement. *J Prosthet Dent.* 1986;56:416-21.
8. Glantz PO, Ryge G, Jendresen MD, Nilner K. Quality of extensive fixed prosthodontics after five years. *J Prosthet Dent.* 1984;52:475-79.
9. Randow K, Glantz P-O, Zöger B. Technical failures and some related clinical complications in extensive fixed prosthodontics. *Acta Odontol Scand.* 1986;44:241-255.
10. Foster LV. Failed conventional bridge work from general dental practice: clinical aspects and treatment needs of 142 cases. *Br Dent J.* 1990;168:199-201.
11. Valderhaug J. A 15-year clinical evaluation of fixed prosthodontics. *Acta Odontol Scand.* 1991;49(1):35-40.
12. Lindquist E, Karlsson S. Success rate and failures for fixed partial dentures after 20 years of service: Part I. *Int J Prosthodont.* 1998;11:133-138.
13. Czichos H. Systemic analysis and description of wear processes. In: *Metallurgic aspects of wear.* Germany: Deutsche Gesellschaft für Metallkunde. 1981;9-23.
14. Kawai K, Isenberg BP, Leinfelder KF. Effect of gap dimension on composite resin cement wear. *Quintessence Int.* 1993;24:53-58.
15. Shinkai K, Suzuki S, Leinfelder KF, Katoh Y. Effect of gap dimension on wear resistance of luting agents. *Am J Dent.* 1995;8:149-51.
16. Guzman AF, Moore BK, Andres CJ. Wear resistance of four luting agents as a function of marginal gap distance, cement type, and restorative material. *Int J Prosthodont.* 1997;10:415-425.
17. Fransson B, Ujilo G, Gjeitanger R. The fit of metal-ceramic crowns, a clinical study. *Dent Mater.* 1985;1:197-199.
18. Felton DA, Kenoy BE, Bayne SC, Wirthman GP. Effect of *in vivo* crown margin discrepancies on periodontal health. *J Prosthet Dent.* 1991;65:357-364.



19. Schmalz G, Federlin M, Reich E. Effect of dimension of luting space and luting composite on marginal adaptation of a class II ceramic inlay. *J Prosthet Dent.* 1995;73:392-399.
20. Schmid-Schwap M, Franz A, Konig F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E, Watts DC, Schedie A. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater.* 2009;25:360-368.
21. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:333-355.
22. Smith DC, Ruse ND. Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. *J Am Dent Assoc.* 1986;112:654-657.
23. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994;21:441-452.
24. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra - and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995;22:1-14.
25. Schweickl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85(10):870-877.
26. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater.* 2004;20(1):12-20.
27. Schuster GS, Caughman GB, Rueggeberg FA, Lefebvre CA, Cibirka R. Alterations in cell lipid metabolism by glycol methacrylate (HEMA). *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999;10(11), 1121-1133.
28. Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Geurtsen W. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2004;25(19):4573-4580.
29. Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2006;22(6):499-505.
30. Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweickl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2006;27(9):1803-1809.
31. Blasiak J, Synowiec E, Tarnawska J, Czarny P, Poplawski T, Reiter RJ. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7487-7496.
32. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki CJ, Chojnacki J, Blasiak J. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1561-1574.
33. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3448-3459.
34. British Standards Institution. Specification for toothpastes: BS 5136:1981. London: British Standards Institution; 1981.

35. Heath JR, Wilson HJ. Forces and rates observed during *in vivo* toothbrushing. *Biomed Eng.* 1974;9:61-64.
36. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ (eds). *A Colour Atlas & Text of Oral Anatomy Histology and Embryology.* 2nd ed. London: Wolfe; 1992. 328 p.
37. Lambrechts P, Vanherle G, Davidson C. An universal and accurate replica technique for scanning electron microscope study in clinical dentistry. *Microsc Acta.* 1981;85:45-58.
38. International Organization for Standardization. *Dental elastomeric impression materials: ISO 4823:1992 (E).* Geneva: International Organization for Standardization. 1982.
39. Franz A, Konig F, Anglmayer M, Rausch-Fan X, Gille G, Rausch WD, Lucas T, Sperr W. Cytotoxic effects of packable and nonpackable dental composites. *Dent Mater.* 2003;19:382-392.
40. Lonroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001;59:34-39.
41. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Nitulescu GB. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater.* 1998;14:429-440.
42. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater.* 2003;19:25-31.
43. Sigusch BW, Volpel A, Braun I, Uhl A, Jandt KD. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater.* 2007; 23:1342-1348.
44. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988; 67:66-70.
45. Mercille S, Massie B. Induction of apoptosis in nutrientdeprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng.* 1994; 44:1140-1154.
46. Biological evaluation of medical devices-part 5: tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO/Draft International Standard 10993-part 5. International Organization for Standardization. 1997.
47. Arslan Malkoc M, Demir N, Sengun A, Bozkurt SB & Hakki S. S. Cytotoxicity evaluation of luting resin cements on bovine dental pulp-derived cells (bDPCs) by real-time cell analysis. *Dent Mater J.* 2015;34(2):154-160.
48. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res.* 1983;62:1076-1081.
49. Saunders WP. The shear impact retentive strengths of four dentine bonding agents to human and bovine dentine. *J Dent.* 1988;16:223-238.
50. Schilke R, Bauß O, Lisson JA, et al. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent.* 1999;12:92-96.
51. Shinkai K, Suzuki S, Leinfelder KF, Katoh Y. Effect of gap dimension on wear resistance of luting agents. *Am J Dent.* 1995;8:149-151.

52. Guzman AF, Moore BK, Andres CJ. Wear resistance of four luting agents as a function of marginal gap distance, cement type, and restorative material. *Int J Prosthodont.* 1997;10:415-425.
53. Kawai K, Isenberg BP, Leinfelder KF. Effect of gap dimension on composite resin cement wear. *Quintessence Int.* 1993;24:53-8.
54. Peutzfeldt A. Dual-cure resin cements: *in vitro* wear and effect of quantity of remaining double bonds, filler volume, and light curing. *Acta Odontol Scand.* 1995;53:29-34.
55. Frazier KB, Sarrett DC. Wear resistance of dual-cured resin luting agents. *Am J Dent.* 1995;8:161-164.
56. Li ZC, White SN. Mechanical properties of dental luting cements. *J Prosthet Dent.* 1999;81:597-609.
57. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentine microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1:176-179.
58. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:333-355.
59. Ulker HE, Sengun A. Cytotoxicity evaluation of self-adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. *Eur J Dent.* 2009;3:120-126.
60. Ulker HE, Hiller KA, Schweikl H, Seidenader C, Sengun A, Schmalz G. Human and bovine pulp-derived cell reactions to dental resin cements. *Clin Oral Investig.* 2012;16:1571-1576.
61. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006;22:838-844.
62. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:361-365.
63. Tyas MJ. In vitro toxicity tests of zinc phosphate cement. *J Oral Rehabil.* 1978;5:339-347.
64. Kanjevac T, Milovanovic M, Volarevic V, Lukic ML, Arsenijevic N, et al. Cytotoxic effects of glass ionomer cements on human dental pulp stem cells correlate with fluoride release. *Med Chem.* 2012;8:40-45.
65. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008;12:1-8.
66. Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J, Nomura S. Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. *Int Endod J.* 2003;36:622-628.
67. Bapna MS, Mueller HJ. Leaching from glass ionomer cements. *J Oral Rehabil.* 1994;21:577-583.
68. Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23:313-322.

69. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006;22: 630-640.
70. Sigusch BW, Pflaum T, Volpel A, Schinkel M, Jandt KD. The influence of various light curing units on the cytotoxicity of dental adhesives. *Dent Mater.* 2009;25:1446-1452.
71. Brackett MG, Bouillaguet S, Lockwood PE, Rotenberg S, Lewis JB, Messer RL, Wataha JC. In vitro cytotoxicity of dental composites based on new and traditional polymerization chemistries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81:397-402.
72. Khashaba RM, Moussa M, Koch C, Jurgensen AR, Missimer DM, Rutherford RL, Chutkan NB, Borke JL. Preparation, physical-chemical characterization, and cytocompatibility of polymeric calcium phosphate cements. *Int J Biomater.* 2011;2011:467641.
73. Xie D, Chung ID, Wu W, Lemons J, Puckett A, Mays J. An amino acid-modified and non-HEMA containing glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004;25(10):1825-1830.
74. Xie D, Yang Y, Zhao J, Park JG, Zhang JT. A novel comonomer free light-cured glass-ionomer cement for reduced cytotoxicity and enhanced mechanical strength. *Dent Mater.* 2007;23:994-1003.
75. O'Brien J, Wilson I, Orton T, & Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-5426.
76. Ng KW, Leong D, Hutmacher DW. The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):182-191.
77. Quent VM, Loessner D, Friis T, Reichert JC, Hutmacher DW. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):1003-1013.
78. Rock KL, & Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.

## CURRICULUM VITAE

**Vardas, pavardė:** Rita Trumpaitė-Vanagienė

**Gimimo metai:** 1970-01-15

**Mokslinis ir akademinis laipsniai:** M. Sc. (Master of Science), VU asistentė

### **Studijos:**

1993m. baigė KMA (dabar Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) Odontologijos fakultetą.

1993-1994m. atliko internatūrą VUL Žalgirio klinikoje.

1997-1999m. mokėsi Oslo universitete Master of Science podiplominėse studijose.

2000 m. Oslo universitete apgynė disertaciją „Some quality aspects of fixed partial dentures contributing to biological complications leading to restoration failure“.

2002-2003 mokėsi VU MF Odontologijos institute Ortopedinės odontologijos rezidentūroje ir įgijo odontologo ortopedo specializaciją.

### **Darbovietės ir pareigos:**

1994-1995m. VU Antakalnio ligoninė, gydytoja odontologė.

1995-1997m. VUL Žalgirio klinika, gydytoja odontologė.

1997-1999m. Oslo universiteto Odontologijos fakulteto rezidentė.

1998-1999m. The Nordic Institute of Dental Materials (NIOM), mokslinė bendradarbiavė.

2000-2003m. VUL Žalgirio klinika, gydytoja odontologė ortopedė.

2001-2002m. VU MF Odontologijos institutas, asistentė.

2007-2012m. VUL Žalgirio klinika, gydytoja odontologė ortopedė.

nuo 2007m. VU MF Odontologijos institutas, asistentė.

nuo 2014m. VU MF OI jaunesnioji asistentė.

### **Mokslo kryptis:**

Dantų protezų cementavimo medžiagų savybės.

Fiksuotų protezų tikslumas.

Periodontologinių ligonių protezavimo ypatumai.

**Dėstomi dalykai:** Okliuzijos pagrindai ir protezavimas fiksuotais protezais.

### **KVALIFIKACIJOS TOBULINIMAS**

1997-1999m. podiplominės studijos Oslo universitete.

2009-2010m. studijos Frankfurto JW Goethe universitete (Course in Oral Implantology).

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Trumpaite-Vanagiene R. Wear resistance of luting cements and the influence of marginal gap width on substance loss. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*. 2003;5:70-76.
2. Trumpaite-Vanagiene R, Bukelskiene V, Aleksejuniene J, Puriene A, Baltriukiene D, Rutkunas V. Cytotoxicity of commonly used luting cements - an in vitro study. *Dent.Mater.J.* 2015;34(3):294-301.
3. Trumpaite-Vanagiene R, Cebatariuniene A, Tunaitis V, Puriene A, Pivorius A. Live cell imaging reveals different modes of cytotoxic action of extracts derived from commonly used luting cements. *Arch.Oral Biol.* 2018;86:108-115.

### Kitos publikacijos disertacijos tema

1. **Trumpaite R.** Some quality aspects of fixed partial dentures contributing to biological complications leading to restoration failure. *Thesis for the Degree of Master of Science in Dentistry*. University of Oslo, Norway; 2000.
2. Pūrienė A, Savickas R, **Trumpaitė-Vanagienė R**, Plančiūnas L, ir kt. Periodonto ligos: periodontologinių ligonių dantų protezavimas ir ortodontinis gydymas. Vilnius; 2006, 120 pusl.
3. Sabaliauskas V, Juciute R, Bukelskiene V, Rutkunas V, **Trumpaite-Vanagiene R**, Puriene A. In vitro evaluation of cytotoxicity of permanent prosthetic materials. *Stomatologija*. 2011;13(3):75-80.

## PADĖKA

Su didžiausia pagarba dėkoju savo mokslinio darbo konsultantei, Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Odontologijos instituto profesorei dr. Alinai Pūrienei už mokslinę patirtį, įžvalgas ir motyvaciją, už kantrybę ir pagalbą ieškant atsakymų į painius mokslo ir kitus gyvenimo klausimus, ilgametę paramą susidūrus su įvairiais iššūkiais, už visą man skirtą laiką, energiją ir išmintį.

Dėkoju Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Odontologijos instituto direktorei ir Gynimo tarybos pirmininkei prof. dr. Vytautei Pečiulienei už pagalbą, kantrybę ir supratimą.

Širdingai ačiū Britų Kolumbijos (Kanada) universiteto doc. dr. Jolantai Aleksejūnienei, mokslinei patarėjai ir draugei, už pagalbą klaidžiojant statistikos labirintais, analizuojant tyrimo rezultatus ir rengiant publikacijas.

Esu dėkinga Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Odontologijos instituto protezavimo poskyrio kolegoms už kolegišką pagalbą ir palaikymą.

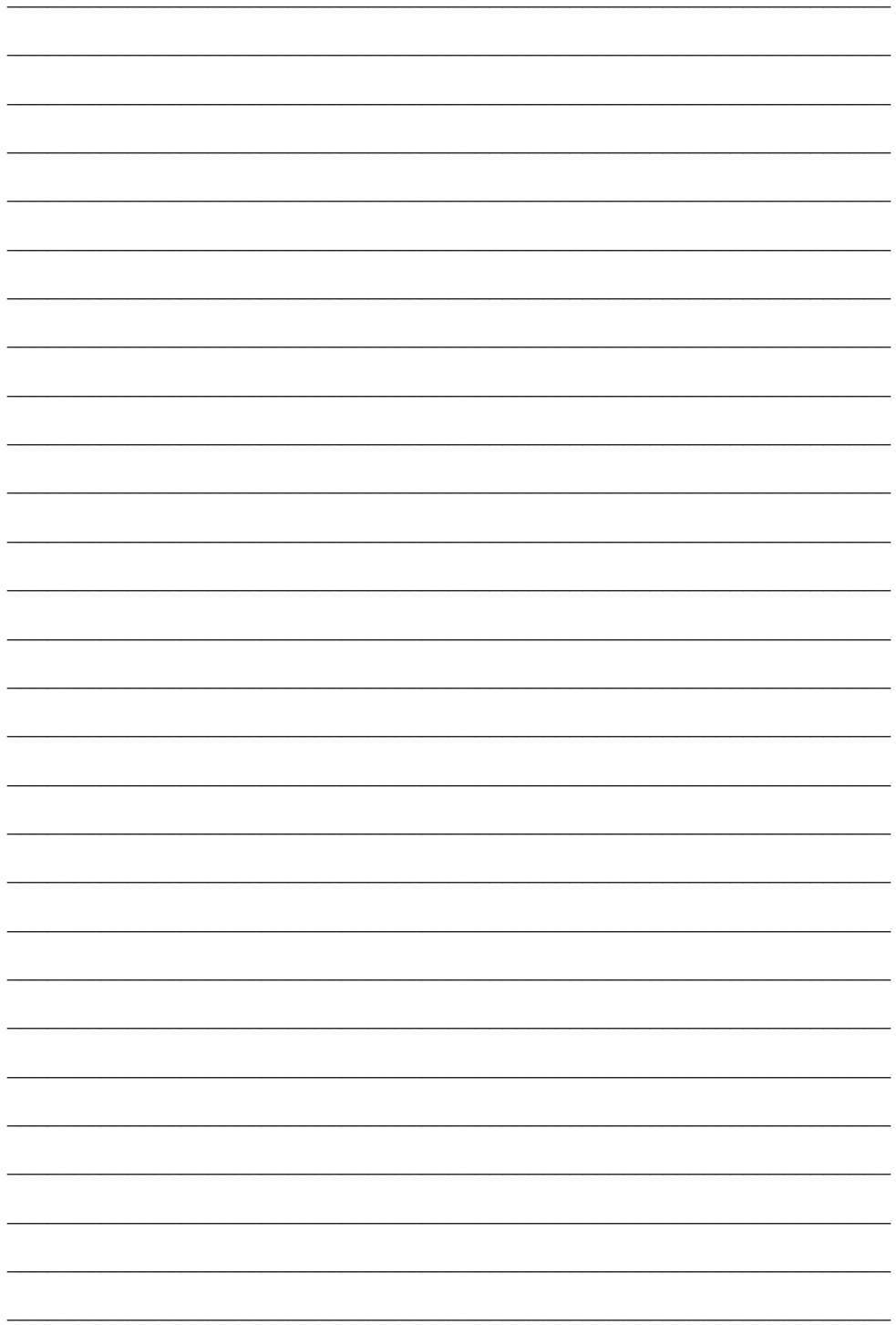
Nuoširdžiai ačiū dr. V. Bukelskienei ir dr. A. Čebatoriūnienei už jų indėlį bendruose laboratoriniuose projektuose.

Ačiū „Odontalio“ bendradarbiams, kolegoms, draugams už bendrystę, palaikymą ir žodžius, kurie motyvuodavo eiti pirmyn.

Begalinio dėkingumo žodžius tariau savo šeimai: tėvams, vyrui Ramūnui, sūnams Martynui ir Šarūnui, kurie šiame užsitęsusiame gyvenimo etape mane kantriai palaikė, suprato, buvo šalia ir visada manimi tikėjo.







Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt  
Tiražas 30 egz.