

ELŻBIETA JODKOWSKA

Cytotoksyczność współcześnie stosowanych systemów wiążących – na podstawie piśmiennictwa

Cytotoxicity of Current Adhesive Systems – Based on Literature Review

Zakład Stomatologii Zachowawczej Instytutu Stomatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Wszystkie współcześnie stosowane materiały dentystyczne w różnym stopniu uwalniają substancje do środowiska jamy ustnej. Znajomość podstawowych reguł ich zastosowania pozwoli zapobiec temu niepożądanemu procesowi lub przynajmniej go ograniczyć. Na podstawie piśmiennictwa zwrócono uwagę na możliwość wystąpienia reakcji ubocznych środowiska jamy ustnej na systemy wiążące. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że uwalniające się monomery powodują uszkodzenia chemiczne w hodowlach komórkowych i komórkach miążgi, penetrując przez tkankę zębinową, zakłócają metabolizm komórek. Oprócz molekularnej cytotoksyczności dużych stężeń monomerów, małe stężenia mogą zaburzyć metabolizm, homeostazę komórkową, indukować apoptozę lub zatrzymać cykl komórkowy. Żywice Bis-GMA, HEMA, TEGDMA zmieniają ekspresję genów, których produkty biorą udział w regulacji wzrostu komórki, proliferacji i zróżnicowaniu, replikacji i naprawie DNA (**Dent. Med. Probl. 2012, 49, 2, 299–304**).

Słowa kluczowe: zębinowe systemy wiążące, cytotoksyczność, zębina.

Abstract

All dental biomaterials release substances to the oral cavity with varying degree. Knowing the basic rules of internal use enables to prevent such adverse reactions, or at least minimize them. Based on literature review, a potential occurrence of side effects of the adhesive systems on the oral cavity, is described. *In vitro* and *in vivo* studies have confirmed that released monomers cause chemical damage in cells cultures and in pulp cells. Penetrating through tooth tissue monomers disrupt meous monomers at high concentration, low concentration can have deleterious effect on the metabolism, cellular homeostasis, can also trigger apoptosis or cell cycle delay. Bis-GMA, HEMA, TEGDMA can induce the expression of the genes whose products are involved in regulation of cell growth, gene expression, proliferation and differentiation, reapplication and DNA repair (**Dent. Med. Probl. 2012, 49, 2, 299–304**).

Key words: dentinal adhesive systems, cytotoxicity, dentin.

Zębinowe systemy wiążące pozwalają na mniej inwazyjną preparację zęba z powodu mniejszej potrzeby wykonania retencji mechanicznej. Wzmacniają osłabioną tkankę zębinową, ograniczają przebarwienie brzeżne i minimalizują mikroprzeciek brzeżny. Zapewniają lepsze przenoszenie naprężeń na tkanki zęba, usuwają objawy zwiększonej wrażliwości pozabiegowej oraz zwiększają możliwości leczenia odtwórczego [1].

W skład systemów wiążących wchodzi hydrofobowe żywice dwumetakrylanowe Bis-GMA, TEGDMA, HEMA lub UDMA oraz substancje,

takie jak: rozpuszczalniki organiczne (aceton, etanol, woda lub mieszaniny wymienionych związków), aktywatory, inicjatory i stabilizatory polimeryzacji, a także wypełniacze nieorganiczne [2]. Badania dawek ED₅₀ dowiodły, że monomery podstawowe Bis-GMA i UDMA już w ilości 0,1 milimola powodowały zahamowanie rozwoju komórkowego w większości hodowli. Spośród komonomerów takie właściwości wykazywały DEGDMA i TEGDMA przy odpowiednio 0,07 i 0,2 milimola. We współczesnych systemach adhezyjnych są stosowane trzy mechanizmy adhezji: system „wytraw

i spłucz” (*etch and rinse adhesive*), system samowytwarzający (*self etch adhesives*) i system modyfikowany żywicą cement szkłoionomerowy (*resin-modified glass-ionomer adhesives*) [3, 4]. Podstawowy mechanizm wiązania systemów łączących do szkliwa i zębiny opiera się na procesie wymiany, w którym minerały usunięte z twardych tkanek zęba zostają zastąpione przez monomery żywic, dlatego w tworzonych porowatościach po polimeryzacji powstają połączenia mikromechaniczne. Proces ten został opisany przez Nakabayashi et al. [5] w 1982 r. i powszechnie jest nazywany „hybrydyzacją” lub formowaniem warstwy hybrydowej. Wiązanie do szkliwa i zębiny zachodzi przez proces wytrawiania kwasem, który prowadzi do powstania porowatej warstwy o grubości 5–50 µm, dostępnej dla penetracji żywic systemu wiążącego. W przypadku zębiny kwas demineralizuje warstwę na głębokość 3–5 µm. Do odsłonięcia sieci włókien kolagenowych prowadzi proces demineralizacji zębiny, którą penetruje primer i żywica adhezyjna, zapewniając retencję mikromechaniczną i utworzenie warstwy hybrydowej. Wytrawianie zębiny prowadzi do powstania zmian strukturalnych i należy liczyć się ze zwiększeniem jej przepuszczalności, penetracją bakterii i produktów ich metabolizmu oraz toksycznym oddziaływaniem stosowanych związków chemicznych. Może to w konsekwencji prowadzić do wystąpienia różnego typu powikłań ze strony miazgi. Kolejnym problemem, na który powinno się zwrócić uwagę jest wpływ płynu kanalikowego. Jego wpływ zwiększa się po wytrawieniu zębiny 5–20%, powodując znaczne zwiększenie wilgotności powierzchni tej tkanki. Dzieje się to po zastosowaniu zarówno jednoetapowego systemu samowytwarzającego, jak i jedno- lub dwuetapowego systemu całkowitego wytrawiania [6, 7]. Mimo że dłuższe wytrawianie zębiny zwiększa grubość wytrawionej warstwy hybrydowej, nie powoduje zwiększania siły połączenia, a wręcz odwrotnie – może doprowadzić do nanoprzecieku w warstwie hybrydowej. Można go zaobserwować na powierzchni zębiny, kiedy monomer pochodzący z systemu wiążącego nie wniknął całkowicie do struktury kolagenu i częściowo zdemineralizowanej zębiny. Wprawdzie przeciek nie osłabi siły wiązania, gdyż jest krótkotrwały i zbyt mały, ale może stanowić problem w przyszłości, ponieważ część niezwiązanych monomerem włókien kolagenowych może ulec degradacji hydrolitycznej.

Stopień polimeryzacji monomerów w warstwie hybrydowej w porównaniu z żywicą jest mniejszy i wynosi około 85%, co jest spowodowane obecnością wody w otoczeniu kolagenu [8]. Stopień polimeryzacji obecnie stosowanych związków metakrylanowych (Bis-GMA, UDMA i TEGDMA)

rzadko przekracza natomiast 75%, co prowadzi do uwalniania się z tych materiałów do jamy ustnej składników, które nie uległy polimeryzacji [9, 10]. Niezwiązane monomery nie wytwarzają podparcia dla włókien i są wypłukiwane [11]. Przesuszenie zębiny powoduje mniejsze wysycenie żywicą oraz znacznie mniejszy (dwukrotnie) stopień polimeryzacji z powodu zapadania się włókien i utraty przestrzeni wokół kolagenu. Aby poprawić adhezję monomerów do zębiny, stosuje się wiele różnych związków chemicznych zdolnych do jednoczesnego wiązania z matrycą polimerową z równoczesnym tworzeniem wiązań chemicznych z hydroksyapatytem i kolagenem zębiny. Primery powodują denaturację i precypitację białek zawartych w płynie zębinowym, wiążąc tym samym zębinę. Płynna żywica pozbawiona wypełniacza składa się z monomerów hybrydowych, jak: Bis-GMA, TEGDMA oraz pewnych ilości monomerów hydrofilowych HEMA, które nawilżając zębinę, promują adhezję „wciągając” żywicę w głąb tkanki. Podstawową rolę żywicy jest stabilizacja polimeryzowania warstwy hybrydowej i penetracja bocznych wypustek kanalików. Są to: kwasy 2-metakryloglicerofosforanowe i addukt N-fenyloglicyny z metakrylatem glicydylu NPG-GMA (N-fenyloglicyna i metakrylan glicydylu) w I generacji, estry halofosforowe połączone z żywicą Bis-GMA oraz HEMA w II generacji, addukt NTG-GMA ze szczawianem glinu oraz Na-NTG-GMA (sól sodowa adduktu N-toluiloglicyny z metakrylanem glicydylu w III generacji. W nowoczesnych systemach wiążących zastosowano monomery oraz ich połączenia, np. HEMA z kwasem poliakrylowym 4-META (ester fosforowy 4-metakryloilo-ksyetylotrój-melitowy z trój-n-butyloboranem), PENTA (ester fosforowy pentaakrylanu i inne).

Liczne badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że uwalniające się monomery powodują chemiczne uszkodzenia w hodowlach komórkowych i komórkach miazgi [12, 13].

Badania wpływu różnych systemów łączących i materiałów złożonych na hodowle fibroblastów miazgowych wykazały mniej lub bardziej zaznaczoną lizę komórek i zmianę ich barwliwości. Wynikało to z mało lepkiej konsystencji monomerów, powodując głębokie ich wnikanie do kanalików zębowych, gdzie w obecności płynu tkankowego nie ulegały całkowitej polimeryzacji, dlatego miały duży potencjał cytotoksyczny [14]. Wyniki badań *in vitro* dotyczące wpływu materiałów złożonych wykazują, że komórki hodowli były mniej uszkodzane przez materiały spolimeryzowane, z których monomery dyfundowały przez płytki zębinowe. W sytuacji, gdy grubość płytki warstwy dyfuzyjnej była mniejsza niż 0,5 mm, wyraźnie było zaznaczone działanie cytotoxiczne [15].

Testy z wprowadzeniem krążków zębinowych (wcześniej stosowano agar lub folię), które z jednej strony pokrywano hodowlami komórkowymi, z drugiej substancją badaną, ograniczały dyfuzję środka cytotoksycznego do hodowli, imitując w ten sposób warunki panujące *in vivo*. Zębina ma za zadanie buforowanie środka toksycznego, jego związanie z organicznymi i nieorganicznymi składnikami zębiny.

Ponieważ wyniki uzyskane z badań w warunkach *in vitro* bez pośredniej warstwy zębiny różniły się znacznie od obserwacji *in vivo*, zaproponowano stosowanie barier zębinowych, gdyż otrzymane w ten sposób wyniki można bezpośrednio odnosić do warunków *in vivo*. Zastosowano dwie strategie przy próbach określenia ryzyka powiązanego z materiałami wypełniającymi za pomocą testów *in vitro*. Pierwsza polegała na badaniu stężeń cytotoksycznych poszczególnych substancji wchodzących w skład materiału w hodowlach komórkowych, a następnie na porównaniu tych stężeń ze stężeniami możliwymi do osiągnięcia przez te substancje w warunkach *in vivo* oraz ocenie ryzyka wystąpienia efektu cytotoksycznego. Mimo iż badania *in vitro* dają wyniki ograniczone brakiem pewnych biologicznych i fizjologicznych czynników, które są niemożliwe do pełnego odtworzenia, nadal są stosowane i użyteczne w ustalaniu istotnych ilości szkodliwych biologicznie składników zawartych w materiałach. Spośród trzech głównych modeli do badania cytotoksyczności (kontrast pośredni, bezpośredni, ekstrakty) protokoły doświadczalne wykazały znaczne zróżnicowanie. W ten sposób mogą być również określane czas ekspresji oraz synergizm i antagonizm między komponentami. Druga strategia polegała na zastosowaniu w testach *in vitro* barier zębinowych między materiałem a komórkami w celu symulacji barier, które mogą występować *in vivo*. Najnowsze badania wykorzystują połączenie obu tych metod. Pomaga to rozpoznać, które komponenty wchodzące w skład materiałów pokrywających zębinę mogą być odpowiedzialne za wpływ na miazgę oraz które z nich mogą zmienić ten wpływ przez zmniejszenie przepuszczalności zębiny. Model doświadczalny z barierą zębinową do testowania cytotoksyczności materiałów wiążących, jest zbliżony do rzeczywistej sytuacji klinicznej, kiedy materiał wchodzi w interakcje z zębina.

Wiadomo, że składniki systemów wiążących penetrując przez tkankę zębinową zakłócają metabolizm komórek miazgi. Stopień przepuszczalności zębiny jest zatem jednym z czynników decydujących o wnikaniu składników systemów wiążących do miazgi i uszkodzeniu jej komórek. Próbkę zębiny o większej przepuszczalności pozwalają na silniej zaznaczony proces dyfuzji,

lecz efekt przechodzenia cząsteczek przez barierę zależy od rodzaju materiału [16]. W warunkach *in vitro* oceniono wpływ przepuszczalności zębiny na cytotoksyczność czterech systemów wiążących. Systemy adhezyjne są zwykle umieszczone bezpośrednio na zębini, z której wcześniej usuwa się warstwę mazistą. Z niewielką grubością tkanki zębinowej jest związany duży potencjał penetracji substancji do miazgi zęba. Z zębiny wypreparowano dyski i podzielono na słabo-, średnio- i wysokoprzepuszczalne. Nakładano na ich powierzchnie 4 różne systemy łączące (Aelitebond[®], Optibond[®], Prima Uniwersal Bond 3[®] i Scotchbond Multipurpose[®]), a na „dokomorową” stronę 1 ml pożywki dla hodowli komórkowych. Zawiesinę wymieniało co 24–168 h i wkraplano do jednowarstwowej hodowli ludzkich fibroblastów na 24 h. Odpowiedź komórek oceniano na podstawie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (test MMT). Uzyskane wyniki wskazują, że składniki wszystkich czterech ocenianych systemów wiążących zbudowane na bazie żywic Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, PENTA, HEMA i zawierające różne rozpuszczalniki etanolowe i wodne penetrowały przez tkankę zębinową, zakłócały metabolizm komórkowy i stwarzały potencjalne ryzyko dla miazgi zęba. Materiały były bardziej toksyczne zaraz po zastosowaniu, chociaż zachowały szkodliwy potencjał nawet 168 godz. po podaniu (ponad 15% zmniejszenie metabolizmu komórkowego). Wyniki tych badań wskazują na szeroki zakres cytotoksyczności zarówno związków chemicznych i jonów metali (w przedziale 3–3600 $\mu\text{mol/l}$) [17, 18], jak i jonów metali (w przedziale 7–3110 μM). Wataha et al. [19] ocenili wpływ związków chemicznych wchodzących w skład materiałów złożonych opartych na bazie żywic Bis-GMA na fibroblasty myszy Balb/C3T3. Żywica Bis-GMA została dodana do hodowli komórkowej na 24 godz. Pierwsze oznaki zmniejszenia ogólnej zawartości białek, syntezy białek i syntezy DNA spostrzeżono przy stężeniu żywicy między 0,5 a 5 $\mu\text{mol/l}$ już po 8 godz. obserwacji. W miarę upływu czasu stwierdzano, że spadek syntezy i ogólnej zawartości białek nasilał się. Związki chemiczne wchodzące w skład materiałów złożonych na bazie żywic Bis-GMA różniły się między sobą wywoływanym stopniem cytotoksyczności nawet 100-krotnie, co wynikało z dużej masy cząsteczkowej żywicy Bis-GMA, która wykazywała mniejszą zdolność dyfuzji przez zębinę. Żywica Bis-GMA podlegała hydrolizie, produkując kwas metakrylowy (MAA), który stymulował wydzielanie TNF- α i zmiany w warstwie lipidów błony komórkowej, co wpływało na przepuszczalność zębiny. Monomer amfoteryczny HEMA (met akrylan 2-hydroksyetylu), składnik większości stosowanych systemów wiążących,

zdolny do szybkiej dyfuzji przez zębinę, zastępując wodę w zębinie w badaniach *in vitro* spowodował cytotoksyczność, pobudzając produkcję receptorów TNF- α i apoptozę. Monomer HEMA uwalniany w mniejszych stężeniach w dłuższym czasie zmniejszał wskaźnik wzrostu komórek i powodował apoptozę prawdopodobnie w wyniku uszkodzeń DNA, które prowadziły do powstania mutacji oraz aberacji chromosomowych dających możliwość powstania genów fuzyjnych. Monomer TEGDMA (2-metakrylan 3-glikolu etylenowego) może zaburzać homeostazę komórkową przez oddziaływanie z błoną komórkową, prowadząc do indukcji apoptozy lub zatrzymania cyklu komórkowego. Monomer TEGDMA może również oddziaływać na syntezę DNA. Hanks et al. [18] zmierzili również odwracalność skutków toksycznych wywołanych przez żywice Bis-GMA przez usunięcie jej z nośników hodowli komórkowych i umożliwienie hodowli na „odzyskanie równowagi” przez kolejne 24 godz. W czasie 24–48 godz. wykazano, że istnieje możliwość odwracalności reakcji toksycznej. Hodowle komórkowe traciły zdolność do odzyskiwania sprawności przy stężeniach żywicy Bis-GMA równych 5–10 $\mu\text{mol/l}$. Według Yoshiego [20] najbardziej toksyczne okazały się żywice wymienione w kolejności od najbardziej do najmniej toksycznej: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, HEMA i MMP. Wśród związków chemicznych dodawanych do żywic najmniejszy spadek aktywności komórkowej na ogólną zawartość białek, syntezę białek i DNA uzyskano z przyspieszaczem polimerizacji DMEpT (2-hydroksyetylo-p-toluidyna).

Analizowano cytotoksyczność wybranych systemów wiążących: Single Bond Plus[®], Clearfil SE Bond12[®] i Xeno V12[®] podawanych na powierzchni krążków ludzkiej zębiny, odtwarzających barierę zębinową [21]. Zestawy umieszczano na jednowarstwowej hodowli komórkowej i inkubowano przez 24, 48 i 72 godz. Podstawowa pożywka hodowlana i lipopolisacharydy *Escherichia coli* zostały użyte jako kontrola negatywna i pozytywna. Toksyczność komórkową oceniano testem MTT (zdolność do przeżycia hodowli makrofagów przez ocenę aktywności enzymów) oraz wydzielanie tlenu azotu. Wyniki badań wskazują, że wszystkie badane materiały przedostawały się do zębiny i wywoływały efekt cytotoksyczny, powodując zmniejszenie stopnia przeżycia makrofagów. Rezultaty były zróżnicowane w zależności od stopnia ekspozycji. Redukcja > 50% została zaobserwowana po 72 godz. inkubacji w kontakcie z materiałem (w porównaniu z grupą kontrolną). Wykorzystując system wiążący Single Bond Plus, obserwowano zależne od czasu zmniejszenie przeżywalności komórek w 3 okresach podobną do LPS *E. coli* – kontroli pozytywnej. W grupie z użyciem Clearfil

SE Bond nastąpił natomiast wzrost przeżycia komórek w czasie 24–48 godz., przy czym wyniki te były podobne do osiągniętych po 72 godz. dla innych grup. Single Bond Plus wykazał istotną statystycznie różnicę między 24 a 72 godz., a Xeno V między 48 a 72 godz. Ilość wytworzonego tlenu azotu (w czytniku ELISA) przez komórki poddane działaniu ocenianych materiałów nie różniła się statystycznie od kontroli negatywnej. Po 48 godz. wykazano istotną statystycznie różnicę między Single Bond Plus/Clearfil SE Bond oraz Xeno V/NC (podstawowa pożywka bakteryjna). Spośród każdej z grup jedynie Clearfil SE Bond różnił się istotnie po 72 godz. Wartości uzyskane dla lipopolisacharydów *E. coli* różniły się statystycznie od wszystkich pozostałych grup we wszystkich okresach. Uzyskany różny stopień cytotoksyczności badanych materiałów mógł być spowodowany odmiennym składem chemicznym [22] lub interakcją z tkanką zębinową, co powoduje różnice w odpowiedzi tkanki miazgowej [23]. Składniki badanych materiałów przenikały przez zębinę w stężeniach wystarczających do spowodowania uszkodzeń metabolizmu komórkowego lub śmierci makrofagów, wykazując tym samym potencjalną cytotoksyczność dla komórek miazgi. Składniki, które mogły być wypłukane z polimerów to: Bis-GMA, HEMA i kamforochinon. Dwa pierwsze zawierały systemy Single Bond Plus i Clearfil SE Bond, a wszystkie trzy fotoinicjator-kamforochinon. Związki te zmniejszają przeżywalność komórek [24–26]. Żywica Bis-GMA jest najbardziej toksyczna spośród nich i mimo mniejszej zdolności dyfuzji przez zębinę z powodu dużej masy cząsteczkowej podlega hydrolizie, produkując kwas metakrylowy, który jest rozpuszczalny w wodzie [27, 28].

Kwas metakrylowy powoduje cytotoksyczność, pobudzając wydzielanie TNF- α lub zmiany w warstwie lipidów błony komórkowej, wpływając na jej przepuszczalność [29, 30]. Żywica HEMA zastępuje wodę w zębinie i jest zdolna do szybkiej dyfuzji i wystarczająca do spowodowania cytotoksyczności przez stymulację produkcji TNF- α oraz apoptozy [31]. Badania *in vitro* wykazały obecność żywicy HEMA nawet po 30 dniach od przygotowania próbek. Najmniejsze stężenie odnotowano w początkowym okresie badania (0–4,32 min) dla wszystkich próbek. W badaniu dyfuzji przez zębinę odnotowano obecność HEMA po 10 dniach od inkubacji, największą ilość w początkowym okresie. Wyniki badań wykazały możliwość bezpośredniego oddziaływania cytotoksycznego HEMA uwalnianego z wypełnienia na komórkę miazgi, jeśli warstwa pozostawionej zębiny nie jest dostatecznie gruba [32, 33]. Fotoinicjator jest kolejnym składnikiem, który może być uwalniany po utwo-

rzeniu polimeru, gdyż frakcja nieużyta w reakcji może być całkowicie wypłukana po polimeryzacji i może powodować stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA i cytotoksyczność [34]. Systemy wiążące wykazują wysoki stopień ryzyka niecałkowitej polimeryzacji, ponieważ podawane są w cienkich warstwach, bez nacisku i w kontakcie z tlenem, osiągając tylko 8,6% konwersji. Wartość ta zwiększa się do 29%, jeśli następnie jest stosowany i polimeryzowany materiał złożony [35].

Sukces kliniczny nowych technik stomatologicznych przypisywany poprawionym właściwościom fizykochemicznym materiałów złożonych nie może uspić czujności dotyczącej niepożądanego efektu biologicznego wynikającego z obecności żywic metakylanowych w organizmie człowieka.

Szczegółowa analiza procesu polimeryzacji, kinetyki uwalniania monomerów z polimerów sugeruje, że miejscowe stężenie monomerów znajdujących się w pośrednich systemach wiązania zębinowego i materiałach złożonych może być wystarczająco duże do wywołania działania cytotoksycznego i genotoksycznego. Materiały te mogą być również mutagenne. Aby zapobiegać temu działaniu *in vivo*, należy m.in. chronić miążgę za pomocą podkładów z cementów o dużej biokompatybilności, tj. cementy polikarboksylowe i szkłoionomerowe. Należy również uzyskać możliwie dokładną informację o używanym materiale. Konieczne są dalsze badania określające, które składniki zawarte w materiałach są odpowiedzialne za szkodliwe działanie na żywe komórki.

Piśmiennictwo

- [1] HUANG F.M., CHANG Y.: Cytotoxicity of dentin-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int. Endod. J.* 2002, 35, 905–909.
- [2] CARVALHO R.M., MENDOÇA J.S., SANTIAGO S.L., SILVEIRA R.R., GARCIA F.C.P., TAY F.R.: Effects of HEMA/solvent combinations on bond strength to dentin. *J. Dent. Res.* 2003, 82, 597–601.
- [3] VAN MEERBECK B., VARGAS S., INOUE S., YOSHIDA Y., PEUMANS M., LAMBRECHTS P.: Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper. Dent.* 2001, 26, S119–S144.
- [4] VAN MEERBECK B., DE MUNCK J., YOSHIDA Y., INOUE S., VARGAS M., VIJAY P.: Buonocore memorial lecture: adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper. Dent.* 2003, 28, 215–235.
- [5] NAKABAYASHI N., KOJIMA K., MASUHARA E.: The promotion of adhesion by the infiltration of monomer into tooth substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* 1982, 16, 1240–1243.
- [6] SAURO S., PASHLEY D.H., MONTANARI M., CHERSONI S., CARVALHO R.M., TOLEDANO M.: Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent. Mater.* 2007, 23, 705–713.
- [7] TAY F.R., FRANKENBERG R., KREJCI I., BOUILLAGUET S., PASHLEY D.H., CARVALHO R.M.: Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. *In vivo* evidence. *J. Dent.* 2004, 32, 611–621.
- [8] DICKENS S.H., STANSBURY J.W., CHOĆ K.M., FLOYD C.J.E.: Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. *Macromolec.* 2003, 36, 6043–6053.
- [9] MICHELSEN V.B., LYGRE H., SHALEVIK R., TVEIT A.B., SOLHEIM E.: Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur. J. Oral Sci.* 2003, 111, 263–271.
- [10] MOSZNER N., SALZ V.: New developments of polymeric dental composites. *Prog. Polym. Sci.* 2001, 26, 535–576.
- [11] FLOYD C.J.E., DICKENS S.H.: Network structure of bis-GMA and UDMA-based resin systems. *Dent. Mater.* 2006, 22, 1143–1149.
- [12] NOCCA G., DE PALMA F., MINUCCI A., DE SOLE P., MARTORANA G.E., CALLA C.: Alternations of energy metabolism and glutathione levels of HL-60 cells induced by methacrylates present in composite resins. *J. Dent.* 2007, 35, 187–194.
- [13] COSTA C.A.S., NASCIMENTO A.B.I., TEIXEIRA H.M.: Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent. Mater.* 2002, 18, 543–551.
- [14] POSTEK-STEFAŃSKA L.: Zgodność biologiczna materiałów kompozytowych i pośrednich systemów łączących w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Rozprawa habilitacyjna. Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001.
- [15] HANKS C.T., CRAIG R.G., DIEHL M.L., PASHLEY D.H.: Cytotoxicity of dental composite and other materials in a new *in vitro* device. *J. Oral Pathol. Med.* 1988, 17, 396–403.
- [16] BOUILLAGUET S., VIRGILLITO M., WATAHA J., CIUCCHI B., HOLZ J.: The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, *in vitro*. *J. Oral Rehabil.* 1998, 25, 45–51.
- [17] RATANASATHIEN W., WATAHA J.C., HANKS C.T., DENNISON J.B.: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J. Dent. Res.* 1995, 74, 1602–1606.
- [18] HANKS C.T., STRAWN S.E., WATAHA J.C., CRAIG R.G.: Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J. Dent. Res.* 1991, 70, 1450–1455.
- [19] WATAHA J.C., HANKS C.T., STRAWN S.E., FAT J.C.: Cytotoxicity of components of resin and other dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.* 1994, 21, 453–462.
- [20] YOSHII E.: Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates relationship of monomer structures and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 37, 4, 517–524.
- [21] PORTO J.C.C.M., OLIVEIRA D.C., RAELE R.A., RIBAS K.H.S., MONTES M.A.J.R., DE CASTRO C.M.M.B.: Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. *Dent. Mater.* 2011, 27, 221–228.

- [22] HUANG F.M., CHANG Y.: Cytotoxicity of dentin-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int. Endod. J.* 2002, 35, 905–909.
- [23] PASHLEY D.H.: Consideration of dentin permeability in cytotoxicity testing. *Int. Endod. J.* 1988, 21, 143–154.
- [24] CHEN R.S., LIN C.C., TSENG W.Y., JENG J.H., LIN C.P.: Cytotoxicity of three dentin bonding agents of human dental pulp cells. *J. Dent.* 2003, 31, 223–229.
- [25] LIN N.J., BAILEY L.O., BECKER M.L., WASHBURN N.R., HENETERSON L.A.: Macrophage response to methacrylate conversion using a gradient approach. *Acta Biomater.* 2007, 3, 163–173.
- [26] MILETIC V., SANTINI A., TRKULJA J.: Quantification of monomer elation and carbon-carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy. *J. Dent.* 2009, 37, 177–184.
- [27] TAY F.R., PASHLEY D.H.: Aggressiveness of contemporary self-etching systems I. Depth of penetration beyond smear layers. *Dent. Mater.* 2001, 17, 296–308.
- [28] CADENARO M., ANTONIOLLI F., SAURO S., TAY F.R., DI LEONARDA R., PRATI C.: Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur. J. Oral Sci.* 2005, 113, 525–530.
- [29] KOSTORYZ E.L., EICK J.D., CHAPPELOW C.C., GLAROS A.G., WETMORE L., YOURTEE D.M.: *In vitro* effect of light-cure dental adhesive on IL-6 release from LPS-stimulated and unstimulated macrophages. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003, 65, 89–94.
- [30] LEFEBVRE C.A., SCHUSTER G., RUEGGEGER F.A., TAMARESELYV K., KNEORSCHILD K.L.: Responses of oral epithelial cells to dental resin components. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1996, 7, 965–976.
- [31] KOSFORYZ E.L., SAMUELSEN J.T., HOLME J.A., BECHER R., KARLSSON S., MORISBAK E., DAHL J.E.: HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*. *Dent. Mater.* 2008, 24, 134–140.
- [32] HAMID A., HUME W.R.: A study of component release from resin pit and fissure sealant *in vitro*. *Dent. Mater.* 1997, 13, 98–102.
- [33] HAMID A., OKOMOTO A., IWAKA M., HUME W.R.: Component release from light-activated glass-ionomer and compomer cements. *J. Oral Rehabil.* 1998, 25, 94–99.
- [34] VOLK J., ZIEMAN C., LEYHAUSEN G., GEURSTEN W.: Non-irradiated camphorquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts. *Dent. Mater.* 2009, 22: doi 10.1016/j.dental.2009.07.009
- [35] RUEGGEGER F.A., MARGESON D.H.: The effects of oxygen inhibition on an unfilled /filled composite system. *J. Dent. Res.* 1990, 69, 1652–1698.

Adres do korespondencji:

Elżbieta Jodkowska
Zakład Stomatologii Zachowawczej IS WUM
tel.: 22 502 20 32
e-mail: e.jodkowska@gmail.com

Praca wpłynęła do Redakcji: 14.11.2011 r.
Po recenzji: 21.02.2012 r.
Zaakceptowano do druku: 27.03.2012 r.

Received: 14.11.2011
Revised: 21.02.2012
Accepted: 27.03.2012