

Citotoksičnost natrij-hipoklorita na kulturama stanica

Ivana Miletić¹
Alena Knežević¹
Ivica Anić¹
Maja Osmak²
Jozo Šutalo¹
Zita Blažić-Potočki³

¹Zavod za bolesti zubi,
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu,
Gundulićeva 5
10000 Zagreb

²Zavod za molekularnu
genetiku, Institut "Ruđer
Bošković", Bijenička cesta 54
10000 Zagreb

³Stomatološka poliklinika,
Perkovčeva 3
10000 Zagreb

Sažetak

Natrij-hipoklorit (NaOCl) najčešće je rabljena otopina za ispiranje i dezinfekciju tijekom obradbe korijenskoga kanala, unatoč činjenici da može iritirati periapeksno tkivo. Svrha ovoga rada bila je utvrditi citotoksičnost vodene otopine NaOCl na humanim (HeLa) stanicama karcinoma grlića maternice i mišjim (L929) fibroblastima. Ispitane su 0,5%, 1,0%, 2,5% i 5,25% koncentracije NaOCl. Ukupni broj stanica izbrojen je elektroničkim brojačem, a broj živih stanica izbrojen je pod svjetlosnim mikroskopom uz dodatak vitalne nigrosin boje. Najmanje promjene morfologije, broja i postotka živih stanica nađene su kod koncentracije 0,5%, a 5,25%-tna koncentracija uzrokovala je potpuni gubitak HeLa i L929 stanica. Utvrđena je statistički vjerodostojna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih koncentracija NaOCl i kontrolne skupine. Između 1,0% i 2,5% NaOCl razlika u toksičnosti nije bila vjerodostojna za obje stanične linije ($p < 0,05$).

Ključne riječi: natrij-hipoklorit, kultura stanica, citotoksičnost

Acta Stomatol Croat
1999; 25—29

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 21. svibnja 1998.

Adresa za dopisivanje:

Ivana Miletić
Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5
10000 Zagreb

Uvod

Svrha je endodontskoga liječenja potpuno odstraniti pulpno tkivo, bakterije i njihove metaboličke produkte te inficirani dentin kako bi se oblikovao prostor i ispunio umjetnim materijalima. Za uspješan zahvat nije dostatna samo mehanička instrumentacija nego je nužno rabiti i sredstva za kemijsku obradu endodontskoga prostora koja odstranjuju sadržaj u korijenskome kanalu:

- fizički (ispiranjem) - protokom kroz kanal tekućina otplavljuje nakupljeni sadržaj,
- kemijski (razgradnjom organskih sastojaka, otapanjem anorganskih, uništavanjem mikroorganizama ili dezinfekcijom) (1,2).

Koliko će pojedino sredstvo biti djelotvorno u fizičkom odstranjivanju nečistoća iz kanala ovisi o (2,3,4):

- proširenosti korijenskoga kanala,

- o veličini i položaju igle za ispiranje u kanalu,
- o količini tekućine za ispiranje.

Za kemijsku obradu danas se najčešće rabi vodena otopina natrij-hipoklorita (NaOCl). Iako ga je u kliničku praksu uveo Walker 1936. godine, ime mu se spominje već godine 1920. kada je opisana uporaba Dakinsove otopine (0,55%-tne otopine natrij-hipoklorita) (5). Kemijsko odstranjivanje organskoga tkiva NaOCl temelji se na otpuštanju hipoklorne kiseline koja reagira s netopljivim proteinima, tvoreći topljive polipeptide, aminokiseline i druge sporedne proizvode (6). Djelotvorne koncentracije NaOCl su od 2,6 do 5,25% (7).

Svrha ovoga rada bila je odrediti citotoksični učinak 0,5%, 1,0%, 2,5% i 5,25%-tne koncentracije NaOCl na rast humanih stanica karcinoma grlića maternice (HeLa) i mišjih fibroblasta (L929).

Materijali i postupak

Kultura stanica

U radu su rabljene HeLa i L929 stanice. Stanice su održavane kao jednoslojna kultura u hranjivu mediju po Eaglu (DMEM) obogaćenom s 10% fetalnoga seruma i antibioticima (100 IU/ml penicilina i 50g/ml streptomicina) na 37°C i 5% CO₂.

Ispitivani materijal

Testiran je citotoksični učinak NaOCl. Natrij-hipoklorit je kao 13%-tna vodena otopina steriliziran neposredno prije uporabe propuštanjem kroz filter (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA) s porama promjera 0,22 μm.

Pokus

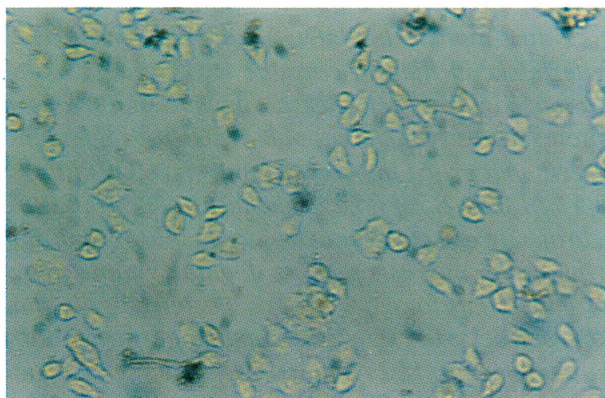
Stanice su nasađene na pločicu s 24 bunarića (3x10⁴ stanica/ 1 ml medija). Natrij-hipoklorit je razrijeđen u mediju i u svaki je bunarić dodan 1 ml otopine NaOCl-a u koncentraciji od 0,5%, 1,0%, 2,5% i 5,25%. Hranjiv medij (1ml) dodan je u uzorke kao kontrolna skupina. Za svaku ispitivanu koncentraciju nasađena su 4 bunarića. Stanice su pohranjene u termostat na 37° C tijekom 24 sata. Elektroničkim brojačem utvrđen je ukupan broj stanica. Broj živih stanica izbrojen je pod svjetlosnim mikroskopom uz dodatak nigrosin boje, koja ne ulazi u žive stanice. Za svaku eksperimentalnu točku iz-

brojeno je 100 stanica. Postotak živih stanica izračunat je formulom: $\% = (A/B) \times 100$, gdje je "A" broj živih stanica u eksperimentalnom bunariću, a "B" je broj živih stanica u kontrolnoj skupini. Eksperiment je ponovljen dva puta.

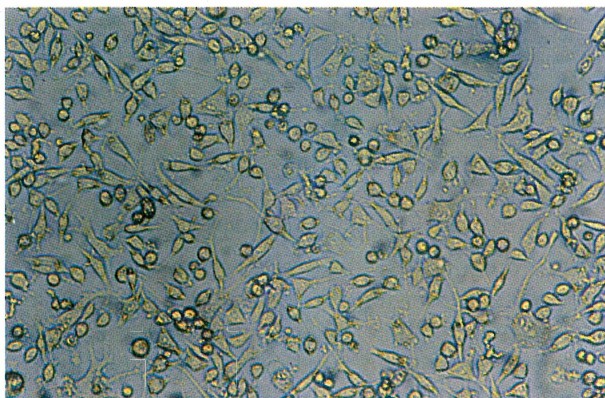
Rezultati

Morfologija stanica

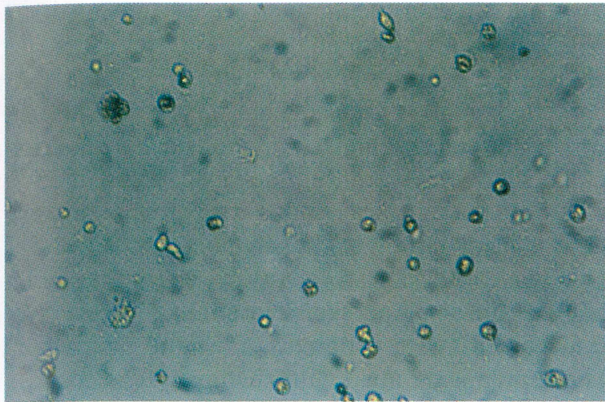
HeLa i L929 stanice kontrolne skupine sačuvale su normalnu morfologiju (Slike 1 i 2). U eksperimentalnim bunarićima s ispitivanim koncentracijama NaOCl stanice su mijenjale oblik, odljepljivale se s podloge i postale okruglaste (Slika 3). S manjom koncentracijom stanice su pokazivale manje morfološke promjene.



Slika 1. HeLa stanice kontrolne skupine, povećanje x6
Figure 1. HeLa cells of control group, magnification x6



Slika 2. L929 stanice kontrolne skupine, povećanje x6
Figure 2. L929 cells of control group, photomicrograph x6



Slika 3. Izgled stanica nakon djelovanja ispitivanih koncentracija natrij-hipoklorita, povećanje $\times 6$

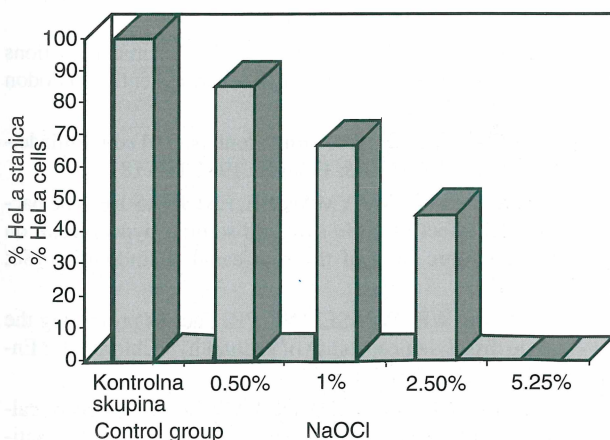
Figure 3. Cells morphology after activity of tested sodium hypochlorite concentration, photomicrograph $\times 6$

Broj stanica

Ukupan broj HeLa i L929 stanica za 0,5%, 1,0%, 2,5% NaOCl prikazan je u Tablici 1. Za obje stanične linije ukupan broj stanica za 5,25% koncentraciju NaOCl nije utvrđen zbog taloženja otopine u mediju. Za statističku raščlambu rabljen je Student *t*-test. Utvrđena je statistički vjerodostojna razlika ($p < 0.05$) između ispitivanih koncentracija NaOCl i kontrolne skupine i između 0,5% NaOCl u usporedbi s 1,0% i 2,5% koncentracijama za HeLa i L929 stanice. Između rezultata za NaOCl 1.0% i 2.5% koncentracije nije zabilježena statistički vjerodostojna razlika ($p < 0,05$) za obje stanične linije.

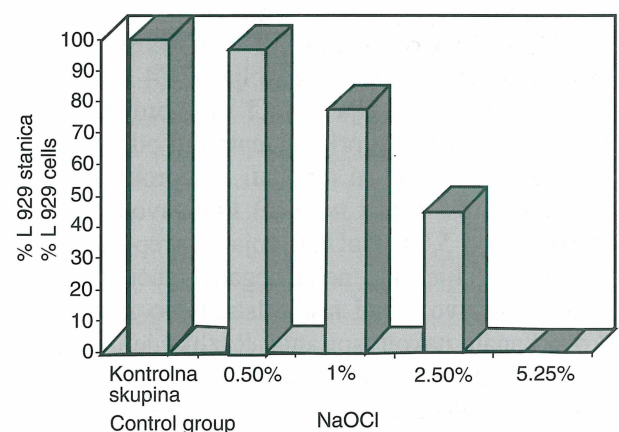
Tablica 1. Srednje vrijednosti i standardne devijacije ukupnoga broja HeLa i L929 stanica za ispitivane koncentracije Na-hipoklorita
Table 1. Mean values and standard deviation for total cell number of HeLa and L929 cell for tested concentration of sodium hypochlorite

Ispitivane koncentracije Na-hipoklorita	HeLa stanice HeLa cells		L929 stanice L929 cells	
	Srednja vrijednost Mean values	Standardna devijacija (SD) Standard deviation	Srednja vrijednost Mean values	Standardna devijacija (SD) Standard deviation
0,50%	$2,29 \times 10^4$	$0,36 \times 10^4$	$2,69 \times 10^4$	$0,25 \times 10^4$
1,0%	$0,52 \times 10^4$	$0,09 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	$0,61 \times 10^4$
2,50%	$0,36 \times 10^4$	$0,02 \times 10^4$	$0,50 \times 10^4$	$0,97 \times 10^4$
kontrolna skupina - control group	$6,77 \times 10^4$	$0,09 \times 10^4$	$5,30 \times 10^4$	$0,64 \times 10^4$



Slika 4. Postotak živih HeLa stanica nakon djelovanja ispitivanih koncentracija natrij-hipoklorita

Figure 4. The effect of tested concentration of sodium hypochlorite on viability of HeLa cells expressed in percentage



Slika 5. Postotak živih L929 stanica nakon djelovanja ispitivanih koncentracija natrij-hipoklorita

Figure 5. The effect of tested concentration of sodium hypochlorite on viability of L929 cells expressed in percentage

Žive stanice

Najveći postotak živih stanica utvrđen je kod najmanje koncentracije NaOCl (0.5%) za HeLa i L929 stanice. Postotak se smanjivao s porastom koncentracije NaOCl (Slike 4 i 5). Za 5,25% koncentraciju obje stanične linije nisu imale ni jednu živu stanicu.

Rasprava

Idealno sredstvo za ispiranje korijenskoga kanala trebalo bi djelovati antimikrobno te otapati organske i anorganske ostataka (8). Jedno od njih je natrijev-hipoklorit, za koji u literaturi nalazimo različite, često nedovoljno jasne podatke o djelovanju. Sposobnost NaOCl da otapa pulpno tkivo poznata je i predočena u prijašnjim istraživanjima (9,10). Natrij-hipoklorit podmazuje tijekom instrumentacije i otplavljuje strugotine iz korijenskoga kanala. Djeluje antibakterijski s mogućnošću detoksikacije endodontskoga prostora (11,6). Glavni je nedostatak NaOCl što uzrokuje koroziju (12) i djeluje citotoksično ako se injicira u periapeksno tkivo (13). Pashley i sur. (14) istaknuli su da djelovanje NaOCl nije ograničeno samo na nekrotično tkivo nego da kao kaustik djeluje citotoksično na sve stanice osim na stanice keratiniziranog epitela. Spanberg i sur. (15) ustanovili su da su koncentracije iznad 0,5% toksične te preporučuju koncentraciju do 1,0% da bi se održao antibakterijski učinak uz najnižu granicu toksičnosti. Rezultati naše studije pokazuju da je NaOCl citotoksičan *in vitro*. Najviša rabljena koncentracija (5,25%) ubija sve stanice tijekom inkubacijskoga razdoblja od 24 sata. Smanjivanjem koncentracija NaOCl raste broj živih stanica, kojih je najviše pri koncentraciji od 0,5% NaOCl. Međutim, ovi su rezultati u suprotnosti s rezultatima Grossmana i sur. (16). Oni navode da koncentracija od 5,0% NaOCl, koja se preporučuje za endodontsko liječenje, nema negativan učinak na periapeksno tkivo i kad nije odstranjeno iz korijenskoga kanala nakon ispiranja. Razlika je u rezultatima zato što je u ovom ispitivanju rabljen model *in vitro*, a Grossmanovi su rezultati dobiveni u *in vivo* uvjetima. Çalt i sur. (17) proučavali su *in vitro* citotoksičnost Tubulicid Plus, NaOCl i EDTA kao sredstva za ispiranje na *Vero* stanicama (afrički zeleni majmuni) određujući broj živih stanica. Ustanovili su toksično djelovanje 5,25% NaOCl, što je

u skladu s našim rezultatima, jer je 5,25% NaOCl pokazao najjače toksično djelovanje. Hegggers i sur. (18) su temeljem *in vivo* i *in vitro* ispitivanja antibakterijskoga i citotoksičnog djelovanja NaOCl utvrdili da 0,025% NaOCl nije toksičan uz bakterioidno djelovanje. Koncentracija od 0,25% bila je toksična što odgovara rezultatima našeg ispitivanja, gdje je najniža rabljena koncentracija od 1,0% NaOCl bila citotoksična uz statistički vjerodostojnu razliku u odnosu prema prema kontrolnoj skupini. No, 0,5% NaOCl je u usporedbi s ostalim ispitivanim koncentracijama imao najniži stupanj toksičnosti.

Iz brojnih kliničkih i eksperimentalnih istraživanja, kao i iz ovoga rada, proizlazi da NaOCl uz bakterioidno ima i citotoksično djelovanje.

Literatura

1. GEORGOPOULU M, KONTAKIOTIS E, NAKOU M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J* 1994; 27:139-143.
2. STANIČIĆ T. Kemijska obrada korijenskoga kanala. *Acta Stomatol Croat* 1993; 27:281-288.
3. BAUMGARTNER JC, CUENIN PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endodon* 1992; 18:605-12.
4. BARBOSA SV, SAFAVI KE, SPÄNGBERG SW. Influence of sodium hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. *Int Endod J* 1994; 27:309-312.
5. ÇALISKAN MK, TÜRKÜN M, ALPER S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endod J* 1994; 27:163-167.
6. BAUMGARTNER JC, IBAY AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endodon* 1987; 13:47-51.
7. INGLE JI, TAINTOR JF. *Endodontics*, 3rd edn. Philadelphia, PA, USA: Lea & Febiger, 1985:180-181.
8. NIKOLAUS BE, WAYMAN BE, ENCINAS EE. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the root canal. *J Endodon* 1988; 14:31-34.
9. MOORER WR, WESSELINK PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982; 15:187-196.
10. HASSELGREN G, OLSONN B, CVEK M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endodon* 1988; 14:125-127.
11. CHEUNG GSP, STOCK CJR. *In vitro* cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonic. *Int Endod J* 1993; 26:334-343.

12. NEAL RG, CRAIG RG, POWERS JM. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *J Endodon* 1983; 9:93-96.
13. SABALA CL, POWELL SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissue. *J Endodon* 1989; 15:490-492.
14. PASHLEY EL, BRIDSONG NL, BOWMAN K, PASHLEY DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endodon* 1985; 11:525-528.
15. SPANGBERG L, ENGSTROM B, LANGELAND K. Biological effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptic *in vitro*. *Oral Surg* 1973; 36:856-871.
16. GROSSMAN L, OLIET S, DEL RIO CE. *Endodontice Practice*, Philadelphia, PA, USA: Lea & Febiger, 1988:188.
17. ÇALT S, ARIKAN S, SEHRI K. An evaluation of cytotoxic effects of NaOCl, EDTA and Tubulicid Plus. The 7 th Biennial Congress 1995, Abstract pp.10.
18. HEGGERS JP, SAZY AJ, STENBERG BD, STROCK LL, McCAULEY RL, HERNON DN, ROBSON MC. Bacterial and wound-healing properties of sodium-hypochlorite solutions. The 1991 Lindeberg Award. *J Burn Care Rehabil* 1991; 12:420-424.

The Cytotoxic Effect of Sodium Hypochlorite on Cell Cultures

Ivana Miletić¹
Alena Knežević¹
Ivica Anić¹
Maja Osmak²
Jozo Šutalo¹
Zita Blažić-Potočki³

¹Department of Dental Pathology, School of Dental Medicine University of Zagreb, Gundulićeva 5 10000 Zagreb

²Department of Molecular Genetics, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54 10000 Zagreb

³Stomatological polyclinic, Perkovičeva 3, 10000 Zagreb

Acta Stomatol Croat
1999; 31—33

ORIGINAL SCIENTIFIC
PAPER

Received: May 21, 1998

Address for correspondence:

Ivana Miletić
Department of Dental Pathology
School of Dental Medicine
University of Zagreb
Gundulićeva 5
10 000 Zagreb

Summary

Sodium hypochlorite (NaOCl) is the most popular irrigation solution used in root canal treatment, in spite of the fact that it may irritate the vital tissues. This study was designed to evaluate the cytotoxic effect of a water solution of sodium hypochlorite on cultures of human cervical carcinoma HeLa cells and mouse L929 fibroblasts by determining the number of vital cells. The tested concentrations of 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.25% were prepared in Eagle's growth medium. The number of cells was counted by electronic counter while the number of viable cells was determined, after the addition of nigrosin dye, by a light microscope. Concentration of 0.5% NaOCl caused the least changes in morphology, number and percentage of viable cells while 5.25% concentration caused total loss of HeLa and L929 cells. All tested concentrations were cytotoxic with significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group. However, the results showed that there was no significant difference between 1.0% and 2.5% concentration of NaOCl for both cell lines ($p < 0.05$).

Key words: sodium hypochlorite, cell culture, cytotoxicity

Introduction

Endodontic therapy includes total removal of pulp tissue, bacteria and its metabolic products to form adequate space for root canal fillings. For successful treatment apart from mechanical instrumentation of the root canal, it is necessary to use solutions for chemical treatment of the endodontic space which remove the substance in the root canal:

- physically (irrigation) - the solution flushes out the debris from the root canal
- chemically (disintegrating organic, dissolving anorganic consist, destroying the microorganisms or by disinfection) (1,2).

How some solution efficacy in physical debriement in the root canal depend on (2,3,4):

- enlargement of root canal

- size and position of needle for irrigation in root canal
- amount of fluid for irrigation

For chemical debridement the water solution of sodium hypochlorite (NaOCl) is the most often used today. In 1920 the use of Dakin's solution was described (a 0.55% sodium hypochlorite solution) and in 1936 Walker introduced it in clinical practice (5).

The chemical removal of organic tissue by NaOCl is based on the release of hypochlorous acid which reacts with insoluble proteins, forming soluble polypeptides, amino acids and other by-products (6). Effective concentrations of NaOCl range from 2.6 to 5.25% (7).

The aim of this study was to determine cytotoxic effects of 0.5%, 1.0%, 2.5% and 5.25% concentration of NaOCl on the growth of human cervical carcinoma (HeLa) cells and mouse (L929) fibroblasts.

Material and methods

Test cells

The cell lines used in this experiment were HeLa and L929 cells. Cells were maintained as a monolayer culture at 37°C, under 5% CO₂ in Eagle's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 50 g/ml streptomycin).

Tested material

In this study the cytotoxic effect of NaOCl was determined. Sodium hypochlorite as a 13% solution in water was sterilized just before use, by filter (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA) with diameter of 0.22 µm.

Cytotoxicity study

The 3x10⁴ cells/ 1ml of the growth medium were plated in 24 wells plate. Sodium hypochlorite was diluted in the growth medium and added (1 ml) to each wells plate in the final concentration of 0.5%, 1%, 2.5% and 5.25%. In control samples, only the growth medium was added (1 ml). For each experimental point four wells were prepared. The cultures were incubated for 24 hours at 37°C. Thereafter

total cell numbers were counted by electronic counter. The number of viable cells was determined under a light microscope, using nigrosin dye, which was excluded from viable cells. For each experimental point at least 100 cells were examined. The number of viable cells was calculated using the following formula: % = (A/B) x 100 where "A" is the number of viable cells in the experimental wells and "B" is the number of viable cells in the control wells. The experiment was repeated twice.

Results

Cell morphology

HeLa and L929 cells for control groups showed normal morphology (Figures 1 and 2). In the experiment wells with different concentrations of NaOCl the cells changed in shape, becoming swollen and rounded (Figure 3). With decreasing concentrations the cells appeared to be more normal.

Cell number

The total cell number of HeLa and L929 cells for 0.5%, 1.0%, 2.5% are demonstrated in Table 1. For both cell types the total cell number for 5.25% concentration of NaOCl was not measured because of the many dissolved parts. Statistical analysis of data was obtained by Student's *t*-test. Statistical significant difference was determined (p<0.05) between all the tested concentrations and samples of the control group and between 0.5% NaOCl compared with 1.0% and 2.5% concentration for HeLa and L929 cells. There was no significant difference between 1.0% and 2.5% concentration of NaOCl (p<0.05) for both cell lines.

Viable cells

The best results were obtained for the lowest concentration for HeLa and L929 cells. The percentage decreased with the concentration (Figures 4 and 5). For 5.25% concentration of NaOCl both cell lines were dead.

Discussion

The ideal irrigant should combine antimicrobial activity and the capacity to dissolve organic and