

1. Βιοσυμβατότητα των οδοντιατρικών υλικών

Η κλινική επιτυχία μιας έμφραξης, εκτός των άλλων, εξαρτάται από την κατάλληλη επιλογή εμφρακτικού υλικού, η οποία βασίζεται στη γνώση των ιδιοτήτων του, στον βέλτιστο (κατάλληλο) σχεδιασμό της έμφραξης, καθώς και στη γνώση του πώς αντιδρά το συγκεκριμένο υλικό με το βιολογικό περιβάλλον του.

Ως **βιοσυμβατότητα** ορίζεται η ικανότητα ενός υλικού να αποκρίνεται βιολογικά σε δεδομένη εφαρμογή του στον οργανισμό (Wataha 2003). Ως απόρροια αυτού του ορισμού, ένα υλικό δεν μπορεί να είναι βιολογικώς αποδεκτό, για κάθε εφαρμογή. Το εάν ένα υλικό χαρακτηρίζεται βιοσυμβατό ή όχι, εξαρτάται άμεσα από τη φυσική λειτουργία για την οποία προορίζεται, καθώς και από την προσδοκώμενη βιολογική ανταπόκριση. Συνεπώς, η βιοσυμβατότητα είναι μια ιδιότητα που αφορά την αλληλεπίδραση ενός υλικού με το περιβάλλον του. Μια δεδομένη βιολογική ανταπόκριση, λοιπόν, μπορεί να αλλάξει σε περίπτωση που αλλάξει ο ξενιστής, η εφαρμογή του υλικού, ή το ίδιο το υλικό.

1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Τα οδοντιατρικά υλικά αποτελούν μια ανομοιογενή ομάδα συνθετικών και φυσικών υλικών, και μπορούν να διαχωρισθούν σε: Κράματα, Πολυμερή, Κεραμικά υλικά, Κονίες, Φυράματα, Κεριά, Προϊόντα γύψου.

Κάθε υλικό που τοποθετείται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό ενός ιστού έχει σαν αποτέλεσμα να επιδρά σε άλλοτε άλλο βαθμό στον ιστό αυτό. Αντίστοιχη επίδραση όμως ασκείται και από τον ιστό στο υλικό. Συνεπώς, κατά τη βιολογική συμπεριφορά των υλικών υφίσταται η αμφίδρομη επίδραση:

ΥΛΙΚΟΥ → ← ΙΣΤΟΥ

Απαραίτητη προϋπόθεση για την κατά το δυνατόν ορθή χρήση των οδοντιατρικών υλικών και για τον περιορισμό των κινδύνων που συνεπάγεται η χρήση τους είναι η γνώση των βιολογικών ιδιοτήτων των υλικών από τον οδοντίατρο (Wataha 2001).

Βιολογικές ιδιότητες είναι όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά ενός υλικού που μπορεί να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα, ευνοϊκά ή δυσμενώς, την υγεία μέρους ή όλου του οργανισμού.

Προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δράση των διαφόρων οδοντιατρικών υλικών, τα υλικά πρέπει να υποστούν μεγάλη σειρά **βιολογικών δοκιμασιών (biological tests)** (ADA 1979, ADA 1982, ISO 1993, AAMI 1994). Τα οδοντιατρικά υλικά θα πρέπει να υποβάλλονται σε σειρά βιολογικών δοκιμασιών ανάλογα με το πεδίο της κλινικής τους εφαρμογής. Συνεπώς, η μέτρηση της βιοσυμβατότητας γίνεται με βιολογικές δοκιμασίες (biological tests) οι οποίες διακρίνονται σε: In vitro tests, Animals tests, Usage tests (έρευνες χρήσης), που μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε ζώα είτε σε ανθρώπους.

1.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

1.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μέτρηση της βιοσυμβατότητας ενός υλικού

Η λειτουργία ή η χρησιμοποίηση ενός υλικού στο σώμα μας εξαρτάται σημαντικά από τη φύση της βιολογικής του ανταπόκρισης. Υπάρχουν πάρα πολλοί παράγοντες που θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν κατά τη μέτρηση της βιοσυμβατότητας ενός υλικού. **Πρώτα απ' όλα, η θέση στην οποία θα τοποθετηθεί το υλικό είναι πολύ σημαντική για το σύνολο των βιολογικών του ανταποκρίσεων** (Wataha 2002). Το υλικό θα περιβάλλεται από μαλακούς ή σκληρούς ιστούς, θα επεκτείνεται εξωτερικά στο στοματικό επιθήλιο ή θα προχωρά βαθύτερα όπως ένα ενδοοστικό εμφύτευμα; Το υλικό θα εκτίθεται άμεσα σε οστούν, ιστικό υγρό, αίμα, σάλιο, ή θα υπάρχει ένα είδος φραγμού, όπως π.χ. αδαμαντίνης ή οδοντίνης, μεταξύ του υλικού και των ζωντανών κυττάρων; Όλοι αυτοί οι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική ανταπόκριση ενός υλικού. Γενικά, υλικά τα οποία διεισδύουν στο επιθήλιο ή τοποθετούνται κάτω από αυτό χρειάζονται μεγαλύτερη διερεύνηση και λεπτομερέστερη εξέταση από άλλα αντίστοιχα τα οποία δεν διαπερνούν το επιθήλιο. Παρομοίως, υλικά τα οποία διαπερνούν την αδαμαντίνη απαιτούν μεγαλύτερη διερεύνηση και λεπτομερέστερη εξέταση από αντίστοιχα τα οποία δεν τη διαπερνούν.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στη βιολογική ανταπόκριση ενός υλικού είναι η διάρκεια παραμονής του υλικού στο σώμα μας (Wataha 2002). Υλικά όπως π.χ. τα αποτυπωτικά υλικά τα οποία παραμένουν στο στόμα μόνο για 4-6 λεπτά έχουν διαφορετική βιολογική ανταπόκριση σε σχέση με άλλα υλικά τα οποία θα παραμείνουν στο στόμα για 10 χρόνια. Για παράδειγμα, ένα αποτυπωτικό υλικό που παραμένει στο στόμα μόνο για λίγα λεπτά ενδέχεται να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση σε ένα ιδιαίτερα αλλεργικό άτομο, αλλά η μικρή διάρκεια παραμονής του στο στόμα περιορίζει τοξικές ή μεταλλακτικές αντιδράσεις. Ένας χάλκινος δακτύλιος ο οποίος πολλές φορές μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνητό τοίχωμα για μια μεγάλη έμφραξη αμαλγάματος είναι απίθανο να προκαλέσει βιολογική αντίδραση όταν θα παραμείνει μόνο για 5-10 λεπτά, αλλά θα μπορούσε να δημιουργήσει μια σοβαρή φλεγμονώδη αντίδραση εάν παρέμενε για μερικές εβδομάδες. Η διάρκεια της παρουσίας ενός υλικού είναι πολύ σημαντικός παράγοντας, διότι πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του σώματος και των υλικών χρειάζονται κάπως μεγαλύτερο χρόνο για να εμφανισθούν. Γενικά, οι πιο αυστηρές δοκιμασίες (tests) μέτρησης της βιοσυμβατότητας προϋποθέτουν όσο το δυνατό μακρύτερους χρόνους. Η μακρά διάρκεια παραμονής των υλικών στο στόμα δίνει τη δυνατότητα στο υλικό να επηρεάσει τον οργανισμό μας, και ο οργανισμός μας να επηρεάσει το υλικό με πολυσύνθετους τρόπους.

Ένας άλλος παράγοντας επίσης πολύ σημαντικός για τη βιολογική ανταπόκριση ενός υλικού είναι γενικά οι τάσεις οι οποίες ασκούνται στο υλικό (Wataha 2002). Οι τάσεις αυτές μπορεί να είναι φυσικής, χημικής, ή θερμοκικής φύσεως. Για παράδειγμα, ένα υλικό μπορεί να συμπεριφέρεται ανεπιθύμητα εάν είναι ιδιαίτερα αδύνατο στην αντοχή στη θλίψη, ή μαλακό, με αποτέλεσμα να παραμορφώνεται ή να αποτριβεται υφιστάμενο τις δυνάμεις της μάσησης. Ενδέχεται επίσης, να αντιδρά δυσμενώς με τις πρωτεΐνες του σάλιου, με αποτέλεσμα είτε την εκφύλιση ή αλλοίωσή του, είτε αυτό να γίνεται εύκαμπτο στη θερμοκρασία του στόματος, κάτι που έχει ως τελική συνέπεια την αύξηση της αποσύνθεσής του. Οι μέθοδοι μέτρησης της βιοσυμβατότητας εξελίσσονται, καθώς όλο και περισσότερα στοιχεία γίνονται γνωστά για την αλληλεπίδραση οδοντικών ιστών και υλικών (Bergman 2000), ενώ εξελίσσεται και η τεχνολογία που υποστηρίζει τις δοκιμασίες (ADA 1982, ISO 1993, Barile 1994).

1.2.2. Τύποι δοκιμασιών

Στο παρελθόν, η δοκιμασία βιοσυμβατότητας γινόταν απλώς κατά την εφαρμογή του υλικού στον άνθρωπο. Σήμερα όμως, όπως προαναφέραμε, προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δράση των διαφόρων οδοντιατρικών υλικών, τα υλικά πρέπει να υποστούν μεγάλη **σειρά βιολογικών δοκιμασιών (biological tests)**. Έτσι, η μέτρηση της βιοσυμβατότητας γίνεται με βιολογικές δοκιμασίες οι οποίες διακρίνονται σε: In vitro tests, Animals tests, Usage tests (έρευνες χρήσης), που μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε ζώα είτε σε ανθρώπους. Στους τρεις αυτούς τύπους δοκιμασιών ανήκει και η κλινική μελέτη, που στην ουσία αποτελεί έρευνα χρήσης σε ανθρώπους.

Κάθε μια από αυτές τις δοκιμασίες έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και κάθε μια χρησιμοποιείται ως ένα βαθμό για να αξιολογηθεί κάθε υλικό πριν βγει στην αγορά. Θα πρέπει να τονισθεί ότι καμιά μεμονωμένη βιολογική δοκιμασία δεν μπορεί να εκτιμήσει επακριβώς τη βιολογική ανταπόκριση ενός υλικού, και είναι απαραίτητη η εφαρμογή και των τριών τύπων δοκιμασιών, ασχέτως του εάν πολλές φορές τα αποτελέσματά τους είναι ιδιαιτέρως αμφισβητήσιμα.

1.3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ IN VITRO (IN VITRO TESTS)

Οι δοκιμασίες in vitro λαμβάνουν χώρα εκτός ζωντανού οργανισμού, σε δοκιμαστικό σωλήνα ή τρυβλίο. Ιστορικά, τα in vitro tests έχουν χρησιμοποιηθεί στον ρόλο του αρχικού βιολογικού ελέγχου (screening test) για την εκτίμηση της βιοσυμβατότητας ενός υλικού (Browne & Tyas 1979). Σε αυτά τα test, ένα υλικό ή συστατικά ενός υλικού τοποθετούνται σε επαφή με κύτταρο, ένζυμο ή απομονωμένο βιολογικό σύστημα. Το βιολογικό σύστημα μπορεί να είναι κύτταρα θηλαστικών, κυτταρικά όργανα, ιστοί, ή ένζυμα (Hanks και συν. 1996). Η επαφή μπορεί να είναι είτε **άμεση**, είτε **έμμεση**, με τη διαμεσολάβηση κάποιου φραγμού. Επιπρόσθετα, τα άμεσα in vitro test μπορούν να υποδιαιρεθούν σε αυτά στα οποία το υλικό βρίσκεται σε φυσική επαφή με το κύτταρο και σε αυτά στα οποία κάποιο συστατικό του υλικού επιδρά στο σύστημα του κυττάρου. Στα έμμεσα in vitro test ο φραγμός μπορεί να είναι το άγαρ, κάποια μεμβράνη, ή η οδοντίνη.

Σε γενικές γραμμές οι δοκιμασίες in vitro μπορούν να υποδιαιρεθούν σε αυτές που μετρούν κυτταροτοξικότητα ή κυτταρική ανάπτυξη, σε αυτές που μετρούν κάποια μεταβολική ή άλλη κυτταρική λειτουργία, και σε αυτές που μελετούν τη μεταλλαξιγόνο δράση ενός υλικού στα κύτταρα. Σαφή όρια μεταξύ αυτών των κατηγοριών δεν υφίστανται.

Οι δοκιμασίες *in vitro* εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των δοκιμασιών σε πειραματόζωα και των δοκιμασιών χρήσης. Στα πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγεται το ότι είναι απλές, έχουν χαμηλό κόστος, δεν είναι χρονοβόρες, είναι αναπαραγωγίμες, είναι δυνατή η τυποποίηση τους, καθώς και το ότι με αυτές περιορίζεται η χρήση ζώων (Browne 1985). Επιπλέον, προσαρμόζονται σε μεγάλης κλίμακας διαδικασίες διαλογής (large scale screening) και έχουν το πρόσθετο πλεονέκτημα του εύκολου ελέγχου των πειραματικών συνθηκών. Το γεγονός ότι μπορούν να ελεγχθούν οι συνθήκες διεξαγωγής τους –με μεγάλη ακρίβεια, χωρίς να επηρεάζονται από παραμέτρους άμεσα σχετιζόμενες με τα *in vivo* πειράματα– δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής αποτελεσμάτων πολύ υψηλής επιστημονικής ακρίβειας (Spångberg 1990). Ως μειονέκτημά τους αναφέρεται η αμφίβολη αντιστοιχία τους με την *in vivo* εφαρμογή του υλικού. Άλλα μειονεκτήματα που παρουσιάζονται στο περιβάλλον των *in vitro* δοκιμασιών είναι η έλλειψη του πολύπλοκου συντονισμού των διαφόρων συστημάτων που απαντούν σε έναν οργανισμό, όπως το ανοσοποιητικό και το κυκλοφορικό σύστημα (Browne 1988). Πρέπει να τονιστεί ότι οι *in vitro* δοκιμασίες δεν επαρκούν για να καλύψουν τη συνολική βιοσυμβατότητα ενός υλικού.

Η τυποποίηση των *in vitro* δοκιμασιών είναι πρωταρχικής σημασίας κατά την αξιολόγηση των υλικών.

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι καλλιέργειας κυττάρων και ιστών *in vitro*:

- 1) **Καλλιέργεια ιστού** (tissue culture). Η καλλιέργεια ιστού πρωτοεμφανίστηκε το 1926 (Strangeways & Fell 1926) και, μόνο μετά από 30 χρόνια χρησιμοποιήθηκε σαν τεχνική για τον έλεγχο της τοξικότητας διαφόρων συνθετικών υλικών. Κατ' αυτήν, ένα τεμάχιο απομονωθέντος ιστού αναπτύσσεται σε συνθήκες που εξασφαλίζουν τη διατήρηση της δομής του, χωρίς να προηγείται αποδόμηση της μεσοκυττάριας ουσίας και των μεσοκυττάρων δεσμών (Kawahara και συν. 1968). Το ιστοτεμάχιο αφήνεται να αναπτυχθεί ολόκληρο σε θρεπτικό υλικό.
- 2) **Καλλιέργεια οργάνου** (organ culture). Διάφοροι ερευνητές άρχισαν να τη χρησιμοποιούν σαν τεχνική στις δεκαετίες του 1950 και 1960 για τον έλεγχο της τοξικότητας των ελαστικών και των πλαστικών σε εμβρυικό ιστό όρνιθας (Cruickshank και συν. 1960). Είναι η πιο πολύπλοκη μορφή καλλιέργειας και αυτή που χρησιμοποιείται λιγότερο. Κατ' αυτήν επιτυγχάνεται η καλλιέργεια διαφόρων ιστικών τύπων οι οποίοι προέρχονται από ένα τεμάχιο οργάνου. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η διατήρηση της ανατομο-βιολογικής σχέσης μεταξύ των διαφόρων κυτταρι-

κών τύπων που αλληλεπιδρούν στο συγκεκριμένο όργανο. Οι πιο συνηθεις έλεγχοι πραγματοποιούνται σε τμήματα οργάνων από έμβryo ανθρώπου ή όρνιθας.

- 3) **Κυτταρική καλλιέργεια** (cell culture). Είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή καλλιέργειας και αφορά την καλλιέργεια ενός μόνο τύπου κυττάρων προερχομένων από έναν ιστό (Mjör και συν. 1977). Οι κυτταρικές καλλιέργειες διακρίνονται: Α) σε καλλιέργειες κυττάρων σε εναιώρημα (cell suspension culture) για βραχυπρόθεσμες παρατηρήσεις (4-24 ώρες), ή μεσοπρόθεσμες (4-7 ημέρες). Β) σε καλλιέργειες κυττάρων σε μονοστιβάδα (cell monolayer culture). Η τεχνική αυτή αποτελεί τον ευρύτερα χρησιμοποιούμενο τρόπο καλλιέργειας *in vitro*, διότι απαιτεί μικρότερο αριθμό κυττάρων, παρέχει τη δυνατότητα λεπτομερών παρατηρήσεων και επιτρέπει την αυτοματοποίηση της έρευνας (Wilson 1986). Οι τύποι των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες *in vitro* διακρίνονται σε:

α) διπλοειδικές κυτταρικές σειρές (primary cell lines), οι οποίες λαμβάνονται απευθείας από καλλιέργεια τεμαχίων ιστών, όπως ουλικούς ινοβλάστες (Fujisawa και συν. 1999), ινοβλάστες περιοδοντικού συνδέσμου (Al Nazhan & Spångberg 1990), πολφικούς ινοβλάστες (Pissiotis & Spångberg 1991). Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται για μικρό χρονικό διάστημα –δηλ. έχουν πεπερασμένη διάρκεια ζωής– με σχετικά αργό ρυθμό, στις κυτταρικές καλλιέργειες, αλλά μπορούν να διατηρηθούν πολλά από τα χαρακτηριστικά των *in vivo* κυττάρων. Στις διπλοειδικές κυτταρικές σειρές, το 75% των κυττάρων παρουσιάζουν τον ίδιο καρύοτυπο με τα φυσιολογικά κύτταρα από τα οποία προήλθε η κυτταρική σειρά.

β) ανευπλοειδικές κυτταρικές σειρές (established cell lines ή continuous cell lines), οι οποίες είναι διπλοειδικές κυτταρικές σειρές που έχουν τροποποιηθεί έτσι ώστε να μπορούν να αναπτυχθούν περισσότερο ή λιγότερο απεριόριστα σε καλλιέργεια. Στις ανευπλοειδικές κυτταρικές σειρές, ο αριθμός των κυττάρων με διπλοειδή χρωμοσωμική εικόνα είναι μικρότερος του 75% του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Εξαιτίας της τροποποίησής τους, τα κύτταρα μπορεί να μην διατηρούν όλα τα *in vivo* χαρακτηριστικά. Οι καλλιέργειες των διπλοειδικών κυτταρικών σειρών είναι πιο σημαντικές από τις δεύτερες, όσον αφορά τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας. Ωστόσο, οι διπλοειδικές κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν το πρόβλημα ότι προέρχονται από ένα μόνο άτομο, πιθανό ξενιστή ιικών ή μικροβιακών παραγόντων, που συχνά αλλοιώ-

νουν τη συμπεριφορά τους ώστε να χάνουν γρήγορα την *in vivo* λειτουργία τους. Επιπλέον, η γενετική και μεταβολική σταθερότητα των ανευπλοειδικών κυτταρικών σειρών συνεισφέρει σημαντικά στην ταυτοποίηση των δοκιμών και των μεθόδων (Browne 1985). Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι τα κύτταρα L 929 (Spångberg 1973, Koulaouzidou και συν. 1998, Koliniotou και συν. 2001), οι ινοβλάστες BHK (Meryon και συν. 1983, Koulaouzίδου 2001) και τα κύτταρα HeLa (Spångberg & Langeland 1973). Εν κατακλείδι, και οι δύο τύποι κυτταρικών σειρών καλλιέργειας, διπλοειδικές και ανευπλοειδικές, είναι πολύ σημαντικοί κατά τις *in vitro* δοκιμασίες και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη δοκιμή ενός υλικού.

ΑΜΕΣΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ (ΑΜΕΣΑ IN VITRO TESTS)

1.3.1. Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας

Οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας υπολογίζουν την κυτταροτοξικότητα ενός υλικού, υπολογίζοντας τον αριθμό κυττάρων ή τον ρυθμό ανάπτυξης, μετά από την έκθεση της καλλιέργειας σε αυτό (Ecobichon 1992).

Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα “φρεάτιο”, σε ένα τρυβλίο κυτταρικής καλλιέργειας, όπου και προσφύονται. Στη συνέχεια, τοποθετείται το προς δοκιμασία υλικό. Εάν το υλικό δεν είναι κυτταροτοξικό, τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στα τοιχώματα του φρεατίου, και με τον καιρό πολλαπλασιάζονται. Αν το υλικό είναι κυτταροτοξικό, τα κύτταρα παύουν να αναπτύσσονται, επιδεικνύοντας κυτταροπαθολογική (cytopathic) συμπεριφορά ή αποκόλληση από τα τοιχώματα του φρεατίου. Αν το υλικό είναι στερεό, τότε η πυκνότητα των κυττάρων (αριθμός κυττάρων ανά περιοχή) ποικίλλει σε διάφορες αποστάσεις από το υλικό, ενώ είναι πιθανόν να παρατηρηθεί και μια “ζώνη αναχαίτισης”. Η εκτίμηση της πυκνότητας των κυττάρων μπορεί να είναι ποιοτική, ποσοτική ή ημιποσοτική. Υλικά όπως το Teflon χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί (μη-κυτταροτοξικοί) δείκτες, ενώ υλικά όπως το χλωριούχο πολυβινύλιο (plasticized polyvinyl chloride) χρησιμοποιούνται ως θετικοί (κυτταροτοξικοί) δείκτες.

Μια άλλη κατηγορία δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας, είναι οι μεταβολές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι η ευχέρεια με την οποία μια χρωστική διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Βάση της δοκιμασίας αυτής είναι ότι η απώλεια της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης είναι ισο-

δύναμη ή σχεδόν ισοδύναμη με τη νέκρωση των κυττάρων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι αναγνωρίζει, προσδιορίζει σε μικροσκοπικό επίπεδο τα ζώντα από τα νεκρά κύτταρα. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ σημαντικό, καθώς πολλές φορές ενδέχεται να απαντούν κύτταρα, αλλά νεκρά. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι χρωστικών που χρησιμοποιούνται: φυσικές (ζωικές) και συνθετικές. Μερικές από τις χρησιμοποιούμενες φυσικές χρωστικές είναι το ουδέτερο κόκκινο και το $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. Οι χρωστικές αυτές πλεονεκτούν ιδιαίτερα, γιατί ούτε αντιδρούν ούτε μεταβολίζονται με τα κύτταρα (Kaltenbach και συν. 1958). Συνήθεις συνθετικές χρωστικές είναι το κυανούν του τρυπανίου (trypan blue), το μελανό του ναφθαλινίου, η ηωσίνη Y, η ερυθροσίνη B και το pyridium iodide.

1.3.2. Δοκιμασίες κυτταρικού μεταβολισμού ή κυτταρικής λειτουργίας

Κάποια *in vitro* test βιοσυμβατότητας χρησιμοποιούν τη βιοσυνθετική ή ενζυμική δραστηριότητα των κυττάρων προκειμένου να εκτιμηθεί η κυτταροτοξική αντίδραση. Το πιο σύνηθες παράδειγμα τέτοιων δοκιμασιών αφορά αυτές που μετρούν τη σύνθεση του DNA ή την πρωτεϊνοσύνθεση (Mitchell και συν. 1980). Η σύνθεση του DNA, ή η πρωτεϊνοσύνθεση, συνήθως ελέγχεται με την προσθήκη ραδιοϊσοτόπων στο υλικό (μέσο) της καλλιέργειας και, στη συνέχεια, με ποσοτικό προσδιορισμό του ενσωματωμένου στο DNA, ή στην πρωτεΐνη, ραδιοϊσοτόπου. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο test είναι η **ανάλυση MTT**. Η μέθοδος προτάθηκε το 1983 από τον Mosmann. Το MTT είναι άλας του τετραζολίου –ένα κίτρινο διαλυτό μόριο– το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της κυτταρικής ενζυμικής δραστηριότητας. Η ανάλυση αυτή υπολογίζει τη δραστικότητα της κυτταρικής δεϋδρογονάσης που μετατρέπει το άλας του τετραζολίου (MMT), μέσω διαφόρων κυτταρικών παραγόντων, με τη δράση των σουκινικών δεϋδρογονασών των ενεργών μιτοχονδρίων σε ένα γαλάζιο, αδιάλυτο παράγωγο φορμαζάνης. Εάν εξαιτίας κυτταροτοξικής δράσης η δεϋδρογονάση είναι ανενεργή, η φορμαζάνη δεν θα σχηματιστεί. Η παραγωγή φορμαζάνης μπορεί να προσδιοριστεί με διάλυση και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος που προκύπτει. Εναλλακτικά, η φορμαζάνη μπορεί να εντοπιστεί γύρω από το υπό δοκιμασία δείγμα με παρατήρηση στο οπτικό ή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Πρόσφατα έχουν προταθεί δοκιμασίες (tests) που υπολογίζουν τη γονιδιακή δράση, τη γονιδιακή έκφραση, την κυτταρική οξειδωση, και άλλες συγκεκριμένες λειτουργίες (Schmalz 1996, Schmalz 1997). Βεβαίως, οι δοκιμασίες αυτές δεν είναι τόσο συνήθεις για την εκτίμηση της βιοσυμβατότητας των υλικών.