



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Klinikum

Universitätsklinikum · Hygiene Institut · Im Neuenheimer Feld 324 · 69120 Heidelberg

Hygiene-Institut

Prof. Dr. med. H.-G. Sonntag
Abt. Hygiene und Med. Mikrobiologie
Dr. Lothar Erdinger
Chemielabor
Im Neuenheimer Feld 324
69120 Heidelberg
TEL: 06221 567810
FAX: 06221 565627
Email: er3@ix.urz.uni-heidelberg.de

Heidelberg, 16.11.95

Bericht über Untersuchungen zur Biokompatibilität kieferorthopädischer Materialien

Kieferorthopädische Maßnahmen werden in der Regel mit Hilfe von Apparaturen durchgeführt, die für eine bestimmte Zeit in direktem und unmittelbarem Kontakt mit der Mundschleimhaut stehen. Aus hygienischer Sicht muss daher die Forderung gestellt werden, dass von diesen Materialien keine Substanzen abgegeben werden dürfen, die möglicherweise zu schädlichen Effekten führen. Diese Anforderungen werden in der Regel unter dem Oberbegriff „Biokompatibilität“ zusammengefasst.

Ein wesentlicher Parameter der Biokompatibilität von Werkstoffen besteht darin, dass diese Materialien bzw. die daraus freigesetzten Stoffe keine gentoxischen Effekte aufweisen dürfen. Daneben ist die zytotoxische und schleimhautreizende Wirkung von besonderer Bedeutung, da die Materialien über längere Zeit unmittelbarem Kontakt mit der Mundschleimhaut haben. In Zusammenarbeit mit der Poliklinik für Kieferorthopädie (Ärztl. Direktor: Prof. Dr. G. Komposch) der Universitätsklinik für Mund-, Zahn- und Kieferkrankheiten wurden daher mit Materialien, die von der Fa. Scheu-Dental zur Verfügung gestellt wurden, Untersuchungen zur Biokompatibilität durchgeführt.

Untersuchungsmaterial:

Im Rahmen dieser Studie kamen insgesamt zehn in der Kieferorthopädie gebräuchliche Materialien zur Anwendung. Die Probenbezeichnungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Untersuchte Materialien

Lfd. Nr.	Handelsname		Chemische Charakterisierung
1	Biocryl „C“	2,0 x 125 mm	Polymethylmethacrylat
2	Bioplast	2,0 x 125 mm	Ethylencopolymer und Vinylacetat. Die Abstufungen 18-24-33-40 entsprechen dem prozentualen Vinylacetatgehalt
3	Copyplast	1,0 x 125 mm	Hochmolekulare, thermoplastische Polymerisate auf der Basis von Ethylen
4	Durasoft	1,8 x 125 mm	Thermoplastisches Polyurethan. Polycarbonat auf der Basis Bisphenol A
5	Hardcast	0,6 x 125 mm	Polypropylen und andere Polyolefine
6	Imprelon „S“	0,75 x 125 mm	Polycarbonat (Poly(bisphenol-A-carbonat))
7	Imprelon	1,0 x 125 mm	Polyvinylchlorid
8	Imprelon	3,0 x 125 mm	Hochmolekulares, thermoplastisches Polymerisat auf der Basis von Styrol
9	Imprelon „C“	0,75 x 125mm	Copolyester*
10	Menzanium	0,9 mm hart	Edelstahl (17,9 % Chrom)

*Anmerkung des Herstellers: Erhältlich unter dem Produktnamen „Duran®“.

Beschreibung der verwendeten Testsysteme

Für die Untersuchungen zur Biokompatibilität werden heute vorwiegend In-Vitro-Modelle verwendet, in denen versuchstierfrei toxikologische Endpunkte ermittelt werden können.

Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität hat sich der Agar-Overlay-Assay in der Zahnheilkunde durchgesetzt. Die Untersuchungen wurden wie bei *Schendel et al* beschrieben durchgeführt [1]. Die Werkstoffe wurden in der Zellkultur im sogenannten Agar-Diffusionstest mit Neutralrot-Färbung nach der DIN-Vornorm 13930 auf lokale, akute und unspezifische Toxizität getestet.

Schleimhautreizende Wirkung

Zur Bestimmung der schleimhautreizenden Wirkung wird in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie noch immer der heftig umstrittene „Draizé-Test“ am Kaninchenauge verwendet. Dieser Tierversuch kann jedoch – zumindest teilweise – durch den HET-CAM Test am bebrüteten Hühnerei ersetzt werden [2]. Bei diesem Test wird das zu untersuchende Material auf die Chorion-Allantois-Membran eines befruchteten Hühnereis am neunten Tag seiner Bebrütung appliziert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Membran vollständig entwickelt und stark durchblutet. Sie ähnelt in ihrem Aufbau einer Schleimhaut, so dass sich dieses Modell als besonders realitätsnah darstellt. Die Reizwirkung wird durch das Auftreten von Hämorrhagie, Koagulation und/oder Lyse von Blutgefäßen festgestellt.

Gentoxizität

Eine der bekanntesten Methoden zur Prüfung auf gentoxische Effekte ist neben zahlreichen weiteren Testverfahren mit unterschiedlichen Endpunkten und unterschiedlicher Aussagekraft der sog. „Ames-Test“. Beim Ames-Test wird die Mutagenität von Prüfsubstanzen an der Induktion von genetischen Veränderungen (Mutationen) an der Erbsubstanz von Bakterien überprüft. Eine mutagene Wirkung ist ein Hinweis für mögliche entsprechende Wirkungen beim Menschen. Dieser Test ist das einzige validierte In-Vitro-Testverfahren zur Bestimmung der mutagenen Aktivität von Stoffen oder Stoffgemischen, so dass dieser Test beispielsweise im Chemikaliengesetz als Prüfmethode vorgeschrieben ist.

Durchführung des Ames-Test

Alle Untersuchungen wurden gemäß der Vorschrift von Maron und Ames durchgeführt [3]. Die verwendeten Teststämme waren TA98 und TA100, alle Untersuchungen wurden sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung durchgeführt. Details stehen auf Anfrage zur Verfügung.

Auswertung

Das Ergebnis des Ames-Tests wird dann als positiv gewertet, wenn sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ergibt und die Revertantenanzahl mindestens doppelt so hoch ist wie die Anzahl der Spontanmutanten.

Hiermit ist gemeint, dass bei Applikationen einer größeren Menge des zu untersuchenden Stoffes oder Stoffgemisches eine entsprechend große Zunahme des Effektes (Mutationen) erfolgen muss. Auch ohne Zugabe von Testsubstanz kann jedoch eine bestimmte Anzahl mutierter Bakterien im Test beobachtet werden. Diese Anzahl wird als Spontanmutationsrate bezeichnet.

Vorbereitung

Für den *Ames-Test* wurden die Materialien getrennt im Soxhlett Extraktor mit Aceton über Nacht extrahiert. Von jedem Material wurden 2 Platten eingewogen, vom Draht etwa 10 g. Nach der Extraktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf eine Restmenge von etwa 10 ml abgezogen. Das restliche Lösungsmittel wurde anschließend mit Stickstoff im Sandbad (ca. 30°C) abgeblasen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückgelöst. Das Extrakt wurde in dieser Form für den Biotest verwendet.

Für den *HET-CAM Test* wurden aus den zu untersuchenden Materialien Prüfkörper mit einer Kantenlänge von 1 cm geschnitten. Die Prüfkörper wurden in dieser Form direkt auf die Membran aufgelegt.

Beim *Agar-Overlay-Assay* wurden die Materialien in zerkleinertem, ansonsten unveränderten Originalzustand als Festkörper direkt auf den Agar appliziert. Das Material Nr. 10 wurde abweichend von den Vorgaben zur Prüfkörperherstellung in Form von etwa 1,5 cm langen Drahtstücken getestet.

Ergebnisse

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammenfassend dargestellt. Bei keinem der untersuchten Materialien konnten mit den verwendeten Testsystemen positive Effekte erzielt werden.

Tabelle 2: Ergebnisse

Lfd. Nr.	Agar-Diffusionstest		HET-CAM Test	Ames-Test
	Entfärbungsindex/ Zellzerstörungsindex	Interpretation nach DIN 13930	Effekte nach 5 min. Einwirkung	Verdoppelung der Rev.-Zahl
1	0,5 / 0,5	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
2	0,25 / 0,25	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
3	0,5 / 0,5	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
4	0,25 / 0,25	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
5	0,5 / 0,5	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
6	0 / 0	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
7	0,25 / 0,25	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
8	0,5 / 0,5	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
9	0 / 0,25	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ
10	0 / 0	nicht zytotoxisch	keine Effekte	negativ

Bewertung

Der *Ames-Test* ist ein etabliertes In-Vitro-Testverfahren, mit dem das genotoxische Potential von Stoffen oder Stoffgemischen abgeschätzt werden kann. Ein negatives Ergebnis kann daher bereits als ein wesentlicher Hinweis für das Fehlen eines mutagenen Potentials gewertet werden. Bezüglich der Übertragbarkeit dieser Aussage auf ein entsprechendes krebserzeugendes Schädigungspotential beim Menschen sollten allerdings weiterführende Untersuchungen insbesondere an eukaryotischen Zellen, bzw. die Bestimmung spezifischer genotoxikologisch relevanter Endpunkte durchgeführt werden.

Die bei den Untersuchungsmaterialien dargestellte fehlende *schleimhautreizende Wirkung* und *Zytotoxizität* lässt sich direkt auf den Einsatz der Materialien beim Menschen übertragen, d.h. da in den hier durchgeführten Untersuchungen solche Effekte nicht nachgewiesen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass eine entsprechende Schädigung beim Menschen nicht zu erwarten ist.

Für eine weitergehende Diskussion der Ergebnisse sowie unserer Vorschläge zum weiteren Vorgehen stehen wir gerne zur Verfügung.



Prof. Dr. G. Komposch



Dr. L. Erdinger



Prof. Dr. H.-G. Sonntag

- [1] Schendel, K.U., Lenhardt, M., Fusenig, N.E., Kopusch, G.:
Testung der Toxizität von in der Kieferorthopädie verwendeten Kunststoffen
Fortschr Kieferorthop 53, 5 (1992) 263-272
- [2] Schendel, K.U., Erdinger, L., Komposch, G., Sonntag, H.-G.:
Untersuchung kieferorthopädischer Materialien im HET-CAM Test auf
schleimhautreizende Wirkung
Fortschr Kieferorthop 55,1 (1994) 28-35
- [3] Maron, D.M., Ames, B.N.:
Revised method for the Salmonella mutagenicity Test
Mutat Res 113 (1983) 173-215

Report in Extracts About The Study Concerning Biocompatibility of Orthodontic Products

Orthodontic treatment is normally carried out with appliances which have direct contact with the mucous membrane for quite some time. Therefore on the hygienic point of view the materials are not allowed to release any substances which may cause harmful effects. These demands are usually summarized by the word „**Biocompatibility**“.

The main task for the biocompatibility of materials is that these materials and their released substances do not show any toxic effects. Furthermore the cytotoxic effect and the effect causing irritation of the mucous membrane are of a special significance as the materials are in direct contact with the mucous membrane.

The company SCHEU-DENTAL has placed 10 different foils, frequently used in the Pressure Moulding Technique, at Prof. Dr. G. Komposch's disposal (University of Heidelberg) in order to give her the permission to do various tests considering the aspect of biocompatibility. (Please see following chart).

Number	Trade Name		Chemical Characterization
1	Biocryl „C“	2,0 x 125 mm	Polymethylmethacrylate
2	Bioplast	2,0 x 125 mm	Ethylencopolymer and Vinylacetate. The graduation 18-24-33-40 correspond to the percentage of Vinylacetate.
3	Copyplast	1,0 x 125 mm	High molecular, thermoplastic Polymerisate on the base of Ethylen
4	Durasoft	1,8 x 125 mm	Thermoplastic Polyurethan. Polycarbonate on the base of Bisphenol A
5	Hardcast	0,6 x 125 mm	Polypropylene and other Polyolefine
6	Imprelon „S“	0,75 x 125 mm	Polycarbonate (Poly(bisphenol-A-carbonate))
7	Imprelon	1,0 x 125 mm	Polyvinylchloride
8	Imprelon	3,0 x 125 mm	High molecular, thermoplastic Polymerisate on the base of Styrene
9	Imprelon „C“	0,75 x 125mm	Copolyester *
10	Menzanium	0,9 mm hart	High-grade steel (17.9 % chrome)

Here is some information given concerning the procedure of the three tests:

Cytotoxicity

For the determination of the cytotoxicity, the *Agar-Overlay-Assay* test is used. The materials have been tested in cell-culture in the so-called Agar Diffusionstest with a neutral red colouration according to the regulation DIN 13930 on local, acute and non-specific toxicity.

Effects causing irritation of the mucous membrane

Here the *HET-CAM-Test* is done on a chicken egg as the structure of an egg is very similar to the one of the mucous membrane.

Toxicity concerning gene

One of the best known methods of testing gene toxic effects is the so-called *Ames-test*. Here the mutagenity was tested on the hereditary substance of bacteria.

None of the tested materials / foils have shown any positive reactions. (Please see following chart)

No.	Agar-Diffusion Test		HET-CAM Test	Ames-Test
	decolourization index / cell destruction index	Interpretation acc. DIN 13930	Effects after 5 min.	doubling of the Rev. Number
1	0,5 / 0,5	non cytotoxic	no effects	negative
2	0,25 / 0,25	non cytotoxic	no effects	negative
3	0,5 / 0,5	non cytotoxic	no effects	negative
4	0,25 / 0,25	non cytotoxic	no effects	negative
5	0,5 / 0,5	non cytotoxic	no effects	negative
6	0 / 0	non cytotoxic	no effects	negative
7	0,25 / 0,25	non cytotoxic	no effects	negative
8	0,5 / 0,5	non cytotoxic	no effects	negative
9	0 / 0,25	non cytotoxic	no effects	negative
10	0 / 0	non cytotoxic	no effects	negative

Summary

The results clearly state negative reactions, i. e. there is no mutagenous potential. SCHEU-DENTAL foils have no harmful effects on the patient!

* Manufacturers note: available under the brandname "DURAN®"