

RAPPORT

NIOM

NORDIC INSTITUTE OF DENTAL MATERIALS

Komposittmaterialer – utlekking av monomer og cytotoxissitet



NORDISK INSTITUTT FOR ODONTOLOGISKE MATERIALER

<u>Tittel</u>	<u>Dato</u>
Komposittmaterialer – utlekking av monomer og cytotoxissitet	2017-11-15

<u>Forfatter(e)</u>	<u>Distribusjon</u>
Hilde M. Kopperud, Jan Tore Samuelsen	Gratis

Forord

NIOM har på oppdrag fra Helsedirektoratet undersøkt fire komposittmaterialer: ett Own Brand Label (OBL)-materiale, to bulk-fill materialer og et mye benyttet universalmateriale. Bakgrunnen for undersøkelsene er usikkerhet knyttet til biokompatibiliteten til dentale kompositter, spesielt de såkalte OBL-materialene.

Materialene har blitt undersøkt for utlekking av monomerer og ved ulike cytotoxissitets-evalueringer.

Denne rapporten presenterer resultatene fra undersøkelsene som er blitt utført ved NIOM i perioden oktober 2015 – februar 2017. Deltakere i prosjektet har vært: Lene Grutle, Hilde M. Kopperud, Else Møriskbak, Bergitte Olderbø, Jan Tore Samuelsen og Hanne Wellendorf.

Oslo, 15. november 2017

Hilde M. Kopperud
Laboratorieleder, dr. scient.

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	4
Bakgrunn	4
Formål	4
Konklusjon	4
MATERIALER OG METODER	5
Materialer	5
Prøvelegemer og ekstrakter	5
Lekkasje-studier	6
Cytotoksisitet	8
Forkortelser	13
Referanser	13

SAMMENDRAG

Bakgrunn

Det har i den senere tid blitt stilt spørsmål om biokompatibiliteten til dentale kompositter, spesielt de såkalte OBL (Own Brand Label)-materialene. Generelt finnes det begrenset informasjon om lekkasjeforbindelser og cytotoxisitet av dentale kompositter som materialgruppe, selv om det er blitt publisert en rekke studier innen feltet. Når det gjelder enkeltprodukter kan begrensingen på tilgjengelig informasjon være enda større.

Biokompatibiliteten til et materiale har sammenheng med sammensetningen og hvilke forbindelser som lekker fra materialet. Sammensetning og lekkasje sammen med cytotoxisitet for individuelle utlekks-substanser og materialekstrakter kan undersøkes i laboratoriet og gi gode indikasjoner på biokompatibilitet. Det er imidlertid viktig å presisere at det er en usikkerhet knyttet til overføring av konklusjoner fra slike studier til det virkelige liv (pasienten). Blant annet kan de homogene cellelinjemodellene som benyttes ha egenskaper som skiller seg fra celler i en kompleks multicellulær organisme.

Formål

Helsedirektoratet har bedt NIOM undersøke biokompatibiliteten til noen komposittmaterialer ved å se på lekkasjestudier samt toksisitet i cellekultur. NIOM har kvantitativt bestemt lekkasje av monomerer fra komposittmaterialer og gjennomført ulike cytotoxisitets-undersøkelser med ekstrakter fra materialene. De undersøkte materialene var 4U (OBL-materiale), Filtek Bulk Fill Flowable, Tetric EvoCeram Bulk Fill, og Filtek Z250 (referansemateriale).

Konklusjon

Undersøkelsene viser ingen vesentlig forskjell i total mengde utlekket monomer for de ulike materialene. Innledende cytotoxisitets-undersøkelser (MTT-screening) viste et mulig cytotoxisk potensiale for to av materialene, men grundigere undersøkelser (endringer i cellevekstmønster, celledød og nivå av spesifikke proteiner) støttet ikke disse indikasjonene.

Basert på denne undersøkelsen er det ikke grunnlag for å konkludere med utilstrekkelig pasientsikkerhet ved bruk av de undersøkte materialene.

MATERIALER OG METODER

Materialer

Fire komposittfyllingsmaterialer har inngått i undersøkelsen (tabell 1): En etablert kompositt som referansemateriale (Filtek Z250), en Own Brand Label (4U) og to bulk fill materialer (Filtek Bulk Fill Flowable og Tetric EvoCeram Bulk Fill).

Tabell 1: Informasjon om komposittfyllingsmaterialer i undersøkelsen.

Materiale Navn (farge), produsent	Anbefalt bruksområde og herdedybde	Anbefalt herdetid og irradians
4U (A2), Nordenta	Fortann og molarfyllinger. 2 mm	20 s, ≥ 1000 mW/cm ²
Filtek Bulk Fill Flowable (A2), 3M ESPE	Basis under klasse I og II restaureringer. Klasse III og V restaureringer. 4 mm	20 s, 1000-2000 mW/cm ²
Filtek Z250 (A2), 3M ESPE	Fortann og molarfyllinger. 2,5 mm	20 s, ≥ 400 mW/cm ²
Tetric EvoCeram Bulk Fill (IVA), Ivoclar Vivadent	Direkte fyllingsterapi i molar området. 4 mm	10 s, ≥ 1000 mW/cm ²

Prøvelegemer og ekstrakter

Prøvelegemer ble laget i henhold til ISO 7405 med dimensjoner 5 mm diameter, 2 mm høyde. Alle materialene ble herdet fra én side med herdelampen Demetron A.2 (Kerr) med den anbefalte herdetid. Målt lysintensitet for denne lampen i bølgeområdet 400-515 nm var 1390 mW/cm². Diameteren på lampens lyslederspiss ble målt til 7,5 mm. Overflaten til prøvelegemene ble slipt (P2400 slipepapir) etter herding for å fjerne upolymerisert sjikt i henhold til ISO 7405.

Ekstrakter ble laget på samme måte til lekkasje- og til cytotoxicitets-undersøkelsene og gjort i henhold til ISO 10993-12. Til cytotoxicitets-undersøkelsene ble ekstraktene laget i celledyrkingsmedium (MEM, vandig løsning), mens det til lekkasje-analysene ble benyttet vann (grad 2, ISO 3696) som ekstraksjonsmiddel. Forholdet mellom overflateareal og ekstraksjonsvolum var 3 cm²/ml, ekstraksjon ble gjort over 24 t ved 37 °C ved 100 rpm i ristevannbad.

Analyser av sammensetning og utlekket monomer ble gjort med HPLC-UV-MS.

Lekkasje-studier

Sammensetningen til komposittmaterialer er sjelden oppgitt nøyaktig av produsent, men noe informasjon kan finnes i bruksanvisning og sikkerhetsdatablad. Tabell 2 viser oppgitt informasjon fra produsent om sammensetning til de undersøkte komposittene. For å bekrefte sammensetningen samt vurdere hvilke monomerer i hvert produkt som var de dominerende ble det gjennomført analyser av oppløsninger av de uherdete komposittpastaene med fokus på identifikasjon av monomerer. Resultatene fra sammensetnings-analysene er vist i tabell 3. De samme monomerene som var oppgitt av produsent ble identifisert i våre analyser med unntak av bis-EMA i Filtek Bulk Fill Flowable som ikke ble detektert. «Procrylat resin» oppgitt for samme materiale kunne heller ikke detekteres grunnet manglende informasjon om forbindelsen og referansemateriale.

Tabell 2. Oppgitt informasjon fra produsent i bruksanvisning og sikkerhetsdatablad om sammensetningen til materialene.

Materiale	Oppgitt sammensetning
4U	bis-GMA, blanding av poly- og difunksjonell metakrylat
Filtek Bulk Fill Flowable	bis-GMA, UDMA, bis-EMA(6), TEGDMA, bis-PMA og procrylat resin*. Ethyl-4-dimethylaminobenzoate, UV090
Filtek Z250	bis-GMA, UDMA, bis-EMA, TEGDMA. Ethyl-4-dimethylaminobenzoate, UV090
Tetric EvoCeram Bulk Fill	Dimetakrylater, bis-GMA, UDMA, bis-EMA

*ifølge produsent er procrylat en monomer som er lik bis-GMA, men uten-OH-grupper og har dermed en lavere viskositet

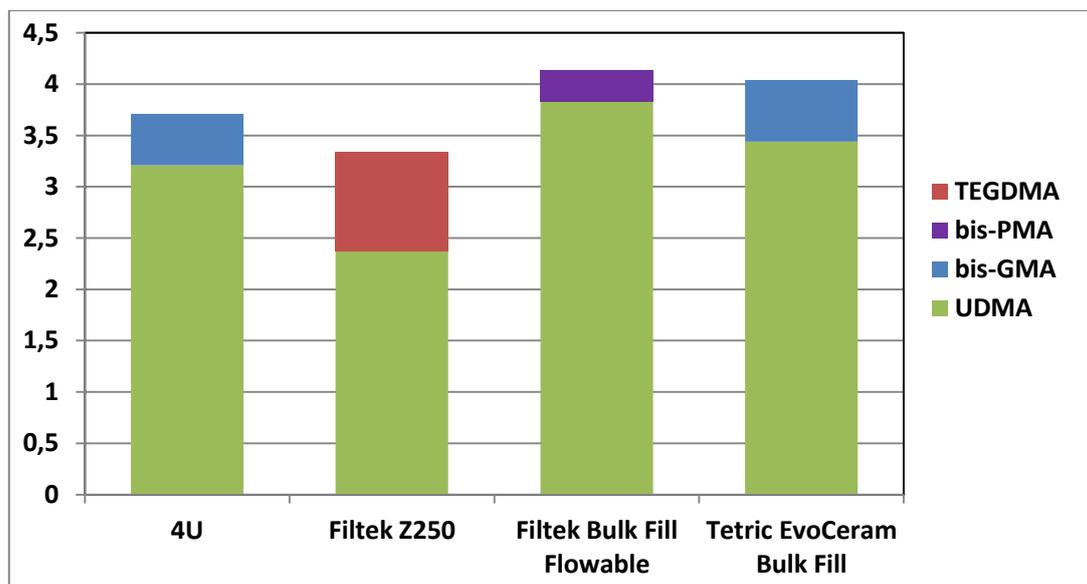
Tabell 3. Resultater fra sammensetningsanalyser av materialene. Monomerer med størst signal er markert med fet skrift og vil inngå i lekkasje-analyser.

Materiale	Analysert sammensetning
4U	UDMA, bis-GMA , 1,6-heksandiol-dimetakrylat
Filtek Bulk Fill Flowable	bis-GMA, UDMA, bis-PMA , TEGDMA
Filtek Z250	bis-GMA, UDMA, bis-EMA, TEGDMA
Tetric EvoCeram Bulk Fill	bis-GMA, UDMA , bis-EMA

På bakgrunn av identifikasjon av hvilke monomerer hvert materiale inneholdt ble det avgjort hvilke monomerer som skulle analyseres kvantitativt i lekkasje-undersøkelsene, dvs. de forbindelsene som det var mest av (som hadde størst signal). Resultater fra kvantitativ bestemmelse av utlekket monomerer fra komposittmaterialene er presentert i tabell 4, samt i figur 1.

Forskjellige monomerer lekket ut fra de ulike materialene. Dette er som forventet ettersom materialene heller ikke har lik sammensetning av monomerer. Kun de to monomerene med størst signal (antatt størst lekkasje) ble kvantifisert. Fra materialet 4U lakk også forbindelsen 1,6- heksandiol-dimetakrylat ut, men denne ble ikke kvantifisert. Bis-GMA ble identifisert i utlekk fra begge Filtek-materialene, men ble ikke kvantifisert, mens TEGDMA også ble detektert i utlekk fra Filtek Bulk Fill Flowable uten å bli kvantifisert.

Samlet sett er det ikke grunnlag til å si at noen av materialene har betydelig større eller annerledes lekkasje enn de andre materialene.



Figur 1: Søylepresentasjon av utlekkete monomerer samlet for de ulike komposittene.

Tabell 4: Mengde utlekket monomer i vekt per overflateareal fra de ulike komposittene, gjennomsnitt (standard avvik).

Materiale	TEGDMA µg/cm ²	UDMA µg/cm ²	Bis-GMA µg/cm ²	Bis-PMA µg/cm ²
4U *		3,21 (0,18)	0,50 (0,02)	
Filtek Bulk Fill Flowable	D	3,83 (0,06)	D	0,32 (0,08)
Filtek Z250 ‡	0,97 (0,04)	2,37 (0,15)	D	
Tetric EvoCeram Bulk Fill ‡		3,44 (0,55)	0,62 (0,13)	

D : detektert, men ikke kvantifisert

* 1,6-HDDMA detektert, men ikke kvantifisert

‡ Spor av Bis-EMA, men ikke sikker deteksjon

Cytotoksisitet

Evaluering av cytotoksisitet ble gjort i flere trinn for å underbygge og utfylle de innledende resultatene. I første omgang ble det gjennomført MTT etter metoden beskrevet i ISO 10993-5 på L929 celler (en cellelinje med opphav fra muse-fibroblaster). Videre ble det gjennomført MTT på en annen cellelinje, BEAS-2B celler (en human bronkial epitel-cellelinje) som ofte tåler mindre dose av toksiske stoff (NIOMs egne observasjoner). For to materialer som etter begge disse undersøkelsene viste lavest viabilitetsverdier, ble det målt endringer i cellevekstmønster og celledød med flow cytometri, og til sist nivå av proteiner som er kjent å endres når celler skades.

MTT, L929 celler

Resultater fra MTT-undersøkelsen med L929 celler er gitt i tabell 5.

I følge standarden (ISO 10993-5) skal en prøve tolkes å ha et cytotoksisk potensiale hvis en analyse utført med MTT-test gir avlest viabilitetsverdi < 70 % av kontrollprøve. Det er viktig å presisere at resultatene fra slike laborietester ikke er direkte overførbare til menneske-eksponering, men er en indikasjon om mulig skadepotensial i menneske. Celler dyrket i laboriet og celler i kroppen kan reagere forskjellig gjennom bl.a. å ha forskjeller i forsvar mot kroppsfremmede stoff. Det kan derfor ikke utelukkes at et testet materiale som gir verdi større enn 70 % har et skadepotensial, eller at et testet materiale som gir verdi mindre enn 70 % er trygt å bruke. Metoden er ment som en «screeningmetode», og ved usikre resultater (verdier nær 70 %) vil det være nødvendig med ytterligere analyser for enten å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelse av en toksisk respons.

Tabell 5: MTT resultater for L929 celler, prosent celleoverlevelse etter eksponering for ekstrakter fra komposittmaterialene, gjennomsnitt (standard avvik).

Materialer	% viabilitet, relativt til kontroll
4U	81,0 (3,9)
Filtek Bulk Fill Flowable	50,8 (2,1)
Filtek Z250	66,8 (1,9)
Tetric EvoCeram Bulk Fill	75,8 (4,8)

Usikkerhetsmomenter ved selve testen:

En målt reduksjon i MTT-verdi tolkes rutinemessig som redusert viabilitet og økt celledød. Mer presist måler MTT aktiviteten av det mitokondrielle enzymet succinat dehydrogenase (SDH) i en cellepopulasjon. Dermed kan også andre faktorer være årsak til lavere MTT-verdier, eksempelvis redusert cellevekst (gir færre celler og dermed lavere total SDH-aktivitet) eller lavere enzymaktivitet i mitokondriene (MTT-avlesningen vil da ikke være proporsjonal med celleantall). Forskjellige cellekulturmodeller kan også gi forskjellig utslag i testen. I tillegg vil en direkte interaksjon mellom testsubstans og MTT-reagens kunne være en kilde til feil verdier fra denne testen.

Tabell 6: MTT resultater for BEAS-2B celler, prosent viabilitet etter eksponering for ekstrakter fra komposittmaterialene, gjennomsnitt (standard avvik).

Materialer	% viabilitet, relativt til kontroll
4U	95,3 (1,5)
Filtek Bulk Fill Flowable	64,8 (7,4)
Filtek Z250	71,4 (4,9)
Tetric EvoCeram Bulk Fill	93,2 (7,6)

MTT, BEAS-2B celler

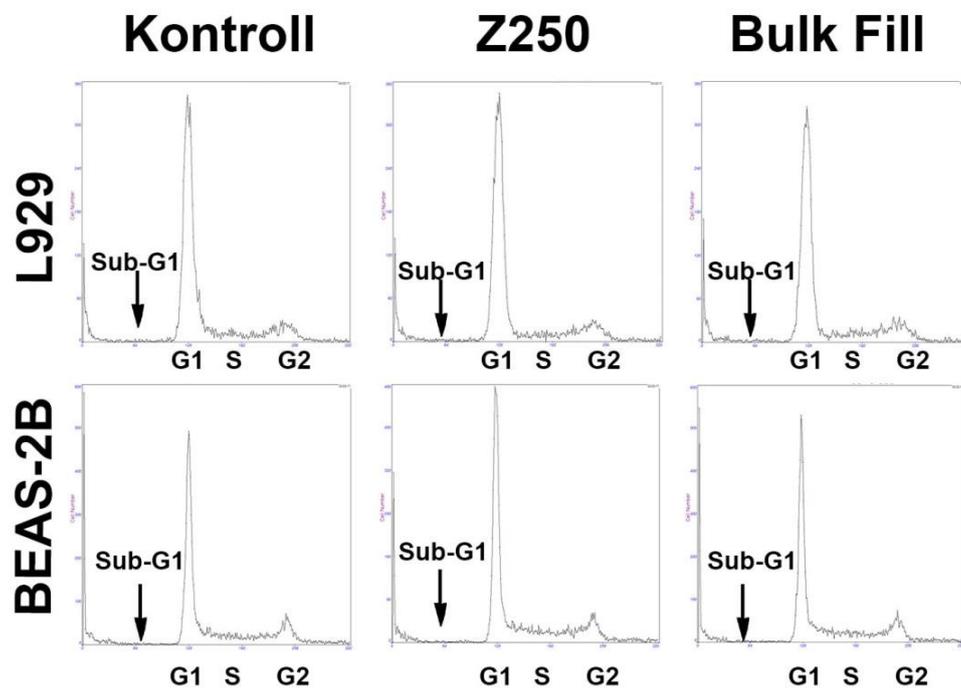
Med bakgrunn i MTT-resultater etter ISO 10993-5 (L929 celler) ble det utført videre analyser av celler eksponert for ekstrakt fra Filtek Bulk Fill Flowable og Filtek Z250 som henholdsvis ga viabilitetsverdiene 51 % og 67 %. MTT ble utført på en annen cellelinje, BEAS-2B (bronkial epitelcellelinje) og ekstrakter fra de to andre materialene ble inkludert som sammenlikning. Resultater fra MTT på BEAS-2B celler er gitt i tabell 6.

Foreløpig kan det konkluderes med at MTT gir mindre utslag på BEAS-2B celler enn i L929 celler for alle materialene, men at det for de to Filtek-materialene bør gjøres grundigere undersøkelser ettersom MTT-verdiene ligger rundt 70 %.

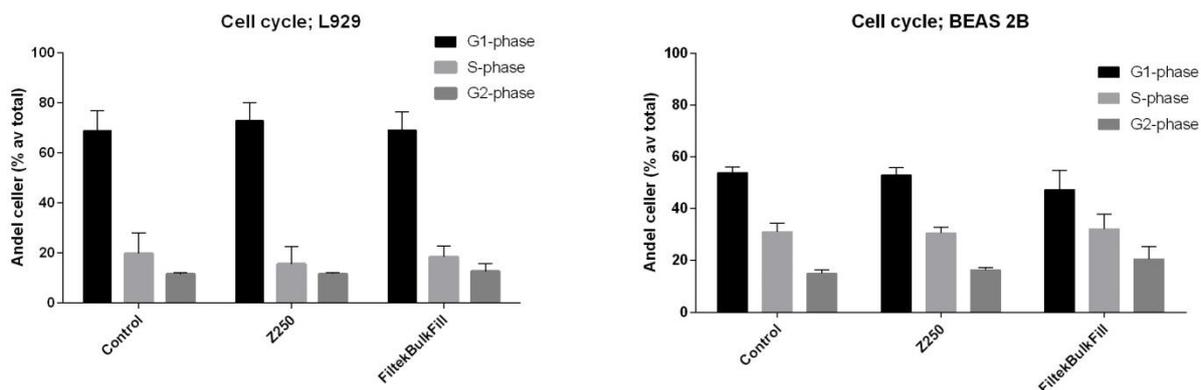
Cellevekstmønster og celledød ved flow cytometri

Videre undersøkelser ble gjort med flow cytometri av celler eksponert for ekstrakt fra Filtek Bulk Fill Flowable og Filtek Z250. Flow-histogram (figur 2) viser fordeling av celler i de forskjellige faser av cellevekstsyklus (G1, S og G2). Endret fordeling mellom disse fasene kan være tegn på vekstforstyrrelser i skadede celler. I tillegg gir andel cellefragmenter («Sub-G1» fraksjonen; pil i figur) en indikasjon på mengde døde eller døende celler. Figur 3 viser beregnet fordeling av celler i de ulike cellevekstfasene for begge cellelinjene etter eksponering for Filtek-materialene.

Undersøkelsene viser ingen endring av vekstmønster eller økt celledød.



Figur 2: Eksempler på flowcytometriske analyser av ikke-eksponerte kontrollceller og celler eksponert for ekstrakt fra Filtek Z250 og Filtek Bulk Fill Flowable.



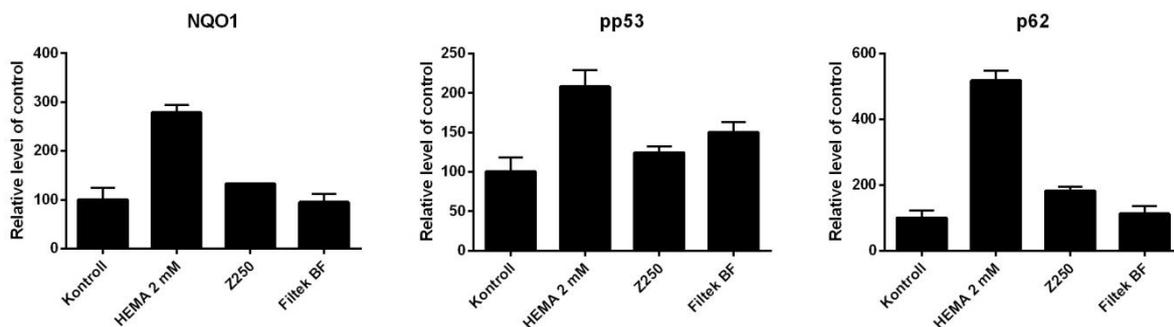
Figur 3: Beregning av fordeling celler i cellevekstfaser for Filtek Z250 og Filtek Bulk Fill Flowable for L929 og BEAS-2B celler (n=3).

Proteomendringer som tilpasning til skadelige stoffer

Det er blitt gjort måling av endret nivå av spesifikke proteiner som kan indikere oksidativt stress, proteinskader eller DNA skader. Som positiv kontroll er 2 mM HEMA brukt. Denne konsentrasjonen av HEMA er kjent å gi endringer i proteomet forenlig med økning i alle de målte parameterne uten målbar endring i MTT-verdi. De undersøkte proteinene er:

- NQO1 - øker normalt ved eksponeringer som kan gi oksidative skader
- P-p53 (pp53) - økning kan være tegn på DNA-skade
- p62 - økning kan være tegn på proteinskader og økt autofagi

Undersøkelse av proteomendringer (figur 4) gir ingen indikasjon på økt oksidativt stress, DNA-skade eller protein-skade i BEAS-2B celler som er eksponert for ekstrakter fra Filtek Z250 eller Filtek Bulk Fill Flowable.



Figur 4: Undersøkelse av endringer i nivå av proteinene NQO1, pp53 og p62.

Forkortelser

Bis-EMA	Etoksylert bisfenol A-glycidyl metakrylat; 2,2-bis-(4-(2-methacryloxyethoxy)phenyl)propane]
Bis-GMA	bisfenol A-glycidyl metakrylat; 2,2-bis-(4-(2-hydroxy-3-methacryloxypropoxy)phenyl)propane
Bis-PMA	Propoksylert bisfenol A-glycidyl metakrylat; 2,2-bis-(4-(3-methacryloxypropoxy)phenyl)propane
HEMA	2-Hydroksyetylmetakrylat; 1,2-Ethanediol mono(2-methylpropenoate
TEGDMA	Trietylglykol-dimetakrylat; 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,2-ethanediylbis(oxy-2,1-ethanediyl) ester
UDMA	Uretan-dimetakrylat; bis (2-methacryloxyethyl) N, N'-1, 9-nonylene biscarbamate
UV090	UV-stabilisator; 2-(2'-hydroxy-5'-methacryloxyethylphenyl)-2H-benzotriazole

Referanser

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use -- Specification and test methods

ISO 7405:2008 Dentistry -- Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry

ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials



NORDIC INSTITUTE OF DENTAL MATERIALS

KNOWLEDGE

INNOVATION

QUALITY

NIOM works to ensure that dental biomaterials are safe and effective.

We undertake research, participate in standardization and provide clinical relevant advice to the dental health services and health authorities in the Nordic countries.

NIOM offers research-based consultancy and accredited testing according to international standards.

Our independent test laboratory delivers accurate and independent data accepted for third-party evaluations of dental materials and instruments.