



Prüfbericht 11 09 048 / 2009

In vitro Zytotoxizitätstest nach DIN ISO 10993-5

für:

ANKATIT-ANKA Guss GmbH Alexander Kauermann Dentalprodukte Schillerstrasse 26 63857 Waldaschaff

bearbeitet von:

Prüfbereich ZS Fraunhofer-Institut für Grenzflächenund Bioverfahrenstechnik (IGB) Nobelstrasse 12

70569 Stuttgart

Ausstellungsdatum: 05.08.2009

1 Probenbeschreibung und Problemstellung

Vom Auftraggeber ANKATIT-ANKA Guss GmbH, Waldaschaff wurden zur Untersuchung Probekörper aus Legierungen geliefert, die auf ihr zytotoxisches Potential nach DIN ISO 10993-5 getestet werden sollen. Die Zytotoxizität soll an einer subkonfluenten Monolayerkultur der HaCaT-Zelllinie (DKFZ) getestet werden.

2 Prüfzeitraum

Die Prüfkörper wurden vom 23.07.09 – 31.07.09 gemessen und ausgewertet.

3 Beschreibung des Prüfverfahrens

Die Prüfung wurde nach der Methoden-SOP *In vitro* Zytotoxizitätstests an Zelllinien und an einem organtypischen Hautmodell durchgeführt. Dokumenten-Nr.: A-ZS-1, 2. Fassung.

3.1 Extraktionsverfahren

Die Prüfkörper wurden vor der Extraktion für 25 min bei 134°C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extraktion für 72 ± 2h bei einer Temperatur von 37 ± 2°C und 5% CO₂ im Brutschrank (nach DIN ISO 10993-12 Extraktion von Festkörpern mit 0,1-0,2 g/ml) durchgeführt. Als Extraktionsmedium wurde DMEM-Medium ohne Zusatz von Serum verwendet. Als Blindlösung wurde DMEM-Medium, welches denselben Extraktionsbedingungen unterworfen wurde, verwendet. Nach erfolgter Extraktion wurde das Medium sofort zur weiteren Verwendung mit 10% FCS versetzt und auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Die Masse der Prüfkörper wurde an einer Analysenwaage bestimmt. In Tabelle 1 sind Angaben zum eingesetzten Medienvolumen aufgeführt.

Tabelle 1: Angaben zur Extraktion

Probe	Probenbezeichnung	Masse [g]	Extraktionsvolumen [ml]
	Extrakt 1a	1,2435	12,435
Prüfkörper	Extrakt 1b	1,1557	11,557
	Extrakt 1c	1,2649	12,649

3.2 Kontrollen

Als Negativkontrolle wurde frisches DMEM-Medium mit 10% FCS verwendet. Als Positivkontrolle wurde frisches DMEM-Medium mit 10 % FCS unter Zusatz von 1,0 % SDS eingesetzt.

Hierzu wurde eine wässrige 20%-ige SDS-Lösung 1:1 mit 2fach-DMEM-Medium verdünnt, um die Osmolarität zu gewährleisten. Ausgehend von diesem DMEM-Medium mit 10% SDS wurde die weitere Verdünnung mit 1 % SDS angesetzt.

Die Kennzeichnung der Extrakte, der Blindlösung und der Kontrollen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Kennzeichnung der Extrakte mit zugehörigen Kontrollen

Probe	Bezeichnung des Extraktes
	Extrakt 1a
Prüfkörper	Extrakt 1b
	Extrakt 1c

Kontrollen	Bezeichnung der Kontrolle
Blindlösung (DMEM extrahiert + 10% FCS)	BL
Negativkontrolle (DMEM +10% FCS)	NK
Positivkontrolle (DMEM +10% FCS+1% SDS)	PK

3.3 Zytotoxizitätsprüfung an Monolayerkulturen nach DIN EN ISO 10993-5

Zur Überprüfung des zytotoxischen Potentials der Proben wurde der in Kapitel 3.1 gewonnenen Originalextrakt auf eine subkonfluente Zellkultur gegeben und für 24 ± 2 Std. bei einer Temperatur von $37\pm2^{\circ}$ C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für den Test wurde die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (DKFZ; Heidelberg) verwendet. Die Mycoplasmenfreiheit dieser Zellkultur wurde durch die Firma Biochem, Karlsruhe im Unterauftrag nachgewiesen.

Diese epitheliale Zelllinie wurde ausgewählt, da bei Verwendung des Produktes ebenfalls epitheliale Zellen mit dem Produkt in Kontakt treten.

Prüfcode Zelllinie: 2

2 HaCaT 38P*/ 1P/a

3.3.1 Bestimmung der Zellproliferation in verschiedenen Extrakten

Die HaCaT-Zellen wurden in der 2P/a Passage (a=1. Einfrierzyklus) verwendet und mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen/well in eine 96-well-Platte ausgesät. Bei dieser Zellzahl ist erfahrungsgemäß gewährleistet, dass es innerhalb des Versuchszeitraumes zu keiner Konfluenz der Zellen im well kommt. Dies ist für eine aussagekräftige Testung unbedingt erforderlich.

Die Zellen wurden in 200 μ l Kulturmedium ausgesät, und bei 37°C / 5%CO $_2$ im Brutschrank bis zur vollständigen Adhärenz inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium durch den zu testenden Extrakt / die Kontrollmedien ausgetauscht. Die Zellen wurden 24 Std. bei 37°C / 5%CO $_2$ im Brutschrank mit den Extrakten inkubiert. Je Extrakt wurden 6 identische Ansätze pipettiert.

Eine Stocklösung aus dem verwendeten Extraktionsmedium (DMEM ohne Zusatz von FCS) mit entsprechend zugesetzter MTS-Lösung wurde vorbereitet (20 μ l MTS-Reagenz + 100 μ l Medium je well). Aus den 96-well-Platten wurde das Kulturmedium entfernt und jeweils 120 μ l vorbereitete Stocklösung zu den Zellen pipettiert. Die Platten wurden für 60 min im Brutschrank inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte am ELISA-Reader bei 492 nm.

Die Extrakte / die Kontrollmedien (ohne Zellen) wurden ebenfalls in einer Sechsfach-Bestimmung mit MTS-Reagenz vermessen, um den Hintergrund zu bestimmen. Dieser Wert wurde vom Messwert abgezogen

4 Probenbezeichnung und Ergebnisse

Tabelle 3: Probeneingang

Probeneingang	Bezeichnung	Anzahl		
23.07.2009	Prüfkörper	6 identische Prüfkörper		

Die Prüfkörper sind identisch in ihrer Zusammensetzung und enthalten folgende Legierungen:

- Ankatit S
- Ankatit H
- Ankatit Laser
- Ankatit B
- Ankatit U
- Ankatit LFC
- Ankatit CoCr-Laserschweißdraht

4.1 Mikroskopische Beurteilung der Zellen

Vor Zugabe der Extrakte wurden die Zellen auf ihre Adhärenz im Mikroskop überprüft, um für alle Zellproben die gleichen Ausgangsbedingungen sicherzustellen.

4.2 Ergebnis der Extrakttestung

Die Absorptionen werden als Prozent der Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle (100% Proliferation) und Positivkontrolle (0% Proliferation) berechnet. Zwischen Zellzahl und Proliferation wurde ein linearer Zusammenhang vorausgesetzt.

In Tabelle 4 sind die gemessenen Absorptionen abzüglich des jeweiligen Hintergrundes angegeben. Tabelle 5 zeigt die Berechnung der Proliferation in Prozent. Die graphische Auftragung der Werte ist in Abbildung 1 dargestellt.

Negative Werte der Positivkontrolle werden "Null" gesetzt.

Tabelle 4: gemessene Absorptionen abzüglich des Hintergrundes

Proben							
Probenbezei	Al	bsorption-l	MW	SD			
	Extrakt 1a	0,434	0,457	0,453	0,450	0,015	
	EXITARLIA	0,434	0,473	-	0,430		
Duithinnor	Extrakt 1b	0,445	0,434	0,464	0,454	0,020	
Prüfkörper		0,439	0,489	_	0,434		
	Extrakt 1c	0,490	0,468	•	0,475	0,022	
		0,436	0,496	0,486	0,473		
Plindlögung	DI	0,516	0,529	0,513	0,505	0,017	
Blindlösung	BL	0,504	0,486	0,479	0,505		

Kontrollen							
Probenbezeichnung		Absorption-HG			MW	SD	entspricht
Negativkontrolle	NK	0,418	0,433	0,420	0,447	0,047	100%
		0,457	0,545	0,406			
Positivkontrolle	PK	-0,009	-0,014	-0,034	-0,020	0,010	0%
		-0,018	-0,012	-0,032			0.70

Tabelle 5: Proliferation in % bezogen auf die Kontrollen

	Proben							
Probenbezeic	hnung	Pro	liferation in	%	MW	SD	zytotox. Potential	
	Extrakt 1a	97,2	102,4	101,5	103,0	4,94	nicht zytotoxisch	
	EXHARLIA	97,2	105,9	-				
Prüfkörper	Extrakt 1b	99,7	97,2	103,9				
Trankorper	EXTRACT ID	98,3	109,5	1-				
	Extrakt 1c	109,7	104,8	-				
	EXHARLIC	97,6	111,1	108,8				
Blindlösung	BL -	115,6	118,5	114,9	113,0	3,88	nicht zytotoxisch	
billidiosung	DL	112,9	108,8	107,3				



Abbildung 1: graphische Darstellung der Ergebnisse

Die schädigende Wirkung der Prüfkörper wird anhand der Beeinträchtigung der Zellproliferation nach der in Tabelle 6 gezeigten Zytotoxizitätsskala beurteilt.

Tabelle 6: Zytotoxizitätsskala

Zytotoxizitätsskala	Proliferation in % (bzgl. Kontrolle)	Interpretation
0	100 - 81 %	nicht zytotoxisch
1	80 - 71 %	schwach zytotoxisch
2	70 - 61 %	mäßig zytotoxisch
3	60 - 0 %	stark zytotoxisch

Die Blindlösung ist eine interne Kontrolle und zeigt, dass die zur Extraktion verwendeten Gefäße kein zytotoxisches Potential aufweisen. Tritt ein zytotoxischer Effekt auf, ist dieser definitiv auf das extrahierte Material zurückzuführen.

Der aus den Prüfkörpern gewonnene Original-Extrakt zeigte keine zytotoxische Wirkung auf die HaCaT-Zellline.

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände.

Ohne schriftliche Genehmigung des Prüflaboratoriums darf der Bericht nicht auszugsweise vervielfältigt werden.

Datum, Name, Titel und Unterschrift des Prüfleiters