

ONDERZOEK

EEN IN VITRO ONDERZOEK NAAR DE TOXICITEIT VAN EEN REUK- EN SMAAKLOOS ZINKOXYDE-EUGENOLCEMENT (ISO-PROTECT)

G. SCHMALZ
J. ROTGANS

Uit de afdeling Conserverende Tandheelkunde van het 'Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Eberhard-Karls-Universität' te Tübingen (W.-Duitsland).
Leitender Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Rieth.

Trefwoorden: Conserverende tandheelkunde - ZnO-eugenolciment

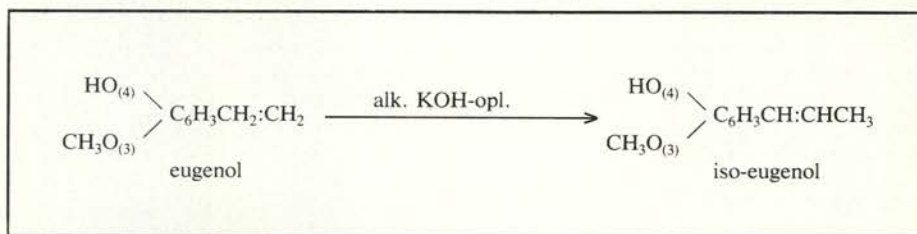
Inleiding

Afhankelijk van de keuze van het restauratiemateriaal kan men argumenten vinden om de bodem van een (diepe) caviteit vooraf met een onderlaagciment af te dekken. Het doel is de pulpa te beschermen tegen insulten. Deze kunnen van verschillende aard zijn: mechanisch, thermisch of chemisch. Ook kan een therapeutische werking beoogd worden.

Zonder op de chemische en farmaceutische werking van het zinkoxyde-eugenolciment in te willen gaan, kan men stellen dat de 'pijnstillende' werking van eugenol de voornaamste reden is van de grote populariteit in de tandheelkunde. Hiertegenover staat echter de wetenschap dat vrij eugenol eiwitten aantast (Brongersma, 1969) en dus aanleiding kan geven tot een toxische reactie. Een groot nadeel van het zinkoxyde-eugenolciment is derhalve zijn (initiele) giftigheid voor weefsel, die in een vers mengsel manifest is (Colman, 1962; Maizumi en Sauwerwein, 1962; Roydhouse en Weiss, 1964). Indien eugenol in contact komt met de vitale pulpa, kan het tot een coagulatieneecrose komen (Ehmer en Welker, 1972), die een uiterst ongunstige prognose heeft (Seufert, 1969). Een mogelijk bezwaar voor de patiënt is de slechte smaak en geur. Om hieraan tegemoet te komen werd een nieuw reuk- en smaakloos zinkoxyde eugenolciment (Iso-Protect^{*)} ontwikkeld. Dit werd nader op zijn

toxiciteit onderzocht. In dit cement is het eugenol door een isomeer (iso-eugenol) vervangen (Brauer et al., 1963; 1964.).

Door een alcoholische oplossing van kaliumhydroxyde wordt eugenol omgezet in iso-eugenol (Winkler Prins, 1950), volgens:



Het doel van dit onderzoek was het vergelijken van de toxiciteit van het nieuwe zinkoxyde-eugenolciment met enige andere in de tandheelkunde toegepaste cementen.

Materiaal en methode

Onderzocht werden:

1. Zinkoxyde-eugenolcimentpoeder Protect^{*)}.
2. Zinkoxyde-eugenolciment-vloeistof Protect^{*)}.
3. Zinkoxyde-eugenolciment-vloeistof Iso-Protect^{*)}.
4. Zinkoxyde-poeder (via universiteitsapotheek conform Deutsches Arzneibuch, 1968).
5. Eugenol^{**)} (via universiteitsapotheek, conform Deutsches Arzneibuch, 1968).
6. Zinkoxyde-eugenolciment verkregen door mengen van 1. en 2.
7. Zinkoxyde-eugenolciment verkregen

Samenvatting:

De celdodende eigenschappen van enige (iso-)eugenolen, zinkoxyde-poeders en hun cementmengsels werden in levende celculturen onderzocht. Na vervanging van eugenol door iso-eugenol kon een vermindering der toxische eigenschappen van aangemaakt zinkoxyde-eugenolciment niet worden vastgesteld, zodat het klinische voordeel van het reuk- en smaakloos zijn in dit geval prevaleert.

door mengen van 1. en 3. (reuk- en smaakloos).

8. Zinkoxyde-eugenolciment verkregen door mengen van 4. en 5.

Het mengen geschiedde volgens voorschrift van de fabrikant en door een geroutineerde tandartsassistente. De testmaterialen werden na een verhardingstijd (= de tijd verstreken tussen het begin van

het mengen en het begin van het onderzoek) van respectievelijk 1 en 24 uur afzonderlijk onderzocht.

Van deze materialen werden volgens de door Autain (1973) beschreven en op de United States Pharmacopeia XIX (1975) gebaseerde methode extracten gemaakt. In een afgesloten hittebestendige reageerbuis werd 4 gram van het te onderzoeken materiaal in 20 ml gedestilleerd water gebracht en gedurende 1 uur bij 121 °C en aansluitend langzame drukvermindering ge-autoclaveerd. Van het residu werd 0,5 ml nader onderzocht.

Als biologisch testsysteem functioneerden culturen van L-929 muizefibroblasten. Volgens de door Guess et al. (1965) beschreven methode werd op een zgn. monolayer een laag agar geapliceerd. Na een incubatietijd van 24 uur bij 37 °C in een met 5% CO₂ verrijkte atmosfeer werd een eventuele toxische reactie semi-kwalitatief (als hof van ontkleuring om het testmateriaal) en semi-kwantitatief (door bepaling van het percentage beschadigde cellen binnen deze hof) bepaald.

Resultaten

De resultaten zijn in de tabellen I, II en III samengevat.

^{*)} Standaard Dental Producten v/h C. F. Weiland, 's-Gravenhage.

^{**)} Eugenol is een olie met een sterke geur naar kruidnagelen en het hoofdbestanddeel van kruidnagel- en pimentolie (ca. 80%).

^{*)} Standaard Dental Producten v/h C. F. Weiland, 's-Gravenhage.

Tabel I. Toxiciteitsgraden der afzonderlijke cementcomponenten.

Materialen	Zonen-index m ± s.d.	Lysis-index m ± s.d.
ZOE-cementpoeder Protect	1 ± 0,5	1 ± 0,5
ZOE-cementvloeistof Protect	5 ± 0	5 ± 0
ZOE-cementvloeistof Iso-Protect	5 ± 0	5 ± 0
Zinkoxydepoeder (apotheek)	2 ± 0	2 ± 0
Eugenol (apotheek)	5 ± 0	4 ± 0

Tabel II. Toxiciteitsgraden van aangemengde zinkoxyde-eugenolcementen.

Materialen	Verhardings- tijd (h)	Zonen-index m ± s.d.	Lysis-index m ± s.d.
ZOE-cement Protect	1	1 ± 0	2 ± 0,5
	24	1 ± 0	1 ± 0,58
ZOE-cement Iso-Protect	1	1 ± 0	2 ± 0
	24	1 ± 0	2 ± 0
ZOE-cement (apotheek)	1	1 ± 0	2 ± 0,5
	24	1 ± 0	1 ± 0

Tabel III. Toxiciteitsgraden van de extracten van aangemengde zinkoxyde-eugenol.

Materialen	Verhardings- tijd (h)	Zonen-index m ± s.d.	Lysis-index m ± s.d.
ZOE-cement Protect	1	1 ± 0,82	1 ± 0,5
	24	1 ± 0,96	1 ± 0,5
ZOE-cement Iso-Protect	1	0 ± 0	0 ± 0
	24	0 ± 0	0 ± 0
ZOE-cement (apotheek)	1	1 ± 0,5	1 ± 0,5
	24	1 ± 0,5	2 ± 0,5



Afb. 2. Detailopname van afb. 1 (vergr. ca. 100 ×). Gezonde, gekleurde cellen.



Afb. 3. Detailopname van afb. 1 (vergr. ca. 100 ×). Beschadigde, gelyseerde cellen.



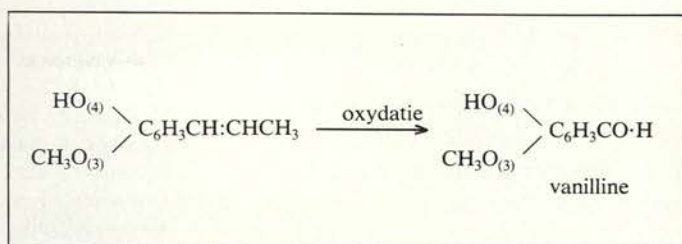
Afb. 1. Reactie van de muizefibroblasten op het zinkoxyde-iso-eugenolciment (vergr. ca. 25 ×). Van links naar rechts: testmateriaal (donker), beschadigde gelyseerde cellen en gezonde cellen (het overgangsgebied is aangegeven).



Afb. 4. Detailopname van afb. 1 (vergr. ca. 100 ×). Gelyseerde cellen (links) – overgangsgebied – gezonde cellen.



Afb. 5. Overzichtopname (vergr. ca. 25 ×). Totaal gelyseerde plaat als reactie op iso-eugenol (links: testmateriaal - donker). Opm.: Zelfde reactie is zichtbaar bij eugenol.



De in de literatuur beschreven toxiciteit van vers aangemengd zinkoxyde-eugenolcement (Roydhouse en Weiss, 1964); Colman, 1962; Maizumi en Sauerwein, 1962) kan door ons onderzoek niet worden aangetoond. Dit verschil in bevindingen zou misschien verklaard kunnen worden door het feit, dat in de genoemde literatuur de mengverhoudingen en de verhardingstijd niet duidelijk genoeg zijn aangegeven en derhalve niet meer vergelijkbaar zijn. Bovendien is bij de door ons gekozen testprocedure de diffusie van het testmateriaal door de agarlaag noodzakelijk alvorens een toxische reactie kan optreden en vast te stellen is (Spangberg, 1973). Aangezien etherische oliën slechts in geringe mate in water oplosbaar zijn, is een sterk concentratieverval in de agarlaag aanwezig. Deze is in onze proefopstelling zo groot, dat een sterke toxische reactie niet meer kan worden waargenomen. Het klinisch waarneembare, niet toxische gedrag van zinkoxyde-eugenolcementen ten opzichte van de pulpa, bij volledig intacte caviteitsbodem (Massler, 1956; Plant, 1970; Cook en Tayler, 1972; Klötzer en Langeland, 1973) kan op deze wijze worden verklaard en is daarom niet in tegenspraak met de gevonden in vitro resultaten. Immers, ook in de tand moeten toxische componenten van geapliceerde materialen een meer of minder lange diffusieweg afleggen, voordat een toxische (pulpa)-reactie kan worden opgeroepen en gediagnostiseerd. Omdat deze reactie dosisafhankelijk is, kan bij een groot concentratieverval de pulpa onbeïnvloed blijven. Wordt hetzelfde materiaal echter direct in contact met de pulpa gebracht dan leidt deze behandeling tot pulpanecrose.

Aan de hand van ons onderzoek ko-

In afbeelding 1 is de reactie op het geteste zinkoxyde-iso-eugenolcement (testmateriaal 7) na een verhardingstijd van 24 uur zichtbaar. De hof (als reactie van de mufibroblasten op het testmateriaal) is duidelijk te onderscheiden.

Afbeelding 2 toont de gezonde cellen, afbeelding 3 de beschadigde, terwijl de reactiegrens in afbeelding 4 vergroot is weergegeven. De cellulaire reactie op het iso-eugenol zelf (testmateriaal 3) wordt in afbeelding 5 getoond.

Discussie

De bij het zuivere eugenol (testmateriaal 5) waargenomen toxische reactie komt overeen met ander in-vitro onderzoek met aanverwante materialen (Maizumi en Sauerwein, 1962; Kreth et al., 1966; Hildebrand en De Renzis, 1974).

Het werkingsmechanisme van het eugenol is in dit verband nog onbekend. Kozam (1977) concludeert uit zijn onderzoek aan geïsoleerde ischiadicusenuwen van kikkers, dat eugenol direct, irreversibel en dosisafhankelijk op de neurieten inwerkt.

In ons onderzoek konden we aantonen, dat alle (iso-)eugenolen (testmaterialen 2, 3 en 5) sterk toxisch zijn. Op basis van overwegingen met betrekking tot de structuur en de activiteit van het molecuul (iso-verbindingen hebben in vergelijking met de overeenkomstige onvertakte moleculen een geringer oktanolwatercoëfficiënt

(Hansch, 1968) zou men een geringere toxiciteit van iso-verbindingen mogen verwachten (Iwasa et al., 1965; Purcell en Clayton, 1968). Deze opvatting kon door ons onderzoek niet worden bevestigd.

Zinkoxyde reageert in alle gevallen (testmateriaal 1 en 4) toxisch, zij het in mindere mate dan de onderzochte etherische oliën. Deze toxiciteit komt overeen met de (geringe) antibacteriële werking (Fischer, 1974); deze relatie is conform eerder gepubliceerd onderzoek (Ikeda, 1971).

De cementmengsels (testmateriaal 6, 7 en 8) vertonen een geringe, doch duidelijke toxiciteit. Bij het zinkoxyde-iso-eugenolcement is deze ook nog na een verhardingstijd van 24 uur onveranderd aantoonbaar, terwijl bij de andere cementmengsels een reductie is waar te nemen.

Bij het onderzoek van de extracten vertoont het iso-preparaat geen enkele cytotoxische reactie meer. Hierbij moet men zich realiseren, dat door het beschreven extractieprocedé het testmateriaal eventueel aan veranderingen onderhevig was.

De door oxydatie te veroorzaken overgang van iso-eugenol naar vanilline is in dit verband niet uit te sluiten (Winkler Prins, 1950). Uit deze resultaten kan men concluderen, dat het iso-eugenol minder stabiel of vluchtiger dan eugenol moet zijn.

men wij tot de conclusie, dat door de vervanging van eugenol door iso-eugenol in zinkoxyde-eugenolcementen de celdodende eigenschappen niet veranderd worden en het met iso-eugenol vervaardigde eindproduct zich slechts door zijn klinisch prettige verschijningsvorm (reuk- en smaakloos) van de andere onderscheidt.

Dit fenomeen heeft zich inmiddels bij de kinderbehandeling als uiterst waardevol bewezen.

Summary:

The cytotoxic character of some (iso-)eugenol, zinc oxide powders and their cement mixes respectively were investigated in living cell cultures.

A replacement of eugenol by iso-eugenol in the cement showed no reduction of the toxic reactions to the test system. Therefore, the odour and tastelessness are the only advantages of clinical interest.

Literatuur:

1. Autain, J. (1973): The new field of plastics toxicology methods. CPR Press.
2. Brauer, G. M., Morris, R. W., Howe, W. B. (1963): Synthesis of isomers of eugenol. J Res Nat Bur Stand (US) 67A: 253.
3. Brauer, G. M., Argentar, H., Durany, G. (1964): Ionization constants and reactivity of isomers of eugenol. J Res Nat Bur Stand (US) 86A: 619.
4. Brongersma, A. J. (1969): Problemen bij de indirecte pulpa-overkapping. Uitg. Stafleu/Tholen, Leiden.
5. Colman, G. (1962): A study of some antimicrobial agents used in oral surgery. Brit Dent J 113:22.
6. Cook, D. J., Taylor, P. P. (1972): Tissue reactions of improved zinc oxide-eugenol cements. J Dent Child 40:199.
7. Deutsches Arzneibuch (1968): Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 7e editie.
8. Ehmer, D., Welker, D. (1972): Untersuchungen der abdichtenden bakteriostatischen, hämolytischen und eiweissfällenden Eigenschaften von Phosphat-, EBA- und Polyacrylat-Zementen. Dtsch Stomat 22:328.
9. Fischer T. (1974): On 8-hydroxyquinoline-zinc oxide incompatibility. Dermatologica 149:129.
10. Guess, W. L., Rosenblut, S. A., Schmidt, B., Autain, J. (1965): Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J Pharm Sci 54: 1545.
11. Hansch, C. (1968): The use of substituent constants in drug modification. II Farm 23:293.
12. Hildebrand, C. DeRenzis, F. (1974): Effect of periodontal dressings on fibroblasts in vitro. J Periodont Res 9:114.
13. Ikeda, T. (1971): Relation between irritant and antibactericid action of drugs. Congres van de Tissue Culture Society for Dental Research, Tokyo.
14. Iwasa, J., Fujita, T., Hansch, C. (1965): Substituent constants for aliphatic functions obtained from partitioning coefficients. J Med Chem 8:150.
15. Klötzer, W. T., Langeland, K. (1973): Tierexperimentelle Prüfung von Materialien und Methoden der Kronen- und Brückenprothetik. Schweiz Mschr Zahnheilkd 83:163.
16. Kozam, G. (1977): The effect of eugenol on nerve transmission. Oral Surg 44:799.
17. Kreth, K. K., Zimmermann, E. R., Collings, C. K. (1966): Effect of periodontal dressings on tissue culture cells. J Periodontol 37:48.
18. Maizumi, H., Sauerwein, E. (1962): Die Wirkung verschiedener Vitalerhaltung- und Würzelfüllmittel auf Gewebekulturen. Dtsch Zahnärztl Z 17:1628.
19. Massler, M. (1957): Effects of filling materials on the pulp. N Y St Dent J 26:183.
20. Plant, C. G. (1970): The effect of polycarboxylate cement on the dental pulp. Brit Dent J 129:424.
21. Purcell, W. P., Clayton, J. M. (1968): Application of regression analyses to antitumor activities of various acetylenic carbamates. J Med Chem 11:199.
22. Roydhouse, R. H., Weiss, M. E. (1964): Tissue reaction to restorative materials (abstract). J Dent Res 43:807.
23. Seufert, G. (1969): Zinkoxid-Nelkenöl bzw. Zinkoxid-Eugenol und seine Verwendung bei der indirekten und direkten Überkapping. Med. Diss., Bonn.
24. Spangberg, L. (1973): Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. Oral Surg 35:389.
25. United States Pharmacopeia XIX (1975): Biological tests-plastic containers. Mack Publishing Co., Easton, P. 644.
26. Winkler Prins Encyclopaedie (1950): Eugenol. Elsevier, Amsterdam-Brussel. P. 354.

Oktober 1978. Adres: Osianderstrasse 2-8, D-7400 Tübingen 1, West-Duitsland.