

Aus der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Direktor: Prof. Dr. H. Günay (komm.))
Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der
Medizinischen Hochschule Hannover

**Interaktive biologische Effekte von
organischen Kompositbestandteilen und Natriumfluorid**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Renald Trempetic
aus Bielefeld

Hannover 2005

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 16.03.2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. Hüsamettin Günay
Referent:	Priv. –Doz. Dr. Michael Eisenburger
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. André Eckardt
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2006

Promotionsausschussmitglieder:	Prof. Dr. Dr. Nils-Claudius Gellrich
	Prof. Dr. Hartmut Hagemann
	Prof. Dr. Peter Vogt

meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
1 EINLEITUNG	3
1.1 Zusammensetzung der Kompositmaterialien.....	3
1.1.1 Organische Bestandteile von Kompositen	3
1.1.2 Anorganische Bestandteile von Kompositen	5
1.1.3 Verbindung von organischer und anorganischer Komponente	6
1.1.4 Polymerisation.....	7
1.1.5 Degradation von Kompositmaterialien	8
1.2 Natriumfluorid	14
1.3 Biokompatibilität	16
1.4 In-vitro-Testverfahren zur Zytotoxizitätsprüfung von Kompositen	18
1.5 Problemstellung	21
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Organische Testmaterialien	22
2.1.2 Anorganisches Testmaterial	25
2.1.3 Zellen	26
2.1.4 Zellkulturmedien und Lösungen	26
2.1.5 Materialien für Mikrotiterplattenassays	27
2.2 Methoden	29
2.2.1 Zellkultur	29
2.2.2 Herstellung der Inkubationslösungen	29
2.2.3 Zytotoxizitätsassays mit XTT	31
2.2.4 Zytotoxizitätsassays mit Bisbenzimid Hoechst 33342	34
2.2.5 Mikroskopie	35
2.2.6 Statistische Auswertung	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Die In-vitro-Zytotoxizität von Natriumfluorid	36
3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse für Natriumfluorid.....	36
3.2 Die In-vitro-Zytotoxizität von Resinmonomeren bei An- bzw. Abwesenheit von Natriumfluorid	38

3.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse für UDMA	38
3.2.2	Zusammenfassung der Ergebnisse für Bis-GMA.....	40
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse für HEMA.....	42
3.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse für TEGDMA.....	44
3.3	Bestimmung der effektiven Dosis (ED₅₀) der organischen	
	Testsubstanzen für Einzel- und Kombinationsbehandlungen	49
3.4	Mikroskopische Auswertung der Zytotoxizität.....	51
4	DISKUSSION.....	60
4.1	Zytotoxizität von Natriumfluorid	61
4.2	Zytotoxizität von Kompositmonomeren.....	63
4.2.1	UDMA	64
4.2.2	Bis-GMA.....	65
4.2.3	HEMA.....	66
4.2.4	TEGDMA.....	68
4.3	Interaktive Effekte	71
4.4	Schlussfolgerung.....	72
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG	91
7.1	Abkürzungen	91
7.2	Tabellen	93
7.3	Danksagung	96
7.4	Lebenslauf	97

1 EINLEITUNG

1.1 Zusammensetzung der Kompositmaterialien

Zahnärztliche Komposit – Füllungsmaterialien bestehen aus einer organischen und einer anorganischen Komponente, die durch eine dritte Komponente, in der Regel ein Silan, verbunden werden. Die modernen zahnärztlichen Kompositmaterialien bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Bestandteile, welche die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Werkstoffes determinieren. Die Idee, höhermolekulare organische Substanzen (Bis-GMA) mit anorganischen Substanzen (Silikat) zu kombinieren und dadurch sowohl die Polymerisationsschrumpfung zu reduzieren, als auch gleichzeitig die Abriebfestigkeit zu erhöhen, geht auf BOWEN im Jahre 1963 zurück [13].

Besonders entscheidend für die klinische Anwendbarkeit dieses neuen Kunststoffes war dessen niedrigerer Restmonomergehalt und die damit verbundene geringere iatrogene Schädigung der Zahnpulpa im Vergleich zu den seinerzeit gebräuchlichen Füllungskunststoffen.

Grundsätzlich lassen sich chemisch härtende Komposite, lichthärtende Komposite und sogenannte Duale Systeme (härteten sowohl chemisch als auch lichtinduziert aus) unterscheiden. Unabhängig von der Art der Aushärtung wird die Polymerisation durch Aktivierung eines organischen Initiatormoleküls eingeleitet, welches in Radikale umgesetzt wird und so den Vernetzungsvorgang der Monomergruppen einleitet. Die Aktivierung dieser Initiatoren kann entweder chemisch oder durch energiereiche Strahlung (Licht) erfolgen. Heutzutage werden fast ausschließlich photopolymerisierende Materialien verwendet [126].

1.1.1 Organische Bestandteile von Kompositen

Die organische Komponente eines Komposites wird als Matrix bezeichnet und besteht aus Monomeren, Komonomeren und unterschiedlichen Additiven. Die niedermolekularen Komonomere fungieren als Verdünner, um eine größere Menge anorganischer Füllstoffe in die sonst sehr visköse Matrix einbetten zu können. Unter den Additiven subsumieren sich eine Vielzahl von Substanzen wie Initiatoren, Koinitiatoren, Inhibitoren und Photostabilisatoren [32;52;128].

Zu den heute verwendeten Matrixmonomeren zählen als wichtigste Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA) sowie ethoxyliertes Bisphenol-A (Bis-EMA) und Dimethanol-tricyclodecan-diacrylat (DMTCDDA).

Weitere Monomere sind Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Benzylmethacrylat (BEMA). Ferner finden Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA), Diethylenglycoldimethacrylat (DEGDMA) und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) Verwendung als Komonomere. Diese Monomere bilden die Matrix der Komposite, indem sie bei der Polymerisation miteinander vernetzen und so aushärten. In diese Polymermatrix sind die anorganischen Füllstoffe eingebettet [83]. Um einen höheren Füllstoffgehalt des Komposites zu gewährleisten, bedient man sich niedermolekularer Komonomere (DEGDMA, TEGDMA, etc.), welche die Funktion eines Verdünners haben. Dadurch lässt sich der Füllstoffgehalt der Komposite auf bis zu 85 Gew.% erhöhen [22]. Durch die Verwendung von viskositätssenkenden Komonomeren erhöht sich jedoch der Restmonomergehalt des auspolymerisierten Komposites, da die Komonomere nur zu einem geringen Teil mit den Basismonomeren zur Matrix polymerisieren. Untersuchungen von SPAHL, BUDZIKIEWICZ und GEURTSEN ergaben, dass die Komonomere (Verdünner) den höchsten Anteil an Restmonomeren stellen [118;119].

Die Polymerisationsreaktion wird durch einen Initiator gestartet und von diesem unterhalten. Dieser Initiator ist ebenfalls Bestandteil der organischen Phase und initiiert als hochreaktives Radikal die Verkettung der Monomere zu Polymerketten. Bei den chemisch härtenden Kompositen ist der meistens verwendete Initiator Dibenzoylperoxid (DBP). Photopolymerisierende Komposite enthalten als Initiator Campherchinon (CQ), welches durch Licht der Wellenlänge 470 nm aktiviert wird.

Weitere organische Bestandteile von Kompositen sind die Koinitiatoren, Photostabilisatoren und Inhibitoren. Als Koinitiatoren kommen tertiäre Amine, wie Diethylaminoethanol (DEAE) oder Dimethylaminobenzoesäureethylester (DMABEE), zum Einsatz. Sie wirken als Akzeleratoren.

Als Photostabilisatoren kommen oft 2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenon (HMBP), Triphenylphosphan (TPP) oder Triphenylstiban (TPSb) vor. Diese werden den Kompositen beigesetzt, um im Laufe der Zeit lichtinduzierte Diskoloration zu vermeiden. Um eine vorzeitige Polymerisation während der Verarbeitung des Komposites zu verhindern, werden diesem Inhibitoren, die als Antioxidantien

fungieren, zugesetzt. Diese Antioxidantien erhöhen die Lagerbarkeit, indem sie die Spontanpolymerisation im Vorratsgefäß verhindern [96]. Der am häufigsten eingesetzte Inhibitor ist „butyliertes Hydroxytoluol“ (BHT).

1.1.2 Anorganische Bestandteile von Kompositen

Die anorganischen Bestandteile der Komposite sind die Füllstoffe, welche für die mechanischen Eigenschaften der Füllungskunststoffe verantwortlich sind. In modernen Feinpartikel-Hybridkompositen erreichen sie mitunter Füllstoffanteile von bis zu 85 Gew.%, mindestens jedoch 50 Gew.% [3]. Je höher der Füllstoffanteil eines Komposites ist, desto geringer ist die Polymerisationsschrumpfung, desto geringer ist der Randspalt zwischen Kavitätenwand und Restaurationsmaterial und desto geringer ist der Restmonomergehalt [3;18;41;78]

Die Oberflächenbeschaffenheit korreliert stark mit der Partikelgröße der im Komposit verwendeten anorganischen Füllstoffe. Je größer die Korn- bzw. Partikelgröße, desto schlechter polierbar wird die Oberfläche, was der Adhäsion von Plaque und Mikroorganismen Vorschub leistet. Durch die anorganische Phase eines Komposites wird dessen Abrieb-, Druck- und Zugfestigkeit maßgeblich bestimmt [40;67]. LUTZ et al. [77], teilen die Komposite nach den Partikelgrößen ihrer Füllstoffe ein. Sie unterscheiden konventionelle Komposite, homogene respektive inhomogene Mikrofüllerkomposite und Hybridkomposite Typ I bis Typ IV.

Anorganische Kompositbestandteile der Partikelgröße 0,1-100 µm werden als Makrofüller bezeichnet, Füllstoffe, deren Partikelgröße geringer als 0,1 µm ist, als Mikrofüller. Hybridkomposite enthalten sowohl Mikro- als auch Makrofüller.

Als Makrofüller werden meist Quarze, Glas oder Keramik verwendet wie zum Beispiel Barium-Glas, Strontium-Glas oder Lithium-Aluminium-Silikat. Die Glaspartikel werden zum Zwecke der röntgenologischen Sichtbarkeit mit röntgenopaken Schwermetallen wie Barium, Strontium, Zink oder Zirkonium versetzt, um die Randständigkeit von Kompositfüllungen röntgenologisch kontrollieren und evtl. aufgetretene Sekundärkaries diagnostizieren zu können.

Reine Makrofüllerkomposite werden heutzutage äußerst selten verwendet, da ihre physikalisch-mechanischen Eigenschaften für heutige Verhältnisse mangelhaft sind. Makrofüller lassen sich schlecht polieren. Der große Härteunterschied zwischen Makrofüllerpartikel und Matrix bedingt ein Herausbrechen der Füller unter

Kaubelastung, worin das schlechte Abrasionsverhalten dieser Komposite begründet liegt [29;30;33]. Als Mikrofüller werden äußerst feine SiO_2 – Partikel, deren Durchmesser im Nanometerbereich (7–40 nm) liegen, verwendet. Diese Mikrofüllerpartikel, auch amorphes Silika genannt, werden durch Hydrolyse von Siliziumtetrachlorid in einer Knallgasflamme synthetisiert. Auch Mikrofüllerkomposite können durch Zugabe von röntgenopaken Substanzen (z.B.: Ytterbium-Trifluorid) röntgenologisch sichtbar gemacht werden. Bei Mikrofüllerkompositen lässt sich ein Füllstoffgehalt von ca. 70-80% erreichen. Sie sind polierbar und aufgrund ihrer geringen Partikelgröße ($<$ Wellenlänge des sichtbaren Lichtes) werden nach Füllerverlusten an der Oberfläche keine Rauigkeiten sichtbar. Mikrogefüllte Komposite sind verschleißfester als Makrofüllerkomposite, da die Füllkörper gleichmäßiger an der Oberfläche verteilt liegen. Somit vermag auch stark abrasive Nahrung nicht die Partikel aus der Matrix herauszureißen oder diese selbst anzugreifen. Die Nachteile von Mikrofüllerkompositen werden unter anderem in der höheren Wasseraufnahme und der größeren Polymerisationsschrumpfung im Vergleich zu konventionellen Kompositen gesehen. Ein Vorteil jedoch ist die höhere Druckfestigkeit [89]. Um die positiven Eigenschaften beider Systeme zu kombinieren, wurden die Hybridkomposite entwickelt. Diese bestehen zu 85-90 Gew.% aus Makrofüllern und zu 10-15 Gew.% aus Mikrofüllern. Dadurch erreicht man eine Steigerung des Füllkörpergehaltes des gesamten Materials auf 85%. Feinstpartikelhybride besitzen Makrofüller mit einer Partikelgröße von weniger als 2 μm und sind polierbar. Die Abriebfestigkeit ist mit der von Mikrofüllerkompositen vergleichbar. Hybridkomposite besitzen eine geringe Polymerisationsschrumpfung, wodurch eine gute Randständigkeit und Volumenkonstanz erreicht wird. Die Röntgenopazität ist durch die Zugabe von entsprechenden Makrofüllern unproblematisch zu erreichen. Das ästhetische Erscheinungsbild von Restaurationen mit Feinsthybridkompositen ist, mittel- und langfristig gesehen, dem der Mikrofüllerkomposite überlegen.

1.1.3 Verbindung von organischer und anorganischer Komponente

Da die Komposite aus organischen und anorganischen Bestandteilen bestehen und eine direkte Verbindung beider Phasen nicht möglich ist, benötigt man eine dritte Komponente, die als Verbinder zwischen diesen Phasen fungiert.

Dieser Verbinder muss sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften in sich vereinen. Man verwendet hierzu ein *Silan*. In der Regel handelt es sich hierbei um trifunktionelle, ungesättigte Alkoxysilane (z.B.: 3-Methacryloxypropyl-Trimethoxysilan), welche durch Esterbindung ihrer Alkoxy-Gruppen chemisch an die Silanolgruppen an der Silicatoberfläche der Füllstoffe binden (Hydrophobierung der anorganischen Füllstoffe). Diese silanisierten Füllstoffpartikel werden dann durch die Polymerisation des Methacrylsäurerestes des Silans mit den organischen Bestandteilen des Komposites (Matrix) chemisch verbunden [126]. Durch diese Einbindung der anorganischen Bestandteile in die Matrix des Komposites werden dessen mechanische Eigenschaften (Biegefestigkeit, Druckfestigkeit, Vickers-Härte) deutlich erhöht. Jedoch muss angemerkt werden, dass diese Verbindung die Schwachstelle der Komposite darstellt, da durch saure Hydrolyse dieser Verbund gelöst werden kann, wodurch es zum Verlust der Füllstoffe kommt und in Folge dessen zu einem höheren Verschleiß.

1.1.4 Polymerisation

Die meisten heute verwendeten Komposite sind photochemisch polymerisierende Komposite. Dabei wird der Photoinitiator (meist Campherchinon) durch die Energie der Lichtquanten aktiviert und geht mit einem Reduktionsagens, einem tertiären Amin (z.B.: DEAE, DMABEE), eine Reaktion ein. Es entsteht ein angeregter, instabiler Komplex, der in Radikale zerfällt und die Polymerisationsreaktion der Monomere zu Polymeren startet [39]. Während der Polymerisation werden nicht alle Doppelbindungen der Kompositmaterialien umgesetzt. Diese unvollständige Polymerisation wird *Monomer-Polymer-Konversion* genannt und liegt zwischen 35-77%. Dies deutet auf einen im Polymer verbleibenden Restmonomergehalt hin [4;5;18;42;52;118]. Weiterhin entstehen bei der Polymerisation der Komposite zusätzlich organische Verbindungen als Reaktions- oder Abbauprodukte. Bei einigen von ihnen ist die Herkunft bekannt, wie zum Beispiel bei Camphersäureanhydrid (CSA) und Hydroxyepicampher (HC), welche sich vom Photoinitiator Campherchinon (CQ) ableiten. Bei anderen hingegen, wie zum Beispiel bei Benzoesäuremethylester (BME) und 2-Ethylhexansäure (EHS) ist die Herkunft unklar [119]. Neben den Matrixmonomeren verbleiben ebenfalls Initiatoren und Stabilisatoren, zum Teil unreaigiert, in der polymerisierten Matrix.

Alle diese Substanzen besitzen ein toxikologisches Potential. Die Identifizierung der im auspolymerisierten Material vorhandenen Restmonomere, Additiva und neu entstandenen Reaktionsprodukte und deren allergisierendes bzw. toxikologisches oder teratogenes Potential sind Gegenstand aktueller Forschungen [2;54;74;102;119].

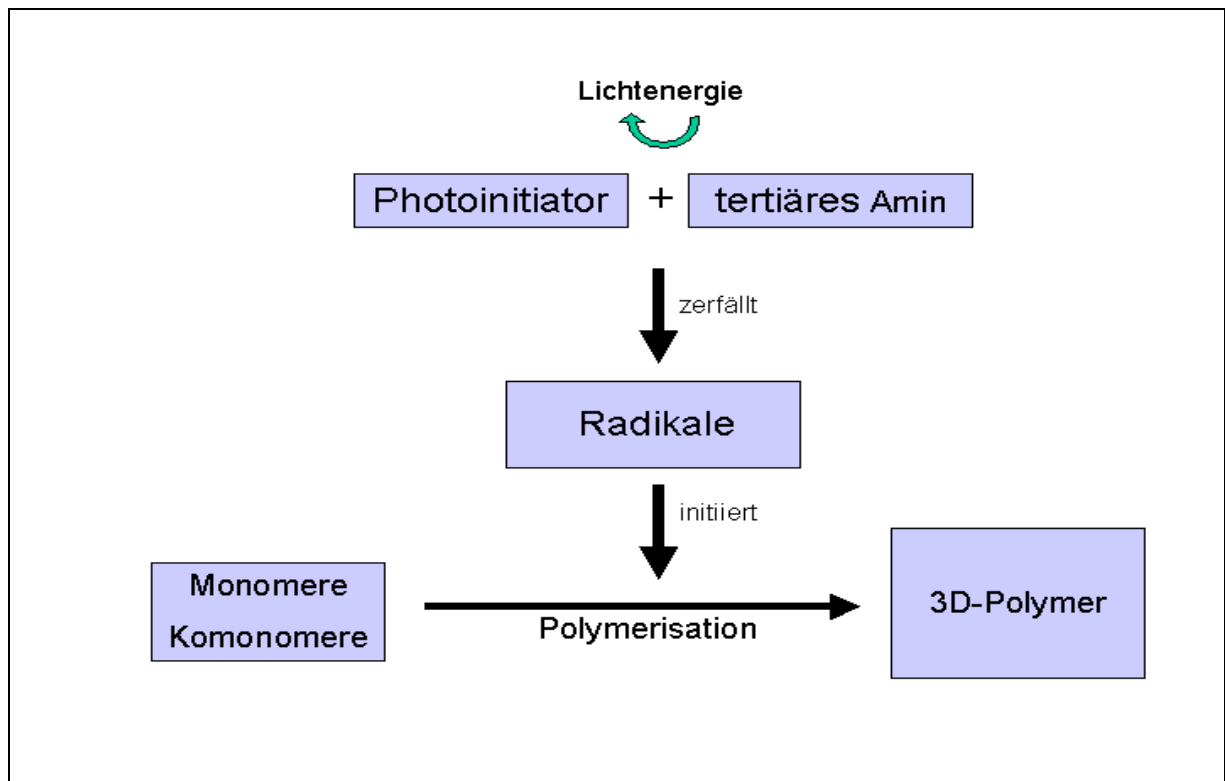


Abb. 1.1 Initiierung und Ablauf der Polymerisation eines Komposites

1.1.5 Degradation von Kompositmaterialien

Die Entwicklung in der Zahnheilkunde von der Verwendung relativ inerter Werkstoffe (Gold, Amalgam) hin zu vielseitigen, chemisch aktiven Substanzen, wie sie die Komposite darstellen, brachte die Notwendigkeit mit sich zu untersuchen, welche der Materialkomponenten durch Elution in das orale Milieu abgegeben werden können.

So wurden die einzelnen Bestandteile der heute verwendeten Komposite in unterschiedlichen Verfahren im Hinblick auf zellschädigendes Potential untersucht. Das Augenmerk wurde hierbei besonders auf die in Kompositpolymerisaten aufgrund der schlechten Monomer-Polymer-Konversion enthaltenen Residualmonomere

gerichtet. So untersuchten SPAHL et al. im Jahre 1991 Methanol- und Wasserextrakte von polymerisierten und nicht polymerisierten, lighthärtenden Hybridkompositen auf eluierbare organische Verbindungen und wiesen diese mit Hilfe der Gaschromatographie bzw. Massenspektroskopie nach [119]. Aus allen polymerisierten Prüfkörpern ließen sich mit Methanol mehr Komponenten extrahieren als aus den entsprechenden nicht polymerisierten Materialien. SPAHL et al. zogen aus den Ergebnissen den Rückschluss, dass während der Polymerisation zusätzliche Reaktions- und Abbauprodukte entstehen [118]. Bei den entstandenen Verbindungen handelte es sich um Reaktionsprodukte (CSA, HC) des Photoinitiators Campherchinon und um Verbindungen wie Benzoessäuremethylester (BME) und 2-Ethylhexansäure (EHS), welche von unklarer Herkunft sind. Weiterhin wurden die Matrixmonomere Bis-GMA, UDMA, sowie das Komonomer TEGDMA und der Photoinitiator Campherchinon (CQ) identifiziert. Im Wasserextrakt der ausgehärteten und nichtpolymerisierten Prüfkörper wurde nur das Komonomer TEGDMA nachgewiesen. Aus den Ergebnissen schlossen die Autoren, dass auch nach der Härtung alle in den unpolymerisierten Materialien enthaltenen Verbindungen extrahierbar sind, wobei es sich ihrer Meinung nach nicht um Depolymerisationsprodukte des ausgehärteten Kunststoffes, sondern um Restmonomere handelte. Ihren Untersuchungen zufolge können in wässrigen Extrakten nur die Substanzen nachgewiesen werden, die in hoher Konzentration in den Kunststoffen enthalten sind. Dies traf nur für TEGDMA zu. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich im Verlauf der Polymerisation der Anteil an polymerisierbaren Substanzen stetig verringerte und der Anteil der Initiatoren, Komonomere und Photoakzeleratoren im Verhältnis dazu zunahm. Nach dem *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)* des *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)* sind alle diese Substanzen als entweder reizend, ätzend oder toxisch klassifiziert.

In ähnlichen Studien über die Eluierbarkeit von Kompositbestandteilen kamen auch FERRACANE et al. [28;31;32] zu dem Ergebnis, dass ein signifikanter Teil an Residualmonomeren oder kurzkettigen Polymeren ungebunden an das übrige Matrixgerüst im auspolymerisierten Werkstoff vorhanden sein muss. FERRACANE beobachtete bei seinen Untersuchungen, dass sowohl Restmonomere, Füllerpartikel als auch Additiva innerhalb von wenigen Tagen aus Kompositen eluieren, nachdem

der Werkstoff in verschiedene Extraktionsmedien gegeben wurde. Der Anteil der eluierten Substanzen eines Komposites machte ungefähr 2 Gew.% der organischen Komponente aus. Nach seiner Auffassung ist die Eluierbarkeit der Kompositbestandteile in organischen Extraktionsmedien effektiver als in Wasser und direkt abhängig von den Löslichkeitsparametern des Extraktionsmediums. Zudem liege die Elutionsrate in der Mundhöhle zwischen den experimentell bestimmten Werten für die Extraktionsmedien Ethanol und Wasser [28;32].

Diese und weitere zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass organische Bestandteile aus ausgehärteten Kompositen eluieren können. So zeigten ÖRTENGREN et al. mittels HPLC - Analyse, dass hauptsächlich TEGDMA aus Kompositmaterialien eluiert, und dass die maximale Monomerkonzentration nach 7 Tagen in den wässrigen Eluaten nachgewiesen werden kann [87]. PELKA et al. wiesen ebenfalls die Elution von TEGDMA aus ausgehärteten Kompositmaterialien nach, wobei sie höhere Konzentrationen des Monomers in den Eluaten nachwiesen, bei denen die Probenkörper eine Sauerstoffinhibitionsschicht aufwiesen. In saurem Milieu sank die Konzentration von TEGDMA im Eluat, wobei die Konzentration von Methacrylsäuren stieg [92]. WILLERSHAUSEN et al. untersuchten neben den Parametern Zellzahl, Zellvitalität und Proteingehalt auch die Freisetzung des Entzündungsmediators Prostaglandin (PGE subset 2) in Fibroblastenzellen nach Kontakt mit Eluaten verschiedener Komposite. Sie konnten bei den sechs unterschiedlich zusammengesetzten Kompositmaterialien stoffspezifische Variabilitäten der Parameter Zellzahl, Zellvitalität und Proteingehalt nachweisen, die Unterschiede im Hinblick auf die Freisetzung von PGE waren jedoch marginal [132]. Alle organischen Bestandteile von Kompositen können in organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Methanol, nach der Polymerisation extrahiert werden. GEURTSSEN konnte nachweisen, dass einige dieser Komponenten auch in wässrigem Milieu nachweisbar sind. So wurden Bis-GMA, UDMA, EGDMA, DEGDMA, 1,6-Hexandioldimethacrylat, Campherchinon, 4-N,N-dimethylaminobenzolsäureethylester und zahlreiche andere Substanzen in geringeren Konzentrationen in wässrigen Lösungen extrahiert [41]. Nach Untersuchungen von KOCH et al. setzte eine Vielzahl von Kompositmaterialien über einen längeren Zeitraum (115 Tage) Formaldehyd in Wasser frei. Dieses Degradationsprodukt wurde besonders bei den Probekörpern mit einer unpolymerisierten Sauerstoffinhibitionsschicht nachgewiesen. Das

freigesetzte Formaldehyd erreichte zum Teil Konzentrationen, die nach Meinung der Autoren ausreichen, um lokale allergische Reaktionen hervorzurufen [71]. SPAHL et al. analysierten die eluierbaren Bestandteile von vier kommerziell vertriebenen zahnärztlichen Hybridkompositen anhand von Gas- und Flüssigkeitschromatographie respektive Massenspektroskopie. Nach Elution in Methanol respektive Wasser konnten sie in allen untersuchten Lösungen sowohl (Ko)monomere und eine Vielzahl Additiva als auch herstellungstechnisch bedingte Verunreinigungen nachweisen. Auch konnten sie im Methanoleluat aus den polymerisierten Probekörpern nahezu jede Einzelkomponente des unpolymerisierten Komposites nachweisen. Im wässrigen Eluat wurden jedoch nur einige wenige Einzelbestandteile nachgewiesen. Insbesondere zeigten sich in den Eluaten Konzentrationen von TEGDMA, welche höher waren, als die, die in Zellkulturuntersuchungen mit primären menschlichen oralen Fibroblasten für toxisch befunden wurden [119]. MÜLLER et al. untersuchten die Freisetzung von TEGDMA aus zwei unterschiedlichen Kompositmatrizes in destilliertem Wasser. Die eine Matrix bestand aus UDMA und TEGDMA, die andere aus Bis-GMA und TEGDMA. Beide Matrizes enthielten einen Anteil von 50 Gew.% TEGDMA. Die Autoren beobachteten eine doppelt so hohe Freisetzung von TEGDMA bei der Bis-GMA/TEGDMA Matrix im Vergleich zur UDMA/TEGDMA Matrix. Weiterhin stellten sie fest, dass weder die Füllstoffzusammensetzung noch die Silanisierungsmethode der Füllerpartikel eines Komposites einen Einfluss auf die Eluierbarkeit von Matrixmonomeren haben [83].

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die potentielle schädigende Wirkung dieser eluierbaren Substanzen auf Gewebe und Zellen zu untersuchen. Bisher wurden eine Reihe von In-vitro- und In-vivo-Studien zur Zytotoxizität und Genotoxizität restaurativer Füllungsmaterialien durchgeführt, die zu unterschiedlichen Resultaten geführt haben. Die einzelnen In-vitro-Studien zur Zytotoxizität unterscheiden sich in sofern voneinander, dass bei den Versuchsansätzen die Wirkungsweise auf unterschiedliche Zielgewebe untersucht wurde. Als Zielgewebe kommen hauptsächlich Dauerzelllinien und Primärkulturen oraler und dentaler Gewebe von Mensch und Tier zur Anwendung. Ein weiterer Unterschied besteht in der Applikationsform der Testsubstanz auf die Zielgewebe. Häufig werden Eluate, Verdünnungen, Gemische oder Kontakt-Probekörper verwendet. In Kapitel 1.4

werden die heutzutage gängigsten In-vitro-Zytotoxizitätstestverfahren zur Materialtestung in der Zahnheilkunde erläutert.

In den unterschiedlichen Versuchsansätzen liegt der Grund für die quantitativen Variabilitäten der Resultate begründet. So testeten HUANG et al. die Eluate ausgehärteter Komposite, Kompomere und Glasionomerezemente nach zwei respektive fünf Tagen Elution im Kulturmedium an menschlichen Pulpazellen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnten sie bezüglich der drei Materialgruppen lediglich die Aussage treffen, dass alle getesteten Materialien zellschädigend auf menschliche Pulpazellen wirken können [68]. LEFEBVRE et al. untersuchten die Langzeitzytotoxizität subletaler Konzentrationen von TEGDMA und Bis-GMA anhand von menschlichen THP-1 Monozyten. Dabei setzten sie die Zellen jeweils fünf Wochen lang TEGDMA - Konzentrationen von 100 – 400 µmol/l respektive 1 - 25 µmol/l Bis-GMA aus und bestimmten wöchentlich Zellproliferation, Succinatdehydrogenaseaktivität (MTT) und den Proteingehalt der Zellen. So fanden sie heraus, dass die Zellen auf TEGDMA und Bis-GMA unterschiedlich reagieren. TEGDMA hatte keinen Einfluss auf die Proliferation und den Proteingehalt der Zellen. Initial jedoch war eine Steigerung der Succinatdehydrogenaseaktivität zu beobachten, welche in der zweiten Woche deutlich abnahm und ab der dritten Woche wieder leicht anstieg. Im Gegensatz dazu beobachteten die Autoren bei Bis-GMA eine deutliche Proliferationshemmung. Auf die beiden anderen Parameter hatte das Monomer jedoch keinen Einfluss [73]. Die Zytotoxizitätstests von CAMPS et al. basierten auf Dentinbarrierediffusionstests, um die Situation *in vivo* möglichst realitätsnah wiedergeben zu können. Sie simulierten ebenfalls den Gewebedruck der Pulpa und stellten fest, dass dieses die Zytotoxizität der *in vitro* getesteten Materialien erhöhte [17]. ADAMS et al. führten ihre Versuche ebenfalls im Barrierediffusionstest durch, wobei sie sowohl menschliche Dentinscheiben als auch labortechnisch genutzte Filterscheiben als Barriere verwendet haben. Sie untersuchten die Zytotoxizität von sieben Glasionomerezementen. Ihre Rückschlüsse auf die Zellschädigung zogen sie anhand zytopathologischer Auswertungen unter dem Inversmikroskop [1]. ENGELMANN et al. untersuchten anhand von 3T3-Mausfibroblasten den Zellmetabolismus und dessen Veränderung in Anwesenheit von TEGDMA und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (HMBP) anhand der Kernmagnetresonanz – Spektroskopie (NMR-Spektroskopie). So untersuchten sie

Zellextrakte und Kulturmedien nach 24-Stunden Inkubation mit den Testsubstanzen. Die Autoren konnten TEGDMA in der Lipidfraktion, dem Zytosol und im Kulturmedium nachweisen, während HMBP lediglich in der Lipidfraktion nachweisbar war. TEGDMA erhöhte den Anteil von Phosphomonoestern und reduzierte die Phosphodiester. Der Phospholipidgehalt und die Zusammensetzung der Zellmembranen war trotz des erhöhten Phospholipidumsatzes in Anwesenheit von TEGDMA unverändert. TEGDMA veränderte den metabolischen Zustand der Zellen, was durch die leichte Abnahme der Nukleosidtriphosphate und den Anstieg der Ratio Nukleosiddiphosphat zu Nukleosidtriphosphat angezeigt wurde. Nach Meinung der Autoren war der bedeutendste Effekt von TEGDMA das nahezu vollständige Absinken der intrazellulären Glutathionlevel. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass durch die NMR-Spektroskopie von Zell – Material – Interaktionen metabolische Effekte von organischen Testsubstanzen aufgedeckt werden, die nicht durch andere In-vitro-Assays nachgewiesen werden können [27;56]. PELKA et al. testeten die Zytotoxizität von zahnärztlichen Füllungsmaterialien in einem Bioassay unter Verwendung von Garnelenlarven, welche sie für insgesamt 48 h mit unterschiedlichen zahnärztlichen Materialien inkubierten. Anhand der Motilität der Larven beurteilten sie jeweils nach 2, 5, 24 und 48 Stunden die Toxizität der einzelnen Substanzen, indem sie durch Auszählen den Anteil der unbeweglichen (toten) zu den beweglichen (lebendigen) Larven im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmten. Nach Ansicht der Autoren habe das Verfahren den Vorteil der schnellen Durchführbarkeit (Screening) bei geringem Kostenaufwand. Der Nachteil des Verfahrens jedoch sei jedoch der hohe Materialverbrauch und die geringe Sensitivität des Verfahrens. So konnten die Autoren anhand dieses Verfahrens lediglich feststellen, dass alle untersuchten Komposmere nach 24 h Inkubation eine Larven – Mortalität von 100 % hervorriefen und das sie im Vergleich zu den getesteten Kompositen stärker toxisch waren [91]. Aufgrund der Tatsache, dass über die Zytotoxizität von zahnärztlichen Kompositmaterialien im allgemeinen zahlreiche Studien durchgeführt wurden, jedoch sehr wenig über die zellschädigende Wirkung der einzelnen Bestandteile dieser Materialien bekannt war, führten GEURTSEN et al. umfangreiche Zellkulturuntersuchungen mit 35 Monomeren / Additiva und deren Ab- und Umbauprodukten, die in kommerziell erhältlichen Kompositmaterialien nachgewiesen wurden, durch. Sie bestimmten für jede einzelne Testsubstanz

anhand von Zellkulturuntersuchungen an primären humanen Fibroblastenzellen und einer Dauerzelllinie von 3T3 – Mausfibroblasten die effektive Dosis, bei der die Zellletalität 50 % im Vergleich zur Kontrolle betrug (ED_{50}). Die Autoren konnten anhand ihrer Ergebnisse für jede einzelne Substanz deren Schädigungspotential bestimmen und zeigen, dass es für besonders toxische Komponenten auch alternative, weniger toxische Materialien gibt. Weiterhin konnten sie aus ihren Ergebnissen schließen, dass es zwar keine Zellart gibt, die generell für alle getesteten Substanzen sensibler reagiert als andere, jedoch waren häufig humane Parodontal- und Pulpafibroblasten sensibler als 3T3 - Fibroblasten und Gingivafibroblasten. Die Autoren empfehlen daher die Verwendung verschiedener Zelllinien zur hinlänglichen Materialtestung auf Zytotoxizität [42].

Bei den In-vivo-Studien ist in diesem Zusammenhang das Tierexperiment zu nennen, jedoch ist dessen Aussagekraft in bezug auf Zytotoxizitäts- bzw. Genotoxizitätstestung gering und es ist als Screening-Verfahren ungeeignet.

Neben den organischen Bestandteilen von Kompositen enthalten diese auch anorganische Zusätze. Zum einen finden sich relativ inerte Füllerbestandteile wie Quarz, Glas (z.B. Ba-/Sr-Glas) oder Keramik (Li-Al-Silikat), zum anderen enthalten Komposite, Kompomere und Glasionomerezemente häufig Fluoridverbindungen, welche durch ihre kariesprotektive Wirkung die Remineralisation des Zahnschmelzes unterstützen sollen. Diese anorganischen Verbindungen, im speziellen die Fluoride, sind ebenfalls aus den dentalen Füllungsmaterialien eluierbar und stellen somit ein weiteres Degradationsprodukt von Kompositmaterialien dar.

1.2 Natriumfluorid

Bei der anorganischen Verbindung Natriumfluorid handelt es sich um eine kristalline Salzstruktur, welche sich als weißes und geruchloses Pulver darstellt. Fluoride nehmen eine zentrale Rolle in der Kariesprophylaxe ein. In der Zahnheilkunde ist die Wirkungsweise von Fluoriden im De- bzw. Remineralisationsgleichgewicht des Hydroxylapatits des Schmelzes natürlicher Zähne in der Vergangenheit intensiv in vielen Studien untersucht worden [9;20;66;69;72;123;137]. Der Metabolismus, die Toxikologie und die Effektivität unterschiedlicher Fluoridverbindungen gelten heute als wissenschaftlich weitestgehend erforscht [58]. Fluorid kommt in unterschiedlichen Darreichungsformen in der Zahnheilkunde vor. Zur topischen Anwendung von

Fluoriden reicht das Spektrum von der Zahnpasta über Mundspüllösungen bis hin zu verschiedenen fluoridhaltigen Gelen oder Lacken. Weiterhin enthalten einige zahnärztliche Füllungsmaterialien, vornehmlich die Glasionomerezemente und Kompomere, fluoridhaltige Verbindungen zur Kariesprophylaxe. Bei der systemischen Anwendung von Fluoriden ist die Tablettenfluoridierung zu nennen. Die Supplementierung mit Fluoridtabletten wird vornehmlich im Kindesalter durchgeführt und ist empfehlenswert in Regionen, in denen der Trinkwasserfluoridgehalt zu gering ist ($< 0,3\text{--}0,7\text{ mg/l}$). Diese Supplementierung wird als Ergänzung zur täglich mit der Nahrung aufgenommenen Fluoridmenge verabreicht. Heutzutage wird die lokale Fluoridapplikation der systemischen Supplementierung mit Fluorid vorgezogen [48]. Zu den Nebenwirkungen einer zu hohen systemisch verabreichten Fluoridmenge zählt die Hypermineralisationen des Schmelzes, die sog. Dentalfluorose. Fluorid verursacht Mineralisationsdefekte im Sinne unregelmäßiger und verzögerter Mineralisation und Veränderungen der Kristallstruktur. Die Kristalle sind zum Teil größer und haben deshalb keinen Platz innerhalb der geordneten Kollagenfibrillenstruktur. Dies zeigen physikalische Strukturanalysen des fluorotischen Schmelzes und es erklärt, warum Schmelz gleichzeitig mineralhaltiger und dennoch für mechanische Belastungen inkompetenter wird [116]. Zusätzlich hängt die Menge des eingebauten Fluorids und damit die Toxizität vom Calcium-Angebot ab; bei Calcium-Mangel wird mehr Fluorid eingebaut [88]. Kommt es zu einer systemischen Überdosierung von Fluoriden zeigt der Organismus die Symptome einer akuten Intoxikation. Es kommt zu gastro-intestinalen und neuromuskulären Symptomen, je nach Einwirkdauer auch zu zellschädigenden Effekten. Jedoch ist eine Intoxikation durch fluoridhaltige Mundhygieneartikel praktisch unmöglich, da Fluorid eine sehr große therapeutische Breite besitzt. Bei Kindern wird eine PTD (*probably toxic dose*) von 5 mg Fluorid / kg Körpergewicht angenommen. Die CTD (*certainly toxic dose*) beim Erwachsenen wird mit 32 – 35 mg Fluorid / kg Körpergewicht angenommen. Die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde hat im Juni 2002 eine Empfehlung zur Kariesprophylaxe mit Fluoriden verfasst, welche als Richtlinie bei der Fluoridsupplementierung verstanden werden kann (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Richtwerte für Fluoridsupplemente (mg Fluorid/Tag)

Stellungnahme der DGZMK V 2.1, Stand 6/02 nach *H.-J. Gölzow*, Hamburg,
E. Hellwig, Freiburg, *G. Hetzer*, Dresden

Alter	Fluoridkonzentration im Trinkwasser (Mineralwasser), mg/l		
	< 0,3	0,3 - 0,7	> 0,7
0 - 6 Monate	-	-	-
6 - 12 Monate	0,25	-	-
ab 1 - unter 3 Jahren	0,25	-	-
ab 3 - unter 6 Jahren	0,5	0,25	-
> 6 Jahre	1,0	0,5	-

Die Zytotoxizität von Fluoriden wurde ebenfalls in vielen Studien, sowohl im Tierversuch [88], als auch im Zellkulturversuch mit unterschiedlichen Zielgeweben intensiv erforscht [64;65;86;135]. Die Ergebnisse zeigen eine Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von Fluoridverbindungen auf das entsprechende Untersuchungsgut.

1.3 Biokompatibilität

Jeder Stoff, der als Biomaterial therapeutisch in einen lebenden Organismus eingesetzt wird, löst in lebendem Gewebe Reaktionen aus. Der Organismus erkennt das „Implantat“ als „fremd“ und versucht es entweder zu eliminieren oder zu tolerieren.

Nach WILLIAMS versteht man unter Biokompatibilität die Fähigkeit eines Materials unter spezifischer Anwendung an einem Lebensystem keine (oder eine tolerable nachteilige) Reaktion auszulösen [133].

Der Begriff Biokompatibilität beschreibt den Verträglichkeitsanspruch zwischen künstlichem Material und einem biologischen System. Darunter versteht man den Grad der Gewebeverträglichkeit eines in den Körper eingesetzten oder mit seiner Oberfläche in Kontakt kommenden Werkstoffes bzw. Medizinproduktes.

Die zahnärztlichen Füllungswerkstoffe, im speziellen hier die Komposite, zählen zu den Medizinprodukten und müssen, um therapeutisch Anwendung finden zu können, biologisch verträglich sein. Dies bedeutet, das folgende Risiken durch die Anwendung des Therapeutikums mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen

sind: akute oder chronische Toxizität, Mutagenität, Kanzerogenität, Teratogenität und Sensibilisierung. Um die Eignung eines Materials für dessen Einsatz in einem biologischen System zu untersuchen, sind umfangreiche und aufeinander aufbauende Testmethoden erforderlich. Zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten in der Zahnmedizin werden die Materialien gemäß dem Medizinproduktegesetz in fünf Gruppen eingeteilt. Die Zugehörigkeit zu einer der Gruppen wird nach Expositionsdauer und Art des Kontaktes determiniert.

Um beurteilen zu können, ob ein Werkstoff als biokompatibel einzustufen ist oder nicht, müssen bestimmte Kriterien eingeführt werden, die eine verifizierbare Aussage über die biologische Verträglichkeit dieses Stoffes erlauben. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen objektivierbare Testverfahren und Normen einzuführen, die es erlauben, quantitative und qualitative Aussagen in bezug auf die biologische Verträglichkeit zu treffen. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang die Prüfung auf Zytotoxizität und genetische Toxizität empfohlen [74].

Die In-vitro-Prüfmethoden auf Zytotoxizität, Karzinogenität, Genotoxizität und Teratogenität werden in der DIN-Norm ISO 10993-3 und ISO 10993-5 zusammengefasst. Weiterhin besteht die Möglichkeit, in klinischen In-vivo-Studien und im Tierexperiment die Bioverträglichkeit zahnärztlicher Materialien zu untersuchen [2;16;23;25;26;41;42;46].

Unter Zytotoxizität versteht man die Gesamtheit der toxischen Einflüsse auf eine Zelle. Der Begriff Genotoxizität ist der Oberbegriff für alle Schädigungen des primären Informationsträgers einer Zelle, der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die DNA steuert sämtliche Vorgänge in der Körperzelle und ist das materielle Äquivalent des Erbgutes jedes Lebewesens. Die Folge einer genotoxischen Schädigung kann die Karzinogenese sein, welche einem multifaktoriellen Regulationsprozess unterliegt, an dessen Beginn Veränderungen auf der Stufe der DNA stehen [56]. Je nachdem welches Schädigungspotential einer Substanz untersucht werden soll, werden verschiedene Testsysteme angewendet.

Aufgrund ihrer Spezifität und Reproduzierbarkeit sind In-vitro-Testverfahren den In-vivo-Methoden überlegen und im Vergleich zum Tierexperiment ethisch unbedenklich. Zudem ist es aus ökonomischen Überlegungen heraus heute nicht möglich, jedes neuentwickelte Füllungsmaterial an hochentwickelten Versuchstieren

(z.B. Affen, Hunden) zu testen. Weiterhin ist die Komplexität eines Tierorganismus ein weiterer limitierender Faktor bei der Beurteilung der Ergebnisse im Tierversuch. Es ist nicht möglich, sichere Rückschlüsse über die Wirkungsweise von an Tieren getesteten Werkstoffen auf deren Reaktion im menschlichen Organismus zu ziehen, da es sich um unterschiedliche Spezies handelt. Eine tierexperimentell ermittelte Unbedenklichkeit eines Werkstoffes oder Medikamentes führt nicht zwangsläufig zum gleichen Ergebnis bei der Anwendung der Testsubstanz beim Menschen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Tierversuch in der Bioverträglichkeitsprüfung von zahnärztlichen Füllungswerkstoffen eine untergeordnete Rolle spielt. In der Materialtestung in der Zahnmedizin wird heutzutage den In-vitro-Testverfahren speziell den Zellkulturmethoden der Vorzug gewährt, da diese Verfahren viele Vorteile aufweisen. Das biologische Testsystem ist gut überschaubar. Die Anzahl der Variablen ist gegenüber Tierversuchen oder gar klinischen Tests geringer. Da sie kostengünstiger und zeitsparender sind, können sie als sog. Screeningtests angewendet werden [105;106;111].

1.4 In-vitro-Testverfahren zur Zytotoxizitätsprüfung von Kompositen

Um zahnärztliche Füllungsmaterialien und Werkstoffe auf deren Schädigungspotential lebender Strukturen zu überprüfen, bedient man sich unterschiedlicher Testverfahren [19].

Dazu verwendet man häufig Gewebe- und Zellkulturen sowie auch verschiedene Mikroorganismen (z.B.: *S. mutans*, *E. coli*) und Hefen. Daneben stehen enzymatische Tests und Hämolysetests zur Verfügung.

Gewebe- oder Zellkulturen werden seit mehr als 30 Jahren zur biologischen Testung von zahnärztlichen Füllungsmaterialien im Hinblick auf zytotoxische Effekte herangezogen [47;60;103]. Es kommen sowohl Zellen tierischen [66;103;131] als auch Zellen menschlichen Ursprungs [7;134] zur Anwendung. Weiterhin unterscheidet man zwischen Primär- und Dauerzelllinien. Primärzelllinien erhält man durch Züchtung von Zellen aus Gewebeproben. Sie sind hoch differenziert und weisen entsprechend ihrer Entnahmestelle charakteristische Merkmale des Muttergewebes auf. Primärzellkulturen bieten die Möglichkeit, die zellschädigende Wirkung von zu testenden Materialien direkt am Zielgewebe zu untersuchen und lassen so eine Simulation der tatsächlich *in vivo* herrschenden Verhältnisse zu.

Jedoch ist ihre Züchtung langdauernder und der Grad der Differenzierung führt häufig zu unterschiedlichen Phänotypen, was zu sehr unterschiedlichem metabolischen Verhalten führen kann. Zudem sind sie im Vergleich zu Dauerzelllinien nicht so häufig passagierbar und ihre Lebenszeit ist kürzer.

Dauerzelllinien werden aus Tumoren gezüchtet oder durch *in vitro* Transformation primärer Zelllinien gewonnen. Durch Selektion der Zellen und deren anschließender Klonierung werden die Zellen entsprechend ihrem relativen konstanten Metabolismus charakterisiert. Solche Zellen sind immortalisiert, weisen eine hohe physiologische und morphologische Homogenität auf und können über Jahre hinweg in Kultur gehalten werden [76].

Da zahnärztliche Füllungsmaterialien jedoch nicht nur lokale Effekte wie zytotoxische Reaktionen oder Entzündungsreaktionen am Ort ihrer Applikation auslösen können, sondern auch allergenes, teratogenes, mutagenes und tumorogenes Potential besitzen können, reicht ein Testsystem allein nicht aus, um ein dentales Restaurationsmaterial biologisch zu charakterisieren. Um die Wirkung auf den menschlichen Organismus möglichst genau vorhersagen zu können, muss in präklinischen Testverfahren auf unterschiedlichen biologischen Ebenen durch eine strukturierte Herangehensweise eine Reihe von Testmethoden durchlaufen werden. Aus der Gesamtheit aller zusammengetragenen Testergebnisse können Rückschlüsse auf das tatsächliche Verhalten der Testsubstanzen im menschlichen Organismus gezogen werden [108].

Im Gegensatz zu den früher vorherrschenden Zellkulturmodellen, bei denen man versuchte, die Testmethode an die Erfordernisse der *in vitro* wachsenden Zellen anzupassen, ist man heute bestrebt, die *in vitro* Testmethode derart zu gestalten, dass sie die klinische Situation so exakt wie möglich imitiert. So kommt heutzutage die Agar-Overlay-Methode mit mikroskopischer Hemmzonenauswertung um das zu testende Material so gut wie gar nicht mehr zur Anwendung. Dieses Verfahren bot lediglich eine reduzierte quantitative Beurteilungsmöglichkeit der Zytotoxizität, da es sich im wesentlichen auf die zytopathologische Beurteilung der behandelten Zellen im Hinblick auf morphologische Veränderungen wie Granulation, Vakuolisierung, Potozytose, Abkuglung der Zellen mit Adhäsionsverlust oder Zelllyse beschränkte [55;130]. Weitere Bestrebungen waren Versuche, die Mitoserate von mit Testsubstanzen behandelten Zellen zu bestimmen [85].

Als besonders effektiv und einfach in der Handhabung erwies sich die fluorophotometrische Bestimmung der Zellzahl zur Bestimmung der Wachstumsrate in Proliferations - Inhibitionstests [8;41;44].

Weiterhin kommen Barrierediffusionstests zur Anwendung. Hierbei wird das Testmaterial durch eine diffundierbare Barriere von den Zellen getrennt. Als Diffusionsbarriere werden Dentindünnschliffe extrahierter Molaren von Mensch oder Tier (Rind) verwandt, um die *in vivo* Situation annähernd zu simulieren [51;107;110;125]. Neben Dentin als Diffusionsbarriere werden auch künstlich erzeugte Mucosa-Barrieren *in vitro* verwandt, um das Irritationspotential von Dentalmaterialien zu erkennen. Dabei werden auf einem Nylonnetz adhärente humane Fibroblasten, welche mit Epithelzellen überzogen werden, kultiviert um die menschliche Schleimhautbarriere zu simulieren [109].

Die Applikationsart der Testsubstanzen spielt für die Testmethode ebenfalls eine große Rolle. So können die Zellen in direkten Kontakt zu den Testmaterialien gebracht werden, oder man erstellt Eluate oder Verdünnungsreihen mit dem zu testenden Agens [10;44;104]. Auf diese Weise kann die toxikologische Wirkung der Testmaterialien in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkdauer den klinisch vorherrschenden Gegebenheiten angepasst und *in vitro* simuliert werden. Die Verwendung von Eluaten oder Verdünnungsreihen ist einfach und zeitsparend in der Handhabung. Solche Testverfahren sind ökonomisch und als Screeningtests für eine Vielzahl von Untersuchungen geeignet.

Die Grundlage quantitativer Testverfahren stellt heutzutage die biochemische Bestimmung metabolischer Zellaktivität dar. Prinzipiell basieren diese Tests auf der Möglichkeit durch Farbstoffe (z.B.: Trypanblau, H 33342, XTT, MTT), Salze, radioaktive Marker (z.B.: ^3H -Thymidin) oder Enzyme intrazelluläre Stoffwechselparameter spezifisch zu bestimmen. Je nach Testart können Rückschlüsse im Hinblick auf Zellzahl, Zellwachstum, Bestimmung der Zellproliferation oder Proliferationsinhibition, DNA-Syntheserate, Chromosomenzahl und Chromosomenabberationen gezogen werden. Alle diese Parameter können nicht isoliert bei der Interpretation der Ergebnisse betrachtet werden, sondern nur im Gesamtzusammenhang miteinander.

1.5 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, interaktive biologische Effekte von vier häufig in zahnärztlichen Füllungswerkstoffen vorkommenden Resinmonomeren (Bis-GMA, HEMA, UDMA, TEGDMA) mit dem Kariesprophylaktikum Natriumfluorid zu untersuchen, um dadurch Hinweise auf mögliche synergistische zytotoxische Nebenwirkungen *in vivo* zu erhalten. Alle Untersuchungen sollten mit immortalisierten Zellen der heteroploiden NIH-3T3-Swiss-Mausfibroblastenzelllinie in Anlehnung an die DIN-Norm (ISO 10993) durchgeführt werden. Zwei biochemische Zytotoxizitätsassays wurden gewählt, mittels derer zum einen der DNA-Gehalt (Hoechst 33342-Assay) und zum anderen die metabolische (mitochondriale) Aktivität der Zellen (XTT-Assay) in Mikrotiterplatten erfasst werden sollte. Anhand morphologischer Veränderungen der Zellen sollte nach mikroskopischer Auswertung die Zellschädigung bewertet werden.

Alle verwendeten Substanzen wurden zunächst einzeln in Konzentrationsreihen getestet. Danach wurde die Konzentration von NaF bei den Kombinationsbehandlungen konstant auf einem gering toxischen Niveau eingesetzt, um Interaktionen zwischen Monomeren und NaF besser messen zu können. Als gering toxisch wurde die Konzentration von NaF angenommen, bei welcher die Zellzahl nach 24 h noch ca. 90% im Vergleich zur Kontrolle betrug.

Anhand der drei ermittelten Parameter (Zellzahl, mitochondriale Aktivität und morphologische Zellveränderungen) sollte das Auftreten interaktiver Effekte zwischen organischen Kompositbestandteilen und dem anorganischen Salz Natriumfluorid und dessen Einfluß auf die Toxizität gemessen und statistisch ausgewertet werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

Für die Versuche wurden vier in Kompositen häufig vorkommende Monomere und Komonomere verwendet. Außerdem wurde die anorganische Substanz Natriumfluorid getestet.

Zunächst wurde jede organische und anorganische Komponente einzeln im Zellkulturversuch untersucht. Danach erfolgten Versuche, in denen jeweils eine der organischen Substanzen in Kombination mit der anorganischen Komponente verwendet wurde.

2.1.1 Organische Testmaterialien

In den Untersuchungen wurden die Monomere Bisphenol-A-glycidylmethacrylat (Bis-GMA) sowie Urethandimethacrylat (UDMA) und 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (HEMA) verwendet. Bei dem untersuchten Komonomer handelt es sich um Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA). Alle getesteten Monomere wurden zu Versuchszwecken von der Firma VOCO GmbH (Cuxhaven) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Reinheit der Testmonomere entsprach den bei VOCO zur Herstellung von zahnärztlichen Füllungsmaterialien verwendeten Monomeren. Die Strukturformeln sind in Abb. 2.1 dargestellt.

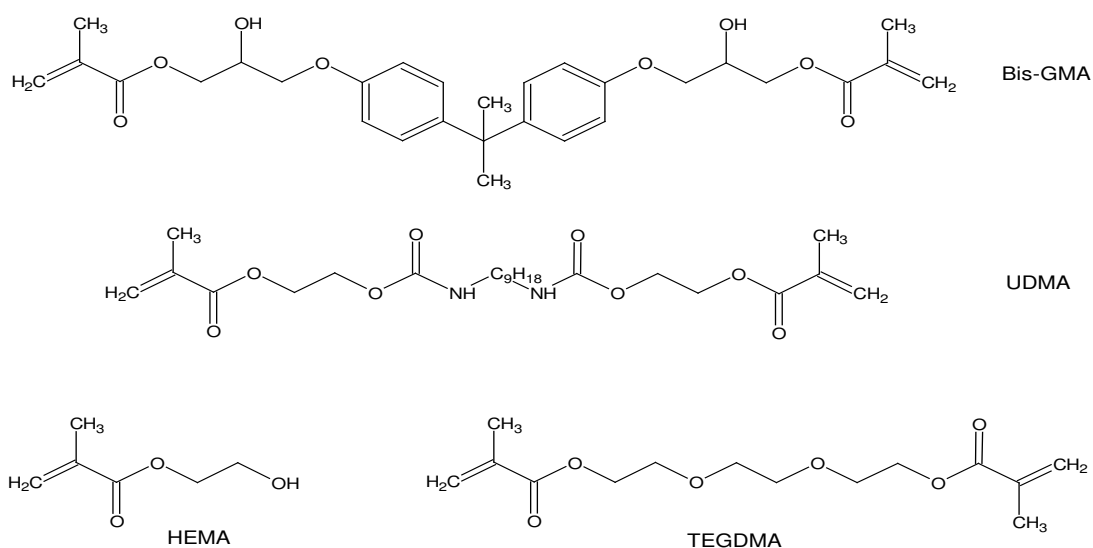


Abb. 2.1 Chemische Strukturformeln der Monomere Bis-GMA, UDMA, HEMA und TEGDMA
(Abb. erstellt mit *ChemSketch Vers. 5.12, ACD Labs, Toronto, Kanada*)

Bis-GMA

Bei dem zähflüssigen Monomer Bis-GMA handelt es sich um ein Isomerengemisch aus der Dimethacrylatverbindung Bis-GDMA und einem einfach verzweigten Isomer Bis-IGDMA. Bis-GMA entsteht durch eine Additionsreaktion von Methacrylsäure an den Bisphenol-A-Diglycidylether. Das Bisphenol-A-Molekül besteht aus zwei phenolischen Ringen. Seine beiden OH-Gruppen sind polymerisationsfähig. Bisphenol-A ist das Vorprodukt zur Herstellung von Polycarbonaten und Epoxydharzen. Die aus der oben beschriebenen Additionsreaktion entstandene Verbindung bezeichnet man nach der chemischen Nomenklatur als 2,2-Bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl]-propan. Die bei der Additionsreaktion gebildeten Hydroxyl-Gruppen (-OH) geben dem Monomer wie dem Kunststoff deutlich hydrophile Eigenschaften. Abb. 2.2 stellt das gesamte Molekül dreidimensional im Modell dar.

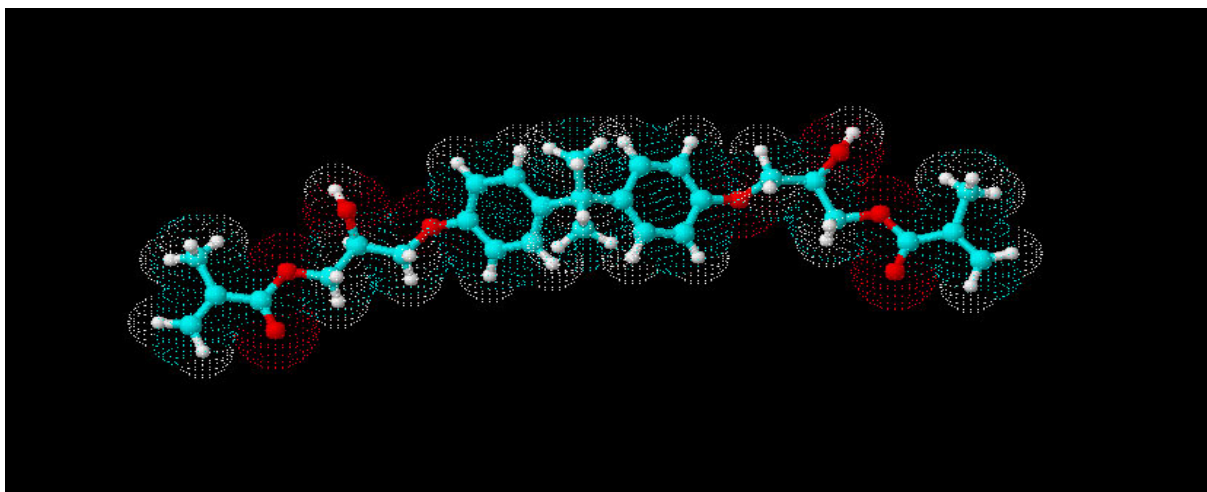


Abb. 2.2 **Dreidimensionale Molekülstruktur von Bis-GMA im Orbitalmodell**

(Abb. erstellt mit *ChemSketch Vers. 5.12*, ACD Labs, Toronto, Kanada)

UDMA

UDMA ist ebenfalls ein Isomerengemisch mit unterschiedlicher Verteilung der drei Methylgruppen am Hexadecangrundkörper. Es handelt sich bei dem Molekül um ein aliphatisches Dimethacrylat. Nach der chemischen Nomenklatur bezeichnet man diese Verbindung als 7,7,9-Trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diaza-hexadecan-1,16-diol-dimethacrylat. Abb. 2.3 kennzeichnet die gestreckte Molekülstruktur im dreidimensionalen Modell.

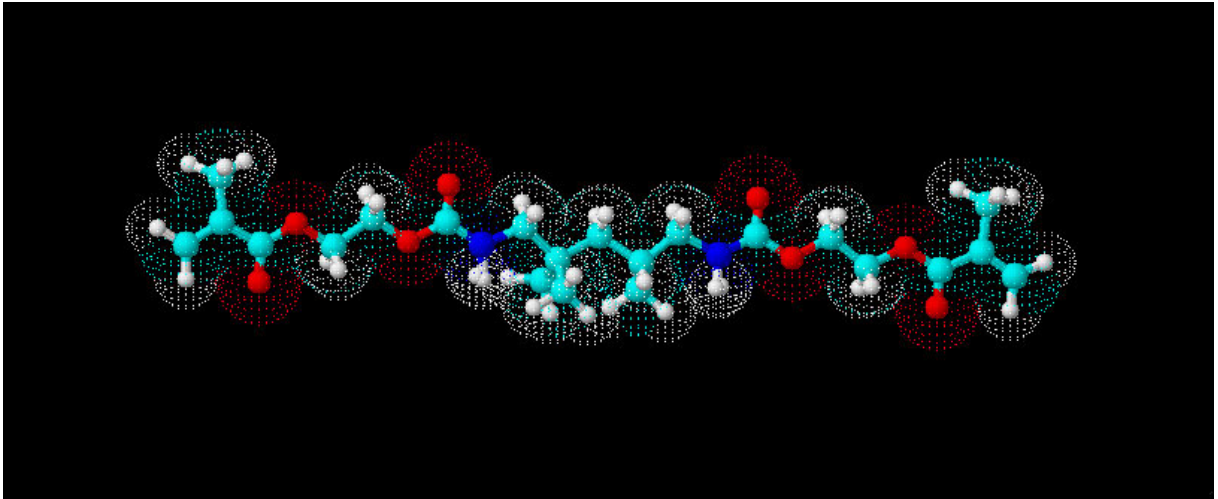


Abb. 2.3 **Dreidimensionale Molekülstruktur von UDMA im Orbitalmodell**

(Abb. erstellt mit *ChemSketch Vers. 5.12*, ACD Labs, Toronto, Kanada)

HEMA

Das kurzkettige Hydroxyethylmethacrylat-Molekül zählt zu den Mono-Methacrylaten und weist bei Raumtemperatur eine niedrige Viskosität auf. Im Unterschied zu den übrigen Mono-Methacrylaten bildet HEMA in Bezug auf die Härtingszeit eine Ausnahme, da es schnell aushärtet und eine hohe Wasseraufnahme zeigt. Somit kommt HEMA im Zusammenhang mit anderen Monomeren als Haftvermittler für hydrophile, chemisch- und lichthärtende Polymere zum Einsatz. Die korrekte Bezeichnung nach der chemischen Nomenklatur lautet: 2-Hydroxyethylmethacrylat. Das Molekül ist in Abb. 2.4 in seiner räumlichen Darstellung abgebildet.

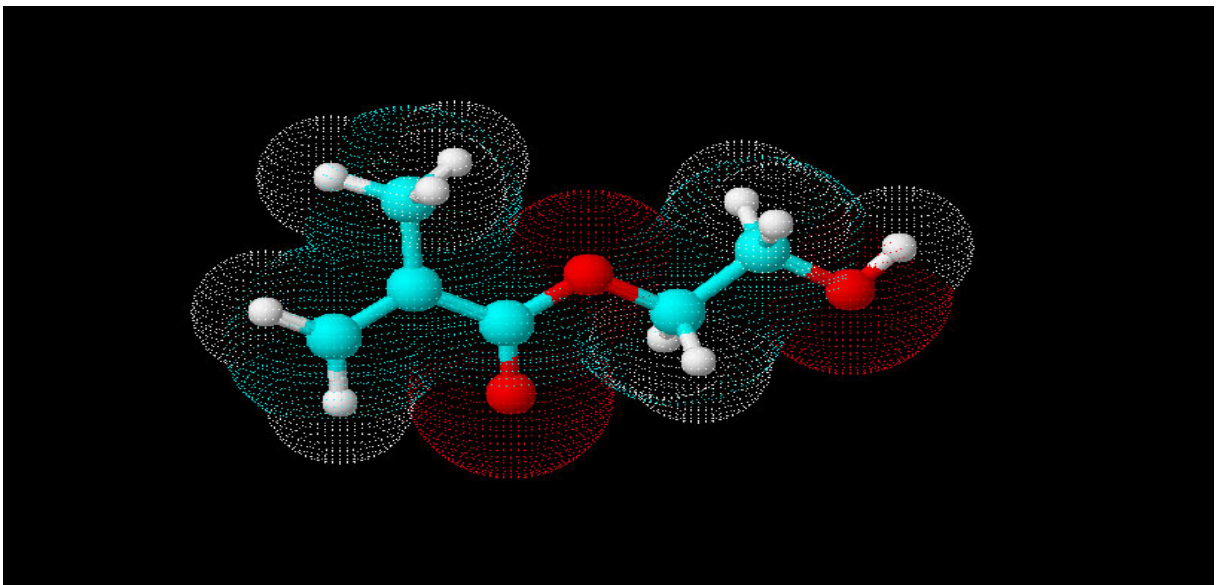


Abb. 2.4 **Dreidimensionale Molekülstruktur von HEMA im Orbitalmodell**

(Abb. erstellt mit *ChemSketch Vers. 5.12*, ACD Labs, Toronto, Kanada)

TEGDMA

Das Ethylenglykolmonomer TEGDMA besteht aus einem Grundgerüst von Ethylenglykoleinheiten mit methacrylierten Hydroxylendgruppen. Bei TEGDMA handelt es sich um ein Komonomer. Die Substanz liegt bei Raumtemperatur als farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit vor. TEGDMA fungiert als Vernetzer für die radikalische Polymerisation. Die Bezeichnung nach der chemischen Nomenklatur lautet Triethylenglycoldimethacrylat (Abb. 2.5).

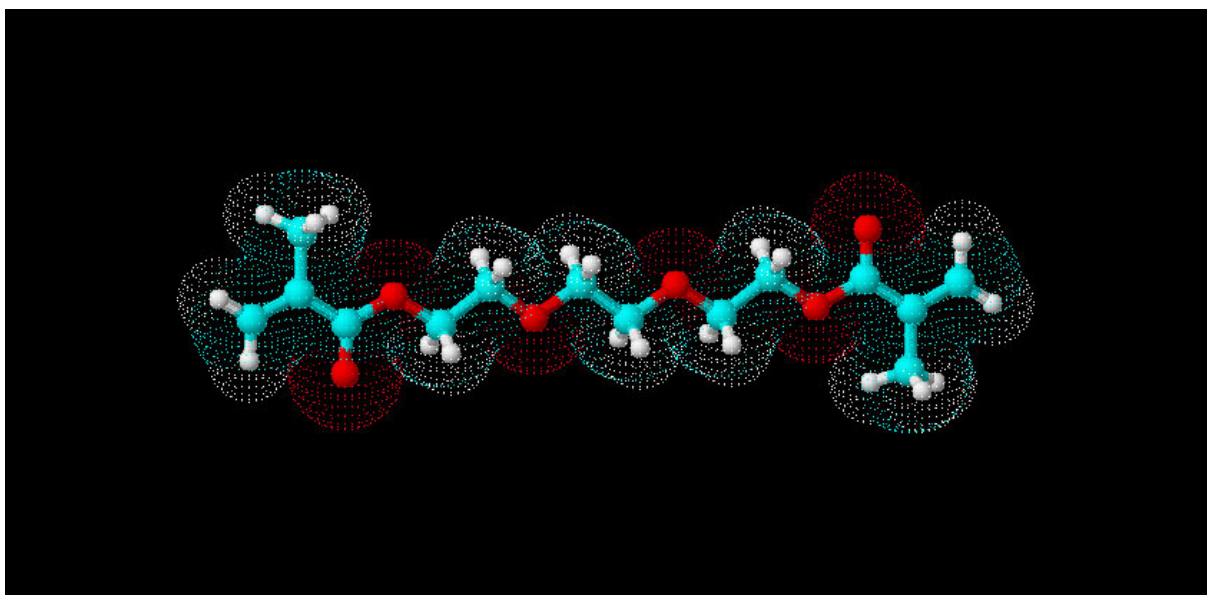


Abb. 2.5 Dreidimensionale Molekülstruktur von TEGDMA im Orbitalmodell

(Abb. erstellt mit *ChemSketch Vers. 5.12, ACD Labs, Toronto, Kanada*)

2.1.2 Anorganisches Testmaterial

Als anorganische Testsubstanz wurde das Salz Natriumfluorid (NaF , *Fluka, Seelze*) verwandt. Natriumfluorid ist das Salz der Flusssäure und liegt bei Zimmertemperatur als weißes Pulver in kristalliner Form vor. Die molare Masse beträgt 41,99 g/mol. Die Löslichkeit in Wasser bei 20°C liegt bei 42 g/l. Für die Zytotoxizitätsversuche wurde NaF in wässrigen Lösungen unterschiedlicher Konzentration verwendet, die jeweils frisch angesetzt wurden.

2.1.3 Zellen

Die Versuche wurden mit der immortalisierten, heteroploiden und kontaktinhibierten Zelllinie NIH-3T3-Swiss-Mausfibroblasten (*ACC 59, DSMZ, Braunschweig*) in Monolayerkultur durchgeführt. Die adhärenenten Zellen haben unter den hier verwendeten Kulturbedingungen eine Generationszeit von ca. 20 h.

2.1.4 Zellkulturmedien und Lösungen

Zellkulturmedium

Minimal Essential Medium nach Dulbecco (DMEM, Biochrom KG, Berlin) mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l), versetzt mit 100 I.E. Penicillin (*Biochrom KG, Berlin*) und 1 mg Streptomycin/ml (*Biochrom KG, Berlin*) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (*FKS, Chargennummer P979549, PAN-Systems, Aidenbach*) und 10 mM HEPES (*Sigma, Steinheim*)

Zellkulturflaschen

75 cm² Zellkulturflaschen (*Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen*)

PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung)

NaCl, p.a.	(<i>Merck KG, Darmstadt</i>)	8,00	g/l
KCl, reinst	(<i>Merck KG, Darmstadt</i>)	0,20	g/l
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O, p.a.	(<i>Merck KG, Darmstadt</i>)	1,14	g/l
KH ₂ PO ₄ , p.a.	(<i>Merck KG, Darmstadt</i>)	0,20	g/l
H ₂ O dest.		1000,00	ml

Die Salze wurden in H₂O dest. gelöst und der pH-Wert der Pufferlösung mit HCl (1 mol/l) auf 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde bei 121 °C und einem Druck von 1 bar für 20 Minuten im Autoklav sterilisiert.

Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin	(<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>)	2,50	g/l
EDTA	(<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>)	0,20	g/l
PBS		1000,00	ml

In einem Teil der PBS-Pufferlösung wurde das Trypsin gelöst, anschliessend das EDTA dazugegeben und mit dem Rest des Puffers aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl (1 mol/l) auf 7,2. Die Lösung wurde steril filtriert.

Organischer Lösungsvermittler

Dimethylsulfoxid (*DMSO*, *Sigma*, *Steinheim*) wurde als Lösungsvermittler für die organischen Verbindungen in Wasser verwendet.

Trypanblaulösung

Zur Herstellung einer Trypanblau-Stammlösung wurden 0,4 g Trypanblau (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*) in 100 ml H₂O dest. gelöst. Unmittelbar vor deren Anwendung wurde die Gebrauchslösung durch Verdünnen der Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit H₂O dest. hergestellt.

2.1.5 Materialien für Mikrotiterplattenassays

H 33342-Inkubationslösung

In 1 ml H₂O dest. wurde 1 mg Bisbenzimid Hoechst 33342 (*Riedel- de-Haën*, *Steinheim*) zur Herstellung der Stammlösung gelöst, welche lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt wurde und zwei Wochen stabil war. Um die für den Zytotoxizitätsassay benötigte H 33342-Inkubationslösung zu erhalten, wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:100 mit Zellkulturmedium verdünnt.

XTT-Inkubationslösung

Die verwendete XTT-Inkubationslösung wurde unmittelbar vor deren Gebrauch frisch aus folgenden Komponenten hergestellt:

2,5 mg XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt) (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*)

0,025 mg Phenazine Methosulfate (N-Methyldibenzopyrazine methyl sulfate salt) (*Sigma-Aldrich*, *Steinheim*)

15 ml Minimal Essential Medium nach Dulbecco (DMEM) ohne Phenolrot (*Biochrom KG*, *Berlin*)

Die angesetzte Inkubationslösung wurde unter Vermeidung von direktem Lichteinfall innerhalb von 5 Minuten verwendet.

Mikrotiterplatten

96-well-Greiner Mikrotiterplatten (*Greiner bio-one, Frickenhausen*)

Gefäße

Szintillationsgefäße 20 ml (*Ratiolab, Dreieich*)

Waage

Elektronische Halbmikrowaage 2024 MP 6 (*Sartorius, Göttingen*)

Brutschrank

Die Inkubation bzw. die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (*NUNC, Wiesbaden-Biebrich*) bei 37°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 100 % und einem CO₂-Gehalt von 10 %.

Werkbank

Alle Zellkulturarbeiten und Materialvorbereitungen wurden in einer Reinluftwerkbank (*Hera safe, KENDRO, Hamburg*) durchgeführt.

Messgeräte

Multiwell-Fluoreszenz-Scanner (*CytoFluor 2350, PerSeptive Biosystems GmbH, Freiburg*)

Plattenphotometer (*SpectraMax[®] 250, MWG Biotech, Ebersberg*)

Mikroskop

Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrastblenden (*Olympus IMT-2*)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinie wurde als Kryokonserven bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert und für die Versuche bei 37°C aufgetaut und in mit 20 ml Kulturmedium befüllten Zellkulturflaschen ausgesät (siehe Kapitel 2.1.4).

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C , 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 10 % CO_2 -Gehalt. Zur Subkultivierung der am Flaschenboden adhären Zellschicht bei Überführung in neue Kulturgefäße (Passagierung) bzw. bei der Entnahme von Zellen für Versuchszwecke wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Dafür wurde zuerst das Wachstumsmedium aus dem Kulturgefäß entfernt und der Zellrasen mit phosphatgepufferter Salzlösung (*PBS*) gründlich gewaschen. Anschließend wurde eine sterile Trypsin/EDTA-Lösung dem Zellrasen zugegeben. Im Brutschrank erfolgte jetzt die Dissoziation der Zellschicht durch die Protease Trypsin. Nach 5–7 Minuten wurde dieser Ablösungsprozess durch die Zugabe von serumhaltigen Medium abgebrochen.

Die abgelösten Zellen wurden zum einen in neue Kulturgefäße mit frischem Medium passagiert und zum anderen nach Zellzählung in einer Thoma-Zählkammer in einer definierten Zellkonzentration (5×10^4 Zellen / ml) in Mikrotiterplatten (200 μl / well) zur Versuchsdurchführung ausgesät. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte während der Auszählung nach Anfärben der toten Zellen mit Trypanblau. Die Beobachtungen der Zellmorphologie erfolgten mit dem inversen Durchlichtmikroskop im Phasenkontrast.

2.2.2 Herstellung der Inkubationslösungen

Für die Versuche mit dem anorganischen Salz NaF wurde eine Stammlösung von Natriumfluorid in H_2O dest. (Konzentration = 100 mM) angesetzt und zum Herstellen der Inkubationslösungen mit DMEM entsprechend den gewünschten Konzentrationsstufen verdünnt. Die Verdünnungsreihe mit Natriumfluorid in wässriger Lösung umfasste den Konzentrationsbereich von 0,05 mM bis 10,0 mM.

Für die Versuche mit den Monomeren wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen in DMEM hergestellt. Dabei wurden bei den Untersuchungen mit der Reinsubstanz des Monomers, im folgenden

Einzelbehandlung genannt, 200-fach konzentrierte sterile Stammlösungen in dem organischen Lösungsmittel DMSO angesetzt. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden die Inkubationslösungen durch Verdünnung mit DMEM hergestellt.

Analog wurden für die Kombinationsbehandlung (variierende Monomerkonzentration in Kombination mit konstanter Natriumfluoridkonzentration 1mM) Inkubationslösungen hergestellt, denen aber jeweils Natriumfluorid in einer Endkonzentration von 1mM zugesetzt worden war. Es wurde darauf geachtet, dass in allen Inkubationslösungen der Anteil von DMSO 0,5 % war. Die Verdünnungsreihen umfassten folgende Konzentrationsbereiche:

Bis-GMA	0,005 mM	-	0,25 mM
HEMA	1,000 mM	-	10,00 mM
UDMA	0,010 mM	-	0,25 mM
TEGDMA	0,050 mM	-	2,50 mM

Alle Inkubationslösungen wurden unmittelbar vor der Behandlung frisch angesetzt.

2.2.3 Zytotoxizitätsassays mit XTT

Dieser Zytotoxizitätsassay basiert auf dem Prinzip der spektrophotometrischen Bestimmung der Intensität einer Farbreaktion, ausgelöst durch die mitochondriale Metabolisierung des Tetrazoliumsalzes XTT. Dabei wird das XTT Salz durch das zur mitochondrialen Atmungskette vitaler Zellen gehörende Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu einem wasserlöslichen, gefärbten Formazan-Salz reduziert. Zur Durchführung dieses Zytotoxizitätsassays wurde, wie unter 2.2.1 beschrieben, zunächst eine Einzelzellsuspension mit 3T3-Mausfibroblasten hergestellt. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl in einer Thoma-Zählkammer erfolgte die Aussaat der Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen / ml in je 200 μ l Zellsuspension pro Vertiefung (well) der Platte.

Nach einer Anheftungszeit von 24 h im Brutschrank erfolgte die Behandlung der Zellen. Zuvor wurde der gewachsene Zellrasen auf atypisches Wachstumsverhalten der Zellen bzw. morphologische Veränderungen lichtmikroskopisch kontrolliert und anschließend aussortiert. Die Kulturmedien wurden gegen die zu untersuchenden Behandlungslösungen ausgetauscht und für weitere 24 h inkubiert.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Aussaatmuster der Mikrotiterplatten für Einzel- und Kombinationsbehandlungen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
C		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
D		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
E		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
F		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
G		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆			DMSO	DMEM	B
H												

Abb. 2.6: Aussaatmuster einer Mikrotiterplatte für die Einzelbehandlung mit Monomer

K₁ – K₆ : Verdünnungsreihe mit einem der vier zu untersuchenden Monomere UDMA, Bis-GMA, HEMA, und TEGDMA in jeweils sechs unterschiedlichen Konzentrationsstufen des Monomers mit jeweils sechs Replikaten.
DMSO : Kontrolle Dimethylsulfoxid 0,5%. DMEM : Kontrolle Wachstumsmedium.

B: Blank mit PBS. Alle übrigen Wells enthalten phosphatgepufferte Salzlösung

Des weiteren wurden ebenfalls mit der anorganischen Einzelsubstanz Natriumfluorid (NaF) Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Die schematische Darstellung in Abb. 2.7 veranschaulicht das Plattendesign für diese Versuchsreihen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
C		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
D		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
E		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
F		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
G		NaF ₁	NaF ₂	NaF ₃	NaF ₄	NaF ₅	NaF ₆	NaF ₇	NaF ₈	NaF ₉	DMEM	B
H												

Abb. 2.7: Aussaatmuster einer Mikrotiterplatte für die Einzelsubstanzbehandlung mit NaF

NaF₁ – NaF₉: Verdünnungsreihe mit Natriumfluoridlösung in neun unterschiedlichen Konzentrationsstufen mit jeweils sechs Replikaten. DMEM : Kontrolle Wachstumsmedium. B : Blank mit PBS. Alle übrigen Wells enthalten phosphatgepufferte Salzlösung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
C		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
D		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
E		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
F		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
G		K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	Kon ₁	Kon ₂	DMSO	DMEM	B
H												

Abb. 2.8: Aussaatmuster einer Mikrotiterplatte für die Kombinationsbehandlung mit Monomer und Natriumfluorid

K₁ – K₆ : Verdünnungsreihe mit einem der vier zu untersuchenden Monomere UDMA, Bis-GMA, HEMA, und TEGDMA in jeweils sechs unterschiedlichen Konzentrationsstufen des Monomers und konstanter Konzentration von NaF (1mM) in allen Testwells mit jeweils sechs Replikaten. Kon₁ : erste Kontrollgruppe mit 0,1 mM NaF-Lösung. Kon₂ : zweite Kontrollgruppe mit 1mM NaF-Lösung. DMSO : Kontrolle Dimethylsulfoxid 0,5%. DMEM : Kontrolle Wachstumsmedium. B : Blank mit PBS. Alle übrigen Wells enthalten phosphatgepufferte Salzlösung

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Testmedien aus allen Testwells abgesaugt und mit jeweils 200 µl der zuvor frisch angesetzten XTT-Inkubationslösung (siehe Kapitel 2.1.5) im Brutschrank für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert.

Nach der Inkubation wird in einem Plattenphotometer die Absorption des entstandenen Farbstoffes bei 450 nm mit 690 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Als „Blank“ wird die Absorption der Inkubationslösung in Vertiefungen ohne Zellen gemessen und von den Absorptionswerten der Testwells abgezogen. Anhand der Intensität der Farbreaktion kann die Stoffwechselaktivität der Zellen und damit deren Vitalität bestimmt werden. Für die vier getesteten organischen Einzelsubstanzen Bis-GMA, UDMA, HEMA, TEGDMA und das anorganische Salz Natriumfluorid wurden jeweils mindestens 3 Assays mit jeweils sechs Replikaten durchgeführt. Bei den daran anschließenden Kombinationsversuchen mit jedem einzelnen der vier Monomere in Kombination mit Natriumfluorid erfolgten mindestens sechs Assays mit jeweils sechs Replikaten.

2.2.4 Zytotoxizitätsassays mit Bisbenzimid Hoechst 33342

Neben dem oben beschriebenen Zytotoxizitätstest mit XTT kam auch der Zytotoxizitätsassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid Hoechst 33342 (H 33342) zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation zur Anwendung.

Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert spezifisch und quantitativ in zelluläre DNA und ist somit ein Marker für die Zellzahl in prozentualer Relation zur Kontrolle vitaler Zellen. Zur Durchführung dieses Zytotoxizitätsassays wurde, wie unter 2.2.1 beschrieben, zunächst eine Einzelzellsuspension mit 3T3-Mausfibroblasten hergestellt. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte die Aussaat der Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte mit einer Konzentration von 10^4 Zellen pro well. Nach einer Anheftungszeit von 24 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Inkubationslösungen für 24 h. Nach Ablauf der Behandlungszeit der Zellen erfolgte die Aufarbeitung. Dazu wurde das Medium in jedem Testwell gegen 100 µl der zuvor frisch angesetzten H 33342-Inkubationslösung ausgetauscht, für weitere 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. In einem Multiwell-Fluoreszenz-Scanner erfolgte die Messung der Fluoreszenz des an die DNA der Zellen gebundenen Farbstoffes mit einer Anregung der Fluoreszenz bei 360 nm und einer Emission bei 460 nm. Als „Blank“ wurde die Emission der H 33342-Inkubationslösung in den Plattenvertiefungen ohne Zellen gemessen und von den Fluoreszenzwerten der Testwells abgezogen.

Versuchsdurchführung und Anzahl der Mikrotiterplatten waren identisch zum XTT-Assay (siehe Kapitel 2.2.3). Alle Monomere wurden für die Versuche in DMSO gelöst. Bei der Herstellung der Inkubationslösungen wurde darauf geachtet, dass der Anteil von DMSO in den Lösungen 0,5 % war. Die Kontrolle DMSO, die in jedem Assay mitgeführt wurde, zeigte keine Beeinträchtigung des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle DMEM. Daher wurden die Ergebnisse der jeweiligen Assay-Auswertungen prozentual in Relation zur Kontrolle DMSO = 100 % gesetzt und ausgewertet.

Die Beurteilung der Zellreaktionen auf die Inkubationslösungen erfolgte in Anlehnung an die EN ISO 7405.

Einteilung	Zellwachstum in % der Kontrolle	Bewertung
0	> 95	nicht zelltoxisch
1	80 – 95	schwach zelltoxisch
2	40 – 79	mäßig zelltoxisch
3	< 40	stark zelltoxisch

2.2.5 Mikroskopie

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Zellen in Lab Tek™ Platten (*NUNC GmbH, Wiesbaden*) in einer Zelldichte von $2,0 \times 10^5$ pro ml ausgesät und nach 24 h Inkubation mit den gleichen Einzelsubstanzen und Kombinationen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen im Phasenkontrast mikroskopiert und morphologisch beurteilt.

An exemplarischen Kulturen wurde bei 400-facher Vergrößerung eine photographische Dokumentation durchgeführt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Aus den gemessenen Werten wurde jeweils der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde eine Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) mit nachfolgendem Tukey-Test, welcher signifikante Unterschiede bei multiplen Mittelwertvergleichen zeigt, durchgeführt. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Reinsubstanz- und Kombinationsbehandlungen wurden mit Hilfe des t-Tests ermittelt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angenommen, wenn $p < 0,05$ war. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism® 3.0 (GraphPad, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Die In-vitro-Zytotoxizität von Natriumfluorid

3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse für Natriumfluorid

Die Verdünnungsreihe von Natriumfluorid (NaF) umfasste den Konzentrationsbereich von 0,05 mM – 10 mM. Bei den beiden durchgeführten Zytotoxizitätsassays wurde festgestellt, dass Konzentrationen unterhalb von 1 mM keine signifikante Hemmung des Zellwachstums von 3T3-Mausfibroblasten gegenüber der Kontrollgruppe auszulösen vermögen. Die effektive Dosis mit 50 % Hemmung des Zellwachstums (ED_{50}) lag bei einer NaF-Konzentration von $3,0 \pm 1,4$ mM. Ab einer Konzentration von 2 mM wirkt NaF stark zytotoxisch. Die Ergebnisse des Hoechst 33342-Zytotoxizitätsassays korrelieren mit denen des XTT-Assays. Für die Kombinationsbehandlungen mit den jeweiligen organischen Substanzen enthielten die einzelnen Inkubationslösungen eine NaF-Endkonzentration von 1 mM, da bei dieser Konzentration nahezu keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden konnten (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Zellwachstum (H 33342) und metabolische Aktivität (XTT) der 3T3-Mausfibroblasten nach 24h Inkubation mit Natriumfluorid in unterschiedlichen Konzentrationen, (Mittelwerte und Standardabweichung in % der Kontrolle; Kontrolle=100%); * = ($p < 0,05$); ** = ($p < 0,01$); *** = ($p < 0,001$) Vergleich zwischen jeweiliger Konzentrationsstufe und Kontrolle innerhalb des jeweiligen Testsystems

	NaF-Inkubationslösung / BHZ 24h	
Konzentration [mM]	Hoechst 33342	XTT
10	$16,2 \pm 12,2^{***}$	$14,2 \pm 15,0^{***}$
5	$31,7 \pm 11,5^{***}$	$26,8 \pm 11,8^{***}$
2	$56,9 \pm 14,1^{***}$	$63,1 \pm 17,2^{***}$
1	$90,6 \pm 7,3$	$84,4 \pm 15,5$
0.5	$98,6 \pm 8,6$	$92,7 \pm 20,5$
0.25	$97,7 \pm 9,3$	$90,1 \pm 18,2$
0,1	$101,2 \pm 8,9$	$96,7 \pm 12,6$
0,05	$105,1 \pm 6,2$	$95,9 \pm 9,9$

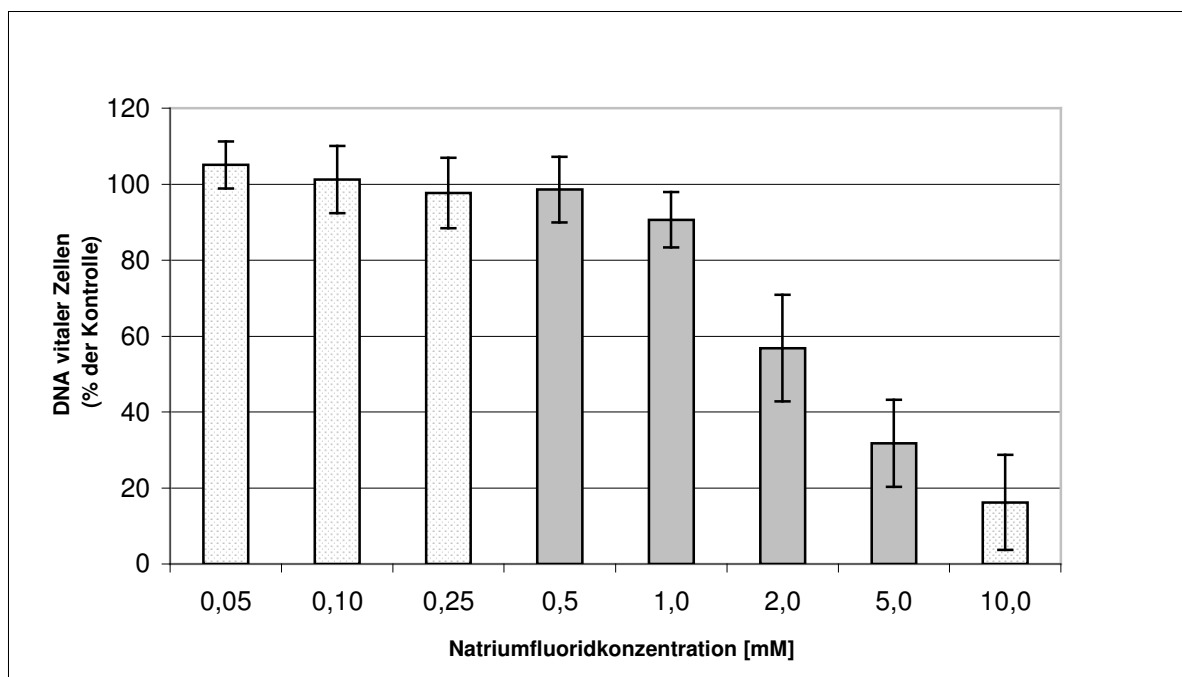


Abb. 3.1 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Natriumfluorid (Tabelle 3.1)
 Zytotoxizitätsassay: H 33342; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM = 100%; n = 7

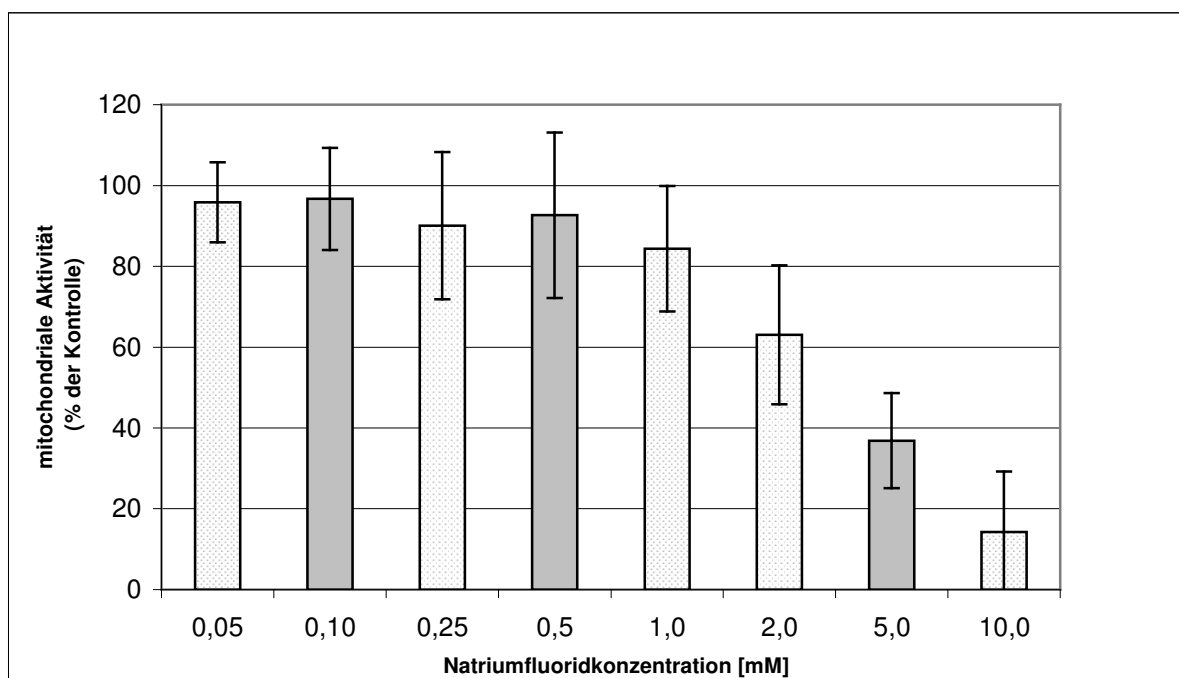


Abb. 3.2 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Natriumfluorid (Tabelle 3.1)
 Zytotoxizitätsassay: XTT; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM = 100%; n = 6

3.2 Die In-vitro-Zytotoxizität von Resinmonomeren bei An- bzw. Abwesenheit von Natriumfluorid

3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse für UDMA

UDMA zeigte sich in allen untersuchten Konzentrationsstufen im H 33342-Assay zytotoxisch. Bei den Versuchen mit der Reinsubstanz bewirkte eine Verdoppelung der Substanzkonzentration eine Steigerung der Zellschädigung um 10 – 48 %.

UDMA wies im H 33342 Assay in Kombination mit NaF (1 mM) eine 18 – 30 % signifikant höhere Toxizität gegenüber 3T3 Mausfibroblasten auf als das Monomer allein (Abb. 3.3). Während die alleinige Behandlung der Zellen mit UDMA im XTT-Assay bis auf die höchstkonzentrierte Inkubationslösung (0,25 mM) keine Reduktion der mitochondrialen Aktivität herbeiführte, zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung bei Verdopplung der Monomerkonzentration eine Steigerung der Zellschädigung um jeweils etwa 20 % pro Konzentrationsstufe (Tabelle 3.2). Bei den Konzentrationen von 0,01 mM bis 0,1 mM erfolgte bei den Versuchen mit UDMA allein eine signifikante Erhöhung der Dehydrogenaseaktivität bis auf 128,9 % $\pm$ 17,2 %. Ein Effekt, der bei den anderen Monomeren nicht festzustellen war. Insgesamt war hier bei der Kombination von UDMA mit NaF eine deutlich signifikante Steigerung der Zytotoxizität von 30 – 63 % ($p < 0,001$) im Vergleich zur organischen Einzelsubstanz festzustellen (Abb. 3.4).

Tabelle 3.2 Zellwachstum (Hoechst 33342) und metabolische Aktivität (XTT) der 3T3-Mausfibroblasten nach 24h Inkubation mit UDMA (variierende Konz.) alleine und in Anwesenheit von Natriumfluorid (konstante Endkonz. = 1 mM)

(Mittelwerte und Standardabweichung in % der Kontrolle; Kontrolle=100%)

* = ($p < 0,05$); ** = ($p < 0,01$); *** = ($p < 0,001$) Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung innerhalb des jeweiligen Testsystems

Konzentration [mM]	UDMA		UDMA + NaF [1 mM]	
	Hoechst 33342	XTT	Hoechst 33342	XTT
0,01	94,6 $\pm$ 3,5***	115,8 $\pm$ 6,5***	78,9 $\pm$ 4,5***	85,8 $\pm$ 8,8***
0,025	86,1 $\pm$ 6,7***	128,9 $\pm$ 17,2***	62,8 $\pm$ 6,2***	84,5 $\pm$ 7,7***
0,05	77,0 $\pm$ 7,5***	128,0 $\pm$ 13,4***	46,5 $\pm$ 9,8***	65,5 $\pm$ 12,6***
0,1	54,2 $\pm$ 9,8*	106,1 $\pm$ 9,9***	36,3 $\pm$ 11,5*	42,8 $\pm$ 15,7***
0,25	6,4 $\pm$ 7,9	36,7 $\pm$ 36,0	31,9 $\pm$ 9,6	18,6 $\pm$ 12,2

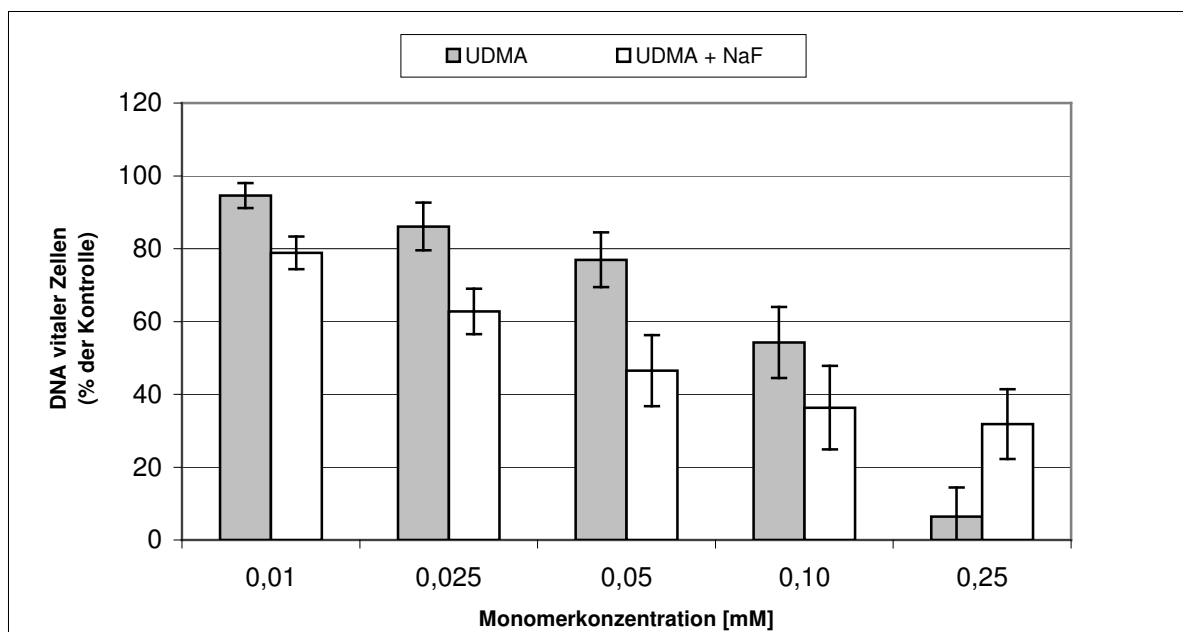


Abb. 3.3 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von UDMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: H 33342; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; UDMA: n = 5; UDMA+NaF: n = 6

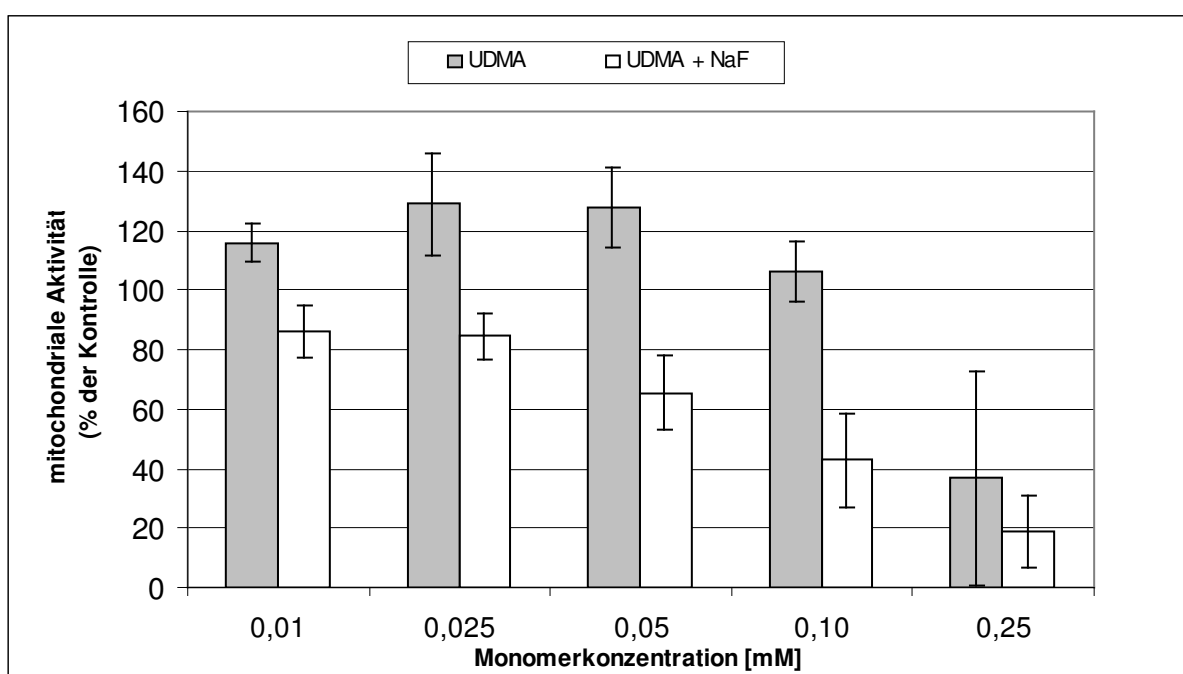


Abb. 3.4 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von UDMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: XTT; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; UDMA: n = 5; UDMA+NaF: n = 6

3.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse für Bis-GMA

Auch bei dieser Versuchsreihe erwiesen sich alle Konzentrationsstufen von Bis-GMA als zelltoxisch, jedoch konnten Auffälligkeiten im Vergleich zu den anderen Monomeren beobachtet werden. Im Bereich der niedrigen Monomerkonzentrationen (0,01–0,005 mM) war eine 26-30 % ($p < 0,001$) geringere Zellzahl im Hoechst-Assay bei den Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu der Behandlung mit dem reinen Monomer feststellbar. Dieser Effekt wurde zu den höheren Konzentrationen hin schwächer, bis er sich im Bereich der stark zellschädigenden Konzentrationsstufen (0,1-0,25 mM) umkehrte. In Anwesenheit von NaF kam es hier zu einer Absenkung der Zytotoxizität um etwa 5-10 % ($p < 0,05$) im Vergleich zur Behandlung mit dem reinen Monomer (Abb. 3.5). Die Ergebnisse des XTT-Assays korrelierten mit denen des H 33342-Assays. Auch hier war die oben beschriebene Besonderheit festzustellen. Im Bereich der niedrigen Konzentrationen (0,005-0,05 mM) war bei den Kombinationsversuchen eine 20-24 % höhere Toxizität in Anwesenheit von NaF zu verzeichnen ($p < 0,001$). Dagegen war ab der Konzentrationsstufe 0,1 mM eine etwa 5-11 % geringere Zellschädigung ($p < 0,05$) zu beobachten (Abb. 3.6).

Tabelle 3.3 Zellwachstum (Hoechst 33342) und metabolische Aktivität (XTT) der 3T3-Mausfibroblasten nach 24h Inkubation mit Bis-GMA (variierende Konz.) alleine und in Anwesenheit von Natriumfluorid (konstante Endkonz. = 1 mM)

(Mittelwerte und Standardabweichung in % der Kontrolle; Kontrolle=100%)

* = ($p < 0,05$); ** = ($p < 0,01$); *** = ($p < 0,001$) Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung innerhalb des jeweiligen Testsystems

	Bis-GMA		Bis-GMA + NaF [1 mM]	
Konzentration [mM]	Hoechst 33342	XTT	Hoechst 33342	XTT
0,005	77,8 ± 3,3***	92,7 ± 5,9***	48,2 ± 8,1***	69,1 ± 7,1***
0,01	65,5 ± 3,5***	89,2 ± 4,4***	39,4 ± 2,7***	65,8 ± 8,3***
0,05	38,7 ± 2,5***	72,1 ± 5,6***	32,6 ± 1,7***	52,1 ± 6,1 ***
0,1	19,7 ± 5,5*	22,2 ± 3,8*	27,1 ± 3,2*	33,2 ± 8,1*
0,25	10,4 ± 3,1*	7,6 ± 1,7*	15,7 ± 3,0*	12,8 ± 4,4*

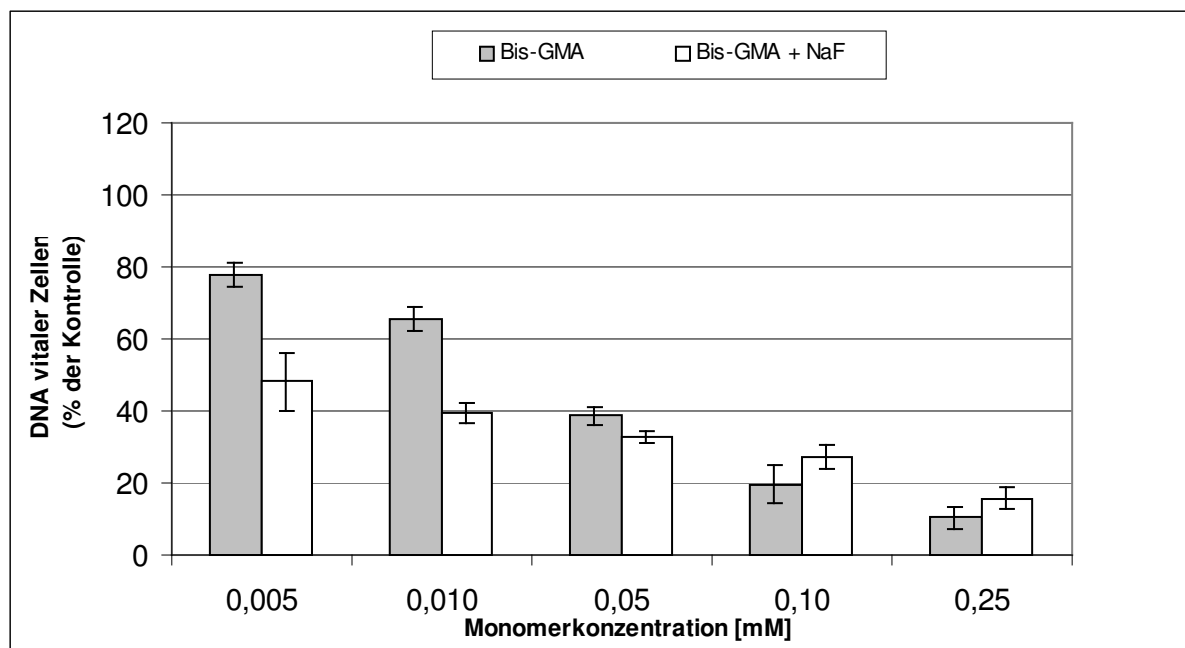


Abb. 3.5 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Bis-GMA mit und ohne NaF 1 mM
Zytotoxizitätsassay: H 33342; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
Kontrolle DMEM mit 0,5 % DMSO = 100%; n = 6

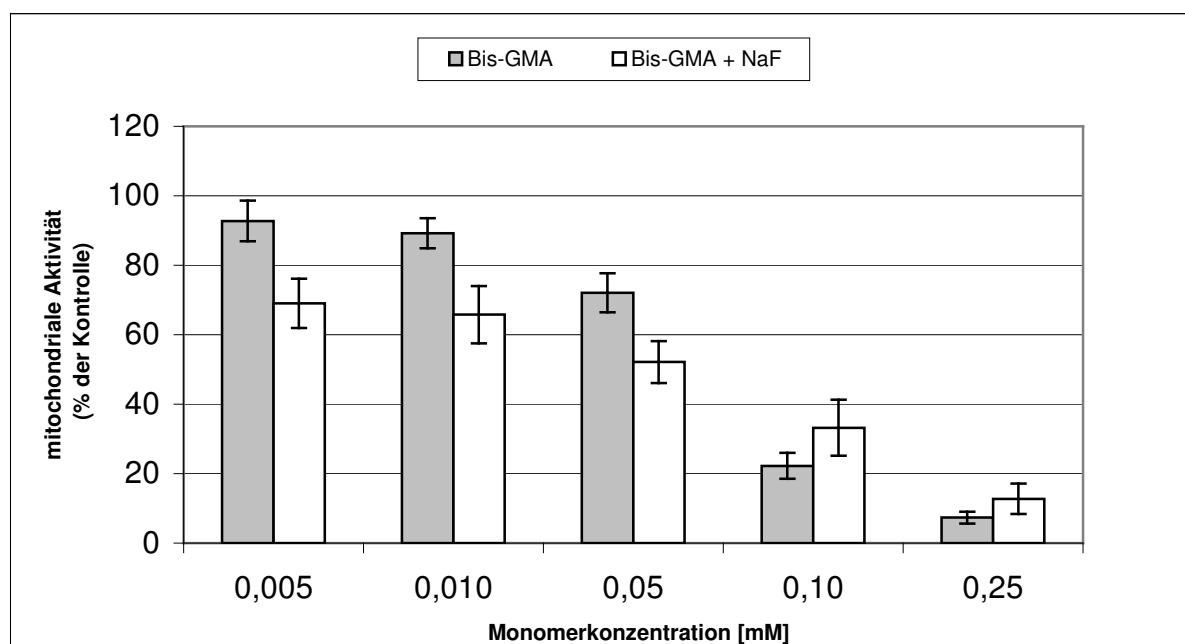


Abb. 3.6 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von Bis-GMA mit und ohne NaF 1 mM
Zytotoxizitätsassay: XTT; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; n = 6

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für HEMA

Analog zu den oben beschriebenen Monomeren vermag auch HEMA in allen getesteten Konzentrationsstufen des H 33342-Assays zytotoxische Effekte auszulösen. In Kombination mit NaF steigerte sich die Zytotoxizität der inkubierten Monomere bei einer Konzentration von 1,0 mM signifikant um 18 %, im Konzentrationsbereich 2,0 – 5,0 mM signifikant ($p < 0,01$) um etwa 22 % (Abb. 3.7).

Bei dem XTT-Assay von HEMA war ab der Monomerkonzentration von 4 mM in Kombination mit NaF eine Zunahme der Zytotoxizität um 16-18 % im Vergleich zur Einzelbehandlung mit der organischen Reinsubstanz rein rechnerisch zu verzeichnen, jedoch war diese statistisch nicht signifikant. Die beiden niedrigen Konzentrationsbereiche 1,0-2,0 mM verursachten im XTT keine nachweisbare Inhibition der metabolischen Aktivität der 3T3-Zellen (Abb. 3.8).

Tabelle 3.4 Zellwachstum (Hoechst 33342) und metabolische Aktivität (XTT) der 3T3-Mausfibroblasten nach 24h Inkubation mit HEMA (variierende Konz.) alleine und in Anwesenheit von Natriumfluorid (konstante Endkonz. = 1 mM)

(Mittelwerte und Standardabweichung in % der Kontrolle; Kontrolle=100%

* = ($p < 0,05$); ** = ($p < 0,01$); *** = ($p < 0,001$) Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung innerhalb des jeweiligen Testsystems

	HEMA		HEMA + NaF [1 mM]	
Konzentration [mM]	Hoechst 33342	XTT	Hoechst 33342	XTT
1,0	93,3 ± 1,2***	96,0 ± 7,3	75,7 ± 8,0***	99,7 ± 3,7
2,0	85,7 ± 3,6**	108,8 ± 3,3	63,2 ± 12,8**	104,6 ± 8,1
4,0	63,9 ± 11,5**	102,3 ± 12,5	38,7 ± 11,2**	86,7 ± 19,3
5,0	55,1 ± 10,2**	89,6 ± 16,6	33,5 ± 9,7**	75,7 ± 20,7
10,0	27,4 ± 17,5	45,5 ± 17,3	21,7 ± 9,3	27,3 ± 14,0

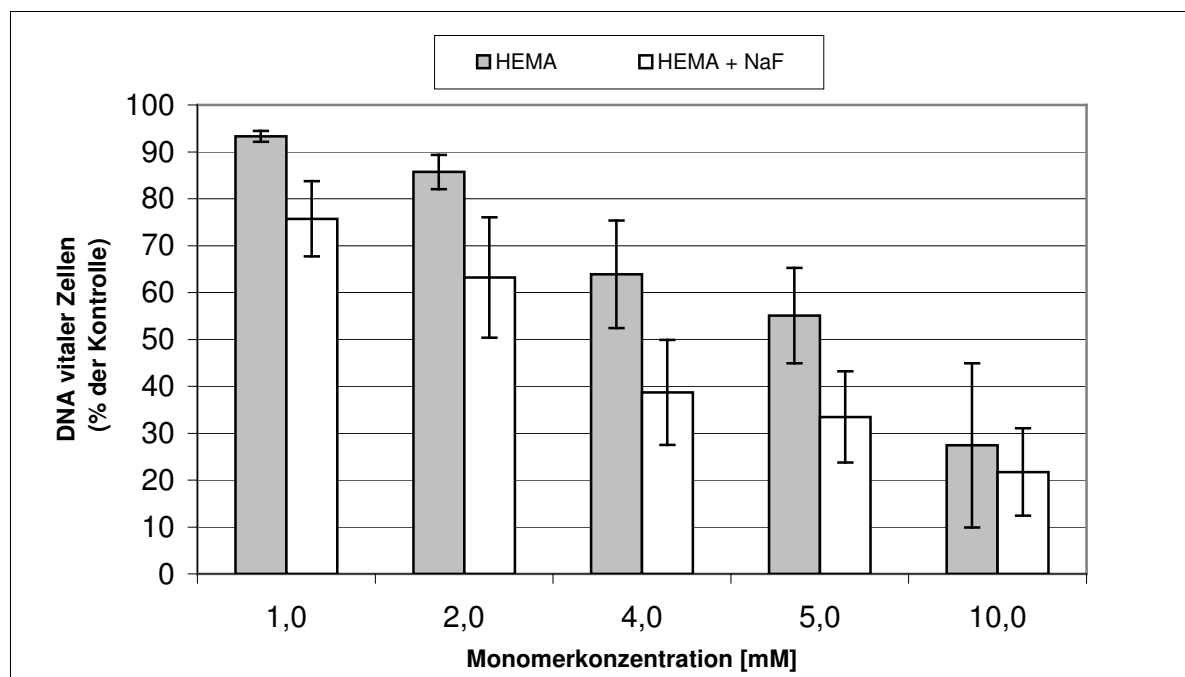


Abb. 3.7 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von HEMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: H 33342; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; HEMA: n = 5; HEMA+NaF: n = 6

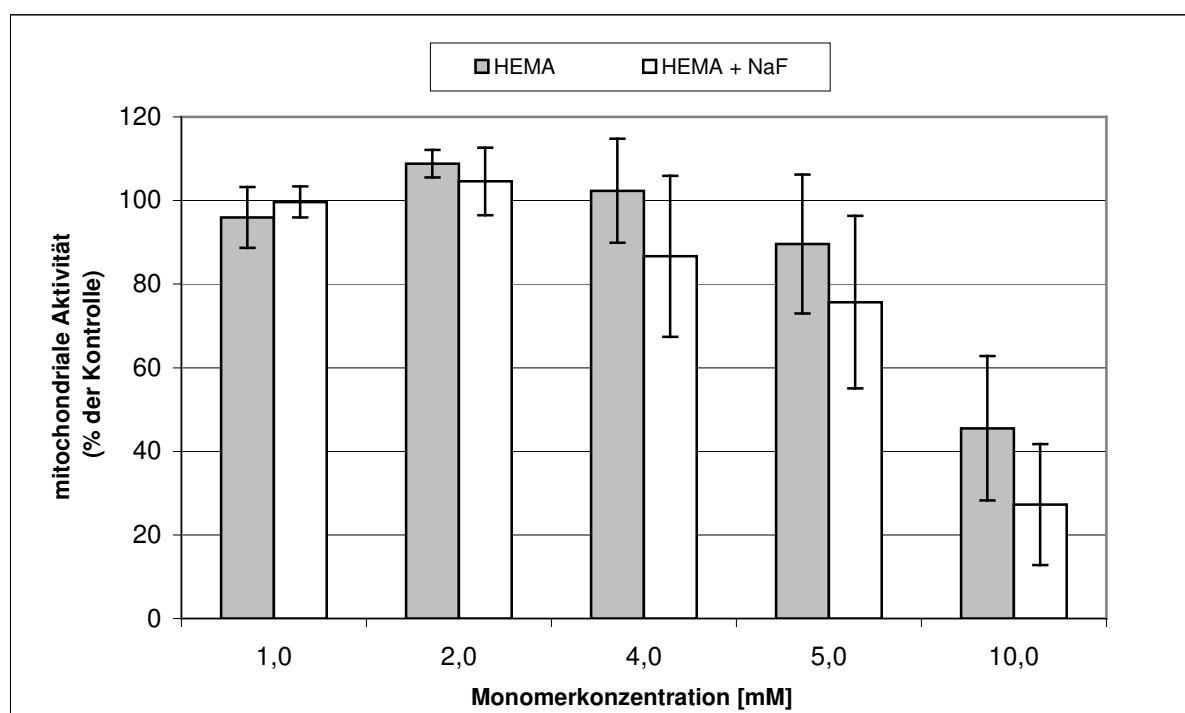


Abb. 3.8 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von HEMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: XTT; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; HEMA: n = 3; HEMA+NaF: n = 6

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für TEGDMA

Im H 33342-Assay war zu beobachten, dass das Monomer TEGDMA in allen getesteten Konzentrationsstufen das Zellwachstum hemmt. Bei den Kombinationsbehandlungen zeichnet sich im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ein 18 – 33 % signifikant geringeres Zellwachstum ab ($p < 0,001$). Bei den Einzelbehandlungen hat ab einer Konzentration von 0,5 mM eine Verdoppelung der Konzentration eine Verringerung der Zellzahl um 13 – 18 % zur Folge. Bei den Kombinationsbehandlungen hat eine Konzentrationsverdoppelung ein 8 – 12 % geringeres Zellwachstum zur Folge.

Auffällig waren die Ergebnisse des XTT-Assays. Hier zeigten sich zwar rechnerisch ermittelte unterschiedliche Mittelwerte der Zellzahl bei zum Teil außergewöhnlich hohen Standardabweichungen, so dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung festzustellen waren. Weiterhin war ungewöhnlich, dass nur beim XTT-Assay mit TEGDMA die Fibroblasten auf zwei unterschiedliche Arten auf die Inkubationslösungen reagierten. Ein Teil der XTT-Assays der Einzelbehandlung mit TEGDMA zeigte eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität (Assays 2, 3, 4; siehe Abb. 3.12 - Abb. 3.14) wobei in den übrigen Versuchen nahezu keine Beeinflussung des Zellmetabolismus durch die Inkubationslösungen hervorgerufen wurde (Assay 1, 5, 6; siehe Abb. 3.11, Abb. 3.15, Abb. 3.16).

Bei den Kombinationsbehandlungen mit TEGDMA und NaF zeichnete sich ein ähnliches Bild wie bei den Einzelbehandlungen ab. Die Zellen reagierten zum Teil sehr stark auf die Inkubationslösungen (Assays 2, 3, 4; siehe Abb. 3.12 - Abb. 3.14) und zum Teil schwach (Assays 1, 5; siehe Abb. 3.11 und Abb. 3.15). Bei der statistischen Analyse dieser Werte viel auf, dass auch hier eine außergewöhnlich hohe Standardabweichung berechnet werden konnte.

Dieser beobachtete Effekt wird um so interessanter, berücksichtigt man die Ergebnisse der parallel angesetzten H 33342-Assays. Diese wurden mit der gleichen Zellgeneration wie die einzelnen XTT-Assays durchgeführt.

Die Ergebnisse der beiden mit TEGDMA durchgeführten Testsysteme korrelieren nicht miteinander.

Tabelle 3.5 Zellwachstum (Hoechst 33342) und metabolische Aktivität (XTT) der 3T3-Mausfibroblasten nach 24h Inkubation mit TEGDMA (variierende Konz.) alleine und in Anwesenheit von Natriumfluorid (konstante Endkonz. = 1 mM)

(Mittelwerte und Standardabweichung in % der Kontrolle; Kontrolle=100%)

* = (p< 0,05); ** = (p< 0,01); *** = (p< 0,001) Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung innerhalb des jeweiligen Testsystems

Konzentration [mM]	TEGDMA		TEGDMA + NaF [1 mM]	
	<i>Hoechst 33342</i>	<i>XTT</i>	<i>Hoechst 33342</i>	<i>XTT</i>
0,05	92,9 ± 2,6***	100,6 ± 7,8	75,4 ± 5,4***	95,2 ± 12,25
0,1	90,0 ± 3,9***	98,5 ± 14,1	67,4 ± 9,1***	92,0 ± 16,5
0,5	74,4 ± 10,2***	78,3 ± 36,6	41,9 ± 9,5***	54,3 ± 33,9
1,0	61,8 ± 11,2**	64,9 ± 50,3	29,9 ± 14,8**	27,3 ± 29,8
1,25	56,7 ± 10,1**	62,4 ± 52,5	25,7 ± 14,0**	20,3 ± 24,7
2,5	38,4 ± 6,8***	53,4 ± 53,3	12,9 ± 7,4***	5,2 ± 3,6

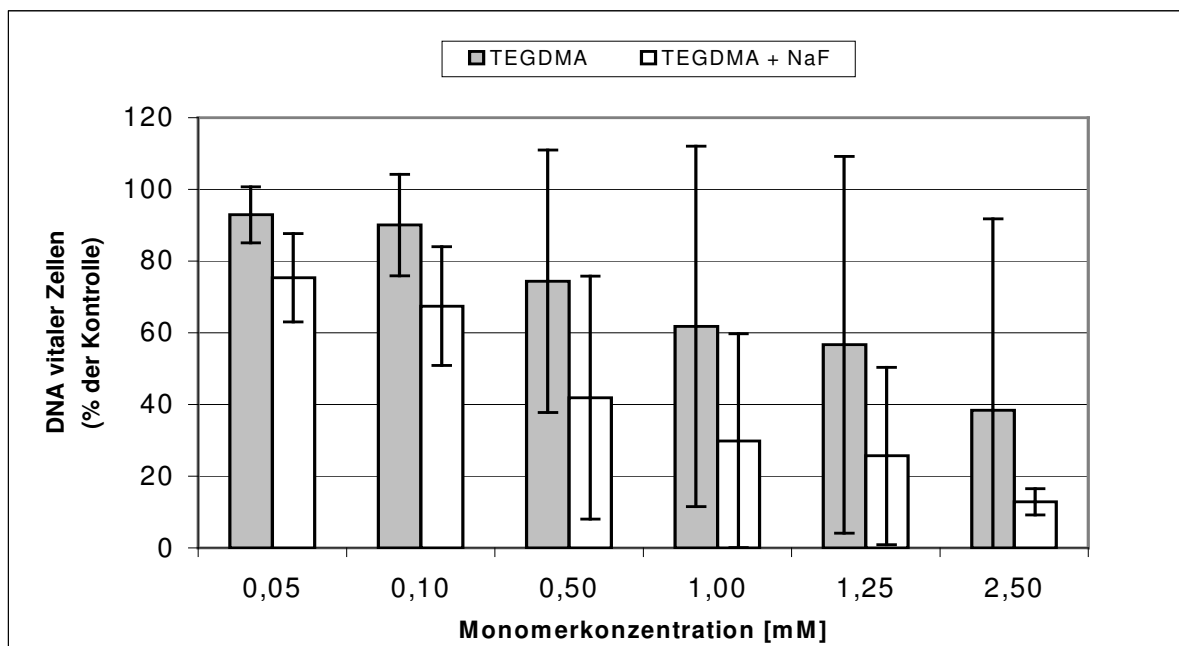


Abb. 3.9 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von TEGDMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: H 33342; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; TEGDMA: n = 5; TEGDMA+NaF: n = 7

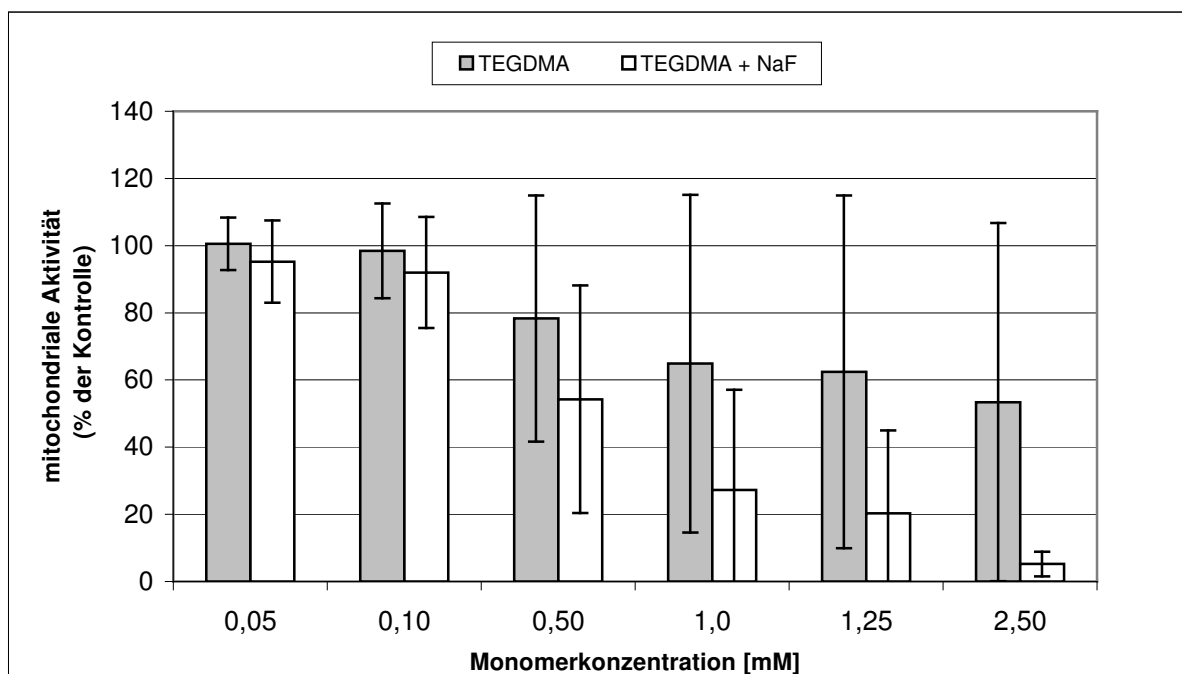


Abb. 3.10 Graphische Darstellung der Zytotoxizität von TEGDMA mit und ohne NaF 1 mM
 Zytotoxizitätsassay: XTT; Anheftungszeit 24 h; Inkubationszeit 24 h
 Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%; TEGDMA: n = 6; TEGDMA: n = 7

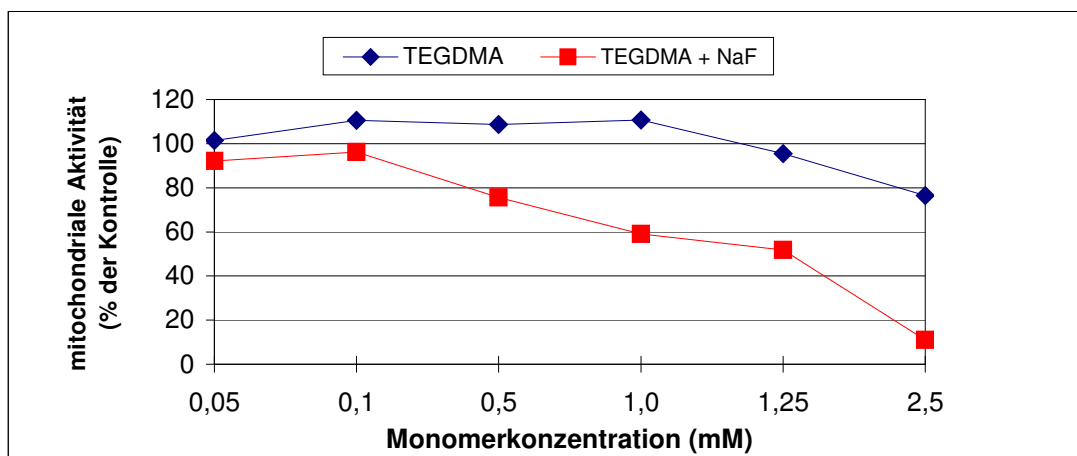


Abb. 3.11 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 1
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

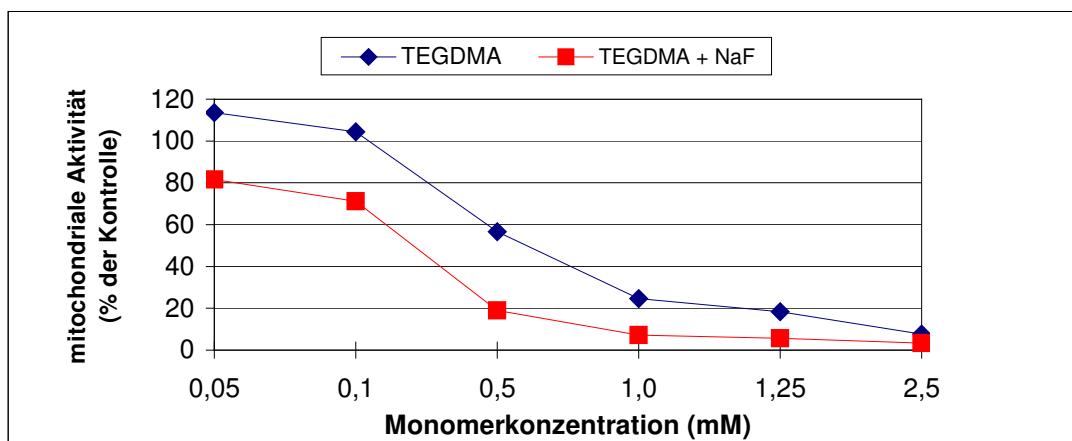


Abb. 3.12 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 2
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

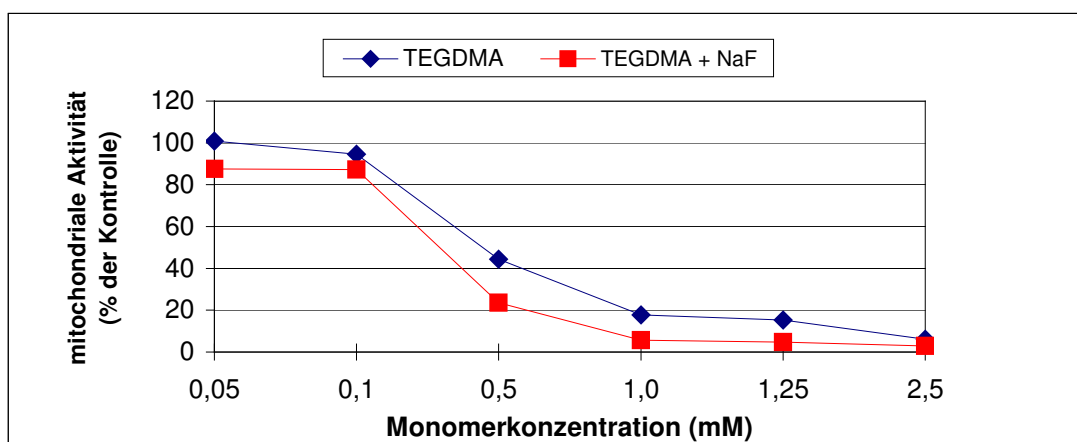


Abb. 3.13 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 3
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

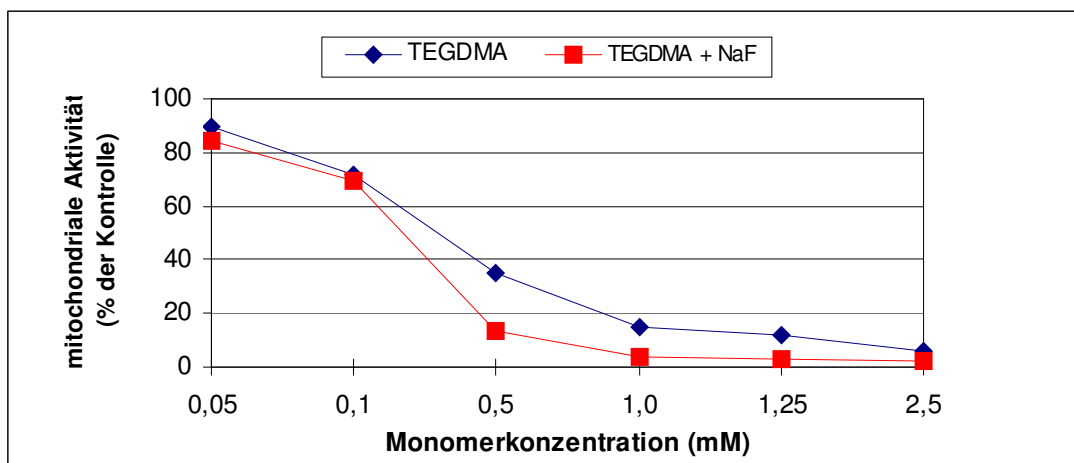


Abb. 3.14 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 4
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

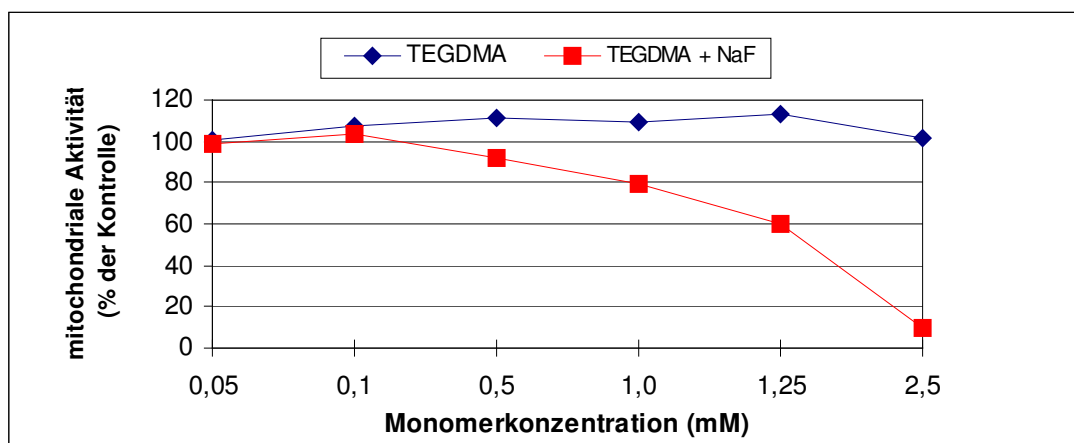


Abb. 3.15 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 5
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

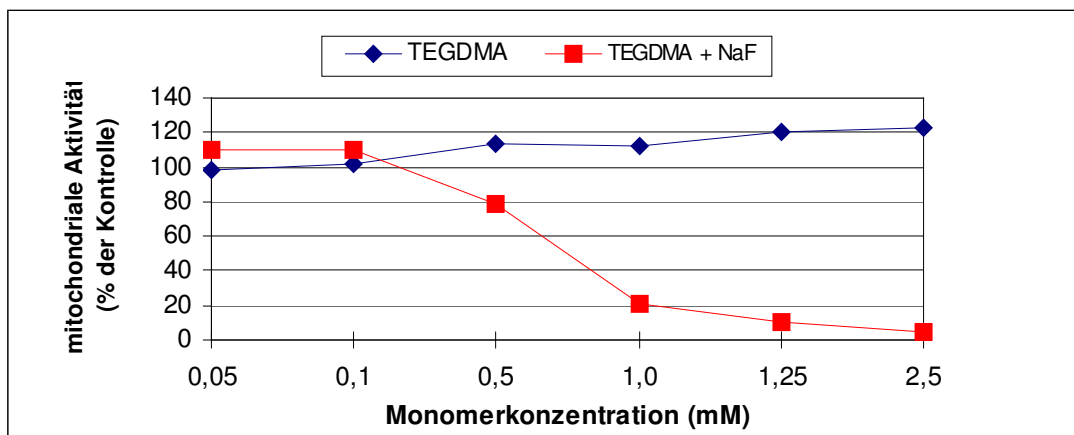


Abb. 3.16 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit TEGDMA XTT-Assay 6
jeder Wert in % der Kontrolle, (Kontrolle DMEM mit 0,5% DMSO = 100%)

3.3 Bestimmung der effektiven Dosis (ED_{50}) der organischen Testsubstanzen für Einzel- und Kombinationsbehandlungen

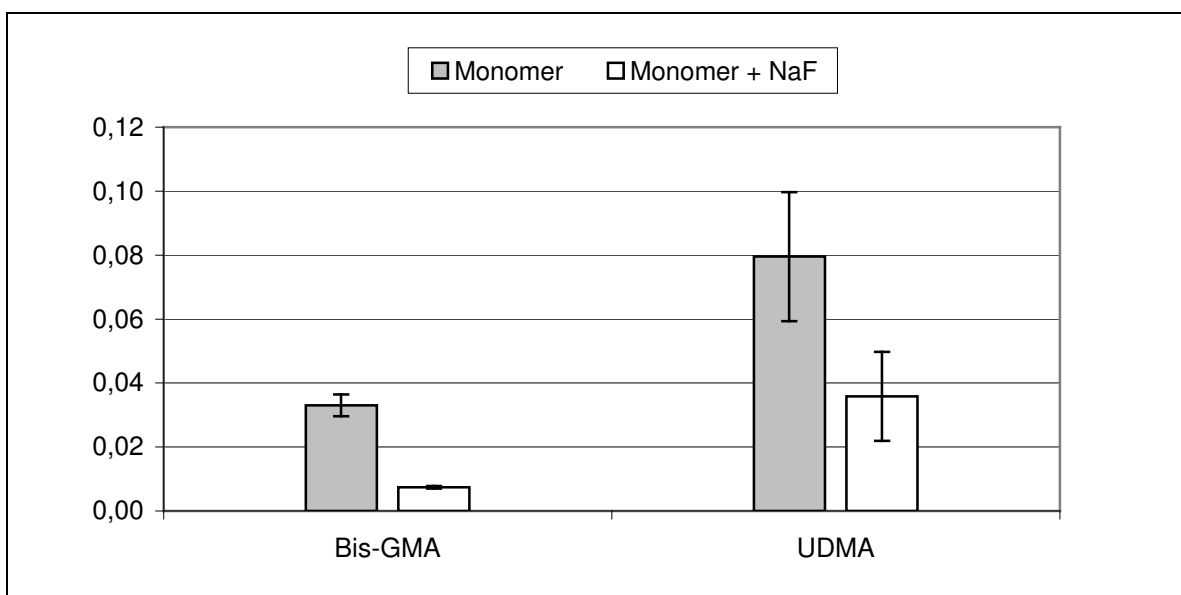


Abb. 3.17 Vergleich der ED_{50} Werte von Bis-GMA und UDMA bei der Einzelbehandlung (grau) und bei der Kombinationsbehandlung (weiß) mit 3T3-Mausfibroblasten im H 33342-Assay nach 24 h Inkubation; Angaben in mM

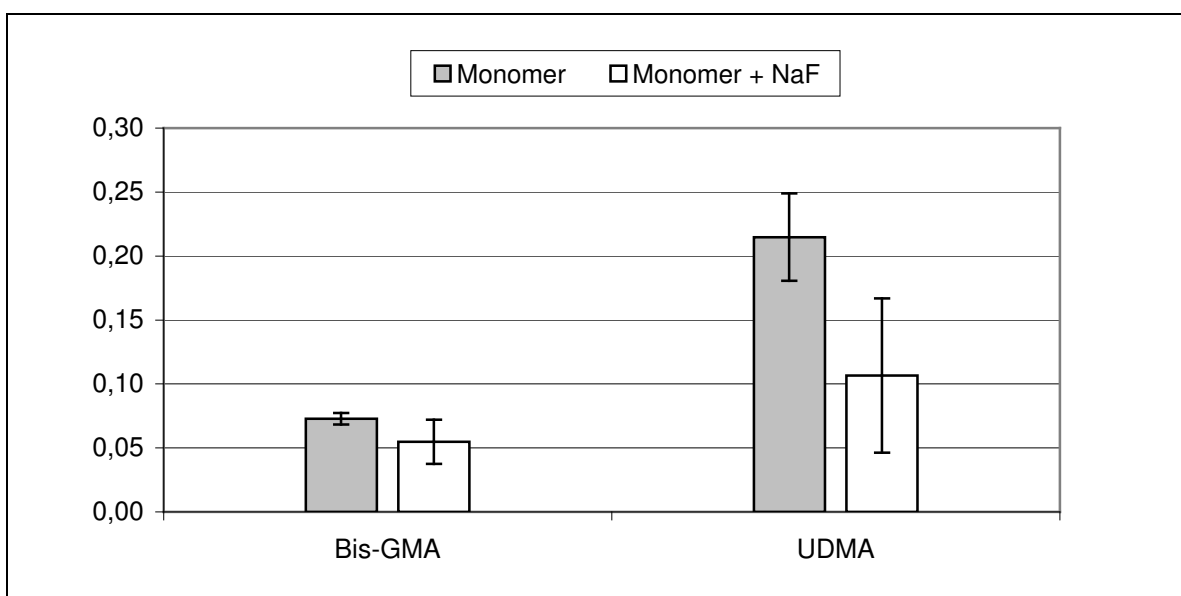


Abb. 3.18 Vergleich der ED_{50} Werte von Bis-GMA und UDMA bei der Einzelbehandlung (grau) und bei der Kombinationsbehandlung (weiß) mit 3T3-Mausfibroblasten im XTT-Assay nach 24 h Inkubation; Angaben in mM

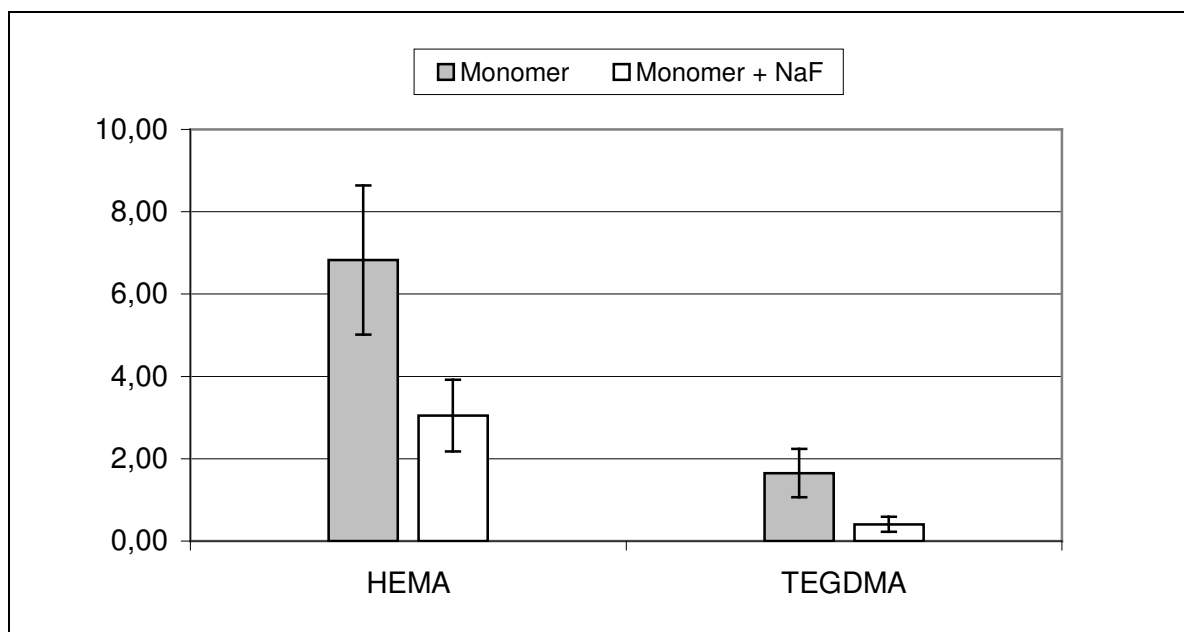


Abb. 3.19 Vergleich der ED_{50} Werte von HEMA und TEGDMA bei der Einzelbehandlung (grau) und bei der Kombinationsbehandlung (weiß) mit 3T3-Mausfibroblasten im H 33342-Assay nach 24 h Inkubation; Angaben in mM

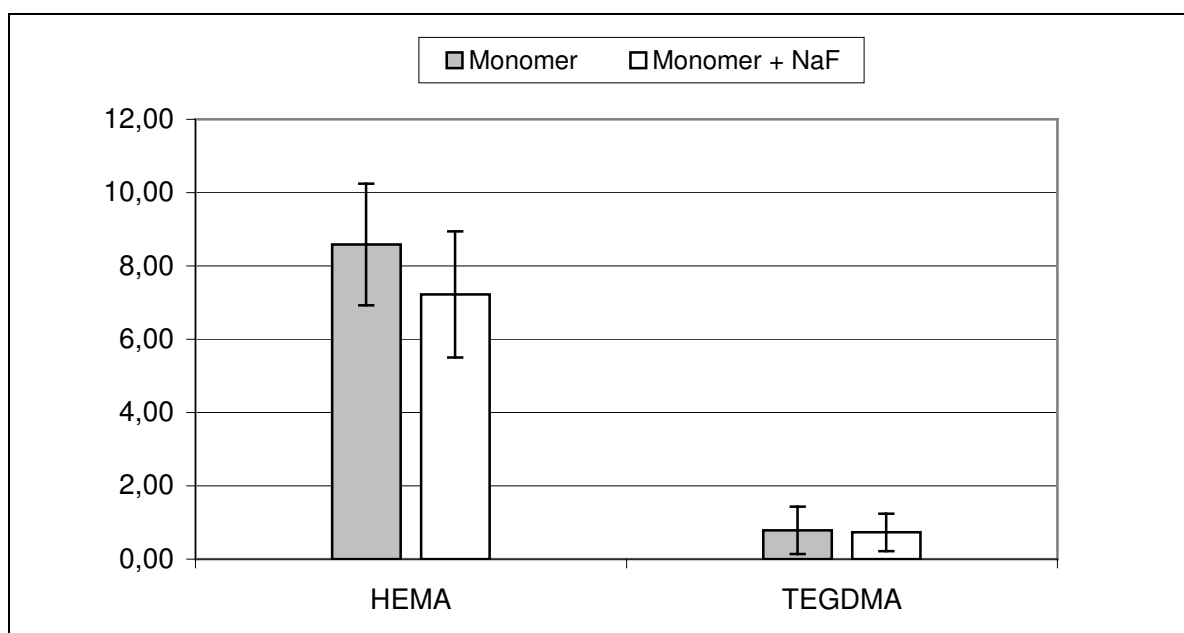


Abb. 3.20 Vergleich der ED_{50} Werte von HEMA und TEGDMA bei der Einzelbehandlung (grau) und bei der Kombinationsbehandlung (weiß) mit 3T3-Mausfibroblasten im XTT-Assay nach 24 h Inkubation; Angaben in mM

Die ED₅₀ Werte für alle Substanzen wurden durch Extrapolation berechnet. Für die Versuchsansätze mit dem Monomer alleine zeigt sich sowohl im H 33342 Assay als auch im XTT Assay das gleiche Ranking im Hinblick auf die Zytotoxizität der Substanzen. Das zytotoxische Schädigungspotential nimmt in folgender Reihenfolge ab: Bis-GMA > UDMA > TEGDMA > HEMA (siehe Abb. 3.17 - Abb. 3.20).

Bei den Kombinationsversuchen zeigt sich im H 33342 Assay dieselbe Reihenfolge wie in den beiden Assays für die Versuche mit dem Monomer alleine.

Nur im XTT Assay bei den Kombinationsversuchen zeigt sich die folgende etwas abweichende Reihenfolge im Zytotoxizitätsranking: Bis-GMA > TEGDMA > UDMA > HEMA (siehe auch Anhang Tabelle 7.5, Tabelle 7.6).

Insgesamt ist festzustellen, dass bei den Versuchen im H 33342 Assay bei Bis-GMA, UDMA, HEMA und TEGDMA jeweils in Kombination mit NaF 1 mM die ED₅₀ im Vergleich zu den Versuchen mit dem Monomer alleine signifikant niedriger lag.

Gleiches trifft auch für den XTT-Assay für die Versuche mit Bis-GMA und UDMA zu. Bei TEGDMA und HEMA lagen die ED₅₀ Werte bei den Kombinationen auch niedriger, jedoch waren sie statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 3.20).

3.4 Mikroskopische Auswertung der Zytotoxizität

Alle vier untersuchten Monomere und auch Natriumfluorid allein waren in der Lage an der permanenten Zelllinie zytotoxische Effekte auszulösen, was im Hinblick auf Zellmorphologie und Zelldichte mikroskopisch dargestellt werden konnte.

Im folgenden sollen die morphologischen Veränderungen exemplarisch und stellvertretend für die getesteten Monomere anhand der Versuche mit TEGDMA dargestellt werden (Abb. 3.25 - Abb. 3.32). Die Untersuchungen mit den übrigen Monomeren Bis-GMA, UDMA und HEMA zeigten im mikroskopischen Bild vergleichbare Effekte zu den bei TEGDMA beschriebenen morphologischen Veränderungen.

Die folgenden Angaben zur Wachstumsrate wurden aus den jeweiligen H 33342 Experimenten übernommen.

Natriumfluorid

Die Inkubationslösungen mit Natriumfluorid vermögen je nach Konzentration ebenfalls zytotoxische Effekte hervorzurufen.

Bei den mit 1 mM NaF behandelten Zellen zeigen sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen keine signifikanten morphologischen Unterschiede. Die Wachstumsrate beträgt etwa 90 % (siehe Kapitel 3.1.1). Es liegt ein dichter und homogener Zellrasen vor. Mitosen (weiße Pfeile) sind häufig zu beobachten (Abb. 3.22). Ein anderes Bild zeigt sich jedoch bei den mit 5 mM NaF behandelten Zellen. Hier fallen deutlich inhomogene Zellformationen auf. Intrazellulär finden sich bei einer Vielzahl der Zellen eine hohe Anzahl von Vakuolen (schwarze Pfeile). Mitosen sind selten, lysierte Zellen treten dafür um so häufiger auf (grau-weiße Pfeile). Zum Teil finden sich atypisch aufgeblähte, abgekugelte Zellen mit veränderten Zellfortsätzen. Die Wachstumsrate liegt bei 30 – 40 % (Abb. 3.23).

Das mikroskopische Bild des Ansatzes mit 10 mM NaF zeigt deutlich eine erhebliche Reduktion der Zellzahl, es lag kein zusammenhängender Zellrasen vor. Die Zellen sind stark vakuolisiert und aufgebläht. Der überwiegende Teil der Zellen ist lysiert, die übrigen erscheinen im Ablösungsprozess begriffen. Zelltrümmer und atypische, abgekugelte Fibroblastenzellen prägen das Bild (gestrichelte weiße Linie). Die Wachstumsrate liegt bei etwa 15 % (Abb. 3.24).

Die unbehandelten Kontrollansätze waren morphologisch unauffällig. Die Zellen bedecken den Plattenboden in einem dichten homogenen Zellrasen (Abb. 3.21).

0,1 mM TEGDMA mit und ohne 1 mM NaF

Bei dem Ansatz mit 0,1 mM TEGDMA war ein nahezu unbeeinträchtigtes Zellwachstum zu beobachten. Einige wenige Zellen erscheinen unphysiologisch abgekugelt, andere weisen eine erhöhte Anzahl an intrazellulären Vakuolen (schwarze Pfeile) auf. Es fallen jedoch insgesamt deutlich sichtbare Mitosestadien (weiße Pfeile) mehrerer Zellen auf (Abb. 3.25).

Im Vergleich dazu ist bei dem Ansatz mit 0,1 mM TEGDMA und 1 mM NaF ein deutlich stärkerer zytotoxischer Effekt zu beobachten. Es finden sich mehr abgekugelte, zum Teil abgelöste Zellen in den Untersuchungswells als bei der oben beschriebenen Einzelbehandlung mit 0,1 mM TEGDMA (gestrichelte weiße Linie).

Die Mitoserate ist deutlich geringer. Die Zellzahl im Untersuchungswell ist reduziert. Es finden sich inhomogene Zellhäufungen (Abb. 3.26).

0,5 mM TEGDMA mit und ohne 1 mM NaF

Mit zunehmender Konzentration der TEGDMA-Inkubationslösung steigt der Anteil der abgekugelten Zellen. Es finden sich jetzt auch Zelltrümmer (grau-weiße Pfeile). Die Homogenität des zuvor einschichtigen Zellrasens ist aufgelöst. Es finden sich vereinzelt Mitosen.

Im Vergleich zur Einzelbehandlung (Abb. 3.27) ist bei dem Ansatz von 0,5 mM TEGDMA mit 1 mM NaF (Abb. 3.28) der Anteil von abgekugelten, in der Ablösung befindlichen Zellen weitaus größer (gestrichelte weiße Linie). Die Wachstumsrate der Zellen ist um 50 % geringer (Abb. 3.28).

1,0 mM TEGDMA mit und ohne 1 mM NaF

Nahezu 50 % der mit 1,0 mM TEGDMA behandelten Zellen sind tot. Es finden sich großflächig abgelöste, kugelige Zellkonglomerate (gestrichelte weiße Linie). Zelldetritus verteilt sich im gesamten Untersuchungswell (Abb. 3.29).

Bei den mit 1,0 mM TEGDMA und 1 mM NaF behandelten Zellen finden sich hauptsächlich kugelige und häufig aufgeblähte Zellen. Die typische Fibroblastenmorphologie ist aufgelöst. Ein großer Teil der Zellen befindet sich in der Zytolyse. Die Wachstumsrate beträgt < 30 % (Abb. 3.30).

1,25 mM TEGDMA mit und ohne 1 mM NaF

Zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung (Abb. 3.31 und Abb. 3.32) besteht im lichtmikroskopischen Bild kein signifikanter Unterschied. Die Wachstumsrate liegt unter 25 %. Es finden sich fast ausschließlich kugelige, devitale Zellen. Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich in der Zytolyse. Zelldetritus findet sich in Häufungen.

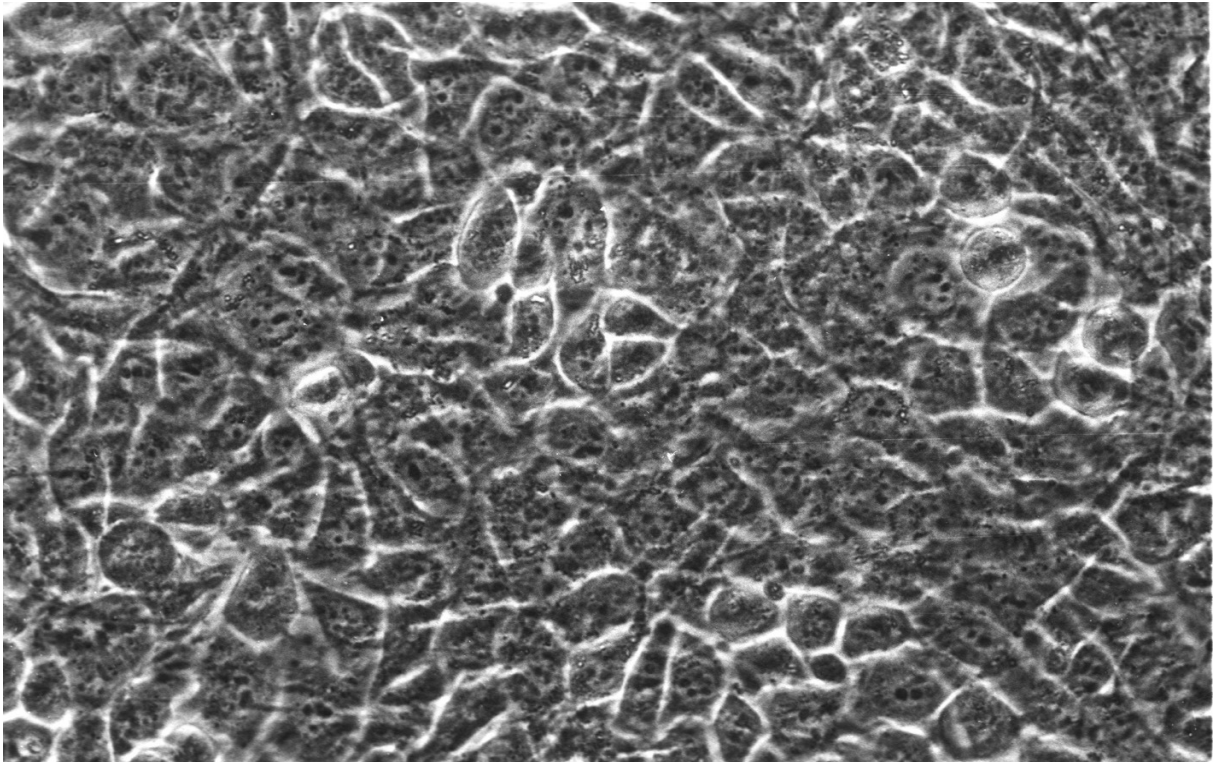


Abb. 3.21 3T3-Mausfibroblasten in DMEM (unbehandelte Kontrolle)
Anheftungszeit (AHZ) 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate = 100 %

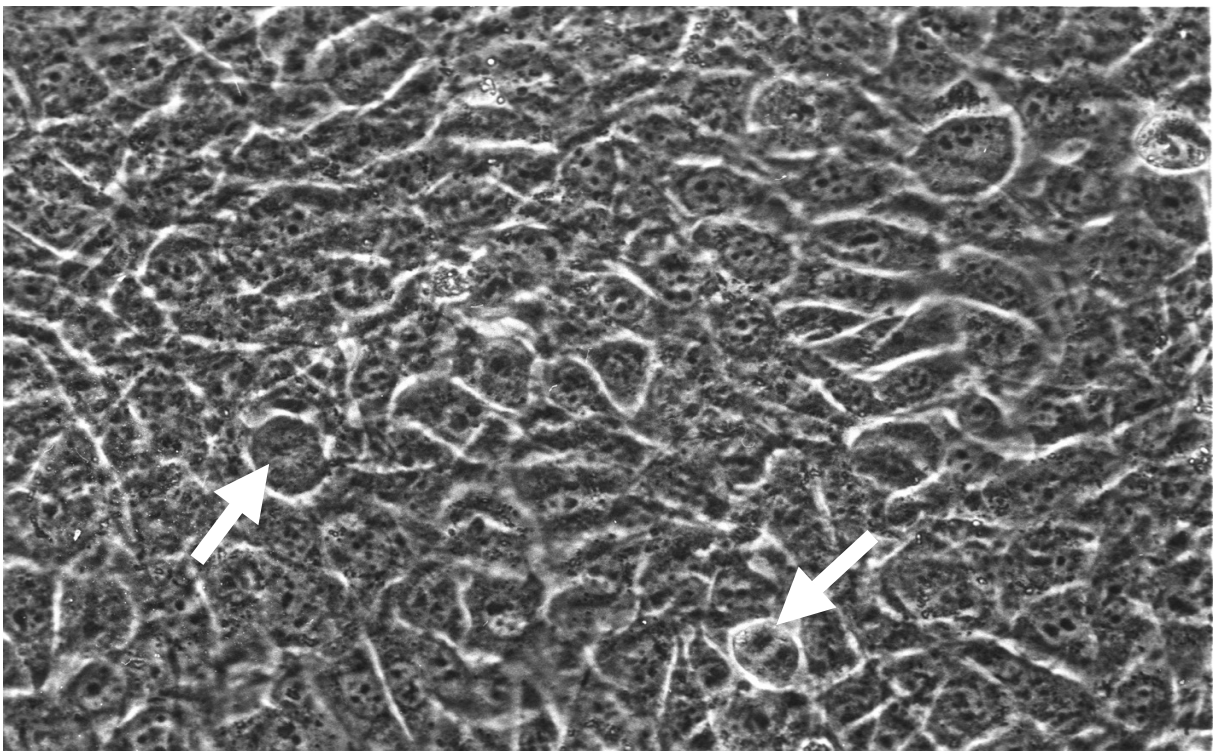


Abb. 3.22 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit NaF (1 mM)
Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate ca. 90 %
weiße Pfeile = Mitosen

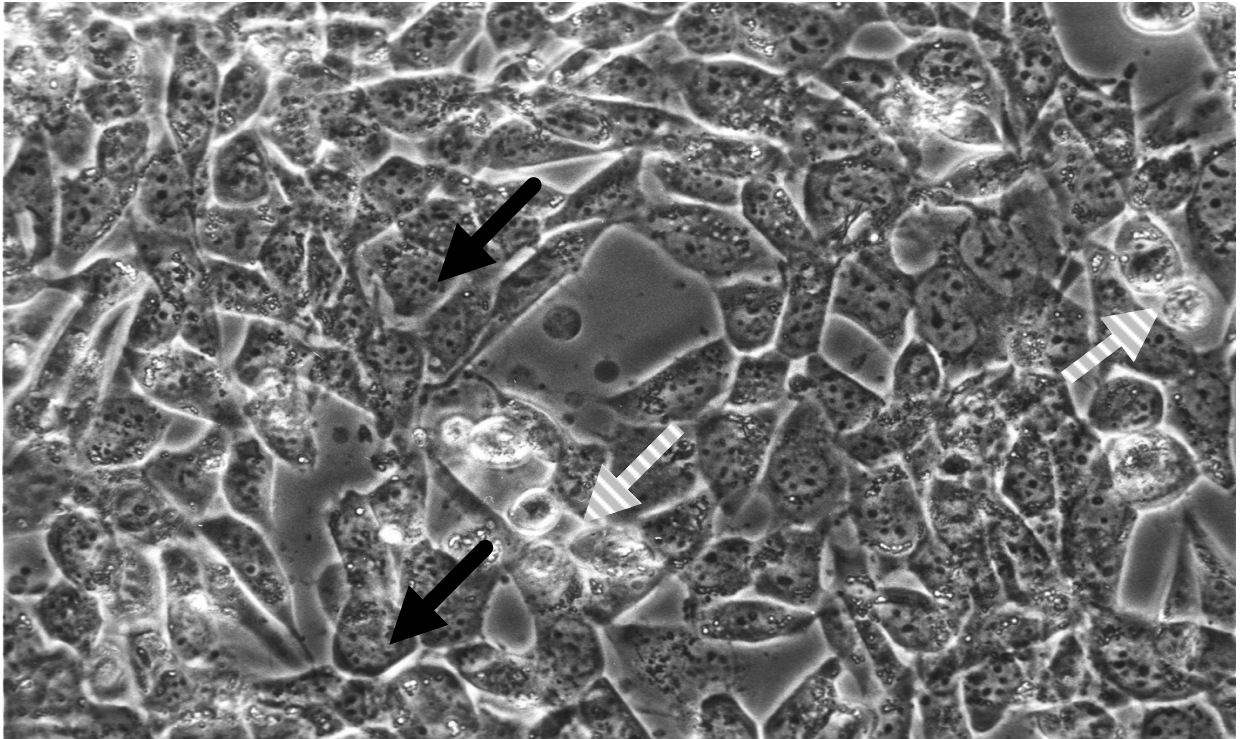


Abb. 3.23 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit NaF (5 mM)
 Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate 30 – 40 %
 schwarze Pfeile = intrazelluläre Vakuolisierung; grau-weiße Pfeile = lysierte Zellen

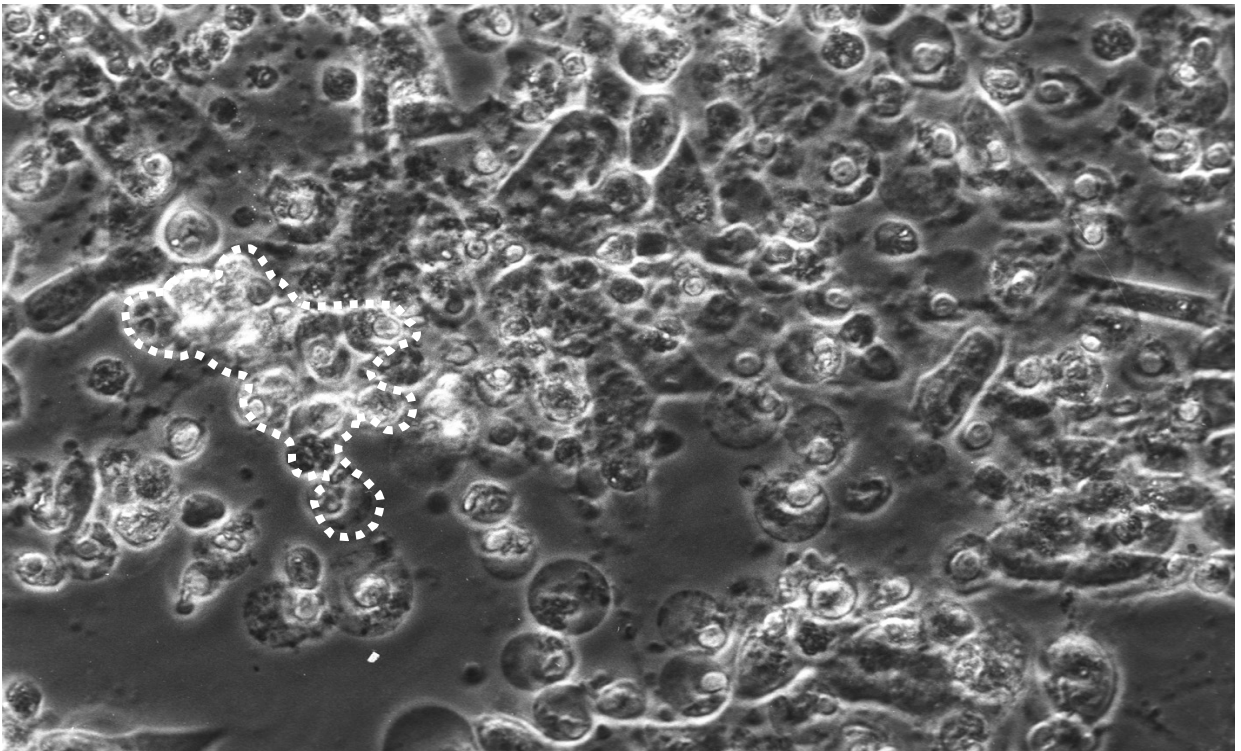


Abb. 3.24 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit NaF (10 mM)
 Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate etwa 15 %
 gestrichelte weiße Linie = abgelöste, abgekugelte Zellen

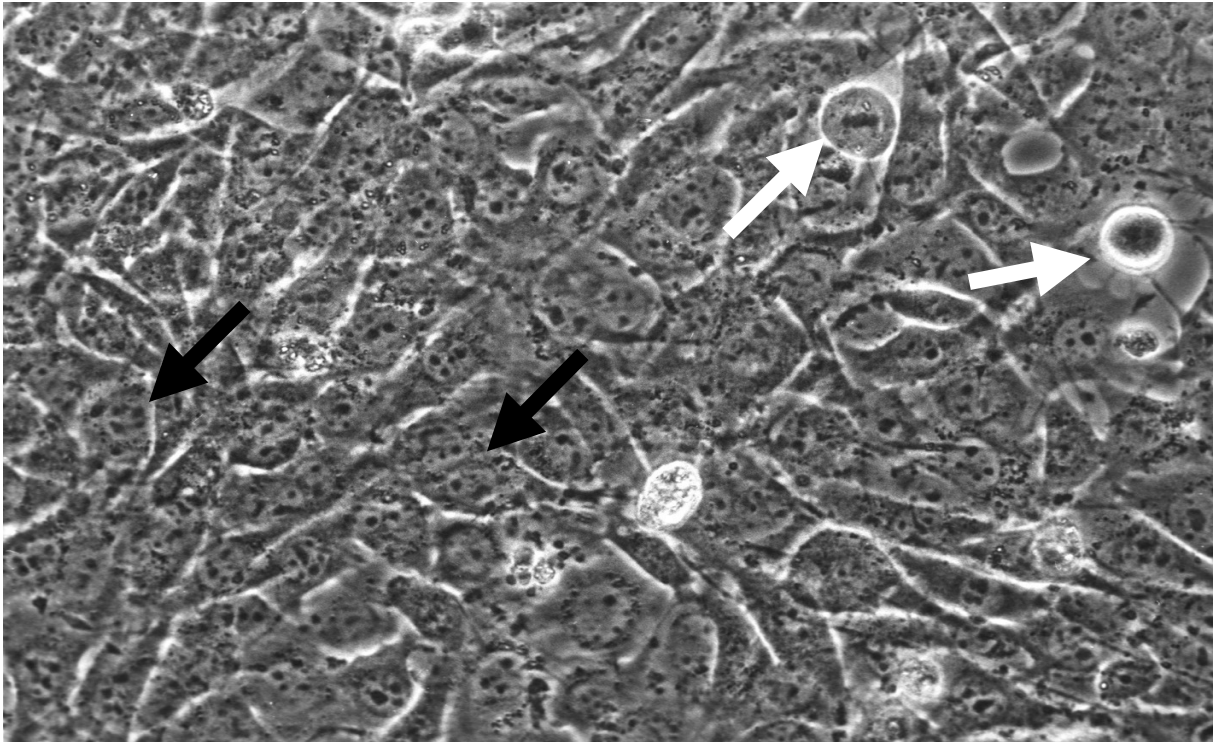


Abb. 3.25 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (0,1 mM)
 Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate ≥ 90 %
 schwarze Pfeile = intrazelluläre Vakuolisierung; weiße Pfeile = Mitosen

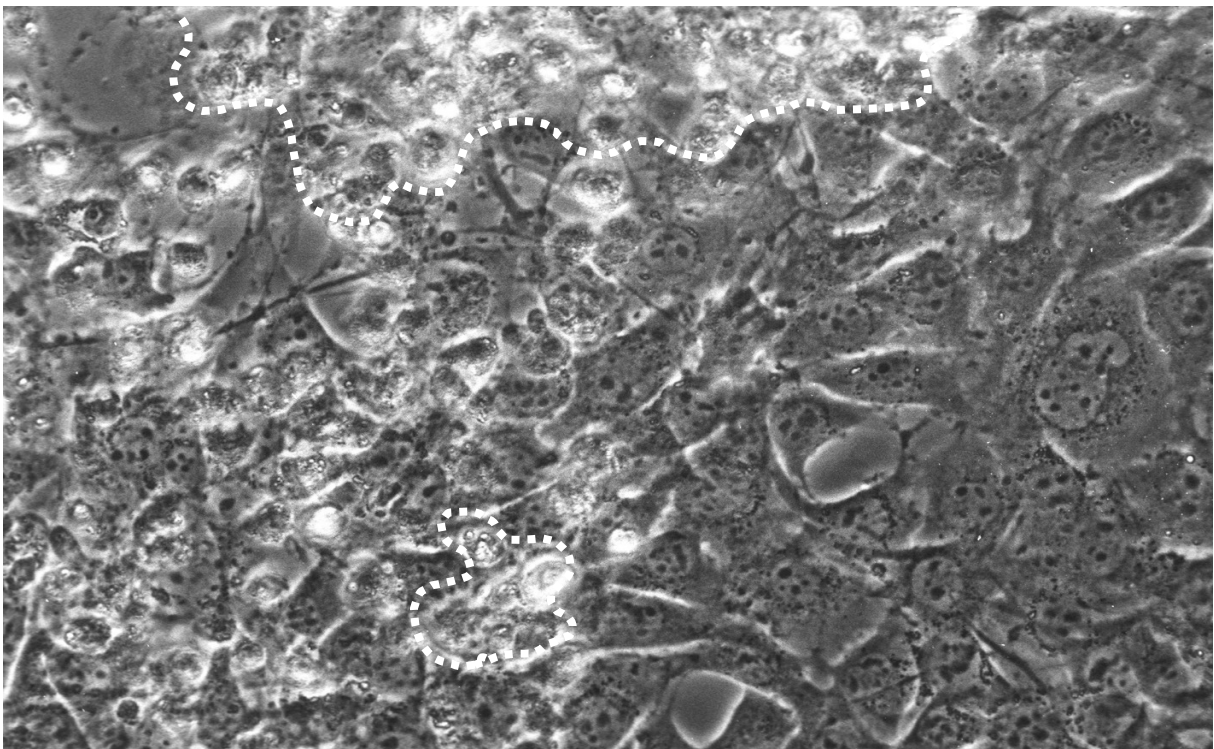


Abb. 3.26 3T3- Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (0,1 mM) und NaF (1 mM)
 Inkubationszeit: 24h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate < 70 %
 gestrichelte weiße Linie = abgelöste, abgekugelte Zellen

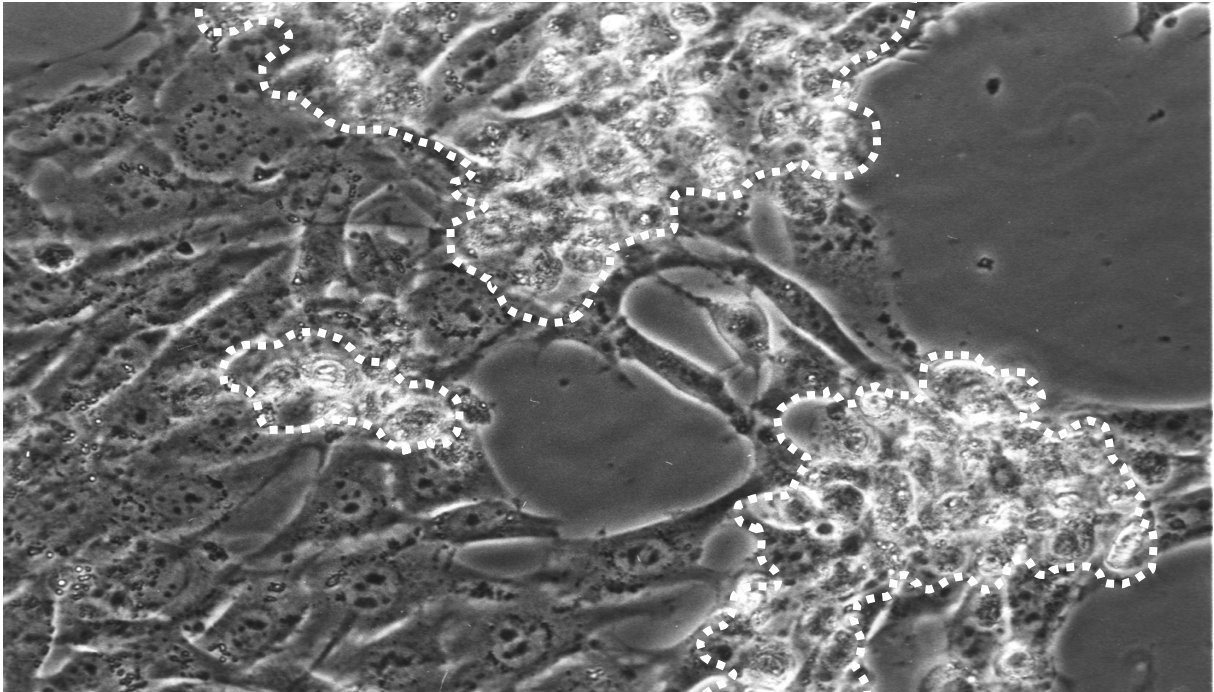


Abb. 3.27 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (0,5 mM)
Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate 70 - 75 %
gestrichelte weiße Linie = abgelöste, abgekugelte Zellen

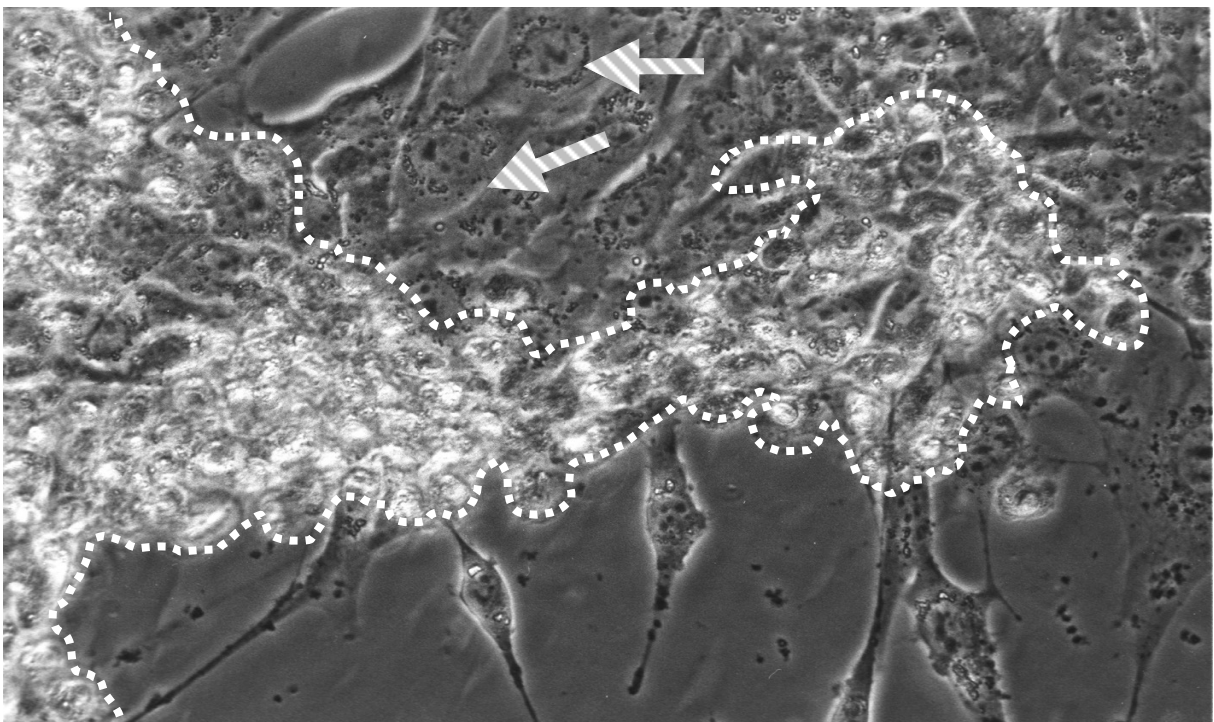


Abb. 3.28 3T3- Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (0,5 mM) und NaF (1 mM)
Inkubationszeit: 24h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate 35 - 40%
gestrichelte weiße Linie = abgelöste, abgekugelte Zellen,
grau-weiße Pfeile = lysierte Zellen, Zelltrümmer

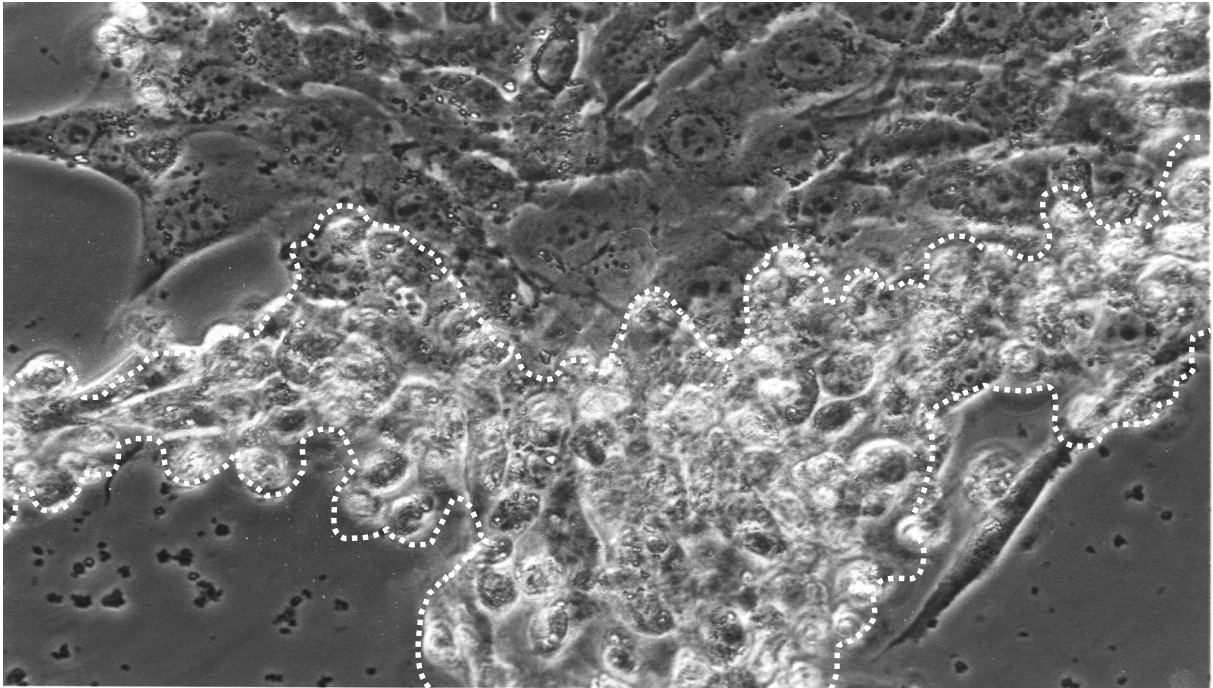


Abb. 3.29 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (1,0 mM)
Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate 60 – 65 %
gestrichelte weiße Linie = abgelöste, abgekugelte Zellen

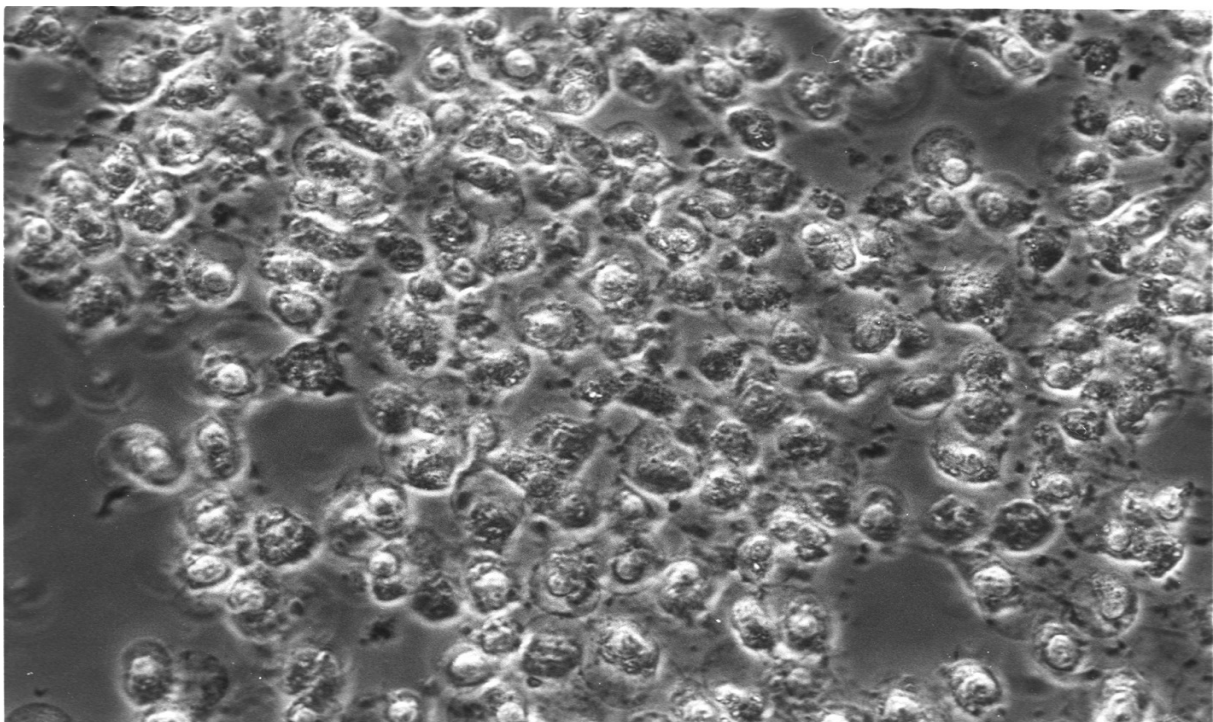


Abb. 3.30 3T3- Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (1,0 mM) und NaF (1 mM)
Inkubationszeit: 24h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate < 30 %

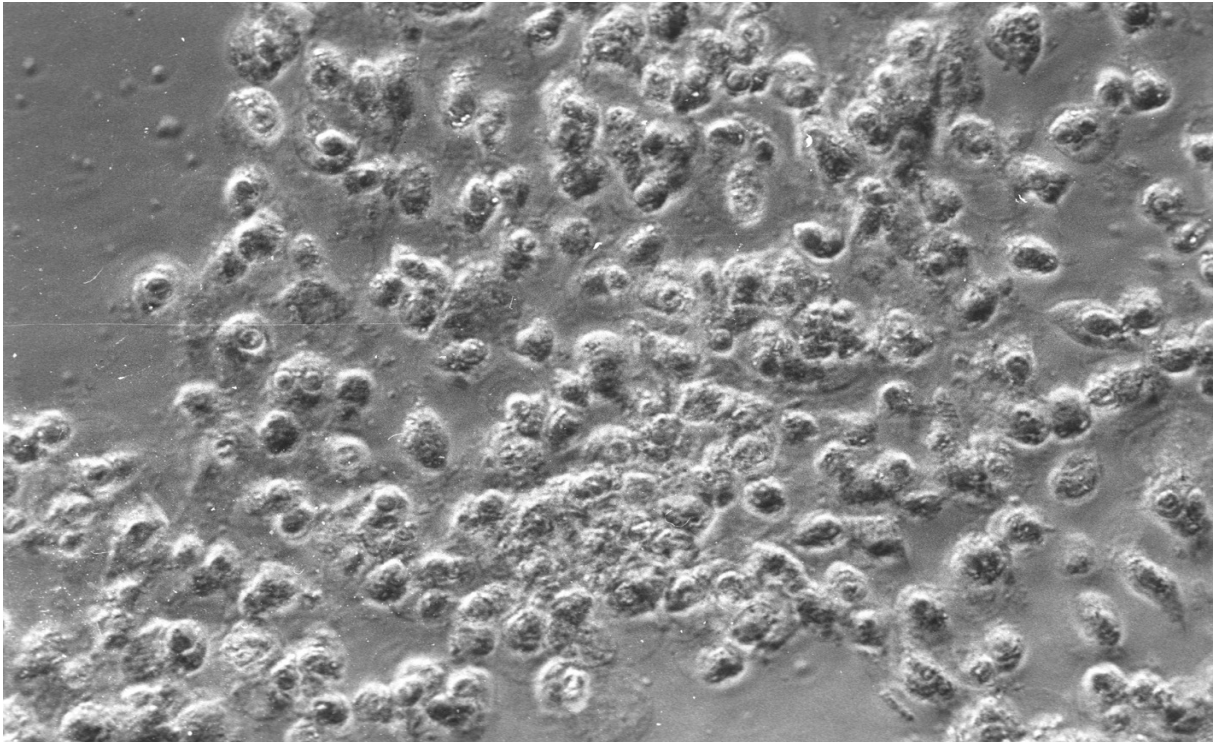


Abb. 3.31 3T3-Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (1,25 mM)
Inkubationszeit: 24 h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate < 25 %

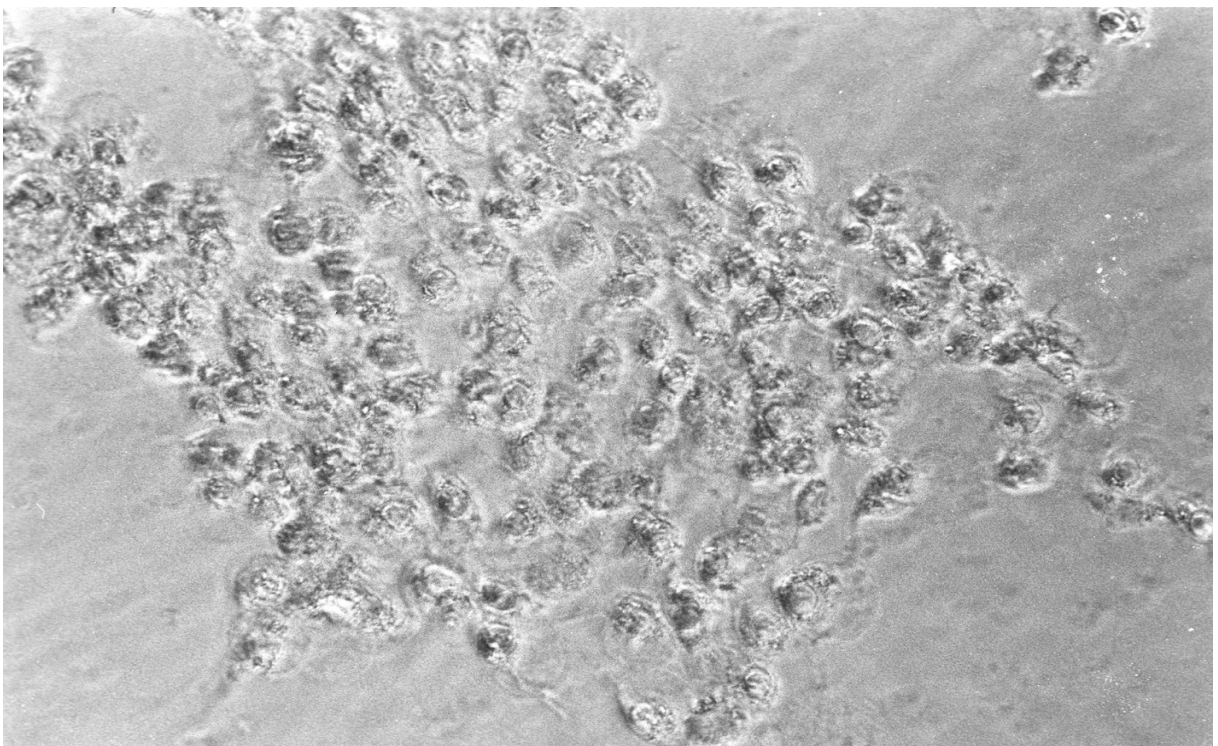


Abb. 3.32 3T3- Mausfibroblasten nach Inkubation mit TEGDMA (1,25 mM) und NaF (1 mM)
Inkubationszeit: 24h, Vergrößerung: 400-fach, Wachstumsrate < 20 %

4 Diskussion

Ein Komposit muss als Biomaterial sowohl auf werkstoffkundliche Eigenschaften als auch auf biologische Verträglichkeit überprüft werden. Die Prüfung auf biologische Verträglichkeit schließt unter anderem die Untersuchung des polymerisierten Kunststoffes und im speziellen die Testung seiner Einzelkomponenten ein. Frühere Studien haben gezeigt, dass sich moderne zahnärztliche Kompositmaterialien aus einer Vielzahl von Monomeren und Additiva zusammensetzen [119]. Aufgrund dieser komplexen chemischen Zusammensetzung und der insuffizienten Monomer-Polymer-Konversion können eine Vielzahl von Substanzen wie z.B. Komonomere, Additiva oder Polymerisationsnebenprodukte an die umliegenden Gewebe der Mundhöhle abgegeben werden [28;32;42;44]. Diese freigesetzten Komponenten können sowohl lokal als auch systemisch nachteilige Effekte auslösen [38;41;43]. Hierzu gehören unter anderem pathologische Veränderungen des Pulpagewebes mit Gefäßveränderungen, Entzündungsreaktionen, Produktion irregulären Dentins genauso wie Odontoblastenverdrängung oder Zahnhypersensibilität [14;21;24;120]. Diese unerwünschten Pulpareaktionen wurden dadurch erklärt, dass die Kompositmaterialien in direktem Kontakt zu Zahnhartsubstanz stehen, wodurch die Penetration von unpolymerisierten Materialkomponenten, wie z.B. Bis-GMA, entlang der Dentinkanälchen in Richtung Pulpa möglich wird [37;90]. Faktoren, die das irritative Potential von Kompositmaterialien erhöhen, sind die Eluierbarkeit von Residualmonomeren aufgrund der schlechten Monomer-Polymer-Konversion und die verarbeitungstechnisch schlecht zu verhindernde Ausbildung einer Sauerstoffinhibitionsschicht [101]. Da zahnärztliche Füllungsmaterialien aus einer Vielzahl von Einzelsubstanzen bestehen, kann es zwischen diesen zu Interaktionen kommen, bei denen die Zytotoxizität höher oder niedriger ist als die der einzelnen Ausgangskomponenten [53;82]. RATANASATHIEN et al. zeigten, dass es interaktive Effekte zwischen organischen Kompositbestandteilen wie Bis-GMA, HEMA, UDMA und TEGDMA gibt. Sie wiesen eine stoffspezifische Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Synergismen, Antagonismen und Additionen im Bezug auf Zytotoxizität nach [95]. Weiterhin zeigten sie, dass interaktive Effekte bei Kombinationsversuchen mit jeweils zwei unterschiedlichen Monomerkomponenten bei Konzentrationen auftraten, bei denen die Einzelsubstanzen für sich genommen nicht zytotoxisch wirkten. Zudem stellten sie fest, dass die Expositionsdauer, in

denen die Zellen den Testsubstanzen ausgesetzt waren, ebenfalls entscheidend war für die Art der Interaktion der Agenzien untereinander. So fanden sie heraus, dass im allgemeinen nach einer Exposition von 24 Stunden vornehmlich Antagonismen beobachtet werden konnten, wobei nach 72 Stunden Synergismen dominierten. Da bekannt ist, dass aus Kompositmaterialien Restmonomere in entsprechenden Konzentrationen freigesetzt werden können, haben die oben beschriebenen Interaktionen auch *in vivo* Relevanz.

4.1 Zytotoxizität von Natriumfluorid

In zahlreichen Studien wurde das zytotoxische Potential von Natriumfluorid an unterschiedlichen Zelltypen *in vitro* bereits untersucht. HOLLAND konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass Natriumfluorid oberhalb einer Konzentration von 3 mM die DNA-Synthese von fluoridsensitiven Zellen inhibieren kann und ab einer Konzentration von 0,9 mM Einfluss auf die Proteinbiosynthese von Fibroblasten (LS-Zellen) hat [61;62]. JENG et al. bestätigten die dosisabhängige Einflussnahme von Natriumfluorid auf Proteinbiosynthese (Inhibition), intrazelluläre ATP-Menge (Reduktion) und funktionelle Mitochondrienaktivität (Inhibition) ab einer Konzentration von 4 mM [70].

Die zytotoxische Wirkung von Natriumfluorid auf Mausfibroblasten konnte auch bei den Versuchen zur vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, jedoch trat ein mäßig zellschädigender Effekt bereits ab einer Konzentration von 2 mM auf. Die effektive Dosis (ED₅₀), die zur Reduktion der Zellzahl auf 50 % führte, lag bei $3,0 \pm 1,4$ mM im Vergleich zur Kontrolle. Eine Halbierung der mitochondrialen metabolischen Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe war ab einer NaF-Konzentration von $3,4 \pm 1,4$ mM zu registrieren.

Die Wirkungen, die Natriumfluorid in einem lebenden Organismus auszulösen vermag sind abhängig von der angewandten Dosis, welche physiologische, pharmakologische oder toxikologische Effekte hervorrufen kann. Neben den bereits beschriebenen Effekten von Natriumfluorid auf Zellen, kann Fluorid auf eine Vielzahl von Enzymen inhibierend wirken. In Anwesenheit von Phosphat ist Fluorid in der Lage, die Aktivität des Enzyms Enolase oberhalb von 0,03 mM kompetitiv zu hemmen. Weitere Enzyme, die durch Fluorid nachweislich gehemmt werden können, sind die saure Phosphatase, ATPase, Succinatdehydrogenase, Cholinesterase [64].

Zytotoxische Effekte können sowohl *in vitro* [59;86;117;124] als auch *in vivo* [15] an Geweben hervorgerufen werden, die mit Fluoriden in Kontakt kommen. HOLLAND stellte fest, dass die beeinflussbaren Zellparameter, die in Anwesenheit von Fluorid zu einer Wachstumsinhibition der Zellen führten, die Proteinbiosynthese, die DNA-Synthese und die Aktivität des Enzyms Ornithindecaboxylase sind [61-63]. Inhibitoren der zellulären Proteinsynthese reduzieren ebenfalls die DNA – Synthese [36;49], wahrscheinlich als Resultat ihres Effektes auf die Proteinsynthese. Fluoride inhibieren jedoch erst bei höheren Konzentrationen direkt die DNA – Synthese. Es ist daher denkbar, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MANKOVITZ et al., dass der primäre zelluläre Angriffspunkt von Fluoriden die Proteinsynthese ist und das der Hauptmechanismus für den zytotoxischen Effekt von Fluoriden deren Inhibition darstellt [79]. Andere beobachtete Effekte, wie z.B. die Inhibition der DNA - Synthese oder die Aktivitätshemmung von Enzymen, die schon bei ziemlich geringen Konzentrationen eintreten, sind wahrscheinlich Ergebnisse des oben beschriebenen Effektes [64]. Bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität von Natriumfluorid wurde das Augenmerk auf die Konzentrationsstufe gerichtet, ab der nur eine geringe metabolische bzw. proliferationshemmende Wirkung zu beobachten war. Es war zu beobachten, dass bei einer NaF-Konzentration von 1 mM die Zellzahl bei ca. 90 % im Vergleich zur Kontrolle lag (ED_{10}). Entsprechend betrug die metabolische Aktivität der Mitochondrien bei dieser Konzentrationsstufe ca. 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Diese Reaktion wurde als schwach zelltoxisch nach der EN ISO 7405 Norm eingestuft. Bei allen weiteren Versuchen, bei denen jeweils eine organische Komponente (Monomer) mit NaF in Kombination getestet wurde, wurde die Konzentration von NaF konstant bei 1 mM gehalten, während die Monomerkonzentrationen variierten.

4.2 Zytotoxizität von Kompositmonomeren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Wachstumsinhibitionstest zur Zytotoxizitätsprüfung der vier organischen Testsubstanzen mit immortalisierten, heteroploiden NIH - 3T3-Swiss-Mausfibroblasten durchgeführt. Die Toxizität wurde in Verdünnungsreihen unter direktem Kontakt der Inkubationslösung mit den Zellen bestimmt. Anhand des Hoechst 33342-Assays konnte durch fluorophotometrische Auswertung der Einfluss der einzelnen Inkubationslösungen auf das Wachstumsverhalten der 3T3-Mausfibroblasten auf DNA-Ebene bestimmt werden.¹ Nach dem Wachstumsinhibitionstest lassen sich die in dieser Arbeit verwendeten Monomere nach ihrer Toxizität einteilen. Zusätzlich dazu wurde ein etabliertes Testsystem verwendet, welches die Messung eines intrazellulären Prozesses zur Bestimmung der Zytotoxizität der Testsubstanzen erlaubt (XTT-Assay).

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde festgestellt, dass Bis-GMA die stärkste Toxizität aller getesteten Substanzen aufwies, gefolgt von UDMA, TEGDMA und HEMA, welches am schwächsten zytotoxisch war. RATANASATHIEN et al. kommen zu den gleichen Ergebnissen [95]. GEURTSEN et al. haben 35 zahnärztliche Kompositmonomere und Additiva sowohl an permanenten als auch an primären Fibroblastenkulturen im Hinblick auf ihr zytotoxisches Potential untersucht und sind unter anderem zu dem Schluss gekommen, dass alle getesteten Substanzen in der Lage sind, leichte bis stark zytotoxische Effekte in der In-vitro-Zellkultur auszulösen [42]. Eine wichtige Rolle spielte in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass alle Substanzen im Konzentrationsbereich von 0,01-5,0 mM getestet wurden. So war später die Einteilung der Substanzen nach ihrem relativen zytotoxischen Potential möglich. Bei der vorliegenden Studie lagen die Konzentrationsbereiche der Verdünnungsreihen der einzelnen Testmonomere ebenfalls innerhalb dieser Parameter, bis auf den Konzentrationsbereich für HEMA, welcher zwischen 1-10 mM lag. Alle vier getesteten Monomere zeigten in der Zellkultur zytotoxisches Potential. Daher forderten SPAHL et al., die durch Elution in Alkohol oder Wasser extrahierbaren Komponenten bei Kompositen zu minimieren, da die direkte zytotoxische Wirkung sowohl auf tierische als auch auf menschliche Zellen nachgewiesen ist [118;119].

¹ Blaheta et al. (1993) empfehlen für Zellzahlmessungen und Proliferationstests in der Zellkultur die Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342.

Da bereits durch RATANASATHIEN et al. der Nachweis von interaktiven Effekten zwischen den einzelnen organischen Füllungsbestandteilen eines Komposites mit entsprechender Auswirkung auf dessen zytotoxisches Potential geführt wurde [95], stellt sich die Frage, ob solche Effekte auch zwischen organischen und anorganischen Füllungsbestandteilen auftreten können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten anhand von In-vitro-Untersuchungen an einer permanenten Zelllinie die in Kompositen am häufigsten vorkommenden Monomere und Komonomere auf Interaktionen mit klinisch in der Mundhöhle häufig vorkommenden anorganischen Substanzen wie NaF untersucht werden.

4.2.1 UDMA

Ein wichtiges Basismonomer von Kompositen stellt UDMA dar. Es kommt in vielen Fabrikaten hauptsächlich in Kombination mit Bis-GMA vor. Diese Mischung scheint sich sowohl von den Polymerisationseigenschaften als auch von der Viskosität des Komposites als ideal erwiesen zu haben. Einzeln wird UDMA heutzutage sehr selten verwendet. Allgemein geht der Trend bei der Entwicklung neuer Kompositversionen hin zu den Monomerkombinationen. GEURTSSEN et al. stellten in Zellkulturuntersuchungen fest, dass UDMA für sich allein ein äußerst starkes zytotoxisches Schädigungspotential besitzt [42].

Zusätzlich haben vorangehende Studien gezeigt, dass eine UDMA Konzentration von 0,05 mM signifikant und dauerhaft das Wachstum von Zellen inhibieren kann, während Effekte (Störung des Zellzyklus, Verlängerung der Verdopplungszeit), bei denen die Zellen subletalen Konzentrationen von UDMA ausgesetzt waren, nach der Entfernung des Monomers aus dem Kulturmedium reversibel waren [84].

Basismonomere wie UDMA haben ein Molekulargewicht von 500 – 1000 g/M und sind in der Regel sehr viskös, so dass sie beträchtlich verdünnt werden müssen, um verarbeitungsfähig zu sein. Daher werden sie häufig mit niedermolekularen Komonomeren (Molekulargewicht von 100 – 300 g/M) in einer radikalischen Additionsreaktion vernetzt. Durch diese Additionsreaktion entsteht eine gelartige Struktur, welche nur eine geringe Beweglichkeit der Moleküle zueinander erlaubt und die Polymerisationsrate reduziert. Im endgültigen Polymernetzwerk verbleiben daher ca. 25 – 50 % unreaktierte Methacrylatgruppen. Der Restmonomergehalt an UDMA in einem polymerisierten Komposit ist vergleichsweise gering, so dass bei

Elutionsversuchen ca. 5 – 10 % des ungebundenen „Monomers“ in wässrige Lösungen eluieren können, was einem Anteil von ca. 2 % Gew. der organischen Matrix von Monomeren ausmacht [28].

Jedoch ist festzustellen, dass UDMA in Zytotoxizitätstests als äußerst toxisch eingestuft wurde. GEURTSEN et al. untersuchten 35 Monomere und Additiva zahnärztlicher Füllungsmaterialien und stellten fest, dass UDMA ($ED_{50} = 0,10 \pm 0,05$ mM) und Bis-GMA ($ED_{50} = 0,11 \pm 0,01$ mM) die am stärksten toxisch wirksamen Monomere in dentalen Kompositen sind. Die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (siehe Abb. 3.17) stimmen mit diesen Ergebnissen überein.

Interessant jedoch war die Feststellung, dass die Anwesenheit von NaF bei den Kombinationsversuchen eine 18 – 30 % signifikant höhere Toxizität respektive Zellzahlreduktion gegenüber 3T3 Mausfibroblasten auslöste als das Monomer alleine (siehe Abb. 3.3). CAUGHMAN et al. führten durch radioaktive Isotopenmarkierung mittels ^{35}S -Methionin den Nachweis, dass dentale Kompositmaterialien die Proteinbiosynthese von Fibroblastenzellen stören können. Den gleichen Effekt können auch Fluoride in der Zellkultur hervorrufen (siehe Kap.4.1). Diese Wirkung beider Materialien auf einen intrazellulären metabolischen Parameter könnte die stärkere Proliferationshemmung bei Anwesenheit beider Substanzen im Sinne einer synergistischen Wirkung erklären. Der genaue Mechanismus dieses Effektes kann allein anhand der Versuche dieser Arbeit nicht erklärt werden.

4.2.2 Bis-GMA

Bis-GMA besitzt neben UDMA das höchste toxische Potential unter den Monomeren zahnärztlicher Komposite. Dies konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. HANKS et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und diskutierten aufgrund ihrer Daten die mögliche Existenz einer chronischen Toxizität monomerer Substanzen wie Bis-GMA und UDMA [52]. Sie vermuteten eine Schwächung des Zellmetabolismus durch niedrige subletale Konzentrationen der Testagenzien, wodurch deren Anfälligkeit für Schädigungen anderer Art steige. TERAKADO et al. und FUJISAWA et al. wiesen Zellmembranverletzungen durch die Bildung Bis-GMA-induzierter Peroxide und die starke zytolytische Aktivität von Bis-GMA nach [35;121]. YOSHII vermutete, dass sich die starke Toxizität von Bis-GMA und UDMA durch deren besondere Struktur im Vergleich zu anderen Dimethacrylaten erklären lässt.

Sie fanden heraus, dass Hydroxyl-Gruppen die Zytotoxizität von Acrylaten und Methacrylaten verstärken. Obwohl die sehr großen Moleküle von Bis-GMA und UDMA nur sehr schwer durch ein Komposit diffundieren können und sehr hydrophob sind, wurden Anteile in wässrigen Eluaten von auspolymerisierten Kompositen identifiziert [136]. Die geringere Zytotoxizität der langkettigen Dimethacrylate liegt vermutlich darin begründet, dass diese Monomere aufgrund ihrer Molekülgröße die Zellmembran nicht passieren können, wohingegen kürzere Monomere zellmembrangängig sind. Da bei diesen Monomeren schon bei auffällig geringen Konzentrationen eine schwache zelltoxische Wirkung beobachtet werden konnte, wurde bisher eine primär chronische und nicht so sehr akute Toxizität diskutiert [42]. Daneben konnte bei Anwesenheit von NaF eine deutlich signifikante Steigerung der Zytotoxizität in der vorliegenden Arbeit unter anderem bei Bis-GMA nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.2.1). Jedoch war festzustellen, dass bei Konzentrationen oberhalb von 0,1 mM Bis-GMA in den Kombinationsversuchen die Zellzahl weniger stark reduziert wurde, als dies durch Bis-GMA alleine der Fall war. Analog dazu wurde ab dieser Konzentration auch die Mitochondrienaktivität in Anwesenheit von NaF weniger stark inhibiert. So war bei Bis-GMA festzustellen, dass sich bei niedrigen Monomerkonzentrationen die Anwesenheit von NaF synergistisch auf die Proliferationsinhibition und die Einschränkung der mitochondrialen Aktivität auswirkte, wobei es ab einer Monomerkonzentration von 0,1 mM zu einem Antagonismus² kam.

HEIL et al. konnten in Ihren Untersuchungen zur Gentoxizität von zahnärztlichen Materialien den Nachweis führen, dass Bis-GMA gentoxisches Potential besitzt [57]. Die DNA-Schädigung durch Bis-GMA konnte weder im HPRT-Test noch im Ames-Test nachgewiesen werden [114].

4.2.3 HEMA

Seit vielen Jahren wird 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (HEMA) als Bestandteil von Kompositen und Dentinadhäsiven verwendet. Eine Vielzahl von Studien haben sowohl dessen Zytotoxizität [11;12;75;98], als auch dessen Eluierbarkeit aus auspolymerisierten Kompositen *in vitro* nachgewiesen [28;32].

² Nach Wataha et al. (1992): Reduktion der Zytotoxizität bei der Kombination von zwei Agentien im Vergleich zu den Einzelkomponenten

Das relativ kleine Molekül HEMA besitzt sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen und kann die Diffusion von Methacrylaten aus Kompositen in saurem Milieu fördern. HEMA ist gut wasserlöslich und kann aufgrund seiner Größe leicht durch Dentinkanälchen diffundieren und dadurch die Odontoblastenzellschicht schädigen. Die gute Löslichkeit von anderen relativ hydrophoben Kompositbestandteilen in HEMA macht die Möglichkeit der synergistischen Interaktion dieser Substanzen mit diesem Monomer wahrscheinlich [11]. Die Toxizität von HEMA war im Vergleich zu allen anderen Testsubstanzen am geringsten. Erst ab einer Konzentration von 2 mM konnte bei den Einzelbehandlungen eine leichte Proliferationshemmung beobachtet werden (siehe Abb. 3.7). Die ED_{50} lag bei $6,8 \pm 1,8$ mM für die Einzelbehandlung und $3,1 \pm 0,9$ mM für die Kombinationsbehandlung. Womit eine Zunahme der Zytotoxizität von HEMA in der Anwesenheit von NaF nachgewiesen werden konnte. BOUILLAGUET et al. diskutierten aufgrund der relativ geringen Toxizität im Vergleich zu anderen Monomeren eine eher chronische Zellschädigung durch langdauernden Kontakt mit geringen Konzentrationen von HEMA [12]. Auch GEURTSEN et al. beobachteten bei Versuchen mit verschiedenen Monomeren auch bei HEMA moderate zytotoxische Effekte [42].

REICHL untersuchte mittels radioaktiver Isotopenmarkierung die Metabolisierung von HEMA an Meerschweinchen und fand heraus, dass der Hauptanteil von HEMA (ca. 70 %) über die Lunge ausgeschieden wurde, während der Rest über Faeces und Urin eliminiert wurde. Zudem beobachtete er, dass die Ablagerung von HEMA in den untersuchten Geweben mindestens 10^6 -mal geringer waren, als die derzeit bekannten toxischen Dosen [97]. RAKICH et al. untersuchten die mitochondriale Aktivität von Makrophagen nach Inkubation mit HEMA und verschiedenen anderen Monomeren. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle sowohl bei Wundheilungsprozessen als auch bei Entzündungsreaktionen und sind ein wichtiger biologischer Parameter in Zusammenhang mit Zytotoxizitätsuntersuchungen. Sie fanden heraus, dass alle getesteten Substanzen die mitochondriale Aktivität der Makrophagen in Abhängigkeit von der applizierten Dosis und dem Einwirkungszeitraum mehr oder weniger stark schädigen können [93;94]. Weiterhin konnte um die Forschungsgruppe um REICHL gezeigt werden, dass dentale Kompositmonomere auch auf andere Stoffwechselvorgänge, wie z.B. die Glukoneogenese, Einfluss haben können [99].

Der Einfluss von NaF auf die Steigerung der Zytotoxizität von HEMA könnte durch eine synergistische Wirkung im Hinblick auf die Inhibition der metabolischen Aktivität der Mitochondrien zurückzuführen sein. Weiterhin wäre auch die Verstärkung der Hemmung von bestimmten Enzymen, wie z.B. Lactatdehydrogenase oder Succinatdehydrogenase, vorstellbar. Die bei Bis-GMA beobachtete Genotoxizität konnte bisher nicht bei HEMA nachgewiesen werden [113]. Jedoch wurde die dosisabhängige Induktion von Mikronuklei bei HEMA nachgewiesen [115].

4.2.4 TEGDMA

Das Komonomer TEGDMA ist ein Ester einer α,β -ungesättigten Carboxylsäure, welcher mit intrazellulären Nukleophilen wie z.B. freien Sulfhydrylgruppen von Enzymen, reduziertem Glutathion oder Amino- und Amidgruppen reagieren kann [81]. Zusätzlich ist TEGDMA ein Substrat für Enzyme wie extra- und intrazelluläre Esterasen, die durch Hydrolyse aus dem Substrat Methacrylsäure freisetzen können [6].

Den stärksten metabolischen Effekt hat TEGDMA bereits bei niedrigen Konzentrationen auf das intrazellulär vorkommende Antioxidans Glutathion. Dessen Aufgabe innerhalb einer Zelle ist die Inaktivierung zellfremder Substanzen, sog. Xenobiotika. Es ist bekannt, dass Methacrylatester wie TEGDMA mit Glutathion innerhalb der Zelle chemisch durch eine Konjugationsreaktion reagieren können, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Reduktion der intrazellulären Glutathionmenge zur Folge hat [80]. Die durch TEGDMA induzierte Reduktion des intrazellulären Glutathiongehaltes beeinträchtigt die Abwehrkapazität einer Zelle. Somit wirkt TEGDMA nicht nur zytotoxisch [42;122] und mutagen [112], sondern führt zu einem ausgeprägten Anstieg der Anfälligkeit einer Zelle gegenüber weiteren Noxen.

Die Abb. 3.11 - Abb. 3.16 zeigen eine sehr große Variabilität der metabolischen Zellreaktionen im XTT-Assay. Zum einen wird bei den Assays 1, 5 und 6 die metabolische Aktivität der Mitochondrien durch die alleinige Zugabe von TEGDMA, weder bei der höchsten noch bei der niedrigsten Konzentrationsstufe negativ beeinflusst, während die parallel dazu ausgeführte Kombinationsbehandlung (TEGDMA + 1 mM NaF) eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Mitochondrienaktivität zeigt. Die Assays 2, 3 und 4 zeigen im Gegensatz zu den

anderen Assays sowohl bei der Einzelbehandlung mit TEGDMA als auch bei der Kombinationsbehandlung mit TEGDMA und 1 mM NaF einen konzentrationsabhängigen synchronen Verlauf. Dabei zeigen die Assays der Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu denen der Einzelbehandlungen in allen Konzentrationsstufen eine deutlich geringere metabolische Aktivität der Mitochondrien.

ENGELMANN et al. haben bereits diskutiert, dass in Anwesenheit von subletalen Konzentrationen von TEGDMA die Anfälligkeit einer Zelle gegenüber weiteren Noxen steigt [27]. Wäre nun eine Zelle durch die Anwesenheit von TEGDMA noch nicht ausreichend stark geschädigt worden, so würde ihr mitochondrialer Metabolismus unbeeinträchtigt bleiben können, auch bei höheren Konzentrationen (z.B.: 2,5 mM). Dies wird mit der blauen Kurve in den Assays 1, 5 und 6 verdeutlicht. Gleichzeitig könnte aber ein zusätzlicher zytotoxischer Reiz, z.B. die Anwesenheit von NaF, dann einen verstärkenden Effekt auf den zunächst unterschwelligen metabolischen Reiz von TEGDMA haben. Dies veranschaulicht die rote Kurve in den Assays 1, 5 und 6. Auf der anderen Seite war bei den Assays 2, 3 und 4 zu beobachten, dass TEGDMA alleine, ebenfalls konzentrationsabhängig, inhibierend auf den Mitochondrienmetabolismus Einfluss nehmen kann (siehe blaue Kurve in Abb. 3.12 - Abb. 3.14). Der verstärkte zellschädigende Effekt in Anwesenheit von NaF könnte als Synergismus bezeichnet werden. Auffällig ist jedoch, dass nur bei den XTT-Assays mit TEGDMA diese Variabilitäten auftreten. Die starke Divergenz der Ergebnisse spricht für eine Art Schwellenwert bezüglich der Abwehrkapazität der Fibroblastenzelle gegenüber dem metabolischen Schädigungspotential von TEGDMA.

Im H-33342 Assay zeigen sich keine Auffälligkeiten, die das oben beschriebene Phänomen eines Schwellenwertes vermuten ließen. TEGDMA zeigt bei den Einzelbehandlungen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl. Die Anwesenheit von 1 mM NaF bei den Kombinationsversuchen verstärkt den zytotoxischen Effekt im Sinne eines Synergismus. Dieser oben beobachtete Effekt bei TEGDMA zeigt, dass der XTT-Assay keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Zellzahl zulässt, sondern ausschließlich zur Beurteilung der mitochondrialen Stoffwechselleistung einer Zelle herangezogen werden kann. Bei TEGDMA gibt es ein, wahrscheinlich zeitlich und konzentrationsabhängig begrenztes, „Inkubationsfenster“, bei dem man Auswirkungen auf den

Mitochondrienmetabolismus beobachten kann, ohne dass die zytotoxische Wirkung der Testsubstanz auf die Zelle überwiegt. Im H-33342 Assay wird deutlich, dass durch die Anwesenheit von NaF in den Kombinationsversuchen die Zellzahl bereits bei einem Viertel der TEGDMA Konzentration der Einzelbehandlungen um 50 % reduziert werden kann. Im Gegensatz dazu ist bei der Reduktion der Mitochondrienaktivität um 50 % kein verstärkender Effekt durch die Anwesenheit von NaF feststellbar. Während bei der Kombinationsbehandlung bereits bei 0,4 mM TEGDMA und 1 mM NaF die Zellzahl um die Hälfte reduziert wird, tritt eine Reduktion der Mitochondrienaktivität erst bei nahezu doppelt so hoher TEGDMA Konzentration ein. YOSHII et al. fanden heraus, dass Dimethacrylate mit 14 oder weniger Oxyethylenketten ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) eine ähnliche Zytotoxizität aufweisen, während solche mit 23 Oxyethylenketten im Vergleich dazu eine viel geringere Zytotoxizität aufweisen [136]. So zeigt TEGDMA, ein Dimethacrylat mit weniger als 14 Oxyethylenketten, eine wesentlich höhere Toxizität als Dimethacrylate mit 23 Oxyethylenketten. Zum einen wird diskutiert, dass die Größe des Moleküls und dessen Membrangängigkeit ein förderlicher Faktor für die toxische Wirkung des Monomers an Zellen sein kann (je kleiner desto schädlicher). Zum anderen äußerte FUJISAWA die Vermutung, dass durch die Doppelbindung der Ethylenglykolgruppe von TEGDMA ein Eindringen des Moleküls in die Zellmembran und deren anschließende Lysis ermöglicht würde [34]. Diese Annahmen könnten das in dieser Arbeit beobachtete „Inkubationsfenster“ erklären. Solange der Einbau von TEGDMA deren Integrität nicht zerstört hat findet kein zytotoxischer Effekt statt (siehe Abb. 3.11, Abb. 3.15 und Abb. 3.16 blaue Kurve). Die zunächst geringe zytotoxische Wirkung von NaF könnte bei einer derart vorgeschädigten Membran eine stärkere Zellschädigung hervorrufen, als es durch NaF alleine bei diesen Konzentrationen möglich wäre (siehe blaue Kurve in Abb. 3.12 - Abb. 3.14).

In aktuellen Untersuchungen wurde für TEGDMA die Induktion von DNA-Schäden über klastogene Effekte nachgewiesen [112]. Ob dieser Effekt durch die Anwesenheit von NaF verstärkt wird und dadurch die Steigerung der Zellzahlreduktion herbeizuführen ist kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

4.3 Interaktive Effekte

Die Tatsache, dass Monomere oder Additiva zahnärztlicher Füllungsmaterialien zytotoxische Effekte auszulösen vermögen, ist in zahlreichen Studien nachgewiesen [42;44;45;50;68;100;129;135]. Jedoch gibt es nur wenig Informationen über die metabolischen Veränderungen von Zellen nach der Inkubation mit Kompositextrakten oder daraus isolierten Bestandteilen. Die Mechanismen der metabolischen Veränderungen, verursacht durch Monomere, sind noch weitestgehend unklar.

Die vorgenannten Studien zeigen, dass je nach Zellart und Testsystem sehr unterschiedliche und zum Teil voneinander abweichende Resultate erhalten werden. Die große Variabilität der Untersuchungsergebnisse liegt darin begründet, dass es derzeit noch keine umfassenden Untersuchungen mit vereinheitlichten Methoden gibt. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien untereinander ist daher sehr limitiert. Als nachgewiesen gilt, dass zwischen organischen Substanzen (Monomeren, Komonomeren, Additiva, Akzeleratoren) von dentalen Kompositmaterialien Interaktionen auftreten können. Es sind in diesem Zusammenhang synergistische, antagonistische und kumulative Effekte im Bezug auf Zytotoxizität und metabolische Aktivität beobachtet worden [95]. Die Effekte sind abhängig von Dosis und Expositionsdauer. Innerhalb eines Zellsystems können bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testagenzien Synergismen und Antagonismen nebeneinander vorkommen. Die biologisch - pharmakologischen Wirkungsmechanismen sind noch weitestgehend unbekannt.

Vor diesem Hintergrund war es von großem Interesse festzustellen, ob auch zwischen anorganischen und organischen Kompositbestandteilen solche Interaktionen beobachtet werden können und welchen Effekt sie auf die Zytotoxizität und die mitochondriale Aktivität von Zellen haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die Existenz solcher Interaktionen. Dabei scheint ein synergistischer Effekt sowohl bei der Proliferationshemmung als auch bei der Inhibition der Mitochondrienaktivität bei allen Testsubstanzen zu überwiegen. Das bedeutet, dass die Kombination zweier zytotoxisch wirkender Einzelkomponenten stärker zellschädigend wirkt, als die Einzelkomponenten für sich genommen. WATAHA et al. zeigten, dass auch Kationen verschiedener Metalle in der Lage sind zytotoxische Effekte in der Zellkultur hervorzurufen. Je nachdem welche Metallionen

untereinander kombiniert wurden, konnte sowohl eine Steigerung der Zytotoxizität (Synergismus) als auch eine Abschwächung der Zellschädigung (Antagonismus) im Vergleich zu den Einzelkomponenten beobachtet werden [127]. Weshalb dieser Effekt jedoch auftritt wird auch von dieser Arbeitsgruppe nicht geklärt.

Allein TEGDMA zeigt im Gegensatz zu allen anderen Testmonomeren im XTT-Assay deutliche Unregelmäßigkeiten. Obwohl bei TEGDMA eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung im H-33342 Assay beobachtet wurde, konnte bei den Einzelversuchen im XTT-Assay kein dazu korrespondierendes Ergebnis erhalten werden (siehe Abb. 3.11 - Abb. 3.16).

Sowohl Membraneffekte als auch die kompetitive Hemmung von Enzymen durch die Testagenzien wurden, wie oben beschrieben, von einigen Autoren als Erklärungsversuche für diese interaktiven Effekte bereits vermutet. Daneben wird die Einflussnahme aller in eine Zelle eingeschleusten Fremdstoffe (Xenobiotika) auf den Glutathionhaushalt der Zelle vermutet. Bei allen diesen Erklärungsversuchen handelt es sich zur Zeit jedoch noch um Spekulationen, da sie derzeit noch nicht evidenzbasiert nachgewiesen sind.

4.4 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen der Kombination organischer und anorganischer Materialien, die häufig in Kompositen enthalten sind, verdeutlichen, dass es nicht ausreicht, zahnärztliche Füllungsmaterialien alleine auf die zelluläre Schädlichkeit der Einzelbestandteile hin zu untersuchen. Um Aufschluss über die Biokompatibilität von zahnärztlichen Füllungsmaterialien zu gewinnen, ist es unerlässlich, auch die möglichen Interaktionen der Inhaltstoffe untereinander zu erkennen und auf deren zellschädigendes, mutagenes und teratogenes Potential hin zu untersuchen. Das ist auch für die Hersteller dieser Produkte von immer größer werdender Bedeutung, da deren Produkte gesetzlichen Richtlinien im Hinblick auf biologische Verträglichkeit entsprechen müssen.

In Zukunft sollten verstärkt In-vitro-Methoden zum Einsatz kommen, die es ermöglichen das Schädigungspotential dentaler Werkstoffe auch im Hinblick auf die Interaktionen der Einzelbestandteile zu verifizieren. Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden eignen sich für solche Testverfahren.

Der Wert von solchen Untersuchungsmethoden liegt darin, dass kontrollierte Zellkulturuntersuchungen unter gleichen und exakt wiederholbaren Bedingungen in unterschiedlichen Laboratorien eine Evaluation bzw. ein „Screening“ von isolierten Kompositkomponenten erlauben. Daraus folgt die Möglichkeit der Einteilung von Füllungsmaterialien oder deren Einzelkomponenten, ob alleine oder in unterschiedlichen Kombinationen, bezüglich ihrer Zytotoxizität [52]. Jedoch spiegeln Zellkulturmethoden nicht die Bedingungen der Mundhöhle wieder. Die Ergebnisse von Zellkulturuntersuchungen werden von einer Vielzahl von Faktoren wie z.B. dem Zelltyp, dem Applikationsmodus der Testmaterialien oder den biologischen Endpunkten eines Testverfahrens beeinflusst [107].

Daher können Rückschlüsse bezüglich der möglichen Toxizität der getesteten Substanzen *in vivo* nur mit Einschränkungen gezogen werden. So ist das Auftreten der interaktiven Effekte, wie sie in dieser Studie beschrieben werden, zwar wahrscheinlich, jedoch bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um darüber Klarheit zu erlangen.

Die Schlussfolgerungen, die sich für die Entwicklung von neuen Kompositmaterialien nach den Ergebnissen dieser Untersuchung ergeben könnten, wären zum einen den Zusatz von Natriumfluorid zu Kompositmaterialien so gering zu halten, dass keine synergistischen Effekte zu erwarten sind (weniger als 1 mM NaF Endkonzentration im Komposit) oder zum anderen, ganz auf diese Komponente zu verzichten.

In wieweit die topische Fluoridapplikation durch Lacke oder Mundspüllösungen einen klinisch signifikanten synergistischen Effekt des unpolymerisierten Restmonomeranteils von ausgehärteten Kompositmaterialien mit Fluoriden auszulösen vermag, ist allein durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht zu beantworten und bedarf weiterer Untersuchungen.

In weiteren Untersuchungen zur Biokompatibilität von zahnärztlichen Füllungsmaterialien sollte nicht allein der Nachweis der Toxizität der Kompositbestandteile geführt werden. Um das Gefahrenpotential dieser Stoffe besser einschätzen zu können, sollten Testverfahren optimiert und entwickelt werden, die es erlauben, den pharmakologisch - biologischen Wirkungsmechanismus der Testsubstanzen detailliert zu erforschen. Dabei bietet es sich an, die einzelnen Zellkompartimente auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Um metabolische Stoffwechselwege zu identifizieren und Aufschluss über den

Verbleib der Substanzen zu erlangen, eignet sich unter anderem die radioaktive Isotopenmarkierung.

Die Existenz von interaktiven Effekten zwischen organischen und anorganischen Kompositbestandteilen mit Einflussnahme auf das zytotoxische Potential ist in dieser In-vitro-Arbeit nachgewiesen worden. Jedoch reichen die bisherigen Erkenntnisse zu dieser Problematik allein nicht aus, um die klinische Bedeutung solcher Interaktionen beurteilen zu können. Hierzu sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es festzustellen, ob Interaktionen zwischen organischen Kompositbestandteilen und dem Kariesprophylaktikum Natriumfluorid nachweisbar sind, und welchen Einfluss solche interaktiven Effekte auf die Zytotoxizität und den Metabolismus von immortalisierten 3T3 Mausfibroblastenzellen im In-vitro-Modell haben können. Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte Zellen und mit DMSO inkubierte Zellen. Bei den Kombinationsversuchen wurde zusätzlich noch eine Kontrolle, bei der die Zellen mit 1 mM Natriumfluoridlösung behandelt wurden, bei allen Assays mitgeführt.

Die Zellkulturen wurden mit den Inkubationslösungen für 24 Stunden inkubiert und anschließend fluoreszenzphotometrisch ausgewertet. Zur Auswertung der Versuche wurde ein computergestütztes Fluoreszenzmessverfahren verwendet, das die zuverlässige Bestimmung von Zellzahl und Mitochondrienaktivität erlaubt. Die Zellproliferation wurde mit dem etablierten Zellkulturassay mit Bisbenzimid Hoechst 33342 bestimmt. Zur Bestimmung der metabolischen Mitochondrienaktivität wurde der Zellkulturassay mit dem Tetrazoliumsalz XTT angewandt. Anhand mikroskopischer Beobachtungen wurde die zytopathologische Wirkung der Testsubstanzen auf Basis der Zellmorphologie und Zellproliferation registriert, was exemplarisch bei den Versuchen mit TEGDMA gezeigt wurde, welche gut übereinstimmte mit den Ergebnissen der spektrophotometrischen Auswertung der Zellkulturassays.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten Substanzen einzeln in der Lage sind, konzentrationsabhängige Hemmeffekte auf das Zellwachstum auszulösen. Dabei nahm das Schädigungspotential bei den Monomeren in folgender Reihenfolge ab: Bis-GMA > UDMA > TEGDMA > HEMA. Die Wirkungen, die Natriumfluorid in einem lebenden Organismus auszulösen vermag, sind abhängig von der angewandten Dosis, welche physiologische, pharmakologische oder toxikologische Effekte hervorrufen kann. Die mitochondriale Aktivität wird von allen Testsubstanzen ebenfalls konzentrationsabhängig inhibiert.

Bei den Kombinationsversuchen war festzustellen, dass die Anwesenheit von Natriumfluorid zum einen die Toxizität der einzelnen Monomere im Sinne eines Synergismus in nahezu allen getesteten Konzentrationsstufen verstärkt und zum anderen deutlich inhibierend auf den Mitochondrienmetabolismus von 3T3-

Mausfibroblasten wirkt. Lediglich bei den Versuchen mit dem Komonomer TEGDMA war ein, im Vergleich zu den übrigen Monomeren, abweichendes Verhalten im XTT-Assay festzustellen. So scheint der dort beobachtete metabolische Effekt möglicherweise im Zusammenhang mit einer von anderen Autoren bereits beschriebenen chronischen Toxizität von TEGDMA zu stehen.

Außerdem wurde die zelluläre Verträglichkeit der Materialien in Kontakt mit 3T3-Fibroblasten mikroskopisch untersucht. Die schädigenden Einflüsse waren deutlich darzustellen, jedoch waren die Ergebnisse der fluoreszenzphotometrischen Auswertungen der Zellkultur präziser als deren zytopathologische Beurteilung im Durchlichtmikroskop.

Der pharmakokinetische Mechanismus der Interaktion von Natriumfluorid und Kompositmonomeren kann anhand der vorliegenden Ergebnisse und dem derzeitigen Stand der Wissenschaft noch nicht erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Natriumfluorid in Kombination mit unterschiedlichen Kompositmonomeren im Stande ist, die Biokompatibilität zahnärztlicher Füllungsmaterialien *in vitro* und dementsprechend möglicherweise auch *in vivo* zu reduzieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. *Adams A.M., Soames J.V., Searle R.F.:* Cytotoxicity studies of dental restorative materials using human periodontal ligament cells in vitro. *Int Endod J* 27 (4), 171-7, (1994).
2. *al-Dawood A., Wennberg A.:* Biocompatibility of dentin bonding agents. *Endod Dent Traumatol* 9 (1), 1-7, (1993).
3. *Anseth K.S., Goodner M.D., Reil M.A., Kannurpatti A.R., Newmann S.M., Bowman C.N.:* The Influence of comonomer composition on dimethacrylates resin properties for dental composites. *J. Dent. Res.* 75 (8), 1607-12, (1996).
4. *Asmussen E.:* Factors affecting the quantity of remaining double bonds in restorative resin polymers. *Scand J Dent Res* 90 (6), 490-6, (1982).
5. *Asmussen E.:* Restorative resins: hardness and strength vs. quantity of remaining double bonds. *Scand J Dent Res* 90 (6), 484-9, (1982).
6. *Bean T.A., Zhuang W.C., Tong P.Y., Eick J.D., Yourtee D.M.:* Effect of esterase on methacrylates and methacrylate polymers in an enzyme simulator for biodurability and biocompatibility testing. *J Biomed Mater Res* 28 (1), 59-63, (1994).
7. *Berstein A., Bernauer I., Marx R., Geurtsen W.:* Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomaterials* 13 (2), 98-100, (1992).
8. *Blaheta R.A., Franz M., Auth M.K., Wenisch H.J., Markus B.H.:* A rapid non-radioactive fluorescence assay for the measurement of both cell number and proliferation. *J Immunol Methods* 142 (2), 199-206, (1991).
9. *Borovskii E.V., Leont'ev V.K.:* [Caries resistance]. *Stomatologiya (Mosk)* 81 (5), 26-8, (2002).

10. *Bouillaguet S., Shaw L., Gonzalez L., Wataha J.C., Krejci I.*: Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 29 (1), 7-13, (2002).
11. *Bouillaguet S., Wataha J.C., Hanks C.T., Ciucchi B., Holz J.*: In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod* 22 (5), 244-8, (1996).
12. *Bouillaguet S., Wataha J.C., Virgillito M., Gonzalez L., Rakich D.R., Meyer J.M.*: Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dent Mater* 16 (3), 213-7, (2000).
13. *Bowen R.L.*: Properties of a silica reinforced polymer for dental restaurations. *J Am Dent Assoc* 66 57-64, (1963).
14. *Bowen R.L., Rupp N.W., Eichmiller F.C., Stanley H.R.*: Clinical biocompatibility of an experimental dentine-enamel adhesive for composites. *Int Dent J* 39 (4), 247-52, (1989).
15. *Branemark P.I.*: Local tissue effects of sodium fluoride. *Odontol Rev* 18 (3), 273-94, (1967).
16. *Browne R.M.*: Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *J Dent* 22 Suppl 2 S21-4, (1994).
17. *Camps J., Tardieu C., Dejou J., Franquin J.C., Ladaique P., Rieu R.*: In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent Mater* 13 (1), 34-42, (1997).
18. *Caughman W.F., Caughman G.B., Shiflett R.A., Rueggeberg F., Schuster G.S.*: Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials* 12 (8), 737-40, (1991).
19. *CEN/TC 206*: Biokompatibilität von medizinischen und zahnmedizinischen Werkstoffen und Produkten. EN 30993 (1994).

20. *Chaves S.C., Vieira-da-Silva L.M.*: [Anticaries effectiveness of fluoride toothpaste: a meta-analysis]. *Rev Saude Publica* 36 (5), 598-606, (2002).
21. *Chohayeb A.A., Bowen R.L., Adrian J.*: Pulpal response to a dentin and enamel bonding system. *Dent Mater* 4 (3), 144-6, (1988).
22. *Condon J.R., Ferracane J.L.*: In vitro wear of composite with varied cure, filler level, and filler treatment. *J Dent Res* 76 (7), 1405-11, (1997).
23. *Cox C.F., Felton D., Bergenholtz G.*: Histopathological response of infected cavities treated with Gluma and Scotchbond dentin bonding agents. *Am J Dent* 1 Spec No 189-94, (1988).
24. *Dumsha T.C., Beckerman T.*: Pulp response to a dentin bonding system in miniature swine. *Dent Mater* 2 (4), 156-8, (1986).
25. *Elbaum R., Pignoly C., Brouillet J.L.*: A histologic study of the biocompatibility of a dentinal bonding system. *Quintessence Int* 22 (11), 901-10, (1991).
26. *Elbaum R., Remusat M., Brouillet J.L.*: Biocompatibility of an enamel-dentin adhesive. *Quintessence Int* 23 (11), 773-82, (1992).
27. *Engelmann J., Leyhausen G., Leibfritz D., Geurtsen W.*: Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. *J Dent Res* 80 (3), 869-75, (2001).
28. *Ferracane J.L.*: Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 21 (4), 441-52, (1994).
29. *Ferracane J.L.*: Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med* 6 (4), 302-18, (1995).
30. *Ferracane J.L., Berge H.X.*: Fracture toughness of experimental dental composites aged in ethanol. *J Dent Res* 74 (7), 1418-23, (1995).

31. *Ferracane J.L., Berge H.X., Condon J.R.*: In vitro aging of dental composites in water--effect of degree of conversion, filler volume, and filler/matrix coupling. *J Biomed Mater Res* 42 (3), 465-72, (1998).
32. *Ferracane J.L., Condon J.R.*: Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 6 (4), 282-7, (1990).
33. *Ferracane J.L., Condon J.R.*: In vitro evaluation of the marginal degradation of dental composites under simulated occlusal loading. *Dent Mater* 15 (4), 262-7, (1999).
34. *Fujisawa S., Kadoma Y., Komoda Y.*: ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res* 67 (11), 1438-41, (1988).
35. *Fujisawa S., Kadoma Y., Masuhara E.*: A calorimetric study of the interaction of synthetic phospholipid liposomes with vinyl monomers, acrylates and methacrylates. *J Biomed Mater Res* 18 (9), 1105-14, (1984).
36. *Gautschi J.R.*: Letter: Effects of puromycin on DNA chain elongation in mammalian cells. *J Mol Biol* 84 (1), 223-9, (1974).
37. *Gerzina T.M., Hume W.R.*: Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *J Dent Res* 74 (1), 369-73, (1995).
38. *Geurtsen W.*: [Subcellular damage caused by the unfilled component systems of a composite]. *Dtsch Zahnärztl Z* 42 (6), 580-3, (1987).
39. *Geurtsen, W.*: Klinik der Kompositfüllung, Carl-Hanser Verlag, München (1989).
40. *Geurtsen, W.*: Kunststofffüllung: In: Heidemann, D. (Hrsg.): Praxis der Zahnheilkunde, Bd. 2 (Kariologie und Füllungstherapie), 4. Auflage Urban & Schwarzenberg, München 1999, S. 177-217.

41. *Geurtsen W.*: Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med* 11 (3), 333-55, (2000).
42. *Geurtsen W., Lehmann F., Spahl W., Leyhausen G.*: Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41 (3), 474-80, (1998).
43. *Geurtsen- W., Leyhausen G.*: Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol- dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 80 (12), 2046-50, (2001).
44. *Geurtsen W., Spahl W., Leyhausen G.*: Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res* 77 (12), 2012-9, (1998).
45. *Geurtsen W., Spahl W., Leyhausen G.*: Variability of cytotoxicity and leaching of substances from four light- curing pit and fissure sealants. *J Biomed Mater Res* 44 (1), 73-7, (1999).
46. *Goracci G., Bazzucchi M., Mori G., Casa de Martinis L.*: In vivo and in vitro analysis of a bonding agent. *Quintessence Int* 25 (9), 627-35, (1994).
47. *Guess W.L., Rosenbluth S.A., Schmidt B., Autian J.*: Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharm Sci* 54 (10), 1545-7, (1965).
48. *Gülzer, H. J. ; Hellwig, E.; Hetzer, G.*: Kariesprophylaxe mit Fluoriden: In: Stellungnahme der DGZMK 2002,
49. *Hand R., Tamm I.*: DNA replication: direction and rate of chain growth in mammalian cells. *J Cell Biol* 58 (2), 410-8, (1973).
50. *Hanks C.T., Craig R.G., Diehl M.L., Pashley D.H.*: Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol* 17 (8), 396-403, (1988).

51. *Hanks C.T., Diehl M.L., Craig R.G., Makinen P.K., Pashley D.H.:* Characterization of the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol. *J Oral Pathol Med* 18 (2), 97-107, (1989).
52. *Hanks C.T., Strawn S.E., Wataha J.C., Craig R.G.:* Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70 (11), 1450-5, (1991).
53. *Hanks C.T., Wataha J.C., Parsell R.R., Strawn S.E.:* Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod* 18 (12), 589-96, (1992).
54. *Hanks C.T., Wataha J.C., Sun Z.:* In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12 (3), 186-93, (1996).
55. *Heidemann D., Lampert F.:* [The testing of dental filling materials in cell cultures]. *Dtsch Zahnarztl Z* 35 (2), 349-53, (1980).
56. *Heil J.:* [Genotoxicity--causes and sequelae]. *Gesundheitswesen* 55 (2), 60-2, (1993).
57. *Heil J., Reifferscheid G., Waldmann P., Leyhausen G., Geurtsen W.:* Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 368 (3-4), 181-94, (1996).
58. *Hellwig, E.; Klimek, J.; Attin, T.:* Einführung in die Zahnerhaltung, Urban & Schwarzenberg, München (2003).
59. *Hirano S., Ando M.:* Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. *Arch Toxicol* 70 (3-4), 249-51, (1996).
60. *Holland R.I.:* [Cell culture as a biological test system]. *Nor Tannlaegeforen Tid* 85 (8), 304-9, (1975).
61. *Holland R.I.:* Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 45 (2), 96-101, (1979).

62. *Holland R.I.*: Fluoride inhibition of DNA synthesis in isolated nuclei from cultured cells. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 45 (4), 302-5, (1979).
63. *Holland R.I.*: Fluoride inhibition of protein synthesis. *Cell Biol Int Rep* 3 (9), 701-5, (1979).
64. *Holland R.I.*: Cytotoxicity of fluoride. *Acta Odontol Scand* 38 (2), 69-79, (1980).
65. *Holland R.I.*: Cytotoxicity of sodium monofluorophosphate. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 53 (5), 410-2, (1983).
66. *Hongslo J.K., Holland R.I., Jonsen J.*: Effect of sodium fluoride on LS cells. *J Dent Res* 53 (2), 410-3, (1974).
67. *Htang A., Ohsawa M., Matsumoto H.*: Fatigue resistance of composite restorations: effect of filler content. *Dent Mater* 11 (1), 7-13, (1995).
68. *Huang F.M., Chang Y.C.*: Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94 (3), 361-5, (2002).
69. *Inaba D., Kawasaki K., Iijima Y., Taguchi N., Hayashida H., Yoshikawa T., Furugen R., Fukumoto E., Nishiyama T., Tanaka K., et al.*: Enamel fluoride uptake from mouthrinse solutions with different NaF concentrations. *Community Dent Oral Epidemiol* 30 (4), 248-53, (2002).
70. *Jeng J.H., Hsieh C.C., Lan W.H., Chang M.C., Lin S.K., Hahn L.J., Kuo M.Y.*: Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol* 14 (6), 383-9, (1998).
71. *Koch M.J., Staehle H.J.*: Formaldehyd in zahnärztlichen Materialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 52 (12), 778-82, (1997).
72. *Konig K.G., Kalsbeek H., Weerheijm K.L., ten C.J.*: [Dental equipment in the twentieth century 1. Preventive dentistry]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 107 (1), 15-8 , (2000).

73. *Lefebvre C.A., Wataha J.C., Bouillaguet S., Lockwood P.E.*: Effects of long-term sub-lethal concentrations of dental monomers on THP-1 human monocytes. *J Biomater Sci Polym Ed* 10 (12), 1265-74, (1999).
74. *Leyhausen G., Heil J., Reifferscheid G., Geurtsen W.*: Das gentoxische Potential von Kompositbestandteilen. *Dtsch Zahnärztl Z* 50 (2), 134-6, (1995).
75. *Li N., Miao X., Takakuwa M., Sato K., Sato A.*: Effect of dental material HEMA monomer on human dental pulp cells. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 27 (1), 85-90, (1999).
76. *Lindl, T.*: Zell- und Gewebekultur, Gustav Fischer, Stuttgart (1989).
77. *Lutz F., Phillips R.W., Roulet J.F., Imfeld T.*: Komposits - Klassifikation und Wertung. *Schweiz Monatsschr Zahnheilk* 93 (10), 914 - 29, (1983).
78. *Manhart J., Kunzelmann K.H., Chen H.Y., Hickel R.*: Mechanical properties and wear behavior of light-cured packable composite resins. *Dent Mater* 16 (1), 33-40, (2000).
79. *Mankovitz R., Kisilevsky R., Florian M.*: Chinese hamster cell lines resistant to the cytotoxic action of fluoride. *Can J Genet Cytol* 20 (1), 71-84, (1978).
80. *McCarthy T.J., Hayes E.P., Schwartz C.S., Witz G.*: The reactivity of selected acrylate esters toward glutathione and deoxyribonucleosides in vitro: structure-activity relationships. *Fundam Appl Toxicol* 22 (4), 543-8, (1994).
81. *McCarthy T.J., Witz G.*: Structure-activity relationships in the hydrolysis of acrylate and methacrylate esters by carboxylesterase in vitro. *Toxicology* 116 (1-3), 153-8, (1997).
82. *Meryon S.D., Brook A.M.*: In vitro cytotoxicity of three dentine bonding agents. *J Dent* 17 (6), 279-83, (1989).

83. *Müller H., Olsson S., Söderholm K.J.*: The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites. *Eur J Oral Sci* 105 (4), 362-8, (1997).
84. *Nassiri M.R., Hanks C.T., Cameron M.J., Strawn S.E., Craig R.G.*: Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. *J Biomed Mater Res* 28 (2), 153-8, (1994).
85. *Neupert G., Welker D.*: [Tissue compatibility of stomatologic materials in cell cultures]. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 63 (2), 134-41, (1975).
86. *Oguro A., Cervenka J., Horii K.*: Effect of sodium fluoride on growth of human diploid cells in culture. *Pharmacol Toxicol* 67 (5), 411-4, (1990).
87. *Örtengren U., Wellendorf H., Karlsson S., Ruyter I.E.*: Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *J Oral Rehabil* 28 (12), 1106-15, (2001).
88. *Ouyang W., Li Y., Liu Z., et al.*: [Effect caused by uptake of different levels of calcium to enamel fluorosis in rats]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 35 (1), 47-9, (2000).
89. *Pallav P., De Gee A.J., Davidson C.L., Erickson R.L., Glasspoole E.A.*: The influence of admixing microfiller to small-particle composite resin on wear, tensile strength, hardness, and surface roughness. *J Dent Res* 68 (3), 489-90, (1989).
90. *Pashley D.H.*: Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J* 21 (2), 143-54, (1988).
91. *Pelka M., Danzl C., Distler W., Petschelt A.*: A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent* 28 (5), 341-5, (2000).

92. *Pelka M., Distler W., Petschelt A.*: Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. Clin Oral Investig 3 (4), 194-200, (1999).
93. *Rakich D.R., Wataha J.C., Lefebvre C.A., Weller R.N.*: Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. J Endod 24 (8), 528-33, (1998).
94. *Rakich D.R., Wataha J.C., Lefebvre C.A., Weller R.N.*: Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. J Endod 25 (2), 114-7, (1999).
95. *Ratanasathien S. , Wataha J.C., Hanks C.T., Dennison J.B.* : Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 74 (9), 1602-6, (1995).
96. *Rathbun M.A., Craig R.G., Hanks C.T., Filisko F.E.*: Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. J Biomed Mater Res 25 (4), 443-57, (1991).
97. *Reichl F.X., Durner J., Kehe K., Manhart J., Folwaczny M., Kleinsasser N., Hume W.R., Hickel R.*: Toxicokinetic of HEMA in guinea pigs. J Dent 30 (7-8), 353-8, (2002).
98. *Reichl F.X., Durner J., Manhart J., Spahl W., Gempel K., Kehe K., Liebl B., Walther U.I., Hume W.R., Hickel R.*: Biological clearance of HEMA in guinea pigs. Biomaterials 23 (10), 2135-41, (2002).
99. *Reichl F.X., Durner J., Muckter H., Elsenhans B., Forth W., Kunzelmann K.H., Hickel R., Spahl W., Hume W.R., Moes G.W.*: Effect of dental materials on gluconeogenesis in rat kidney tubules. Arch Toxicol 73 (7), 381-6, (1999).

100. *Reichl F.X., Walther U.I., Durner J., Kehe K., Hickel R., Kunzelmann K.H., Spahl W., Hume W.R., Benschop H., Forth W.*: Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dent Mater* 17 (2), 95-101, (2001).
101. *Rueggeberg F.A. , Margeson D.H.*: The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res* 69 (10), 1652-8, (1990).
102. *Schedle A., Franz A., Rausch-Fan X., Spittler A., Lucas T., Samorapoompichit P., Sperr W., Boltz-Nitulescu G.*: Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 14 (6), 429-40, (1998).
103. *Schmalz G.*: [The sensitivity of various in-vitro-test systems in biological testing of materials]. *Dtsch Zahnarztl Z* 32 (11), 878-9, (1977).
104. *Schmalz G.*: [Comparison between 2 elution methods for biological testing of materials]. *Dtsch Zahnarztl Z* 33 (12), 850-5, (1978).
105. *Schmalz G.*: [Materials in biological research]. *Dent Labor (Munch)* 28 (9), 1547-51, (1980).
106. *Schmalz G.*: [Correlation analyses between cell cultures and animal experiments]. *Dtsch Zahnarztl Z* 37 (2), 184-6, (1982).
107. *Schmalz G.*: Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent* 22 Suppl 2 S6-11, (1994).
108. *Schmalz G.*: Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1 (4), 154-62, (1997).
109. *Schmalz G., Arenholt-Bindslev D., Hiller K.A., Schweikl H.*: Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci* 105 (1), 86-91, (1997).

110. *Schmalz G., Garhammer P., Schweiki H.*: A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod* 22 (5), 249-52, (1996).
111. *Schweiki H., Schmalz G.*: Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 104 (3), 292-9, (1996).
112. *Schweiki H., Schmalz G.*: Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res* 438 (1), 71-8, (1999).
113. *Schweiki H., Schmalz G., Bey B.*: Mutagenicity of dentin bonding agents. *J Biomed Mater Res* 28 (9), 1061-7, (1994).
114. *Schweiki H., Schmalz G., Federlin M.*: Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig* 2 (3), 125-9, (1998).
115. *Schweiki H., Schmalz G., Spruss T.*: The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80 (7), 1615-20, (2001).
116. *Silness J., Gustavsen F.*: Some observations on the fine structure of fluorosed dental enamel. *Acta Odontol Scand* 28 (5), 701-20, (1970).
117. *Slamenova D., Gabelova A., Ruppova K.*: Cytotoxicity and genotoxicity testing of sodium fluoride on Chinese hamster V79 cells and human EUE cells. *Mutat Res* 279 (2), 109-15, (1992).
118. *Spahl W., Budzikiewicz H., Geurtsen W.*: [Study on the residual monomer contents of different light curing hybrid composite resins]. *Dtsch Zahnarztl Z* 46 (7), 471-5, (1991).
119. *Spahl W., Budzikiewicz H., Geurtsen W.*: Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent* 26 (2), 137-45, (1998).

120. *Stanley H.R., Going R.E., Chauncey H.H.*: Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Assoc* 91 (4), 817-25, (1975).
121. *Terakado M., Yamazaki M., Tsujimoto Y., Kawashima T., Nagashima K., Ogawa J., Fujita Y., Sugiya H., Sakai T., Furuyama S.*: Lipid peroxidation as a possible cause of benzoyl peroxide toxicity in rabbit dental pulp--a microsomal lipid peroxidation in vitro. *J Dent Res* 63 (6), 901-5, (1984).
122. *Theilig C., Tegtmeier Y., Leyhausen G., Geurtsen W.*: Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *J Biomed Mater Res* 53 (6), 632-9, (2000).
123. *Tinanoff N., Douglass J.M.*: Clinical decision making for caries management in children. *Pediatr Dent* 24 (5), 386-92, (2002).
124. *Tsutsui T., Suzuki N., Ohmori M., Maizumi H.*: Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblasts induced by sodium fluoride. *Mutat Res* 139 (4), 193-8, (1984).
125. *Tyas M.J.*: A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J Dent Res* 56 (10), 1285-90, (1977).
126. *Viohl, J.;Dermann, K.;Quast, D.et al.*: Die Chemie zahnärztlicher Füllungskunststoffe, Carl-Hanser Verlag, München (1986).
127. *Wataha J.C., Hanks C.T., Craig R.G.*: In vitro synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J Biomed Mater Res* 26 (10), 1297-309, (1992).
128. *Wataha J.C., Hanks C.T., Strawn S.E., Fat J.C.*: Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. *J Oral Rehabil* 21 (4), 453-62, (1994).

129. *Wataha J.C., Rueggeberg F.A., Lapp C.A., Lewis J.B., Lockwood P.E., Ergle J.W., Mettenburg D.J.* : In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. Clin Oral Investig 3 (3), 144-9, (1999).
130. *Wennberg A., Hasselgren G., Tronstad L.*: A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. J Biomed Mater Res 13 (1), 109-20, (1979).
131. *Wennberg A., Mjor I.A., Hensten-Pettersen A.*: Biological evaluation of dental restorative materials--a comparison of different test methods. J Biomed Mater Res 17 (1), 23-36, (1983).
132. *Willershausen B., Schafer D., Pistorius A., Schulze R. , Mann W.*: Influence of resin-based restoration materials on cytotoxicity in gingival fibroblasts. Eur J Med Res 4 (4), 149-55, (1999).
133. *Williams D.F.*: Definitions in Biomaterials, Elsevier, Oxford (1987).
134. *Yamagata N., Oshima H.*: [Cytotoxic effects of restorative materials on early passage cultured cells derived from human gingiva (in vitro)]. Shika Zairyo Kikai 9 (4), 541-54, (1990).
135. *Yang A., Cardona D.L., Barile F.A.*: In vitro cytotoxicity testing with fluorescence-based assays in cultured human lung and dermal cells. Cell Biol Toxicol 18 (2), 97-108, (2002).
136. *Yoshii E.*: Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res 37 (4), 517-24, (1997).
137. *Young D.A.*: New caries detection technologies and modern caries management: merging the strategies. Gen Dent 50 (4), 320-31, (2002).

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

3T3	3T3-Mausfibroblasten
ANOVA	analysis of variance
BEMA	Benzylmethacrylat
BHT	butyliertes Hydroxytoluol
Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat
BME	Benzoessäuremethylester
CQ	Campherchinon
CSA	Camphersäureanhydrid
CTD	certainly toxic dose
DBP	Dibenzoylperoxid
DEAE	Diethylaminoethanol
DEGDMA	Diethylenglycoldimethacrylat
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DMABEE	Dimethylaminobenzoessäureethylester
DMEM	Minimal Essential Medium nach Dulbecco
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTCDDA	Dimethanol-tricyclodecan-diacrylat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED ₅₀	effektive Dosis mit 50% Hemmung des Zellwachstums
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
EHS	2-Ethylhexansäure
FKS	Fötales Kälberserum
GMA	Glycidyl-Methacrylat
HC	Hydroxyepicampher
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMBP	2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenon

NaF	Natriumfluorid
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
PBS	phosphate buffered saline
PTD	probably toxic dose
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TPP	Triphenylphosphan
UDMA	Urethandimethacrylat
well	Vertiefungen in Mikrotiterplatten

7.2 Tabellen

Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung der Zytotoxizitätsversuche an 3T3-Mausfibroblasten. Die roten Zeichen kennzeichnen die Ergebnisse der H 33342 Assays, die schwarzen die der XTT – Assays.

Tabelle 7.1 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse von HEMA mit und ohne 1mM Natriumfluorid (Konzentrationen in mM)

		HEMA mit 1mM NaF						
		10	8	5	4	2	1	Kontrolle
HEMA	10	ns / ns						*** / ***
	8		* / ns					*** / ns
	5			* / ns				*** / ns
	4				* / ns			*** / ns
	2					* / ns		ns / ns
	1						** / ns	ns / ns
	Kontrolle	*** / ***	*** / ***	*** / ns	*** / ns	*** / ns	** / ns	

* = (p < 0,05)

*** = (p < 0,001)

** = (p < 0,01)

ns = nicht signifikant

Tabelle 7.2 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse von Bis-GMA mit und ohne 1mM Natriumfluorid (Konzentrationen in mM)

		Bis-GMA mit 1mM NaF						
		0,5	0,25	0,1	0,05	0,01	0,005	Kontrolle
Bis-GMA	0,5	ns / ns						*** / ***
	0,25		* / *					*** / ***
	0,1			* / *				*** / ***
	0,05				*** / ***			*** / ***
	0,01					*** / ***		*** / ***
	0,005						*** / ***	*** / **
	Kontrolle	*** / ***	*** / ***	*** / ***	*** / ***	*** / ***	*** / ***	

* = (p < 0,05)

*** = (p < 0,001)

** = (p < 0,01)

ns = nicht signifikant

Tabelle 7.3 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse von UDMA mit und ohne 1mM Natriumfluorid (Konzentrationen in mM)

		UDMA mit 1mM NaF						
		0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	Kontrolle
UDMA	0,5	ns / ns						*** / ***
	0,25		ns / ns					*** / ***
	0,1			** / ***				*** / ***
	0,05				*** / ***			*** / ***
	0,025					*** / ***		ns / ***
	0,01						*** / ***	ns / ***
	Kontrolle	*** / ***	*** / ***	*** / ns	*** / ns	ns / ns	ns / ns	

* = (p < 0,05)

*** = (p < 0,001)

** = (p < 0,01)

ns = nicht signifikant

Tabelle 7.4 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse von TEGDMA mit und ohne 1mM Natriumfluorid (Konzentrationen in mM)

		TEGDMA mit 1mM NaF						
		2,5	1,25	1,0	0,5	0,1	0,05	Kontrolle
TEGDMA	2,5	*** / *						*** / ns
	1,25		** / ns					*** / ns
	1,0			** / ns				*** / ns
	0,5				*** / ns			*** / ns
	0,1					*** / ns		ns / ns
	0,05						*** / ns	ns / ns
	Kontrolle	*** / ***	*** / ***	*** / ***	*** / **	*** / ns	*** / ns	

* = (p < 0,05)

*** = (p < 0,001)

** = (p < 0,01)

ns = nicht signifikant

Tabelle 7.5 ED_{50} der Testsubstanzen mit 3T3-Mausfibroblasten im H 33342-Assay
nach 24 h Inkubation; Angaben in mM / l mit Standardabweichung

Substanz	Einzelbehandlung	Kombinationsbehandlung
NaF	$2,984 \pm 1,381$	-
HEMA	$6,831 \pm 1,812$	$3,050 \pm 0,872$
TEGDMA	$1,649 \pm 0,587$	$0,408 \pm 0,185$
UDMA	$0,080 \pm 0,020$	$0,036 \pm 0,014$
Bis-GMA	$0,033 \pm 0,003$	$0,007 \pm 0,000$

Einzelbehandlung: Inkubationslösung enthält nur eine Testsubstanz

Kombinationsbehandlung: Inkubationslösung enthält eines der vier Monomere und 1 mM NaF

ED_{50} : Effektive Dosis mit Reduktion der Zellzahl auf 50% im Vergleich zur Kontrolle

Tabelle 7.6 ED_{50} der Testsubstanzen mit 3T3-Mausfibroblasten im XTT-Assay
nach 24 h Inkubation; Angaben in mM / l mit Standardabweichung

Substanz	Einzelbehandlung	Kombinationsbehandlung
NaF	$3,386 \pm 1,427$	-
HEMA	$8,583 \pm 1,659$	$7,223 \pm 1,722$
TEGDMA	$0,786 \pm 0,648$	$0,731 \pm 0,510$
UDMA	$0,215 \pm 0,034$	$0,107 \pm 0,060$
Bis-GMA	$0,073 \pm 0,004$	$0,055 \pm 0,017$

Einzelbehandlung: Inkubationslösung enthält nur eine Testsubstanz

Kombinationsbehandlung: Inkubationslösung enthält eines der vier Monomere und 1 mM NaF

ED_{50} : Effektive Dosis mit Reduktion der metabolischen Aktivität auf 50% im Vergleich zur Kontrolle

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. Geurtsen für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. G. Leyhausen für die Heranführung an die Zellkulturforschung, die wissenschaftliche Betreuung und vielfältige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Günay für die freundliche Unterstützung und sein Verständnis bei der Durchführung dieser Arbeit

Frau A. Beckedorf für ihren unermüdlichen, verständnisvollen und freundlichen Beistand bei der praktischen Ausführung dieser Arbeit im Zellkulturlabor.

Herrn Dr. J. Engelmann für seine unermüdliche und freundliche wissenschaftliche Unterstützung und seine hilfreichen Anregungen nach der Korrekturdurchsicht.

Frau Dr. V. Janke für ihren Beistand bei der praktischen Ausführung dieser Arbeit im Labor.

Herrn O. Staperfeld für seine stets freundliche Aufnahme im Labor und seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Arbeit im Zellkulturlabor.

7.4 Lebenslauf

Name: Renald Trempetic
Geburtsdatum: 28.08.1974
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Ivan Trempetic, Graphiker
Marica Trempetic, geb. Pudak, Lehrerin

Schulausbildung

1981 - 1985 Besuch der Diesterweg-Grundschule in Bielefeld
1985 - 1994 Besuch der Marienschule der Ursulinen, Gymnasium zu Bielefeld
1994 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1994 - 2000 Studium der Zahnheilkunde an der Medizinischen Hochschule Hannover
2000 Approbation zum Zahnarzt

Beruflicher Werdegang

2000 - 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie der Medizinischen Hochschule Hannover
seit 04.11. 2003 angestellter Zahnarzt in der Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Klaus J. Bothe und Dr. Dr. Arnd Schultze in Hannover

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Interaktive biologische Effekte von
organischen Kompositbestandteilen und Natriumfluorid**

in der Zahn-, Mund- und Kieferklinik der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Geurtsen und Prof. Dr. H. Günay ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teilergebnisse dieser Dissertationsarbeit wurden im Juli 2005 zur Veröffentlichung bei der Deutschen Zahnärztlichen Zeitschrift eingereicht.

Hannover, den 15.07.2005

Renald Trempetic