

Entwicklung und Vergleich von Kurzzeitassays zur Bestimmung der
zellulären Verträglichkeit von Monomeren und Additiva zahnärztlicher
Füllungswerkstoffe

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Fred Lehmann
geboren am 27. 06.1962 in Hannover
Dezember 1999

Referent: Prof. Dr. med. dent. Geurtsen

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Steinlechner

Tag der Promotion: 16. Dezember 1999

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Meßsystem entwickelt, das auf der Basis der DNA-markierenden fluoreszierenden Farbstoffe Höchst 33342 und BCECF-AM sowie als Parameter der Membranintegrität Sulforhodamin 101 als Proteinmarker ED₅₀-Bestimmungen von primären und Dauerzellkulturen in einem Kurzeittest ermöglicht. Dabei erwies sich die intrazelluläre Messung mit dem Hoechstfarbstoff sensitiver gegenüber der ED₅₀-Bestimmung mit BCECF-AM sowie der Proteinbestimmung mit Sulforhodamin 101. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß alle Messungen in einem Well durchgeführt werden können, was eine deutliche Zeit- und Materialersparnis mit sich bringt. Mit Hilfe dieser Methoden wurden für insgesamt 38 Substanzen von zahnärztlichen Füllungswerkstoffen ED₅₀-Bestimmungen mit der Dauerzelllinie 3T3 sowie primären humanen Pulpa-, Wurzelhaut- und Gingivafibroblasten durchgeführt.

Es konnte in dieser Arbeit keine Zelllinie gefunden werden, die generell weniger bzw stärker auf die hier untersuchten Substanzen reagierten als die anderen Zelllinien. Primäre Wurzelhautfibroblasten und Pulpafibroblasten erwiesen sich bei den meisten untersuchten Substanzen empfindlicher als die 3T3- und Gingivafibroblasten. In allen Zellkulturen waren Bis-GMA, UDMA, Bis-MA, DEGDMA, TEGDMA, Bis-EMA, DMTDA, DMDDA, BHT, TPSb und TPP stark zytotoxisch. Diese Substanzen zeigten in allen Zellkulturen ähnliche ED₅₀-Konzentrationen.

Auch weniger schädigende Substanzen wie DDMA, DEAE und DMAPE führten in allen Zellkulturen zu vergleichbaren Ergebnissen. Substanzen, bei denen sich weniger oder kaum zytotoxische Effekte (z.B. EGDMA) nachweisen ließen, wiesen dagegen größere Varianzen bei den verschiedenen Zellarten auf.

Für TEGDMA, das sehr gut wasserlöslich ist, konnten Konzentrationen in Wassereluat nachgewiesen werden, die an die hier gefundenen ED₅₀-Werte heranreichen.

Die Ergebnisse aus dem ED₅₀-Bestimmungen zeigen auf, daß es zu jeder stark toxischen Substanz mittlerweile biokompatible Substanzen mit geringerem toxischem Potential gibt, die als Alternative zu den sehr toxischen Substanzen eingesetzt werden können.

Bei der Verwendung von primären Zellen ist die Frage, inwieweit diese Zellen für reproduzierbare Zytotoxizitätstest verwendet werden können, von großer Wichtigkeit, da sich mit zunehmender Passagenzahl die Morphologie und die Biochemie dieser Zellen stark verändert.

Die Alterung der Zellen konnte durch eine starke Zunahme der Verdoppelungszeiten ab der 9. Passage von 35-40 h. auf 90-120 h in höheren Passagen beobachtet werden. Der BrdU-Einbau sank dagegen ab der 9. Passage von etwa 40 % markierter Zellen bis zur Nachweisgrenze.

Primäre Zellen zeigten in den Passagen 3-8 einen etwa gleichbleibenden ED₅₀-Wert. Ab der neunten Passage lassen sich jedoch nicht mehr reproduzierbare ED₅₀-Bestimmungen durchführen. Der Grund dafür liegt weniger in der Veränderung der Zellen wie z.B. morphologische Veränderungen, als vielmehr darin, daß wegen der verlängerten Verdoppelungszeiten nicht mehr genügend Zellen pro Well zu Verfügung stehen, um eine reproduzierbare ED₅₀-Bestimmung durchzuführen. Das Alter der Patienten scheint dagegen kaum einen Einfluß auf die ED₅₀ zu haben.

Somit können primäre Zellen zwischen den Passagen 3-8 für reproduzierbare ED₅₀-Bestimmungen verwendet werden. Höhere Passagen sind aufgrund des verringerten Zellwachstums nicht mehr für Zytotoxizitätstest geeignet.

Weiterhin wurde an einigen ausgewählten Substanzen Untersuchungen zur Gentoxizität und Kanzerogenität mit zwei verschiedenen Kurzzeittestmethoden durchgeführt, zum einem mit einem bakteriellen, dem klassischen Ames-Test vergleichbaren System, dem *umu*- Mikrottest, und zum anderen mit einem eukaryontischen System, dem DIT (DNA-Synthese-Inhibitionstest) der die DNA-Synthese der Zellen quantitativ durch BrdU-Einbau mißt.

Dabei konnten bei den meisten Substanzen in beiden Testsystemen kein gentoxisches Potential ausgemacht werden. Bei Bis-GMA, UDMA und CQ könnte eine mögliche Gentoxizität dieser Stoffe durch die hohe Zytotoxizität überlagert sein. Bei TPSb, einem Zusatzstoff bei der Herstellung von Bis-GMA, wurde jedoch im DIT-Test eine starke konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Synthese beobachtet. Für diese Substanz wurde die Möglichkeit diskutiert, daß TPSb aufgrund seiner molekularen Eigenschaften sich an die DNA kovalent bindet und damit die DNA-Synthese behindert, jedoch dabei die DNA nicht schädigt.

Schlagwörter:

Zytotoxizität, Zahnärztliche Materialien, Monomere, primäre humane orale Fibroblasten, Gentoxizität.

Abstract

It was the purpose of this investigation to determine the cytotoxic effects (ED50 concentrations) of 35 monomers or additives identified in commercial dental resin composites. Monolayers of permanent 3T3 cells and three primary human fibroblast types derived from oral tissues (gingiva, pulp, and periodontal ligament) were used as test systems. In this work we used a microplate test system, with the DNA-intercalating fluorescent dye Hoechst 33342 to marked living cells. All substances were tested in concentrations ranging from 0.01 to 5.0 mM. In general, ED50 values varied from 0.06 to > 5 mM. Within the groups of co(monomers), initiators, and cointiators, severe (e.g., Bis-GMA, UDMA, DMBZ, and DMDTA) or moderate (HEMA, BEMA, CQ, DMPT, and DMAPE) cytotoxic effects could be evaluated. Within the group of reaction/decomposition products, only moderate or slight effects were found (ED50: 0.7 to > 5 mM). The inhibitor BHT, the contaminant TPSb, and the photostabilizer HMBP, however, were highly cytotoxic in all cell cultures. In addition, the ED50 values of DBPO and HMBP significantly varied (0.43-3.8 mM, respectively, and 0.44-3.07 mM) with the applied cell culture. Our comprehensive screening shows that for several of the highly cytotoxic composite components, less cytotoxic alternatives are available. Furthermore, there was no cell type identified which was consistently less or more sensitive to the toxic effects of the tested compounds than the others. Primary human periodontal ligament and pulp fibroblasts, however, were found to be more sensitive than 3T3 and gingival fibroblasts to alterations from most tested substances.

In contrary to permanent cell cultures - primary cell cultures can only be used for cytotoxicity studies - during a limited period. A disadvantage of primary cells is that they are more difficult to handle than permanent cell cultures. This is partially caused by the heterogeneous origin (patients of different ages etc) and more complex culture requirements of the cells.

Permanent cell cultures are mostly well defined and more homogeneous with respect to morphology and growth characteristics, but do not correspond to the tissue of the target, in general. Thus various authors prefer to perform cytotoxicity tests of composites and resins with primary cells derived from the oral cavity, (1,2,3,) because the use of these cells might improve the comparison with the *in vivo*-situation.

Therefore it was the purpose of this study to evaluate the reproducibility of cytotoxicity data determined by primary fibroblasts of patients with different ages and different passages of the cells. Our results show that human periodontal ligament fibroblasts can be used for cytotoxicity tests and ED50 values.

Cytotoxicity tests with HPLF of different origin, resp. patients can be performed during passage #4 to #10. But due to the significantly increasing doubling time and the markedly decreasing proliferation rate (BrdU-incorporation) beginning with passage #9 it is recommended to use the primary cells from passage 4 to #8 only for biocompatibility studies.

To characterize the (possible) DNA-damaging properties of resins and specific compounds that contribute to this genotoxicity. For screening, two tests that assay for different aspects of genotoxicity (i) the bacterial umu-test; and (ii) the eucaryotic DNA synthesis inhibition test (DIT); were chosen. This investigation gives several lines of evidence that most of the 14 chemical monosubstances tested yield 'positive' results in at least one of the genotoxicity tests, however, with effects ranging from 'borderline' to 'strong positive'. However, TPSb in the DIT test a strong concentration-dependent inhibition of the DNA synthesis was observed. For this substance the possibility was discussed that TPSb binds itself due to its molecular characteristics to the DNA binds and so that obstructs the DNA synthesis however the DNA does not damage. On the basis of these data and public concern, more attention has to be given to local or systemic complications which may be associated with the use of dental materials.

Keywords:

cytotoxicity, cytocompatibility, genotoxicity, dental materials, monomers, additives, oral fibroblasts.

Abkürzungen :

3T3	3T3 – Mausfibroblasten
Abb	<u>A</u> bbildung
ATCC	American Type Culture Collection
AMMUG	Arbeitsgemeinschaft Molekulare Mechanismen umweltbedingter Gentoxizität
BCECF-AM	2',7'- <u>b</u> is(carboxyethyl)-5,6-carboxy-fluorescein-acetoxy-methyl-ester)
B-Puffer	Puffer zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der β -Galaktosidase
CO ₂	Kohlendioxyd
DIT	<u>D</u> NA- <u>S</u> ynthese- <u>I</u> nhibitions-Test.
DMEM	<u>D</u> ulbeccos' <u>M</u> inimal <u>e</u> ssential <u>M</u> edium für 3T3- Zellen
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxynucleicacid = Desoxyribonukleinsäure
ED ₅₀	<u>E</u> ffektive <u>D</u> osis 50% = Konzentration einer Substanz, bei der 50% der Zellen überleben
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure
E-MEM	<u>E</u> agle's <u>M</u> inimal <u>e</u> ssential <u>M</u> edium für HELA-Zellen
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Bidestiliertes Wasser
H 33258	<u>H</u> oechst Farbstoff 33258
H 33342	<u>H</u> oechst Farbstoff 33342
HGF	<u>H</u> umane <u>G</u> ingivafibroblasten = primäre Gingivafibroblasten
HPF	<u>H</u> umane <u>P</u> ulpafibroblasten = primäre Pulpafibroblasten
HPDL	<u>H</u> umane <u>P</u> arodontalligamentfibroblasten = primäre Wurzelhautfibroblasten
FKS	<u>F</u> ötale- <u>K</u> älber- <u>S</u> erum
l	<u>L</u> iter
LD ₅₀	<u>L</u> ethale <u>D</u> osis 50% (Konzentration einer Substanz, bei der 50% der Versuchstiere überleben)
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid
N	<u>N</u> ormal

M	<u>M</u> ol
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
OD ₆₀₀	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte bei der angegebenen Wellenlänge
PBS	<u>P</u> hosphat <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
P/S/A	<u>P</u> enicillin, <u>S</u> teptomycin, <u>A</u> mphtericin B
SDS	<u>S</u> oduim- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfat
TGA-Medium	Medium zum Ansatz der Bakterien für den <i>umu</i> - Mikrotest
U/min	Umdrehungen pro Minute
units	Einheiten der Enzymaktivität
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen

Liste der untersuchten Substanzen

Monomere

Bis-GMA	2,2-Bis{4-(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl}-Propan
Bis-MA	Bisphenol-a-Dimethacrylat
Bis-EMA	Èthoxyliertes Bisphenol-A
UDMA	Urethandimethacrylat
HEMA	2-Hydroxyethyl-methacrylat: aus UDMA
BEMA	Benzylmethacrylat
EGDMA	Ethylenglycoldi-methacrylat
DEGDMA	Diethylenglycoldi-methacrylat
SIMA	3-Trimethoxysilan-propylmethacrylat
TEGDMA	Triethylenglycoldi-Methacrylat
1,10-DDMA	1,10-Decandioldi-methacrylat
1,12-DDMA	1,12-Dodecandi-methacrylat

Koinitiatoren

DEAE	2-Diethylaminoethanol
DMPT	Dimethyl-p-toluidin
DMAPE	2-(4-Dimethylamino-phenyl)ethanol
DIPA	2,6-Diisopropylannilin
DEAEMA	N,N-diethylamino-ethylamin
DCHA	Dicyclohexylamin
DHEPT	Dihydroxyethyl-p-Toluidin
DMDDA	Dimethyldodecanamin
DMTDA	Dimethyltetradecan-amin
TBA	2,4,6-tri-t-butylanillin
THA	Trihexylamin
DMABEE	4-Dimethylamino-benzoesäureethylester

Initiatoren

DBPO	Dibenzoylperoxid
CQ	Champherchinon, 2-3- Bornandion
BL	Benzil
BPE	Benzoessäure-phenylester, aus DBPO
DMBZ	2,2-Dimethoxybenzoin,

Photostabilisator, Inhibitor, Reaktionsprodukte und Verunreinigungen

BHT	2,6-Di-t-butyl-4-methylphenol
HMBP	2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon
TPSb	Triphenylstiban, aus Bis-GMA
BEA	Benzylalkohol
BME	Benzoessäure-methylester
TEG	Triethylenglykol, aus TEGDMA
DICH	1,6-Diisocyanato-hexan aus UEDMA
BPE	Benzoessäure-phenylester, aus DBPO
TPP	Triphenyl-phosphan
CSA	Camphersäure-anhydrid
DCHP	Dicyclohexyl-pthyalat

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Begründung zur Notwendigkeit biologischer Prüfungen von zahnärztlichen Materialien	1
1.2 Die biologische Testung von Materialien	1
1.2.1 Zellkulturen	3
1.2.2 Dauerzellkulturen.....	3
1.2.3 Primäre Zellkulturen	4
1.3 Methoden zur Prüfung der Biokompatibilität in der Zellkultur	6
1.3.1 Gesetzliche Grundlagen	7
1.3.2 Gewebekulturtestung	7
1.3.3 Agar-Overlay-Test	8
1.3.4 Hämolysetest.....	9
1.4 Bestimmung der ED ₅₀ an Zellkulturen und der LD ₅₀ an Tieren	9
1.4.1 Hefe-Test.....	10
1.4.2 Bestimmung der LD ₅₀ an Tieren	11
1.4.3 Korrelation zwischen Zellkultur und Tierversuchen	12
1.5 Methoden zur Bestimmung der Toxizität in der Zellkultur mittels Fluoreszenzfarbstoffen.....	13
1.6 Materialien	16
1.6.1 Metallische Werkstoffe	16
1.6.2 Kunststoffe.....	18
1.6.3 Biokompatibilitätsprüfung von Kompositen.....	22
1.7 Mutagenitätstests : Ames-Test, <i>umu</i> -Test	22
1.8 Der DNA-Synthese-Inhibitionstest (DIT- Test).....	24
1.9 Problemstellung	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Zellstämme.....	28
2.2 Chemikalien	28
2.3 Verwendete Monomere und Additiva.....	30
2.4 Nährmedien und Antikörper.....	30
2.4.1 Antibiotika	30
2.4.2 Nährmedien	31
2.5 Kulturbedingungen	33
2.6 Beschichtung der Flaschen mit Kollagen.....	33

2.7 Gewinnung und Zellanzucht der primären Zellen	33
2.7.1 Gewinnung von Pulpazellen und Gingivafibroblasten.....	33
2.7.2 Gewinnung von Wurzelhautfibroblasten.....	34
2.8 Mediumwechsel	35
2.9 Subkultivierung von Monolayerkulturen (Trypsinierung)	35
2.10 Konservierung	36
2.11 Wachstumsparameter	37
2.11.1 Trypan-Blau-Färbung.....	37
2.11.2 Zellzählung	38
2.11.3 Messung des Proliferationsindex	38
2.12 Fluoreszenz-Test zur Bestimmung der ED ₅₀ (Inkubations-Test)	38
2.12.1 Aussaat der Zellen.....	38
2.12.2 Anheftungszeit.....	39
2.12.3 Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen	39
2.12.4 Messung mit dem Hoechst-Farbstoff H 33342	41
2.12.5 BCECF-AM-Assay	42
2.12.6 Auswertung.....	42
2.12.7 Berechnung der ED ₅₀ und statistische Auswertung der Daten.....	43
2.13 Relative Bestimmung des Proteingehaltes mit Sulforhodamin 101.....	43
2.14 Zellzählung mittels Coulter Counter.....	44
2.15 Durchführung des <i>umu</i> -Mikrotest	44
2.15.1 Medien und Puffer	44
2.15.2 Übernachtkultur und Vorkultur.....	45
2.15.3 Ansatz der Testkultur und der Verdünnungsreihen	45
2.15.4 Messung des Wachstums.....	46
2.15.5 Bestimmung der Induktion des <i>umuC</i> -Gens	46
2.15.6 Gültigkeitskriterien und Testauswertung	47
2.16 DNA-Synthese-Inhibitions-Test (DIT-Test)	48
3 Ergebnisse	50
3.1 Anzucht der einzelnen Zelltypen.....	50
3.1.2 Das Wachstumsverhalten von primären Zellen	51
3.1.3 Das Wachstumsverhalten von 3T3 Zellen.....	55
3.1.4 Einfluß des DMSO auf das Proliferationsverhalten der Zellen.....	56
3.2 Die Messung der Zytotoxizität mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	57
3.2.1 Die Messung der Zellzahl und des DNA-Gehaltes mit den Farbstoffen H 33342 und H 33258	58
3.2.2 Messung der Membranintegrität mittels BCECF-AM	62

3.2.3 Bestimmung des relativen Proteingehaltes mit Sulforhodamin 101.....	64
3.3 Bestimmung der ED ₅₀ -Werte über den DNA-Gehalt und die Messung der Membranintegrität	66
3.3.1 Monomere	66
3.3.2 Koinitiatoren.....	77
3.3.3 Initiatoren.....	80
3.3.4 Photostabilisator, Inhibitor, Reaktionsprodukte und Verunreinigungen.....	82
3.4 Einfluß der Passagenzahl auf das Wachstums- und Toxizitätsverhalten an Wurzelhautfibroblasten	86
3.4.1 Einfluß der Passagenzahl der Wurzelhautfibroblasten auf die Toxizität von CSA	87
3.4.2 Einfluß der Passagenzahl der Wurzelhautfibroblasten auf die Toxizität von BEA.....	93
3.5 Untersuchungen über Zellvolumenänderungen als Reaktion auf Kompositbestandteile	96
3.6 Mutagenitätstest: <i>umu</i> - Mikrottest und DIT-Test.....	100
4 Diskussion	108
4.1 Beurteilung der Testmethoden	108
4.2 Vergleich der Zellarten	111
4.3 Bewertung der Toxizität der untersuchten Substanzen.....	115
4.4 Die Löslichkeit der Substanzen	118
4.5 DMSO-Problematik	120
4.6 Der Einfluß der Passagenabhängigkeit auf die Toxizität.....	121
4.7 Gentoxizität, DIT und <i>-umu</i> - MIKROTEST	124
4.8 Zellvolumenveränderung.....	126
4.9 Schlußfolgerungen und Ausblick	127
5 Literaturverzeichnis	130

1. Einleitung

1.1 Begründung zur Notwendigkeit biologischer Prüfungen von zahnärztlichen Materialien

In den letzten Jahren ist die In-vitro-Biokompatibilitätsprüfung von zahnärztlichen Werkstoffen in den Vordergrund eines breiten Interesses gerückt.

Angesichts einer immer mehr zunehmenden Skepsis gegen das auf einer Quecksilber-Silber-Legierung basierende Füllungsmaterial Amalgam wird den modernen Kunststofffüllungswerkstoffen immer mehr Beachtung geschenkt. Sie werden mitunter auch als "biologische Amalgam-Alternative" bezeichnet. Allerdings melden sich immer mehr Kunststoffgegner zu Wort, die vielfältige Krankheitserscheinungen auf dentale Kunststoffe zurückführen (Lehnhard, 1994). Zahnärztliche Füllungswerkstoffe werden als Medizinprodukte angesehen, da diese Materialien für längere Zeit in den menschlichen Körper direkt appliziert werden und auch systemisch wirken können. Im Sinne einer verantwortungsvollen Medizin ist eine biologische Prüfung dieser Materialien und ihrer Einzelsubstanzen notwendig. Zur Kontrolle werden heute bereits eine Reihe von Prüfverfahren angewendet, wobei den Zellkulturmodellen eine immer größere Bedeutung zukommt.

1.2 Die biologische Testung von Materialien

Die Untersuchungen von physikalischen Parametern wie die Wasseraufnahme von Kunststoffen oder die Härte- und Dichtemessung von Metallen und Kunststoffen sind relativ einfach durchzuführen und inzwischen sehr gut standardisiert.

Dagegen sind Analysen zur Biokompatibilität wesentlich schwieriger durchzuführen und zu interpretieren. Das liegt zum einen daran, daß es sich um biologische Testsysteme handelt, die naturgemäß biologischen Schwankungen unterliegen, welche schwierig zu kontrollieren sind, zum anderen in der Anzahl der variablen Parameter im Vergleich zu physikalischen Untersuchungsmethoden (Schmalz, 1986).

Die American Dental Association (ADA) erarbeitete 1976 eine Reihe von Richtlinien, die für die Standardisierung von Tests zur Analyse von dentalen Materialien herangezogen werden sollten. Diese Richtlinien sind in den letzten Jahren überarbeitet

worden und finden in den heutigen europäischen und internationalen Normen ihre Anwendung (EN 30993, ISO/TR 7450-1984). Die Materialien sollen dabei auf folgende biologische Effekte untersucht werden:

- 1.) Akute allgemeine Toxizität
- 2.) Chronische Toxizität und Tumorproduktion
- 3.) Allergische Sensibilisierung
- 4.) Lokale Toxizität
 - a) bei unspezifischer Applikation
 - b) bei spezifischer Applikation (Anwendungstest)
(nach Langeland und Klötzer, 1971)

Zur Bestimmung dieser Größen empfehlen die Autoren Thonstedt und Wennberg (1980) folgende Punkte:

1. Screening Test zur Ermittlung der allgemeinen Toxizität
 - a) Zytotoxizität (In-vitro-Test)
 - b) Karzinogene und mutagene Wirkung
 - c) Sensibilisierung (Meerschweinchen)
2. Screening Test zur Bestimmung der lokalen Gewebeirritation
 - a) kurzzeitige Applikation (15 min) auf intaktes nichtepithelisiertes Gewebe (Kaninchen)
 - b) Langzeitimplantationsversuche (mehr als 12 Monate im subkutanen Gewebe bei Kleintieren)
3. Anwendungstest
4. Klinische Untersuchungen

1.2.1 Zellkulturen

Schon seit 30 Jahren werden Zell- und Gewebekulturen verschiedenster Art zur Bestimmung zytotoxischer Effekte von zahnärztlichen Materialien, wie Wurzelkanalfüllungsmaterialien, Füllungsmaterialien, Unterfüllungsmaterialien etc. benutzt. Als Zellkultur bezeichnet man die Aussaat und Weiterzucht einzelner Zellen als selbständige und unabhängige Einheiten (Klaiber, 1979).

Die Untersuchungen dentaler Materialien in den In-vitro-Studien bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber den In-vivo-Modellen, da sich hierbei einzelne Zelltypen isolieren und die Umgebungsparameter genauer definieren lassen. Desweiteren sind die Testverfahren relativ gut reproduzier- und standardisierbar, somit ökonomisch und im Gegensatz zu den häufig angewandten Tierversuchen ethisch unbedenklich.

Die Prüfung einer möglichen Toxizität kann mit den unterschiedlichsten Zellkulturen durchgeführt werden. Die Problematik, die sich dabei ergibt ist, daß je nach Herkunft der Zellart ein verändertes Verhalten auf das zu untersuchende Material auftreten kann.

Ebenfalls ist es wichtig, daß Zellkulturuntersuchungen auf ihre Vorhersagbarkeit für die wirklichen Gegebenheiten in situ überprüft werden. Dazu müssen Methoden entwickelt werden, die eine möglichst schnelle und genaue Vorhersage über die Toxizität eines Stoffes ermöglichen.

Man unterscheidet dabei zwischen Dauerzellkulturen und primären Zellkulturen.

1.2.2 Dauerzellkulturen

Dauerzellkulturen, oft auch permanente oder immortalisierte Zellkulturen genannt, sind spontan oder gezielt so transformiert worden, daß sie unbegrenzt passagiert und auf Vorrat über Jahre gehalten werden können. Allgemein gilt, daß eine Zelllinie als etabliert angesehen werden kann, wenn sie mehr als 70 x passagiert werden konnte. Zelllinien stammen aus den unterschiedlichsten Organen verschiedenster Spezies.

Die wesentliche Eigenschaft von permanenten Zelllinien ist, daß diese Zellen Klone, ausgehend von einer Zelle, darstellen. Somit sind diese Zellen genetisch,

morphologisch und physiologisch gleich. Erst dadurch lassen sich viele molekularbiologische und biochemische Untersuchungen in ausreichender Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführen, da die charakteristischen Eigenschaften der Zellen erhalten bleiben. Dauerzellkulturen werden im allgemeinen wegen ihrer höheren Zellteilungsgeschwindigkeit sowie aufgrund ihrer weltweiten Verfügbarkeit in Stammsammlungen und der dadurch erst möglichen Vergleichbarkeit in verschiedenen Laboratorien für Screeningtests und die Bestimmung der ED₅₀ verwendet.

Dauerzellkulturen sollen nach der europäischen Norm EN 30993 in den In-vitro-Biokompatibilitätsprüfungen verwendet werden. Die in dieser Arbeit u.a. verwendete Mäusefibroblastenzelllinie 3T3 ist eine der zur Prüfung empfohlenen Zelllinien. Weiterhin ist in der Norm festgehalten, daß für speziellere Fragestellungen auch primäre Zellen des Zielgewebes benutzt werden sollten, um in einer kombiniert parallel verlaufenden Anwendung der primären und der Dauerzelllinie eine Ergänzung des Gesamteindruckes der Zytotoxizität des untersuchten Materials zu finden.

1.2.3 Primäre Zellkulturen

Primäre Zellkulturen zeichnen sich durch ein relativ inhomogenes Zellbild aus. Diese Zellkulturen werden im Gegensatz zu den Dauerzellkulturen immer wieder erneut aus dem Gewebe gewonnen und weisen dabei ähnlich dem Muttergewebe eine heterogene Zusammensetzung des Zellmaterials auf.

Die Kultivierung von primären Zellen erfolgt durch das Aussetzen von Gewebestückchen in Zellkulturflaschen.

Nach 3-6 Tagen kann durch mikroskopische Kontrolle das Auswachsen der Zellen beobachtet werden, diese neuen Zellen können nach einiger Zeit passagiert und in Kultur genommen werden.

Die EG-Leitlinien zur Prüfung von Impfstoffen definieren die Primärzellen als Kulturen von Zellen, die sich nicht von denen im tierischen Ursprungsgewebe unterscheiden, aus denen sie hergestellt wurden. In der letzten Zeit unterscheiden einige Autoren zwischen Primär- und Sekundärkulturen. Primärkulturen sind Kulturen der 0.-5. Passage, Sekundärkulturen die der 6.-10. Passage (Uphoff, et al.,1992).

Lidel und Bauer (1986) unterscheiden im Gegensatz dazu zwischen Primärkultur und Zelllinie. Primärkulturen sind nach ihrer Definition nur diejenigen Zellen, die direkt aus dem Gewebe stammen. Bereits nach der ersten Passage liegt dann nach ihrer Definition eine primäre Zelllinie vor, bestehend aus vielen Unterlinien der ursprünglichen Primärkultur.

Ein wesentlicher Vorteil des primären Zellkulturmodells gegenüber den Dauerzellkulturen ist die bessere Anpassung des Zellkulturmodells an die In-vivo-Lebensbedingungen. Die Heterogenität des Zellgewebes ist aber auch ein Ausdruck des physiologischen Zustandes des Herkunftsgewebes, da diese Zellen unterschiedliche Differenzierungsrichtungen mit ähnlichem oder unterschiedlichem Phänotyp aufweisen. Desweiteren können Zellen verschiedensten Alters vorhanden sein und in die Kultur mit übernommen werden. Dieses ist ein Zustand, der den In-vivo-Bedingungen stark ähnelt (Heidemann, 1982).

Aus diesem Grunde propagieren einige Autoren die Prüfung von zahnärztlichen Materialien mit primären Zellen des oralen Zielgewebes (Geurtsen, 1986, Hensten-Petersen, 1981). In der folgenden Tabelle 1 sind noch einmal die Eigenschaften von Primär- und Dauerzellkulturen zusammengestellt:

Tab 1.: Unterschiede zwischen primären Zellen und Dauerzellkulturen (nach Zalkind 1979).

Primäre Zellen	Dauerzellkulturen
Zellbild	
Heterogenes Zellbild Verschiedene physiologische „Alterszustände“ Verschiedene physiologische Aktivität	Homogenes Zellbild, gleichartiges Wachstum Nur Mitose und Degeneration heben sich aus dem Zellbild ab
Vermehrungsgeschwindigkeit	
Geringer Instabile Mitoseaktivität	Hoch, Mitoseaktivität bleibt über 100 Passagen stabil
Transformation, Genetik	
Relativ konstante Genetik über 10-15 Passagen	Konstante Genetik über 100 Passagen
Anschließend mögliche spontane Transformation, Übergang in einen diploiden “cell strain”	
Endgültige Degeneration durch Alteration oder Erschöpfung der Wachstumspotenz	Endgültige Transformation bei Verlust der Diploidie, Übergang zur heteroploiden Dauerzelllinie

1.3 Methoden zur Prüfung der Biokompatibilität in der Zellkultur

Es gibt seit der Einführung der Bioverträglichkeitsprüfungen mittels Zellkultur eine große Anzahl von Testmethoden zu unterschiedlichsten Fragestellungen. Dabei können qualitative und quantitative Methoden unterschieden werden. Die qualitativen Methoden, die nur eine begrenzte Abschätzung der Toxizität ermöglichen, sind meist relativ einfach durchzuführen, während man bei den quantitativen Methoden, wie der ED₅₀-Bestimmung, einen verhältnismäßig großen Aufwand in der Probenvorbereitung und bei der Testdurchführung zu bedenken hat.

1.3.1 Gesetzliche Grundlagen

Zur Prüfung der Biokompatibilität liegt in der Bundesrepublik Deutschland eine DIN-Vornorm (DIN 13930) in zweiter Fassung vor. Diese Vornorm ist inzwischen in eine Europäische Norm (EN 30993) übergegangen, die als ein in der Europäischen Union geltender "European Standard" dienen soll. Die EN 30993 lehnt sich eng an internationale und nationale Vorschläge zur standardisierten biologischen Materialtestung der FDI/ISO, OECD und ADA/ANSI an.

Für plastische, metallische und nichtmetallische Füllungswerkstoffe kann zur Ermittlung der systemischen Toxizität auf eine Vielzahl von physikalischen und biologischen Testmethoden auf die EN 30993 zurückgegriffen werden.

In dieser Norm werden verschiedene Methoden zur Bestimmung eines Toxizitätsprofils genannt und in folgende Gruppen unterteilt:

- (1) Prüfungen auf systemische Toxizität.
- (2) Prüfungen auf allergisierende Eigenschaften.
- (3) Prüfungen auf lokale Toxizität und Gewebeirritation.
- (4) Prüfungen auf Mutagenität und Gentoxizität.

Diesen Gruppen ist jeweils eine Reihe von biologischen Prüfungen zugeordnet, aus welchen dann die geeignete Prüfung ausgewählt werden kann.

Es soll hier nun eine kleine, nicht vollständige Auswahl von qualitativen Testmethoden vorgestellt werden, die sich historisch innerhalb der Zellkulturtestung entwickelt haben.

1.3.2 Gewebekulturtestung

Bei der Gewebekulturtestung, auch direkter Auflagetest genannt, wird, wobei man hier bevorzugt humanes Zellmaterial verwendet, das zu prüfende Material in geringem Abstand vom Gewebe plaziert. Die Entstehung eines Hemmhofes an der dem Material zugewandten Seite, bzw. die Hemmung des Wachstums der Zellen kann morphologisch beurteilt werden. Diese Methode ist empfindlicher als die oft angewandte Agar-Overlay-Methode, hierbei kann man allerdings die Effekte meist nur als „Alles oder Nichts“-Phänomen oder durch die Aufteilung in mehrere

„Schädigungsklassen“ charakterisieren.

Mit dieser recht einfachen Methode der Gewebekulturtestung wurde eine Vielzahl von Füllungswerkstoffen auf ihr toxisches Potential hin untersucht. Geurtsen (1986) untersuchte einige Einzelbestandteile zahnärztlicher Füllungswerkstoffe. Dabei zeigte BIS-GMA (Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat) nach 20 Stunden eine leichte Hemmwirkung, während bei UDMA (Urethan-Dimethacrylat) eine starke Hemmwirkung durch Potozytose und Ablösen der Zellen von dem Untergrund gefunden wurde. Methylmethacrylat wies bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml Medium keine gravierenden bzw. morphologisch beurteilbaren Schäden an den Zellen auf.

1.3.3 Agar-Overlay-Test

Der am meisten verbreitete Test zur Biokompatibilitätsprüfung ist der Agardiffusionstest, auch Agar-Overlay-Test genannt. Dieser Test dient zur Erfassung der lokalen, akuten und unspezifischen Zytotoxizität von Prüfsubstanzen. Bei diesem Testsystem werden Mausfibroblastenzellen in Petrischalen angezchtet und nach einer Anheftungszeit von 24 h mit Agar überschichtet. Nach dem Erstarren des Agars werden die Zellen mit dem Farbstoff Neutralrot angefärbt, welcher nur in die lebenden Zellen eindringt. Danach wird das Prüfmaterial auf den Agar aufgelegt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert (Borenfreund et al., 1985). Die Toxizität eines Materials kann dann halbquantitativ durch die Abschätzung von Entfärbung und Lyse der Zellen in Relation zur Entfernung zum Material bestimmt werden.

Nach Lindl (1988) hat der Agar-Overlay-Test allerdings eine Reihe von Nachteilen:

Das Material sollte in fester oder zumindest halbfester Form vorliegen, flüssige Materialien können nur mit Hilfe eines Filterstreifens ausgebracht werden.

Es müssen Stoffe aus dem Material heraustreten, d.h. dieser Test erkennt eine toxische Oberfläche oder eine toxische Beschaffenheit des Materials nicht, wenn dieses nicht wasserlöslich ist.

Der Test ist relativ unempfindlich, da die Diffusionsstrecke verhältnismäßig groß ist.

Die Vitalität ist stark abhängig von den Randbedingungen der Inkubation. Randeffekte

wie pH-Verschiebungen können auftreten, welche die Aussage negativ beeinflussen können.

Mit dieser Methode sind in den letzten Jahren einige Materialien untersucht worden.

Reines Methylmethacrylat (MMA) brachte die Zellkultur zum kompletten Absterben (Schmalz, 1985). Schendel et al. (1992) untersuchten mehrere Kunststoffe, die in der Kieferorthopädie verwendet werden. Die meisten der untersuchten Kunststoffmaterialien sind direkt nach der Aushärtung nur gering oder mäßig toxisch, einige zeigten keine Toxizität.

1.3.4 Hämolysetest

Eine weitere Methode zur Toxizitätsprüfung stellt die Untersuchung des Hämolyseverhaltens von Erythrozyten dar. Durch die osmotischen und chemischen Wechselwirkungen tritt an den Erythrozyten Hämoglobin aus, dieses ausgetretene Hämoglobin wird als Maß für den Schädigungsgrad des untersuchten Werkstoffes herangezogen. Für den Test werden Erythrozyten vom Hund, Kaninchen oder Menschen verwendet.

Welch (1978) fand eine komplette Hämolyse der Erythrozyten 15 min nach Zusatz von 2,5% Methylmethacrylat (MMA).

Fujisawa et al. (1978) stellten fest, daß bei den von ihnen untersuchten BIS-GMA-Werkstoffen ein höherer Hämolysegrad als bei den MMA-Kunststoffen zu finden war.

1.4 Bestimmung der ED₅₀ an Zellkulturen und der LD₅₀ an Tieren

Die Bestimmung der ED₅₀ (Effektive Dosis: Konzentration eines Stoffes, bei der eine 50%ige Hemmung des Zellwachstums eintritt, bzw. 50% des zu erreichenden Effektes eintreten) ist heute ein gebräuchliches Mittel für die Bestimmung der Toxizität einer Substanz (Beubler, E. und Schmid, B., 1988) und wird synonym zur LD₅₀ (Letale Dosis 50% im Test bei Ratten und Mäusen) verwendet. Die Bestimmung der ED₅₀ in der Zellkultur erfolgt z.B. durch das Auszählen der Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz behandelt werden.

Neben der Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer können die Zellen auch mittels eines elektronischen Zellmeßgerätes ermittelt werden. Dabei wird nicht nur die Zellzahl ermittelt, sondern es können auch Zellvolumenveränderungen aufgrund der toxischen Wirkung einer Substanz erfaßt werden. Damit kann eine Aussage hinsichtlich des Einflusses der Testsubstanz auf die Zellen gemacht werden. Als Nachteil ist einzufügen, daß das Gerät nicht zwischen vitalen und letalen Zellen unterscheiden kann, sondern lediglich die Gesamtzellzahl ermitteln kann. Geurtsen (1988) untersuchte an insgesamt acht Einzelbestandteilen von Kompositen die ED₅₀ mit der Dauerzelllinie L 5178y (Fc-rezeptorpositive Mäuse-T-Lymphomzellen) mittels elektronischer Zellzählung.

1.4.1 Hefe-Test

Eine weitere Methode ED₅₀ Bestimmungen durchzuführen, stellt der Hefetest dar. Mit Hilfe der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden zahlreiche Arzneimittelsubstanzen untersucht. Der Testansatz besteht aus einer Kultur von Hefezellen in einem flüssigen Nährmedium, dem die zu testende Substanz in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wird. Die Kulturen werden unter aeroben Bedingungen bebrütet und die Zellzahl zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Testes entweder in einer Zählkammer oder mit einem elektronischen Zellzählgerät gemessen. Die Bestimmung der ED₅₀ erfolgt durch lineare Transformation der Dosis-Wirkungsbeziehungen.

Häufig wird darauf hingewiesen, daß Toxizitätsprüfungen einen intakten Organismus erfordern, da die toxische Wirkung der zu untersuchenden Substanzen infolge einer Biotransformation im Körper entweder neutralisiert oder verstärkt werden kann (Koch et al., 1992). Da es sich bei den Hefezellen um intakte Organismen handelt, scheinen diese für In-vitro-Prüfungen sehr geeignet zu sein. Hefe besitzt mit dem Cytochrom P-450 eine Enzymausstattung, die der Fremdstoffmetabolisierung im Menschen sehr ähnlich ist. Bei aus Gewebe isolierten Zellen ist die vollständige metabolische Aktivität dagegen nicht gegeben.

Während man bei der LD₅₀-Bestimmung an Ratten mit sehr wenigen Individuen auskommen muß (etwa 10 - 100 Ratten pro Testreihe), werden im Hefe-Test hohe

Zellzahlen (10^6 - 10^7 Zellen) verwendet. Dadurch kann eine höhere statistische Sicherheit gegenüber dem Tierversuch erreicht werden.

1.4.2 Bestimmung der LD₅₀ an Tieren

Ursprünglich ist die LD₅₀ zur Bestimmung von hochaktiven pharmakologischen Substanzen eingeführt worden. Im Laufe der Zeit wurde der Test jedoch in der Toxikologie zur Standarduntersuchung für jede Substanz, wie Pestizide und Industriechemikalien, eingeführt.

Dabei werden den Tieren, meist Ratten oder kleine Nagetiere, die Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht und die LD₅₀ anhand der Anzahl der gestorbenen Tiere ermittelt. Eine große Anzahl von Tieren ist nötig, um die LD₅₀ möglichst statistisch abgesichert zu ermitteln..

Bei der Verabreichung der Testsubstanzen kann man zwischen verschiedenen Applikationsarten wählen. Sie kann intraperitoneal, intravenös, subcutan oder oral erfolgen. Da die Autoren dieser Tests die Darreichungsform häufig nicht angeben, gibt dieses oft Anlaß zu Unklarheiten in der Durchführung und Interpretation der Versuchsergebnisse.

Eine generelle Abwendung von der LD₅₀ scheint zur Zeit noch nicht in Sicht, da die Gesundheitsbehörden nach wie vor fordern, daß für jede neue chemische Substanz die LD₅₀ ermittelt werden muß. Werden die Vorschriften der Behörden nicht beachtet und die Substanz nicht den entsprechenden Tests unterzogen, verlangt das Gesetz, die betreffende Substanz als starkes Gift anzusehen.

Seit 1988 wird in der Bundesrepublik vom Bundesgesundheitsamt die Acute Toxic Class Method (ATC) entwickelt, die die Einstufung bzw. Klassifizierung chemischer Stoffe nicht mehr in exakten Werten, sondern in Giftklassen einteilt. Damit ließen sich durch eine sequenzielle Prüfstrategie die Versuchstiere von durchschnittlich 25 auf 7,5 Tiere reduzieren (Schendel et. al., 1992).

Die Übereinstimmung der ATC - Methode mit Einstufungen der LD₅₀ Methode betrug 88%, in 6% der Fälle waren die LD₅₀-Werte höher als die ATC-Werte und in 5% niedriger. Die ATC-Methode ist nach umfangreicher nationaler und internationaler Validierung, die vom Deutschen Forschungministerium (BMFT) finanziert wurde,

1995 von der OECD als international offizielle Prüfmethode zur Bestimmung der akuten Toxizität akzeptiert worden (Spielmann, 1996).

1.4.3 Korrelation zwischen Zellkultur und Tierversuchen

Zellkulturen können für die Toxizitätsprüfung von Chemikalien und Arzneimitteln den Tierversuch nicht vollständig ersetzen, aber zur weiteren Reduzierung der Versuchstierzahlen beitragen. Am ehemaligen Institut für Wirkstoffprüfung in Berlin kann auf der Grundlage einer in der Zellkultur ermittelten ED_{50} die Stärke einer im Tierversuch verursachten LD_{50} vorhergesagt werden. Bisher wurden die LD_{50} -Daten von mehr als zweihundert Substanzen mit denen in der Zellkultur gefundenen ED_{50} -Werten verglichen (Halle et al., 1992).

Anhand dieser Daten ließ sich eine Übereinstimmung von etwa 74% für beide Testsysteme finden.

Untersuchungen zur Korrelation zwischen Tierversuchen und Zellkulturversuchen an dentalen Werkstoffen zeigen ebenfalls eine relativ gute Übereinstimmung zwischen diesen beiden Testmethoden (Schmalz, 1982).

Dabei zeigte sich, daß die Zellkulturtests bei weniger toxischen Materialien eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Implantatversuchen an Tieren besitzen.

Aber auch in den Zellkulturuntersuchungen untereinander gibt es oft keine übereinstimmenden Ergebnisse.

Es sind vor allem drei Gründe, die eine Vergleichbarkeit erschweren:

- 1) Verwendung unterschiedlicher Zellkulturen.
- 2) Verwendung verschiedenster Testmethoden, die einen Vergleich nicht oder nur schwer ermöglichen.
- 3) Keine einheitliche Probenvorbereitung und Probenlagerung, sowie keine einheitliche Inkubationsdauer. Thiel und Zinner (1983) verlangen, daß sich die Dauer der Toxizitätsprüfung mindestens über eine Generationszeit erstrecken sollte.

1.5 Methoden zur Bestimmung der Toxizität in der Zellkultur mittels Fluoreszenzfarbstoffen

Seit vielen Jahre werden fluoreszierende Farbstoffe zur spezifischen Lokalisation bestimmter Stoffe in Zellen und auf Zellmembranen, wie z.B. bei der indirekten Immunfluoreszenz, benutzt.

Bei dieser Methode werden Antikörper, die gegen bestimmte Proteine (Antigene) gerichtet sind, verwendet, um diese in der Zelle lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich z.B. Elemente des Zytoskeletts fluoreszenzmikroskopisch in hoher Auflösung nachweisen.

Das Objekt wird mit kurzwelliger Erregerstrahlung beleuchtet und emittiert längerwelliges Fluoreszenzlicht, das mikroskopisch, photographisch oder elektronisch detektiert werden kann. Die Empfindlichkeit ist ähnlich hoch wie bei radioaktiven Isotopen (Kleinig-Sitte, 1986).

Weiterhin haben sich die Fluoreszenzfarbstoffe als Alternative zu radioaktiven Methoden z.B. bei der Bestimmung der DNA-Sequenz mit fluoreszenzgekoppelten Basenanalogen bewährt.

Auf der Suche nach schnellen sicheren Alternativen zu den heute noch häufig verwendeten radioaktiven Methoden wie der ^3H Thymidinmarkierung oder dem ^{51}Cr Release-Test, wurden fluoreszenzmikroskopische Verfahren zur Markierung der DNA entwickelt.

Fluoreszenzfarbstoffe bieten gegenüber radioaktiven Isotopen neben einer besseren Handhabung auch eine unproblematischere Entsorgung.

Mittlerweile sind viele Fluorochrome bekannt, die sehr sensitiv sind und sich spezifisch jeweils nur an eine Zellkomponente anlagern.

Jedoch sind bisher noch keine Untersuchungen zur Bestimmung der ED_{50} mit fluoreszierenden Farbstoffen in der Zellkultur durchgeführt worden.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der ED_{50} mittels fluoreszierenden Farbstoffen bietet die DNA-Markierung mit den Bisbenzimidderivaten Hoechst H 33342 und H 33358. Diese Farbstoffe binden sich spezifisch und quantitativ an die DNA und fluoreszieren im gebundenen Zustand (Latt, 1976; Arnd-Jovin and Jovin, 1977). Im

Gegensatz zu H 33258 und anderen DNA-Farbstoffen wird H 33342 von lebenden Zellen etwa um den Faktor 1000fach besser aufgenommen (Blaheta et al., 1991) und ist selbst relativ untoxisch für die Zellen (Arnd-Jovin and Jovin, 1977; Durand and Olive, 1982).

Da sich der Hoechst Farbstoff quantitativ, d. h. stöchiometrisch an die DNA bindet, können Zellzahlbestimmungen mit diesem Farbstoff durchgeführt werden. So wurde von Papadimetriou (1993) gezeigt, daß die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes H 33258 mit der Zellzahl pro Well linear zunimmt.

Blaheta et. al. (1991) beschrieben eine Methode der Zellzählung mittels Markierung mit den Bisbenzimid H 33342 und H 33258.

Dabei wurden die beiden Bisbenzimide mit dem radioaktiven ^3H -Thymidin-Einbau verglichen. Die Zellen wurden 20 Stunden mit dem radioaktiven ^3H -Thymidin inkubiert, so daß ein quantitativer Einbau in die DNA erfolgte. Es zeigte sich in der Analyse, daß der ^3H -Einbau und die Fluoreszenzmessung praktisch identische Ergebnisse lieferten. Die Fluoreszenzintensität war linear zu der eingesetzten DNA-Menge. Das Bisbenzimid H 33342 scheint aufgrund seiner besseren Membrangängigkeit für eine Zellzählung bei vitalen Zellen besser geeignet zu sein als der Farbstoff H 33258. Die Bisbenzimide können den ^3H -Thymidineinbau teilweise ersetzen, wenn der Einbau nicht im Sinne einer Pulsmarkierung durchgeführt wird.

Die Fluoreszenzintensität kann quantitativ mit speziell entwickelten Geräten, sogenannten Fluoreszenzscannern direkt in der Mikrotiterplatte gemessen werden, wobei es verschiedene Meßprinzipien gibt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Scanner strahlt eine Halogenlampe Licht in definierter Wellenlänge (Exzitation) durch die Unterseite der Mikrotiterplatte aus, die dabei durch den Farbstoff entstehende Fluoreszenz (Emission) wird gleichzeitig von der Unterseite der Platte gemessen. Der Durchgang für die Messung einer 96-well-Platte beträgt dabei weniger als 1 min. Die Messwerte stellen relative Fluoreszenzeinheiten dar, die im Computer weiter verarbeitet und berechnet werden können.

Mit diesem Gerät ist es möglich, auch mit relativ wenig Zellmaterial ED_{50} -Bestimmungen durchzuführen. Zugleich können mehrere Farbstoffe, die sich durch verschiedene Wellenlängen bei Exzitation und Emission unterscheiden, durch verschiedene Filterkombinationen quantitativ in derselben Mikrotiterplatte detektiert

werden.

Eine andere Möglichkeit die Biokompatibilität einer Substanz zu untersuchen, ist die Messung der Membranintegrität an Zellen, da für die Funktion der Zelle die Membran von essentieller Bedeutung ist. Eine der möglichen Methoden zur Messung der Membranintegrität ist die Messung des Überstandes von ^{51}Cr (Brunner et al., 1968). Dabei wird $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ von den Zellen aufgenommen und intrazellulär reduziert zu ^{51}Cr , das dann nicht mehr freigesetzt werden kann. Bei einer Schädigung der Zellmembran ist eine erhöhte Radioaktivität im Überstand nachzuweisen.

BCECF-AM (2',7'-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxy-fluorescein-acetoxy-methyl-ester) bietet sich als Ersatz für den ^{51}Cr -Release-Test an. Kolber et al. (1988) zeigten im Vergleich zu dem ^{51}Cr -Release-Test vergleichbare Ergebnisse mit BCECF-AM.

Dieser Vitalfarbstoff wird von vielen Zellarten als membrangängiger Acetomethyl-Ester (BCECF-AM) aufgenommen und dann intrazellulär zu dem Abspaltungsprodukt BCECF hydrolysiert, wodurch er fluorogen wird und die Zellmembran nicht mehr verlassen kann (Juliane et al., 1990). Bei einer Schädigung der Zellmembran ist diese allerdings permeabel, so daß eine Veränderung der Fluoreszenz Aufschluß über die Membranaktivität unter Einwirkung eines toxischen Stoffes geben kann. Die Messung kann gleichzeitig mit der Hoechst-Farbstoff-Messung erfolgen, da die Farbstoffe unterschiedliche Excitations- und Emissionswellenlängen besitzen.

Die Zellen leuchten nach der Aufnahme grün und die Fluoreszenz kann im Cytofluorgerät quantitativ gemessen werden.

Auch diese Methode bietet sich für eine quantitative Bestimmung der Toxizität an.

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes als Zellzahlparameter wird ebenfalls zur Bestimmung der Toxizität herangezogen. Die Messung von Zellen in der Mikrotiterplatte kann mit dem fluoreszierenden Farbstoff Sulforhodamin 101 erfolgen. Dieser Farbstoff ist ein Derivat des Sulforhodamins B. Dabei werden die Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung mit dem Farbstoff inkubiert. Sulforhodamin 101 ist ein aminoxanthener Farbstoff mit zwei Sulfogruppen. Das Sulforhodamin 101 bindet sich an freie Aminogruppen in Proteinen. Diese Bindung ist stöchiometrisch und kann durch Abführen des Überstandes und Lösen des gebundenen Sulforhodamins durch pH-Änderung gemessen werden.

Sulforhodamine sind die empfindlichsten fluoreszierenden Farbstoffe für die

Proteinbestimmung (Brinkley, 1991).

Skehan et al. (1990) verglichen verschiedene Testmethoden zur Proteinbestimmung. Dabei zeigte sich, daß die Sulforhodamine in der Empfindlichkeit vergleichbar sind mit klassischen Bestimmungsmethoden wie Lowry et al. (1951) oder Bradford (1976). Damit stellt dieser Farbstoff ein stabiles und schnelles Meßsystem für die Messung des relativen Proteingehaltes dar.

1.6 Materialien

In der Zahnmedizin werden Materialien verwendet, die nach dem neuesten Medizinproduktegesetz auf ihre Biokompatibilität hin geprüft werden müssen. Im folgenden soll der Stand der Forschung bei Metallen und Kunststoffen kurz dargestellt werden:

1.6.1 Metallische Werkstoffe

Für die Testung von metallischen Materialien, die z.B. für Prothesen, Inlays oder Kronen verwendet werden, müssen nach Ewers und Schliepkötter (1984) folgende toxikologische, biochemische und physiologische Aspekte beachtet werden:

- 1) Schwermetallionen können mit bestimmten chemischen Gruppen von Proteinen bzw. Peptiden unter Bildung von stabilen Komplexverbindungen chemische Reaktionen eingehen. Hierdurch entstehen häufig Störungen der biologischen Funktionsfähigkeit dieser Moleküle (Inaktivierung von Enzymsystemen).
- 2) Bei vielen Enzymreaktionen spielen Spurenelemente eine wichtige Schlüsselrolle. Toxische Metallionen können an deren Stelle treten und die Spurenelemente verdrängen. Damit kommt es zu Änderungen oder Beeinflussung der Enzymaktivität.
- 3) Zahlreiche Metalle bzw. Metallverbindungen können biologische Prozesse wie z.B. die Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen, Hormonen und Neurotransmittern beeinflussen.

In-vivo-Untersuchungen

Bisher wurden zahlreiche In-vitro-Untersuchungen in der Zellkultur mit Legierungen und Reinmetallen durchgeführt. In-vitro-Untersuchungen zur Bestimmung der Toxizität mit Fibroblastenzellkulturen von Ratten zur Toxizität von pulverisierten Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen zeigten wesentlich geringere toxische Reaktionen als die Reinmetalle Kobalt, Nickel, Chrom und Molybdän (Evans et. al, 1986).

Bei Nickel-Chrom-Legierungen wurde festgestellt, daß in der gegossenen Legierungsform keine zytotoxischen Effekte in der Zellkultur meßbar waren, während bei Nickel- bzw. Chrompulver toxische Effekte nachgewiesen wurden (Rae, 1975, 1983).

Gewebekulturuntersuchungen von Kawahara (1968) zur Zytotoxizität von Metallen und Legierungen deuten darauf hin, daß Metalle der zweiten Gruppe des Periodensystems (Kadmium, Quecksilber, Beryllium) das Wachstum und die Zellteilung der Zellen vollständig verhindern.

Metalle der dritten und vierten Gruppe (Aluminium, Titan, Germanium, Zinn, Zirkonium) weisen dagegen keine zytotoxischen Effekte auf.

Metalle, die keine stabilen Oxide bilden, z.B. Kupfer, Zink, Cadmium verhalten sich in der Zellkultur hochtoxisch, während Metalle mit stabiler Oxidschicht (Nickel, Palladium, Platin) nur geringe zytotoxische Beeinträchtigungen aufweisen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das toxische Potential von Dentallegierungen einerseits von der Korrosionsbeständigkeit der Legierung, andererseits von der Toxizität der verwendeten Metalle abhängig ist (Klötzer, 1985; Willams, 1981). Eine Dentallegierung weist im biologischen Milieu erst dann eine toxikologische Wirkung auf, wenn durch Korrosion Bestandteile der Legierung freigesetzt werden. Daraus resultierende toxische Reaktionsprodukte (z.B. Metall-Protein-Verbindungen) können lokale Schädigungen des Gewebes, aber auch systemische Schädigungen hervorrufen.

Aus In-vitro-Untersuchungen zur Toxizität von Metallen und Dentallegierungen können allgemeine Informationen zur Zytotoxizität abgeleitet werden, jedoch lassen sich hieraus nur sehr begrenzte Aussagen unter In-vivo-Bedingungen ableiten. Smith (1982) zeigte, daß bei besonders ungünstigen Versuchsbedingungen die Ergebnisse

der In-vitro-Untersuchungen, wobei er deutliche zytotoxische Effekte auf Dentallegierungen nachweisen konnte, große Unterschiede zu den In-vivo-Versuchen aufwies, bei denen nur geringe oder keine zytotoxischen Effekte auftraten.

Die In-vitro-Biokompatibilitätsprüfungen von Metallen und Legierungen sind bereits in der Prüfnorm EN 30993 als Präscreeningtests verankert.

1.6.2 Kunststoffe

Die historische Entwicklung bis hin zu den heutigen Kunststoffen begann mit der Einführung von Silikatzementen in den vierziger Jahren. Damit kam man dem Wunsch nach, zahnfarbene Füllungsmaterialien zu entwickeln.

Später wurden die Silikatzemente durch die selbsthärtenden Acrylate ersetzt. Beide Kunststoffarten wiesen große Nachteile auf: Zum einen zeigten die Silikatzemente eine hohe Wasserlöslichkeit, zum anderen wiesen die Acrylate eine geringe Dimensionsstabilität auf. Schon früh wurde bei beiden Materialien eine hohe Pulpatoxizität festgestellt.

Entscheidende Fortschritte brachte die Einführung einer Mischung des Kunststoffes mit einem Füllstoff, z.B. mit vinylsilianisiertem Silikatpulver. Für diese zusammengesetzten Füllungskunststoffe hat sich die Bezeichnung "Komposite" durchgesetzt. Ein Komposit besteht demnach aus einer Mischung von mindestens zwei chemisch unterschiedlichen Materialien mit einer klar abgegrenzten Verbundschicht (Phillips, 1981).

Mit der Einführung eines größeren Monomermoleküls, dem Bisphenol-a-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA), durch Bowen (1962) und die verbesserte Kunststoffhaftung an der Zahnhartsubstanz auf chemischem Wege, bzw. durch die Einführung der mechanischen Mikroretention durch Säureätztechnik wurde eine weitere Verbesserung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Füllungsmaterialien erreicht.

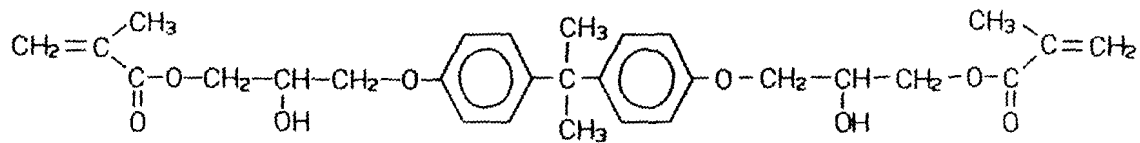
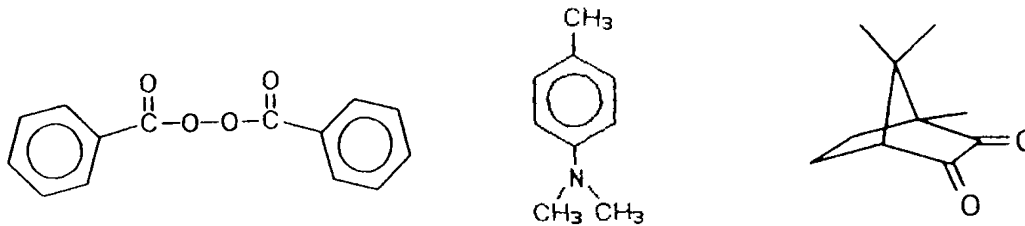


Abb 1: Bisphenol-a-Glycidyl-methacrylat (Bis-GMA), Bowen-Monomer

Durch die Verwendung von Makromolekülen erhöhte sich die Viskosität des Materials. Mit dem Einsatz von sogenannten Verdünnern, den Komonomeren, konnte eine bessere Verarbeitungsqualität erreicht werden. Die Bezeichnung “Verdünner” ist chemisch gesehen nicht korrekt, da die Komomere als Mono-, Di- oder Trimethacrylate mit den Monomeren kopolymerisieren und somit in den Kunststoff eingebaut werden. Sie dienen nur zur besseren Verarbeitung des Kunststoffes vor der Polymerisation. Art und Konzentration des Komonomers haben entscheidenden Einfluß auf das Dimensionsverhalten (Viohl et. al., 1986).

Die Polymerisation eines Füllungsmaterials läßt sich in zwei Funktionsarten aufteilen: in eine chemische und in eine lichthärtende Polymerisation.

Beide Reaktionsarten können auf alle Monomere angewendet werden. Bei der chemischen Härtung erfolgt die Autopolymerisation durch Dibenzoylperoxid (DBPO). DBPO zerfällt unter Hitzeeinwirkung in zwei Carboxylradikale welche die Polymerisation starten. Als Coinitiator wird ein tertiäres Amin, das N,N Dimethyl-p-Toluidin verwendet (Schnebel, 1951, Horner, Schwenk, 1949, Asmussen, 1980). Da die Hitzeentwicklung für eine Polymerisation im Mundraum nicht geeignet ist, wird heute meist die Photopolymerisation verwendet. Bei der Photopolymerisation wird die Härtung durch das Campherquinon initiiert. Die Substanz wird bei einer Wellenlänge von 420-450 nm in einen angeregten Tripletzustand angehoben, der unter Reduktion zu Radikalen zerfällt (Rabeck, 1987).

**Abb 2.:****Dibenzoylperoxid (DBPO), N,N Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) und Campherquinon (CQ)**

DBPO zerfällt in zwei Carboxyradikale, welche die Polymerisation starten. Als Koinitiatoren für DBPO fungieren tertiäre Amine. Das Amin N,N-Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) geht mit DBPO einen Charge-Transfer-Komplex ein, der dann unter Bildung eines Amin- und eines Carboxyradikals zerfällt. Die Toxizität von tertiären Aminen ist bekannt. Die LD₅₀-Dosis bei Ratten beträgt bei tertiären Aminen 25 mg/kg. Da die Reaktion bei der Polymerisation von Kompositen nie vollständig abläuft und je nach Reaktionsbedingungen ausgehärtete Kunststoffe einen mehr oder weniger hohen Restmonomergehalt aufweisen, tragen diese Residualmonomere vermutlich zu der gewebeschädigenden Wirkung der Komposite bei. Der hohe Restgehalt und die unbefriedigende Monomer-Polymer-Konversion der heute verfügbaren gefüllten Kunststoffe (Assmussen, 1975) bedingen neben einer biologischen Unverträglichkeit auch Veränderungen der physikalischen Eigenschaften. Dies kann zur Folge haben, daß sich das Material verfärbt oder auch zu einer mangelhaften Standfestigkeit des Komposites führt. Es ist bekannt, daß alle im unpolymerisierten Komposit vorliegenden Komponenten extrahierbar sind (Ferrance, 1990, Spahl 1990, Jontell, 1995 Geurtsen, 1997, 1998, 1999, Hamid, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, daß sich Monomere und die Additiva bis zu 2 Gew.% innerhalb von 14 Tagen nach Start der Polymerisation aus dem Kunststoff herauslösen lassen.

Mittels der Gaschromatographie/Massenspektroskopie und der IR-Spektroskopie und anschließendem Vergleich der IR-Spektren in der Literatur konnten eine Reihe von Substanzen aus polymerisierten und unpolymerisierten Kompositextrakten identifiziert werden. Interessanterweise ließen sich mehr Substanzen aus den polymerisierten als aus den unpolymerisierten Extrakten identifizieren. Das bedeutet, daß während der

Polymerisation zusätzliche organische Substanzen als Reaktions- oder Abbauprodukte entstehen. Die Herkunft dieser Produkte ist in den meisten Fällen noch unklar, nur bei Camphersäureanhydrid (CSA) und Hydroxyepicampher (HC) läßt sich die Herkunft aus dem Campherquinon herleiten (Spahl, 1991, 1995 und 1998, Geurtsen, 1998;).

Angesichts dieser Daten und der nachgewiesenen Zytotoxizität von modernen Kompositen (Geurtsen, 1987) ist zu vermuten, daß einige Nebenwirkungen der in dieser Studie gefundenen Substanzen darauf zurückzuführen sind. Diese Stoffe wurden in dem Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) als reizend, ätzend oder mindergiftig klassifiziert.

Deshalb sollte eine Biokompatibilitätsprüfung nicht nur an dem ausgehärteten Komposit, sondern auch an den Einzelbestandteilen dieser Füllungswerkstoffe durchgeführt werden. Dadurch ergäbe sich die Möglichkeit, schon im Vorfeld hochtoxische oder mutagene Substanzen zu eliminieren, die dann später zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnten. Bisher wurden allerdings erst verhältnismäßig wenige Untersuchungen zur biologischen Verträglichkeit von Einzelbestandteilen zahnärztlicher Komposite durchgeführt (Geurtsen, 1988, 1998, Hensten-Petersen, 1978, Hanks, 1991, Wataha, 1994, Li, 1999), jedoch wurde bisher kein Vergleich der Zytotoxizitäten von Substanzen mit chemisch ähnlicher Funktion vorgenommen, um einen Vergleich der Zytotoxizitäten innerhalb von Funktionsklassen (Monomere, Komonomere, Inhibitoren, Initiatoren, Additiva etc.) zu erhalten.

Von Hanks (1991) wurden insgesamt 11 Einzelsubstanzen von Füllungswerkstoffen an einer Dauerzelllinie getestet. Die dabei verwendeten Testmethoden waren die Ermittlung der ED₅₀ anhand des Einbaus von ³H-Thymidin, die Ermittlung der Proteinsynthese durch den Einbau von ³H-Leucin sowie die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes pro Well. Die Ergebnisse zeigten für alle untersuchten Substanzen eine hohe Toxizität. Die ED₅₀-Werte von BIS-GMA, UEDMA, TEGDMA und anderen Glycidylmethacrylaten lagen zwischen 10 - 100 µmol/L.

1.6.3 Biokompatibilitätsprüfung von Kompositen

Für die Testung von festen Bestandteilen bzw. ausgehärteten Kompositen können Eluate dieser Materialien verwendet werden.

Dabei werden die Materialien, wie z.B. Füllungskunststoffe nach Herstellervorschrift angesetzt und dem Nährmedium oder einer künstlichen Korrosionslösung für einige Zeit ausgesetzt. Das Eluat kann dann anschließend unverdünnt oder verdünnt auf die Zellkultur gegeben und die Reaktion beobachtet werden. Einige Untersuchungen (Leinenbach, 1993, Leyhausen, 1993; 1994, Geurtsen, 1999) an Metallegierungen, Wurzelkanalfüllmaterialien und lighthärtenden Füllungsmaterialien zeigten, daß sich aus diesen Materialien toxische Komponenten herauslösen ließen.

Dabei konnte z.B. die Zunahme oder Abnahme der Toxizität eines Materials im Verlauf der Eluat-Dauer an Zellkulturen gezeigt werden. Es zeigte sich, daß die höchste Toxizität zu Beginn des Versuchs gemessen wurde, mit zunehmender Eluat-Dauer aber stetig abnahm. Daraus resultiert die Vermutung, daß direkt nach der Polymerisation die stärkste Konzentration von Monomeren und Additiven freigesetzt wird.

1.7 Mutagenitätstest : Ames-Test, *umu*-Test

Von besonderer Bedeutung ist neben der allgemeinen Zytotoxizität einer Substanz auch ihre möglicherweise vorhandene Mutagenität.

Die große Zahl aller Genotoxine (Mutagene, Kanzerogene) ist an sich inaktiv und entfaltet im intakten Organismus erst ihre Schädigung durch metabolische Aktivierung. Unter genotoxisch wirksamen Stoffen faßt man solche chemischen und physikalischen Noxen zusammen, die in der Lage sind, den primären Träger der Erbinformation, die DNA zu verändern (Reifferscheid, 1993).

Für die Prüfung der Mutagenität eines Werkstoffes ist in der EN 30993 der Ames-Test vorgeschrieben. Bisher wurden schon einige Monomere und Bestandteile von Kompositen im Ames-Test überprüft (Hensten-Petersen et al., 1978, Geurtsen, 1988,

Schweikl, 1994). Gentoxische Effekte traten in diesen Studien nicht auf. Der Ames-Test (Ames, 1962) beruht auf der Bildung von Revertanten von speziellen histidinauxotrophen Mutanten der Bakterienstämme des Stammes *Salmonella typhimurium* (Ames-Test, Ames et.al., 1973, 1979). Eine mutagene Substanz erhöht die Anzahl der Rückmutationen in der Weise, daß auf einem histidinfreien Nährmedium mehr Kolonien auftreten als in der negativen Kontrolle. Je nach Konstitution des betreffenden Genlokus wird dabei zwischen Basensubstitution und Rasterverschiebungsmutation unterschieden. Durch die Anwesenheit weiterer spezieller Faktoren (z.B. durch die Zugabe von S-9 Extrakt) kann die metabolische Aktivität der untersuchten Substanz erhöht werden.

Über den Ames-Test ist bekannt, daß etwa 63-93% der getesteten Karzinogene als Mutagene erkannt werden (Rinkus und Legator, 1979). Die Rate der falsch negativen Ergebnisse wird mit etwa 8-37 % angegeben.

Auf der Suche nach einer schnelleren und kostengünstigeren Methode wurde der *umu*-Test als Alternative zum Ames-Test entwickelt (Reifferscheid, 1993). Dieser Test läßt sich innerhalb eines Tages ausführen und auswerten, während der Ames Test mehrere Tage benötigt.

Für den *umu*-Test wird der Stamm *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK1002) eingesetzt. Dem *umu*-Test liegt die wissenschaftlich gesicherte Erkenntnis zugrunde, daß die bakterielle Mutagenese weitgehend an die Anwesenheit und die Aktivität bestimmter Gene in der DNA gekoppelt ist (Reifferscheid et. al., 1991). Bei *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK1002) sind zwei Gene, die sogenannten *umuDC* bzw. *mucAB* Gene für diese Aktivität zuständig. *Salmonella*-Stämme, die kein *umuDC* oder das Analogon *mucAB* besitzen, sind praktisch nicht mutierbar (Perry, 1982).

Beim *umu*-Test werden nicht wie bei dem klassischen Ames-Test die durch die Rückmutation entstandenen Bakterienkolonien (his-Revertanten) gezählt, sondern man bestimmt die Aktivität der induzierten Gensequenzen, die ein Maß für die Gentoxizität darstellen, durch die kolorimetrische Bestimmung der Genaktivität, die sich dadurch leicht bestimmen läßt, daß die Gene mit dem Enzym β -Galaktosidase gekoppelt werden (Shinagawa et al., 1983). Die β -Galaktosidase läßt sich durch den Zusatz von o-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid (ONPG) nachweisen. Das ONPG wird dabei von

der β -Galaktosidase in seine gefärbten Komponenten gespalten. Die Farbintensität ist ein Maß für die Mutagenität einer Substanz. Ein weiterer Vorteil des *umu*-Mikrotests gegenüber dem Ames-Test ist nicht nur der Zeitvorteil, sondern die gleichzeitige Messung der Gentoxizität durch die Ermittlung der Induktionsrate und der allgemeinen Zytotoxizität einer Substanz durch Messung der Zellzahl anhand der optischen Dichte.

Der *umu*-Test wird bereits seit Jahren in der Umweltanalytik zur Untersuchung von Gentoxizitätsprofilen an Fließgewässern angewendet (Reifferscheid, 1990, 1991). Für den *umu*-Test steht eine DIN-Vorschrift kurz vor der Verabschiedung; eine ISO-Version ist in Vorbereitung.

1.8 Der DNA-Synthese-Inhibitionstest (DIT- Test)

Im Gegensatz zu der in Bakterien in Form einer zirkulären DNA relativ einfach strukturierten, genetischen Information ist in den Zellen eukaryontischer Organismen der genetische Apparat in den Chromosomen wesentlich komplizierter organisiert. Gentoxine können hier sowohl in der DNA selbst, als auch in den chromosomalen Proteinen Schädigungen erzeugen.

Deshalb kann nicht ohne Weiteres aus Ergebnissen mit einem bakteriellen System wie dem *umu*-Mikrotest auf die Wirkung in eukaryontischen Organismen geschlossen werden.

Die EN 30993 fordert deshalb neben dem Ames-Test auch einen Gentoxizitätstest in einem eukaryontischen System.

Der DNA-Synthese-Inhibitionstest (DIT-Test) beruht auf der Tatsache, daß Veränderungen an der DNA meist zu einer Verringerung der replikativen DNA-Syntheserate dieser Zellen führt. Dieser Test wurde bereits erfolgreich zur Detektion von Kanzerogenen eingesetzt (Heil, 1992). Dabei wird angenommen, daß die Bindung von karzinogenen Substanzen an die DNA die Synthese hemmt. Dieser nichtradioaktive Test beruht auf dem Einbau und dem enzymatischen Nachweis eines Thymidinanalogs, dem Bromdesoxyuridin (BrdU). Das eingebaute BrdU wird dann mit Hilfe eines primären und eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers mit anschließender Substratinduktion mittels O-Phenyldiamin (OPD) im Sandwich-

Verfahren detektiert. Eine anschließende Proteinmessung ergibt in Verbindung mit dem gebildeten OPD eine zellzahlkorrigierte DNA-Synthese. Als gentoxisch wird eine Substanz bezeichnet, bei der die zellzahlkorrigierte DNA-Synthese 50% oder weniger der Kontrolle erreicht.

Ein Absinken der DNA-Synthese weist hierbei auf einen gentoxischen Schädigungsmechanismus hin. Ein eventuelles Wiederansteigen der DNA-Synthese wird als Ausdruck einer nicht-gentoxischen Schädigung interpretiert. Nach Auswaschen der Zellen erholen sich die Zellen relativ rasch von den allgemeintoxischen Schädigungen, während einer Schädigung der DNA noch nach Stunden, Tagen oder sogar Wochen nachweisbar bleibt. Eine einzige DNA-Läsion ist dabei ausreichend, um die Initiation der Replikation aller Replikone eines Clusters zu inhibieren (Painter, 1986), und ein einziges DNA-Addukt hemmt die (durch die DNA-Polymerasen erfolgende) Kettenelongation (Villiani et al., 1978). Es konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition der DNA-Synthes durch Karzinogene bereits bei Konzentrationen erfolgt, die 100 bis 1000fach geringer sind als zur (meßbaren) Induktion einer DNA-Reparatursynthes notwendig sind (Novicki et al. 1985).

1.9 Problemstellung

Die Industrie verwendet heute eine Vielzahl von Substanzen für zahnärztliche Füllungsmaterialien. Bisher sind nur wenige dieser Materialien auf Zytotoxizität hin untersucht worden. Dabei wurden meist nur Eluate von ausgehärteten Materialien verwendet. Um eine Abschätzung des Toxizitätspotentials schon bei der Entwicklung neuer Materialien zu erkennen, ist es unerlässlich die ED_{50} nicht nur aus Eluaten, sondern auch der jeweiligen Einzelsubstanzen zu bestimmen. Das Ziel dieser Arbeit sollte sein, die ED_{50} dieser Einzelbestandteile innerhalb der jeweiligen Materialklasse zu ermitteln und hinsichtlich ihrer Zytotoxizität zu bewerten.

Weiterhin werden in diesen Arbeiten meist Dauerzellkulturen eingesetzt, die dem "oralen" Zielgewebe" nicht oder nur bedingt entsprechen. Auch werden dabei Kulturbedingungen eingehalten, die nur schlecht die Situation im oralen Gewebe simulieren. Daher ist eine weitere wichtige biologische Fragestellung die Vergleichbarkeit der Zytotoxizität von Dauerzellkulturen mit nicht transformierten Zellkulturen, die direkt dem oralen Zielgewebe entnommen worden sind. Für die vergleichende Untersuchung stehen primäre Zelllinien zur Verfügung, die aus der Gingiva, der Wurzelhaut und der Pulpa von Zähnen gewonnen wurden. Für die Vergleichbarkeit der Toxizität sollte ein Testsystem gefunden werden, das es ermöglicht, mit verhältnismäßig wenig Zellmaterial reproduzierbare Daten zu bekommen. Dazu sollte auf der Basis von Fluoreszenzfarbstoffen (Hoechst 33342, BCECF-AM und Sulforhodamin 101) ein Testsystem für die Bestimmung der ED_{50} in der Zellkultur für adhärente Zellen entwickelt werden. Zudem sollten Kultur- und Inkubationsbedingungen eingehalten werden, die es gewährleisten, daß die Substanzen in der gesamten Proliferationsphase auf die Zellen einwirken können.

Die mögliche Genotoxizität und Mutagenität der in der Zahnmedizin verwendeten Substanzen spielt durch die lange Verwendungsdauer von Kompositen eine wichtige Rolle. Deshalb sollte an einigen ausgewählten Substanzen eine mögliche mutagene Wirkung dieser Substanzen mit zwei Kurzzeittestsystemen ermittelt werden.

Da der *umu*-Mikrotest ein prokaryontisches System darstellt und Ergebnisse aus dem *umu*-Test nicht ohne weiteres auf Zellkulturen humaner Zellen übertragen werden können, sollte mit einem eukaryontischen Testsystem, dem DNA-Synthese-Inhibitionsstest (DIT-Test) Aufschluß über eine möglicherweise vorhandene DNA-synthesebeeinflussende Wirkung dieser Substanzen gefunden werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellstämme

Es wurden folgende Teststämme verwendet :

Als permanente oder kontinuierliche Zelllinie in einer Monolayerkultur wurde die kontakt-inhibierte Mausfibroblastenzelllinie 3T3 (CCL 92, American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, USA) verwendet.

Als Suspensionszelle kam für die Untersuchungen am Coulter Counter eine humane Zelllinie, die K 562 ATCC CCL 243 (chronic myelogenous leucemia) zur Anwendung.

Humane Pulpa (HPF), parodontale Ligament- (HPDL) und Gingivafibroblasten (HGF) wurden als primäre Zellen entweder aus tiefgefrorenen Beständen aufgetaut und kultiviert, oder direkt aus Biopsien von Patienten der Zahnklinik Hannover gewonnen und verwendet.

Die Gentoxizitätsuntersuchungen mit dem *umu*-Test wurden mit dem Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002 durchgeführt. Für den DIT-Test wurden humane HeLa-S3 Zellen, ATCC CCL 2.2 verwendet.

2.2 Chemikalien

Es wurden, sofern nicht anders angegeben, die Chemikalien von der Firma Riedel de Haen (Seelze) oder von der Firma E. Merck (Darmstadt) in den Reinheitsgraden „p.a“, „reinst“ oder für „biochemische Zwecke“ bezogen.

Zellkulturchemikalien :

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim :

Penicillin /Streptomycin

- Serva Feinbiochemica, Heidelberg :

Kollagen, Ampicillin

- Sigma Chemie GmbH, München :

DMSO, Trypsin, Ampicillin

- Biochrom KG, Berlin:
DMEM, Hanks , RPMI, Amphotericin B
- Bibby Dunn, Asbach
96-Well-Platten
- Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen
- Pan- System, Aidenbach:
Fötale Kälberserum
- Greiner GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen

Antikörper :

- Bio-Cell-Consulting, Reinach Schweiz:
anti BrdU (monoclonal)
- Sigma Chemie GmbH, München
Ratte-Anti Maus IgG, FITC-Konjugate,
Schaf-Anti Maus-IgG Antikörper, Peroxidase-Konjugate

Fluoreszenzfarbstoffe

- Fluka AG, Buchs, Schweiz:
Sulforhodamin 101
- Riedel de Haen, Seelze:
Hoechst Farbstoffe Nr. H 33342 und H 33258
- Calbiochem- Novabiochem, Bad Soden:
BCECF-AM

Sonstige Chemikalien:

- Sigma, Deisenhofen:

2`-Desoxycytidin, 5`-Bromo-2`Desoxyuridin,
Schafserum, o-Nitrophenyl- β -d-Galaktopyranosid,
Nitrochinolin-N-oxid, SDS, Tween 20,
 β -Merkaptoethanol, OPD (*o*-Phenylendiamin), Sulforhodamin B

- Difco Laboratories, Detroit USA:

Bacto-Trypton

- Roth, Karlsruhe:

Tris(hydroxymethyl)aminoethane

2.3 Verwendete Monomere und Additiva:

Die in dieser Arbeit untersuchten Monomere und Additiva wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Werner Spahl, Institut für Organische Chemie II, Köln, Greinstraße 2, zu Versuchszwecken zur Verfügung gestellt.

Die Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Degussa, Janssen, Röhm, Merck und Kulzer bezogen, bzw. vom Institut für Organische Chemie Köln selbst synthetisiert (Spahl, 1995).

Die für die Bestimmung der ED₅₀ verwendeten Chemikalien sind unter 3.2. aufgelistet.

2.4 Nährmedien und Antikörper**2.4.1 Antibiotika**

Zur Erhaltung der Sterilität der Zellen und zum Schutz vor bakterieller und Pilzinfektion wurde den Medien ein Gemisch aus Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B zugesetzt.

Penicillin/Streptomycin

Eine Flasche (50000 Units) wurde in 50 ml sterilem Aqua bidest. gelöst und zu 1% den Medien bzw. 2% der Hanks-Lösung vor der Sterilfiltration zugeführt.

Amphotericin B

Die gebrauchsfertige Lösung wurde zusammen mit der Zugabe des fötalen Kälberserums (FKS) dem Medien zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml beigemischt.

2.4.2 Nährmedien

Unter In-vitro-Bedingungen muß für die aus einem Organismus isolierten Zellen eine Umgebung geschaffen werden, die Wachstum, Proliferation, Differenzierung und die Ausübung von typischen Zellfunktionen gewährleistet. Hierzu müssen alle nicht selbstsynthetisierbaren Substanzen zugeführt werden (*essentielle Substanzen*). Abfallprodukte müssen so lange wie möglich neutralisiert werden, wozu Puffersysteme unentbehrlich sind.

Daneben ist für ein optimales Wachstum ein Zusatz von 5-20% tierischem Serum notwendig. Dieses liefert wichtige Hormone, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren. Somit setzen sich die Zellkulturmedien in der Regel aus Aminosäuren, Antibiotika, Vitaminen und einem anorganischen Puffergemisch zusammen. Es wurden den verschiedenen Medien, je nach Formulierung, fötales Kälberserum (FKS) und Natriumhydrogencarbonat zugegeben.

Natriumhydrogencarbonat dient sowohl als essentieller Nahrungsbestandteil, als auch als Puffersubstanz, welche den erhöhten CO₂-Gehalt, der bei starkem Zellwachstum auftritt, in gewissen Grenzen neutralisieren kann.

RPMI 1640 Medium (für die Anzucht der primären Zelllinien)

RPMI- Basis (Biochrom)	10,42 g
Penicillin/Streptomycin	10 ml
NaHCO ₃	2,0 g
Aqua bidest.	ad. 1000 ml

Dulbeccos' MEM (DMEM) Medium

Das DMEM Medium wurde für die Aufzucht und Stammhaltung der Dauerzelllinie 3T3 verwendet.

Dulbeccos MEM Basis (Biochrom)	9,12 g
D-Glucose	1 g
10 mM Hepes	2,38 g
Penicillin/Streptomycin	10 ml
NaHCO ₃	3,7 g
Aqua bidest.	ad. 1000 ml

Für die Aufbewahrung der Biopsien (3-24 h bei 4°C) bis zu deren Aussetzen in Zellkulturflaschen, wurde eine Hanks-Lösung mit doppelt konzentriertem Zusatz an Penicillin/Streptomycin (2%) und Amphotericin (2%) verwendet.

Hanks-Lösung Doppelt P/S/A

Hanks Salt Basis	9,86 g
NaHCO ₃	0,350 g
Penicillin/Streptomycin	20 ml
Aqua bidest.	ad. 1000 ml

Die jeweiligen Substanzen der verschiedenen Medien wurden in etwas Aqua bidest. gelöst, anschließend die Penicillin/Streptomycinlösung dazugegeben und der pH-Wert auf 7,1 mit 1M verdünnter HCl eingestellt. Danach wurden die Medien durch ein 0,2 µm Ø Filter (Mediacap5, Laguna Hills, California, USA) sterilfiltriert.

Die Basismedien können bis zu einem Jahr bei 4°C aufbewahrt werden.

Vor Gebrauch wurde das Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt, mit 10% FKS und mit Amphotericin-B-Lösung (1% bzw. 2% bei der Hanks-Lösung) zum definierten Wachstumsmedium (steril) ergänzt.

Zum Waschen der Zellen und für die Entfernung der Medien beim Subkultivieren wurde folgende Pufferlösung verwendet:

PBS Puffer (0,1 mol) nach Amersham pH 7,3

137 mM NaCl	8 g/L
2,7 mM KCl	0,2 g/L
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
8 mM Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	1,14 g/L
Aqua bidest.	ad. 1 L

Der pH-Wert wurde, wenn nötig, mit 1M NaOH eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

2.5 Kulturbedingungen

Die primären Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank (Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und einem relativen CO₂-Gehalt von 5% bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 100% kultiviert bzw. inkubiert. Die 3T3-Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden in einer Reinluftwerkbank (Antair BSK 3, Anthos, Mikrosysteme GmbH, Köln) durchgeführt.

2.6 Beschichtung der Flaschen mit Kollagen

Zur Gewinnung primärer Zellen aus menschlichem Gewebe und zur besseren Anheftung der Biopsiestücke müssen die Flaschen mit Kollagen Typ I beschichtet werden. Collagen R (Serva) wurde zu 10% in steriler Essigsäure (0,1%) gelöst. 800 µl dieser Lösung wurden in 25cm² Flaschen pipettiert und auf dem Boden der Flasche gleichmäßig verteilt. Die Flaschen konnten dann bis zum Gebrauch im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt werden. Kurz vor Gebrauch wurde das überschüssige Kollagen entfernt und die Flasche einmal mit 5 ml RPMI gespült.

2.7 Gewinnung und Zellanzucht der primären Zellen**2.7.1 Gewinnung von Pulpazellen und Gingivafibroblasten**

Pulpa-(HPF) und Gingivafibroblasten (HGF) wurden direkt durch das Aussetzen kleiner ca. 2mm² großer Stückchen Pulpa und Gingivagewebe in die zuvor mit Kollagen Typ I beschichteten (siehe 2.3.1) Zellkulturflaschen gewonnen. Dazu wurden

durch parodontalchirurgische Eingriffe direkt von Patienten gewonnene Biopsien in der Hanks-Lösung mit 2% P/S/A bei 4°C aufbewahrt. Diese wurden dann anschließend mit frischer Hanks-Lösung gespült und steril in kleine Stücke mit einer Schere zerschnitten. Die Biopsiestückchen wurden in der Flasche verteilt und ca. 30-45 min offen in der Werkbank stehengelassen. Dadurch wurde eine größere Haftung der Biopsien an die Zellkulturflaschen erreicht. Nach dieser Zeit wurden die 25 cm² Flaschen mit 4 ml RPMI Wachstumsmedium vorsichtig gefüllt und möglichst ohne größere Erschütterungen in den Brutschrank überführt. Nach 48-72 h konnte dann das Auswachsen der Zellen protokolliert werden. Um eine Konditionierung des Mediums zu erreichen, wurde in der ersten Phase des Anwachsens nur 1-2 mal pro Woche das Medium gewechselt. Nach Anwachsen des Zellrasens (präkonfluente Phase) wurden die Zellen in 80 cm² Kulturflaschen passagiert.

2.7.2 Gewinnung von Wurzelhautfibroblasten

Parodontale Ligamentfibroblasten wachsen direkt an der Zahnwurzel und müssen deshalb enzymatisch von der Wurzel entfernt werden. Die Zähne wurden nach der operativen Entfernung in Hanks-Lösung mit doppelt konzentriertem P/S/A (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) bei 4°C 3 h bis höchstens 24 h aufbewahrt. Anschließend wurden die Zähne mit steriler PBS gewaschen. Die Krone des Zahns, die eine sehr hohe Anzahl von Mikroorganismen aufweist, wurde durch das Eintauchen in einer 5% Natriumhypochloritlösung für ca. 1 min desinfiziert. Dabei ist zu beachten, daß nur die Zahnkrone in Berührung mit der Natriumhypochloritlösung kommt, da sonst die Zellen der Wurzelhaut ebenfalls mit abgetötet würden. Ferner wurden alle anhaftenden Gingivareste entfernt. Die Zähne wurden dann anschließend noch einmal mit PBS gespült, um Reste der Desinfektionslösung zu entfernen. Danach wurden die Zähne in eine sterile Dissoziationslösung, bestehend aus PBS, 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA, die den gesamten Zahn bedeckt, überführt. Die Trypsinlösung wirkte für ca. 45 min im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln auf die Wurzelhaut ein. Das Einwirken der Enzymlösung, die die angedauten Zellen enthielt, wurde dann durch die Zugabe von 10 ml RPMI gestoppt, die resultierende Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 800 U/min (Sigma 3-K-1, Sigma, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das

Zellpellet in 4 ml RPMI aufgenommen und in die vorbereitete 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte die erste mikroskopische Kontrolle und beim Erreichen eines semikonfluenten Zellrasens wurden die HPDL in 80cm² Kulturflaschen passagiert und bis zum Versuchsbeginn weiter kultiviert.

2.8 Mediumwechsel

Um das Wachstum und die Vitalerhaltung der Zellen zu gewährleisten, muß ein regelmäßiger Mediumwechsel durchgeführt werden, da bestimmte Bestandteile des Mediums entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen. Die Intervalle des Mediumwechsels variieren von Zelllinie zu Zelllinie und sind abhängig vom Metabolismus und der Wachstumsgeschwindigkeit.

Das verbrauchte Medium wurde mit Hilfe einer Absaugvorrichtung (Vacuboy, Fa. Integra, Fernwald) steril entfernt und mit der gleichen Menge frischem, auf 37°C vorgewärmtem Medium ersetzt. Je nach Größe der Flaschen wurden in die 25 cm² Flasche 5 ml, in die 80 cm² Flasche 15 ml und in die 175 cm² Flasche 35 ml Medium pipettiert.

2.9 Subkultivierung von Monolayerkulturen (Trypsinierung)

Wachsen adhärente Zellen in der Flasche aus, so daß sie zu großen Teilen den Flaschenboden bedecken, kommt es zunächst zu einem Stillstand des Wachstums und dann auch zu einem Absterben der Zellen, wenn sie nicht in eine neue Flasche mit einer geringeren Zellzahl überführt werden.

Um dies zu verhindern, müssen die Zellen mit einer enzymatischen Verdauung z. B. durch die Protease Trypsin vom Boden gelöst, und in einer 1:3 oder 1:5 Verdünnung neu ausgesät werden.

Trypsin Lösung 0,25% , 0,02% EDTA:

Trypsin	2,5 g
EDTA	0,02 g
PBS	ad. 1000 ml

Trypsin und EDTA wurden in etwas PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,1 eingestellt. Die Trypsinlösung wurde dann sterilfiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren.

Durchführung :

Das alte Medium wurde entfernt und die Flasche einmal mit einer Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺ freien, sterilen PBS-Lösung gespült. Anschließend wurde je nach Größe der Flasche 0,5-1,5 ml der Trypsin-EDTA Lösung zupipettiert. Die Lösung muß den gesamten Flaschenboden bedecken. Die Flasche wurde kurz geschwenkt, fest verschlossen und dann für 5-7 min in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle des Ablösungsprozesses. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frischem FKS-haltigen Medium abgestoppt (Inaktivierung des Enzyms durch Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺-Ionen) und durch anschließendes Suspendieren der Zellen wurde ein Teil der Zellen für Versuche verwendet und ein Teil weiterkultiviert. Jede Passagenanzahl und jeder Mediumwechsel wurden für jede Zelllinie protokolliert.

2.10 Konservierung

Zur Aufbewahrung über eine längere Zeit bietet sich nur die Kryokonservierung bei -196°C in flüssigem Stickstoff an. Dazu wurden die Zellen nach Kapitel 2.9. trypsinisiert und in einer geringen Menge frischen Mediums aufgenommen. Die Zellzahl wurde nach Kapitel 2.11.1 bestimmt. Dabei sollte die Zellzahl 5×10^5 /ml nicht unterschreiten. Falls erforderlich, wurden die Zellen zentrifugiert und noch einmal in weniger Medium aufgenommen.

Die Zell/Mediumsuspension wurde mit ca. 8% DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt, um einen effektiven Gefrierschutz der Zellen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde in sterile Kryoröhrchen zu je 1ml pipettiert und anschließend in ein Einfriergefäß (Nalgene Nunc, Wiesbaden) gegeben. Der Behälter wurde für 6-24 h bei -80°C

gelagert. Der in dem Einfrierbehälter enthaltene Isopropylalkohol senkt dabei die Temperatur der Kryoröhrchen um 1°C pro Minute, damit das Wasser in den Zellen nicht auskristallisiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen können je nach Bedarf wieder aufgetaut und für Zytotoxizitätsversuche verwendet werden.

Dazu wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln aufgetaut, bis kein Eis mehr zu sehen war. Die Zellen wurden dann in eine mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt. Die Flasche wurde dann für 24 h möglichst nicht bewegt, um die Anheftung der Zellen nicht zu behindern. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um den toxischen Einfrierschutz DMSO aus dem Medium zu entfernen.

2.11 Wachstumsparameter

2.11.1 Trypan-Blau-Färbung

Die trypsinierten Zellen wurden mit der Trypan-Blau-Gebrauchslösung 1:1 gemischt. Trypan Blau dringt in tote Zellen aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität dieser Zellen ein und kann somit als Unterscheidungskriterium für tote und lebende Zellen dienen. Wenn der ermittelte Prozentsatz toter Zellen über 15% lag, wurden diese Zellen nicht mehr für die Zytotoxizitätsversuche verwendet.

Trypan-Blau Stammlösung :

0,4 g Trypanblau wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst.

Gebrauchslösung :

Die Stammlösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt und sterilfiltriert.

2.11.2 Zellzählung

Die Zählung erfolgte in einer Thoma-Zählkammer. Mit der errechneten Zellzahl wurden anschließend die Zellen mit frischem Medium auf die für den Test entsprechende Zellzahl verdünnt.

2.11.3 Messung des Proliferationsindex

Die Proliferationsraten und der Nachweis des Verhältnisses von proliferierenden zu nicht proliferierenden Zellen wurde durch den Einbau von BrdU überprüft.

Dazu wurden die Zellen 24-h (3T3) bzw. 48 h (HDPL) nach Aussaat auf spezielle Objektträger (Mikroflask, Nunc) mit zuvor frisch angesetzter BrdU-Inkubationslösung (Bromdesoxyuridin [BrdU] und 5-Brom-2'-Desoxyridin) in einer Konzentration von 20 μM für 60 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 30 min Fixierung mit einer Lösung aus 90% Ethanol, 5% Essigsäure und 5% Aqua dest (v/v) und anschließender 15 minütiger HCl-Denaturierung (4N HCl) wurden die Zellen mit einer 1:100 (in 50% Schafserum/ 50% PBS/0,5% Tween 20) verdünnten Lösung von anti-BrdU markiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die sekundäre Markierung mit dem fluoreszierenden Antikörper Ratte-Anti-Maus IgG FITC Konjugat (Sigma 1/50 in 20% Schafserum/ PBS/ 0,5% Tween 20) für 45 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Zur Auswertung wurden 3x je 100 Zellen auf ihre Markierung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IMT-2, Japan) untersucht, wobei das Verhältnis der markierten zu den nichtmarkierten Zellen ausgezählt wurde.

2.12 Fluoreszenz-Test zur Bestimmung der ED₅₀ (Inkubations-Test)

2.12.1 Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Die Aussaat betrug 1×10^4 Zellen /Well in 200 μl . Wegen der starken Verdunstung am Rand der Platte wurden die direkt am Rand liegenden Wells nicht mit der Zellsuspension, sondern mit sterilem PBS befüllt.

So standen jeweils für die einzelnen Verdünnungsstufen und die Kontrolle je 6 Wells zur Verfügung.

2.12.2 Anheftungszeit

Die Dauerzelllinie 3T3 wurde nach der Aussaat 24 h, die primären Zellen 48 h inkubiert, um den Zellen Zeit für die Anheftung und Überwindung der lag-Phase zu geben. Die Dauerzelllinie 3T3 besitzt im Gegensatz zu den primären Zellen eine deutlich kürzere Anheftungs- und Generationszeit. Um zu gewährleisten, daß die Toxizitätsprüfung an allen Zellarten in der Proliferationsphase stattfindet, wurden unterschiedliche Anheftungszeiten gewählt.

2.12.3 Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen

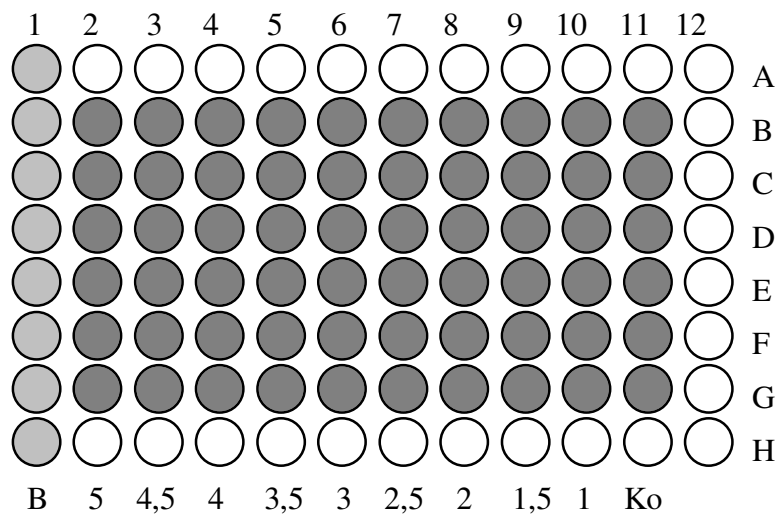
Nach der Anheftungszeit erfolgte die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen. Es wurden von den unterschiedlichen Substanzen Stammlösungen in einer Konzentration von 100 mM in DMSO angesetzt. Um dabei die Höchstgrenze von DMSO im Medium von 1% nicht zu überschreiten, wurde bei Konzentrationen von über 5 mM im Testansatz die zu testende Substanz in einer Stammkonzentration von 1 M gelöst. Die Substanzen zeigten ein unterschiedliches Lösungsverhalten und mußten teilweise im Ultraschallbad gelöst werden. Danach wurden die Stammlösungen bei 4°C in Kunststofffläschchen aufbewahrt.

Vor den Zytotoxizitätstest wurden die Stammlösungen auf Zimmertemperatur gebracht und mit frischem Medium bis zur höchsten Konzentration im Testansatz verdünnt. Von dieser Konzentrationsstufe ausgehend wurde die Verdünnungsreihe angesetzt. Jeweils um eine Zehntelstufe wurde die Ausgangskonzentration verdünnt. Die Substanzen wurden zusammen mit dem Mediumwechsel nach 24 bzw. 48 h zugegeben.

Tab 2: Verdünnungsstufen vom Bereich 5- 0,1 mM

Bereich in mM			
5-1 mM	2,5-0,5 mM	1- 0,2 mM	0,5- 0,1 mM
5	2,5	1	0,5
4,5	2,25	0,9	0,45
4	2	0,8	0,4
3,5	1,75	0,7	0,35
3	1,5	0,6	0,3
2,5	1,25	0,5	0,25
2	1	0,4	0,2
1,5	0,75	0,3	0,15
1	0,5	0,2	0,1
0	0	0	0

Die Reihen mit der Konzentration 0 mM bezeichnen die 100%- Kontrolle, bei der ein Mediumwechsel ohne Zusatz der zu untersuchenden Substanz erfolgte.

**Abb. 3 Aussaatmuster der Mikrotiterplatten**

● : Test-Wells. Die Zahlen im unteren Teil geben die Konzentration in mM an.

● : Referenz-Wells für Fluoreszenzfarbstoff (Leerwert).

○ : Mit PBS gefüllte Wells.

Ko = Kontrolle

Die Konzentrationsbereiche der untersuchten Substanzen wurden in Vorversuchen ermittelt. Zunächst wurden die Substanzen im Bereich von 5-1 mM an 3T3 Zellen getestet, um einen Anhaltspunkt für die Zytotoxizität der jeweiligen Substanz zu erhalten. Zur genaueren Ermittlung der ED₅₀ wurde nach diesen Vorversuchen der engere Konzentrationsbereich ausgewählt, in dem in etwa eine 50%ige Wachstumshemmung zu erwarten war. Innerhalb dieses ermittelten Konzentrationsbereichs wurden dann die Zytotoxizitätstests an den primären Zellen durchgeführt.

Die Inkubationszeit betrug 24 h für die 3T3-Zellen und 48 h für die primären Zellen. Mit den unterschiedlichen Behandlungszeiten sollte gewährleistet sein, daß die Zellen den Substanzen mindestens eine Generationszeit lang ausgesetzt wurden.

2.12.4 Messung mit dem Hoechst-Farbstoff H 33342

Für die Hoechst 33342-Stammlösung wurde 1 mg /ml Aqua bidest gelöst. Diese ist bei 4°C ca. 2 Wochen haltbar. Für den Testansatz wurde die Stammlösung 1:100 mit frischem temperiertem Wachstumsmedium verdünnt.

Nach der Inkubation der Testsubstanzen wurde das Medium ausgeschüttelt, pro Well 100 µl von der Hoechst H 33342-Inkubationslösung mit einer 8-Kanalpipette zugegeben und die Platte bei 37°C im Brutschrank für 30 min inkubiert. In den Referenzwells für den Fluoreszenzfarbstoff (Leerwert) wurde die PBS Lösung durch Medium mit Farbstoff ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte wiederum ausgeschüttelt und einmal mit PBS (100 µl/Well) gewaschen, um Farbstoffreste und Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden die Wells wieder mit 100 µl PBS gefüllt. Die Platte wurde dann bei einer Exzitation von 360 nm (40 nm Streubreite) und einer Emission von 460 nm (40 nm Streubreite) bei einer Sensitivität von 6 im Cytofluor 2350 (Millipore, Bradford, MA, USA) gemessen.

2.12.5 BCECF-AM-Assay

Zeitgleich mit der Messung des Hoechstfarbstoffes kann die Membranintegrität der Zellen mit Hilfe des Farbstoffes BCECF-AM bestimmt werden. Eine gegenseitige Beeinflussung der Meßergebnisse durch den parallelen Einsatz beider Substanzen wurde durch Vorversuche ausgeschlossen.

BCECF-AM wurde in DMSO (2 mg/ml) gelöst. Diese Lösung ist bei -20 °C über mehrere Monate haltbar. Zum Gebrauch wurde diese Lösung 1:200 mit den entsprechenden Wachstumsmedien, die auch den Hoechst-Farbstoff beinhaltet, gemischt. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.12.4 beschrieben, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz wurde bei einer Exzitation von 485 nm (Streuung des Filters 20 nm), einer Emission von 530 nm (bei einer Streuung des Filters von 25 nm) und einer Sensitivität von 4 durchgeführt.

2.12.6 Auswertung

Zur Auswertung aller Fluoreszenzmeßwerte wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 5.0 verwendet. Die nach Ablauf der Testzeit gemessenen Fluoreszenzwerte, die daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 6 Wells der einzelnen Konzentrationsstufen bzw. Verdünnungen wurden tabellarisch zusammengestellt und sind im Ergebniss als Mittelwert und die Abweichungen als Balken graphisch dargestellt. Von jedem Meßwert der Mikrotiterplatte wurde zunächst der Mittelwert des Hintergrundes (Leerwert) abgezogen. Der Leerwert, bestehend aus Farbstoff ohne Zellen, dient der Berichtigung der Eigenfluoreszenz der Platte und des Farbstoffes. Anschließend wurde die Wachstumshemmung in Prozent zu der Kontrolle (100%) gesetzt.

$$\text{Hemmung des Wachstums in Prozent} = \frac{\text{Fl}_P - \text{MW Leerwert}}{\text{MW}_K - \text{MW Leerwert}} \times 100$$

Fl_P = Fluoreszenzwert der eingesetzten Konzentration der Probe

MW_K = Mittelwert Kontrolle (100%)

Aus den jeweils sechs Werten pro Konzentrationsstufe wurde anschließend der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Wachstumsbeeinflussung wurde graphisch dargestellt.

2.12.7 Berechnung der ED₅₀ und statistische Auswertung der Daten

Die Berechnung der ED₅₀ wurde mit dem Computerprogramm Inplot 4.0 vorgenommen. Dazu wurde aus den sechs Wells für jede Konzentrationsstufe der ermittelte Mittelwert aus den sechs Wells zur Berechnung eingegeben. Je nach Verlauf der Kurve wurde eine lineare Regression oder eine sigmoide Berechnung der ED₅₀ angewendet.

Die endgültige Berechnung der ED₅₀ und die statistische Auswertung erfolgte dann aus den Mittelwerten von mindestens drei einzelnen Plattenmessungen, so daß eine ausreichende Anzahl von Messungen zur Verfügung stand. Im Ergebnisteil ist die ED₅₀ als Mittelwert aus drei Messungen und die dazugehörige Standardabweichung angegeben.

2.13 Relative Bestimmung des Proteingehaltes mit Sulforhodamin 101

Direkt nach der Messung mit den Fluoreszenzfarbstoffen H 33324 und BCECF-AM wurden die angehefteten Zellen 2 x mit PBS (100 µl/Well) gründlich gespült, um das proteinreiche FKS aus dem Well zu entfernen. Die Zellen wurden mit einer Lösung von 90% Ethanol, 5% Essigsäure und 5% H₂O für 30 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt, 50µl/Well der Sulforhodamin 101 Lösung (0,05% Sulforhodamin 101 in einer 1%igen Essigsäurelösung) dazupipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet sich das Sulforhodamin an das Protein. Anschließend wurden die Platten zweimal mit H₂O gewaschen und kräftig ausgeschüttelt, um das überschüssige Sulforhodamin zu entfernen. Das an die Zellen gebundene Sulforhodamin 101 wurde danach mit 100µl einer 10 mM Tris/Aqua dest.-Lösung (pH 10,5) in Lösung gebracht.

Dabei war darauf zu achten, daß die Platte gut geschüttelt und der Farbstoff homogen verteilt wurde.

Die Messung erfolgte im Cytofluorgerät 2350 mit der Filterkombination C/D, bei einer Emission von 530 nm und einer Exzitation von 620 nm bei einer Sensitivität von 2. Die Berechnung der Wachstumshemmung erfolgte wie in Kapitel 2.12.6. beschrieben.

2.14 Zellzählung mittels Coulter Counter

Zur Überprüfung der Veränderung des Volumengehaltes bei K 562-Zellen unter dem Einfluß von den Testsubstanzen wurde uns ein Meßsystem der Fa. Coulter Counter (Krefeld) zur Verfügung gestellt. Dieses System besteht aus einer Meßzelle, einem Channelanalyser und der Auswertungssoftware ZM-Soft.

Die K 562-Zellen wurden zu 5×10^4 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und gleich nach der Aussaat mit den zu untersuchenden Substanzen in einer Konzentrationsreihe behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit einer Pipette suspendiert und 1:20 in einer isotonischen Lösung (Isoterge) verdünnt. Diese Suspension wurde mit dem Coulter Counter gemessen. Der Durchmesser der Meßkapillare betrug 100 µm, der Meßbereich lag im Bereich von 1,91 µm bis 15,28 µm Durchmesser bei einer Auflösung von 256 Kanälen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ZM-Soft.

2.15 Durchführung des *umu*-Mikrotest

Der *umu*-Test wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Georg Reifferscheid vom Arbeitskreis für Molekulare Mechanismen umweltbedingter Gentoxizität (AMMUG) der Universität Mainz durchgeführt.

2.15.1 Medien und Puffer

Für die Anzucht der Bakterien: **TGA-Medium:**

Bacto-Trypton (Difco)	10 g
Glucose	2g
NaCl	1g
Hepes	0,1M

Das Medium wurde auf pH 7 eingestellt und bei 212 °C 20 min autoklaviert. Vor dem test wurdem dem Medium 50 µl Ampicilin zugegeben.

2.15.2 Übernachtkultur und Vorkultur

Ein steriler Erlenmeyerkolben wurde mit 20 ml TGA Medium gefüllt und mit den zuvor aufgetauten Salmonellen beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Schüttelwasserbad bei 37°C und 120 Upm. Am nächsten Morgen wurde die Kultur, die mindestens eine OD₆₀₀ von 1 aufweisen sollte, mit TGA-Medium 1:10 verdünnt. Dieser Ansatz wurde für weitere 1,5 h im Schüttelwasserbad bei 37°C bis zum Erreichen der OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert.

2.15.3 Ansatz der Testkultur und der Verdünnungsreihen

96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit 180µl TGA-Medium beschickt. Dabei wurden die ersten drei Wells pro waagerechter Reihe ausgespart. In diese Wells kamen 360 µl TGA-Medium, die 3µl einer in DMSO gelösten Testsubstanz enthielten. Die Konzentration der in DMSO angesetzten Stammlösungen betrug 1-2 M. Die Verdünnungsreihe wurde daraus wie folgt angesetzt: von den Wells mit der Ausgangskonzentration wurden 180 µl abgenommen und in die mit TGA-Medium gefüllten Wells gegeben und gründlich durchgemischt. Von dieser 1/2-Verdünnung wurde eine weitere Verdünnungsstufe hergestellt; bis 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/124, 1/256-Verdünnungsreihen entstanden. Für die Positivkontrolle wurde eine 3%ige 4-NQO-Lösung (Nitrochinolin-N-oxid) verwendet.

Der Test wurde mit der Zugabe von 65 µl Bakteriensuspension gestartet. Die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte auf einem 45 Grad schräggestellten Rotor. In dieser Position wurden die Bakterien bei ca. 10-12 Upm für 2 h bei 37°C inkubiert. Durch den schräggestellten Rotor wurde eine gute Durchmischung der Kultur mit Sauerstoff erreicht und ein Absetzen der Bakterienkultur verhindert.

Nach Ende der Inkubationsphase wurden 30µl der Salmonellenkultur in eine mit 270 µl TGA-Medium gefüllte zweite Mikrotiterplatte gefüllt und wiederum für 2 h auf dem Rotor inkubiert.

2.15.4 Messung des Wachstums

Die Messung des Wachstums erfolgte mit Hilfe eines Plattenphotometers bei einer OD_{600} gegen Medium-Leerwert.

2.15.5 Bestimmung der Induktion des *umuC*-Gens

Etwa 10 min. vor Ende der zweiten Inkubation wurden die Medien bereitgestellt. Vor dem Enzymtest wurden in eine dritte Mikrotiterplatte 120 μ l B-Puffer pipettiert und bei 28°C vortemperiert.

30 μ l der Salmonellen-Suspension pro Well wurden aus der zweiten Mikrotiterplatte in die Wells der dritten Platte pipettiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 30 μ l einer ONPG-Lösung gestartet und kräftig gemischt. Die Platte wurde für 30 min. bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 120 μ l Na_2CO_3 Lösung gestoppt. Der Inhalt der Wells wurde gut gemischt, Blasen wurden mit Hilfe eines kalten Luftstromes (Föhn) entfernt.

B-Puffer :

Puffer zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der β -Galaktosidase

$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	20,18 g	110 mM
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	5,5 g	40 mM
KCl	0,75 g	10 mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,25 g	1 mM
SDS	1,0 g	3,5 mM
β -Merkaptoethanol	2,7 ml	40 mM
ad 1 L pH 7,0		

ONPG-Lösung:

45 mg o-Nitrophenyl- β -d-Galaktopyranosyd/ml Phosphat Puffer.

Phosphat-Puffer

Puffer zum Lösen des Substrates ONPG

0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Der pH wurde durch Mischen beider Lösungen auf 7,0 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

Stoppreagens

1M Natriumcarbonat (Na_2CO_3) in bidest. Wasser.

Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 420 nm.

2.15.6 Gültigkeitskriterien und Testauswertung

Die nach Ablauf des Testes gefundenen Meßwerte wurden gespeichert und mit einem Tabellenkalkulationsprogramm ausgewertet.

Der Test wurde als gültig erachtet, wenn die Positivkontrolle (5×10^{-5} g/l NQO) bei den gegebenen Testbedingungen eine Induktionsrate von 2 erreichte.

Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität

Die gemessenen Extinktion- und Trübungsdaten wurden für die einzelnen Konzentrationsstufen zur Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität herangezogen.

Zur Berechnung der Enzymaktivität in Units wurde die Formel von Miller (1972) zugrunde gelegt und auf das Mikrotiterplattensystem modifiziert. Von jedem Meßwert wurde der Mittelwert des Hintergrundes abgezogen. Die Errechnung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Unit} = \frac{E_{420}}{t \times v \times \text{OD}_{600} \times m}$$

E_{420}	Extinktion des gebildeten <i>o</i> -Nitrophenol bei 420 nm
OD_{600}	Trübung bei 600 nm, Meßwert für die Zelldichte
t	Reaktionszeit in min (30 min)
v	eingesetztes Bakterienvolumen in ml (0,03 ml)
m	Steigung der Eichgeraden (0,012 mM/Ansatz) mit <i>o</i> -Nitrophenol

1 Unit entspricht der Enzymaktivität, die zur Bildung von 1 mM *o*-Nitrophenol pro Minute pro ml Salmonellen Suspension bei 28°C führt.

Eine Erhöhung der Enzymaktivität in den Ansätzen mit den Testsubstanzen gegenüber der Negativkontrolle zeigte eine erhöhte Genotoxizität und damit ein erhöhtes mutagenes Potential an.

2.16 DNA-Synthese-Inhibitions-Test (DIT-Test)

Der DNA-Synthese-Inhibitionstest wurde von Herrn Dr. Jürgen Heil entwickelt. Der Test wurde am Arbeitskreis Molekulare Mechanismen umweltbedingter Genoxizität (AMMUG) an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz durchgeführt (Heil und Reifferscheid, 1992; Heil et al. 1996).

HeLa S3-Zellen wurden in Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM)-Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 mg/l Kanamycin bei 37°C kultiviert.

Die Zellen, die als Monolayer wachsen, wurden nach dem Trypsinieren in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Well ausgesät. Nach der Anheftungszeit von mindestens 16 h wurden die Zellen dem zu testenden Agens für 90 min exponiert. Die Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Substanzen wurde genauso wie im *umu*-Test (Kapitel 2.15.3). hergestellt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit frischem Medium folgte eine Erholungsphase von zwei Stunden, um allgemeintoxische von

gentoxischen Effekten zu unterscheiden. DNA-synthetisierende Zellen wurden daraufhin mit 20 μM eines Thymidinersatzes, dem 5-Bromdesoxyuridin (BrdU) für 60 min inkubiert. Diese Substanz wurde selektiv in DNA-synthetisierende Zellen eingebaut. Nach dieser Zeit wurden die Zellen für 30 min. mit einem Gemisch aus Ethanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis (90/5/5%) fixiert. Anschließend wurde die DNA mit 4N HCl für 10 min denaturiert. Das überschüssige HCl wurde durch 3-maliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. In jedes Well wurde eine 1:1500 verdünnte Lösung eines anti-BrdU-Antikörpers in einer Mischung von 50%-Schafserum und PBS/Tween 20 (0,5%) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde der überschüssige Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Leitungswasser unter einem weichen Wasserstrahl entfernt. Anschließend wurden 50 μl /Well einer 1:500 verdünnten Lösung eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers F(ab')₂ (Schaf-anti Maus IgG-Antikörper) in einer Lösung von 10% Schafserum, 90% PBS/0,5% Tween 20 für 30 min zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach erneutem mehrmaligen Auswaschen des sekundären Antikörpers mit Leitungswasser erfolgte die Zugabe von 100 μl Peroxidase-Lösung (300 mg OPD[*o*-Phenylendiamin]/100 ml 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5 + 0,015% H₂O₂). Die Platten wurden dann bei Raumtemperatur für ca. 30 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 μl einer Lösung von 1M H₂SO₄ gestoppt. Mit einem Plattenphotometer wurde die Extinktion bei 495 nm gemessen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch den Proteinfarbstoff Sulforhodamin B (SRB, 0,1g SRB/l H₂O 1% Essigsäure). Die Messung des chromogenen Sulforhodamin B wurde bei 546 nm durchgeführt.

Bei einer gentoxischen Reaktion des zu testenden Agens kam es zu einem verringerten BrdU-Einbau in die DNA und somit zu einer verringerten Reaktion des OPD, d.h. die DNA-Synthese war gehemmt.

Die DNA-Synthese unbehandelter Zellen (Negativkontrolle) wurde gleich 100% gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Anzucht der einzelnen Zelltypen

Die für die Zellkultur benötigten humanen primären Fibroblasten wurden aus Biopsien der Gingiva und des Pulpagewebes angezüchtet.

Die Biopsien wurden verworfen, wenn sich nach einer Woche keine aus den Biopsien ausgewachsenen Fibroblasten am Flaschenboden zeigten, oder wenn sie bakteriell kontaminiert oder verpilzt waren. Beim Anwachsen der Zellen aus Gingivabiopsien wurden vereinzelt Epithelzellen neben den Fibroblastenzellen beobachtet. Diese Zellen waren jedoch nach der ersten Passagierung verschwunden. Zudem wurde durch die Zugabe von NaCO_3 in das Medium und die dadurch bedingte Alkalität das Wachstum von Epithelzellen erschwert (Michl, 1971).

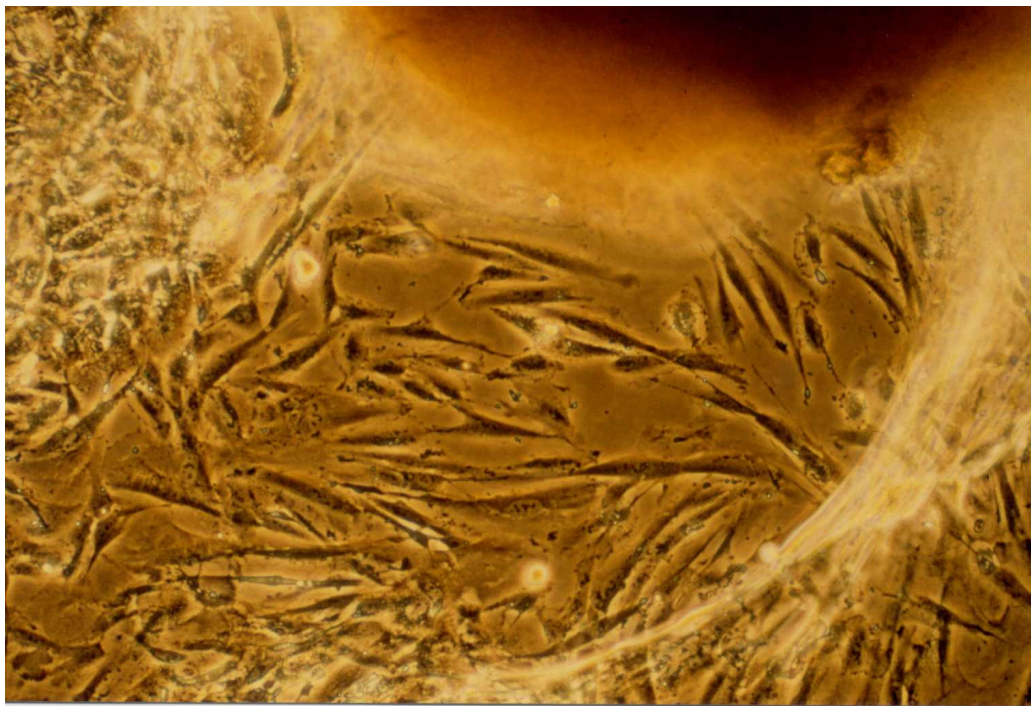


Abb. 4: Gingivabiopsien mit ersten angehefteten Fibroblasten. Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400 x

In der Regel konnte nach der Anheftung der Explantate von Gingiva- bzw. Pulpagewebe an den Flaschenboden nach etwa 2 Tagen am Rand des Explantates das Auswachsen der ersten Fibroblasten beobachtet werden. Die Zellen erschienen klar, wenig granuliert und zeigten schon die für die Vorwärtsbewegung typischen Plasmasäume. Nach etwa drei weiteren Tagen waren kleine, inselartige Zellrasen zu erkennen. Die Zellen lagen meist schon dicht beieinander und zeigten eine regelmäßige Ausrichtung (siehe Abb. 4). Die Abbildung 4 läßt erkennen, daß sich die Gingivafibroblasten nach einigen Tagen erfolgreich an den Flaschenboden angeheftet hatten. Von diesen einzelnen Zellen aus bildete sich dann nach einigen Tagen ein Zellrasen, der schließlich den gesamten Flaschenboden bedeckte und anschließend zur Weiterkultivierung trypsinisiert wurde. Die langgestreckten, spindelförmigen Zellen ordneten sich meist an ihrer Längsseite an. Nach weiteren 7-14 Tagen konnte die erste Passagierung der Zellen, wie in Kapitel 2.10 beschrieben, erfolgen. Für die Versuche wurden nicht die Zellen, die direkt aus der ersten Passage gewonnen wurden verwendet, sondern diejenigen Zellen, die nach Kapitel 2.10 aufgetaut worden sind. Dadurch wurde gewährleistet, daß die Zellen ein möglichst einheitliches Erscheinungsbild zeigten und keine Epithelzellen mehr vorhanden waren. Die Gewinnung der Wurzelhautfibroblasten erfolgte durch Trypsinierung der Zahnwurzel, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben und führte meist nach 1-3 Tagen zur Ausbildung eines Zellrasens.

3.1.2 Das Wachstumsverhalten von primären Zellen

Um das Proliferationsverhalten der primären Zellen zu untersuchen, wurden Wachstumskontrollen von allen primären Zellarten durchgeführt (siehe 2.11.1). Die Zellen zeigten meist bis zur achten Passage ein etwa gleichförmiges Wachstumsverhalten.

Zum Anfang zeigten die Wachstumskurven der primären Zellen gegenüber der 3T3-Zellkultur eine deutlich längere Anheftungszeit und lag-Phase. Die Verdopplungszeit der Zellen lag bei etwa 43-48 h und betrug somit mehr als das Doppelte der Verdopplungszeit der 3T3-Zellen.

Etwa 24-48 h nach der Aussaat waren die primären Zellen in der logarithmischen

Wachstumsphase. Der BrdU-Einbau lag bei den Wurzelhautfibroblasten bei etwa 40% der markierten Zellen und nahm im Verlaufe der Passagenzahl kontinuierlich bis unter die Nachweisgrenze ab. Für die Bestimmung der Zytotoxizität sollte gewährleistet sein, daß sich die Zellen in der Wachstumsphase befanden. Nach etwa 120 h Inkubation hatten die Zellen den Flaschenboden vollständig bewachsen und befanden sich im subkonfluenten Zustand. Dabei verringerten sie das Wachstum bis zum Stillstand (siehe Abb. 5). Zellen in höheren Passagen wiesen oft Degenerationserscheinungen auf. Während Zellen jüngerer Passagen große strukturierte Zellkerne und ein klares Zytoplasma besaßen, zeigten die Zellen in höheren Passagen meist eine starke Vakuolenbildung. Degenerierte Zellen zeigten pyknotische Kerne und begannen sich aus dem Zellrasen zu lösen (siehe Abb.6). Zunehmend verloren die Zellen die Fähigkeit, sich an den Flaschenboden anzuheften. Diese Zellen lösten sich dann aus dem Verband und wurden beim nächsten Mediumwechsel mit abgesaugt und entfernt.

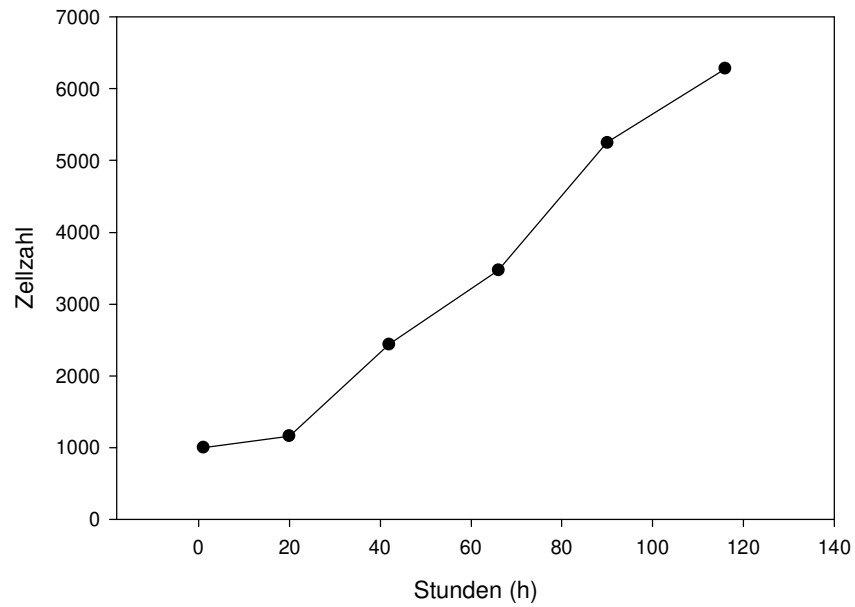


Abb. 5: Wachstumskurve von Gingivafibroblasten der 4. Passage

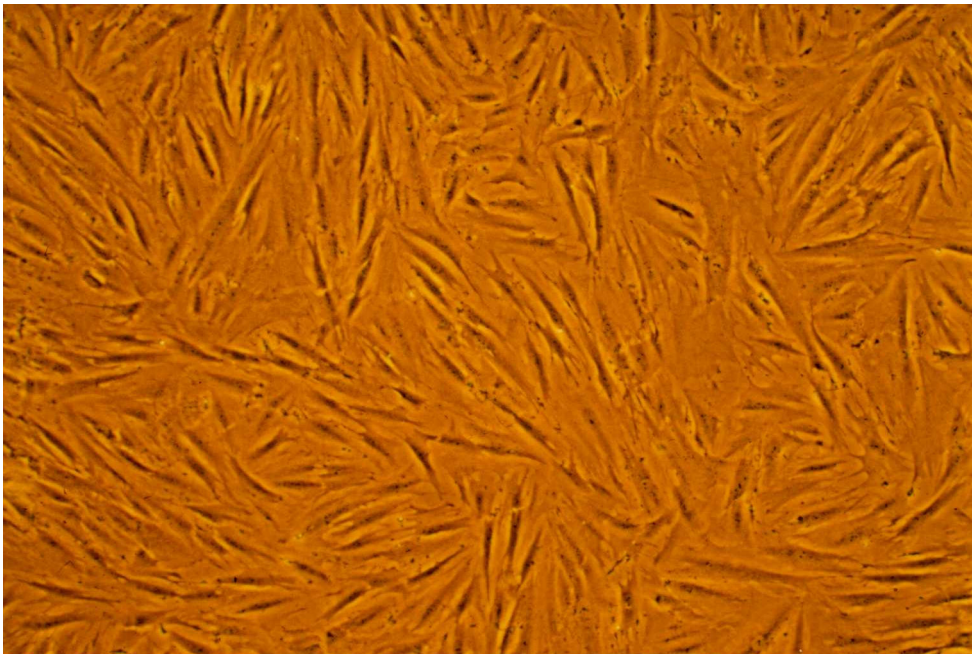


Abb. 6: Gingivafibroblasten der 4. Passage. Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400 x

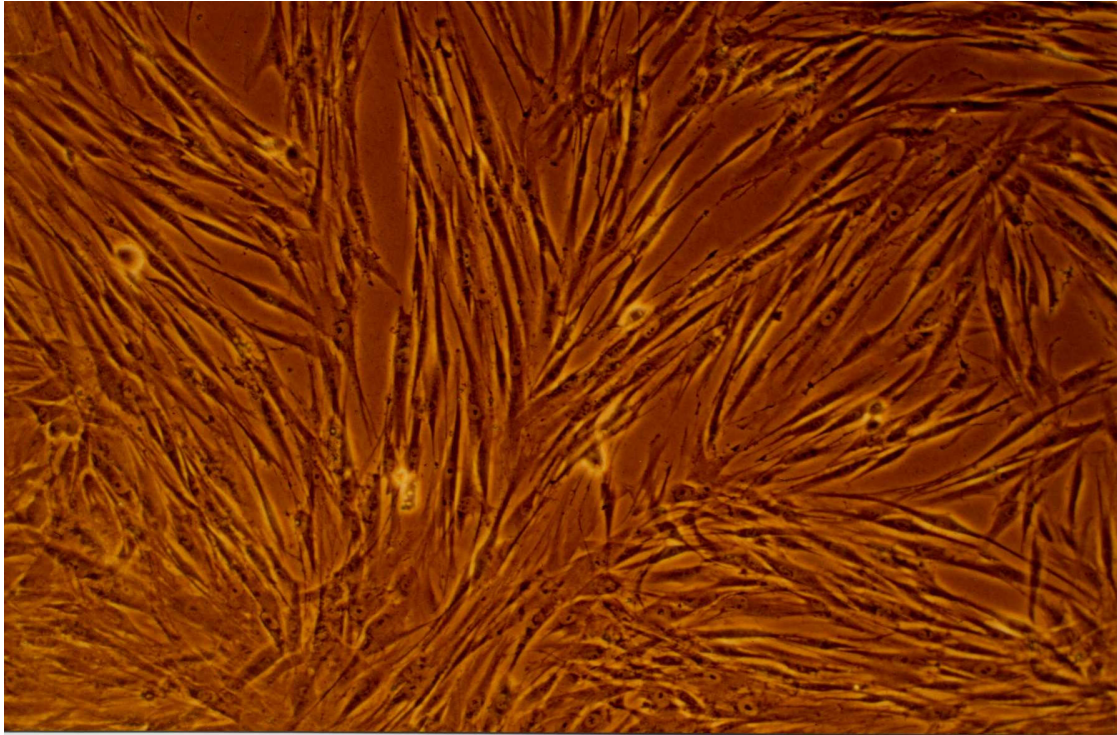


Abb. 7: Gingivafibroblasten der 10. Passage. Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400x

Die Morphologie der Zellen veränderte sich kontinuierlich von Passage zu Passage. Zunächst waren die Zellen in den Passagen 2-6 fest im Zellverband eingeschlossen und wiesen noch viel Plasmamaterial auf. Mit höherer Passagenzahl waren die Zellen im Gegensatz dazu wesentlich langgestreckter und wiesen mehr Zellvolumen aufgrund der beginnenden Vakuolisierung auf. Auch das Proliferationsverhalten veränderte sich. Während in den jüngeren Passagen etwa 24-48 h nach Aussaat das Wachstum begann, verzögerte sich der Beginn des Wachstums bei Wurzelhautfibroblasten auf über 90h in der 10. Passage (Kapitel 3.6.2). Bei den Pulpa- und Gingivafibroblasten zeigte sich ein sehr ähnliches Verhalten des Wachstums. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen dieselbe Biopsie in Passage 4 und Passage 10.

Die Zellen der 4. Passage wiesen einen gut entwickelten Fibroblastenrasen und eine normale Morphologie auf. Der Zellrasen war gleichmäßig dicht gewachsen. Die Zellen der 10. Passage befanden sich dagegen in einem Stadium der Degeneration. Sie wuchsen vereinzelt und wiesen gegenüber den Fibroblasten der 4. Passage eine wesentlich langgestrecktere Gestalt auf. Desweiteren zeigten die Zellen eine starke Vakuolisierung auf. Basierend auf diesen Beobachtungen der Zellveränderung wurden für die ED₅₀-Bestimmungen nur Zellen bis zur neunten Passage verwendet. Im

Einzelfall ließen sich jedoch durchaus auch höhere Passagen für den Toxizitätstest verwenden. Daher wurden alle für die Testung verwendeten Zellen auch immer nach den morphologischen Kriterien bewertet.

3.1.3 Das Wachstumsverhalten von 3T3 Zellen

Die 3T3-Zellen hefteten sich nach dem Trypsinieren nach etwa 3-4 h am Flaschenboden an. Nach 24 h hatten die Zellen ihre stationäre Phase beendet und begannen zu proliferieren. Das zeigte sich auch in der Anzahl markierter Zellen (siehe 2.11.3). Etwa 60% der Fibroblasten waren nach dieser Zeit markiert. Die 3T3-Zellen wuchsen sehr schnell, so das etwa alle 2 Tage die Zellen trypsiniert werden mußten. Für die 3T3-Zellkultur wurde eine Zellverdoppelungsrate zwischen etwa 17-19 h bestimmt. Die 3T3 Zellen zeigten auch nach über 150 Passagen keinerlei morphologische Veränderungen oder Abweichungen der Verdoppelungszeit. Auch eine Veränderung der Anheftungszeit sowie eine Änderung der Empfindlichkeit gegenüber den Substanzen konnte nicht festgestellt werden. Die Zellen wurden bis zur 150. Passage für Testungen benutzt, danach wurden Zellen früherer Passagen für die ED₅₀-Bestimmung verwendet.

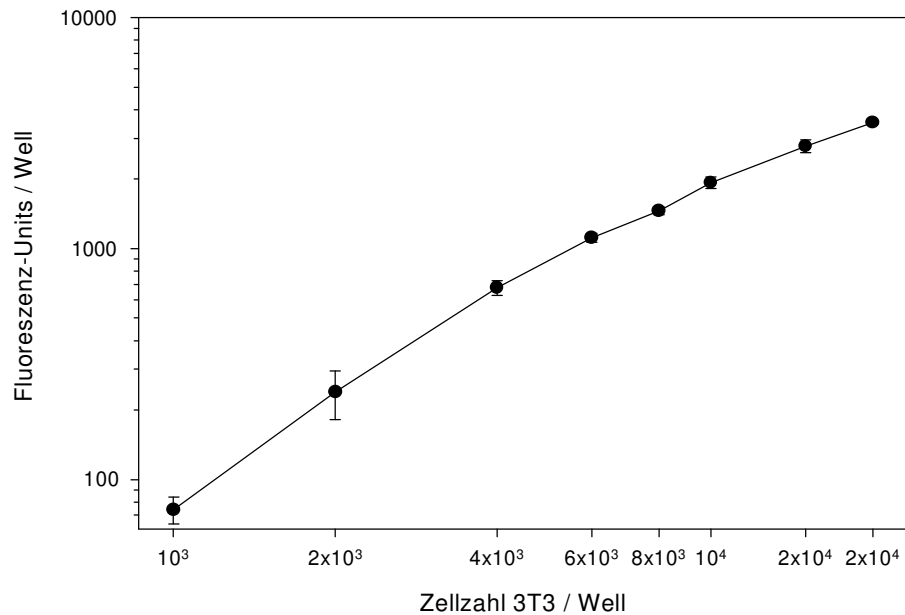


Abb. 8: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Zellzahl/Well

3.1.4 Einfluß des DMSO auf das Proliferationsverhalten der Zellen.

Da die meisten der getesteten Substanzen nicht oder nur schlecht wasserlöslich sind, wurde als Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Von diesem Lösungsmittel ist bekannt, daß es in höheren Konzentrationen toxisch wirken kann. Deshalb wurde zunächst der Einfluß von DMSO auf 3T3- und die primären Zellen geprüft. Die Zellen wurden in einer Anzahl von 1×10^4 /Well ausgesät und nach 24 h (3T3) bzw. 48 h (primäre Zellen) mit verschiedenen Konzentrationen an DMSO behandelt. Der Versuch wurde insgesamt 3x durchgeführt. Es zeigte sich bei den 3T3 und den primären Zellen ein einheitliches Bild. Die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen setzte bei etwa 1,25 % (v/v) ein. In den ED₅₀-Versuchen wurde daher nur bis zu einer Endkonzentration von 1 Vol. % DMSO eingesetzt. Die Abbildung 9 zeigt exemplarisch den Einfluß auf verschiedene Zellarten nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO.

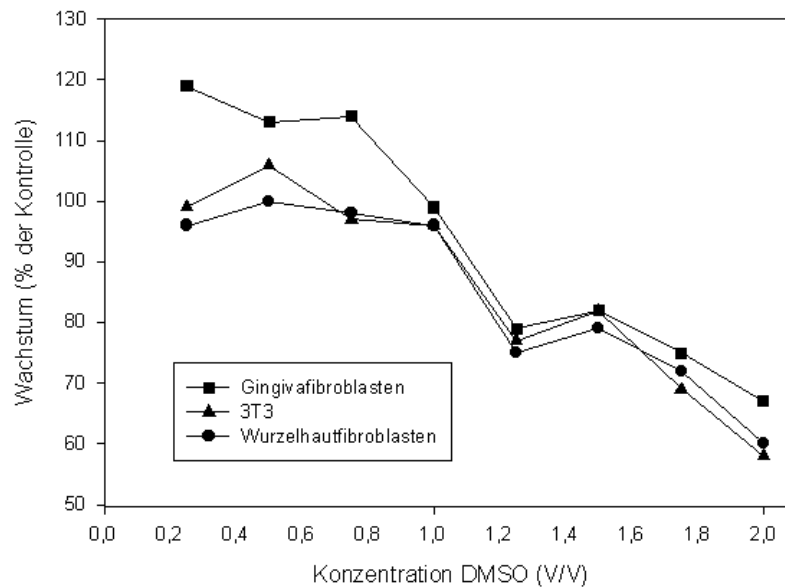


Abb. 9: Einfluß von DMSO auf das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zellen nach 24 h (3T3) bzw 48 h (primäre) Inkubation mit DMSO (n=2)

3.2 Die Messung der Zytotoxizität mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Messung des Zellwachstums erfolgte über Fluoreszenzfarbstoffe. Die Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe waren so unterschiedlich, daß die Farbstoffe parallel mit den passenden Filtern in derselben Platte gemessen werden konnten.

Vergleichende Messungen erbrachten keinerlei Quencheffekte von BCECF-AM auf die H 33342- und H 33258-Messungen und umgekehrt. Ebenso konnte die Proteinmessung mit Sulforhodamin 101 ohne Beeinflussung durch die vorangegangene Markierung der anderen Farbstoffe erfolgen. Die Eigenfluoreszenz (Blanc) der Platten betrug bei H 33342 etwa 800 Einheiten, bei BCECF- AM etwa 400

Einheiten und bei Sulforhodamin 101 etwa 80 Einheiten bei der jeweiligen eingestellten Empfindlichkeit des Gerätes.

Die Zellen selbst besaßen eine vernachlässigbare Eigenfluoreszenz von nur etwa 20 Fluoreszenzeinheiten bei H 33342, die in der Berechnung der ED₅₀ nicht berücksichtigt wurde.

Die 100%-Kontrolle der markierten Zellen im ED₅₀-Test betrug bei H 33342 nach Abzug des Leerwerts bei den Zellen etwa 2000 Fluoreszenzeinheiten, bei BCECF-AM im Durchschnitt etwa 4000 Fluoreszenzeinheiten und bei Sulforhodamin 101 etwa 3000 Fluoreszenzeinheiten. Damit ließen sich die ED₅₀-Werte mit hinreichender Genauigkeit ermitteln.

3.2.1 Die Messung der Zellzahl und des DNA-Gehaltes mit den Farbstoffen H 33342 und H 33258

Zur Ermittlung des DNA-Gehaltes mittels H 33342 und H 33258 wurde eine Eichreihe mit reiner DNA angelegt. Dazu wurde DNA (Sigma) im Bereich von 20-5000 ng/Well zugegeben und mit den beiden zugegebenen Farbstoffen bei einer Sensitivität von 6 gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt. Der Versuch wurde zweimal mit fast identischen Fluoreszenzwerten wiederholt.

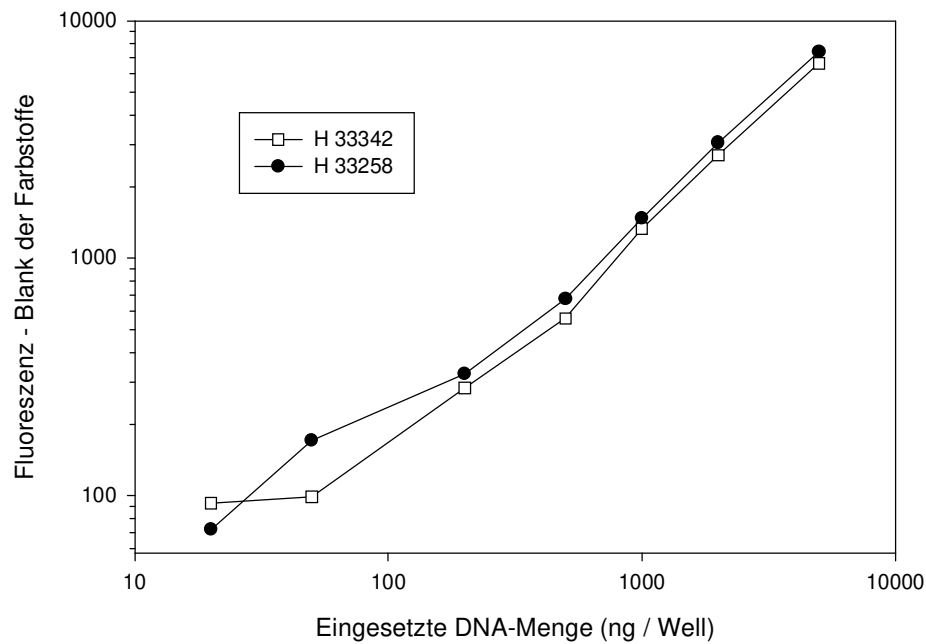


Abb. 10: Messung des DNA-Gehaltes durch Markierung mit den Bisbenzimidin H 33342 und H 33258 (n= Anzahl der Versuche =2)

Die Messungen mit reiner DNA zeigten für beide Farbstoffe eine sehr gute Linearität zwischen der eingesetzten DNA-Menge und der Fluoreszenz-Emission. Beide Farbstoffe eigneten sich somit gut für eine quantitative DNA-Bestimmung. Für die ED_{50} -Bestimmungen wurde jedoch H 33342 als Marker gewählt, da dieser Farbstoff ca. 1000-fach membrangängiger ist als der H 33258 und somit für die vollständige Markierung aller noch lebenden Zellen geeignet ist. Auch zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Fluoreszenzintensität mit der eingesäten Zellzahl (siehe Abbildung 11).

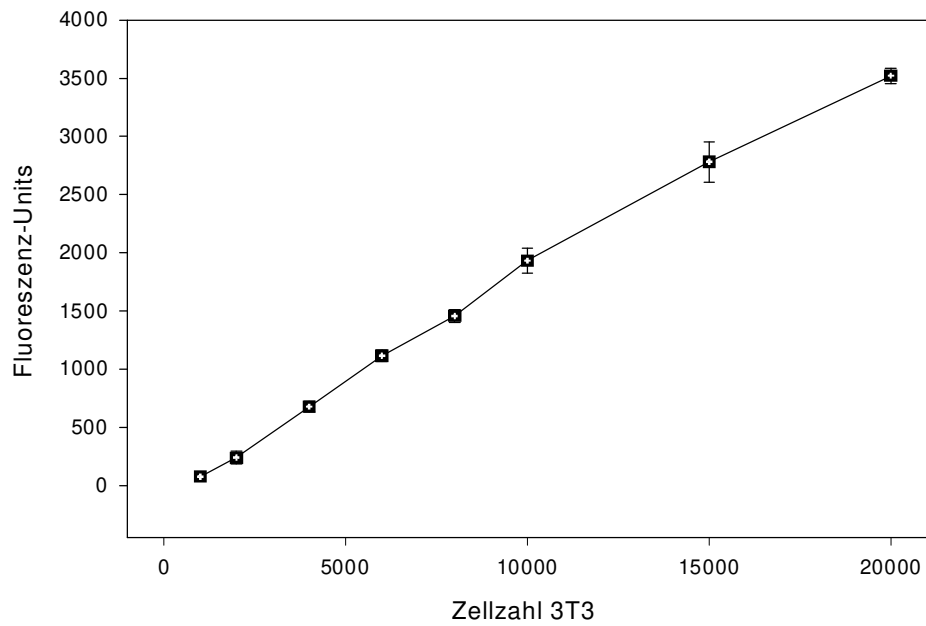


Abb.11: H 33342 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl bei 3T3-Zellen (n =Anzahl der Versuche 2x)

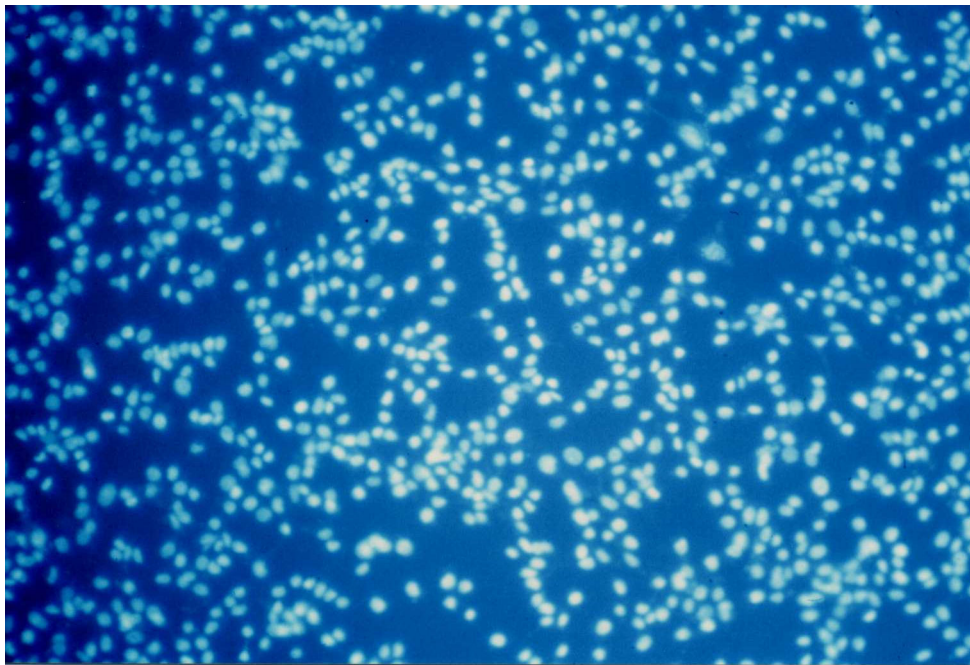


Abb. 12: 3T3-Zellen markiert mit H 33342 im Fluoreszenzlicht. Aussaat 1×10^4 /Well. Vergrößerung ca. 400 x

Parallel durchgeführte vergleichende Zellzählungen mit der Thomakammer und daraus errechneten Hemmraten in Prozent ergaben ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung mit aus der Fluoreszenzmessung erhaltenen Werten.

Einfluß des Monomers Bis-GMA auf das Wachstum von 3T3-Zellen. Vergleichende Messung mit H 33342 und H 33258

Mit den beiden Bisbenzimidin wurde der Lebend/Tot-Index an 3T3-Zellen unter der toxischen Wirkung von Bis-GMA bestimmt. Dazu wurden 3T3-Fibroblasten in zwei Mikrotiterplatten ausgesät und mit einer Verdünnungsreihe von Bis-GMA behandelt. Anschließend wurde je eine Platte mit H 33342 und mit H 33258 angefärbt. Da die Wells nicht vorher mit Ethanol behandelt wurden, wurden nur diejenigen Zellen mit H 33258 markiert, dessen Zellmembran schon soweit geschädigt war, daß der Farbstoff passiv eindringen konnte. Die 100%-Kontrolle der H 33342 Markierung wurde als Bezugsgröße für beide Farbstoffe gewählt.

Die Abbildung 13 zeigt exemplarisch das Ergebnis aus einem Versuch. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, mit gleichem Ergebnis. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.12.6 beschrieben. Die Streuungsmaße beziehen sich auf die Standardabweichungen innerhalb einer Testreihe, da bei jeder Konzentrationsstufe jeweils 6 Wells gleichzeitig getestet wurden. Die ermittelten Prozentwerte des Farbstoffes H 33342 beziehen sich auf die 100%-Kontrolle des H 33342. Der Farbstoff H 33258 markierte in der 100%-Kontrolle ca. 10 % der Zellen. Dies entspricht etwa dem 10%-Anteil von toten Zellen, die mit der Trypan-Blau-Färbung bei vitalen Kulturen markiert wurden.

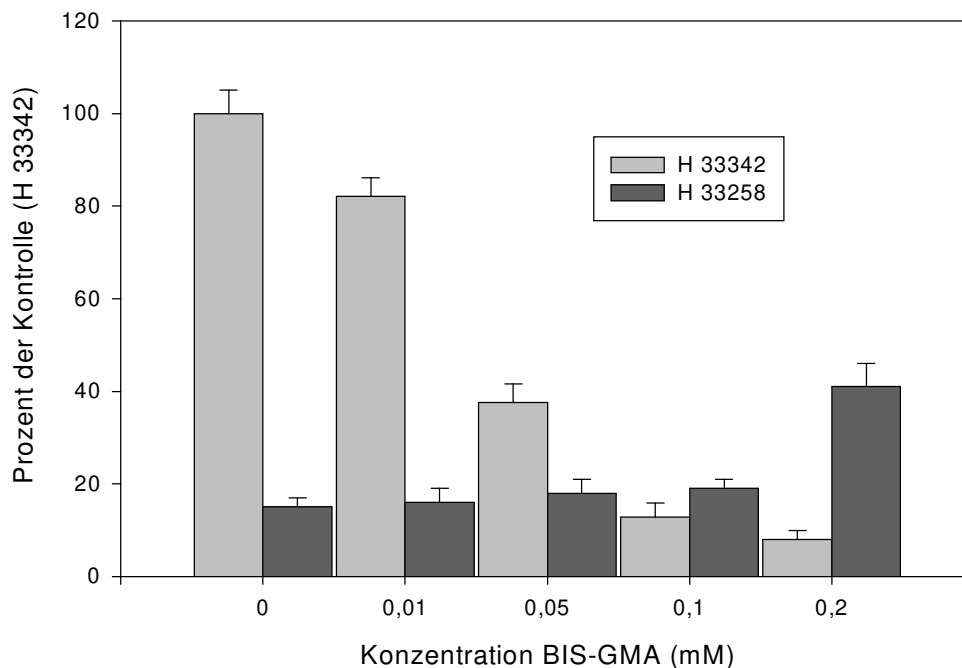


Abb. 13: Vergleich von H33342 und H33258 am 3T3-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von Bis-GMA. (Daten aus einem repräsentativen Experiment; n= 2, Erklärung im Text)

Mit steigender Konzentration des Bis-GMA nimmt der Anteil der mit dem Farbstoff H 33258 angefärbten Zellen zu, während die Lebendzellzahl in direkter Abhängigkeit mit der Konzentration von Bis-GMA abnahm. Somit konnte gezeigt werden, daß H 33342 im Rahmen dieser Versuchsanordnung nur lebende Zellen anfärbt. H 33258 zeigt dabei den Anteil von nicht lebensfähigen Zellen an, die sich noch am Boden der Mikrotiterplatten angeheftet hatten.

3.2.2 Messung der Membranintegrität mittels BCECF-AM

Die Messung der Membranintegrität konnte parallel zu der Hoechst-Farbstoffmessung erfolgen, da die Fluoreszenzwellenlängen für die einzelnen Farbstoffe unterschiedlich waren. Dabei erwies die Bestimmung der ED₅₀ mit BCECF-AM als nicht so genau wie der des H 33342, da die Standardabweichungen der Testreihen bei BCECF-AM meist

um etwa 5% höher lagen. Zudem wurde in Wells, in denen nachweislich keine intakten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten, gegenüber dem Leerwert erhöhte BCECF-AM Werte gefunden.

Die Abbildung 14 zeigt die Fluoreszenz im Verhältnis zu der eingesetzten Zellzahl bei 3T3-Zellen und Wurzelhautfibroblasten.

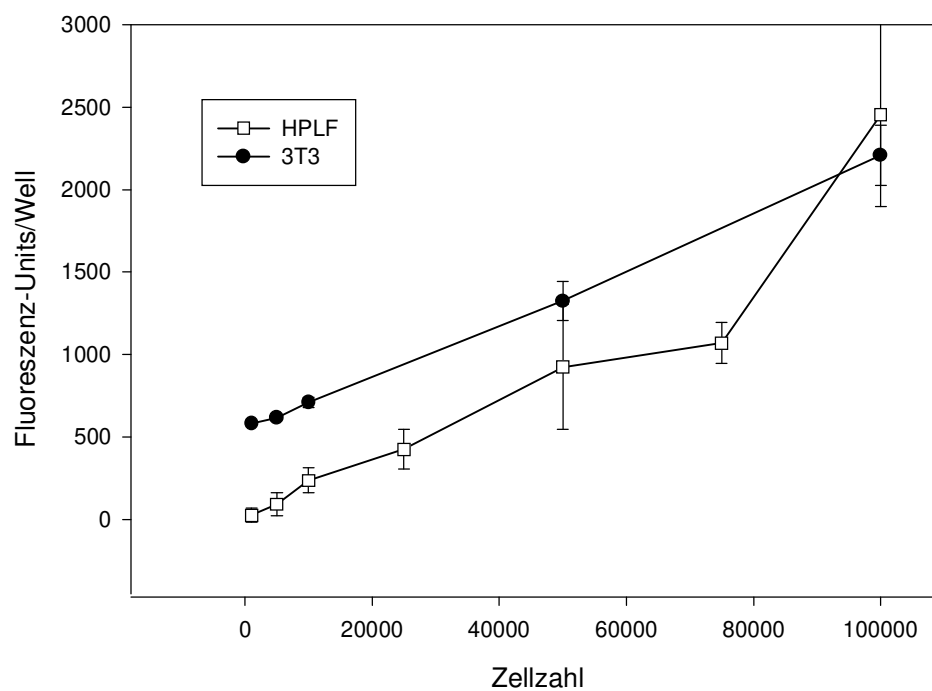


Abb. 14: Fluoreszenz von BCECF-AM in Abhängigkeit der Zellzahl von 3T3 und Wurzelhautfibroblasten

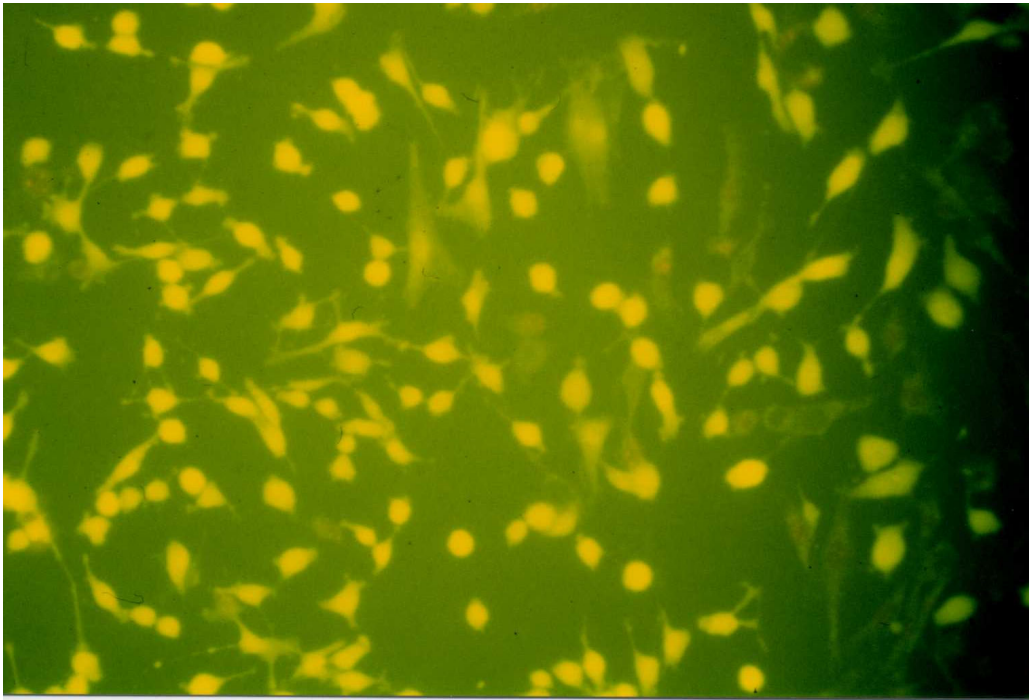


Abb.15: 3T3-Zellen nach 30 min. Inkubation mit BCECF-AM. Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Vergrößerung ca. 400 x

3.2.3 Bestimmung des relativen Proteingehaltes mit Sulforhodamin 101

Die Bestimmung des relativen Proteingehaltes mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin 101 zeigte eine ausgesprochen gute Linearität zur eingesetzten Zellzahl. Zur optimalen Markierung der Zellen wurden verschiedene Konzentrationen des Farbstoffes (0,1-0,01% (V/V)) eingesetzt. Die optimale Konzentration beträgt 0,05%. Eine höhere Konzentration des Sulforhodamin 101 bewirkte keine höhere Fluoreszenz (siehe Abb. 16). Mit dieser Methodik war es möglich, den relativen Prozentgehalt von Protein im Well im Vergleich zu einer 100% Kontrolle zu ermitteln.

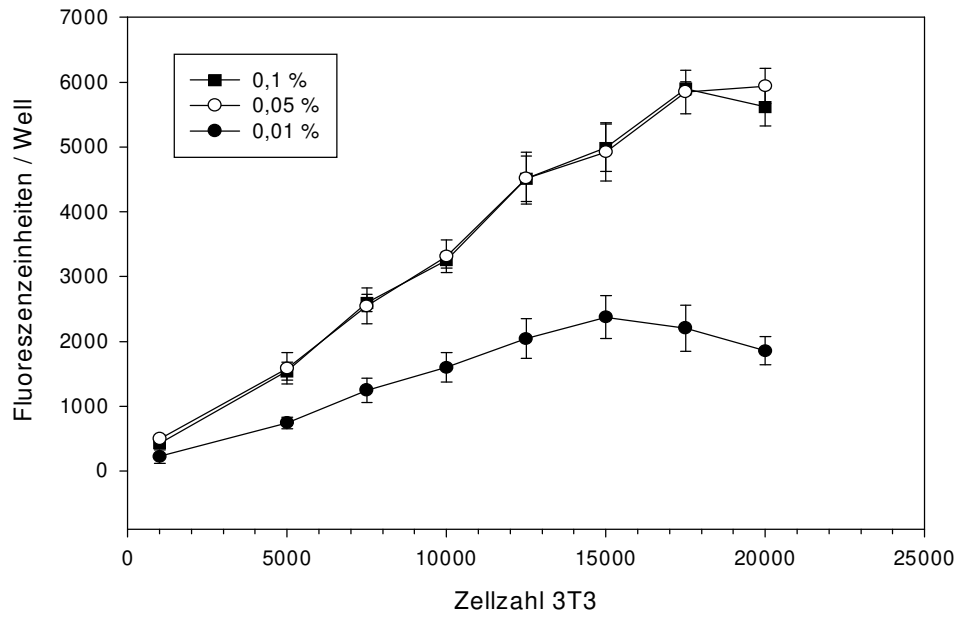


Abb. 16: Fluoreszenz bei unterschiedlicher Zellzahl und verschiedenen Konzentrationen des Farbstoffes Sulforhodamin 101

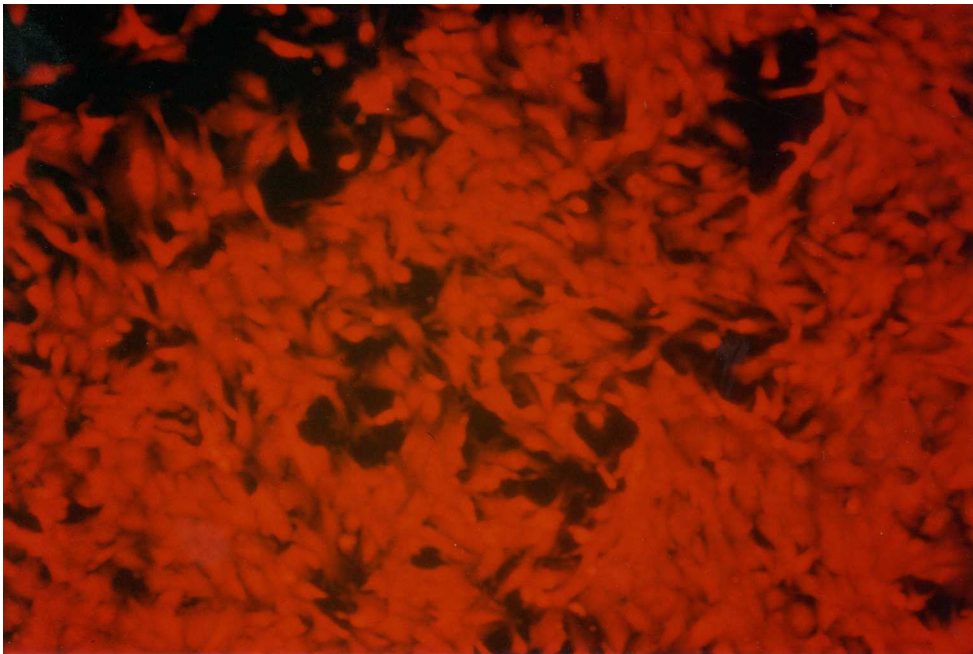


Abb. 17.: Markierte 3T3-Zellen mit Sulforhodamin 101. Aufnahme vor der Herauslösung des Farbstoffes mit Tris. Fluoreszenzaufnahme, Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400 x

3.3 Bestimmung der ED₅₀-Werte über den DNA-Gehalt und die Messung der Membranintegrität

Die ermittelten ED₅₀-Werte lagen bei den untersuchten Substanzen zwischen 0,06 mM und > 5mM. Keine Beeinträchtigung des Wachstums wurde bei der DMSO-Kontrolle im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gefunden.

Die Ergebnisse der ED₅₀-Bestimmung werden hier in den nachfolgenden Tabellen zu den einzelnen Stoffgruppen zusammengefaßt, so daß ein Überblick über die jeweilige Funktionsgruppe gegeben werden kann. Für jede Gruppe erfolgt eine kurze Einführung über die Funktion und Bedeutung dieser Gruppe. Für jeden einzelnen Stoff sind die bisher bekannten Nebenwirkungen aufgelistet. Falls bekannt, sind die LD₅₀-Werte aus Ratte oder Maus hinzugefügt. Die Nebenwirkungen, sowie die ED₅₀-Werte in der Tabelle sind entnommen aus der RTECS, der Registry of Toxic Effects des US Dept. of Health Human Services (NIOSH) (Lewis et.al., 1980). Testwerte, die unterhalb 15% der Kontrolle lagen, zeigten bei lichtmikroskopischer Betrachtung meist stark zerstörte Zellkulturen.

3.3.1 Monomere

Die Monomere gehören zu den Hauptbestandteilen der heutigen Füllungskunststoffe. Sie sind meist Bisphenol-A-Derivate, mit einer, zwei oder drei endständigen Doppelbindungen (Mono-, Di- und Trimethacrylate). Die Aushärtung der Methacrylate entsteht durch radikalische Polymerisation (Viohl et. al., 1986). Die Basismonomere können bis zu 30 Gew.% (70 Gew.% der organischen Matrix) eines Komposits ausmachen (Spahl, 1995). Die getesteten Monomere sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Die Ergebnisse der Monomere sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Die chemisch recht ähnlichen Basismonomere UDMA (06-0,47 mM), Bis-GMA (0,08-

0,14 mM) sowie Bis-EMA (0,1-0,16 mM) wiesen dabei die höchste Toxizität innerhalb dieser Gruppe auf.

Ebenfalls als sehr toxisch erwiesen sich TEGDMA (0,12-0,26 mM) und DEGDMA mit einer ED_{50} von etwa 0,2 mM. Bei TEGDMA reagierten die Wurzelhautfibroblasten mit 0,12 mM am empfindlichsten. Es konnte jedoch bei den einzelnen Zellkulturen kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Substanzen gefunden werden. Untersuchungen von Bis-GMA verschiedener Hersteller wiesen ebenfalls keinen Unterschied in der ED_{50} auf.

EGDMA zeigte dagegen bei den einzelnen Zelltypen unterschiedliche Resultate. Während die primären Zellen Werte von 0,46 mM (HGF) bis 1,7mM (HPLF) ergaben, ragt der ED_{50} -Wert bei 3T3 mit 2,31 mM deutlich heraus.

Bei DEGDMA liegen die ED_{50} -Werte bei den primären Zellen nah beieinander, jedoch lag der mit 3T3 ermittelte Wert mit etwa 0,07 mM deutlich unter denen der primären Zellen. Das Monomethacrylat HEMA (1,77-2,52 mM) zeigte wesentlich höhere ED_{50} -Werte auf als die getesteten Dimethacrylate, ebenso BEMA (1,93-4,1 mM). SIMA zeigte wie EGDMA eine höhere Toxizität für die primären Zellen. Der ED_{50} -Wert lag bei etwa 1,9 mM, während 3T3 mit 5,8 mM einen ca. dreifach höheren ED_{50} -Wert aufwiesen.

Bei 1,10 DDMA und 1,12 DDMA konnten die ED_{50} -Werte nicht mehr exakt bestimmt werden, da hier die Testansätze nur bis zu einer Konzentration von 5 mM durchgeführt wurden. Bei 5 mM konnte nur eine Wachstumsbeeinflussung von 70% der Kontrolle festgestellt werden, so daß eine Berechnung der ED_{50} nicht möglich war. Auch erwiesen sich diese Substanzen als relativ unlöslich in DMSO, so daß diese Werte nur unter Vorbehalt interpretiert werden können.

Die ED_{50} von MMA ließ sich nur sehr schwer bestimmen, da das Material bei 37°C im Brutschrank leicht flüchtig und daher kaum verlässlich zu bestimmen war. Auch das Abkleben der Versuchsplatten mit Klebeband brachte hier keine wesentliche Verbesserung.

Tab.4: Liste der getesteten Monomere und KomonomereLD₅₀ = Letale Dosis für 50% der Versuchstiere,

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Summenformel	Hersteller	Mg	Nebenwirkungen
MMA	Methylmethacrylat	C ₅ H ₈ O ₂	Kulzer	100	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 7872 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 150 mg
Bis-GMA	2,2-Bis{4-(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl}-Propan	C ₂₉ H ₃₆ O ₈	Kulzer	512	Reizend, kein Eintrag
Bis-MA	Bisphenol-a-Dimethacrylat	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	Kulzer	346	Reizend, kein Eintrag
Bis-EMA	Äthoxyliertes Bisphenol-A	C ₂₇ H ₃₂ O ₆	Kulzer	452	Unbekannt, kein Eintrag
UDMA	Urethandimethacrylat	C ₂₃ H ₃₈ N ₂ O ₈	Degussa	470	Reizend, kein Eintrag
HEMA	2-Hydroxyethyl-methacrylat: aus UDMA	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Röhm	130	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 5050 mg/kg
BEMA	Benzylmethacrylat	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	Röhm	176	Reizend, kein Eintrag
EGDMA	Ethylenglycoldi-methacrylat	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	Röhm	198	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 3300 mg/kg
DEGDMA	Diethylenglycoldi-methacrylat	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	Röhm	242	Unbekannt, kein Eintrag
SIMA	3-Trimethoxysilan-propylmethacrylat	C ₁₂ H ₂₀ O ₅ Si	Aldrich	248	Reizend, Auge Kanninchen 24 h 500 mg mild
TEGDMA	Triethylenglycoldi-Methacrylat	C ₁₄ H ₂₂ O ₆	Degussa	286	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 1083 mg/kg
1,10-DDMA	1,10-Decandioldi-methacrylat	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	Röhm	310	Unbekannt, kein Eintrag
1,12-DDMA	1,12-Dodecandi-methacrylat	C ₂₇ H ₃₂ O ₆	Kulzer	452	Unbekannt, kein Eintrag

Tab.5: Ergebnisse der ED₅₀-Messungen (mM) der getesteten Monomere und Komonomere in den einzelnen Zellkulturen mit H33342.

3T3= 3T3 Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,HPF = Pulpafibroblasten,
HPDL = Wurzelhautfibroblasten

Monomere	3T3	HGF	HPF	HPDL
MMA	9,51 ± 0,69	> 10 mM	über 10 mM	2,59 ± n.b.
HEMA	1,77 ± 0,12	2,38 ± 0,51	2,52 ± 1,14	1,87 ± 0,36
BEMA	4,10 ± 0,63	1,93 ± 0,36	1,99 ± 0,19	2,25 ± 0,24
EGDMA	2,31 ± 0,27	0,46 ± 0,06	0,51 ± 0,03	1,17 ± 0,48
DEGDMA	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,01
SIMA	5,80 ± 0,49	2,85 ± 0,26	2,99 ± 0,23	2,83 ± 0,35
TEGDMA	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,26 ± 0,02	0,12 ± 0,06
1,10 DDMA	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM
1.12 DDMA	4,00 ± 0,75	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM
Bis- MA	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,05
Bis- EMA	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,21 ± 0,05	0,78 ± 0,02
UDMA	0,10 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,47 ± 0,14	0,06 ± 0,02
Bis-GMA	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,03

Die Abbildungen 18-20 zeigen drei typische Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Bis-GMA, EGDMA und HEMA an den verschiedenen Zellkulturen gemessen mit H 33342. Bis-GMA wurde als ein Beispiel einer hochtoxischen Substanz, EGDMA als mittel toxische Substanz und HEMA als eine wenig toxische Substanz gewählt. Bei Bis-GMA war eine Beeinträchtigung der Proliferation erst bei einem Schwellenwert von 0,04 mM zu beobachten.

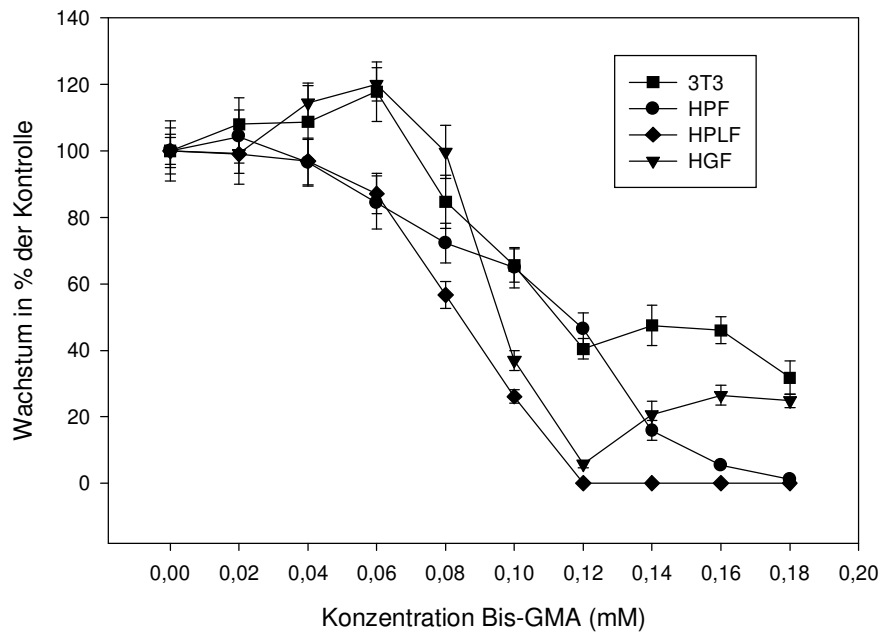


Abb. 18: Wachstumsbeeinflussung verschiedener Zellkulturen durch Bis-GMA. Messung mit H 33342

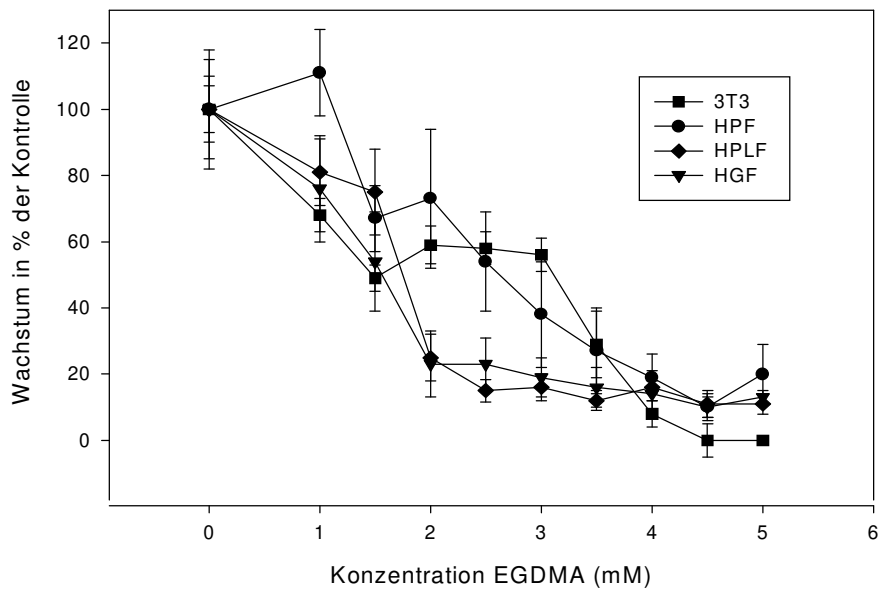


Abb.19: Wachstumbeeinflussung verschiedener Zellkulturen durch EGDMA. Messung mit H 33342

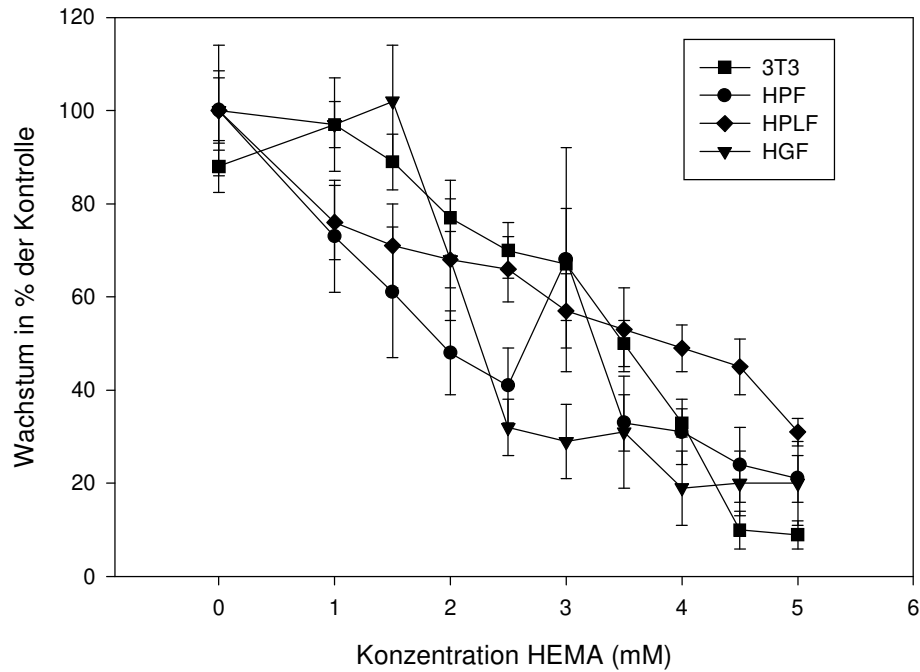


Abb. 20: Wachstumbeeinflussung verschiedener Zellkulturen durch HEMA, Messung mit H 33342

Vergleicht man die ED_{50} -Werte der H 33342 Messung in Tabelle 5 mit denen der ED_{50} Werte von BCECF-AM in Tabelle 6, so erkennt man, daß die BCECF-AM Werte meist um den Wert der Hoechst- ED_{50} schwankten. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Es ist daher nicht möglich, eine generelle Aussage zu beiden Systemen zu treffen. Es ergab sich daraus kein Hinweis auf eine mögliche membranintegritätschädigende Wirkung der hier untersuchten Substanzen.

Tab. 6: ED₅₀-Werte (mM) der untersuchten Monomere ermittelt mit BCECF-AM

**3T3= 3T3 Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,
HPF = Pulpafibroblasten, HPDL = Wurzelhautfibroblasten**

Monomere	3T3	HGF	HPF	HPDL
MMA	über 10 mM	Über 10 mM	über 10 mM	3,07 ± 0,00
HEMA	2,59 ± 0,68	2,40 ± 0,59	2,65 ± 0,28	1,80 ± 0,18
BEMA	4,27 ± 0,36	2,09 ± 0,37 ^o	2,20 ± 0,14	2,47 ± 0,07
EGDMA	1,73 ± 0,48	0,44 ± 0,02	0,48 ± 0,04	0,91 ± 0,41
DEGDMA	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,01
SIMA	>5 mM	2,69 ± 0,35	3,10 ± 0,49	2,98 ± 0,45
TEGDMA	0,31 ± 0,05	0,25 ± 0,06	0,29 ± 0,06	0,16 ± 0,04
1,10 DDMA	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM	1,70 ± 0,62
1,12 DDMA	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM	> 5 mM
Bis-MA	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,05
Bis-EMA	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,52 ± 0,17
UDMA	0,07 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,44 ± 0,09	0,12 ± 0,03
Bis-GMA	0,12±0,01	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,03

3.3.1.1 Zeitlicher Verlauf der Schädigung durch Bis-GMA und UEDMA in 3T3-Kulturen

Um den zeitlichen Verlauf der Schädigung von Bis-GMA und UDMA zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungskurven nach 7, 24, 48 und 72 h mit verschiedenen Konzentrationen dieser Substanzen erstellt. Bei Bis-GMA erkennt man in Abbildung 21, daß die Schädigung bereits nach 7 h eingesetzt hatte. Bei UDMA in Abbildung 22 zeigte sich der Schwellenwert der toxischen Wirkung bei etwa 0,06 mM, während bei Bis-GMA dieser Wert bei etwa 0,04 mM lag. In höheren Konzentrationen erwies sich UDMA nach 7 h wirksamer als Bis-GMA.

Nach etwa 24 h hatte Bis-GMA bereits seine höchste Wirkung erreicht, während UDMA erst nach etwa 48 h die größte Wirkung erreicht hatte. Zwar hatte UDMA in geringen Konzentrationen von 0,06 mM einen eher wachstumstimulierenden Einfluß auf die Zellen, dieser war jedoch nach 48 h Inkubation nicht mehr erkennbar.

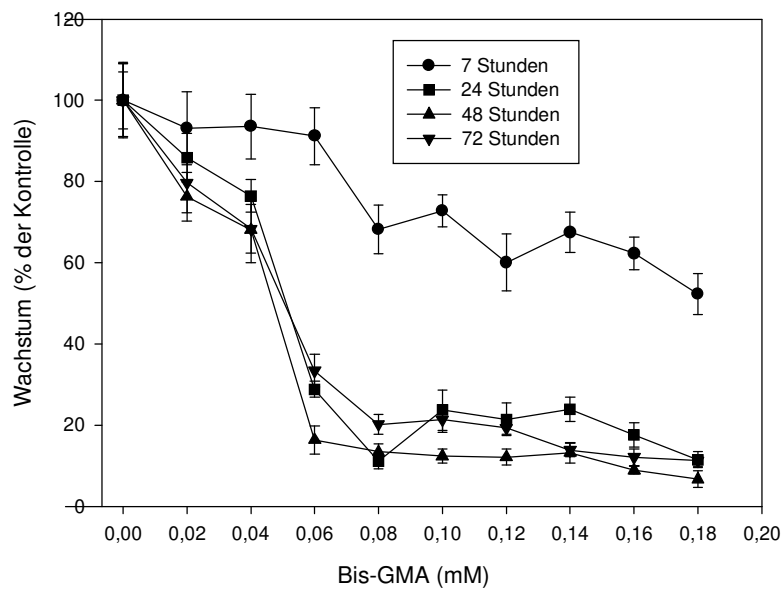


Abb.21: Einfluß von Bis-GMA auf 3T3- Zellen nach 7, 24, 48 und 72 h Behandlung, Messung mit BCECF-AM

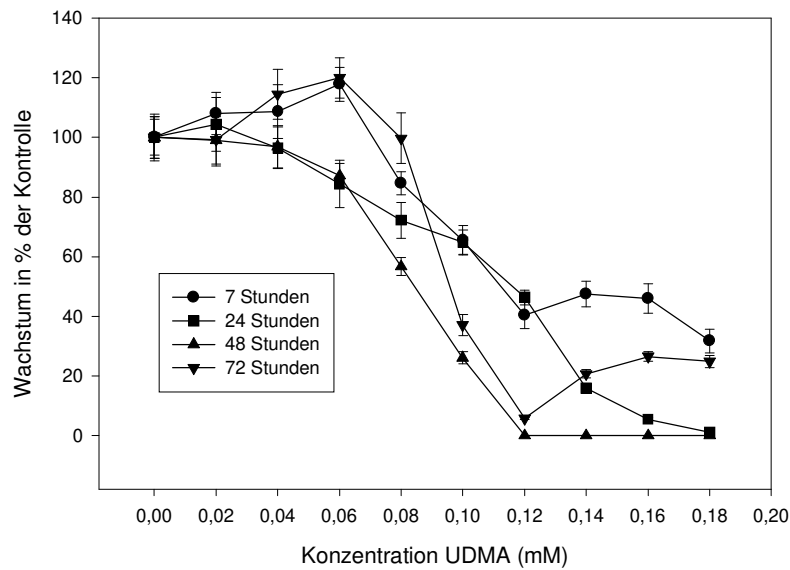


Abb.22: Einfluß von UDMA auf 3T3- Zellen nach 7, 24, 48 und 72 h, gemessen mit BCECF-AM

3.3.1.2 Morphologische Auswertung der Toxizität von Bis-GMA in Pulpazellkulturen.

Die einzelnen Platten wurden zu Beginn und zum Ende jeder Testreihe mikroskopisch beurteilt und die Beobachtungen protokolliert. Der Verlauf der Schädigung ist hier anhand von Bis-GMA an Pulpazellen dargestellt. Zu Beginn des Versuches befanden sich die Zellen noch im gutem Zustand (Abb. 23). Die Zellen waren gleichmäßig gewachsen und wiesen keine morphologischen Schädigungen auf. Die Zellkerne waren deutlich zu erkennen. Je länger die Inkubationsdauer und je höher die Konzentration von Bis-GMA war, desto größer waren die Zellschädigungen.

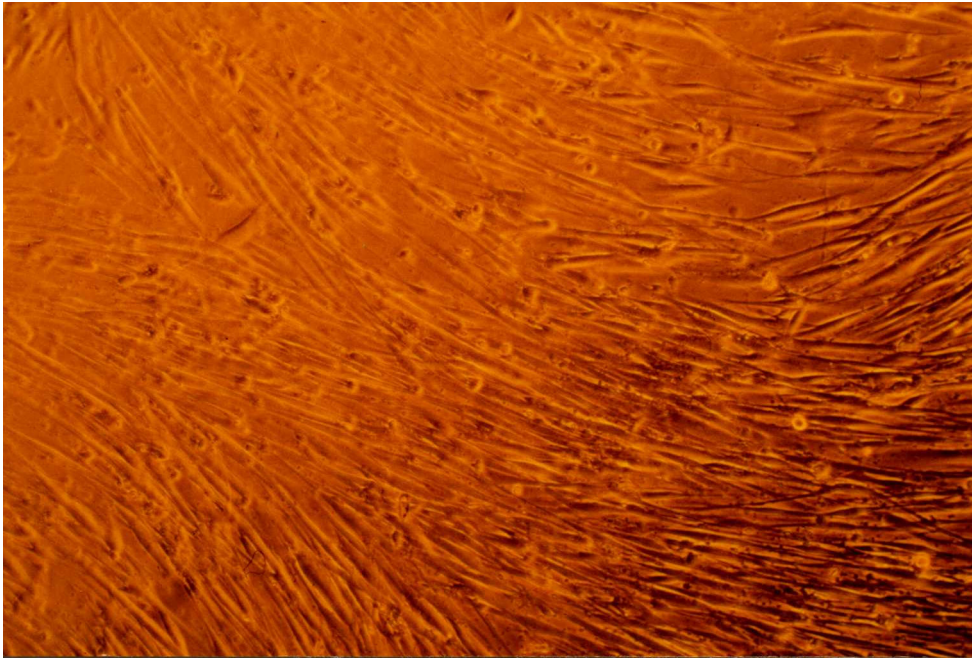


Abb. 23: Kontrolle unbehandelter Pulpazellen. Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400 x

Der präkonfluente Fibroblastenrasen in Abbildung 23 wies in der Kontrolle keine Degenerationserscheinungen und keine Interzellularräume auf. Die Zellen zeigten ein normales Wachstum. Schon nach etwa 5 h der Inkubation mit Bis-GMA begannen sich aber einzelne Zellen aus dem Verband abzulösen. Die Zellen degenerierten zusehends und begannen sich abzukugeln. Die Schädigung nahm mit dem Anstieg der Inkubationsdauer zu und nach 48 h zeigte keine der angehefteten Zellen noch eine normale Morphologie (siehe Abb. 24). In noch höheren Konzentrationen von Bis-GMA waren alle Zellen stark degeneriert und wiesen sehr starke Abkugelungs- und Vakuolisierungserscheinungen auf (Abb. 25).

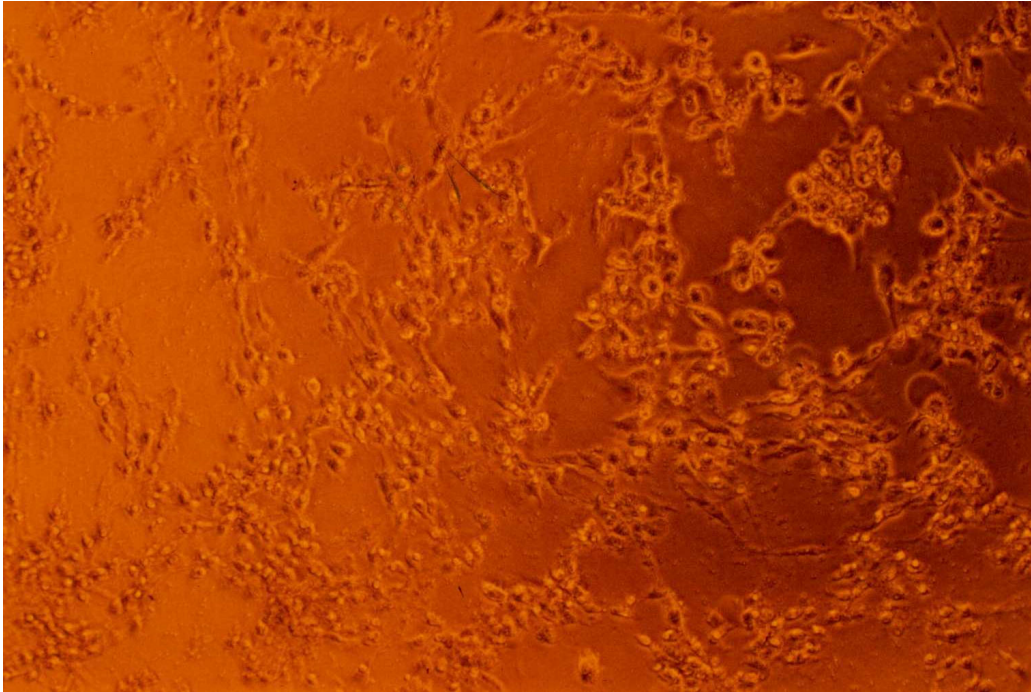


Abb. 24: Pulpafibroblasten nach 48 h mit 0,06 mM Bis-GMA. Der Zellrasen ist nicht mehr dicht bewachsen und zeigt größere Bereiche von Zelllysis

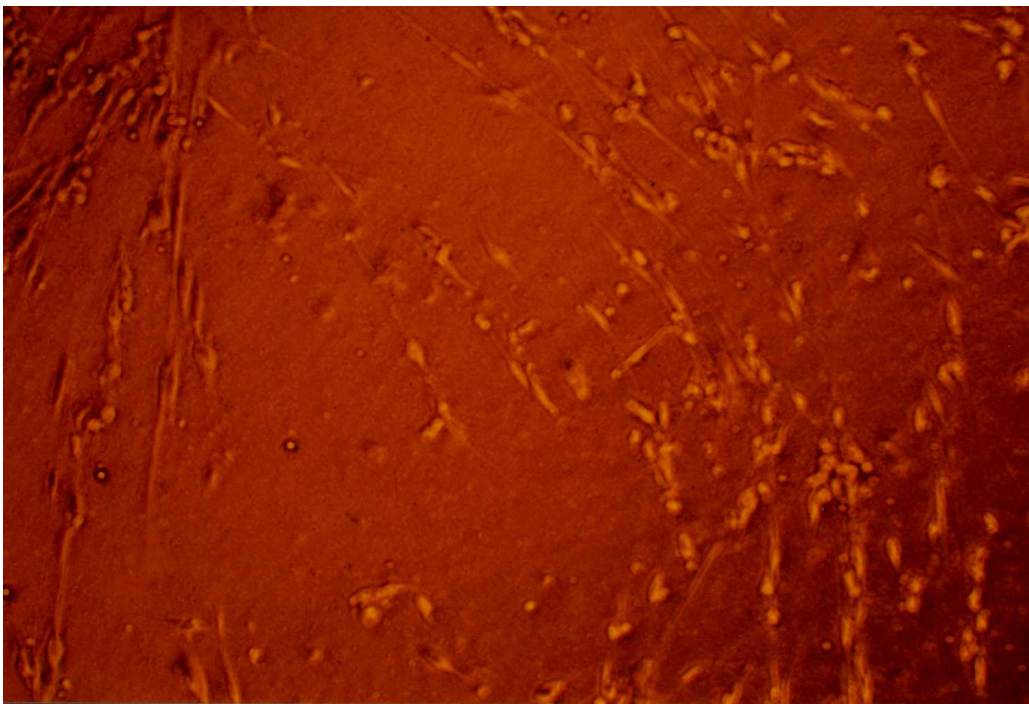


Abb. 25: Pulpafibroblasten 48 h nach Inkubation mit 0,5 mM Bis-GMA. Phasenkontrast, Vergrößerung ca. 400 x

3.3.2 Koinitiatoren

Koinitiatoren werden zur Beschleunigung des radikalischen Zerfalls eingesetzt. Es werden meist tertiäre aromatische Amine eingesetzt.

Die Substanzen in dieser Gruppe wiesen relativ hohe ED_{50} -Werte auf.

Als toxischste Substanz erwies sich DMTDA mit Werten zwischen 0,37mM (3T3) und 0,59 mM (HPDL). Das chemisch damit verwandte DMTDA wies einen ähnlichen ED_{50} -Wert von 0,31 mM (HPDL) 0,44 mM (3T3) und 0,48 mM (HPF) auf. Die anderen untersuchten Koinitiatoren wiesen ED_{50} -Werte von über 1 mM auf. DMABEE zeigte mit einer ED_{50} von 1,2 mM bei allen Zellarten nur noch mäßige toxische Wirkung. DIPA dagegen zeigte bei den Pulpazellen eine niedrigere (0,38 mM) ED_{50} als bei den übrigen getesteten Zellkulturen. Bei diesen lag die ED_{50} Konzentration bei über 1 mM. THA wies bei 3T3-Zellen eine wesentlich höhere ED_{50} (2,86 mM) auf als die primären Zellkulturen, deren ED_{50} etwa halb so groß war (1,25-1,52 mM). Die übrigen getesteten Substanzen DEAE, DMPT DMAPE und DCHA erwiesen sich mit einer ED_{50} von über 2 mM bei allen Zellarten als nur noch mäßig toxisch.

Tab. 7. Liste der untersuchten Koinitiatoren.

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Summenformel	Hersteller	Mg	Nebenwirkungen
DEAE	2-Diethylaminoethanol	C ₆ H ₁₅ NO	Uni Köln	117	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Ratte 1300 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 5 mg
DMPT	Dimethyl-p-toluidin	C ₉ H ₁₃ N	Degussa	135	Giftig, LD ₅₀ ipr Muskel 212 mg/kg
DMAPE	2-(4-Dimethylamino-phenyl)ethanol	C ₁₀ H ₁₅ NO	Aldrich	165	Reizend, kein Eintrag
DIPA	2,6-Diisopropylannilin	C ₁₂ H ₁₉ N	Janssen	177	Giftig LD ₅₀ oral Ratte 3204 mg/kg
DEAEMA	N,N-diethylamino-ethylamin	C ₁₀ H ₁₉ NO ₂	Röhm	193	Reizend
DCHA	Dicyclohexylamin	C ₁₂ H ₂₃ N	Uni Köln	181	Ätzend, LD ₅₀ oral Ratte 373 mg/kg
DHEPT	Dihydroxyethyl-p-Toluidin	C ₁₁ H ₁₇ NO ₂	Degussa	195	Ungiftig, kein Eintrag
DMDDA	Dimethyldodecanamin	C ₁₄ H ₃₁ N	Aldrich	213	Ätzend, LD ₅₀ oral Ratte 740 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 24h 0,05 mg
DMTDA	Dimethyltetradecan-amin	C ₁₆ H ₃₅ N	Synthese	241	Unbekannt, kein Eintrag
TBA	2,4,6-tri-t-butylanilin	C ₁₈ H ₃₁ N	Aldrich	261	Mindergiftig, kein Eintrag
THA	Trihexylamin	C ₁₈ H ₃₉ N	Aldrich	269	Giftig, kein Eintrag
DMABEE	4-Dimethylamino-benzoesäureethylester	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	Janssen	193	Ungiftig, kein Eintrag

Tab. 8: ED₅₀-Werte der Koinitiatoren ermittelt mit H 33342 (mM)
3T3= 3T3 Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,
HPF = Pulpafibroblasten, HPDL = Wurzelhautfibroblasten

Koinitiatoren	3T3	HGF	HPF	HPDL
DEAE	3,10 ± 0,35	4,17 ± 0,52	3,07 ± 0,57	2,61 ± 0,22
DMPT	3,43 ± 0,19	2,53 ± 0,19	2,30 ± 0,16	4,25 ± 0,06
DMAPE	5,75 ± 0,15	3,56 ± 0,41	3,70 ± 0,08	2,78 ± 0,60
DIPA	1,47 ± 0,29	1,22 ± 0,11	0,38 ± 0,26	1,10 ± 0,05
DCHA	4,48 ± 0,23	3,00 ± 0,22	2,43 ± 0,24	2,35 ± 0,44
DMABEE	1,25 ± 0,04	1,23 ± 0,06	1,22 ± 0,06	1,26 ± 0,06
DHEPT	3,58 ± 0,36	2,94 ± 0,86	1,55 ± 0,32	1,30 ± 0,34
DMDDA	0,37 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,30 ± 0,08	0,59 ± 0,28
DMTDA	0,44 ± 0,07	0,48 ± 0,12	0,31 ± 0,05	0,34 ± 0,07
THA	2,86 ± 0,14	1,52 ± 0,28	1,47 ± 0,14	1,25 ± 0,46

Tab. 9: ED₅₀-Werte der getesteten Koinitiatoren ermittelt mit BCECF-AM (mM)

Koinitiatoren	3T3	HGF	HPF	HPDL
DEAE	3,73 ± 0,17	4,43 ± 0,46	4,73 ± 0,17	3,72 ± 0,74
DMPT	Über 5 mM	2,47 ± 0,17	2,39 ± 0,17	3,07 ± 0,26
DMAPE	3,05 ± 0,50	4,07 ± 0,46	4,50 ± 0,14	2,87 ± 0,45
DIPA	1,74 ± 0,41	0,97 ± 0,33	0,38 ± 0,01	1,16 ± 0,02
DCHA	4,80 ± 0,15	3,16 ± 0,06	3,12 ± 0,09	2,59 ± 0,46
DMABEE	1,28 ± 0,02	1,20 ± 0,02	1,17 ± 0,04	1,28 ± 0,12
DHEPT	3,94 ± 0,41	2,79 ± 0,44	2,62 ± 0,64	1,51 ± 0,19
DMDDA	0,39 ± 0,05	0,48 ± 0,08	0,36 ± 0,08	0,55 ± 0,18
DMTDA	0,46 ± 0,07	0,56 ± 0,23	0,39 ± 0,02	0,36 ± 0,06
THA	3,19 ± 0,28	1,73 ± 0,19	1,49 ± 0,05	1,69 ± 0,08

3.3.3 Initiatoren

Man unterscheidet zwei Initiatorarten. Der Initiator DBPO startet die chemische Aushärtung der Kunststoffe durch die Bereitstellung von Radikalen. Dagegen wird in photopolymerisierenden Kompositen ein Photoinitatorsystem eingesetzt, das durch Einwirkung von UV-A Strahlung oder sichtbarem Licht im blauen Bereich Radikale für den Polymerisationsstart freisetzt. Sichtbares Licht dringt tiefer in die Kunststoffschichten ein als das UV-Licht, so daß heute fast ausnahmslos sichtbares Licht für die Härtung von Kunststoffüllungen verwendet wird. Photoinitiatoren stammen aus der Gruppe der Ketoether und 1,2,-Diketone, deren wichtigster Vertreter Campherchinon (CQ) (Reinhard, 1979; Ruyter, 1982) ist.

Die Substanzen dieser Gruppe wiesen relativ hohe ED₅₀-Konzentrationen auf. Die niedrigste ED₅₀-Konzentration wurde bei DMBZ gefunden. Hier lag die Konzentration bei 0,24-0,34 mM. Der häufig verwendete Photoinitiator CQ wies eine gute Zellkompatibilität mit geringen Abweichungen bei den primären Zellkulturen auf (2,17-2,39 mM bei H 33342 bzw. 2,30-2,83 mM bei BCECF-AM).

DBPO wirkte auf die 3T3-Zellen weniger toxisch als auf die primären Zellen. Der ED₅₀-Wert lag bei den 3T3-Zellen bei 3,7 mM, während er bei den primären Zellen zwischen 0,43 und 0,78 mM lag. Zudem waren die ermittelten ED₅₀-Werte aus den BCECF-AM-Assay geringer als die mit dem H 33342 ermittelten Daten.

Bei BPE zeigte sich die 3T3-Zellkultur empfindlicher als die primären Zellkulturen mit 0,92 mM. Die primären Zellkulturen wiesen dagegen uneinheitliche, jedoch höhere Werte von 1,97- 2,42 mM auf. Ebenso zeigte BL diese Wirkung auf die 3T3-Zellen. Bei den 3T3-Zellen erwies sich BL mit 2,02 mM weniger toxisch als bei den primären Zellkulturen, die eine ED₅₀ zwischen 0,68 und 0,87 mM aufwiesen und damit wesentlich sensibler auf die Substanz reagierten.

Tab. 10: Liste der untersuchten Initiatoren

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Summen- Formel	Hersteller	Mg	Nebenwirkungen
DBPO	Dibenzoylperoxid	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	Degussa	242	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 950 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 24h 500 mg mild
CQ	Champherchinon, 2-3- Bornandion	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	Degussa	166	Ungiftig, kein Eintrag
BL	Benzil	C ₁₄ H ₁₀ O ₂	Janssen	210	Reizend, LD ₅₀ oral Ratte 2710 mg/kg, Reizung Kaninchenauge 24 h moderat
BPE	Benzoessäure-phenylester, aus DBPO	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	Uni Köln	198	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Maus 1225 mg/kg
DMBZ	2,2-Dimethoxybenzoin,	C ₁₄ H ₁₀ O ₂	Degussa	256	Ungiftig, kein Eintrag

Tab. 11: ED₅₀-Werte (mM) ermittelt im H 33342 Assay
3T3= 3T3 Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,
HPF = Pulpafibroblasten, HPDL = Wurzelhautfibroblasten

Photoinitiatoren	3T3	HGF	HPF	HPDL
DBPO	3,78 ± 0,12	0,83 ± 0,09	0,43 ± 0,09	0,78 ± 0,02
CQ	2,22 ± 0,07	2,40 ± 0,42	2,22 ± 0,33	2,17 ± 0,03
BL	2,02 ± 0,13	0,68 ± 0,08	0,87 ± 0,09	0,73 ± 0,01
BPE	0,92 ± 0,14	1,97 ± 0,17	2,10 ± 0,16	2,42 ± 0,17
DMBZ	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,24 ± 0,07	0,33 ± 0,04

**Tab. 12: ED₅₀ (mM) ermittelt im BCECF-AM Assay 3T3= 3T3
Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,
HPF = Pulpafibroblasten, HPDL = Wurzelhautfibroblasten**

Photoinitiatoren	3T3	HGF	HPF	HPDL
DBPO	2,85 ± 0,50	0,69 ± 0,24	0,42 ± 0,07	0,52 ± 0,17
CQ	1,75 ± 0,07	2,83 ± 0,17	2,77 ± 0,25	2,74 ± 0,04
BL	2,31 ± 0,21	1,01 ± 0,07	0,80 ± 0,08	0,94 ± 0,05
BPE	0,92 ± 0,14	1,97 ± 0,17	2,10 ± 0,16	2,42 ± 0,17
DMBZ	0,68 ± 0,06	0,54 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,40 ± 0,04

3.3.4 Photostabilisator, Inhibitor, Reaktionsprodukte und Verunreinigungen

Photostabilisatoren gewährleisten die Farbstabilität der Kompositfüllung unter Lichteinfluß, indem sie energiereiche UV-Strahlung absorbieren und in Wärmeenergie umwandeln (Rabek, 1987). Photostabilisatoren werden in geringen Mengen von etwa 0,1 Gew% zugesetzt. Der am meisten verwendete Photostabilisator ist das 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (HMBP).

HMBP zeigte bei den einzelnen Zellarten unterschiedliche ED₅₀-Werte. Diese schwankten zwischen 0,44 mM (HPLF), 0,50 mM (HGF), 1,87 mM (HPF) bis zu 3,07 mM bei den 3T3-Zellen.

Komposite enthalten zur Reaktionsverzögerung und Erhöhung der Lagerstabilität Phenolderivate als Inhibitoren. Am häufigsten wird das besonders wirksame 2,6-di-*t*-Butyl-4-methylphenol (BHT), mit dem Trivialnamen Jonol (Brauner, 1981, Bowen, 1979) eingesetzt. Als Reaktionsinhibitor wirkt auch Sauerstoff. Die Inhibitoren, die spontan freiwerdende Radikale abfangen können, werden zu etwa 0,01-0,06 Gew.% den Kompositen zugesetzt.

BHT zeigte sich für alle untersuchten Zellkulturen sowohl bei der ED₅₀ -Bestimmung mit dem Hoechst-Farbstoff als auch bei BCEF-AM etwa gleich toxisch bei Werten von 0,16-0,2 mM.

Die anderen hier untersuchten Substanzen waren zum Teil Reaktionsprodukte ausgehend von Monomeren beziehungsweise produktionsbedingte Verunreinigungen. Diese Substanzen wurden von Spahl (1995) in einigen Kompositen nachgewiesen.

Triphenylstiban (TPSb) und Triphenylphosphan (TPP) werden als Katalysator für die Exoxidöffnung bei der Synthese des Basismonomers Bis-GMA eingesetzt und stellen somit eine Verunreinigung dar (Glenn, 1979). DCHP wird zur Einstellung der Konsistenz in den Kompositen verwendet (Ruyter, 1981). BEA entsteht durch Methacrylatabspaltung aus dem Komonomer BEMA (Spahl, 1995). BPE ist wahrscheinlich ein Produkt aus der Polymerisation eines Komposites (Spahl, 1995). Bei BME ist die Herkunft ungeklärt. DICH und TEG sind wahrscheinlich Reaktionsprodukte aus UDMA und TEGDMA, die bei der Polymerisation entstehen.

Camphersäureanhydrid (CSA) konnte von Spahl (1995) aus allen Kompositen extrahiert werden. Wahrscheinlich entsteht CSA als Photozersetzungsprodukt von CQ in Anwesenheit von Sauerstoff. CSA zeigte einen niedrigeren ED₅₀-Wert als das CQ.

TPSb erwies sich als äußerst toxisch in allen getesteten Zellkulturen bei einem ED₅₀-Wert von etwa 0,1 mM. Als ebenfalls toxische Substanz erwies sich das TPP mit einer ED₅₀ von 0,32 (3T3) bis 0,45 mM (HPDL). BEA, TEG und DICH erwiesen sich in der ED₅₀-Bestimmung als moderat toxisch mit einer ED₅₀ von 1,71mM bis >5mM. Lediglich bei BPE reagierten die 3T3-Zellen mit 0,92 mM empfindlicher auf die Substanz als die primären Zellen (1,97-2,42 mM). DCHP wies mit 0,69 (HPF) bis 0,85 mM (HGF) eine mäßige Toxizität in allen Zellkulturen auf.

Bei der BCECF-AM Messung ergab sich im Vergleich zu der Hoechst-Messung kaum ein Unterschied in der ED₅₀ bei den hier untersuchten Substanzen.

Tab. 13: Liste der verwendeten Substanzen

Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Summenformel	Hersteller	Mg	Nebenwirkungen
BHT	2,6-Di-t-butyl-4-methylphenol	$C_{15}H_{20}O$	Degussa	220	Mindergiftig: LD ₅₀ oral Ratte 890 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 25h 100 mg moderat
HMBP	2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon	$C_{14}H_{12}O_3$	Degussa	228	Ungiftig, LD ₅₀ oral Rat 7400 mg/kg. Kein Eintrag
TPSb	Triphenylstiban, aus Bis-GMA	$C_{18}H_{15}Sb$	Uni Köln	352	Giftig, LD ₅₀ oral Ratte 183 mg/kg
BEA	Benzylalkohol	C_7H_8O	Merck	108	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Rat 1230 mg/kg Reizung Auge Kaninchen 24 h 0,75mg heftig
BME	Benzoessäure-methylester	C_8H_8O	Merck	136	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Rat 1177 mg/Kg, Reizung Haut Kaninchen 24h 500 mg mild
TEG	Triethylenglykol, aus TEGDMA	$C_6H_{14}O_4$	Merck	150	Ungiftig, LD ₅₀ oral Ratte 1700 mg/kg
DICH	1,6-Diisocyanato-hexan aus UEDMA	$C_8H_{12}N_2O_2$	Aldrich	168	Giftig, LD ₅₀ oral Ratte 738 mg/kg, Reizung Auge Kaninchen 24 h 500 mg mild
BPE	Benzoessäure-phenylester, aus DBPO	$C_{13}H_{10}O_4$	Synthese Uni Köln	198	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Ratte 1225 mg/kg
TPP	Triphenyl-phosphan	$C_{18}H_{15}P$	Uni Köln	262	Mindergiftig, LD ₅₀ oral Ratte 700 mg/kg
CSA	Camphersäure-anhydrid	$C_{10}H_{14}O_3$	Synthese Uni Köln	182	Unbekannt, kein Eintrag
DCHP	Dicyclohexyl-phtyalat	$C_{20}H_{26}O_4$	Merck	330	Ungiftig, LD ₅₀ oral Ratte 30000 mg/kg

Tab. 14: ED₅₀-Werte (mM) ermittelt im H 33342 Assay
3T3 = 3T3
Mausfibroblasten, HGF = Gingivafibroblasten,
HPF = Pulpafibroblasten, HPDL = Wurzelhautfibroblasten

Sonstiges	3T3	HGF	HPF	HPDL
BHT	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01
HMBP	3,07 ± 0,03	0,50 ± 0,12	0,19 ± 0,35	0,44 ± 0,03
BEA	2,62 ± 0,10	3,17 ± 0,44	3,01 ± 0,25	1,74 ± 0,05
BME	2,53 ± 0,30	2,33 ± 0,19	2,81 ± 0,13	2,14 ± 0,49
TEG	4,60 ± 0,22	> 5 mM	2,93 ± 0,17	1,99 ± 0,43
DICH	2,67 ± 0,17	3,49 ± 0,08	2,93 ± 0,31	1,83 ± 0,34
TPP	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,02
DCHP	0,73 ± 0,07	0,85 ± 0,09	0,69 ± 0,01	0,80 ± 0,07
TPSb	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00
CSA	1,75 ± 0,12	1,82 ± 0,09	2,53 ± 0,13	1,17 ± 0,10
BPE	0,92 ± 0,14	1,97 ± 0,17	2,10 ± 0,16	2,42 ± 0,17

Tab. 15: ED₅₀-Werte (mM) ermittelt im BCECF-AM Assay

Sonstiges	3T3	HGF	HPF	HPDL
BHT	0,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,19 ± 0,00
HMBP	1,85 ± 0,05	0,75 ± 0,25	3,51 ± 1,28	0,45 ± 0,03
BEA	2,14 ± 0,43	3,30 ± 0,42	3,36 ± 0,28	2,19 ± 0,31
BME	4,12 ± 0,57	3,82 ± 0,27	2,60 ± 0,03	2,13 ± 0,34
TEG	4,57 ± 0,29	> 5 mM	3,10 ± 0,08	1,79 ± 0,09
DICH	3,50 ± 0,43	3,70 ± 0,36	3,10 ± 0,08	2,02 ± 0,27
TPP	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,43 ± 0,00	0,45 ± 0,01
DCHP	0,83 ± 0,03	0,90 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,80 ± 0,05
TBSB	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00
CSA	1,53 ± 0,075	1,61 ± 0,11	3,49 ± 0,36	1,49 ± 0,33
BPE	0,77 ± 0,12	2,27 ± 0,12	1,86 ± 0,05	2,27 ± 0,12

3.4 Einfluß der Passagenzahl auf das Wachstums- und Toxizitätsverhalten an Wurzelhautfibroblasten

Da aus der Literatur bekannt ist (Leigh et. al., 1995; Adams et. al., 1994 Zeng und Millis, 1996), daß sich die Morphologie und biochemische Eigenschaften primärer Zellen aus frühen Passagen stark von den Zellen älterer Passagen unterscheiden, war es wichtig, herauszufinden inwieweit sich Herkunft der Zellen und die Passagenzahl auf die Bestimmung der ED₅₀ auswirken können.

Dazu wurden an zwei verschiedenen Wurzelhautfibroblastenzellkulturen systematisch in jeder Passage die ED₅₀ mit H 33342 und Sulforhodamin 101 bestimmt. Der BrdU-Einbau und die Wachstumsrate wurden ebenfalls ermittelt. Da das Alter der Patienten, von denen die jeweiligen Biopsien stammten, eine Rolle in Bezug auf Proliferationseigenschaften und den Stoffwechsel der davon abstammenden Zellpopulation spielen könnte, wurden parallel eine Zellkultur von einer 4-jährigen Patientin (ZK 4) und eine von einer 20-jährigen Patientin (ZK 20) untersucht.

Es wurden zwei mindertoxische Substanzen ausgewählt, da sich bei stark toxischen Substanzen Unterschiede in der ED₅₀ schwerer als bei mäßig toxischen Stoffen feststellen lassen. Dazu wurden die Substanzen BEA (Benzylalkohol) sowie aus der Reihe der Photoinhibitoren CSA (Camphersäureanhydrid) ausgewählt, da diese Substanzen in den meisten Kompositen vorkommen und nur eine geringe Toxizität aufwiesen.

Zu Bestimmung der ED₅₀ wurde im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen eine logarithmische Verdünnungsreihe in Stufen von 2,5- 0,033 mM angelegt, um Unterschiede in der ED₅₀ besser feststellen zu können. Die Ergebnisse der Versuche mit BEA sind in der Tabelle 23 aufgeführt. Parallel wurde der Test insgesamt dreimal mit 3T3-Zellen durchgeführt. Die Proliferationszeiten und der BrdU-Einbau veränderten sich erwartungsgemäß nicht. Sie lagen bei einer Verdoppelungszeit von etwa 18 h und einer BrdU-Einbaurrate von etwa 55-60% nach 24 h.

Alle in den unterschiedlichen Passagen der 3T3-Zellen ermittelten ED₅₀-Werte lagen bei den 3T3-Zellen bei etwa 0,76 mM bei einer Standardabweichung von 0,1 mM. Abbildung 26 zeigt 3T3-Zellen mit BrdU Markierung. Die fluoreszierenden Zellkerne (1) zeigen die markierten, in der DNA-Synthese befindlichen Zellen im

Fluoreszenzlicht an, während die unmarkierten Zellkerne (2) sich nicht in der replizierenden Phase des Zellzyklus befinden.

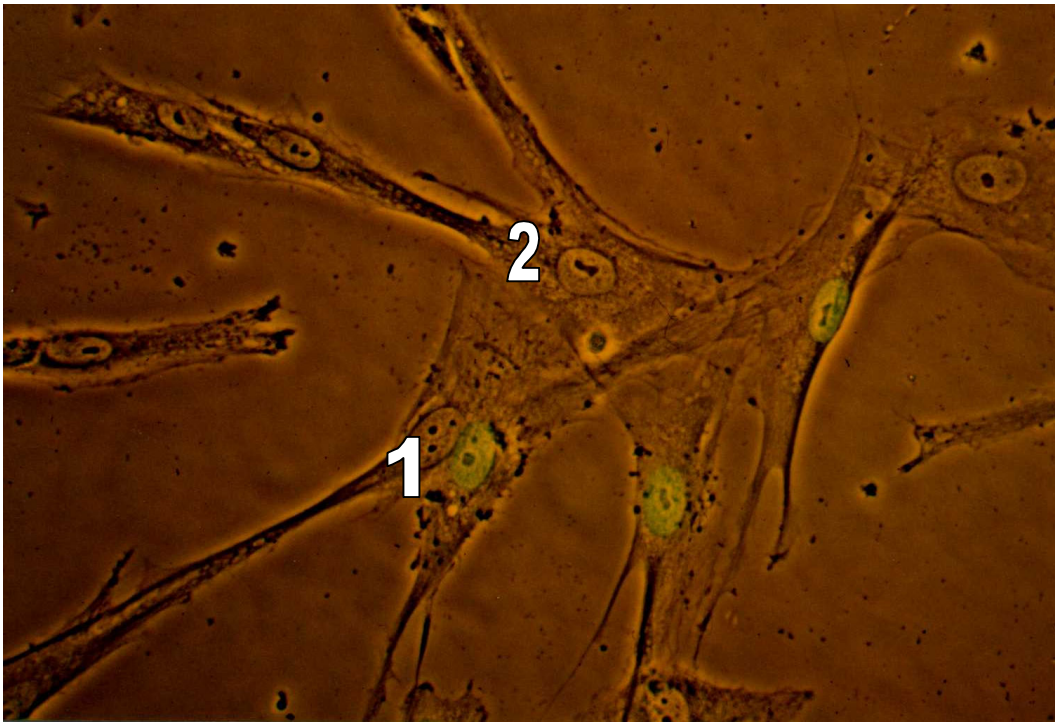


Abb. 26: BrdU-Einbau bei 3T3-Zellen. Aufnahme im Phasenkontrast mit Fluoreszenzlicht. Vergrößerung ca. 400 x

3.4.1 Einfluß der Passagenzahl der Wurzelhautfibroblasten auf die Toxizität von CSA

Die Zellkultur ZK 20 konnte nur bis zur 10. Passage fortgesetzt werden, die von ZK 4 jedoch bis zur 14. Passage. Die ED₅₀-Werte wiesen dagegen bis auf die Passagen 9-14 keine größeren Unterschiede auf. Zwar zeigte die Zellkultur ZK 4 im Mittel einen etwa 25% höheren ED₅₀-Wert als der der ZK 20, jedoch schwankten die ED₅₀-Werte innerhalb der einzelnen Passagen um diesen Wert. Auch zeigte die ZK4-Zellkultur gegenüber der ZK 20 eine "höhere Vitalität" von etwa 5% im Trypan-Blau-Vitalitätstest.

Das Diagramm in Abbildung 27 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von H 33342 und

Sulforhodamin 101 bei ZK 4. Erst ab einer Konzentration von 0,2 mM setzte die toxische Wirkung ein und ging dann konzentrationsabhängig weiter, bis bei etwa 1 M alle Zellen abgetötet waren. Das Sulforhodamin 101 wies im Vergleich zur Höchst-Markierung leicht höhere Werte auf.

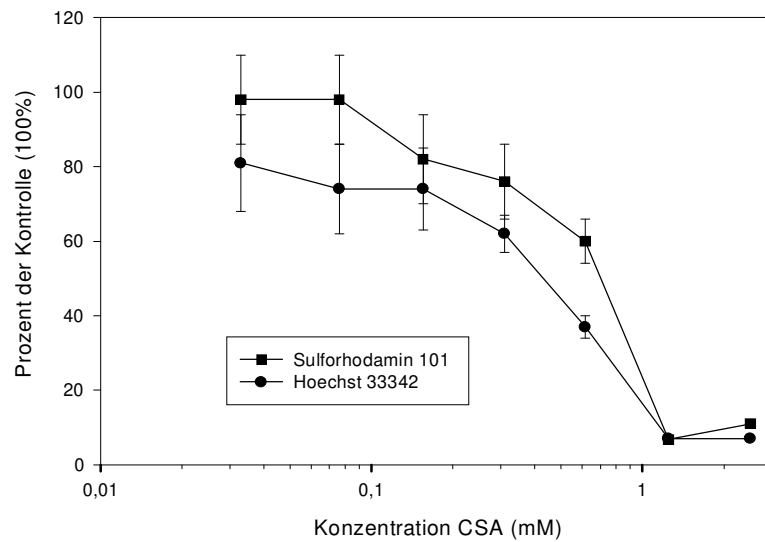


Abb. 27: Dosis-Wirkungs Kurve von CSA bei Wurzelhautfibroblasten einer 4-jährigen Patientin der 4. Passage

Tab. 16: ED₅₀ (mM) von CSA, Verdoppelungszeit und BrdU-Einbau von Wurzelhautfibroblasten von zwei Patientinnen mit einem Alter von 4 bzw. 20 Jahre. n.b. = nicht bestimmt, da die Kultur nicht weiter kultiviert wurde.

Passagen-Zahl	ED ₅₀ -Werte (mM)				Verdoppelungszeit (h)				BrdU-Einbau (%)	
	ZK 4		ZK 20		ZK 4	ZK 20	ZK 4	ZK 20	ZK 4	ZK 20
	H	Sulfo	H	Sulfo						
4	0,39	0,61	0,42	0,34	31,16	26,22	43,2	45		
5	0,67	0,82	0,48	0,52	25,45	22,50	46,8	45		
6	0,59	0,72	0,61	0,73	40,72	43,30	44,8	50		
7	0,9	0,62	0,58	0,64	35,39	44,98	43,2	43		
8	0,82	0,73	0,42	0,48	36,55	67,82	38,2	29		
9	0,86	0,87	0,85	0,9	42,57	59,90	33,6	18		
10	0,82	0,80	0,54	0,54	40,21	127,50	21,8	n.b.		
11	0,84	0,94	n.b.	n.b.	33,73	n.b.	16	n.b.		
12	0,81	1,18	n.b.	n.b.	83,28	n.b.	n.b.	n.b.		
13	0,58	1,20	n.b.	n.b.	95,03	n.b.	n.b.	n.b.		
14	1,14	1,57	n.b.	n.b.	91,92	n.b.	n.b.	n.b.		
Mittelwert Passage 4-8	0,67 ± 0,17	0,7 ± 0,07	0,50 ± 0,07	0,54 ± 0,13	33,85 ± 5,18	40,96 ± 16,13	43,24 ± 2,84	42,40 ± 7,08		

Die Zellen von ZK 4 zeigten bis zur siebten Passage einen BrdU-Einbau von etwa 45% der markierten Zellen, der dann kontinuierlich von 38,2% in der achten Passage auf 16 % in der 10. Passage absank. In der 11. Passage konnte keine Markierung der Zellen mehr festgestellt werden. Wie in Abbildung 29 gezeigt, blieb bis zur 11. Passage die Verdoppelungszeit relativ konstant, während bei ZK 20 die Verdoppelungszeiten bereits ab der 8. Passage stark zunahmen und in der 11. Passage nicht mehr meßbar waren (Abbildung 28). Die Zellen von ZK 20 wiesen ab der achten Passage eine deutliche Verringerung des BrdU-Einbaus auf. Lag der BrdU-Einbau in den Passagen 4-7 ebenfalls bei 45%, so nahm dieser in den Passagen acht bis elf stark ab und konnte in der zwölften Passage nicht mehr nachgewiesen werden. Auch nahm die Fluoreszenzintensität der markierten Zellen ab der 8. Passage stark ab.

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen für beide Zellkulturen graphisch die Veränderung des BrdU-Einbaus und der Verdoppelungszeit der Zellkulturen. Die Abbildung 30 zeigt den deutlichen Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen der ersten und der zehnten Passage von ZK 20. Während in den Passagen 4-7 die Zellen bereits nach 48 h stark proliferierten, verzögerte sich der Beginn der Proliferation auf über 96 h in der 10. Passage. Die Bestimmung der ED₅₀ erfolgte in den höheren Passagen, also noch vor dem Beginn der Proliferation, die Zellen befanden sich also noch in der stationären Phase. Ab etwa der 9. Passage waren 48 h nach der Aussaat weniger Zellen im Well als zu Beginn eingesät wurden, d.h die Zellkultur degenerierte.

Die Abbildung 30 zeigt außerdem, daß sich nach 48 h in Passage 10 nur noch etwa die Hälfte der Zellen ($5,4 \times 10^3$ Zellen/Well) als zu Beginn der Aussaat befanden. Die ED₅₀ wurde davon jedoch nicht verändert. Erst wenn die Zellzahl noch weiter abnahm, konnte eine sichere Bestimmung der ED₅₀ aufgrund einer geringen Zellzahl nicht mehr erfolgen. CSA wirkte auf ruhende wie wachsende Zellen gleich toxisch.

Vergleicht man die Mittelwerte der beiden Zelllinien innerhalb der 4. bis 8. Passage, zeigen beide Zelllinien ähnliche, vergleichbare Ergebnisse. Die ED₅₀ lag bei dem mit Hoechst-Farbstoff ermittelten Wert mit 0,67 mM bei ZK 4 und 0,5 mM bei ZK 20. Die Verdoppelungszeit lag bei ZK 4 bei 33,85 h und 40,9 h bei ZK 20 ebenfalls nah zusammen.

Der BrdU-Einbau wies mit etwa 3% Unterschied zwischen beiden Zelllinien (ZK 4: 40,96% ; ZK 20: 43,2 %) ebenfalls kaum Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien auf.

Diese Experimente zeigten, daß primäre Zellen trotz ihrer individuell unterschiedlichen Herkunft durchaus zu einer reproduzierbaren Bestimmung der ED_{50} herangezogen werden konnten. Die ED_{50} -Werte unterliegen bei den hier untersuchten Wurzelhautfibroblasten höheren Schwankungen als die der 3T3-Zellkultur, waren aber im wesentlichen gut mit der permanenten Zellkultur zu vergleichen. Zwar ergaben sich beim direkten Vergleich der hier untersuchten Wurzelhautzellkulturen unterschiedliche ED_{50} -Ergebnisse, diese sind aufgrund der Mittelwerte von 0,77 mM (ZK 4) und 0,54 mM (ZK 20) Bei der Testung mit Sulforhodamin 101 und aufgrund der hohen Standardabweichung bei deneinzelnem Testsystemem statistisch nicht signifikant.

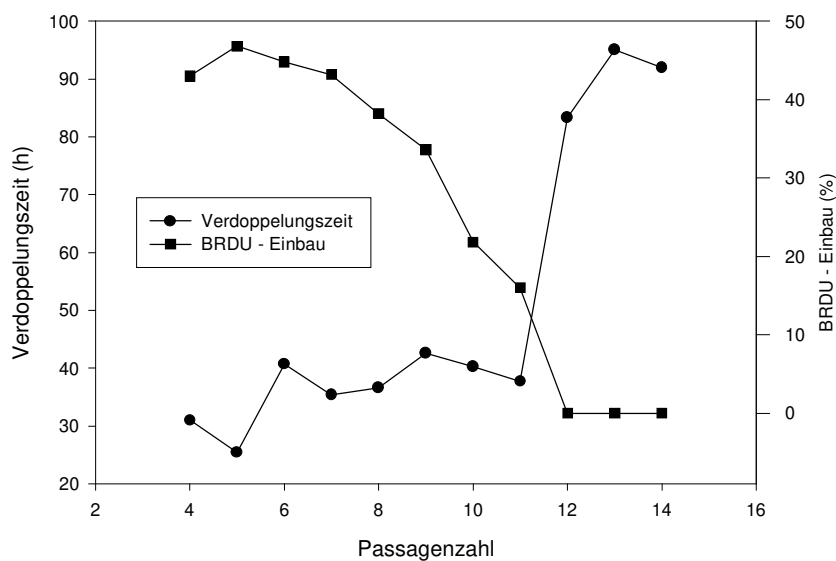


Abb. 28: BrdU-Einbau und Verdoppelungszeit bei ZK 20 in Abhängigkeit von der Passagenzahl

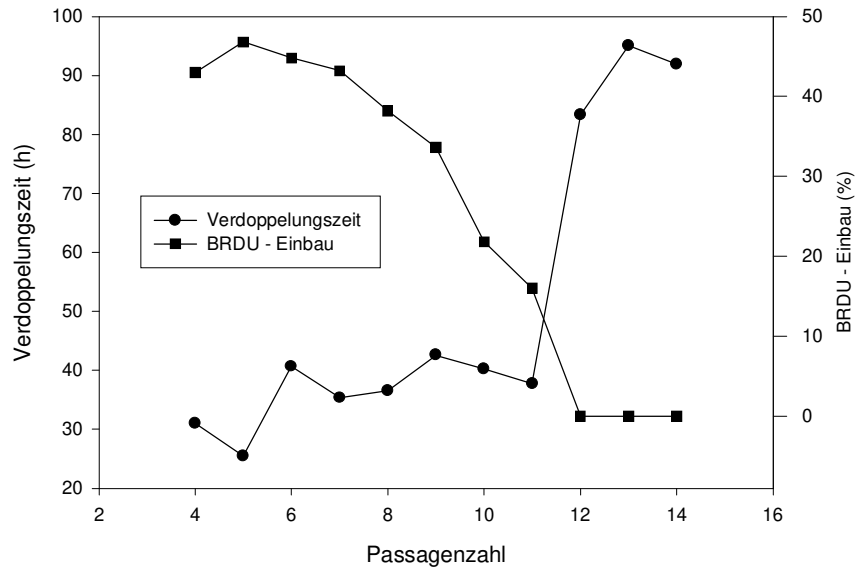


Abb. 29: BrdU-Einbau und Verdoppelungszeit von ZK 4 in Abhängigkeit von der Passagenzahl

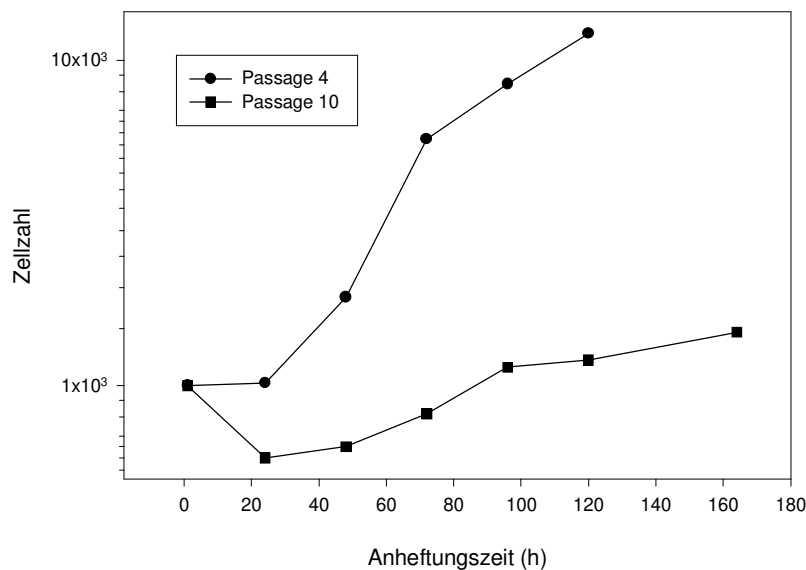


Abb. 30: Wachstum der Wurzelhautfibroblasten von ZK 20 in der 4. und 10. Passage

3.4.2 Einfluß der Passagenzahl der Wurzelhautfibroblasten auf die Toxizität von BEA

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit der Testsubstanz BEA an den HPDL-Zellen von ZK 20 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 dargestellt. Es zeigten sich dabei keine wesentlichen Unterschiede im BrdU-Einbau und der Verdoppelungszeit wie im vorangegangenen Versuch bei ZK 20 mit CSA. Der BrdU-Einbau sank von 49 % in Passage 4 auf 15,4%, in Passage 9. Gleichzeitig stieg die Verdoppelungszeit von 35,6 h auf über 57 h. Die ED_{50} lag bei etwa 2,6 mM in der 4-8. Passage. In der 9. Passage erhöhte sich die ED_{50} von BEA auf 4,6 mM, d.h. die Zellen wurden unempfindlicher gegenüber dem toxischen Einfluß von BEA, was sich durch eine wesentlich eingeschränkte Proliferation und Degeneration in diesen Passagen erklären läßt.

Die Kultur konnte hier nur bis zur 9. Passage geführt werden. Nach der Überführung in die 10. Passage hefteten sich lediglich wenige Zellen an den Flaschenboden an. Ein Wachstum dieser Zellen konnte jedoch nicht mehr festgestellt werden.

Vergleicht man die ED_{50} der einzelnen Passagen bei den Farbstoffen, so zeigte sich eine

sehr gute Korrelation zwischen den Passagen 4 bis 8. Erst ab der neunten Passage sind die Veränderungen im BrdU-Einbau und in der Verdoppelungszeit so gravierend, daß sich keine reproduzierbaren ED₅₀-Bestimmungen mehr durchführen lassen.

Tab. 17: Passagenzahl, BrdU-Einbau, Verdopplungszeit, ED₅₀-Werte von BEA, gemessen mit Hoechst 33342, BCECF-AM und Sulforhodamin 101 an Wurzelhautfibroblasten einer 20jährigen Patientin

Passagen-zahl	BrdU- Einbau (%)	Verdopp-lungszeit (h)	ED ₅₀ (mM) Hoechst 33342	ED ₅₀ (mM) BCECF-AM	ED ₅₀ (mM) Sulforhodamin 101
Passage 4	49,4	35,61	2,57	3,64	2,83
Passage 5	46	31,78	2,8	3,5	3,5
Passage 6	49	35,02	2,06	3,02	2,65
Passage 7	34,2	37,2	2,8	3,7	2,9
Passage 8	25	40,18	2,7	2,28	2,75
Passage 9	15,4	57,53	4,6	4	2,25
Mittelwert	40,72	35,95	2,586	3,22	2,92
Passage 4-8	± 6,17	± 1,97	± 0,30	± 0,26	± 0,31

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Versuche mit primären Zellen zu reproduzierbaren Ergebnissen führen, wenn Zellen bis zur 8. Passage für die ED₅₀-Bestimmung benutzt werden. In höheren Passagen sind die Zellen bereits so stark in ihrem Wachstum behindert, daß sie nicht mehr für reproduzierbare ED₅₀-Bestimmungen herangezogen werden können. Mit der starken Abnahme der Proliferation und der Zunahme der Verdoppelungszeit ab Passage 9 reagieren die Zellen unempfindlicher auf die zugesetzten Substanzen. Zudem wird eine genaue Ermittlung der ED₅₀ durch geringe Zellzahlen in hohen Passagen erschwert.

3.5 Untersuchungen über Zellvolumenänderungen als Reaktion auf Kompositbestandteile

Um einen weiteren biologischen Parameter als Reaktion auf zytotoxische Substanzen zu untersuchen, wurde die Zellvolumenveränderung von K-562 Zellen bei 20 Substanzen untersucht. Aufgrund der geringen Datenmenge wurde aber auf eine Berechnung der ED_{50} verzichtet. Die Resultate der untersuchten Monomere und Additiva zeigten jedoch mit denen durch Fluoreszenzfarbstoffe ermittelten Daten übereinstimmende Ergebnisse. Die K-562 Zellen wiesen einen Durchmesser von etwa 12-15 μm auf, zeigten jedoch keinen ausgeprägten Peak, sondern die Zellen verteilten sich gleichmäßig über diesen Bereich (siehe Abbildung 31 Kontrolle). Bei Bis-GMA lysierten die Zellen als Reaktion auf dessen Zugabe. Ab einer Konzentration von 0,2 mM fanden sich praktisch nur noch gleichmäßig verteilte Zelltrümmer, deren Anzahl mit abnehmender Größe zunahm (siehe Abbildung 31). Auch die mikroskopische Untersuchung wies keine intakten Zellen mehr nach.

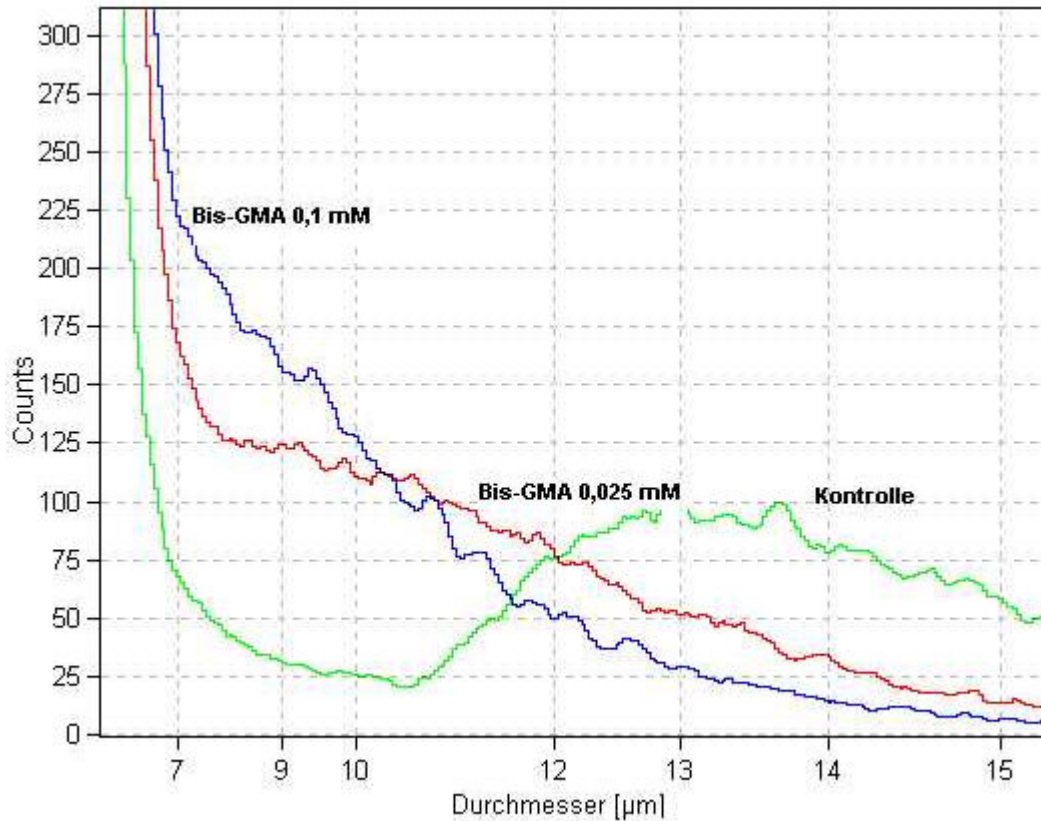


Abb. 31: Größenveränderung von K-562 Zellen nach 24 h Behandlung mit Bis-GMA in einer Konzentration von 0,025 mM und 0,01 mM

Bis-GMA war auch hier unter den Methacrylaten die toxischste Substanz. Gegenüber UDMA zeigte Bis-GMA bei einer Konzentration von 0,025 mM bereits eine starke Zellwandschädigung. Ein anderes Bild ergab sich mit UDMA (Abbildung 32). Zeigten sich bei einer Konzentration von 0,025 mM kaum Auswirkungen auf die Partikelgröße, führte der Anteil der Zelltrümmer bei einer Konzentration von 0,1 µm zu einem gleichmäßigen Peak bei etwa 7,3 µm Durchmesser, der bei den anderen Methacrylaten nicht zu finden war.

Die Substanzen, die aus der Methacrylatgruppe stammen, (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Bis-EMA und TEGDMA) erzeugten bei den Zellen starke Zelltrümmer im Konzentrationsbereich von <10 µm. Von den anderen Substanzen hatte nur BHT eine ähnliche starke Wirkung auf die Membranen der K-562- Zellen.

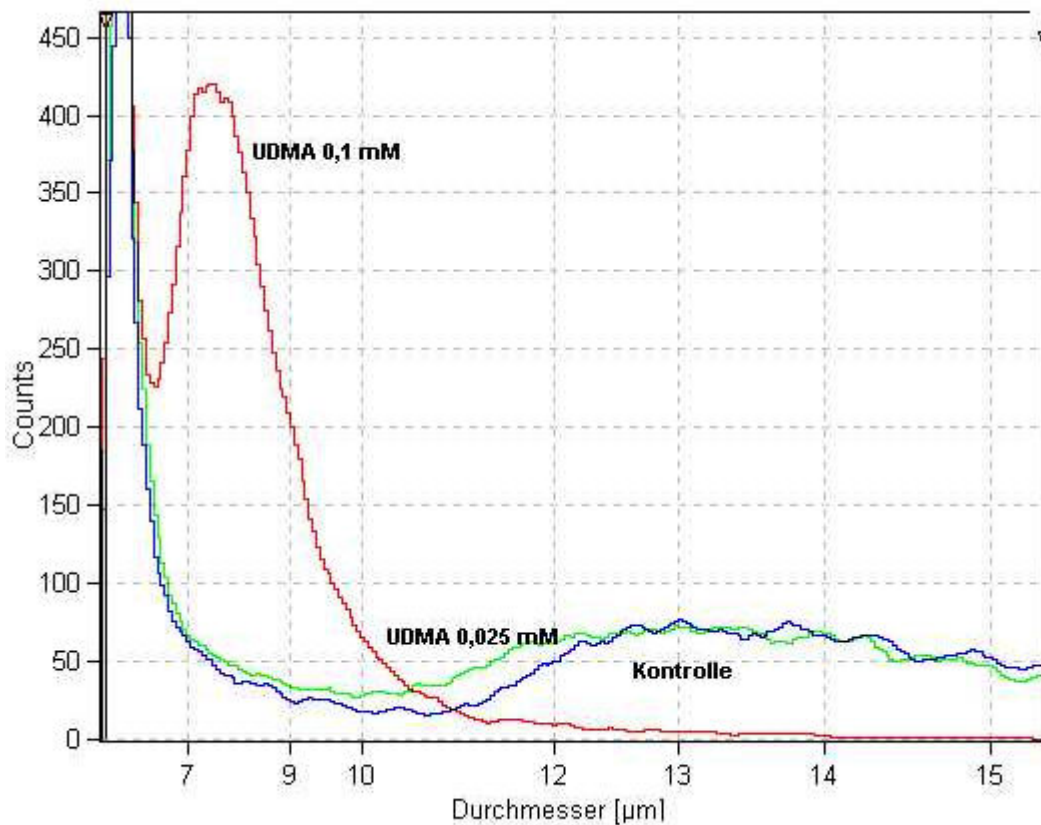


Abb. 32: Größenveränderung von K-562 Zellen nach 24 h Behandlung mit UDMA in einer Konzentration von 0,1 mM und 0,025 mM

Bei allen anderen getesteten Substanzen blieb diese Reaktion jedoch aus. Die Zellen reagierten auf die getesteten Substanzen zunächst mit einer Verkleinerung ihres Zelldurchmessers. Abbildung 33 zeigt die Verringerung der Partikelverteilung nach Zugabe von 0,5 mM und 2 mM CSA. Die Zellen verkleinerten sich von 13,0 µm auf 11,5 µm bei einer Konzentration von 2 mM. TPSb, das sich in den ED₅₀-Bestimmungen als hochtoxisch erwies und auch im DIT-Test gentoxisch war (Abbildung 34), wies dagegen kaum eine Wirkung auf das Zellvolumen auf. Auch ist die Anzahl der Zellen in den getesteten Konzentrationen gleich, da das Gerät nicht tote von lebenden Zellen unterscheiden kann, wenn diese sich nicht in der Größe unterscheiden. Die Vitalitätsprüfung zeigte in den hier gezeigten Konzentrationen mit TPSB keine lebenden Zellen mehr an.

Bei folgenden untersuchten Substanzen wurde als Resultat der toxischen Wirkungen eine Volumenveränderung, jedoch keine Zerstörung der Zellmembran beobachtet (hier nicht gezeigt): TEG, DEAE, BME, BEA, CSA, DMPT, EGDMA, DIPA, 1,10-DDMA, BME, HMBP, DEAE, SIMA.

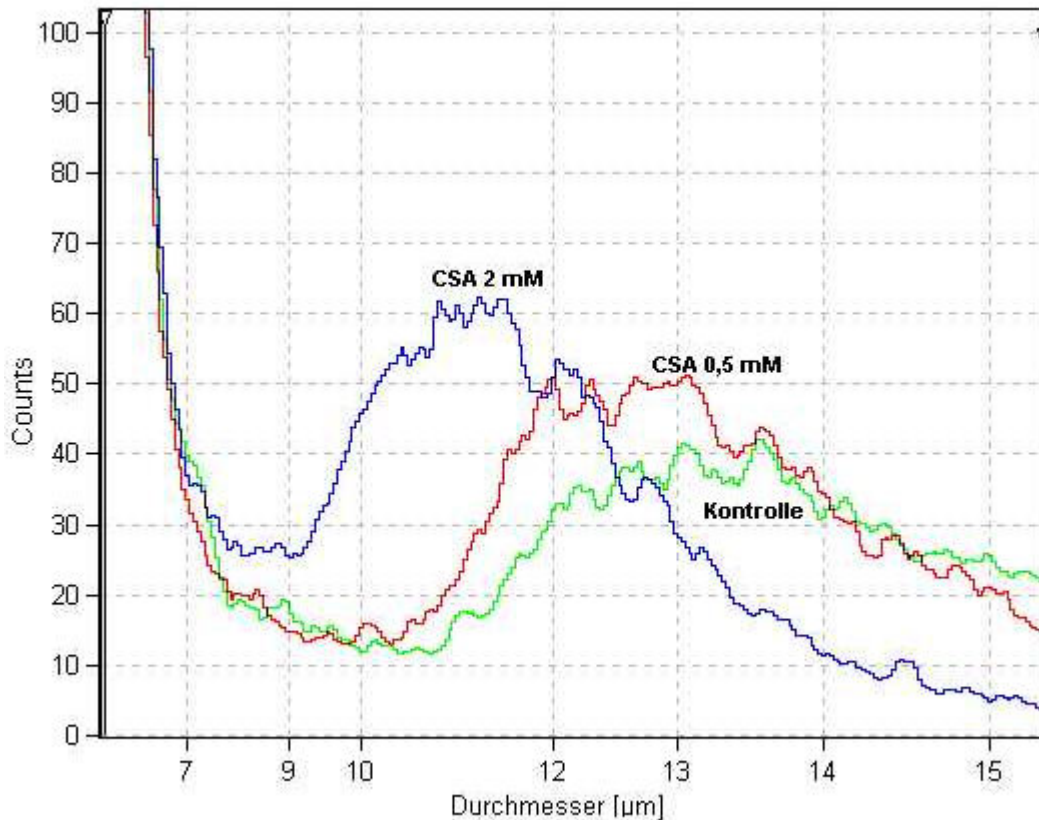


Abb. 33: Größenverteilung von K-562 Zellen nach 24 h Behandlung mit CSA in einer Konzentration von 0,5 mM und 2 mM

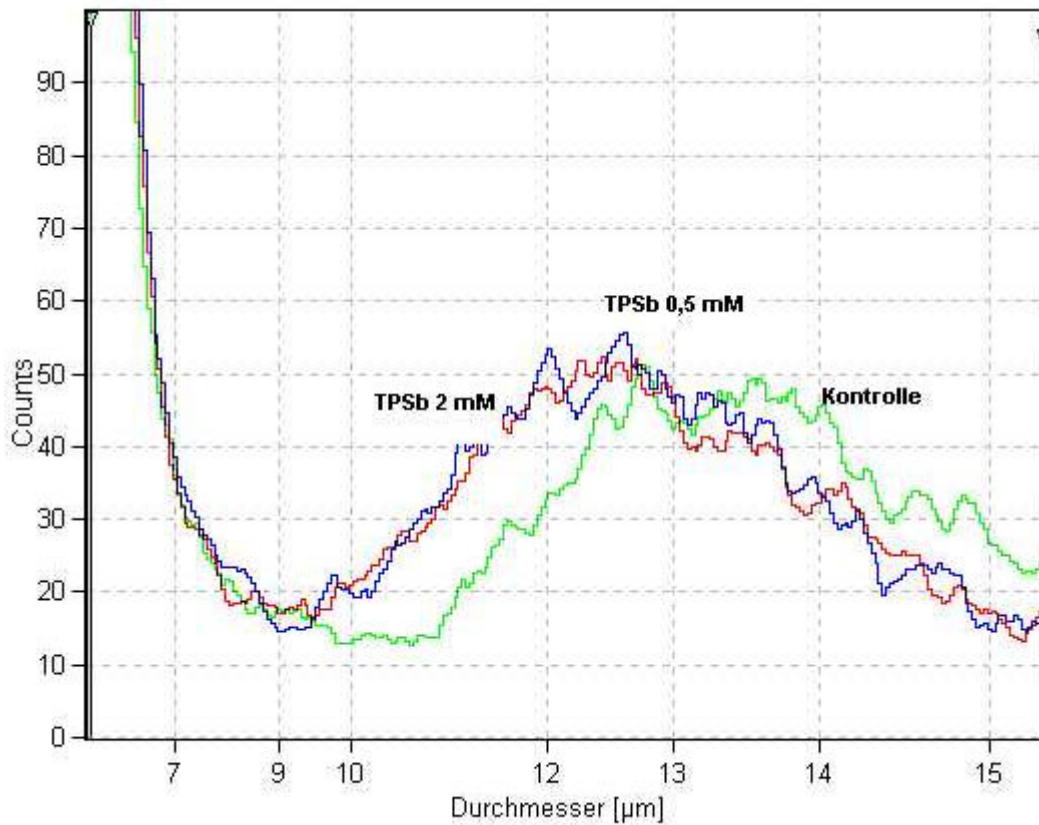


Abb. 34 : Größenverteilung bei K-562 nach Behandlung mit TPSb in einer Konzentration von 0,5 und 2 mM

1.1. 3.6 Mutagenitätstest: *umu*- Mikrotest und DIT-Test

Insgesamt neun der Monomere und Komonomere sowie einige weitere Substanzen wurden für diese Testreihe ausgesucht. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind zum Teil in der Arbeit von Leyhausen et al. (1995), veröffentlicht worden. Weitergehende Untersuchungen zu diesen Substanzen wurden von Heil et al, (1996) durchgeführt und veröffentlicht. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 35-44 dargestellt. Als Positivkontrolle diente 4-Nitrochinolin-N-Oxid (4-NQO) (siehe Abb. 35). Im *umu*-Mikrotest zeigte das 4-NQO eine sehr gute Dosis-Wirkungs-Beziehung bei einer Induktionsrate von bis zu 10 bei 1×10^{-6} Mol/l, während sich die Bakterienzahl (Wachstumsrate in % der Kontrolle) dagegen nur um etwa 25% verringerte.

Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen und ihre Wirkung ist in der Tabelle Nr. 18 dargestellt

Tab. 18: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem *umu*- Mikrottest und DIT.

<i>Substanz</i>	<i>umu- Mikrottest</i>	<i>DIT</i>
Bis-GMA	-	+
TPSb	-	+
UDMA	-	-
CQ	+	+
DEGDMA	(+)	-
DCHA	-	-
HEMA	-	-
BEMA	-	-
DMAPE	(+)	-
Kontrolle	++	++
4-NQO		

++ = stark gentoxisch, + = gentoxisch, - = nicht gentoxisch

(+)= nicht klassifizierbar

Für BEMA, UDMA, HEMA und DCHA konnte in beiden Testsystemen keinerlei mutagene oder gentoxische Effekte durch hohe Induktionsraten oder durch eine stark verminderte DNA- Synthese nachgewiesen werden.

TPSb erwies sich als negativ im bakteriellen *umu*-Mikrotest, hemmte jedoch im hohem Maße die DNA-Synthese im DIT-Test. Höhere Konzentrationen (>10 mM) führten zu einer kompletten Inhibition des prokaryontischen (*umu*- Mikrotest) und des eukaryontischen (DIT-Test) Metabolismus. Im DIT-Gentoxizitätstest zeigte TPSb eine klassische Konzentrations-Inhibitions-Wirkung im Bereich von 5mM bis 0,04 mM. (Abb.35). TPSb hat somit einen nachgewiesenen inhibitorischen Einfluß auf die DNA von Säugerzellen. Eine mögliche Erklärung für die Wirkungsweise von TPSb wird in der Diskussion gegeben.

Bei CQ konnten in beiden Testsystemen mutagene bzw. gentoxische Wirkungen beobachtet werden. CQ zeigte in beiden Testsystemen eine starke Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (siehe Abb. 39). Die Induktionsrate des *umu*- Mikrotestes lag bei 20 mM CQ bei 4,1. Beim DIT lag die DNA-Synthese bei 10 mM bei 31% der Kontrolle. Die Substanz erwies sich auch als stark zelltoxisch in beiden Testsystemen. Die Wachstumsrate sank beim *umu*-Mikrotest kontinuierlich von 0,9 bei 0,3 mM auf 0,1 bei 20 mM. Im DIT sank die Zellzahl auf 44% bei 10 mM.

DEGDMA und DMAPE hatten in *umu*-Mikrotest einem positiven Effekt, jedoch mit Resultaten von schwach bis zu stark positiv. Bis-GMA zeigte im DIT einen deutlichen gentoxischen Effekt, nicht aber im *umu*- Mikrotest .

Zudem konnten gentoxische Effekte aufgrund der starken zytotoxischen Wirkungen nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Induktionsrate bei Bis-GMA und UDMA von <1 im *umu*- Mikrotest ließ keine Beurteilung der Gentoxizität in diesem Testsystem zu.

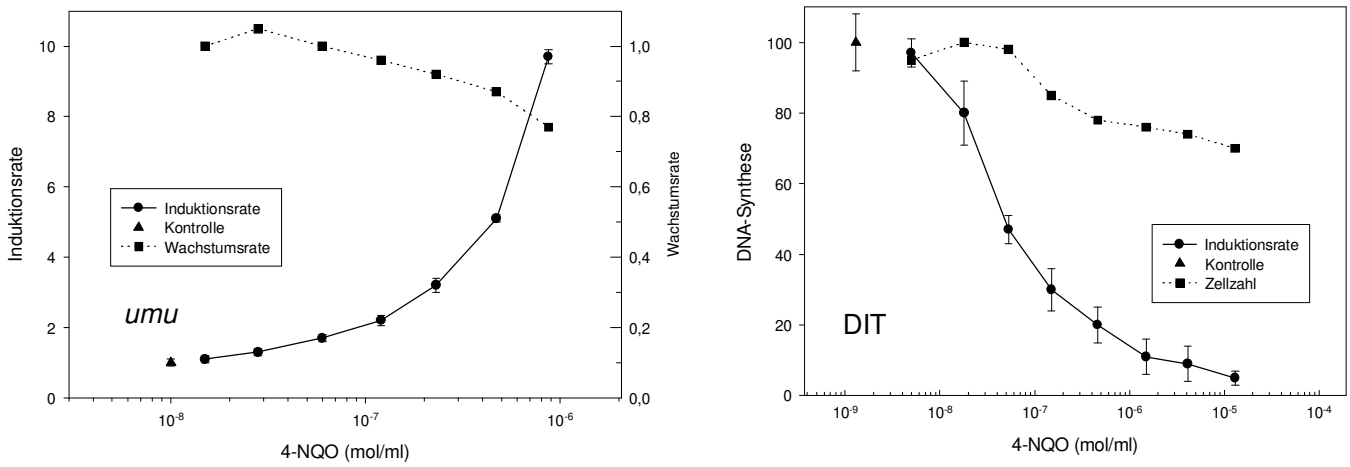


Abb. 35: Effekt der Positiv-Kontrolle 4-NQO im DIT und *umu*-Mikrotest. Daten aus einem repräsentativen Experiment

In Abbildungen 36 bis 44 sind die Effekte der untersuchten Substanzen im *umu*-Mikrotest und im DIT graphisch dargestellt.

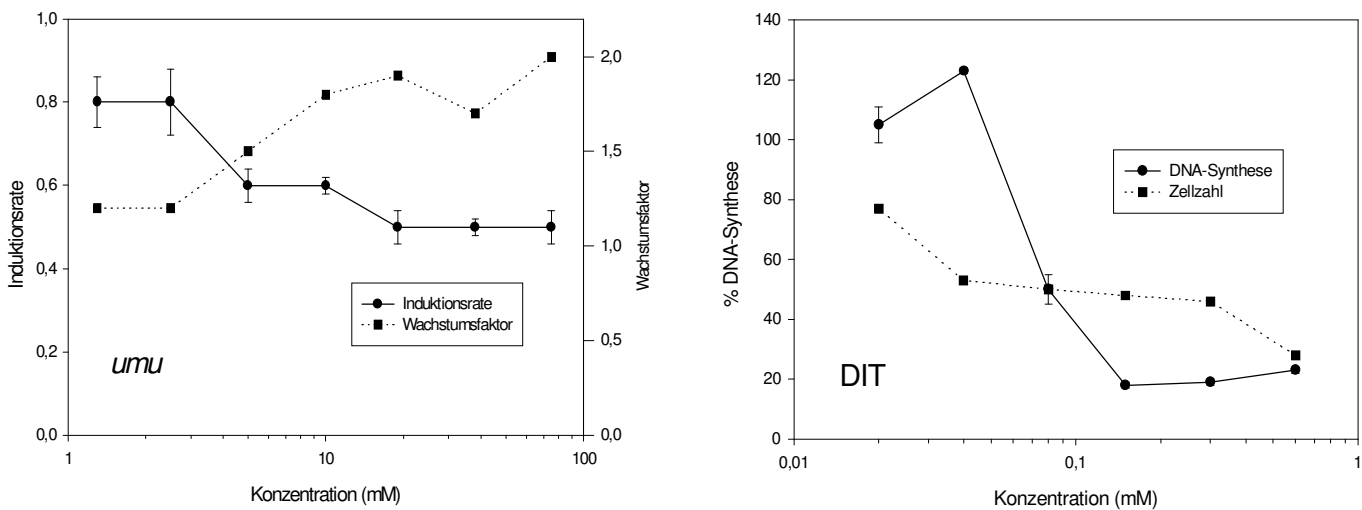


Abb. 36: Effekt von Bis-GMA im DIT und *umu*-Mikrotest

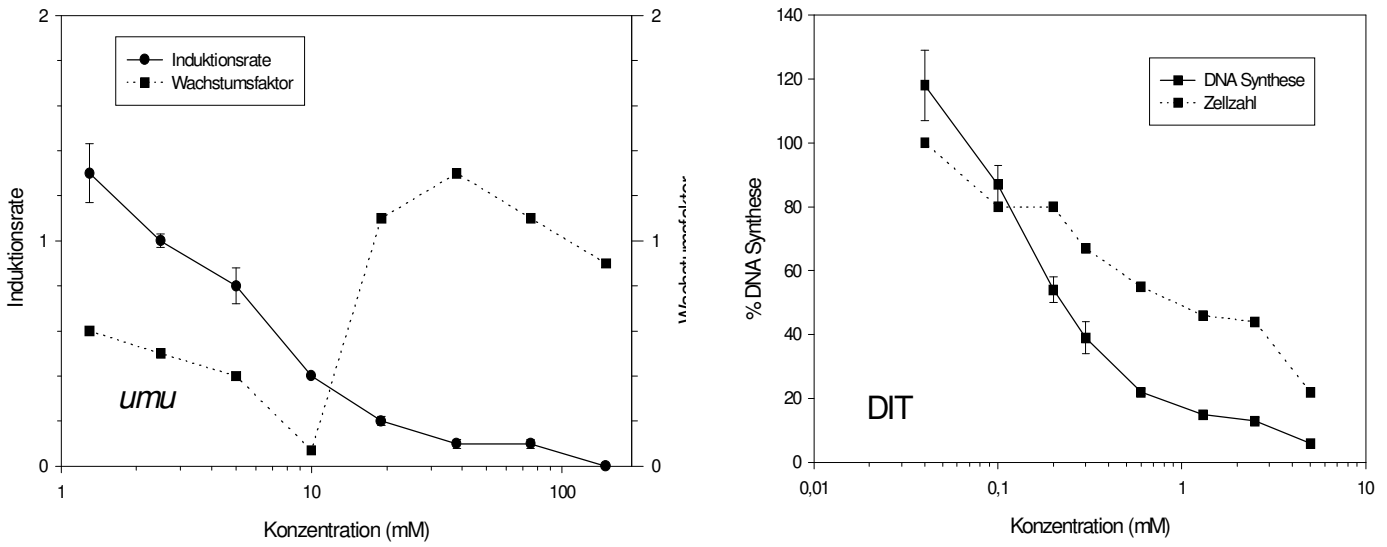


Abb. 37: Effekt von TPSb im DIT und *umu*-Mikrotest

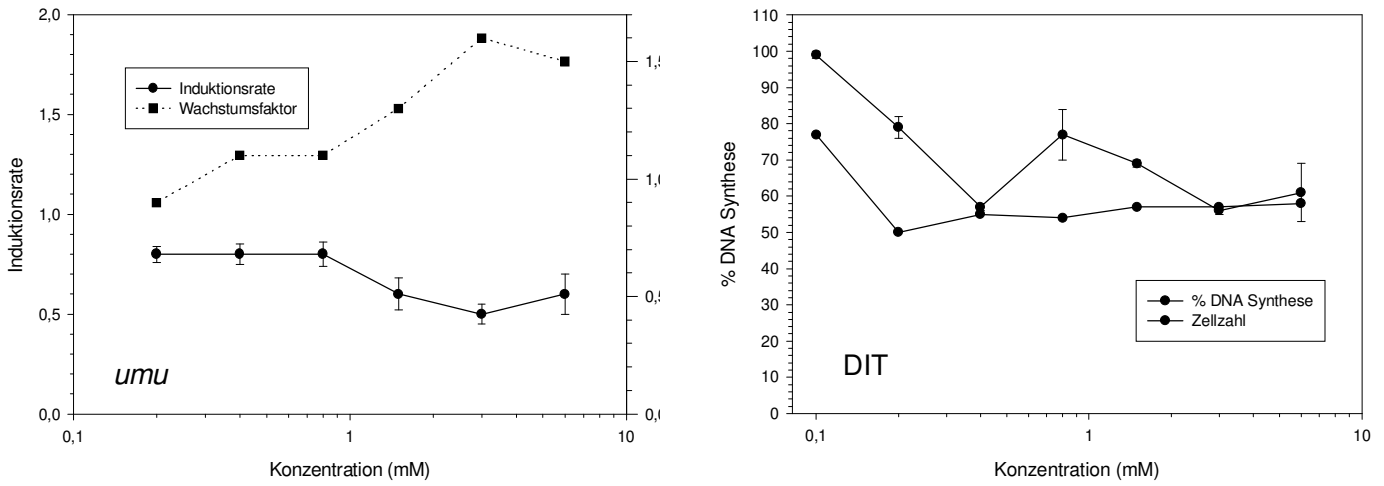


Abb. 38: Effekt von UDMA im DIT und *umu*-Mikrotest

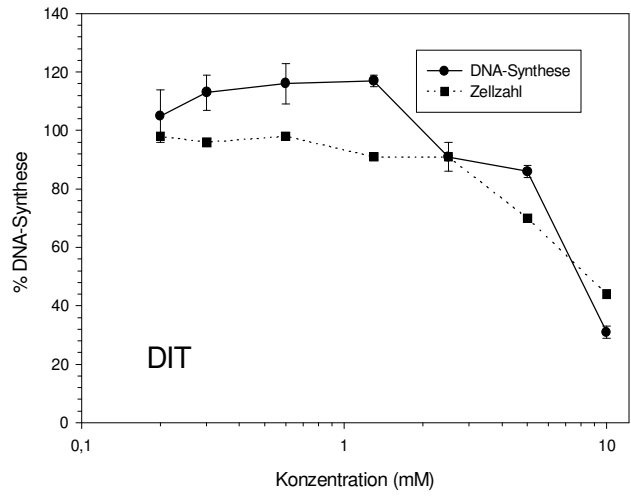
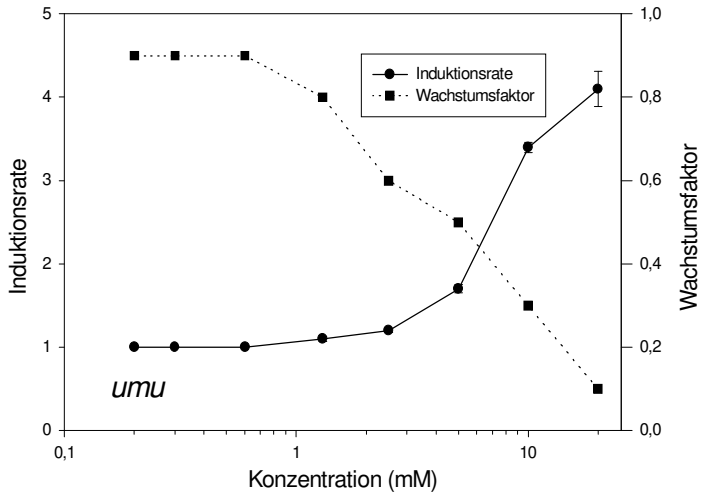


Abb. 39: Effekt von CQ im *umu*-Mikrotest und DIT

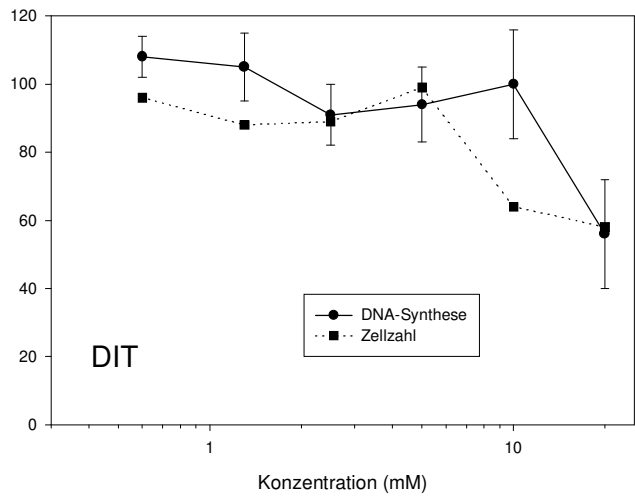
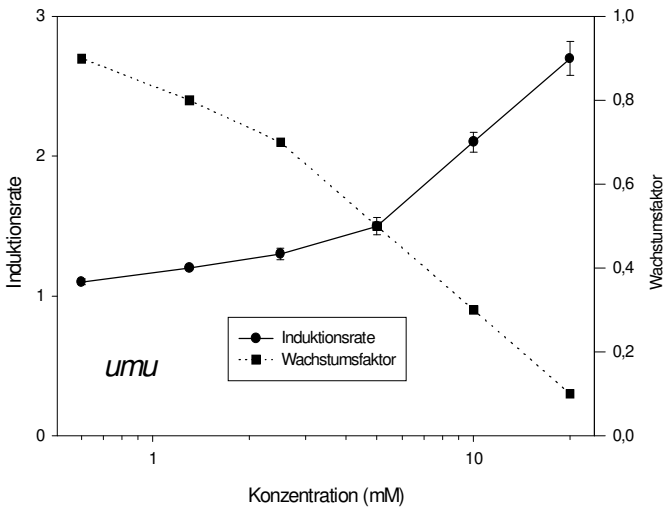


Abb. 40: Effekt von DEGDMA im *umu*-Mikrotest und DIT

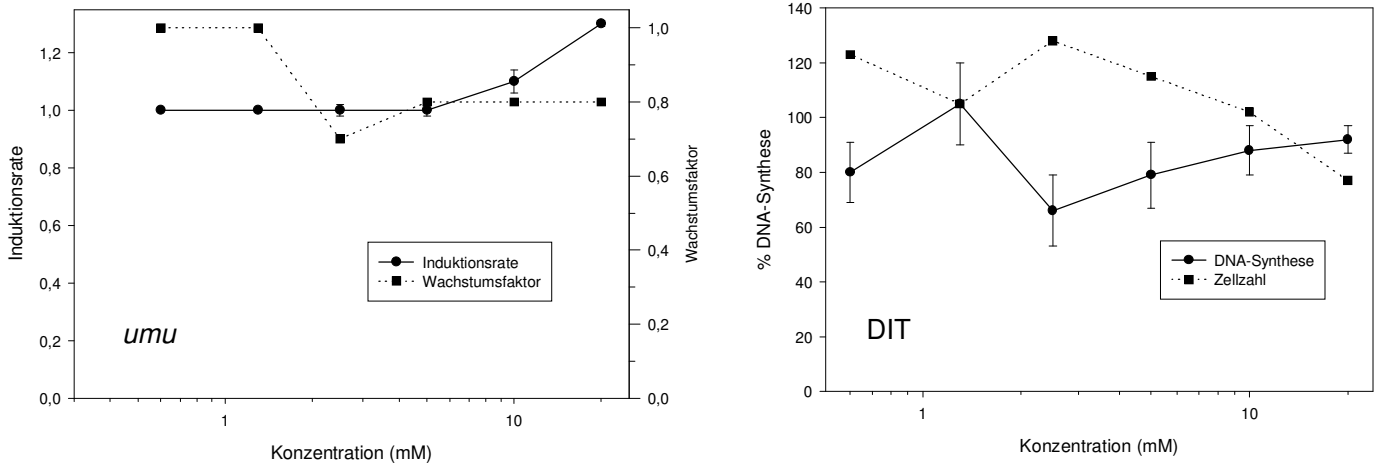


Abb. 41: Effekt von DCHA im *umu*-Mikrotest und DIT

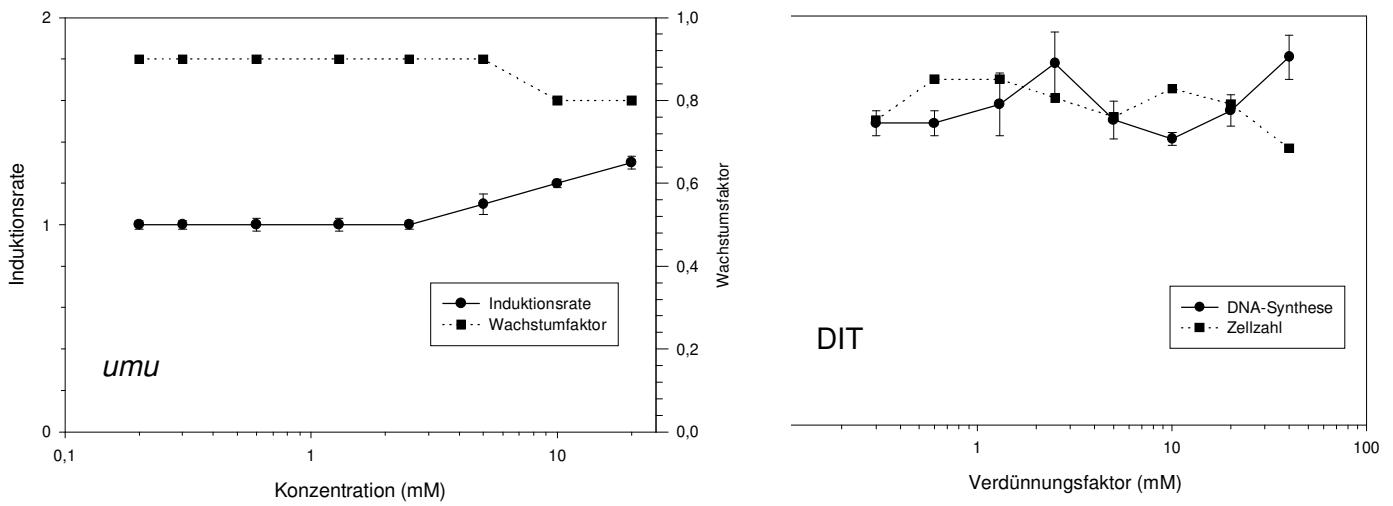


Abb. 42: Effekt von HEMA im *umu*-Mikrotest und DIT.

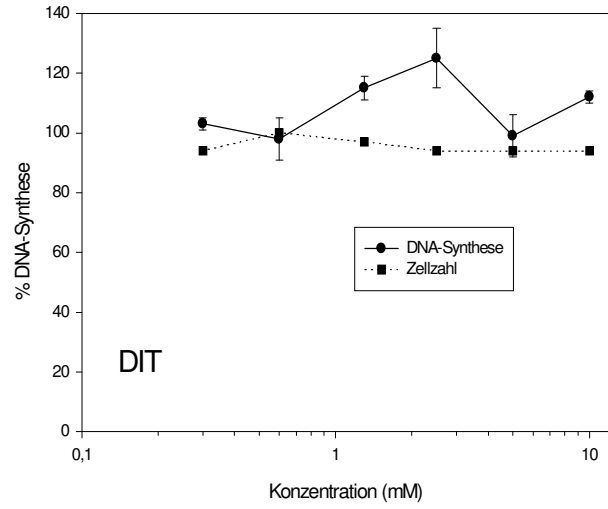
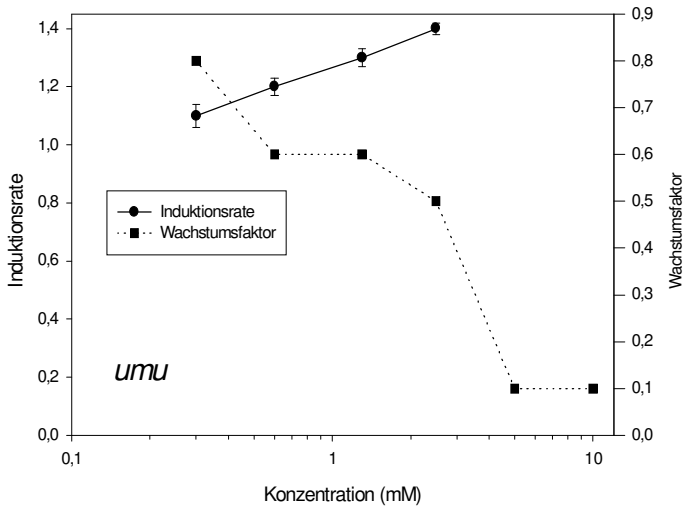


Abb. 43: Effekt von BEMA im *umu*-Mikrotest und DIT.

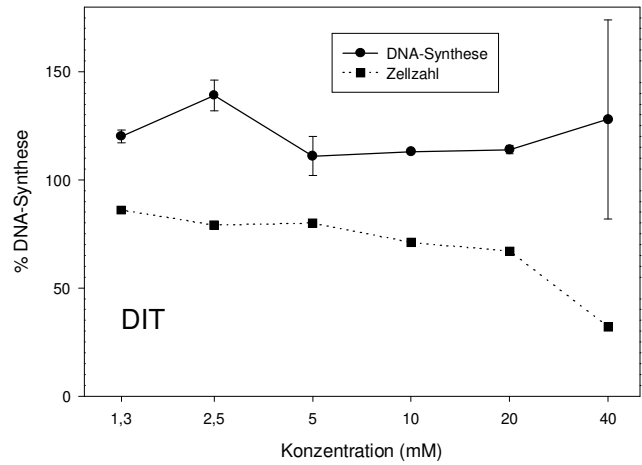
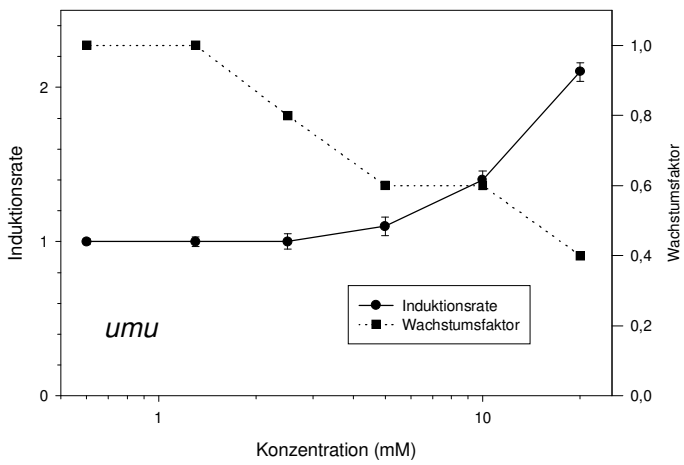


Abb. 44: Effekt von DMAPE im *umu*-Mikrotest und DIT

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Testmethoden

Für eine schnelle und genaue Bestimmung der ED_{50} , die auf der quantitativen DNA-Bestimmung beruht, hat sich das hier entwickelte System des fluoreszierenden DNA-markierenden Farbstoffes H33342 neben dem BCECF-AM sowie das Sulforhodamin 101 als Proteinmarker bewährt. Die Ermittlung der ED_{50} mit fluoreszierenden Farbstoffen bietet gegenüber anderen Methoden mehrere Vorteile:

- 1) Der Test kann in Abhängigkeit von der Proliferationsdauer innerhalb recht kurzer Zeit (48-92 h) durchgeführt werden, wobei für die eigentliche Messung nur wenige Minuten benötigt werden.
- 2) Die Auswertung des Tests erfolgt EDV-gestützt. Dies ermöglicht eine schnelle Auswertung.
- 3) Auf einer 96-well Platte können bis zu 9 Konzentrationen angesetzt werden, wobei je 6 Wells pro Konzentration zu einer statistisch hohen Anzahl pro Testansatz führen.
- 4) Durch die Verwendung von Farbstoffen, die auf verschiedene Zellkomponenten reagieren, ist es möglich zur gleichen Zeit verschiedene Parameter zu untersuchen. Das erspart Zellmaterial und Materialkosten.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstest zeigten, daß der Hoechst Farbstoff H 33342 gegenüber den beiden anderen Farbstoffen eine höhere Sensitivität aufwies.

Die mit dem H 33342 ermittelten ED_{50} -Werte zeigten meist geringere ED_{50} -Werte an und wiesen dabei gegenüber den anderen Markierungsmethoden die geringste Streuung auf. Der Grund für diese geringeren ED_{50} -Werte kann in der höheren Sensitivität des Hoechst-Farbstoffes vermutet werden.

Blaheta et al. (1991) konnten bereits 2,5 µg reiner DNA mit H33342 und H33258 in einem Well nachweisen. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 7 pg pro Zelle lassen sich mit den Farbstoffen schon weniger als 300 Zellen detektieren. (Young-Jo, et al, 1988). Diese hohe Spezifität der Bindung der Farbstoffe an DNA zusammen mit dem

sehr guten Zellzahl-Fluoreszenz-Verhältnis lassen die Markierung mit H33342 gegenüber anderen Methoden der Proliferationsmessung wie dem ^3H -Thymidin-Assay als gute, brauchbare Alternative erscheinen. Die Messung mit dem Hoechst-Farbstoff zeigte sich auch gegenüber der BCECF-AM Messung überlegen in der Sensitivität und in der Standardabweichung. Bewegten sich die Standardabweichungen bei H 33342 bei etwa 5-10%, so lagen diese bei BCECF-AM im Mittel über 10%. Als Ursache für diese Schwankungen vermuten Brenan und Parisch (1984), daß das intraplasmatische Carboxyfluorescein die Zellen leichter verlassen kann, als das sehr stark an die DNA gebundene H 33342. Auch wurden mit Sulforhodamin 101 höhere ED_{50} -Werte als mit der H 33324 ermittelt. Ein möglicher Grund der erhöhten ED_{50} -Werte könnte in der Präparationsmethode liegen, bei der zunächst Sulforhodamin 101 im Überschuß zugegeben wird, der später wieder herausgespült wird. Dabei kann es zu Resten von nicht an Protein gebundenem Farbstoff im Well kommen, der jedoch dann mitgemessen wird. Die Proteinmessung erfolgt mit am Wellboden fixierten Zellen, so das hier auch neben den lebenden bereits abgetötete, aber nicht herausgewaschene Zellen gleichermaßen mit erfaßt werden. H 33342 markiert jedoch selektiv lebende Zellen, so dies die höheren ED_{50} -Werte bei Sulforhodamin 101 erklärt, da bei der Proteinmessung die Gesamtzahl aller lebenden und toten Zellen erfaßt werden.

Zwar können alle drei Methoden zur Bestimmung einer ED_{50} eingesetzt werden. Die Messung der ED_{50} mit dem H 33342 stellt jedoch von allen drei in dieser Arbeit benutzten Meßmethoden die genaueste Methode dar, da dieser Farbstoff sehr selektiv die DNA lebender Zellen markiert und das Zellzahl-Fluoreszenz Verhältnis sehr linear ist.

Enzymtests wie BCECF-AM bieten jedoch den Vorteil von kontinuierlichen Messungen über die Zeit, wobei sich Meßwerte aufaddieren und somit das Signal erhöht wird oder Kinetiken erfassbar sind. So wurde in dieser Arbeit eine Abnahme der Membranintegrität um 50% bereits nach 7 h Inkubation mit Bis-GMA und UDMA beobachtet.

Solche Messungen haben aber häufiger den Nachteil, unspezifisch zu sein oder (z.B. bei der Testung von Legierungen) durch Metallionen über die eigentliche toxische Wirkung seitens des Testmaterials hinaus beeinflusbar zu sein. Metalle können zudem Koenzymfunktion ausüben, bzw. andere wichtige Funktionen im Zellstoffwechsel ausüben, die bis heute noch nicht geklärt sind.

Zytotoxizitätstestungen sind heute anerkannte Verfahren, um das biologische Verhalten medizinische Produkte zu beurteilen (EN 30993-5 1993). Die Norm schreibt allerdings nicht konkret vor, welche Testverfahren zugelassen sind. Daher existieren heute eine Reihe von Zellkulturmodellen, für die oft sehr unterschiedliche biologische Endpunkte verwendet werden. Von daher sind Unterschiede in der Bestimmung der Zytotoxizität eines Materials nicht allein auf die Zellauswahl oder Inkubationsbedingungen zurückzuführen, sondern auch auf die unterschiedlichen Testmethoden.

Dekker et. al (1994) verglichen drei Methoden zur Bestimmung der zellulären Toxizität. Er benutzte zum einen die MTT-Methode, bei der durch Reduktion das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumsalz (3-[4,5-dimethylthiazol-2y]-2,5diphenyl Tetrazoliumbromid) durch die mitochondriale Dehydrogenase in eine wasserunlösliche violette Formazanform überführt wird. Diese Veränderung kann quantitativ durch photometrische Messung ermittelt werden. Als zweite und dritte Methode wurde der Proteingehalt der Zellen und die Bestimmung der DNA-Synthese durch BrdU-Einbau zum Vergleich herangezogen.

Der BrdU-Einbau als Nachweis der DNA-Syntheseaktivität zeigte gegenüber den anderen beiden Methoden die größte Sensitivität. Die MTT-Methode erwies sich sensitiver als die Proteinbestimmung. Bean et al. (1995) fanden eine statistisch gesicherte Korrelation bei der Untersuchung mit zwei unterschiedlichen Techniken für die Beurteilung der Toxizität von acht verschiedenen Füllungsmaterialien. Dabei kamen der intrazelluläre MTT sowie zur Messung der Membranintegrität der ⁵¹Cr-Release-Test zur Anwendung. Solche Tests, die die Wechselwirkungen mit der Membran messen, stellen meistens zeitlich begrenzte Ereignisse dar. Daher sind Messungen von Aktivitäten, die sich auf intrazelluläre Eigenschaften der Zelle beziehen, meist sensitiver als Bestimmungen, die sich auf die Membranwechselwirkungen beziehen. Diese Hypothese wird von Bean (1995) bekräftigt, der berichtet, daß die ED₅₀ Werte die mit der MTT Methode bestimmt wurden, grundsätzlich niedriger waren als diejenigen ED₅₀-Werte, die mit dem ⁵¹Cr-Release-Test ermittelt wurden.

Papadimitriou und Lelkes (1993) verglichen die Sensitivität des MTT-Tests mit der von H 33258. Beide Methoden wiesen dabei eine sehr hohe Korrelation auf. Da H 33258 und H 33342 eine vergleichbare Affinität zur eingesetzten DNA besitzen (siehe 3.2.1), lassen sich die Aussagen auch auf H 33342 übertragen. Somit ist die quantitative Messung der Proliferation mit den Hoechstfarbstoffen vergleichbar mit der Sensitivität des MTT-Testes.

Grundsätzlich agieren toxische Substanzen nicht nur auf einer Ebene, sondern es wird im allgemeinen die zelluläre Homöostasis gestört (Dekker et al., 1994). Dabei können mehrere Zellfunktionen angegriffen werden. Das Ausmaß dieser Störung kann dann mit der einen oder anderen Meßmethode ermittelt werden. Dabei kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß es Substanzen gibt, die nur eine einzige spezifische Schädigung der Zellen bewirken, die erst nach längerer Zeit zu einer Störung der Homöostasis führen kann.

Daher schlagen mehrere Autoren die gleichzeitige Messung mehrerer Parameter vor, um das Ausmaß und Wirkungsart von Substanzen besser abschätzen zu können (Kirkpatrick, 1992; Kirkpatrick und Mittermayer, 1990).

Die in dieser vorliegenden Arbeit erarbeiteten Testmethoden auf der Basis von fluoreszenzmarkierenden Farbstoffen können in ihrer Kombination ergänzend zu anderen photometrischen Messmethoden wie der MTT-Test eingesetzt werden, um diese oben genannten Kriterien zu erfüllen.

4.2 Vergleich der Zellarten

Primäre Zellen zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Herkunft und ihr heterogenes Erscheinungsbild sowie geringere Vermehrungsgeschwindigkeit und Degeneration durch Alteration oder Erschöpfung der Wachstumspotenz gegenüber permanenten Zelllinien aus. Daher können Aussagen hinsichtlich der möglichen Toxizität *in-vivo* nur mit Einschränkungen gemacht werden. Der Aussagewert von ED₅₀-Untersuchungen liegt darin, daß diese Testreihen unter identischen und in allen Labors mit gleichen Konditionen durchgeführt werden können (Geurtsen, 1998). Deshalb können reproduzierbare Bewertungen von Materialien und isolierten Substanzen getroffen werden (Hanks et.al, 1991; Langeland, 1978).

Grundsätzlich ist ein Vergleich der verschiedenen zitierten Zellkulturstudien aber nur bedingt möglich, da sich meist viele Versuchsparameter, wie Zelltyp, Kulturmedium, Materialvorbereitung, Zellaussaatdichte, Inkubationszeit, Mengen- und Oberflächenverhältnis, Material/Kulturmedium sowie der biologische Endpunkt (Schmalz, 1994) recht uneinheitlich präsentieren. Hier müssen die seit Jahren laufenden nationalen und internationalen Normungsbemühungen (DIN/EN/ISO usw.) sinnvollerweise ansetzen, um

allgemeingültige Rahmenbedingungen für ein biologisches Screening zu schaffen. Es konnte jedoch in dieser vorliegenden Arbeit keine Zelllinie gefunden werden, die generell weniger bzw. sensitiver auf die hier untersuchten Substanzen reagierte als die anderen Zelllinien. Primäre Wurzelhautfibroblasten und Pulpafibroblasten erwiesen sich bei den meisten hier untersuchten Substanzen empfindlicher als die 3T3- und Gingivafibroblasten. In allen Zellkulturen hatten diejenigen Substanzen, die sich im Test als stark zytotoxisch herausstellten wie Bis-GMA, UDMA, Bis-MA, DEGDMA, TEGDMA, Bis-EMA, DMTDA, DMDDA, BHT, TPSb und TPP sowie einige weniger schädigende Substanzen wie DDMA, DEAE und DMAPE ähnliche Effekte. Substanzen, die weniger oder kaum zytotoxische Effekte (z.B. EGDMA) induzierten, wiesen dagegen größere Varianzen in der ED_{50} bei den verschiedenen Fibroblastenarten auf. Das kann durch inherente Unterschiede bei den einzelnen Zelllinien, wie z.B. die Membranstabilität, verursacht sein. Diese Beobachtungen zeigen auf, daß es sehr sinnvoll ist, Screeningtests mit mehreren Zelllinien durchzuführen, da die benutzte Zelllinie einen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis haben kann. Daher sollten weitere Untersuchungen in dieser Richtung den Einfluß des Zellkulturtyps auf das Resultat der ED_{50} -Bestimmung überprüfen, um die diese hier aufgeworfenen Fragestellungen genauer zu untersuchen. Diese Beobachtungen werden von verschiedenen Autoren geteilt (Heidemann, 1982, Klaiber, 1979, Feigal, 1985).

Hensten-Petersen und Hegeland (1981) verglichen die Sensitivität von drei humanen Zelllinien bei der biologischen Bewertung von Kunststofffüllungsmaterialien mit vier unterschiedlichen biologischen Endpunkten. Dabei fanden sie, daß die Empfindlichkeit der Zellen variiert. Sie erklärten das mit den unterschiedlichen Kulturmedien, mit denen die verschiedenen Zelltypen kultiviert wurden. Zudem vertreten einzelne Autoren unterschiedliche Meinungen über die Verwendung von primären humanen Zellen in Kurzzeittoxizitätstests. Feigal et al., (1985) verglichen die Sensitivität von Pulpazellen mit denen von transformierten Mäusefibroblasten (L 929). Sie fanden eine signifikant höhere Sensitivität der diploiden Pulpazellen gegenüber der transformierten Zelllinie. Der Grund für diese unterschiedliche Sensitivität ist unbekannt.

Daneben gibt es aber auch Autoren, die sich gegen die Verwendung von primären humanen Zellen aussprechen. Die Arbeit mit diploiden menschlichen Zellen bringt erhebliche technische Probleme mit sich (Schmalz, 1981). Insbesondere das langsame Wachstum dieser Zellen bedingt einen höheren Material- und Kostenverbrauch. Nach der

Trypsinierung heften sich die Zellen in Klumpen an und bilden keine Einzelzellsuspension. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Trypsinierungen konnte die Neigung zu Klumpenbildung jedoch durch ein ausreichendes Suspendieren mit der Pipette (siehe Kapitel 2.9) verhindert werden.

Auch können das heterogene Zellbild, Degenerationen im Verlaufe der Passagenzahl und die instabile Mitoseaktivität bei den diploiden primären Zellen die Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen einschränken.

Jedoch reagierten die humanen Zellen in unserer Studie stets empfindlicher als die immortalisierten Maus-Zellen. Die enge Korrelation der Ergebnisse zwischen beiden Zellarten läßt auf einen Reaktionsmechanismus schließen der auf beide Zellarten gleich wirkt, also unspezifisch ist. Schmalz zieht daraus den Schluß, daß für die biologische Testung auf die Verwendung von humanen Zellen verzichtet werden kann. Dagegen vertritt Heidemann (1982) die Meinung, daß Paralleluntersuchungen von Dauerzellkulturen und primären Zellen nützlich seien, da sie eine wertvolle Ergänzung zu den histologisch-zytologischen und den rein auf zahlenwert-orientierten Meßmethoden darstellen.

Gerade die Differenzierung der primären Zellen scheint für die Ermittlung eines Toxizitätsprofils und der Übertragbarkeit auf die In-vivo-Situation gegenüber den ausdifferenzierten Dauerzellkulturen von Vorteil zu sein.

Ein möglicher Grund für die höhere Sensitivität von primären Zellen könnte in der geringeren Adaption an die Medium- und Laborbedingungen sein als bei den permanenten Zellen. Somit wirken sich Schädigungen von toxischen Substanzen wesentlich stärker aus als bei den permanenten Zellarten, die meist adaptierter an In-vitro-Situation sind. Auch andere Autoren zeigten diesen Unterschied auf (Schmalz, 1981, Hensten-Petersen, 1981; Berstein et. al,1991).

Auch kann die künstliche Zellkultur-Umgebung Artefakte induzieren. Die Art der Oberfläche der Flaschen und Wells hat Einfluß auf die Zelle und kann selektiv das Wachstum oder die Differenzierung fördern (Peters, 1992). Primäre Zellen weisen vermutlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft eine größere Varianz in den Toxizitätstests auf als die 3T3-Zellen. Die Abweichungen in den einzelnen Tests betragen 15-20%, während die Varianz bei den 3T3 Zellen nur bei etwa 10% lag. Der Grund dürfte vermutlich in der größeren Heterogenität der primären Zellen liegen. Diese höhere Variabilität ist aber eher positiv zu sehen, da sie es erlaubt den Schädigungsbereich einer

Substanz von den In-vitro-Bedingungen auf die den In-vivo-Bedingungen im oralen Gewebe besser abzuschätzen, als es eine zwar genau bestimmte ED₅₀-Konzentration bei einer Zellart vermag, die jedoch nicht dem oralem Zielgewebe entspricht.

Jedoch zeigen auch etablierte Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. Wataha et al., (1994) untersuchten vier verschiedene Dauerzellkulturen unterschiedlichsten Ursprung auf ihre Sensitivität gegenüber Metallionen. Es zeigte sich, dass nicht eine hohe Stoffwechselaktivität oder eine hohe Verdoppelungsrate verantwortlich ist für eine höhere Empfindlichkeit der Zellen auf die Metallionen. Bei den vier getesteten Zelllinien wiesen die 3T3-Zellen zwar die größte Sensitivität auf, die L929 Zellen hatten jedoch die höchste Vermehrungsrate. Hanks, et al. (1981) konnten ebenfalls eine hohe Sensitivität der 3T3.-Zellen auf einen Befestigungszement nachweisen. In dieser Arbeit wurden 3T3-Zellen verwendet, da sie für Zytotoxizitätstestungen sehr häufig verwendet werden und eine gegenüber anderen etablierten Zelllinien höhere Sensitivität aufweisen. Neben den hier untersuchten Substanzen wurden auch Eluate von Wurzelfüllmaterialien und Kompositen mit dieser Methode in verschiedenen Zellsystemen untersucht (Leyhausen, 1996, Geurtsen, et. al, 1998). Auch hier zeigten die primären Zellkulturen gegenüber den 3T3-Zellen meist eine höhere Sensibilität.

In den ED₅₀-Tests der vorliegenden Arbeit wurden für 3T3- und primäre Zellen spezifische Anheftungs- und Behandlungszeiten gewählt, die eine Testung in der logarithmischen Teilungsphase der Zellen gewährleisten und auch die unterschiedlichen Teilungsraten der Zellen berücksichtigen. In Abhängigkeit von der Zellaussaatdichte ergaben sich somit Inkubationszeiten von 1 bzw. 2 Tagen. Andere Autoren stellten Methoden vor, die eine langfristige (bis zu 3 Wochen) Betrachtung zelltoxischer Effekte ermöglichen sollten (Arvidsen et al. 1986, Arenhold-Bindslev et al., 1986).

Angesichts der im konfluenten Stadium der Monolayer einsetzenden Kontaktinhibition (Neupert und Welker, 1975) dürfte die Aussagekraft solcher Langzeit-Zellkulturversuche jedoch sehr begrenzt sein. Dementsprechend empfahlen schon früher einige Autoren für In-vitro-Tests von zahnärztlichen Werkstoffen die Verwendung von diploiden humanen Zellen, die dem anwendungsspezifischen Zielgewebe (target cells) entstammen (Wilsnack et al. 1973, Feigal et al. 1985, Spangberg 1973).

4.3 Bewertung der Toxizität der untersuchten Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Toxizität von insgesamt 38 Komponenten von Kunststofffüllungsmaterialien mit primären humanen Zellkulturen und einer permanenten tierischen Zelllinie untersucht. Die ED_{50} -Konzentrationen von zwei Substanzen, DBPO und HMBP zeigten beträchtliche Abweichungen in der ED_{50} -Konzentration bei den einzelnen Zelltypen. Ergänzend erwiesen sich die 3T3-Zellen als weniger sensitiv bei der Bestimmung der Toxizität dieser Substanzen als die primären Zellarten. Ein Hinweis auf eine mögliche Ursache dieses Unterschiedes bei DBPO zeigte Terakado (1984) auf. Er benutzte die mikrosomale Fraktion der Rattenpulpa und wies nach, daß DBPO die Membran angreift. Dieses deutet darauf hin, daß 3T3-Zellen möglicherweise weniger sensitiv auf Substanzen reagieren, die die Membranen der Zellen angreifen als die hier benutzten primären Zellen. Somit könnten 3T3 Zellen weniger anfällig für Membran-induzierte zytotoxische Effekte wie sie von DBPO ausgehen. Die Interaktion von Methacrylaten und Acrylaten auf Liposomen als ein Modell für biologische Membranen untersuchte Fujisawa et al.(1984). Sie fanden eine starke Wechselwirkung von BEMA mit den Liposomen verursacht durch die Doppelbindungen in der Phenylgruppe. Dagegen zeigten sich die 3T3-Zellen in dieser Arbeit weniger sensitiv (ED_{50} : 4,10 mM) als die primären Fibroblasten (1,93-2,25 mM). Auch dies könnte ein Hinweis auf mögliche unterschiedliche Membranstrukturen zwischen den primären Zellen und den 3T3-Zellen sein.

Das höchste toxische Potential besaßen die beiden wichtigsten Monomere, Bis-GMA und UDMA sowie das Bis-MA. Zu ähnlichen Beobachtungen kamen Hanks et al. (1991). Sie untersuchten die ED_{50} und die ED_{10} von insgesamt 11 Bestandteilen zahnärztlicher Füllungswerkstoffe an 3T3 Zellen. Die ED_{10} gibt dabei die Toxizität an, bei der 10 % der Zellen abgestorben sind. Die ED_{10} -Werte für UDMA, Bis-GMA und ethoxylites Bisphenol A waren dabei wesentlich geringer als die korrespondierenden ED_{50} Werte vermuten lassen. Aufgrund dieser Daten diskutierten die Autoren die Möglichkeit einer möglichen chronischen Toxizität dieser Substanzen. Sie vermuteten bei niedrigen Konzentrationen der schädigenden Agens eine Schwächung des Metabolismus der Zellen, die damit anfälliger werden für Schädigungen anderer Art. Weiterhin wurden Membranverletzungen aufgrund der Bildung von Bis-GMA indizierten Peroxiden sowie

eine starke zellzytische Aktivität von Bis-GMA gefunden (Terakado, et al.; 1984 und Fujisawa et al.; 1984).

Joshii (1996) vermutet, daß die starke Toxizität von Bis-GMA und UDMA sich wahrscheinlich aufgrund ihrer besonderen molekularen Struktur unterscheidet von denen anderer Dimethacrylate. In der Molekülgröße vergleichbare andere Monomere wie 1,1 DDMA und 1,2 DDMA zeigten eine geringe Toxische Wirkung. Obwohl diese umfangreichen und sehr großen Moleküle nicht durch das Komposit diffundieren können und sehr schwer wasserlöslich sind, sind jedoch Anteile in wäßrigen Extrakten von Kompositen nachgewiesen worden (Spahl, 1991). Es kann daher vermutet werden, das diese Substanzen zwar keine Akute nachweisbare Toxizität an den Zellen verursachen, jedoch können diese Substanzen eine wichtige Rolle bei der chronischen Toxizität von Kunststofffüllungsmaterialien spielen.

Eine sehr hohe Toxizität wurde bei den beiden Komonomeren DEGDMA und TEGDMA gefunden. Zusätzlich verursachte TEGDMA mikrosomale Peroxidation und kann an Liposomen die Bilayermembran auflösen.

Im Gegensatz zu den Ethylenglycol-Dimethacrylaten erwiesen sich die Monomere HEMA und BEMA und besonders das als Verdünner eingesetzte DDMA signifikant weniger zytotoxisch in allen hier getesteten Zellkulturen. Oliva et al. (1996) fand in Extrakten von einem Füllungsmaterial HEMA zu einer Konzentration von 15-20 mM in der ersten Extraktion und in weiteren Extraktionen noch 4-6 mM. Die geringere Toxizität steht damit im Gegensatz zur hohen Löslichkeit von HEMA. Li et al. (1999) untersuchten die Zytotoxizität von HEMA an Pulpafibroblasten. Sie fanden daß das Zellwachstum und die DNA-Synthese in der Synthese- und in der G₂- sowie in der Mitose-Phase bei hohen Konzentrationen von HEMA gestört wird. Der Mechanismus dafür ist unbekannt.

1,1 DDMA und 1,2 DDMA waren in den hier durchgeführten Testreihen nichttoxisch. In Wasserextrakten von ausgehärtetem Proben einiger Füllungsmaterialien konnte nur DDMA in Spuren nachgewiesen werden. Damit stellt DDMA eine interessante biokompatible, weniger zytotoxische Alternative zu den wasserlöslichen Monomeren wie HEMA dar (Spahl, 1995).

Joshii (1996) versuchte die Toxizität von Monomeren aus der Molekularstruktur zu erklären. Bei Dimethacrylaten steigt die ED₅₀ mit der Anzahl der Oxyelthylenketten (CH₂CH₂O) an. Dimethacrylate mit 14 oder weniger Oxyelthylenketten wie DEGDMA und TEGDMA zeigten dagegen eine wesentlich höhere Toxizität als Dimethacrylate mit

23 Oxyethylketten. Die geringe Zytotoxizität der Dimethacrylate über 23 Oxyethylketten liegt vermutlich darin, dass diese Monomere aufgrund ihrer Größe die Zellmembran nicht passieren können, wohingegen Monomere mit weniger als 14 Oxyethylketten davon nicht betroffen sind und die Membran passieren können.

Ein sehr hohes toxisches Potential wurde in allen Zellkulturen für den Inhibitor BHT, den Initiator DMBZ und den Coinitiator DMTDA festgestellt. Zwar kommen diese Zusätze in sehr geringen Mengen in den Materialien vor, jedoch können diese Substanzen durch hydrolytische Degeneration und Erosion der Polymere sowie durch eine hohe Anzahl der Füllungen im Mund im Laufe der Zeit klinisch bedenkliche Konzentrationen erreichen.

Daher sollten die hier getesteten Substanzen durch andere weniger toxische Zusätze ersetzt werden.

Der wichtige Photoinitiator CQ, neben den anderen getesteten Substanzen (DHEPT, DMPT, DCHA, DEAE und DMAPE) zeigte nur geringe oder kaum toxische Reaktionen auf die Zellen. Die von Hanks, (1991) bei CQ und DHEPT ermittelten Werte bekräftigen die hier gefundenen Daten. Dagegen sind keinerlei Daten über DMPT, DCHA, DEAE und DMAPE verfügbar.

Neben den Substanzen die für die Funktion eines Komposits zuständig sind, lassen sich noch Verunreinigungen oder auch neue Substanzen, die durch die Polymerisation entstanden sind nachweisen. Diese Substanzen wiesen meist eine moderate oder geringe Zelltoxizität auf.

Das Derivat von TEGDMA, TEG erwies sich gegenüber dem TEGDMA (ED_{50} 0,12-0,26 mM) in dem hier aufgeführten Testverfahren als wenig toxisch mit einer ED_{50} von 1,99 mM bei den Pulpafibroblasten bis zu über 5 mM bei den Gingivafibroblasten. Diese Daten stehen im Widerspruch zu der Hypothese von Fujisawa, (1988), der die Wechselwirkung von TEGDMA mit Phosolipidliposomen als ein Modell für Odontoblastenmembranen untersuchte. Er wies darauf hin, dass vermutlich die C=C Doppelbindungen der Ethylenglykolgruppen des TEGDMA in den Bilayer eindringen und diesen auflösen. Unsere Beobachtungen bei TEG erbrachten aber keine Hinweise auf eine solche Interaktion.

Starke Zellschädigungen wurden in allen Zellkulturen mit TPSb und TPP beobachtet. Diese kommen als Katalysatoren bei der Synthese von Bis-GMA vor (Glenn, 1978) und konnten in einigen Extrakten von Kompositen nachgewiesen werden (Spahl, 1994 und 1998).

Da diese Substanzen in den Kompositen nur noch als Verunreinigungen auftreten und keine Funktion mehr erfüllen, sollten TPSb und TPP aus den Füllungsmaterialien eliminiert werden.

Die hier mit einer ED₅₀ von über einem Mol getesteten Kompositkomponenten üben wahrscheinlich keinen Einfluß im Zellstoffwechsel eukaryontischer Zellen aus, sondern wirken wahrscheinlich nur rein destruktiv auf die Zellstrukturen.

Neben der akuten Toxizität an Zellen können Residualmonomere auch weitere Reaktionen auslösen. Zum einen sind da allergische Reaktionen, zum anderen ist aber auch eine Verwertung der Substanzen durch Bakterien zu nennen. Erste Ansätze zeigen dabei Untersuchungen von Hansel (1997). In dieser Arbeit wurden das Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* und *Streptococcus sobrinus* in Gegenwart von Bis-GMA, UDMA und TEGDMA ,sowie EGDMA getestet. Bei *S. sobrinus* zeigte die Wachstumsrate keinen Einfluß unter Zusatz von Bis-GMA UDMA und EGDMA, wogegen TEGDMA das Wachstum nicht statistisch signifikant stimulierte. Bei *L. acidophilus* konnte ein stärkeres Wachstum gegenüber der Kontrolle in Anwesenheit von EGDMA und TEGDMA nachgewiesen werden. Bei Bis-GMA und UDMA wurde die Wachstumsrate inhibiert. Es wird daher vermutet, daß aus Füllungen stammende Komonomere von EGDMA und TEGDMA für einen wachstumsstimulierenden Effekt auf einen mit Karies verursachenden Stamm wie *L. acidiphilius* in Verbindung gebracht werden können.

Auch wird in letzter Zeit eine mögliche hormonelle Wirkung von Methylmethacrylaten diskutiert. Von Bisphenol-A ist die östrogene Wirkung bekannt (Korach, 1993, Krisnan et.al., 1993). Bisphenol-A wird als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Bis-GMA verwendet. Zwar spaltet sich das Bis-GMA nicht unter den normalen Temperatur und Druckbedingungen wieder in das Bisphenol-A, auch besitzt das Bis-GMA selbst keine östrogene Wirkung. Jedoch ist bei dem verwendeten Bis-EMA (Bisphenol-A-Dimethacrylat) eine hydrolytische Aufspaltung in Bisphenol-A nicht auszuschließen.

4.4 Die Löslichkeit der Substanzen

Die meisten der hier untersuchten Agentien sind in Methanol gut löslich, jedoch für die Beurteilung der biologischen Verträglichkeit ist der in Wasser lösliche Teil von höherer Relevanz. Spahl (1995) untersuchte die Wasserlöslichkeit der hier untersuchten Substanzen. Zum großen Teil lassen sich die Substanzen nicht oder kaum mit Wasser

extrahieren. Auch in dieser Arbeit konnten die Substanzen zum großen Teil nur mit DMSO in Lösung gebracht werden.

Die Wasserlöslichkeit ist stark abhängig von der Molekülgröße und der Struktur der Moleküle (Kawai et al., 1988; Bowen, 1982). Die bei der Addition gebildeten Hydroxylgruppen (-OH) wie bei Bis-GMA geben dem Monomer aber auch eine merkliche Hydrophilie, die eine erhöhte Wasseraufnahme und Verschlechterung der Materialeigenschaften erwirkt (Assmussen, 1975). Durch die Wasserquellung wird zwar die Polymerisationsschrumpfung ausgeglichen, daneben können aber andere Schädigungen wie Adhäsionsverminderung oder eindringende Bakterien Veränderungen des Kunststoffes bewirken (Lutz et al., 1976). Die OH-Gruppen, die verantwortlich für die Wasserlöslichkeit dieser Substanzen sind, können leicht durch Isocyanate ($R-N=C=O$) ersetzt werden (Spahl, 1995). Gegenüber den langen und hydrophoben Monomeren sind die Komonomere vergleichbar klein und hydrophil, besonders diejenigen Komonomere, die auf der Basis von Ethylenglykol hergestellt werden, sind sehr wasserlöslich. Das wichtige TEGDMA, das praktisch in allen Kompositen als Komonomer eingesetzt wird, ist sehr gut wasserlöslich. So wurde von Spahl (1998) das TEGDMA aus Wasserextrakten von Kompositen in Konzentrationen gefunden, die der in dieser Arbeit gefundenen ED_{50} -Konzentrationen entspricht.

Die meisten anderen Substanzen sind nicht in Wasserextrakten nachweisbar. Die Wasserextraktmengen von 0,0008 mg/ml Bis-GMA und 0,012 mg/ml bei UDMA liegen noch unter der toxischen ED_{50} -Grenze von 0,09mg/ml bei Bis-GMA und 0,31 mg/ml bei UDMA. Da jedoch beide Substanzen schon bei extrem geringen Konzentrationen einen zellschädigenden Einfluß besitzen, kann es durchaus auch zu einer Irritation der Schleimhaut durch diese Substanzen kommen. Eine Ausnahme in der Wasserlöslichkeit stellt das TEGDMA da. Es ist mit 0,13- 0,4 Gew.% in Wasser weit höher löslich als die anderen Monomere und liegt aufgrund dessen deutlich über dem bei den Pulpazellen ermittelten ED_{50} -Wert von 0,08 mg/ml. Somit stellt TEGDMA diejenige Substanz dar, die einen möglicherweise toxischen Effekt auf die Zellen In-vivo hat. Bis-GMA und UDMA waren jedoch in den Eluaten nicht nachweisbar.

4.5 "DMSO-Problematik"

Dimethylsulfoxid wird allgemein als Lösungsmittel für überwiegend hydrophobe Substanzen verwendet. DMSO besitzt die Fähigkeit, lebendes Gewebe weitgehend ohne Schädigung der Membranintegrität zu penetrieren und wird deshalb in der Medizin als Transportmedium für Pharmaka verwendet (Jacob et al., 1964; Maibach und Feldmann, 1967, Ashton, 1971). DMSO vermag Wasser, Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und ionische Substanzen zu binden (Symant, 1975). Die kryoprotektive Eigenschaft von DMSO wurde in dieser Arbeit zur Konservierung der Zellen eingesetzt (Lovelock und Bishop, 1959).

Da die meisten hier verwendeten Substanzen nicht wasserlöslich sind, wurden sie in DMSO gelöst. Der Einsatz von DMSO ist aber nicht unproblematisch. Die meisten Substanzen fielen bei einer maximalen DMSO-Konzentration von 1% zwar nicht aus, jedoch wurde in einigen Fällen beobachtet, daß die Substanzen aufgrund der Verdünnung im Medium und der Inkubationsdauer aus dem Medium ausfielen.

Zudem beschreiben mehrere Autoren DMSO als nicht inertes, chemische Reaktionen eingehendes Lösungsmittel (Vaughan et al., 1989), wodurch es die Wirkung von Mutagenen erhöhen oder erniedrigen kann (Gatehouse, 1987, Waters, et al., 1989). Kennedy und Symons (1987) berichten von einer "radikalfangenden" Eigenschaft des DMSO, was zu einer Verringerung des genotoxischen Potentials einer Substanz beitragen kann.

Auch muß durch die Erhöhung der Permeabilität der Membran bei einer konzentrationsabhängigen Ermittlung der Toxizität mit einer Erhöhung der toxischen Wirkung einer Substanz gerechnet werden, da die Substanzen leichter durch die Membran diffundieren können. DMSO stellt als Mittel zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit einen wichtigen Faktor bei der Bestimmung der Toxizität In-vitro dar. Es ist anzunehmen, daß aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit die meisten Substanzen eine geringere Toxizität In-vivo aufweisen, als die hier gefundenen Werte andeuten. Trotzdem kann auf DMSO als Zusatz zur Lösung hydrophober Testsubstanzen nicht verzichtet werden.

4.6 Der Einfluß der Passagenabhängigkeit auf die Toxizität

Gegen die Verwendung von primären Zellkulturen wie die hier verwendeten Wurzelhaut-, Gingiva- und Pulpafibroblasten in Zytotoxizitätstest spricht neben der unterschiedlichen Herkunft der Zellen die Veränderung der Morphologie und die Abnahme der Proteinsynthese im Laufe der Passagenzahl (Rattan et al., 1991).

Deshalb war es wichtig, ED₅₀-Messungen über mehrere Passagen durchzuführen, um festzustellen bis zu welcher Passage primäre Zellkulturen für genaue reproduzierbare Bestimmungen der ED₅₀ zu verwenden sind.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erbrachten Hinweise, bei der eine Verwendung der primären Zellen bis mindestens zur 8. Passage zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Ab der 9. Passage verringerte sich die Wachstumsrate sehr stark, so daß eine vernünftige Messung der Proliferation aufgrund der drastisch verlängerten lag-Phase und der geringeren Zellzahl nicht mehr erfolgen konnte. Die Anzahl der markierten Zellen im BrdU-Einbautest nach 48 h sollten für eine Bestimmung der ED₅₀ nicht unter 35% sinken. Unterhalb dieser Rate ist die Proliferation bereits so stark verringert, das eine ED₅₀ nicht mehr sinnvoll ermittelt werden kann. Daneben scheinen andere Parameter einen großen Einfluß auf die Sensitivität der Zellen zu besitzen. Das Alter der Patienten, von denen die Biopsien stammten, könnte dabei eine nicht unerhebliche Rolle hinsichtlich der Passagierbarkeit spielen. Diese Vermutung ließ sich nicht statistisch absichern, da hier nur ein Proband pro Altersgruppe untersucht wurde. Die Biopsie, die von der vierjährigen Patientin stammte, ließ sich bis zur 12. Passage führen, während die Zellen aus der Biopsie einer 20-jährigen Patientin bereits nach der 9. Passage nicht mehr weitergeführt werden konnten. Dennoch ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der ED₅₀ in beiden Zelllinien mit dem hier untersuchten Camphersäureanhydrid und dem Benzylalkokol festzustellen. Die ED₅₀-Werte schwankten bei beiden Zellarten um bis um 35%, jedoch sind diese Schwankungen vermutlich eher durch den unterschiedlichen Herkunft dieser Zellen als durch die Passagenzahl bedingt.

Während in den Passagen 1-4 keine signifikanten morphologischen Veränderungen festzustellen sind, war ab der 5. Passage ein Anstieg der Zellgröße in beiden Zellkulturen zu beobachten. Kent et al., 1995 kommen zu ähnlichen Beobachtungen. Diese

Veränderung hatte keinen signifikanten Einfluß auf die ED₅₀.

Die Vermutung, daß sich in höheren Passagen die ED₅₀ aufgrund einer verringerten Verstoffwechselung der Substanzen erhöht, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Passagierung von primären Zellen kann zudem Selektionscharakter besitzen. Man kann bei primären Zellarten meist nicht von einer homogenen Linie ausgehen, wie es bei den Dauerzellkulturen der Fall ist, sondern aufgrund des hohen Stresses der Kultivierung werden bei jeder Passagierung nur Zellen überführt, die sich den Lebensbedingungen *in vitro* wieder neu anpassen können. So ist zu erwarten, daß sich in den höheren Passagen des Toxizitätstestes unempfindlichere Zellen befinden als in jüngeren Passagen. Das zeigt sich auch bei den ED₅₀-Werten bei der 4-jährigen Patientin, deren ED₅₀ in den Passagen 7-12 mit etwa 0,8 mM höher liegt als in den Passagen 4-6, die eine niedrigere ED₅₀ aufwiesen (0,39-0,67 mM). Es erscheint aber wahrscheinlicher, daß aufgrund des geringen oder nicht mehr vorhandenen Wachstums und der damit wesentlich geringeren Zellzahlen in höheren Passagen eine vernünftige Ermittlung der ED₅₀ nicht mehr möglich ist. Klaiber (1979) empfiehlt daher ebenfalls Toxizitätsversuche mit primären humanen Zellen nur bis zur 8. Passage durchzuführen.

Das es mit zunehmender Alterung primärer Zellen in Kultur, was aber wahrscheinlich nicht vom Patientenalter abhängig ist (Sidler Pfändler et al., 1997), die Verdoppelungszeit zu- und die DNA-Syntheserate abnimmt, könnte die individuelle Streuung bei den Biokompatibilitätsuntersuchungen erklären. Von daher ist es von Bedeutung zu klären ob und wo innerhalb der Passagenzahl die Verdoppelungszeiten relativ konstant bleiben und wie sich dieses Verhalten genauer auf die Evaluation der Zytotoxizität dentaler Materialien auswirkt.

So können mittels unserer Daten Anhaltspunkte ermittelt werden, die es ermöglichen, die Ergebnisse aus der Zytotoxizitätsmessung und die ermittelte Proliferation zu korrelieren. Damit könnte es möglich sein, die individuelle Streuung, die durch die unterschiedliche Herkunft des Donors, sein Alter als Einflußgröße rechnerisch zu korrigieren.

Aber auch Dauerzellkulturen können Zellveränderungen im Verlaufe der Passagen aufweisen. Wataha, et. al, (1994) konnten zwischen der 4. und der 275. Passage von 3T3-Zellen eine Erhöhung der mitochondrialen Enzymaktivität (Succinatdehydrogenase) feststellen. Untersuchungen von Peiser (1993) zeigten an der M3E3/C3-Zelllinie, daß das Wachstum in den Passagen 25-30 gegenüber höheren Passagen verringert ist. Die

Bestimmung der Toxizität durch Bestimmung der Koloniebildungsfrequenz und mit den Substanzen Benzo(a)pyren und N-Methy-N-Nitro-n-Nirosogadenin (MNNG) zeigte dagegen allerdings keine Passagenabhängigkeit.

Veränderungen von primären Zellen liegen aber nicht nur in der Passagierung begründet. Die Herkunft der Zellen hat einen entscheidenden Einfluß auf die Proliferation und den Proteingehalt. Johnson et al., (1986) berichten, daß sich die Proteinproduktion von Gingivafibroblasten von einem 20-jährigen Donor und einem 68-jährigen Donor stark unterscheiden. Die Proteinproduktion war bei dem 68-jährigen Spenderzellen um bis zu fünffach geringer.

Für die Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden hier immer eingefrorene Zellen benutzt. Das Einfrieren von primären Zellen gegenüber frischen, nicht eingefrorenen Kulturen könnte daher einen Einfluß auf den Stoffwechsel haben, was die Übertragbarkeit auf In-vivo Bedingungen erschweren könnte. Einfrorenes Material aus humanen Biopsien ist allerdings die einzige Möglichkeit, Zellen in ausreichenden Mengen für vergleichende Untersuchungen aus einer Quelle zur Verfügung zu haben. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Limitierung von experimentellen Fehlern aufgrund der unterschiedlicher Herkunft des Donors. Warocquier-Clerout et al. (1995) fanden heraus, daß die Prozedur des Einfrierens und Auftauens die Vitalität der Zellen herabsetzt. Auch war die eine Verringerung der Bildung von Cytokeatinen bei Zellen, die im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe vorher eingefroren wurden, zu beobachten. Aus diesen Beobachtungen schließen die Autoren, daß die Differenzierung von Gingivafibroblasten sich von den Zellen unterscheidet, die nicht kryokonserviert wurden.

Auch in allen anderen ED₅₀ -Bestimmungen, die in dieser Arbeit mit Zellen der 3-9 Passagen durchgeführt wurden, belegen die Ergebnisse, daß sich die Sensitivität gegenüber den getesteten Substanzen im Laufe der Passagenzahl nicht verändert.

Von daher können primäre Zellkulturen des Zielgewebes für die Beurteilung zur Toxizität einer Substanz zusammen mit Versuchen an Dauerzellkulturen ein genaueres Bild über ein mögliches Schädigungspotential abgeben als nur Ergebnisse, die mit Dauerzellkulturen gewonnen wurden.

4.7 Gentoxizität, DIT und -*UMU*- MIKROTEST

Karzinogenität und Gentoxizität sind sehr wichtige Aspekte in der Bewertung der Toxizität von Materialien, die im direkten Kontakt mit humanen Zellen stehen. Dadurch, daß sehr geringe Anteile über eine lange Zeit aus den Kompositen eluiert werden können, ist gerade die mögliche Mutagenität eines Stoffes von wichtiger Bedeutung.

Jedoch sind Testungen zur Mutagenität von Monomeren und Additiven zahnärztlicher Werkstoffe in der Literatur bisher kaum zu finden. Die meisten Studien beziehen sich dabei auf Untersuchungen mit einem bakteriellen System, dem Ames-Test. Schweikl et al. (1994) untersuchten HEMA und Methylmetacrylat (MAA) im Ames-Test mit fünf unterschiedlichen Stämmen von *Salmonella typhimurium*. Für beide Substanzen konnte keine Mutagenität festgestellt werden. Auch in dieser Arbeit konnte bei HEMA keine mutagene oder karzinogene Aktivität festgestellt werden. Bei Bis-GMA und CQ ist eine mögliche gentoxische Wirkung durch die starke zytotoxische Wirkung überlagert. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bei diesen Substanzen gentoxisches Potential vorhanden ist. Auf Tests der hier untersuchten Substanzen mit einem Zusatz von Rattenleberhomogenaten (S9 Mix) zur metabolischen Aktivierung von Testsubstanzen wurde verzichtet, weil diese Materialien aufgrund ihrer molekularen Struktur nicht durch den S 9 Mix aktiviert werden können.

Im DIT-Kurzzeittest zeigte besonders eine Substanz - das TPSb - eine starke inhibitorische Wirkung auf die DNA-Synthese der HeLa Zellen. Im bakteriellen *umu*-MIKROTEST dagegen zeigte das TPSb jedoch keine Erhöhung der Induktionsrate. Höhere Konzentrationen von TPSb (> 10 mM) führten zu einem kompletten Absterben der Bakterien sowie der HeLa Zellen im DIT-Kurzzeittest. Auch in den ED₅₀-Bestimmungen zeigte TPSb eine klare Konzentrations-Inhibitionsbeziehung. Die ED₅₀ lag bei allen getesteten Zelllinien bei etwa 0,04 mM.

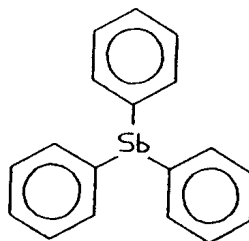


Abb. 37: Triphenylstiban (TPSb)

Bei TPSb ist für die mutagene Wirkung wahrscheinlich seine starke Affinität zur DNA verantwortlich. Die drei aromatischen Ringe, die über das Antimon verbunden sind (Abb. 37), können sich frei im Raum drehen. Durch diese räumliche Anordnung ist es ihnen möglich, in die Doppelhelix der DNA einzudringen und an die DNA zu binden. Eine Verdoppelung der DNA durch die Polymersase wird dadurch verhindert und die DNA-Synthese demnach vermindert. Als Folge davon wird das BrdU nicht mehr in die DNA eingebaut und es kommt zu einer verringerten DNA-Synthese, die stark konzentrationsabhängig ist. Im *umu*-MIKROTEST wird zum Nachweis der Gentoxizität die Induktion des *recA*-Genprodukts nach Behandlung der Bakterien mit einem DNA-schädigenden Agens verwendet. Diese Induktion tritt bei einer Notreparatur der DNA in der postreplikativen Phase der DNA-Synthese ein. Im *UMU*-MIKROTEST kommt es nicht zu einer Aktivierung des *recA* Agens, da TPSb keine Einzelstrangbrüche oder Deletionen der DNA verursacht. Diese Vermutungen werden unterstützt durch Heil. et al. (1996) mit einem *In-vivo*-Kurzeittest, dem Alkalischen-Filter-Elutionstest. Bei diesem Test wird die DNA von Kiemen aus Muscheln von *Dreissena polymorpha*, die zwei Stunden mit der Substanz inkubiert worden ist, auf Einzelstrangbrüche der DNA untersucht. Bei TPSb konnten keine Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden, somit vermuten die Autoren, daß das gentoxische Potential von TPSb aufgrund von DNA-DNA Vernetzungen hervorgerufen wird.

Daneben zeigten die Ergebnisse aus der Zellvolumenmessung mit dem Coulter-Counter ebenfalls keinen Hinweis auf eine mögliche hämolytische Wirkung von TPSb.

Der Grund für die differierenden Resultate in beiden Tests liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Metabolisierung beider Systeme (Dashwood, et. al, 1988). Das im eukaryontischen DIT mehr Substanzen positiv bewertet wurden, kann bis zu einem bestimmten Grade der hohen Toxizität dieser Substanzen zugeschrieben werden, die die Testbakterien im *umu*-Mikrotest abtöten und somit mögliche positive gentoxische Ergebnisse unterdrückten. Der DIT ist einer der wenigen Kurzeittest, der sowohl chemische Karzinogene erkennt, als auch auf Mechanismen anspricht, welche die Integrität des genetischen Apparates in irgendeiner Weise beeinträchtigen (Heil und Reifferscheid, 1992).

Der *umu*-Mikrotest als bakterieller Kurzzeit-Gentoxizitätstest wurde von Reifferscheid (1993) für Untersuchungen von chemischen Monosubstanzen und umweltrelevanten

Proben entwickelt. In dieser Arbeit wurde der Test zur Untersuchung von Einzelsubstanzen zahnärztlicher Füllungsmaterialien eingesetzt. Wegen der hohen Spezifität läßt ein positives Gentoxizitätsresultat mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit gentoxischer Karzinogene schließen. Bakterielle Tests sollten jedoch nicht als alleiniges Entscheidungskriterium herangezogen werden. Der in dieser Arbeit als Vergleichstest gewählte eukaryontische DNA-Synthese Inhibitionstest erfaßt einen Teil der primär nicht gentoxischen Karzinogene durch ihre DNA-Synthese-inhibitorische Wirkung. Die Inhibition der DNA-Synthese führt erwiesenermaßen zu einer Akkumulation von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, DNA-Addukten, Chromosomenabberationen und Mutationen in den betroffenen Zellen, die allesamt das karzinogene Risiko erhöhen. Daher sollten Gentoxizitätstests nicht nur mit einem bakteriellen Testsystem, sondern ergänzend dazu mit einer eukaryontischen Testmethode, die den tatsächlichen Gegebenheiten im menschlichen Körper besser entspricht, verwendet werden, um eine Aussage über das gentoxische Potential einer Substanz besser abschätzen zu können.

4.8 Zellvolumenveränderung

Die Partikelgrößenmessung ist ein geeignetes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung im Rahmen von In-vitro-Toxizitätsprüfungen (Fieblinger et al., 1995). Die Kriterien zur Bewertung der Toxizität gehen über eine einfache Veränderung der Proliferation hinaus. In dieser Arbeit wurde auf die Berechnung der ED₅₀ mit dem Coulter-Counter aufgrund der relativ geringen Datenmenge verzichtet. Jedoch konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der ED₅₀-Bestimmungen im Fluoreszenzassay festgestellt werden. Wichtiger in dieser Arbeit war jedoch nicht die Korrelation der verschiedenen ED₅₀-Testungen mit denen der Partikelgrößenmessung im Coulter Counter, sondern es sollte ein möglicher Hinweis auf die lytische Aktivität der Substanzen mit Hilfe dieser Methode gefunden werden. Bei den meisten der untersuchten Substanzen wurde jedoch keine signifikante Verschiebung der Zellgröße gefunden. Die Substanzen aus der Methacrylatgruppe wie Bis-GMA und UDMA sowie das TEGDMA zeigten eine äußerst starke lytische Wirkung auf die Zellen, ebenso wie der Inhibitor BHT starke Zellzerstörungen auf. Die Zelltrümmer bei UDMA zeigten einen

charakteristischen Peak bei einer Größe von etwa 8 μm , während bei Bis-GMA die Größe der Zelltrümmer gleichmäßig verteilt war. Diese Beobachtung läßt auf einen unterschiedlichen Mechanismus bei der Zerstörung der Zellmembran schließen. Während bei Bis-GMA aufgrund der gleichmäßigen Verteilung ein unspezifischer Mechanismus vermutet werden kann, kann bei UDMA der Peak als eine spezielle Reaktion auf den Angriff von bestimmten Zellwandkomponenten betrachtet werden.

Die Untersuchungen zur Veränderung des Zellvolumens stellen eine sinnvolle Ergänzung zu den ED₅₀-Bestimmungen dar. Bisher gibt es in der Literatur jedoch kaum Berichte mit diesem Meßverfahren zur Untersuchung dieser Substanzen. Geurtsen (1987) konnte mit Hilfe der Volumenverteilung die Toxizität mehrerer Seitenzahnkompositextrakte mit L 5178y-Mäuse T-Lymphomzellen bestimmen.

Insgesamt bietet die Messung mit dem Coulter Counter eine schnelle orientierende Analyse der Toxizität, darüberhinaus kann sie Angaben über die Volumenklassenverteilung geben.

4.9 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen der unterschiedlichen Substanzen, die gewöhnlich in Kompositen enthalten sind, machen deutlich, daß von diesen Materialien ein nicht zu unterschätzendes Risikopotential ausgeht. Das ist auch für die Hersteller dieser Produkte von immer größer werdender Bedeutung, da an sie gesetzliche Anforderungen in Hinblick auf die Verträglichkeit Ihrer Produkte gestellt werden.

In Zukunft sollten In-vitro-Methoden verstärkt zum Einsatz kommen, die es ermöglichen das Schädigungspotential solcher Produkte und insbesondere deren Einzelbestandteile zu bestimmen und einzuschätzen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden eignen sich hierzu.

Die Bestimmung der ED₅₀ mit verschiedenen Zellsystemen erlaubt eine Abschätzung des toxischen Potentials nicht nur mit standardisierten Zellkulturen wie den hier verwendeten 3T3-Zellen, sondern auch mit Zellarten, die den In-vivo-Bedingungen am ehesten entsprechen. Festzustellen bleibt, daß ED₅₀- Bestimmungen, die nicht mit den Zellen des Zielgewebes erfolgen, nur mit Einschränkungen zu verwerten sind. Die Untersuchungen

mit verschiedenen Zelltypen wiesen unterschiedlich starke Reaktionen auf die jeweilige Substanz auf. Gerade die primären Zellen zeigten sich in den Toxizitätstestungen sensitiver als die 3T3-Zelllinie. Daher erscheint es sehr ratsam, für ED₅₀-Bestimmungen nicht nur Dauerzelllinien zu verwenden, sondern auch im jeweiligen Fall primäre Zellen aus dem Bereich zu wählen, die dem Zielgewebe entsprechen. Insbesondere bei den Residualmonomeren und Additiven von Kompositen zeigten gerade diejenigen Substanzen starke Abweichungen innerhalb der getesteten Zelllinien, die sich als gering toxisch erwiesen haben. Aufgrund der langen Liegedauer eines Komposites können aber insbesondere chronische Schäden auch bei mindertoxischen Substanzen In-vivo nicht ausgeschlossen werden. Auch sollten nur Substanzen verwendet werden, die sich nicht oder nur äußerst schlecht in Wasser lösen lassen. Die hier gefundenen Daten zeigen daß es in jeder der hier getesteten Substanzgruppen Verbindungen mit nicht oder nur sehr geringem toxischen Potential gibt, die als Alternative zu den stark toxischen Substanzen verwendet werden können.

Daher sollte bei der Entwicklung von neuen Materialien auf Kunststoffbasis die Fragestellung der Toxizität und der Genotoxizität einer neuen Substanz mit Hilfe der Kurzzeittests schon möglichst früh aufgestellt werden, um dadurch bei der Entwicklung neuer Produkte ein späteres Gefährdungspotential auszuschließen.

Die Zukunft der Zytotoxizitätsuntersuchungen sollte nicht nur mit der Bestimmung der Toxizität einer Substanz oder eines Komposites aufhören. Für die Weiterentwicklung von Tests zur Abschätzung eines Gefahrenpotentials sollten daher noch weitere Untersuchungen in Bezug auf den Wirkmechanismus der einzelnen Substanzen gemacht werden. Erste Ansätze sind bereits in dieser Arbeit gemacht worden.

Es sind drei mögliche Ansätze zur Weiterentwicklung von Untersuchungen zur Zytotoxizität von Materialien denkbar:

-
- Es sollten Untersuchungen zur Interaktion von Monomeren und Comonomeren sowie der anderen in Kompositen verwendeten Stoffe mit den einzelnen Zellkompartimenten auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt werden. Dabei kann der Zusatz von radioaktiv markierten Substanzen Aufschluß über den Verbleib der Substanzen geben.
 - Zum anderen sind weitere Untersuchungen über die Eigenschaften der einzelnen primären Wurzelhaut-, Gingiva- und Pulpafibroblasten erforderlich um Unterschiede in der Zellstruktur der jeweiligen Zellarten zu erkennen. Das Ziel sollte es sein, diejenigen Parameter zu finden, die zu einer hohen Variabilität bei humanen oralen Zellkulturen führen. Die Korrelation von Zytotoxizitätsdaten mit den Proliferationsdaten kann man möglicherweise nutzen, um daraus einen Faktor zu berechnen, der die interindividuelle Streuung als Einflußgröße rechnerisch minimiert. Damit würden Unsicherheiten über die Verwendung von nicht zielbezogenen Zellen (im allgemeinen permanente Zellkulturen) möglicherweise minimiert werden.
 - Auch kann die Entwicklung einer transformierten Zelllinie aus humanem oralem Gewebe, durch Behandlung mit z.B. 4-NQO, die Vorteile permanenter und primärer Zellkulturen vereinen.

5 Literaturverzeichnis

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E.: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc.Natl. Acad Sci. USA **70**, 782- 786 (1973).

Ames, B.N., McCann, J. Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome test. Mutation Res. **31**, 347-364 (1975).

American National Standards Institute/American Dental Association Document no. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. Council on Dental Materials and Devices. J Am Dent Assoc Oct; **99**(4):697-698 (1979).

Arenhold-Bindslev, D., Hörstedt-Bindslev P.: A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblast. Endodont Dent Traumatol **5**, 219-223 ((1986).

Arndt-Jovin D.J., Jovin T.M.: Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content.

J Histochem Cytochem; **25**, 585-589 (1977)

Arvidsen, K., Cottler-Fox, M., Hammarlund, E., Friberg U.: Cytotoxic effects of cobalt chromium alloys on fibroblast derived from human gingiva. Scand J Dend Res **95**, 356-360 (1989).

Ashton, H., Frenk, E., Stevenson, C.J.: Therapeutics XIV. Herpes simplex virus infections and idoxuridine. Br J Dermatol; **84** (5):496-499 (1971).

Assmussen, E.: NMR-analysis of Monomers in restaurative resins. Acta odond scand. **33**, 129-134 (1975).

Assmussen, E.: Composite restorative resins, composition versus wall-to-wall polymerisation contraction. *Acta Odontol Scand.* **33**, 337-341 (1975).

Bean, T.A., Zhuang, W.C., Tomg, P.Y, Eick, J.D., Chappelow, C.C., Yourtee, D.M.: Comparison of tetrazolium colometric and ⁵¹Cr release assays for cytotoxicity determination of dental materials. *Dent Mater* **11**, 327-331 (1995).

Bernauer, I., Berstein, A., Marx, R., Geurtsen, W.: Bacteriostatic properties of Ti compared with other dental alloys. *J Dent Res* **69**, 265 Abstr # 1250 (1990).

Berstein A., Bernauer I., Marx R., Geurtsen W.:

Human cell culture studies with dental metallic materials. *Biomaterials* **13**, 98-100 (1992).

Beubler, B. und Schmid, B.: Ist Toxikologie mehr als LD₅₀ ? In: Fred Lehmbeck (Hsg.) *Alternativen zum Tierversuch* . Thieme Verlag, 116-120 (1988).

Blaheta, R.A., Franz, M., Auth, M.K.H., Wenisch, H.J.C. and Marcus, B.H.: Basic principles of three rapid Fluorochrome assays for DNA quantification and cell counting. *Transplantation Proceedings*, **23**, No 1 : 461-463 (1991).

Borenfreund, E., Puerner, J.A.: Cytotoxicity determination in cell cultures by uptake of neutral red dye. *Toxicol Lett.* **25**, 119-124 (1985).

Bowen, R.L.: Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of Bisphenol and Glycidylacrylate. U.S. Patent No- 3066 112, Nov. 1962 (zitiert in *Phillips, R.W.:* *Skinner`s Science of Dental Materials*. 8. Aufl., W.B Saunders, Philadelphia 1982).

Bowen, R.l.: Compatibility of various materials with oral tissues : I. The components in composites restorations. *J. dent Res.* **58**, 1493-1503 (1979).

Bowen, R.L.: Adhasive bonding of various materials to hard tooth tissues: XXIII. Isotonic monomer formulations. *J. Dent. Res.* **60**, 901-906 (1981).

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254 (1976).

Brauer, G.M.: Initiator Accelerator systems for arylc resins and composites reprinted from: Gebelein, C.G. and Koblitz, F.F.: Biomedical and dental applications of polymers. Plenum Publishing Corporation, New York, (1981).

Brenan, M., Parisch, C.R.: Intracellular fluorescent labelling of cells for analysis of lymphocyte migration. *J of Immunological Methods.* **74**, 31-38 (1984).

Brinkley, M.: A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and cross-linking reagents. *Bioconjugate chem.* **3**, 2-13 (1991).

Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cellion 52Cr-labeled target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181-187 (1968).

Dashwood, R.H., Combes, R.D., Ashby, J.: DNA-binding studies with 6BT and 5I: implications for DNA-binding/carcinogenicity and DNA-binding/mutagenicity correlations. *Mutat Res* **198**, 61-68 (1988).

Dekker, A., Panfil, C., Valdor, M., Pennartz, G., Richter H, Mittermayer, Ch., and Kirkpatrick, C.J.: Quantitative methods for in vitro cytotoxicity testing of biomaterials. *Cells and Materials.* **4**, No.2, 101-112 (1994).

Durand, R.E and Olive, P.L.: Cytotoxicity, mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342. *J. Histochem Cytochem.* **30**, 111-116 (1982).

Evans, E.J., Thomas, J.T.: The in vitro toxicity of cobalt-chrome- molybdenum alloy and its constituent metals. *Biomaterials* **7**, 25-29 (1986).

Ewers, u., Schliepköter, H.W.: Chronische Toxizität von Metallen beim Menschen. In: Merian, E.: *Metalle in der Umwelt*. Verlag Chemie, Weinheim, 229-236 (1984).

Feigal, R.J., Yesilsoy, C., Messer, H.H. and Nelson, J.: Differential sensivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblast to cytotoxic challange. *Arch oral Biol.* **30**, No 8, 609-613 (1985).

Ferrrance, J.L; Condon, J.R.: Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* **6**, 282-286, (1990).

Fieblinger, D., Grünheid, K., Labes, D.: Anwendung der Partikelgröße zur Prüfung auf Zytotoxizität. *BIOforum* **18**, 158-160 (1995).

Fujisawa, S., Imai, Y., Kojima, K., Masuhara, E.: Studies on hemolytic activity of bisphenol A diglycidyl methacrylate (Bis-GMA) . *J. Dent Res.* **57**, 98-102 (1978).

Fujisawa, S., Masuhara, E.: Analysis of eluate extracted from dental filling resin by high performance liquid chromatography. *J Jpn Soc Dent App Mat.* **20**, 121-125 (1979).

Fujisawa, S., Kadoma, Y., and Komoda, Y.: ^1H and ^{13}C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethylenglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a modell system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* **67** (11), 1438-1441 (1988)

Gatehouse, D.: Guidelines for testing of enviromental agents. Critical features of bacterial mutation assays. *Mutagenesis* 397-409 (1987).

Geurtsen W. : Untersuchungen zur Toxizitätsdauer eines Komposits. *Dtsch Zahnärztl Z.* **41**, 496-498 (1986).

Geurtsen W.: Untersuchungen zur subzellulären Schädigung durch die ungefüllten Einzelsysteme eines Komposits. Dtsch Zahnärztl Z. **42**, 580-583 (1987).

Geurtsen, W.: Untersuchungen zur zellulären Verträglichkeit von Kompositen für den Seitenzahnbereich. Dtsch Zahnärztl Z **42**, 960-963 (1987).

Geurtsen, W.: Die zelluläre Verträglichkeit zahnärztlicher Komposite. Hanser, München (1988).

Geurtsen, W., Spahl, W., Budzikiewics, H.: Residual monomers in different composite resins - A qualitative study. IADR-Dental Materials Group Publication (1990) (Microfiche).

Geurtsen, W. and Leyhausen, G.: Biological aspects of root canal filling materials - histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. Clin Oral Invest **1**, 5-11 (1997).

Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W. and Leyhausen, G.: Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res. **41**, 474-480 (1998).

Geurtsen, W.: Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Sci **106**, 687-695 (1998).

Geurtsen, W., Leinenbach, F., Krage, T., and Leyhausen, G.: Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **85**, 592-597 (1998).

Geurtsen, W., Spahl, W. and Leyhausen, G.: Variability of cytotoxicity and leaching of substances from for light-curing pit and fissure sealants. J Biomed Mater Res. **44**, 73-77 (1999).

Glenn, J.F.: Comments on Dr. Bowen`s presentation. J. Dent. Res. **58**, 1493 (1979).

Halle, W., Göres, E.: Register der Zytotoxizität (ID₅₀) in der Zellkultur und Möglichkeiten zur Abschätzung der akuten Toxizität (LD₅₀). Beiträge zur Wirkstoffforschung Heft Nr. **32**, (1988).

Halle W : Alternativverfahren zur Vorhersage der LD₅₀.
In vitro-Systeme **1**, 8-9 (1992).

Hamid, A., Okamoto, A., Iwaku, M. and Hume W.R.: Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements. Journal of Oral Rehabilitation **25**, 94-99 (1998).

Hanks, C.T., Anderson, M., Craig, R.G.: Cytotoxicity effects of dental cements on two cell culture systems. J Oral Pathol **10**, 101-112 (1981).

Hanks, C.T., Strawn, J.C., Wataha, J.C., Craig, R.G.: Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res. **70**, 1450-1455 (1991).

Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U. and Geurtsen, W. : Effects of various components/extracts on the growth of *Streptococcus sobrinus*. J Dent Res. **76**, Nr. 219 (Abstract) (1997).

Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U. and Geurtsen, W. : Effects of various components/extracts on the growth of *Lactobacillus sobrinus*. J Dent Res. **76**, Nr. 220 (Abstract) (1997).

Hansel, C., Leyhausen, G., Mai, U. and Geurtsen, W. : Effects of various Resin Composite (Co)monomers and extracts on two Caries-associated Micro-Organisms *in vitro*.
J Dent Res **77**, 60-67, (1998).

Heidemann, D.: Die Bestimmung der Biokompatibilität von zahnärztlichen Materialien anhand primärer Zellkulturen. In: Kettel, W. (Hrsg.): Deutscher Zahnärztekalendar 1982. Hanser, München (1982).

Heil, J., Reifferscheid, G.: Detection of mammalian carcinogens with an immunological DNA synthesis-inhibition test. *Carcinogenesis* **13**, 2389-2394 (1992).

Heil, J., Reifferscheid, G., Waldmann, P., Leyhausen, G. and Geurtsen, W.: Genotoxicity of dental Materials. *Mutation research* **368**, 181-194 (1996).

Hensten-Petersen, A., Jacobsen, N., Jansen, J.: Mutagenic Potentials and influence on cell growth of single constituents of dental polymers. *J. Dent. Res.* **57**, Spec. Iss. A, 297, Abstr. Nr.889 (1978).

Hensten-Petersen, A., Hegeland, K.: Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res.* **89**, 102-108 (1981).

Horner, L., Schwenk, E.: Zur Beschleunigung des Peroxidzerfalls durch Amine. *Angew.Chem.* **61**, 411-413 (1949).

Jacob, S.W., Bischel, M., Herschler, R.J.: Dimethyl sulfoxide (DMSO): A new concept in pharmacotherapy. *Current Terap Res.* **6**, 134-135 (1964).

Johnson, B.D., Page, R.C., Narayanan, A.S., and Reznikoff C.A.: Effects of donor age on protein and collagen synthesis *in vitro* by human diploid fibroblasts. *Lab. Invest.* **55**, 490-496 (1986).

Jontell, M., Hanks, C.T., Bratel, J. and Bergenholtz, G.: Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* **74**(5) 1162-1167 (1995).

Joshii, E.: Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* **37:4**, 517-524 (1997).

Joung-Jo, Kim, Robert, L.Y Sah, Doong, J.Y., and Grodzinsky, A.J.: Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258.

Analytical Biochemistry **174**, 168-176 (1988).

Juliane S., Essig-Marcello, J. and Buskirk, R. G. V. : A double In-situ cytotoxicity assay using the fluorescent probes neutral red and BCECF-AM. *In vitro Toxicology* **3**, 219-227 (1990).

Kawahara, H., Yamagami, A., Nakamura, M.Jr: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J.* **18**, 443-467 (1968).

Kawai, K. , Torii, M., Tuschitani, J.: Measurement of water solubility of resin components by means of high performance liquid chromatography.

J. Osaka Univ. Dent Sch. **28** , 153-160 (1988).

Kennedy, A.R., Symons, M.C.R.: „Water structure,, versus „radical scavenger,, theories as explanations for the suppressive effects of DMSO and related compounds on radiation-induced transformation In vitro. *Carcinogenesis* **8**, 683-688 (1987).

Kirkpatrick, C.J: A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity In vitro. *Regulatory Affairs* **4**: 13-32 (1992).

Kirkpatrick, C.J and Mittermayer, C.: Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *J Mater Sci Mater Med* **1**: 9-13 (1990).

Klaiber, B: Toxizitätsbestimmung von Überkappungsmaterialien an der Zellkultur aus Menschlichen Pulpafibroblasten. *Med. Habil. Schrift, Freiburg* (1979).

Kleinig, H., Sitte, P.: Zellbiologie. II Auflage, Fischer Verlag (1986).

Koch, H.P.: Der Hefe-Test: Eine Alternativmethode zur Bestimmung der akuten Toxizität von Arzneistoffen und Umweltchemikalien. *Pharmazie* **47**, 531-537 (1992).

Kolber, M.A., Quinones, Gress, R.R., Henkart, P.A.: Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J Dent Res.* **70**, 255-264 (1991).

Klötzer, W.T.: Biologische Aspekte der Korrosion. *Dtsch Zahnärztl Z* **40**, 1141-1143 (1985).

Korach, K.S.: Editorial: Surprising places of oestrogenic activity. *Endocrinology* **132**, 2277-2279 (1993).

Krischnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. Feldmann, D.: Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-2283 (1993).

Langeland, K., Klötzer, W.T.: Verfahren zur Prüfung der biologischen Eigenschaften zahnärztlicher Werkstoffe. *Dtsch Zahnärztl Z.* **26**, 298-315 (1971).

Langeland, K.: Correlation of screening test to usage tests. *J. Endodont.* **4**, 300-303 (1978).

Latt, S.A., Stetten G.: Spectral studies on 33258 Hoechst and related dyes useful for fluorescent detection of DNA. *J. Histochem Cytochem.* **24**, 24-33 (1976).

Lehmann, F., Leyhausen, G., Spahl, W., Geurtsen, W.: Vergleichende Zellkultur-Untersuchungen von Kompositbestandteilen auf Zytotoxizität. *Dtsch Zahnärztl Z.* **48**, 651-653 (1993).

Lehmann, F., Leyhausen, G., Geurtsen, W.: Cytotoxic alterations in different fibroblast cultures caused by matrix monomers. IADR-Dental Materials Group Publication (1993) (Microfiche).

Lehmann F., Leyhausen, G., Geurtsen, W.: Usefulness of primary human gingival fibroblast cultures for cytotoxicity tests: IADR-Dental Materials Group Publication (1996) (Microfiche).

Lehnhard, M., Staehle, H. J.: Zur Frage potentieller Risiken systemischer und lokaler Nebenwirkungen. ZM **84**, Nr 8, 846-855 (1996).

Leinenbach, F., Leyhausen, G., Geurtsen, W.: Biocompatibility of root-canal filling materials in fibroblast cultures. IADR-Dental Materials Group Publication (1993) (Microfiche).

Leinenbach, F.: Die Zelluläre Verträglichkeit von Wurzelkanal-Füllungsmaterialien: Untersuchungen mit primären und Dauerzellkulturen. Med. Diss. Medizinische Hochschule Hannover (1995).

Lewis, R.J., Takten, R.L (eds.): Registry of toxic effects of chemical substances. Vol.1 and 2, US Dept. Health Human Services, Nat. Inst. Occupat. Saf. Health. DHHS (NIOSH) Publ. No. **81**- 116 (1980).

Leyhausen, G., Harms, T., Sapotnick, A., Geurtsen, W.: In vitro compatibility of a new dentin adhesive. IADR Dental Materials Group, Publication (1993) (Microfiche).

Leyhausen, G., Geurtsen, W.: Sensitivity of various cultured human oral cells to dental materials. IADR Dental Materials Group, Publication (1994) (Microfiche).

Leyhausen, G., Heil, J., Reiferscheid, G. und Geurtsen, W.: Das genotoxische Potential von Kompositbestandteilen. Dtsch Zahnärztl Z. **50** 134-136 (1995).

Leyhausen, G., Heil, J., Reiferscheid, G. and Geurtsen, W.: Genotoxic effects of aqueous extracts of 2 dental composites and 2 glass ionomer cements (Abstract), J. Dent Res. **76**, 381 (1997).

Leyhausen, G., Abthai, M., Karbakhsch, M., Sapotnik, A. and Geurtsen, W.: Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials* **19**, 559-564 (1998)

Leyhausen, G., Lehmann, F. and Geurtsen, W.: Compatibility of 38 composites monomers, Additives in human oral primary cell cultures. *J. Dent Res.* **76**, 382 (1997).

Li Ning, Miao Xue, Takakuwa, M, Sato, K. and Sato, A.: Effect of dental material HEMA monomer on human dental pulp cells. *Art.cells,blood subs. and immorb. biotech.*, **27**(1), 85-90 (1999).

Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden + Grundlagen. Fischer, Stuttgart (1994).

Lindl, T.: Erfahrungen bei der Suche nach Alternativen am Beispiel der Prüfung auf Zytotoxizität von Biomaterialien. In: Schuppan, Hardegg: Tierschutz durch Alternativen. Gustaf Fischer Verlag, (1988).

Lindquist, L., Bartfal, T., Berg. J.-O., Blomlöf, L.: In vivo and In vitro studies of inhibitory effects of restorative Materials on salivay esterases. *Scand J Dent Res.* **88**, 229-235 (1980).

Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H.: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* **183**, 1394-1396 (1959).

Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Bio. Chem.* **193**, 265-275 (1951)

Lutz, F. Lüscher, B., Ochsenbein, H und Mühlemann, H.R.: Adhäsive Zahnheilkunde. Juris Druck & Verlag, Zürich (1976).

Maibach, H.I., Feldmann, R.J.: The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man. *Ann. N.J. Acad. Sci.* **141**, 423-427 (1967).

Mariotti, A., Hassel, T. and Kaminker, P.: The influence of age on collagen and non collagen protein production by human gingival epithelial cells. *Arch oral Biol.* **38**, No.8, 635-640 (1993).

Michl, J.: Ernährung und Stoffwechsel gezüchteter Zellen in: Mauersberger, B. Aktuelle Probleme der Zellzüchtung Gustav Fischer Verlag, 227-276 (1971).

Neupert, G., Welker, D.: Bestimmung der Gewebeverträglichkeit stomatologischer Werkstoffe an Zellkulturen. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilk.* **63**, 134-141 (1975).

Noviki, D.L., Rosenberg, M.R., Michalopolos, G.: Inhibition of DNA-synthesis by chemical carcinogens in culture of initiated and normal proliferating rat hepatocytes. *Cancer Res.* **45**, 337-344 (1985).

Oda, Y., Nakamura, J., Oki, J. and Kato, T.: Evaluation of a new system (*umu-test*) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.*, **147**, 219-229 (1985).

Oliva, A., Della Ragione, F., Salerno, A., Riccio, V., Tartaro, G., Cozzolino, A., Amato, S.D., Potoni, G. and Zappia, V.: Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblast. *Biomaterials* **17**, 1351-3156 (1996).

Oysaed, H.: Conversion in different depths of ultraviolet and visible light activated composite material. *Acta Odontol. Scand.* **40**, 179 (1982).

Painter, R.B.: Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **49**, 771-781. (1986).

Papadimitriou, E., Lelkes, P.L.: Measurement of cell numbers in microtiter plates using the fluorescent dye Hoechst 33258. *J of Immun Methods.* **162**, 41-45 (1993).

Peters, J.H.: Charakterisierung der Zellphysiologie in Vitro. In: Verlässlichkeit der Zellkulturmodellen in Grundlagenforschung und Anwendung. Abstract-Band. Gesellschaft für Zell-und Gewebezüchtung e.V: (GZG) (1992).

Perry, K.L. and Walker, G.C.: Identification of plasmid (pKM101)-coded proteins involved in mutagenesis and UV resistance. *Nature* **300**, 278-281 (1982).

Phillips, R.W.: Symposium on composite resins in dentistry.. *Dent Clin North Am.* **25**, 209-218 (1981).

Peiser, C.: Einfluß der Passagenhöhe auf Zytokinetik, Xenobiotikametabolismus, Toxizität, Chromosomenstabilität und Transformation bei der Klonierten fetalen Hamsterlungenepitelzelle M3E3/C3. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover (1993).

Rabek, J.F.: Mechanismen of Photophysical Processes and Photochemical Reactions in Polymers. John Wiley & Sons, Chichester (1987).

Rathburn, M.A., Craig, R.G., Hanks, C.T., Fillisko, F.E.: Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res.* **25**, 443-457 (1991).

Rattan, Suresh I.S.: Protein synthesis and the components of protein synthetic machinery during cellular ageing *Mutation research* **256**, 115-125 (1991).

Rea, T.: The study on the effects of particulate metals of orthopedic interest on murine macrophages in vitro. *J. Bone Jt. Surg.* **57**, 444-450 (1975).

Rea, T.: The action of cobaltnickel and chromium on phagozytosis and bacterial killing by human polymorphonuclea leucocytes; its relevance to infection after total joint artroplastizy. *Biomat.* **4**, 175-180 (1983).

Reifferscheid, G., Heil, J., Zahn, R.K.: Messung erbgutverändernder (gentoxischer) Belastungen des Wassers mit dem DNA-Synthese Inhibitionstest (DIT).

Wasser + Boden **11**, 739-745 (1990).

Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R.K.: A microplate version of the SOS/*umu* - test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples.

Mutation Research **253**, 215-222 (1991).

Reifferscheid, G., Heil, J. und Zahn, R.K.: Die Erfassung von Gentoxinen in Wasserproben mit dem *umu*- Mikrottest . Vom Wasser **76**, 153-166 (1991).

Reifferscheid, G.: Entwicklung und Evaluierung einer teilautomatisierten Mikroversion des *umu*-Tests zur Erfassung gentoxischer Potentiale umweltrelevanter Mischpollutionen und Versuch einer quantitativen Bewertung. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1993).

Reinhardt, K.J., Vahl, J.: Restmonomergehalt und Wasseraufnahme UV-polymerisierbarer Adhäsive und Füllungskunststoffe. Dtsch Zahnärztl Z. **35**, 564-570 (1980).

Reuling, K.: In . Götz K. Siebert: Dentallegierungen in der zahnärztlichen Prothetik. Carl Hanser Verlag München Wien (1987).

Rinkus, S.J. Legator, M.S.: Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. Cancer res. **39** 3289-2318 (1979).

RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemicals) Von. Chem-Bank™ CD-ROM , Silver-Plattner Information Inc., Norwood, MA, May 1995.

Ruyter, I.E., Sjovik, I.J.: Composition of dental resin and composite materials. Acta Odonttol. Scand. **39**, 133 (1981).

Schendel, K.U., Lenhart, M., Fusenig, N.E. und Komposch G.: Testung der Toxizität von in der Kieferorthopädie verwendeten Kunststoffen. *Fortschr. Kieferorthop.* **53**, 263- 272 (1992).

Schmalz G.: Die Gewebeverträglichkeit Zahnärztlicher Materialien. Möglichkeiten einer Standardisierten Prüfung in der Zellkultur, Thieme CopythelThieme Verlag, Stuttgart, New York, (1981).

Schmalz G., Schmalz C.: Korrelationsanalysen zwischen Zellkultur und Tierversuch. *Dtsch Zahnarztl Z* **37**, 184-186 (1982).

Schmalz, G., Netuschli, L.: A modification of the cell agar diffusion test using fluorescein indicate staining. *J-Biomed. Mat Res.* **19**, 653-661 (1985).

Schmalz, G., Klötzer, W.T.: DIN-Standard 13930: biological testing of dental materials. I: Concepts of German Standards. Tests for toxicity and tissue irritation for unspecific application. *Dtsch Zahnarztl Z* **41**, 1242-1247 (1986).

Schnebel,E.: DP 760351. Verfahren zur Herstellung von Zahnersatzteilen, insbesondere Füllungen aus Polymerisations-Kunstharzen (1951).

Schweickl, H., Schmalz, G., Bey,B.: Mutagenicity of dentin bonding agents. *J-Biomed-Mater Res.* **28** (9) 1061-1067 (1994).

Shinagawa, H. et.al.: Cloning and characterisation of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis and UV resistance in *Escherichia coli*. *Gene* **23**, 278- 231 (1983).

Sidler Pfändler, M-A., Lardelli, A., Schroeder, H.E.: Sind Proliferation, Kollagen- und Proteinsynthese menschlicher Desmosomaler Fibroblasten altersabhängig ? *Acta Med Dent Helv.* **2**, 40-44 (1997).

Skehan, P., Storeng, r., Scudiero, D., monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H, Kenney, S. and Boyd, M.: New colorimetric assay for anticancer-drug screening. In: Journal of the National Cancer Institute Vol. **82**, No. 13 , 1107-1112 (1990).

Smith, D.C.: The biocompatibility of dental materials. In.: Smith, D.C.: Williams, D.F.: Biocompatibility of dental materials, Vol. I. CRC-Press, Boca Raton, 2-37 (1982).

Spahl, W. : Qualitative Analyse von Eluaten zahnmedizinischer Komposite mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektroskopie. Diplomarbeit Universität Köln (1990).

Spahl, W., Budzikiewics, H., Geurtsen, W.: Eine Untersuchung zum Restmonomergehalt und Additivagehalt verschiedener lighthärtender Hybridkomposite. Dtsch Zahnärztl Z **46**, 471-473 (1991).

Spahl, W., Budzikiewicz, H., Geurtsen, W.: Extractable residual monomers from various resin materials-A qualitative study. IADR Dental Materials Group, Publication 1994, (Microfiche).

Spahl, W., Budzikiewicz. H.: Qualitative analysis by gas and liquid chromatography/mass spectrometry of dental resin composites. In: Fresenius J. Anal. Chem. **350** , 684 (1994).

Spahl, W.: Analyse zahnmedizinischer Komposite auf extrahierbare Restmonomere und Additive mit Hilfe der Gaschromatographie/ Massenspektroskopie und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/ Massenspektroskopie
Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln (1995).

Spahl, W., Budzikiewicz. H. and Geurtsen, W.: Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of Dentistry **26**, 2, 137-145 (1998).

Spangberg, L., Langeland, K.: Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **35**(3), 389-401 (1973).

Spielmann, H.: Alternativen in der Toxikologie. In: Gruber, H und Spielmann, H : Alternativen zu Tierexperimenten. Wissenschaftliche Herausforderung und Perspektiven. Spektrum Akademischer Verlag, 108-124 (1996).

Symant, H.: Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. In: Biological actions of dimethyl sulfoxide. Jacob, S.W., Herschler, R. (eds.) New York Academy of Sciences. **243**, 20-23 (1975).

Thiel, K.D. Zinner, R.: Kultivierung und Möglichkeiten der Verwendung von Zellen aus Pulpa und Parodont menschlicher Zähne und Zahnkeime. *Zahn Mund Kieferheilk* **71**, 453-457 (1983).

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.* **52**, 1281-1286 (1984).

Tronstadt, L., Wennberg, A.: Screening Test for dental materials. *J. Endodont* **4**, 304-307 (1978).

Tronstadt, L., Wennberg, A.: In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int. Endodont J.* **13**, 131-138 (1980).

Uphoff, C.C., Drexler, H.G.: Epithelzellen in Kultur- eine Bestandsaufnahme. In vitro-Systeme, 3/89 Aus : Zum Ersatz von Tierversuchen. Kommentare-Projektberichte-Literaturbesprechungen Informationen über In-vitro- Methoden 1986-1993 (1993).

Vaughan, D.J., Baptista, J.A., Perdomo, G.R., Krepinsky, J.J.: The involvement of dimethyl sulfoxide in a bacteriotoxic response of the Ames assay tester strains TA98 and TA100. *Mutation Res.* **226**, 39-42 (1989).

Villiani, G., Boteux, S., Radmann, M.: Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: extent and fidelity of in vitro DNA synthesis on radiated templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3037-3041 (1978).

Viohl, J., Dermann, K., Quast, D., Venz, S.: Die Chemie zahnärztlicher Füllungskunststoffe. Carl Hanser Verlag (1986).

Warocquer-Cerout, R.; Hachom-Nitcheu, G.C. and Sigot-Luizard M.F.: Reliability of human fresh and frozen gingiva explant culture in assessing dental materials cytocompatibility. *Cells and Materials* **5**; 1-14 (1995).

Wataha, J.C., Hanks, C.T., Strawn, S.E., Fat, J.C.: Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. *J. of Oral Rehabilitation* **21**, 453-462 (1994).

Wataha, J.C., Hanks, C.T., Zhillin Sun: Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater.* **10**, 156-161 (1994).

Waters, L.C., Schenley, R.L., Owen, B.A., Walsh, P.J., Hsie, A.W., Jolley, R.L., Buchanan M.V., Condie, L.W.: Biotesting of wastewater: a comparative study using the Salmonella and CHO assay systems. *Environ. Mol. Mutagen.* **14**, 254-263 (1989).

Welch, A. B.: Effect of simplex liquid methyl methacrylate monomers on cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, **12**, 775-779 (1978).

Wilsnack, R.E., Meyer, F.J., Smith, J.G.: Human cell culture toxicity testing of medical devices and correlation to animal tests *Biomater Med Devices Artif Organs* **1**, 543-62 (1973).

Zalkind, S.J.: Veränderungen der Zellfunktion bei Langzeitkultivation. In Mauersberger, B.: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 203-226 (1971).

Danksagung

Diese Arbeit ist entstanden an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Dent. Werner Geurtsen, dem ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Aufnahme in seinem Labor sehr herzlich danke. Auch möchte ich Herrn Professor Dr. Steinlechner sehr herzlich für die Durchsicht dieser Arbeit danken.

Herrn Dipl.-Chemiker Werner Spahl von der Universität Köln, Institut für Organische Chemie II danke ich für die Überlassung der Chemikalien.

Frau Dr. rer. nat. Gabriele Leyhausen danke ich für ihre Aufnahme in ihrem Labor.

Weiterhin gilt mein Dank an Frau Angela Sapotnik für ihre unermüdliche Hilfeleistung bei der Erlernung der Methoden der Zellkultur sowie bei der Durchsicht der Arbeit.

Frau Bergmann und Frau Tanja Grafe danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Herrn Dr. Jürgen Heil und Herrn Dr. Georg Reifferscheid danke ich für die Überlassung ihrer Arbeitsmethoden und für ihre freundliche Aufnahme in ihr Labor.

Herrn Dr. Schwarz von der Firma Colter Counter Krefeld danke ich für die freundliche Unterstützung bei dem Umgang mit den Colter Counter.

Lebenslauf :

Name: Lehmann
Vorname: Fred
Geburtsdatum: 27. Juni 1962

Schulbesuch

1968-1972 Grundschule
1972-1981 Integrierte Gesamtschule Hannover-Linden
1981 Abitur

Bundeswehr

1981-1982 Grundwehrdienst

Ausbildung

1982-1984 Ausbildung zum Dachdecker im väterlichen Betrieb

Studium

1984-Juli 1991 Studium der Biologie an der Hochschule Hannover

Juli 1991 Diplom der Biologie

März 1992- 1995 BAT Ila 1/2 Stelle (DFG-finanziert) an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Medizinischen Hochschule Hannover

1993-1996 Studium der Betriebswirtschaft an der Leibniz-Akademie Hannover Abschluß Betriebswirt (VWA)

1995-1999 Dachdecker im väterlichen Betrieb

Ab 1.7. 1999 Repräsentant der Deutschen Ärzte Versicherung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Hannover, im Oktober 1999

(Fred Lehmann)