

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**In-vitro-Untersuchung zur Zytotoxizität
kieferorthopädischer Kunststoffe**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Daniela Helga Witt

aus Kassel

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. dent. Ralf Bürgers

Ko-Referentin: PD Dr. med. Astrid Heutelbeck

Drittreferent:

Datum der mündlichen Prüfung: 01.08.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „In-vitro-
Untersuchung zur Zytotoxizität kieferorthopädischer Kunststoffe“
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angege-
benen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Kieferorthopädische Kunststoffe	2
2.1.1 Allgemein	2
2.1.2 Werkstoffkundliche Aspekte	3
2.2 Zytotoxizität dentaler Kunststoffe.....	7
2.2.1 Zytotoxizität autopolymerisierender Kunststoffe.....	10
2.2.2 Zytotoxizität photopolymerisierender Kunststoffe.....	11
2.2.3 Biologische Verträglichkeit <i>in vivo</i>	13
2.3 Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität dentaler Kunststoffe.....	16
2.3.1 Überblick	16
2.3.2 WST-8-Test	18
2.4 Oberflächenrauheit dentaler Kunststoffe	20
3 Fragestellung	21
4 Material und Methoden.....	22
4.1 Übersicht zum Versuchsaufbau der Zytotoxizitätsmessung	22
4.2 Untersuchte Materialien	23
4.2.1 Orthocryl® LC	23
4.2.2 Weitur®	24
4.2.3 Positiv- und Negativkontrolle.....	25
4.3 Probekörper	26
4.3.1 Herstellung der Probekörper.....	26
4.3.2 Konditionierung der Probekörper	28
4.3.3 Vorbereiten der Well-Platten.....	30
4.4 Zellkulturen	33
4.4.1 Mausfibroblasten (L929)	33
4.4.2 Gingivafibroblasten (GF1)	34

4.4.3	Vorbereiten der Zellkulturen	34
4.5	Messung der Zytotoxizität mittels WST-8-Test.....	36
4.6	Messung der Rauheit.....	38
4.7	Statistische Auswertung	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Zytotoxizität	40
5.1.1	Vorversuch	40
5.1.1.1	Übersicht: Einfluss Probekörper, Zelltypen, Zeit und Silikon	40
5.1.1.2	Zytotoxizität der unterschiedlichen Materialien.....	41
5.1.1.3	Vergleich der Materialien.....	43
5.1.1.4	Zellviabilität der verschiedenen Zelllinien	44
5.1.1.5	Vergleich der Zelllinien.....	46
5.1.2	Hauptversuch.....	48
5.1.2.1	Übersicht: Einfluss Probekörper, Zelltypen, Zeit und Silikon	48
5.1.2.2	Zytotoxizität der unterschiedlichen Materialien.....	50
5.1.2.3	Vergleich der Materialien.....	56
5.1.2.4	Zellviabilität der verschiedenen Zelllinien	58
5.1.2.5	Vergleich der Zelllinien.....	60
5.1.2.6	Zytotoxizität des Silikons	62
5.2	Rauheit	64
5.2.1	Oberflächenrauheit der Materialien.....	64
5.2.2	Vergleich der Oberflächenrauheit der Materialien.....	71
5.3	Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität	72
6	Diskussion.....	73
6.1	Diskussion der Methoden.....	73
6.1.1	Testmaterialien, Positiv- und Negativkontrollen.....	73
6.1.2	Herstellung und Konditionierung der Probekörper	76
6.1.3	Vorbereiten der Well-Platten.....	78
6.1.4	Zellkulturen	79
6.1.5	WST-8-Test.....	80
6.2	Diskussion der Ergebnisse	81
6.2.1	Überblick Ergebnisse Zytotoxizität.....	81
6.2.2	Vergleich der Zytotoxizität.....	82
6.2.3	Zytotoxizität des unpolymerisierten Orthocryl® LC	83

6.2.4	Zytotoxizität von Orthocryl® LC.....	84
6.2.5	Zytotoxizität von Weitur®	85
6.2.6	Effekt der Konditionierung.....	86
6.2.7	Viabilität der Zelllinien	86
6.2.8	Effekt des Silikons.....	87
6.2.9	Ergebnisse Rauheit	88
6.2.10	Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität.....	90
7	Zusammenfassung	91
8	Literaturverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Biochemischer Mechanismus der Reaktion WST-8 zu WST-8-Formazan.....	19
Abb. 2:	Übersicht Versuchsaufbau Zytotoxizität.	22
Abb. 3:	Unpolymerisiertes Orthocryl® LC als Positivkontrolle.....	25
Abb. 4:	Negativform aus Dubliersilikon.	26
Abb. 5:	Streuvorgang Weitur®.	27
Abb. 6:	Verarbeitung Orthocryl® LC.	27
Abb. 7:	Probekörper der getesteten Materialien.....	28
Abb. 8:	Thermocycler.....	29
Abb. 9:	Übersicht Well-Platte: Probenaufteilung der Vorversuche.	31
Abb. 10:	Übersicht Well-Platte: Probenaufteilung im Hauptversuch.	32
Abb. 11:	L929 - Mausfibroblasten.	33
Abb. 12:	GF1 - humane Gingivafibroblasten.	34
Abb. 13:	Testlösung nach Farbumschlag und Übertragung in eine neue Well-Platte.....	37
Abb. 14:	Boxplots zum Einfluss der Materialien im Vorversuch.	42
Abb. 15:	Boxplots zur Zellviabilität der Zelllinien im Vorversuch.	45
Abb. 16:	Boxplots zum Einfluss der Materialien im Hauptversuch.....	51
Abb. 17:	Nicht gealtertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.....	53
Abb. 18:	Nicht gealtertes Orthocryl® LC, GF1, 24 Stunden.....	53
Abb. 19:	Gealtertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.....	53
Abb. 20:	Gealtertes Orthocryl® LC, GF1, 24 Stunden.....	53
Abb. 21:	Nicht gealtertes Weitur®, L929, sechs Stunden.....	54
Abb. 22:	Nicht gealtertes Weitur®, GF1, 24 Stunden.....	54
Abb. 23:	Gealtertes Weitur®, L929, sechs Stunden.....	54
Abb. 24:	Gealtertes Weitur®, GF1, 24 Stunden.....	54

Abb. 25:	Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.....	55
Abb. 26:	Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC, GF1, sechs Stunden.....	55
Abb. 27:	Glas, L929, 24 Stunden.	55
Abb. 28:	Glas, GF1, sechs Stunden.....	55
Abb. 29:	Boxplots zur Zellviabilität der Zelllinien im Hauptversuch.....	59
Abb. 30:	Boxplots zum Einfluss des Silikons auf die Zellviabilität.....	63
Abb. 31:	Boxplots der Oberflächenrauheit (R_A).	65
Abb. 32:	Topografische Darstellung von Orthocryl® LC.....	67
Abb. 33:	Oberfläche von Orthocryl® LC nach Polynomfilterung.....	67
Abb. 34:	Topografische Darstellung von Weitur®.	68
Abb. 35:	Oberfläche von Weitur® nach Polynomfilterung.	68
Abb. 36:	Topografische Darstellung von Orthocryl® LC gealtert.....	69
Abb. 37:	Oberfläche von Orthocryl® LC gealtert nach Polynomfilterung.....	69
Abb. 38:	Topografische Darstellung von Weitur® gealtert.	70
Abb. 39:	Oberfläche von Weitur® gealtert nach Polynomfilterung.....	70
Abb. 40:	Formel zum Errechnen der Zellviabilität in %.....	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Inhaltsstoffe Orthocryl® LC laut Hersteller.....	23
Tab. 2:	Inhaltsstoffe Weitur® laut Hersteller.	24
Tab. 3:	ANOVA-Ergebnisse zum Einfluss der verschiedenen Parameter im Vorversuch.	40
Tab. 4:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der Materialien im Vorversuch.....	43
Tab. 5:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach sechs Stunden (Vorversuch).	47
Tab. 6:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 24 Stunden (Vorversuch).	47
Tab. 7:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 48 Stunden (Vorversuch).	47
Tab. 8:	ANOVA-Ergebnisse zum Einfluss der verschiedenen Parameter im Hauptversuch.	48
Tab. 9:	ANOVA-Ergebnisse bezüglich der Parameter Probekörper und Zelltyp separat für jeden Messzeitpunkt im Hauptversuch.	49
Tab. 10:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der Materialien im Hauptversuch.	57
Tab. 11:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach sechs Stunden (Hauptversuch).....	61
Tab. 12:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 24 Stunden (Hauptversuch).	61
Tab. 13:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 48 Stunden (Hauptversuch).	61
Tab. 14:	ANOVA-Ergebnisse Silikon und Silikon-Zelltyp-Interaktion.	62
Tab. 15:	ANOVA-Ergebnisse des Effekts von Material und Alterung sowie deren Interaktion auf die Oberflächenrauheit (R_A).	64
Tab. 16:	Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich von R_A der Materialien.....	71
Tab. 17:	Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität.	72

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
<i>aqua. dest.</i>	<i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
BMS	Burning-mouth-Syndrom
CCK8	<i>Cell Counting Kit-8</i> ®
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBPO	Dibenzoylperoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FCS	fetales Kälberserum
G	Glas und Silikon
GF1	humane Gingivafibroblasten, Zelllinie GF1
Hrsg.	Herausgeber
L929	Mausfibroblasten, Zelllinie L929
Methoxy-PMS	1-Methoxy-5-Methylphenaziniummethylsulfat
MMA	Methylmethacrylat/Methacrylsäuremethylester
mm/s	Millimeter pro Sekunde
MPG	Medizinproduktegesetz
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
O	Orthocryl® LC und Silikon
OA	Orthocryl® LC gealtert und Silikon
p	Signifikanzwert
p.Holm	Bonferroni-Holm adjustierter p-Wert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Pearsons.r	Pearson-Korrelationskoeffizient
PEG-400-Dimethacrylat	Polyethylenglycoldimethacrylat

PMMA	Polymethylmethacrylat
PMS	Phenaziniummethylsulfat
R _A	Mittenrauwert
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S	Silikon
Tab.	Tabelle
UDMA	Urethandimethacrylat
UO	unpolymerisiertes Orthocryl® LC und Silikon
UV	ultraviolett
W	Weitur® und Silikon
WA	Weitur® gealtert und Silikon
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid
Z	Zellen und Silikon

1 Einleitung

Kunststoffe finden ihren Nutzen in vielen verschiedenen Bereichen des täglichen Lebens, z.B. in der Automobilbranche, im Bauwesen, im Flugzeug- oder Schiffbau. Auch in der Medizin werden Kunststoffe vielfältig genutzt und unter anderem in der Augenoptik, Chirurgie, Hörgeräte-Akustik oder Orthopädie eingesetzt. In der Zahnmedizin haben sie sich beispielsweise zur Herstellung von Prothesen, von kieferorthopädischen Apparaturen, aber auch in Form von Kompositfüllungen etabliert.

Dentale Kunststoffe auf Polymethylmethacrylatbasis sind vergleichsweise schnell und einfach zu verarbeiten. In den Bereichen Funktion und Ästhetik lassen sich mit ihnen hervorragende Ergebnisse erzielen. Dentale Biomaterialien verweilen teilweise für lange Zeit in direktem Kontakt zu den Weichgeweben der Mundhöhle, deswegen sollten zahnmedizinische Kunststoffe exzellente Biokompatibilität aufweisen. In der Zahnmedizin verwendete Polymethylmethacrylate werden seit ihrer Einführung mit Allergien und toxischen Reaktionen in Verbindung gebracht, ihre Biokompatibilität ist daher umstritten.

Im Rahmen der kieferorthopädischen Behandlung kommen dentale Kunststoffe bei nahezu jedem Patienten zur Anwendung. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer kieferorthopädischer Kunststoffe entwickelt. Viele Anbieter werben mit der guten Verträglichkeit ihrer Produkte, ohne wissenschaftliche Nachweise darüber aufzuführen. Auch Produktinformationen und Sicherheitsdatenblätter geben nur einen groben Überblick über die Inhaltsstoffe und potenzielle Gefahren für Behandler und Patienten.

Die vorliegende Studie greift diese Thematik auf und befasst sich mit der Untersuchung und dem Vergleich zweier kieferorthopädischer Kunststoffe in Bezug auf ihre Zytotoxizität. Zusätzlich wurde die Rauheit der Kunststoffe untersucht, um einen möglichen Einfluss der Oberflächenrauheit auf das zytotoxische Potenzial zu beurteilen.

2 Literaturübersicht

2.1 Kieferorthopädische Kunststoffe

2.1.1 Allgemein

In der kieferorthopädischen Therapie von Kindern und Erwachsenen kommen neben festsitzenden Apparaturen auch herausnehmbare Geräte zum Einsatz (Wiedel und Bondemark 2015; Witt 2000; Tränkmann 2000; Diedrich 2000; Hasund *et al.* 2000). Die herausnehmbaren Apparaturen verweilen täglich für mehrere Stunden im Mund (Schäfer *et al.* 2015; Witt *et al.* 1992) und stehen dabei in direktem Kontakt zur Schleimhaut der Mundhöhle (Schendel *et al.* 1995; Wirtz und Diedrich 2002).

Polymethylmethacrylate (PMMA) kommen insbesondere bei der Herstellung von herausnehmbaren, kieferorthopädischen Geräten als Kunststoffbasis zum Einsatz. Das Grundgerüst dieser Apparaturen besteht oftmals aus PMMA und dient als tragender Anteil für die Metallelemente (Wirtz und Diedrich 2002). Auch Operations-Splinte im Rahmen einer kombiniert kieferchirurgisch-kieferorthopädischen Therapie werden aus PMMA gefertigt (Schwestka-Polly 2004). Bei einigen festsitzenden Apparaturen gibt es ebenfalls Konstruktionen, die einen PMMA-Anteil besitzen (Dawjee *et al.* 2009; Chiu *et al.* 2005).

Neben PMMA finden sich in kieferorthopädischen Kunststoffen andere Bestandteile, wie Initiatoren, Stabilisatoren und Katalysatoren. Grundsätzlich sind kieferorthopädische Kunststoffe in Bezug auf ihre Bestandteile nahezu identisch mit Kunststoffen, die in der zahnärztlichen Prothetik zur Herstellung von Voll- und Teilprothesen verwendet werden (Lietz *et al.* 2015). Kunststoffe auf PMMA-Basis haben sich in der Vergangenheit als klinisch sehr zuverlässig bewährt (Groß 1979).

2.1.2 Werkstoffkundliche Aspekte

Die exakte Zusammensetzung der einzelnen kieferorthopädischen Kunststoffe ist nur schwierig zu eruieren. Das Produktgeheimnis ermöglicht es dem Hersteller, auf die Angabe der genauen prozentualen Mengen der Inhaltsstoffe zu verzichten. Exaktere Angaben wären allerdings in Bezug auf den „verantwortungsbewussten Einsatz der Kunststoffe durch den Kieferorthopäden wünschenswert“ (Rose *et al.* 2000). Da viele Inhaltsstoffe nicht bekannt sind, ist auch die Ad-hoc-Beurteilung von Unverträglichkeiten gegenüber dentalen Kunststoffen nicht adäquat möglich (Marino *et al.* 2009).

Die Basisbausteine des PMMA sind Methylmethacrylat-Monomere (MMA), auch Methacrylsäuremethylester genannt. MMA hat einen Siedepunkt von 100,3 °C, besitzt eine klare Farbe und riecht bei Raumtemperatur stechend (Caesar und Ernst 1998). Das monofunktionelle MMA-Molekül enthält eine sehr reaktionsfreudige Doppelbindung. Nach deren Aufspaltung bildet sich aus mehreren Monomeren ein Polymer (Janda 2000). Werden nur MMA-Monomere miteinander polymerisiert, ist die Polymerisationsschrumpfung beachtlich und liegt bei etwa 21 Volumenprozent (Welker 1998, 2000; Combe und Dermann 1984). Je mehr Molmasse und je weniger reaktive Gruppen die Ausgangsmomere besitzen, umso geringer wird die Polymerisationsschrumpfung (Janda 1990, 2000).

Der Überbegriff für chemische Reaktionen, bei denen aus Monomeren ein Polymer gebildet wird, ist „Polyreaktion“. Neben MMA werden auch verschiedene andere Monomere eingesetzt. Diese besitzen zum Teil sehr unterschiedliche Molmassen, Beispiele sind Urethandimethacrylat (UDMA) und Ethylenglycoldimethacrylat (Tanaka *et al.* 2001; Ruyter und Sjøvik 1981). Diese Monomere sind mehrfach funktionell und können daher dreidimensionale Polymernetzwerke bilden (Caesar und Ernst 1998). Dabei entstehen sogenannte „kruzvernetzte Polymere“ (Craig *et al.* 2006). Mehrfach funktionelle Monomere werden häufig als Copolymere und Vernetzer genutzt, wobei UDMA ein besonders effektiver Vernetzer ist (Floyd und Dickens 2006). Bei den verschiedenen Polyreaktionstypen sind die Polymerisation, die Polykondensation und die Polyaddition von besonderer Bedeutung (Janda 2000; Marxkors und Meiners 2005).

Die bedeutsamste Polymerisationsform ist die „radikalische Polymerisation“. Sie kommt bei dentalen Kunststoffen als einzige Polymerisationsart vor. Für den Reaktionsstart wer-

den freie Radikale benötigt, die Ausgangsverbindung muss daher ein unpaariges Elektron besitzen (Combe und Dermann 1984). Eine Polymerisationsreaktion besteht aus drei Phasen: der Kettenstartreaktion, der Kettenfortpflanzungsreaktion und der Kettenabbruchreaktion (Mortimer *et al.* 2014). Zur Kettenstartreaktion wird ein Initiator benötigt, der mithilfe von Energie zu einem Radikal umgewandelt wird. Dieses Radikal reagiert nach seiner Entstehung mit der reaktiven Doppelbindung eines Monomermoleküls oder eines bereits vorpolymerisierten Polymermoleküls. Als Reaktionsprodukt entsteht erneut ein Radikal (Marxkors und Meiners 2005). In der folgenden Kettenfortpflanzungsreaktion reagiert dieses Radikal solange fortlaufend mit dem nächsten Monomer oder Polymer, bis es zu einem Kettenabbruch kommt. Ein Kettenabbruch kann dadurch erfolgen, dass kein Monomer für eine weitere Reaktion mehr vorhanden ist oder durch die Reaktion von zwei Radikalen. Möglich ist die Reaktion zweier Monomerradikale, zweier Polymerradikale oder eines Monomer- mit einem Polymerradikal (Janda 2000).

Die Polykondensation ist eine Reaktion zwischen zwei Molekülen, bei der neben dem Reaktionsprodukt noch ein zweites Produkt abgespalten wird. In der Regel ist dieses zweite Produkt Wasser. Ein Beispiel für eine Polykondensation ist die Bildung von Silikonen (Combe und Dermann 1984). Bei einer Polyaddition entsteht im Gegensatz zur Polykondensation kein zweites Reaktionsprodukt. Im Unterschied zu der Polymerisation müssen sowohl bei der Polyaddition als auch bei der Polykondensation Monomere mit zwei reaktiven Doppelbindungen vorhanden sein, da es sonst nicht zu einer Kettenfortpflanzungsreaktion kommen kann (Janda 2000).

Die in der Zahnmedizin verwendeten Kunststoffe lassen sich hinsichtlich der benötigten Aktivierungsenergie einteilen. Unterschieden werden Heißpolymerisate, Autopolymerisate und Photopolymerisate (Geurtsen 2005; Janda 2000; Welker 1998). Je nach Polymerisationstyp gibt es verschiedene Initiatoren. (Di)Benzoylperoxid (DBPO) ist ein weitverbreiteter Initiator für die Heißpolymerisation (Groß 1979; Marxkors und Meiners 2005; Janda 2000). Ab etwa 74 °C zerfällt DBPO in zwei Benzoylradikale und initiiert damit die oben beschriebene radikalische Polymerisation (Craig *et al.* 2006). Vereinzelt kann es außerdem zu einem spontanen Zerfall in seine Radikale kommen. Dies ist vor allem bei einphasigen Heißpolymerisaten problematisch, weil bei ihnen Monomere und DBPO in einer Komponente vereint sind (Janda 2000). Ein weiterer Initiator für Heißpolymerisation ist 2,5-Dimethylhexan-2,5-diperbenzoat, welches eine deutlich höhere Zerfallstemperatur besitzt.

Je weniger Initiatoren vorhanden sind, umso längerkettig werden die Polymere, und ihre Molmasse steigt (Marxkors und Meiners 2005). Die Aktivierungsenergie kann bei der Heißpolymerisation z.B. über ein Wasserbad zugeführt werden (Welker 1998; Marxkors und Meiners 2005). Alternativ kann die Polymerisation in der Mikrowelle erfolgen. Bei dieser Mikrowellenpolymerisation erfolgt die Aktivierung über elektromagnetische Wellen einer Frequenz von 2450 MHz (de Clerck 1987; Doori *et al.* 1988; Welker 1998). Die Polymerisationszeit ist hierbei deutlich kürzer als bei der konventionellen Heißpolymerisation (Welker 1998). Bei der Herstellung von kieferorthopädischen Apparaturen wird in der Regel auf Heißpolymerisate verzichtet, da es zu Problemen beim Ausbetten der aktiven Elemente und Halteelemente kommen kann (Rossiwall *et al.* 1984).

Autopolymerisationen werden durch das Zusammenführen von mindestens zwei verschiedenen Phasen initiiert, die zusammen ein Redoxsystem bilden (Janda 2000; Marxkors und Meiners 2005). Viele Redoxsysteme kombinieren DBPO mit verschiedenen tertiären Aminen. N,N-Dimethyl-p-toluidin hat sich hierbei in der Vergangenheit als besonders effektiv erwiesen (Lal und Green 1955). Tertiäre Amine reduzieren die für einen Reaktionsstart benötigte Temperatur auf unter 50 °C (Lietz *et al.* 2015). Nachteil dieser Redoxsysteme ist, dass es durch verschiedene Nebenreaktionsprodukte nach einiger Zeit zu einer bräunlichen Verfärbung der Kunststoffe kommen kann (Groß 1979). Hierbei gibt es je nach Art des Amins Unterschiede in der Farbstabilität (Bowen und Argentar 1971). Eine Alternative zu diesen Redoxsystemen sind Barbitursäurederivate in Kombination mit Kupferionen (Janda 2000; Marxkors und Meiners 2005). Autopolymerisate mit Barbitursäureinitiatoren sind langfristig farbstabil (Janda 2000; Groß 1979).

Photopolymerisate nutzen Licht einer bestimmten Wellenlänge als Aktivierungsenergie, wobei der Photoinitiator zur Wellenlänge des Lichts kompatibel sein muss (Hellwig *et al.* 1999). Welker (2000) empfiehlt bei der Aushärtung einen „Sicherheitszuschlag an Bestrahlungszeit“. Ein weitverbreiteter Photoinitiator bei dentalen Kunststoffen ist Campherchinon, welches bei einer Wellenlänge zwischen 400 und 490 nm zum Radikal wird (Boeck 2008). In Kombination mit dem zweiten Initiator 1-Phenyl-1,2-Propandion ist die Polymerisationsrate höher als bei der alleinigen Verwendung von Campherchinon (Park *et al.* 1999). Die Herstellung kieferorthopädischer Apparaturen aus Photopolymerisaten ist gegenüber einer Herstellung aus Autopolymerisaten zeitsparend (Lewis *et al.* 1988).

Dentale Kunststoffe enthalten neben Initiatoren auch Katalysatoren. Diese sorgen für einen rascheren Reaktionsablauf und setzen die benötigte Aktivierungsenergie herab (Zeeck *et al.* 2014). Sie werden im Gegensatz zu den Initiatoren während der Polyreaktion nicht umgesetzt (Zeeck *et al.* 2014; Mortimer *et al.* 2014). Um eine Polymerisationsreaktion während der Lagerung des Werkstoffes zu unterdrücken, sind dentalen Kunststoffen Stabilisatoren beigemischt (Caesar und Ernst 1998). Hierbei finden Hydrochinon und dessen Derivate Verwendung (Combe und Dermann 1984). Durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms von Hydrochinon an ein entstandenes Radikal kann ein unerwünschter Reaktionsstart verhindert werden (Janda 1990). Eine Polymerisation beginnt erst, wenn der Stabilisator aufgebraucht worden ist (Quast und Viohl 1986). Luftsauerstoff verhindert die Polymerisation durch Reaktion seiner Doppelbindung mit den Radikalen. An der Oberfläche des Kunststoffes bildet sich eine Sauerstoffinhibitionsschicht aus Monomeren (Janda 2000). Diese zeigt sich besonders bei lichthärtenden Kunststoffen als schmierige Oberfläche nach der Polymerisation (Janda 1990). Unter Ausschluss von Sauerstoff bildet sich diese Inhibitionsschicht nicht aus (Shawkat *et al.* 2009). Aus diesem Grund besitzen in Wasser polymerisierte Autopolymerisate keine Sauerstoffinhibitionsschicht (Vallittu 1999).

Vielen dentalen Kunststoffen sind Füllstoffe beigemischt. Sie verringern das Ausmaß der Polymerisationsschrumpfung und beeinflussen die Viskosität (Janda 2000). Füllstoffe verbessern außerdem die mechanischen Eigenschaften von Kunststoffen (Combe und Dermann 1984). Als organische Füllstoffe liegen sie als bereits vorpolymerisiertes PMMA in Splitter- oder Perlenform vor (Caesar und Ernst 1998). Organische Füllstoffe lassen sich im polymerisierten Kunststoff nicht mehr von den ursprünglichen Monomeren unterscheiden (Quast und Viohl 1986). Anorganische Füllstoffe sind vor allem in Kompositen enthalten (Hellwig *et al.* 1999).

Bei keiner Polyreaktion kommt es zur Reaktion aller vorhandenen Monomere. Die nicht polymerisierten Monomere werden als Restmonomere bezeichnet und befinden sich im Polymergeflecht. Je höher die Polymerisationsrate, desto geringer ist der Restmonomergehalt. Die Polymerisationsrate ist neben der Temperatur, Art und Dauer der Polymerisation auch von der Oberflächenstruktur der Kunststoffe abhängig (Geurtsen 2005). Restmonomere stehen in Verdacht für Zytotoxizität *in vitro* und Überempfindlichkeitsreaktionen *in vivo* verantwortlich zu sein (Giunta und Zablotzky 1976). Der Restmonomergehalt ist bei Autopolymerisaten mit 1,5–4,5 % deutlich höher als bei Heißpolymerisaten. Dies ist durch

die höhere Polymerisationstemperatur bedingt (Stafford und Brooks 1985). Eine Reduktion des Restmonomergehalts kann sowohl bei Heiß- als auch bei Autopolymerisaten durch eine Erhöhung der Polymerisationstemperatur erreicht werden. Bei Heißpolymerisaten reduziert sich dieser durch eine Polymerisation bei 100 °C für zwölf Stunden auf nur 0,07 % (Vallittu *et al.* 1998). Polymerisierte Kunststoffe können Restmonomer, andere Zusatzstoffe und Reaktionsprodukte an eine wässrige Umgebung, z.B. Speichel, abgeben (Kopperud *et al.* 2011; Mikai *et al.* 2006; Geurtsen 2005). Hierbei eluiert nicht das gesamte Restmonomer aus dem polymerisierten Kunststoff, sondern lediglich 10 %, wobei unterschiedliche Angaben je nach Art des Monomers gemacht werden (Ferracane 1994; Inoue und Hayashi 1982). Restmonomer wird bei seiner Freisetzung aus dem Polymergerüst herausgelöst und durch Wassermoleküle ersetzt. In den ersten 24 Stunden ist die Restmonomerabgabe am höchsten und sinkt danach deutlich (Stafford und Brooks 1985; Kopperud *et al.* 2011; Bural *et al.* 2011). Trotzdem kann auch nach 29 Jahren klinischen Gebrauchs einer Zahnprothese noch Monomer im Eluat nachgewiesen werden (Mikai *et al.* 2006).

2.2 Zytotoxizität dentaler Kunststoffe

Die Zytotoxizität dentaler Kunststoffe hängt insbesondere vom Gehalt an Restmonomeren ab, die nach der Polymerisation in ein wässriges Eluat abgegeben werden (Rose *et al.* 2000). Dentale Kunststoffe können Restmonomer auch an Zellkulturmedien abgeben (Bural *et al.* 2011). Kedjarune *et al.* (1999) untersuchten die Mengen an Restmonomer, die von Heiß- und Autopolymerisaten in Speichel eluieren. Sie setzten anschließend exakt die gleiche Menge an Monomer für einen Zytotoxizitätstest an menschlichen Gingivafibroblasten ein. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dieser Monomermenge und der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Dabei schnitten die Heißpolymerisate aufgrund des deutlich geringeren Restmonomergehalts im Durchschnitt besser ab als die Autopolymerisate. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Ata und Yavuzylmaz (2009). Sie verglichen die Zytotoxizität von heiß- und autopolymerisierenden Kunststoffen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test, siehe Kapitel 2.3.1) an L929-Mausfibroblasten (L929). Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurde eine signifikant höhere Zytotoxizität des Autopolymerisates festgestellt.

Rose *et al.* (2000) untersuchten den Effekt der Lagerung verschiedener dentaler Kunststoffe in Wasser durch einen MTT-Test an Fibroblasten. Eine dreitägige Lagerung ihrer Probestkörper in Wasser verringerte die Zytotoxizität des Photopolymerisates Triad® (Dentsply, York, United States of America (USA)) von 34,6 % auf 25,6 % und des Autopolymerisates Forestacryl® (Forestadent® Bernhard Förster GmbH, Pforzheim, Deutschland) von 47,3 % auf 24,8 %. Die Zytotoxizität wurde demnach bei dem Autopolymerisat fast um die Hälfte reduziert und auch bei dem Photopolymerisat signifikant verringert. Die Autoren begründeten dies mit der abnehmenden Restmonomerabgabe. Je länger ein Kunststoff in Wasser gelagert wird, umso weniger Restmonomer wird abgegeben. Heißpolymerisate setzten in dieser Studie am wenigsten Restmonomer frei. Je nach Produkt wurden zwischen $45,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ und $99,2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ gemessen. Autopolymerisate eluierten mehr MMA ($930,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bis $1034,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) als Photopolymerisate UDMA ($97,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ bis $155,4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Ebrahimi Saravi *et al.* (2012) befassten sich mit der Zytotoxizität zweier Autopolymerisate (FuturaGen®, Schütz Dental GmbH, Rossbach, Deutschland und GC Reline Hard®, GC America Inc, Alsip, USA) und der Zytotoxizität des Heißpolymerisates Meliodent® (Heraeus Kulzer GmbH & Co., Hanau, Deutschland). Der Zytotoxizitätstest erfolgte in dieser Studie mit dem 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid-Test (XTT, siehe Kapitel 2.3.1). Alle drei getesteten Kunststoffe wirkten nach einer Stunde zytotoxisch auf die verwendeten L929-Zellen, dabei zeigten die Autopolymerisate eine signifikant höhere Zytotoxizität als das Heißpolymerisat. Nach 24 Stunden ergab sich eine signifikante Verringerung der Zytotoxizität bei den drei getesteten Kunststoffen. Aus diesem Grund empfehlen auch diese Autoren nach der Polymerisation und vor dem Einsetzen eine 24-stündige Lagerung der Kunststoffe in Wasser. Eine Studie zur Zytotoxizität dentaler Kunststoffe, die rein durch Zellzählung unter dem Lichtmikroskop die Zytotoxizität verschiedener Auto- und Heißpolymerisate untersuchte, konnte bei den unterschiedlichen Materialien beider Polymerisationsformen eine schwache bis mäßige Zytotoxizität nachweisen. Die Heißpolymerisate erwiesen sich auch hier im Durchschnitt weniger zytotoxisch als die Autopolymerisate (Hensten-Pettersen und Wictorin 1981).

Die Zytotoxizität der Monomere wird u.a. dadurch verursacht, dass sie die Membranen der Zelle und der Mitochondrien zerstören und die ATP-Synthese verhindern (Bereznowski 1994). Durch das Fehlen von ATP kommt es zur Apoptose bzw. Nekrose der Zellen (Cimpan *et al.* 2000). Die Ursache für diese Zellschädigungen und letztendlich die Apoptose ist

oxidativer Stress (Jiao *et al.* 2016; Lee *et al.* 2006). Durch Monomere treten vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid, Superoxidation oder Hydroxylradikale, in der Zelle auf (Krifka *et al.* 2013; Schweikl *et al.* 2006). Diese ROS können wichtige Strukturen der Zellen zerstören (Beckman und Ames 1997; Frank *et al.* 2000; Krifka *et al.* 2013). Die Redoxmechanismen der Zelle, wie z.B. Glutathion, schützen die intrazellulären Strukturen vor ROS (Schweikl *et al.* 2006; Krifka *et al.* 2013; Lee *et al.* 2006). Auch eine Verringerung von Glutathion in den Zellen wird als indirekter Grund für den Anstieg von ROS in den Zellen diskutiert (Krifka *et al.* 2013).

Neben den verschiedenen Restmonomeren kann auch Formaldehyd im Eluat von dentalen Kunststoffen enthalten sein (Bettencourt *et al.* 2010; Kopperud *et al.* 2011; Tsuchiya *et al.* 1994; Tsuchiya *et al.* 1993). Formaldehyd konnte sowohl bei Autopolymerisaten als auch bei Photo- und Heißpolymerisaten nachgewiesen werden (Ruyter 1980). Unter Anwesenheit von Sauerstoff wird es durch Oxidation von Restmonomer oder durch die Bildung eines Peroxid-Co-Oligomers gebildet. Dieses Oligomer ist nicht stabil und zerfällt in Methylpyruvat und Formaldehyd (Ruyter 1980). Ähnlich wie bei den Monomeren führt die Anwesenheit von Sauerstoff zur Entstehung einer größeren Menge an Formaldehyd (Oy-saed *et al.* 1988). Durch die Entfernung der Sauerstoffinhibitionsschicht reduziert sich die Abgabe von Formaldehyd an eine wässrige Umgebung signifikant (Tsuchiya *et al.* 1993). In Korrelation zu den Restmonomeren reduziert sich die Abgabe von Formaldehyd ebenfalls im Laufe der Zeit (Mikai *et al.* 2006; Tsuchiya *et al.* 1994). *In vitro* ist Formaldehyd bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark zytotoxisch. Primäre Zellen scheinen besonders empfindlich auf Formaldehyd zu reagieren (Lovschall *et al.* 2002). Formaldehyd wirkt schon in einer geringeren Dosis zytotoxisch als MMA. Bereits bei einer Konzentration von 50,0 nmol pro ml reduziert sich die Anzahl lebender Zellen auf 20 %. Bei MMA hingegen ist bei einer Konzentration von 0,5 µmol/ml keine signifikante Abnahme lebender Zellen zu beobachten (Tsuchiya *et al.* 1994).

In verschiedenen Studien wurden die unterschiedlichen Farben kieferorthopädischer Kunststoffe hinsichtlich ihrer Zytotoxizität mit klarem Kunststoff verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Retamoso *et al.* 2014; Schendel *et al.* 1995; Zentner *et al.* 1994). Andere Studien untersuchten den Einfluss verschieden langer Polymerisationszeiten auf die Zytotoxizität und kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Hensten-Pettersen und Wictorin (1981) keinen Einfluss der Polymerisationszei-

ten auf die Zytotoxizität nachweisen konnten, stellten Jorge *et al.* (2007) mittels einer DNA-Synthese-Untersuchung einen signifikanten Effekt unterschiedlicher Polymerisationszeiten bei Autopolymerisaten fest. Folgte einer langen Polymerisationszeit eine Lagerung in einem Wasserbad bei 55 °C für sechs Minuten, reduzierte sich die zytotoxische Wirkung auf unter 25 %. Dies beurteilten die Autoren als „nicht zytotoxisch“. Bural *et al.* (2011) untersuchten 144 heißpolymerisierte Prüfkörper des Kunststoffes Meliodent®, die während der Herstellung unterschiedlich lange polymerisiert worden waren. Es wurde der Restmonomergehalt durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gemessen und zusätzlich die Zytotoxizität mittels XTT-Test (siehe Kapitel 2.3.1) getestet. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass ein Abkochen nach der Polymerisation die Restmonomerabgabe deutlich verringert und dadurch die Zytotoxizität gemindert werden kann.

Ein weiterer Bestandteil von Heiß- und auch einigen Autopolymerisaten ist das DBPO, welches als Initiator bei Polymerisationsreaktionen aktiv wird (Groß 1979; Marxkors und Meiners 2005). Dibenzoylperoxidhaltigen Kunststoffen konnte bereits *in vitro* durch MTT-Test eine höhere Zytotoxizität nachgewiesen werden als Kunststoffen, die mittels Barbitursäureinitiatoren polymerisieren (Rose *et al.* 2000). Boeckler *et al.* (2008) untersuchten den Gehalt an DBPO in dentalen Polymethylmethacrylaten vor und nach der Lagerung in künstlichem Speichel. Nach acht Tagen konnte kein signifikanter Unterschied zur Ursprungskonzentration festgestellt werden. Im Gegensatz zu MMA ist es daher unwahrscheinlich, dass DBPO in den Speichel eluiert. Dies beruht vermutlich auf den hydrophoben Eigenschaften dieses Initiators (Boeckler *et al.* 2008; Shintani *et al.* 1993).

2.2.1 Zytotoxizität autopolymerisierender Kunststoffe

Autopolymerisierende Kunststoffe zeigten in der Mehrzahl bisheriger Publikationen im Vergleich zu Heißpolymerisaten eine höhere Zytotoxizität (Jorge *et al.* 2003; Hensten-Petersen und Wictorin 1981; Rose *et al.* 2000; Kedjarune *et al.* 1999). Schendel *et al.* (1992) untersuchten den autopolymerisierenden, kieferorthopädischen Kunststoff Orthocryl® (Dentaurum, Ispringen, Deutschland) direkt nach Polymerisation im Drucktopf und nach einem halben Jahr Tragezeit. Insgesamt testeten sie die Zytotoxizität 24-mal mittels Agardiffusionstest und Neutralrotfärbung (siehe Kapitel 2.3.1) an L929-Zellen und an

menschlichen Keratinozyten. In beiden Fällen beurteilten sie diesen Kunststoff als „nicht toxisch“, da weder Zellen zerstört noch geschädigt waren. Dieses Ergebnis bestätigt eine Studie von Zentner *et al.* (1994). Diese Autoren untersuchten menschliche Gingivafibroblasten, welche auf Orthocryl®-Probekörpern ausgesät worden waren, unter dem Lichtmikroskop. Der Zellrasen und die Morphologie der Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten beurteilt. In den ersten 24 Stunden konnte ein gehemmtes Zellwachstum im direkten Umfeld der Probekörper festgestellt werden. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten konnte kein gehemmtes Zellwachstum mehr nachgewiesen werden. Abschließend beurteilten sie Orthocryl® daher als nicht zytotoxisch.

Eine Untersuchung von Öztürk *et al.* (2011) befasste sich mit dem Vergleich zweier unterschiedlicher Verarbeitungsmethoden von Autopolymerisaten, dem Anteigen und dem Sprühverfahren. Im Rahmen dieser Studie wurden die drei Autopolymerisate Orthocryl® EQ (Dentaurum, Ispringen, Deutschland), Orthoplast® (Vertex Dental, Zeist, Niederlande) und O-80® (Imicryl, Konya, Türkei) durch Anteigen und Sprühverfahren verarbeitet und die Zytotoxizität durch elektrische Impedanzmessung ermittelt (siehe Kapitel 2.3.1). Es konnten keine Unterschiede für diese Verfahren bezüglich der Zytotoxizität der polymerisierten Materialien festgestellt werden.

2.2.2 Zytotoxizität photopolymerisierender Kunststoffe

Schendel *et al.* (1992) untersuchten neben dem Autopolymerisat Orthocryl® auch die Zytotoxizität des photopolymerisierenden, kieferorthopädischen Kunststoffes Wil-o-dont® (Wilde dental GmbH, Eltville am Rhein, Deutschland) mit dem Agardiffusionstest und Neutralrotfärbung (siehe Kapitel 2.3.1). Nach Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht mit der vom Hersteller empfohlenen Alkohollösung konnten kaum zytotoxische Reaktionen festgestellt werden. Eine minimale Entfärbung der Zellen deutete auf eine sehr geringe Zellschädigung hin. Wachstumshemmungen der Zellkultur gab es in einem sehr geringen Umfang direkt unter den Probekörpern. Härtete das Material ohne Kontakt zu Luftsauerstoff aus, waren weder geschädigte Zellen noch Wachstumsdefizite zu erkennen. Die Autoren beurteilten Wil-o-dont® daher nach Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht als nicht zytotoxisch. Im Gegensatz dazu war die Zytotoxizität bei Aushärtung in Kontakt zu

Luftsauerstoff und ohne Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht ausgeprägt. Es zeigte sich eine Wachstumshemmung von über 0,5 cm um die Probekörper und bis zu 20 % der Zellen waren zerstört. Die Autoren bewerteten das Material abschließend „bezüglich seiner möglichen toxischen Eigenschaften als nicht unproblematisch“. Auch Rose *et al.* (2000) kamen bei der Untersuchung des Photopolymerisates Wil-o-dont® mittels MTT-Test zu ähnlichen Ergebnissen. Die Wachstumshemmung betrug in ihrer Studie 38,4 %, sodass die Autoren das Material nach ISO 10993-5 (2009b) als „gering zytotoxisch“ einstufen. Die photopolymerisierenden Kunststoffe Triad®, Odontolux® (Dreve-Dentamid GmbH, Unna, Deutschland) und Lux-A-Tech® (DMG Chemisch-pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland) zeigten in dieser Studie ähnliche Ergebnisse. Bewusst wurde beim Kunststoff Triad® die Untersuchung zusätzlich ohne das Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht durchgeführt. Dadurch erhöhte sich die Zytotoxizitätsrate auch hier signifikant. Zentner *et al.* (1994) testeten ebenfalls Wil-o-dont® in Bezug auf dessen Zytotoxizität im Rahmen des schon in 2.2.1 beschriebenen Versuchsaufbaus und konnten diesem „keine toxikologische Unbedenklichkeit“ bescheinigen. Als besonders bedenklich beurteilten sie das Monomer des nicht ausgehärteten lichthärtenden Kunststoffes.

Auch Photopolymerisate geben nach ihrer Polymerisation Restmonomer ab. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um MMA, sondern um andere Matrixmonomere. Rose *et al.* (2000) wiesen bei verschiedenen Photopolymerisaten das Matrixmonomer UDMA nach. Autopolymerisate gaben in dieser Studie über das Zehnfache an MMA an eine wässrige Umgebung ab als Photopolymerisate UDMA. Die Photopolymerisate waren im Zytotoxizitätstest mit einer Wachstumshemmung in der Zellkultur von bis zu 38,4 % gering zytotoxischer als die Autopolymerisate, obwohl sie weniger UDMA eluierten. Die Autoren schlussfolgerten, dass UDMA zytotoxischer wirkt als MMA. Urethandimethacrylat verursacht meist eine Nekrose und keine Apoptose der Zellen (Reichl *et al.* 2006). In einer aktuelleren Studie von Akin *et al.* (2015) wurden die Zytotoxizität und die Wasseraufnahme des UDMA-basierten, photopolymerisierenden Kunststoffes Eclipse® (Dentsply, York, USA) mit denen des heißpolymerisierenden Kunststoffes Meliodent® verglichen. Als Testmethode für die Zytotoxizität wurde die Agardiffusionsmethode an L929 durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1). Beide Kunststoffe zeigten in diesem Versuchsaufbau keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, allerdings war die Wasseraufnahme des photopolymerisierenden Kunststoffes signifikant erhöht.

2.2.3 Biologische Verträglichkeit *in vivo*

Klinisch ist nicht direkt beurteilbar, ob zwischen dentalen Kunststoffen und Reizungen der Mundschleimhaut in ihrer Umgebung ein kausaler Zusammenhang besteht. Auch die erschwerte Selbstreinigung der Schleimhaut beim Tragen der Apparaturen, die Keimbesiedelung und die mechanische Reizung können Ursachen für eine Irritation der Schleimhaut sein (Lietz *et al.* 2015). Eine echte Allergie gegen den Kunststoff der kieferorthopädischen Apparaturen ist zwar in der Literatur beschrieben (Gonçalves *et al.* 2006; Rojas-Alcayaga *et al.* 2012), betrifft aber „nur unter 1 % der Patienten und hat daher epidemiologisch eine untergeordnete Rolle“ (Tschernitscheka *et al.* 1998). Liegt dennoch eine allergische Reaktion gegen einen MMA-basierten Werkstoff vor, können alternativ UDMA-basierte Kunststoffe verwendet werden (Tanoue *et al.* 2005).

Neben MMA kann auch DBPO *in vivo* als Allergen wirken (Dejobert *et al.* 2002; Haustein *et al.* 1985; Gebhart und Geier 1996). In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zum Allergiepotenzial. Während Haustein *et al.* (1985) DBPO lediglich ein leichtes Allergiepotenzial nachweisen konnten, beobachteten Rojas-Alcayaga *et al.* (2012) ein deutlich höheres. In dieser Studie kam es bei 12,5% der untersuchten Probanden zu einer allergischen Reaktion. Patienten, die zu atopischen Reaktionen neigten, reagierten im Rahmen des durchgeführten Epikutan-Tests signifikant häufiger als Nicht-Atopiker.

Der Verdacht, dass eine orale Aufnahme von geringen Mengen MMA innere Organe schädigt, konnte im Tierversuch nicht bestätigt werden (Bereznowski 1995). Bei der direkten Applikation von MMA in den Magen von Ratten stieg zwar der Serumspiegel des MMA-Abbauproduktes Methacrylsäure, es konnten aber keine histopathologischen Veränderungen der inneren Organe festgestellt werden. Singh *et al.* (2013) untersuchten in einer klinischen Studie den Monomergehalt im Speichel von Probanden. Nach einem Tag Tragezeit einer neu angefertigten PMMA-basierten Apparatur war immer noch ein Monomergehalt von 0,3 µg/ml nachzuweisen. Baker *et al.* (1988) konnten in ihrer Untersuchung nach einer Woche Tragedauer ebenfalls noch eine geringe Menge MMA im Speichel nachweisen. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge des Restmonomers in der Apparatur und dem nachgewiesenen MMA im Speichel der Patienten. Im Gegensatz dazu war kein MMA im Blut oder Urin der Träger zu finden. Grund für den negativen Nachweis

ist eine rasche Metabolisierung von oral aufgenommenem MMA durch Carboxylesterasen in weniger toxische Substanzen (Bereznowski 1995). Die Elimination von MMA aus dem Körper findet über die Leber statt. Bei Patienten mit Lebererkrankungen kann daher die toxische Wirkung von MMA gegenüber anderen Organen nicht ausgeschlossen werden (Bereznowski 1997). Problematischer als die orale Aufnahme stellt sich die Aufnahme von MMA während des Zementierens von Gelenkprothesen dar. Methylmethacrylat wird dabei in Zusammenhang mit einer peripheren Vasodilatation gebracht (Peebles *et al.* 1972).

Im zahnmedizinischen Einsatzbereich werden lokale Reizungen der Schleimhaut durch den Kunststoff als problematisch angesehen. Auch das Burning-Mouth-Syndrom (BMS) wird in Zusammenhang mit Bestandteilen von Prothesenwerkstoffen genannt (Kaaber *et al.* 1979; Marino *et al.* 2009). Als BMS werden Brennen und Schmerzen an der sonst klinisch unauffälligen Mundschleimhaut definiert (Kramp und Graumüller 2004). Häufig ist BMS multifaktoriell bedingt. Mögliche Ursachen können z.B. Diabetes mellitus, oraler Pilzbefall oder psychische Erkrankungen sein (Kramp und Graumüller 2004; Witt und Palla 2002). Außerdem konnte in einigen Fällen durch Epikutan-Tests bewiesen werden, dass BMS durch Inhaltsstoffe dentaler Kunststoffe induziert wurde (Kaaber *et al.* 1979; Marino *et al.* 2009; van Loon *et al.* 1992).

Schendel *et al.* (1994) testeten die Schleimhautverträglichkeit verschiedener kieferorthopädischer Werkstoffe in einem Hühnereier-Test mithilfe der Chorion-Allantois-Membran. Dabei wurden angebrütete Hühnereier über kleine Bohrungen mit den zu untersuchenden Materialien bestückt. Die untersuchten Auto- und Photopolymerisate führten bei sachgemäßer Verarbeitung nicht zu auffälligen Reaktionen. Bei Belassen der Sauerstoffinhibitionschicht waren allerdings nach einiger Zeit kleine Gefäße nicht mehr intakt. Die Monomere der Kunststoffe wirkten extrem schädigend.

Es gibt viele Menschen, die einer beruflichen Exposition gegenüber MMA und DBPO ausgesetzt sind. Neben Zahnärzten und Zahnärztinnen sowie Zahnarzhelfer/-innen kommen auch Zahntechniker/-innen in den Laboren häufig mit diesen Werkstoffen in Kontakt. Aalto-Korte *et al.* (2007) bestätigten bei 25 % ihrer Probanden aus dem zahnmedizinischen Arbeitsbereich eine MMA-Allergie. Es sind auch Fälle von Allergien gegenüber lighthärtenden dentalen Kunststoffen bekannt (Kanerva *et al.* 1993). Bei Zahntechnikern und Zahntechnikerinnen werden Allergien auf DBPO und MMA häufiger positiv getestet als

bei Menschen, bei denen keine berufliche Exposition gegenüber diesen Stoffen besteht. Eine DBPO-Allergie wurde in einer Studie von Gebhart und Geier (1996) bei Patienten mit Dermatosen ohne berufliche Exposition in 5,1 % nachgewiesen. In derselben Studie waren 9,8 % der Zahntechniker/-innen von einer MMA-Allergie betroffen, hingegen nur 1,8 % anderer Patienten und Patientinnen ohne Dermatosen. Da Schutzhandschuhe aus Latex und Vinyl schon ab der ersten Minute permeabel für MMA sind, bieten diese keinen adäquaten Schutz (Thomas und Padmanabhan 2009). Es kann trotz konsequentem Tragen von Handschuhen zu Kontaktallergien kommen (Mikov *et al.* 2011).

Neben den Gefahren einer Kontaktallergie kann MMA viele andere lokale und systemische Einflüsse ausüben (Gosavi *et al.* 2010). Tierversuche belegen Reizungen und Schädigungen des respiratorischen Epithels (Mainwaring *et al.* 2001). Auch Fälle von allergischem Asthma und Rhinokonjunktivitis beim Menschen sind in der Literatur zu finden (Lindström *et al.* 2002). Es werden sogar lokale und generalisierte Neuropathien bei Zahntechnikern und Zahntechnikerinnen beschrieben (Sadoh *et al.* 1999; Seppäläinen und Rajaniemi 1984). Methylmethacrylat beeinflusst abhängig von seiner Konzentration die Funktion von myelinisierten Nerven (Böhling *et al.* 1977). Durch Tierversuche konnte belegt werden, dass eine Aspiration von MMA bei Hunden zu einer Hemmung der Motorik des Gastrointestinaltraktes führt (Tansy *et al.* 1977) und eine dauerhafte orale Gabe bei männlichen Ratten eine Atrophie der Samenblase verursacht (Fakhouri *et al.* 2008).

2.3 Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität dentaler Kunststoffe

2.3.1 Überblick

In-vitro-Zytotoxizitätstests sind in den meisten Fällen im Vergleich zu In-vivo-Untersuchungen standardisierter und besser reproduzierbar (Schmalz 1981). Klinische Beobachtungen lassen in einem gewissen Rahmen Rückschlüsse auf das Verhalten der Zellen *in vitro* zu (Schmitz 2011). Zellverhalten *in vitro* und Reaktion *in vivo* stimmen nicht immer überein (Schmalz 1982; Volta *et al.* 1977; Schmitz 2011). Schmalz (1982) verglich hierfür in einer Studie unterschiedliche dentale Werkstoffe. Er untersuchte die Auswirkung der Probematerialien *in vitro* mittels Agar-Diffusionstest und *in vivo* in einem Implantationstest bei Kaninchen. Korrelationen bestanden vor allem bei nicht und bei stark toxischen Materialien. Bei einigen toxikologischen Untersuchungen bieten Zellkulturen eine gute Alternative zu Tierversuchen (Langley *et al.* 2007; Schmitz 2011). Im Gegensatz dazu fanden Hulsart-Billström *et al.* (2016) in einer aktuellen multizentrischen Studie heraus, dass Ergebnisse von vergleichbaren In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen eine durchschnittliche Kovarianz von 58 % besaßen und damit eine geringe Übereinstimmung zeigten. Die Übertragbarkeit von zellbiologischen In-vitro-Tests auf klinische Gegebenheiten ist ebenfalls nicht ohne Weiteres möglich. Trotzdem lassen sich Interaktionen zwischen Zellen und zahnmedizinischen Werkstoffen mithilfe von Zytotoxizitätstests besser beobachten und einordnen (Jorge *et al.* 2003). Neben den Monolayer-Zellkulturen ist auch ein dreidimensionales Mundschleimhautmodell entwickelt worden, welches *in vitro* eine realistische klinische Situation möglichst gut simulieren soll (Schmalz *et al.* 1997; Moharamzadeh *et al.* 2009). In diesem Modell werden Fibroblasten auf einem Nylonnetz ausgesät. Nach vier Wochen bilden sie extrazelluläre Matrix und ein dreidimensionales Netzwerk.

Es gibt unterschiedliche Methoden zur Testung der Zytotoxizität *in vitro*. Eine grobe Einteilung kann in quantitative und qualitative Beurteilungen der Zellkultur erfolgen (Schmalz 1981). Bei der qualitativen Beurteilung werden vor allem Form und Aussehen der Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops begutachtet (Rosenbluth *et al.* 1965). Im Unterschied dazu werden bei der quantitativen Beurteilung beispielsweise das Verhältnis von vitalen zu deaktivierten Zellen oder die Menge spezifischer Stoffwechselprodukte der Zellkultur gemessen (Paul 1959).

Eine der ersten Methoden zur Testung der Zytotoxizität von Kunststoffen war der Einsatz des Farbindikators Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-Hydrochlorid) bei der sogenannten Agardiffusionsmethode. Neutralrot färbt vitale Zellen an, beschädigte Zellen hingegen nicht. Die Färbung kann mithilfe des Lichtmikroskops beurteilt werden (Guess *et al.* 1965). Hensten-Pettersen und Wictorin (1981) zählten auf dentalen Kunststoffen ausgesäte Zellen nach ein bis vier Tagen in einem Cellometer und trafen mit diesen Ergebnissen Aussagen zur Zytotoxizität.

Die Zellproliferation kann auch durch DNA-Synthese-Untersuchungen beurteilt werden. Bei Applikation von 3-H-Thymidin wird dieses in die DNA sich vermehrender Zellen eingebaut und kann dann radiografisch erfasst werden (Moharamzadeh *et al.* 2009). Diese Methode kam bereits zur Testung der Zytotoxizität bei dentalen Kunststoffen zur Anwendung (Jorge *et al.* 2007). Eine Weiterentwicklung des 3-H-Thymidin-Einbaus ist die Verwendung des nicht radioaktiven Farbstoffes Resazurin (Ahmed *et al.* 1994). Durch eine Redoxreaktion kommt es bei diesem Test zu einer Farbänderung, welche im Photometer gemessen werden kann. De Fries und Mitsunashi (1995) verglichen den 3-H-Thymidin-Test mit Resazurin. In dieser Studie wurden mononukleäre Zellen mit bestimmten Proteinen zur Zellteilung angeregt. Bei der Anwendung von 3-H-Thymidin konnte bereits bei einer signifikant geringeren Dosis dieser Proteine eine Zellproliferation nachgewiesen werden. Daher beurteilten sie den 3-H-Thymidin-Test als sensitiver im Vergleich zu Resazurin. Ein weiterer Nachteil von Resazurin ist, dass das photometrisch messbare Reaktionsprodukt Resorufin zu einem farblosen Nebenprodukt reagieren kann und damit die Messung verfälscht (O'Brien *et al.* 2000).

Eine Beurteilung der Zellzahl in Echtzeit kann mittels *Real-Time Cell Analyzern* erfolgen. Hierbei messen zwei Goldelektroden die elektrische Impedanz in einer speziellen Mikrotitrierplatte. Die Impedanz wird unter anderem durch die Anzahl der Zellen, das Zellverhalten und die Zelleigenschaften beeinflusst (Glamann und Hansen 2006). So kann anhand der Impedanz ein Zellstatus ermittelt werden (Marinova *et al.* 2014).

Aktuell wird die Messung der Viabilität der Zellen häufig mittels Funktionstest verschiedener Enzyme untersucht (Schmalz 2005). Bewährt haben sich hierbei Tetrazoliumsalze wie MTT oder dessen Weiterentwicklungen, dem XTT-Test, 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat (WST-1) und 2-(2-methoxy-4-

nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8), welche direkt oder indirekt durch mitochondriale Enzyme der Zellen verstoffwechselt werden (Berridge *et al.* 1996; Gstraunthaler und Lindl 2013; Schmitz 2011). Die Menge der dabei entstehenden Formazane ist proportional zur Anzahl lebender Zellen (Mosmann 1983). Bei der Durchführung des MTT-Tests müssen die Zellen nach der Inkubationszeit lysiert werden. Dieser Schritt entfällt bei den neueren Testmethoden (Berridge *et al.* 1996). Ebenso ist ein Lösen der Reaktionsprodukte in Alkohol überflüssig, da die neuen Generationen der Tetrazoliumsalze wasserlösliche Reaktionsprodukte bilden (Gstraunthaler und Lindl 2013; Roehm *et al.* 1991). Diese Formazane können photometrisch erfasst werden (Schmitz 2011). Diese Methoden sind bereits mehrfach zur Testung der Zytotoxizität von dentalen Werkstoffen und deren Bestandteilen eingesetzt worden (Winkler *et al.* 2014; Ata und Yavuzilmaz 2009; Kwon *et al.* 2015).

2.3.2 WST-8-Test

Das Mononatriumsalz 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) ist ein Tetrazoliumsalz, welches aufgrund seiner negativen Ladung, anders als MTT, nicht in die Zellen eindringt, sondern extrazellulär lokalisiert bleibt (Gstraunthaler und Lindl 2013). Es wird bei intrazellulärer Anwesenheit von NADH auf der Außenseite der Zelle zu dem orangefarbenen, wasserlöslichen WST-8-Formazan: NADH oder NADPH reduzieren das Aktivierungsreagenz 1-Methoxy-5-Methylphenaziniummethylsulfat (Methoxy-PMS), das der Messlösung beigemischt ist, über einen zwischengeschalteten transmembranen Elektronentransporter zu Phenaziniummethylsulfat (PMS). Das PMS induziert anschließend die Umwandlung von WST-8 zu WST-8-Formazan (siehe Abbildung (Abb.) 1). Diesen Farbumschlag kann man photometrisch bestimmen (Gstraunthaler und Lindl 2013). Das Messergebnis ist auch hier proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Ginouves *et al.* 2014). Da die Zellen durch WST-8 kaum beeinträchtigt werden, kann man mehrere Tests zu unterschiedlichen Zeiten an denselben Zellen durchführen (Schmitz 2011).

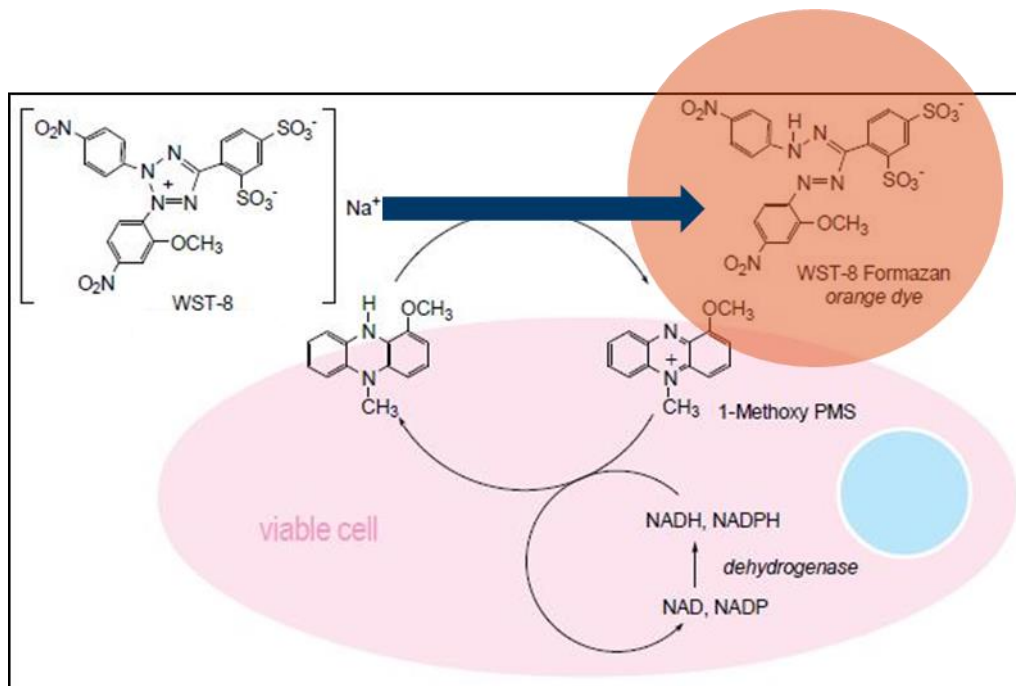


Abb. 1: Biochemischer Mechanismus der Reaktion WST-8 zu WST-8-Formazan. Modifiziert aus Produktbeschreibung (Quelle: Dojindo EU GmbH 2016b, mit freundlicher Genehmigung).

Im Vergleich zu anderen Testmethoden besitzt WST-8 eine sehr hohe Sensitivität (Ginouves *et al.* 2014; Tominaga *et al.* 1999; Gstraunthaler und Lindl 2013). In der Zahnmedizin ist der WST-8-Test zur Testung der Zytotoxizität von Adhäsivsystemen zum Einsatz gekommen (Kim *et al.* 2013). Kwon *et al.* (2015) nutzen den WST-8-Test in einer Studie zur Beurteilung der Verträglichkeit von verschiedenen Monomeren, die in dentalen Kunststoffen enthalten sind. Sie nutzen hierfür Zellen einer jugendlichen Zahnpulpa, deren Vitalität nach 24 Stunden Monomereinfluss deutlich eingeschränkt war. Neben seinem Einsatzbereich in der Zahnmedizin wird der WST-8-Test häufig zur Beurteilung verschiedener Substanzen im Bereich der onkologischen Forschung verwendet (Urtasun *et al.* 2015; He *et al.* 2015; Oishi *et al.* 2014; Ni *et al.* 2014; Fang *et al.* 2013).

2.4 Oberflächenrauheit dentaler Kunststoffe

Photo- und Heißpolymerisate besitzen nach entsprechender Politur eine ähnlich glatte Oberfläche bei einem Mittenrauwert (R_A) von $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m}$ der Photopolymerisate und $0,07 \pm 0,01 \mu\text{m}$ der Heißpolymerisate (Al-Kheraif 2014). Verschiedene Polymerisationsmethoden verursachen bei Autopolymerisaten keine Änderung der Oberflächenrauheit (Alves *et al.* 2007; Gonçalves *et al.* 2008). Die chemische Politur schneidet signifikant schlechter ab als die mechanische Politur (Al-Kheraif 2014; Alves *et al.* 2007; Gonçalves *et al.* 2008). Zum Ausarbeiten und Polieren des Kunststoffes wird der Gebrauch von Fräsen, Sandpapier, Bimsstein und Polierflüssigkeiten empfohlen (Serra *et al.* 2013). Bei PMMA-Kunststoffen kann die Rauheit durch eine Politur um mehr als das Zwanzigfache reduziert werden (Abuzar *et al.* 2010).

Bei einem In-vitro-Vergleich der Zytotoxizität von polierten und nicht polierten Autopolymerisaten waren signifikante Unterschiede der durch einen MTT-Test ermittelten Zellviabilität bei humanen Gingivafibroblasten zu erkennen. Die nicht polierten Prüfkörper waren in dieser Studie deutlich zytotoxischer. Die Zellen schütteten nach Kontakt zu unpolierten Kunststoffen vermehrt proinflammatorische Interleukine aus. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Politur von dentalen Kunststoffen Entzündungsreaktionen der Gingiva reduzieren kann (Trubiani *et al.* 2012).

Die Oberflächenrauheit von dentalen Kunststoffen spielt auch bei der Adhäsion von Mikroorganismen eine Rolle (Bollen *et al.* 1997). Yamauchi *et al.* (1990) konnten zeigen, dass verschiedene Mikroorganismen, z.B. *Streptococcus sanguis*, eine signifikant stärkere Adhärenz an rauen Kunststoffoberflächen haben. Im Gegensatz dazu zeigte *Candida albicans* eine vermehrte Adhärenz an glatte Oberflächen, was ein gegenteiliges Ergebnis zu einer Studie von Radford *et al.* (1998) darstellt.

3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Untersuchung waren die In-vitro-Beurteilung und der Vergleich der Zytotoxizitäten eines klassischen kieferorthopädischen Autopolymerisates (Weitur®, Weithas, Lützenburg, Deutschland) und eines modernen, lichthärtenden kieferorthopädischen Kunststoffes (Orthocryl® LC, Dentaaurum, Ispringen, Deutschland). Beide Kunststoffe werden vor allem als Basismaterialien von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen eingesetzt. Die potenziell zytotoxische Wirkung der Testmaterialien *in vitro* wurde an Mausfibroblasten (L929) und humanen Gingivafibroblasten (GF1) zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Zusätzlich wurde die Oberflächenrauheit der Testmaterialien und deren Einfluss auf die Zytotoxizität getestet.

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht zum Versuchsaufbau der Zytotoxizitätsmessung

Untersucht wurden das Autopolymerisat Weitur® (Johannes Weithas KG, Lütjenburg, Deutschland, LOT-Nummer Pulver 528118, LOT-Nummer Flüssigkeit 607308) und das Photopolymerisat Orthocryl® LC (Dentaurum, Ispringen, Deutschland, REF-Nummer 160-401-00, LOT-Nummer 4528944). Ein Teil der hergestellten Probekörper wurde künstlich gealtert und anschließend feucht gelagert. Die anderen Probekörper wurden trocken gelagert. Außerdem wurden Positiv- und Negativkontrollen, Silikonkontrollen, Zellkontrollen und Leerproben untersucht.

Diese Studie gliederte sich in zwei Versuchsreihen, einen Vorversuch und einen Hauptversuch. Insgesamt wurden sechs Versuchsdurchläufe mit insgesamt 216 Proben zur Messung der Zellviabilität durchgeführt, davon waren 120 Proben selbst hergestellte Probekörper. Die Zytotoxizitätstests wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (Abb. 2).

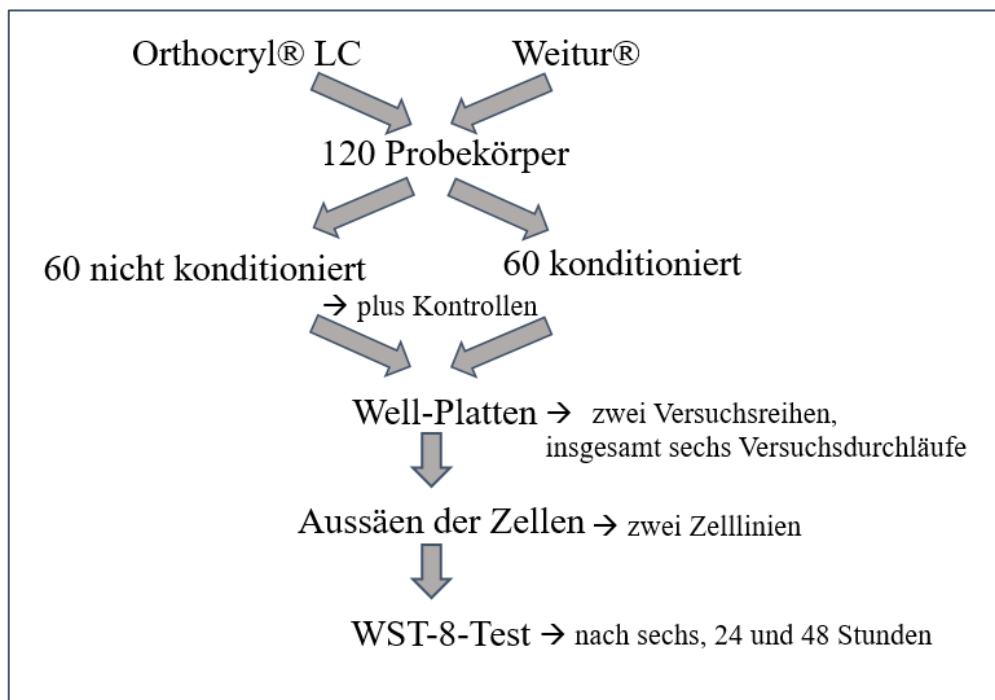


Abb. 2: Übersicht Versuchsaufbau Zytotoxizität.

4.2 Untersuchte Materialien

4.2.1 Orthocryl® LC

Orthocryl® LC ist ein moderner, kommerziell erhältlicher kieferorthopädischer Kunststoff. Es ist ein Photopolymerisat, das sehr viskös ist. Dieses Material ist frei von MMA und DBPO. Die Inhaltsstoffe (laut Hersteller) sind in Tabelle (Tab.) 1 aufgeführt.

Tab. 1: Inhaltsstoffe Orthocryl® LC laut Hersteller.

Bestandteil	Funktion
Urethandimethacrylat (UDMA)	Matrixmonomer und Vernetzer
Polyethylenglycoldimethacrylat (PEG-400-Dimethacrylat)	Matrixmonomer
Pyrogene Kieselsäure	Füllstoff
1,4-Butandiol-dimethacrylat	Monomer
Nicht genauer bezeichnet	Photoinitiatoren
Nicht genauer bezeichnet	Pigmente

4.2.2 Weitur®

Weitur® ist ein Autopolymerisat und gehört damit zu den geläufigsten kieferorthopädischen Kunststoffen. Tabelle 2 zeigt die Inhaltsstoffe laut Hersteller.

Tab. 2: Inhaltsstoffe Weitur® laut Hersteller.

Bestandteil	Funktion
Polymethylmethacrylat	Vorpolymerisiertes Polymer
Polyacrylmethacrylat	Vorpolymerisiertes Polymer
Methylmethacrylat	Monomer
Dienzoylperoxid	Initiator
Dimethyl-p-toluidin	Akzelerator
Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA)	Monomer und Vernetzer
Hydrochinon	Stabilisator
N,N-Diphenyl-p-phenylendiamin	Stabilisator

4.2.3 Positiv- und Negativkontrolle

Als Positivkontrolle wurde 2,5 mg Orthocryl® LC im nicht ausgehärteten Zustand verwendet (Abb. 3). Die exakte Menge wurde mit der Feinwaage „Sartorius Extend“ (Sartorius, Göttingen, Deutschland) abgewogen. Diese Positivkontrolle wurde in zwei Vorversuchen noch einmal auf ihre Zytotoxizität getestet und für geeignet befunden. Nach 120 Minuten waren lichtmikroskopisch keine adhärenen Zellen zu erkennen. Als Negativkontrolle wurden neben reinen Zellproben auch Probekörper aus Glas (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet.

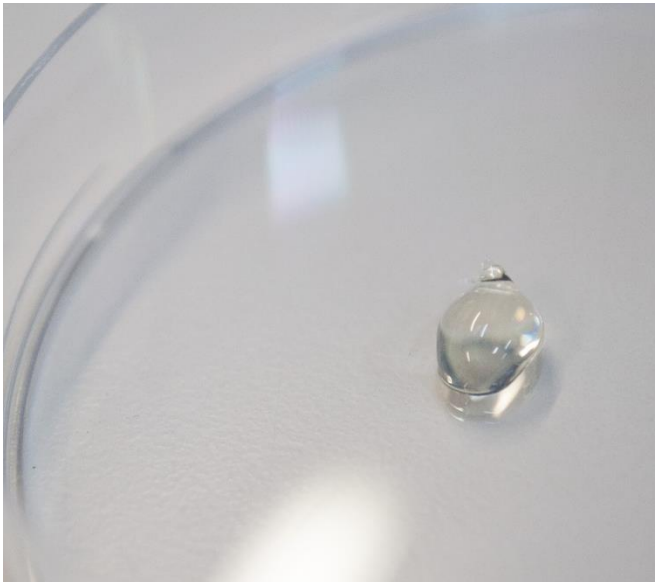


Abb. 3: Unpolymerisiertes Orthocryl® LC als Positivkontrolle.

4.3 Probekörper

Insgesamt wurden 120 Probekörper für die Versuchsdurchführung benötigt, 60 davon aus Orthocryl® LC und 60 aus Weitur®. Die zylindrischen Probekörper hatten einen Durchmesser von 10 mm bei 1 mm Höhe. Beide Kunststoffe wurden ausschließlich in ihrer klaren Variante ohne Farbpigmente verwendet.

4.3.1 Herstellung der Probekörper

Zur Herstellung der Probekörper wurden Negativformen aus Dubliersilikon (Adisil®, Siladent Dr. Böhme & Schöps GmbH; Goslar, Deutschland) verwendet (siehe Abb. 4). Die Probekörper wurden genau nach Herstellerangaben hergestellt und ausgearbeitet.

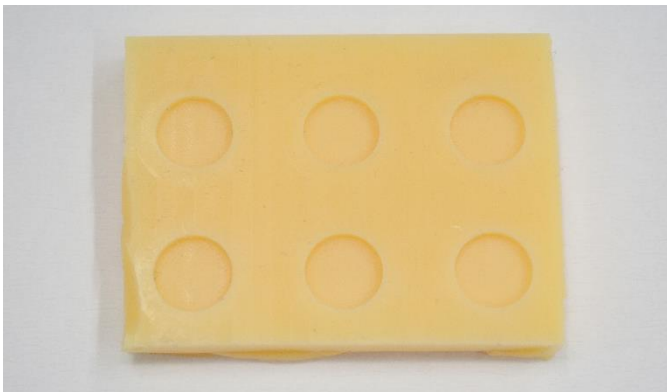


Abb. 4: Negativform aus Dubliersilikon.

Die Verarbeitung von Weitur® erfolgte mit dem sogenannten Sprühverfahren: Erst wurde eine Schicht PMMA-Pulver mit einer Sprühflasche aufgetragen und diese dann mit Monomer betropft. Bei der Herstellung der Probekörper aus Weitur® wurde beim Einbringen des Materials in die Silikonform genau darauf geachtet, dass das Verhältnis Monomer zu Polymer bei jedem Probekörper gleich ausfiel. Hierzu wurden die Negativformen zunächst komplett bis zum Rand mit Pulver aufgefüllt und anschließend mit exakt drei Tropfen Monomer benetzt (Abb. 5). Die Polymerisation fand in dem Drucktopf „Polymax 5“ (Dreve

Dentamid GmbH, Unna, Deutschland) bei einer Temperatur von 55 °C und einem Druck von 2,5 bar für exakt 20 Minuten statt.

Orthocryl® LC wurde mithilfe des passenden Injektors (Dentaurum GmbH & Co. KG, Ispringen, Deutschland) in die Formen gefüllt (Abb. 6). Hatten sich Lufteinschlüsse gebildet, wurden diese mit einer Sonde (Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland) aufgestochen und mit Orthocryl® LC aufgefüllt. Überschüsse wurden mit einem „Le Cron“-Modellierinstrument (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) entfernt. Anschließend wurden die Probekörper im Lichtpolymerisationsgerät „HiLite® power“ (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) bei 540 nm Wellenlänge und einer Lichtleistung von 300 Watt für exakt sechs Minuten polymerisiert. Nach dieser Polymerisation wurden die Probekörper aus der Form genommen und noch einmal für drei Minuten belichtet. Hierbei zeigte die Unterseite des ersten Polymerisationsvorgangs nach oben.

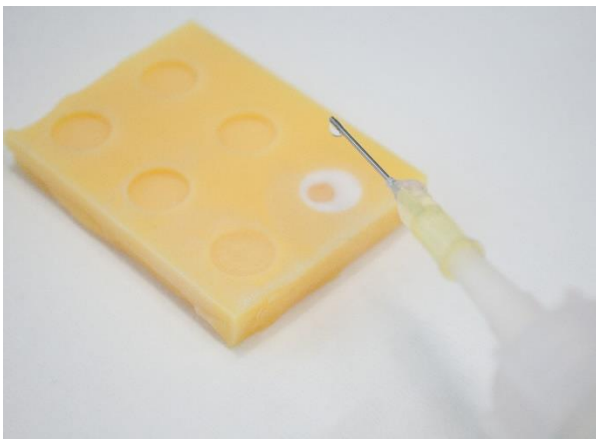


Abb. 5: Streuvorgang Weitur®.



Abb. 6: Verarbeitung Orthocryl® LC.

Nach dem Aushärten wurden die Probekörper mit 70 %igem Ethanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) behandelt, um so die Sauerstoffinhibitionsschicht zu entfernen. Hierzu wurde ein steriler Tupfer mit Ethanol getränkt und jeder Probekörper für genau 60 Sekunden abgerieben. Anschließend wurden die Probekörper, wie von den Herstellern empfohlen, ausgearbeitet: Zuerst erfolgte das Entfernen von Überschüssen mittels handelsüblicher Fräsen bei maximal 40000 Umdrehungen pro Minute (Fräse: Kreuzverzahnung fein, Henry Schein Europa & International, Langen, Deutschland; Handstück/Motor: K11, KaVo Dental GmbH, Biberach/Riß, Deutschland).

Im nächsten Schritt wurden die Probekörper mit verschiedenen Schleifpapieren (Orbis Dental Handelsgesellschaft mbH, Münster, Deutschland) mit Handstück bei maximal 5000 Umdrehungen pro Minute weiter geglättet. Es wurde dabei die Abstufung von grob nach fein eingehalten (Körnung: P120 → P240 → P400). Danach folgte das Polieren mit der Poliermaschine „KaVo EWL“ (KaVo Dental GmbH, Biberach/Riß, Deutschland). Die Probekörper wurden dabei mit einer Polierbürste („Suprema spitz“, Durchmesser 55 mm, Polirapid Dr. Montemerlo GmbH & Co KG, Singen, Deutschland), einem Filzkegel (40 × 20 mm, Polirapid Dr. Montemerlo GmbH & Co KG, Singen, Deutschland) und Bimssteinpulver (mittlere Körnung, Siladent Dr. Böhme & Schös GmbH, Goslar, Deutschland) bei 1420 Umdrehungen pro Minute weiter geglättet. Zum Schluss des Poliervorgangs erfolgte die Hochglanzpolitur mit Wildlederschwabbeln (Durchmesser 90 × 8 mm, Polirapid Dr. Montemerlo GmbH & Co KG, Singen, Deutschland) bei 2800 Umdrehungen pro Minute. Es wurden eine Glatfläche und die Seiten hochglanzpoliert.

4.3.2 Konditionierung der Probekörper

Sechzig Probekörper, je 30 pro Material, wurden in einem Thermocycler (Willytec–SD Mechatronic, Feldkirchen-Westerham, Deutschland und Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland) künstlich gealtert. Die anderen 60 Probekörper wurden trocken gelagert (siehe Abb. 7).

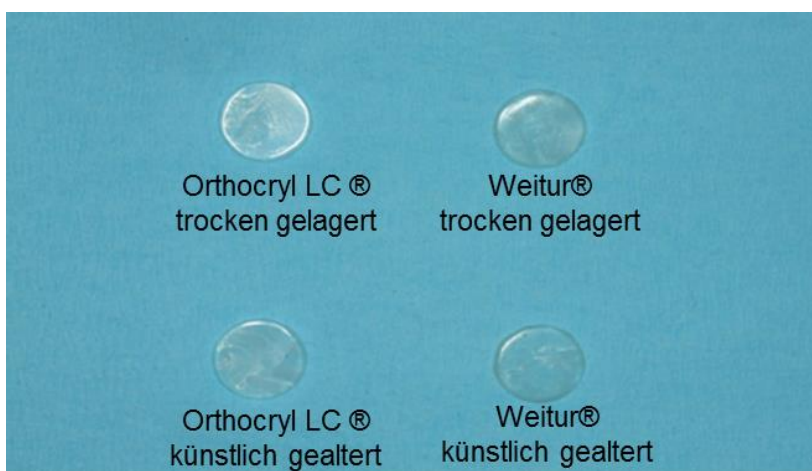


Abb. 7: Probekörper der getesteten Materialien.

Der verwendete Thermocycler (Abb. 8) bestand aus einem Metallkorb, in welchen die Probenkörper eingebracht wurden. Dieser Korb fuhr automatisch zwischen zwei Wasserbädern unterschiedlicher Temperaturen hin und her. So konnten die Materialien Temperaturschwankungen ausgesetzt werden, ähnlich, wie sie beim täglichen Gebrauch zu erwarten sind. Es wurden 1000 Zyklen mit einer Eintauchzeit von je 60 Sekunden durchgeführt. Die Temperaturen der Wasserbäder betragen 5 °C und 55 °C. Nach der Konditionierung im Thermocycler wurden diese Proben in destilliertem Wasser (*aqua dest.*) gelagert.

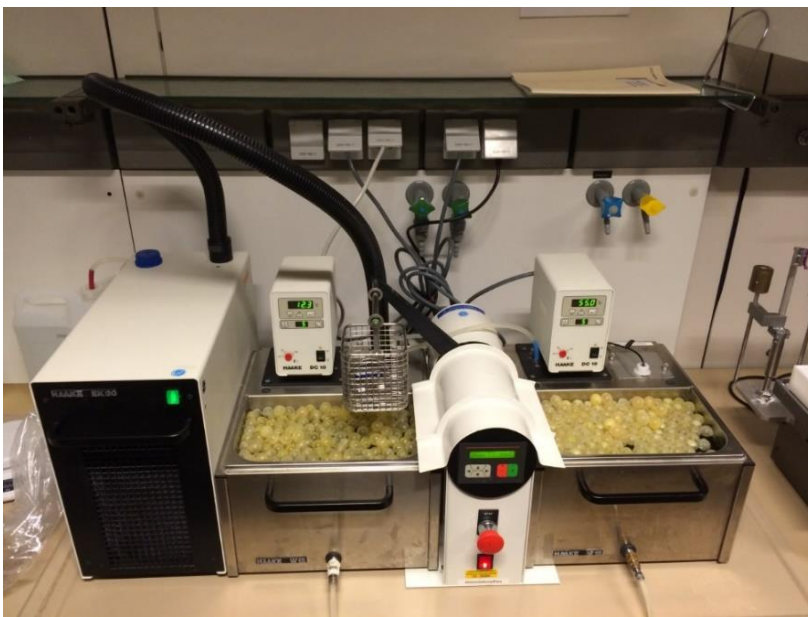


Abb. 8: Thermocycler.

4.3.3 Vorbereiten der Well-Platten

Zunächst wurden die Probekörper mit 70% igem Ethanol in einem Becherglas mit Rührfisch auf einem Magnetrührer (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurde dieser Arbeitsschritt mit *aqua dest.* wiederholt. Die Probekörper wurden danach unter der Sterilbank („HERAsafe Ks12“, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf einem sterilen Tupfer luftgetrocknet.

Das Einkleben in die Well-Platten erfolgte ebenfalls unter der Sterilbank mit dem additionsvernetzten Silikon Z-Dupe® (Henry Schein Dental Germany GmbH, Langen, Deutschland). Dieses Silikon wurde mit sterilen Impfösen (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland) in einer Petrischale (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) angemischt. Die Probekörper wurden auf der nicht polierten Unterseite mit Silikon beschichtet und unter Zuhilfenahme einer sterilen Pinzette (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) in eine 48-Well-Platte eingeklebt (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark). Die glatt polierte Fläche zeigte dabei nach oben. Es wurde so viel Silikon aufgetragen, dass die Unterseiten der Probekörper gleichmäßig beschichtet waren. Überschüssiges Silikon wurde mit einem sterilen Wattestäbchen (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) entfernt.

Die Aufteilung der Proben in den Well-Platten wurde wie folgt umgesetzt (Abb. 9 und 10):

Vorversuch: Pro Zelllinie wurden zwei Versuchsdurchläufe mit jeweils drei Messungen durchgeführt, das heißt insgesamt zwölf Messungen.

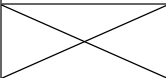
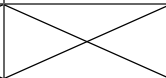
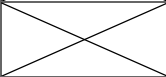
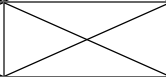


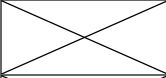

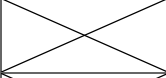
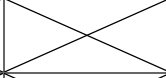
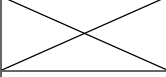
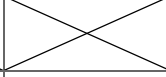
F	E	D	C	B	A	
Z	Z	Z	Z + S	Z + S	Z + S	1
O + Z	W + Z	OA + Z	WA + Z			2
O + Z	W + Z	OA + Z	WA + Z			3
O + Z	W + Z	OA + Z	WA + Z			4
O + Z	W + Z	OA + Z	WA + Z			5
O	W	OA	WA			6
O	W	POA	WA			7
leer	leer	leer	S	S	S	8

Abb. 9: Übersicht Well-Platte: Probenaufteilung der Vorversuche.

O: Orthocryl® LC und Silikon, W: Weitur® und Silikon, OA: Orthocryl® LC gealtert und Silikon, WA: Weitur® gealtert und Silikon, Z: Zellen, S: Silikon.

Hauptversuch: Pro Zelllinie wurde ein Versuchsdurchlauf mit jeweils drei Messungen durchgeführt, das heißt insgesamt sechs Messungen.

F	E	D	C	B	A	
PK: W + Z	PK: W + Z	PK: W + Z	PK: WA + Z	PK: WA + Z	PK: WA + Z	1
PK: O + Z	PK: O + Z	PK: O + Z	PK: OA + Z	PK: OA + Z	PK: OA + Z	2
X	X	X	X	X	X	3
X	X	X	X	X	X	4
G + Z	G + Z	G + Z	G + Z	G + Z	G + Z	5
Z	Z	Z	Z + S	Z + S	Z + S	6
UO+S+Z	UO+S+Z	UO+S+Z	UO+S+Z	UO+S+Z	UO+S+Z	7
leer	leer	leer	S	S	S	8

Abb. 10: Übersicht Well-Platte: Probenaufteilung im Hauptversuch.

O: Orthocryl® LC und Silikon, W: Weitur® und Silikon, OA: Orthocryl® LC gealtert und Silikon, WA: Weitur® gealtert und Silikon, Z: Zellen, S: Silikon, G: Glas und Silikon, UO: unpolymerisiertes Orthocryl® LC und Silikon.

4.4 Zellkulturen

4.4.1 Mausfibroblasten (L929)

Die L929-Zellen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Es kamen ausschließlich Zellen der Passagen drei bis neun zum Einsatz. Abbildung 11 zeigt L929 aus der vorliegenden Studie.

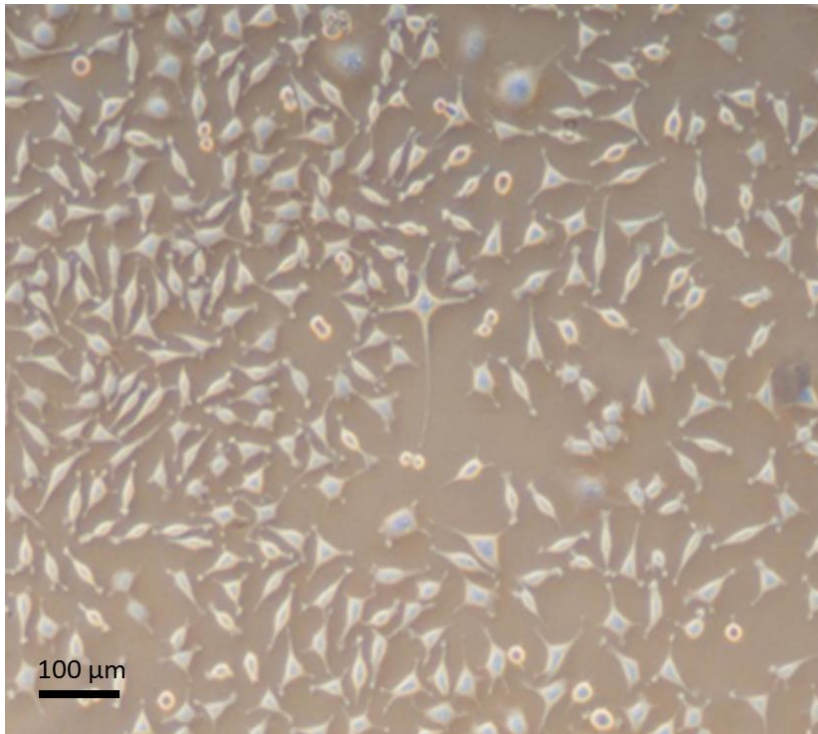


Abb. 11: L929 - Mausfibroblasten.

4.4.2 Gingivafibroblasten (GF1)

Die AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Abteilung für Zahnärztliche Prothetik der Universitätsmedizin Göttingen stellte die Zelllinie GF1 für die vorliegende Arbeit zur Verfügung. Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen drei bis neun für die Studie verwendet. Die Zellen stammten von gesundem Gewebe, das in der Universitätsmedizin Göttingen entnommen worden war. Hierfür lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (Antragsnummer 16/6/09). Abbildung 12 zeigt GF1 aus der vorliegenden Studie.

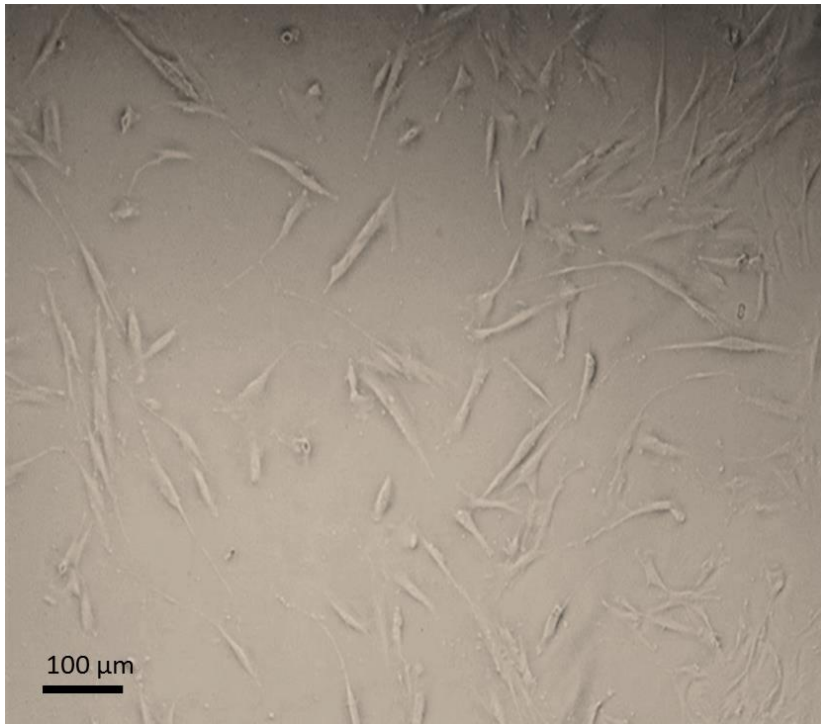


Abb. 12: GF1 - humane Gingivafibroblasten.

4.4.3 Vorbereiten der Zellkulturen

Sowohl L929 als auch GF1 waren in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C Wasserbad gegeben. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) mit 10 ml vorgewärmtem Medium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* + GlutaMaxTM(DMEM

+ GlutaMaxTM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und 50 µg pro ml⁻¹ Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)) überführt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem „Labotect C200 Inkubator®“ (Labotect, Göttingen, Deutschland). Vierundzwanzig Stunden später wurde das Medium, das nun Zelltrümmer und tote Zellen enthielt, durch 10 ml neues Medium ersetzt und die Inkubation fortgesetzt.

Die Zellen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop („Axiovert 40 CFL“, Zeiss, Göttingen, Deutschland) inspiziert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Hatten die Zellen am Boden der Kulturflasche eine Konfluenz von 70 bis 80 %, was in der Regel alle drei bis fünf Tage der Fall war, erfolgte das Passagieren (Subkultivieren). Zum Passagieren der Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Desinfektion der Sterilbank mit 70 %igem Ethanol wurde das alte Medium abgeschüttet. Nun wurden die Zellen zweimal mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) auf die Zellen aufgebracht und so die Zellen vom Boden der Kulturflasche und voneinander gelöst. Nach leichtem Schwenken folgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für exakt fünf Minuten. Unter dem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst hatten. Die Verdauungsreaktion des Trypsins wurde mit 5 ml Medium beendet und die Zellsuspension in Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt. Es folgte ein Zentrifugieren für zehn Minuten bei 12000 rpm („Centrifuge 5810®“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert.

Das anschließende Zählen der Zellen erfolgte im Cellometer „Nexcelom CellometerTMAuto T4 peqlab®“ (VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland): Zunächst wurde die Schutzfolie von dem zugehörigen Objektträger entfernt und 20 µl Zellsuspension mit einer Pipette aufgetragen. Der Objektträger wurde in die Öffnung des Cellometers gelegt und die Zählung der Zellen begonnen. Das Ergebnis beschrieb die Anzahl der Zellen in einem ml Lösung. Es wurden 50000 Zellen in eine neue Kulturflasche mit 10 ml Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte weiter bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

4.5 Messung der Zytotoxizität mittels WST-8-Test

Für den WST-8-Test wurden Zellen der Passagen drei bis neun verwendet. Das Vorbereiten der Zellen für die Messung der Zytotoxizität wurde zunächst analog der Schritte des Passagierens durchgeführt. Nach Waschen, Trypsinieren, Zentrifugieren und Zählen der Zellen erfolgte die Berechnung der benötigten Menge Zellsuspension. In den 48er-Well-Platten entspricht die Fläche des Bodens je Well 1 cm^2 . Das Arbeitsvolumen pro Well wurde auf 0,5 ml festgelegt, demnach wurden pro Well 10000 Zellen in 0,5 ml Medium ausgesät.

Nach dem Aussäen der Zellen erfolgte die Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit für genau vier Stunden. Nach diesem Zeitraum wurde im Lichtmikroskop kontrolliert, ob die Zellen auf den Probekörpern und am Well-Boden adhärent waren.

Nun wurde das Medium abgesaugt und anschließend die Messlösung, bestehend aus WST-8 des „*Cell Counting Kit-8*“ (CCK8, Dojindo EU GmbH, München, Deutschland) und Medium im Verhältnis 1:10, in die Wells eingebracht. Die Well-Platten wurden nun weitere zwei Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurde die Messlösung in eine neue Well-Platte übertragen (Abb. 13). Die ursprüngliche Well-Platte mit den Probekörpern wurde sofort wieder mit 0,5 ml PBS pro Well befüllt, damit die Zellen nicht austrockneten. Zum Auswaschen der verbliebenen Messlösung wurde das PBS abgesaugt und das Waschen mit PBS einmal wiederholt. Nach Absaugen des PBS des zweiten Waschens wurde 0,5 ml Medium pro Well-Vertiefung eingebracht. Diese Well-Platte wurde weiter bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

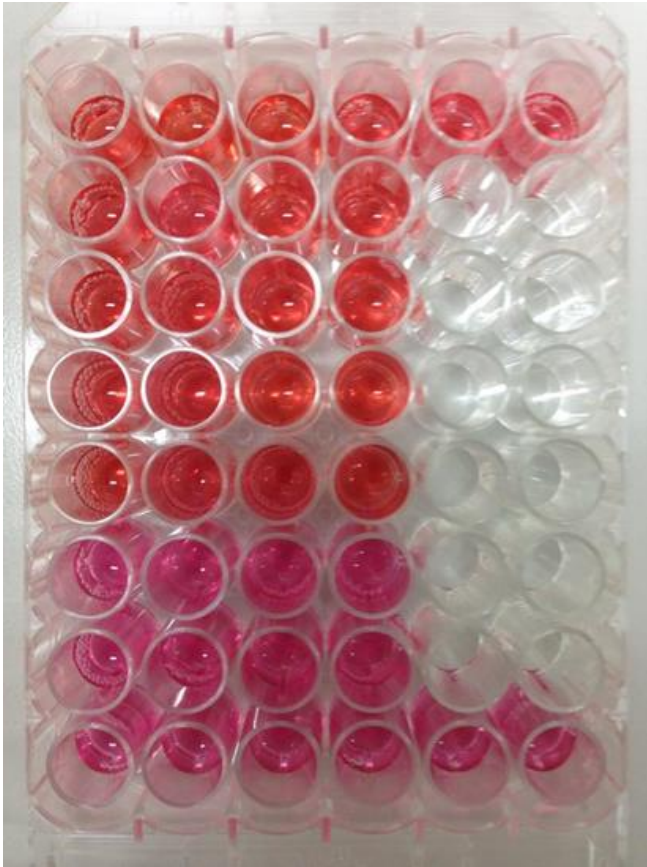


Abb. 13: Testlösung nach Farbumschlag und Übertragung in eine neue Well-Platte.
Hier Vorversuch nach 24 Stunden und Zelllinie GF1.

Die Well-Platte mit der Messlösung wurde genau inspiziert und Luftblasen auf der Messlösung mit einer sterilen Sonde (Henry Schein Dental Deutschland GmbH, Langen, Deutschland) entfernt, damit diese das Ergebnis der Messung im Spektralphotometer nicht verfälschten. Die Messung im Spektralphotometer „SpectraMax M2®“ (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA) erfolgte bei der Wellenlänge 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Das Ergebnis der Referenzwellenlänge wurde von dem Ergebnis der Messung bei 650 nm subtrahiert. Es wurde die Extinktion gemessen.

Der WST-8-Test wurde nach 24 und 48 Stunden mit denselben Zellen wiederholt. Hierbei wurde analog zu dem in diesem Kapitel beschriebenen Versuchsablauf verfahren.

4.6 Messung der Rauheit

Die Messung der Rauheit erfolgte mit dem Perthometer „MarSurf XR20 mit Topografie XT 20“ (Mahr GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Rauheit wurde mit einem Taststift aus Diamant gemessen, welcher an seiner Spitze einen Radius von 2 μm besaß. Bei der Messung bewegte sich der Stift mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/s über eine Strecke von 5,6 mm. Diese Strecke wurde in sieben Einzelmessstrecken unterteilt, wobei die erste und die letzte nicht in das Ergebnis integriert wurden. Das Gerät ermittelte den arithmetischen Mittelwert der Beträge der Messungen, welcher Mittenrauwert (R_A) genannt wird. Es wurden je Material drei Prüfkörper mit je drei Messungen getestet. Die Oberflächen von vier Probekörpern, je einer pro Material, wurden anschließend in 13 Einzelmessstrecken mit jeweils über 11000 Messpunkten erneut vermessen. Die Ergebnisse dieser Oberflächenvermessung wurden zu topografischen Darstellungen der Probekörperoberflächen zusammengefasst. Durch einen Mittelfilter erfolgte digital eine horizontale Ausrichtung der Oberflächen. Anschließend wurden die Zylinderformen der topografischen Oberflächendarstellungen mittels Polynomfilter herausgefiltert, um die Oberflächenbeschaffenheiten genauer beurteilen zu können.

4.7 Statistische Auswertung

Die Verteilung des Parameters Messergebnis (Extinktion Messlösung) des WST-8-Tests wurde separat für jeden Materialtyp, Messzeitpunkt, Zelltyp und Proben mit und ohne Silikon durch Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Da es sich um normalverteilte Werte handelte, wurden die Effekte von Probekörper, Messzeitpunkt, Zelltyp und Silikon mittels Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Der paarweise Vergleich der Proben innerhalb der Gruppen Probekörper und Zelltypen wurde mit einem Tukey Post-hoc-Test vorgenommen.

Bei den Ergebnissen der Rauheitsuntersuchung wurden ebenfalls die Mittelwerte und Standardabweichungen von R_A ermittelt. Es wurde außerdem eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt.

Um Zusammenhänge zwischen Zytotoxizität und Rauheit zu beurteilen, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (Pearsons.r) für Rauheit und Messergebnis errechnet. Die dazugehörigen p-Werte wurden nach Bonferroni-Holm adjustiert (p.Holm) und auf diese Weise das Signifikanzniveau angepasst.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen statistischen Tests auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Alle Analysen wurden mit der statistischen Software R (Version 3.1.2, www.r-project.org) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Zytotoxizität

5.1.1 Vorversuch

5.1.1.1 Übersicht: Einfluss Probekörper, Zelltypen, Zeit und Silikon

Tabelle 3 zeigt die ANOVA-Ergebnisse des Vorversuchs. Die Probekörper und demzufolge die vier verschiedenen Materialien hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität ($p = 0,1062$). Somit unterschieden sich die getesteten Materialien nicht signifikant in ihrer Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu war die Zellviabilität der verschiedenen Zelltypen signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Auch der Messzeitpunkt hatte einen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis ($p < 0,001$). Das Silikon hingegen wirkte sich nicht signifikant auf die Zellviabilität aus ($p = 0,0633$). Des Weiteren wurden signifikante Interaktionen zwischen Zelltyp/Messzeitpunkt und Probekörper/Zelltyp und Messzeitpunkt festgestellt (jeweils $p < 0,05$).

Tab. 3: ANOVA-Ergebnisse zum Einfluss der verschiedenen Parameter im Vorversuch.

Parameter	p
Probekörper	0,1062
Zelltyp	< 0,001
Messung nach Stunden	< 0,001
Silikon	0,0633
Probekörper: Messung nach Stunden	0,6296
Zelltyp: Messung nach Stunden	< 0,001
Zelltyp: Silikon	0,0975
Messung nach Stunden: Silikon	0,5141
Probekörper: Zelltyp: Messung nach Stunden	0,0133
Zelltyp: Messung nach Stunden: Silikon	0,5555

5.1.1.2 Zytotoxizität der unterschiedlichen Materialien

Die niedrigsten Werte wurden bei den zellfreien Proben von Weitur® und Weitur® gealtert nach sechs Stunden mit jeweils $0,27 \pm 0,2$ gemessen. Die höchste Zellviabilität und somit geringste Zytotoxizität hatte Orthocryl® LC nicht gealtert bei GF1 nach 48 Stunden ($0,66 \pm 0,13$), was allerdings ohne statistische Signifikanz war (siehe Tab. 3, Probekörper $p = 0,1062$). Insgesamt nahm die Zellviabilität bei allen vier Materialien im Laufe der Zeit zu, die Zytotoxizität nahm demnach mit der Zeit bei jedem Material ab.

Die einzelnen Materialien unterschieden sich ohne Zellen nur sehr gering in ihrer Extinktion, beeinflussten das Messergebnis also *per se* in vergleichbarem Maß. In Abb. 14 sind die Zellviabilitäten der verschiedenen Zelllinien bei den unterschiedlichen Materialien zu allen drei Messzeitpunkten grafisch dargestellt.

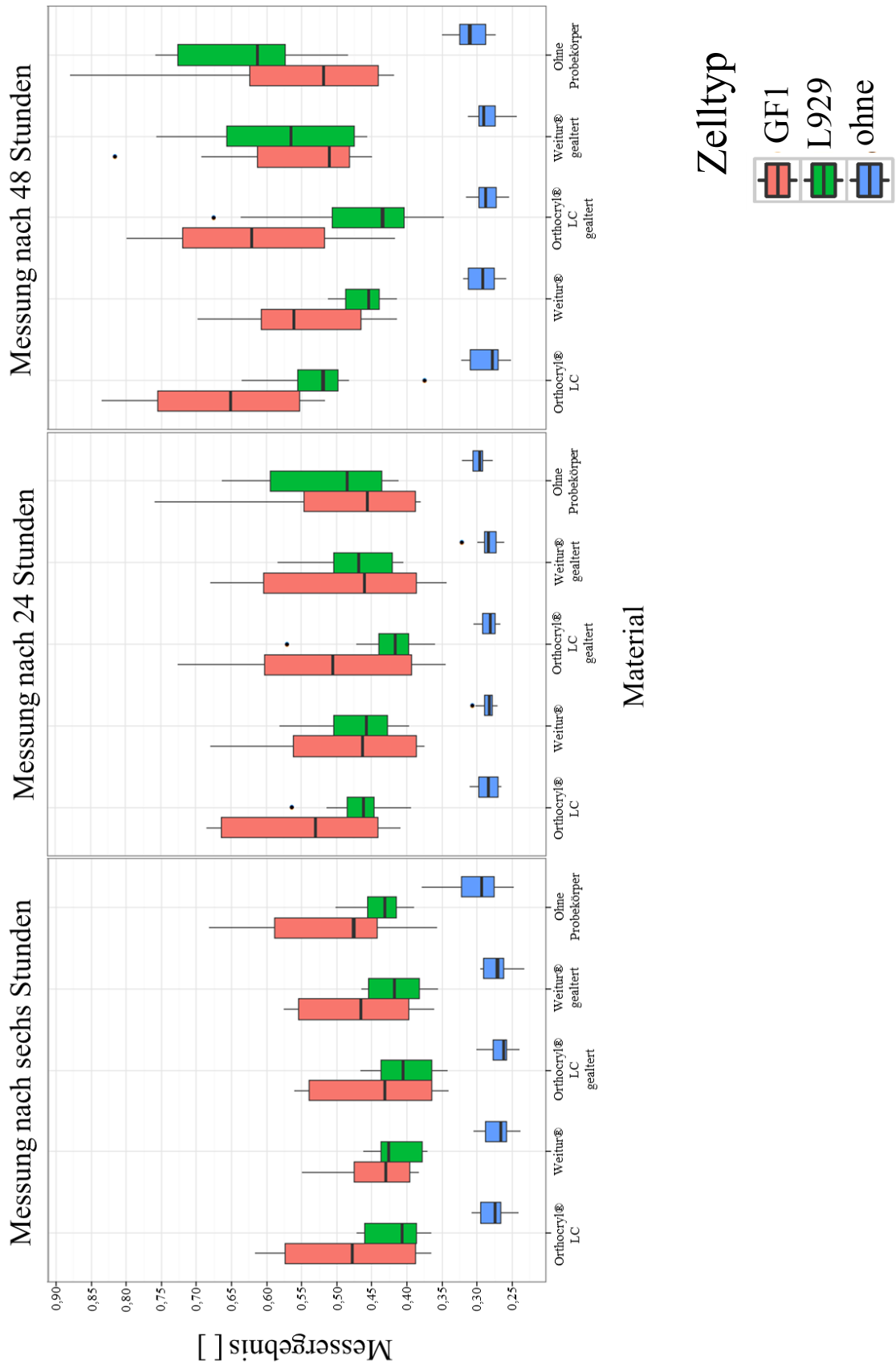


Abb. 14: Boxplots zum Einfluss der Materialien im Vorversuch. (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

5.1.1.3 Vergleich der Materialien

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum Vergleich der einzelnen Materialien. Als alleiniger Parameter beeinflussten die unterschiedlichen Materialien die Zellviabilität nicht signifikant (siehe Tab. 3, Probekörper: $p = 0,1062$). Auch der paarweise Vergleich erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$ für alle Vergleiche). Die Materialien unterschieden sich demnach nicht signifikant in ihrer Zytotoxizität. Es wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Zellviabilität bei den einzelnen Materialien im Vergleich zu den reinen Zellproben festgestellt ($p > 0,05$ für alle Vergleiche). Die untersuchten Materialien zeigten folglich keine signifikant zytotoxischere Wirkung als die Proben ohne Probekörper. Im Gegensatz dazu war ein signifikanter Unterschied der Leerproben (ohne Probekörper und ohne Zellen) zu allen im Vorversuch getesteten Materialien und zu der reinen Zellprobe festzustellen (jeweils $p < 0,001$).

Tab. 4: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der Materialien im Vorversuch.

	Orthocryl® LC	Orthocryl® LC gealtert	Weitur®	Weitur® gealtert	Zellen	leer
Orthocryl® LC	X	0,5125	0,2709	0,9772	0,997	< 0,001
Orthocryl® LC gealtert		X	0,9986	0,9197	0,1695	< 0,001
Weitur®			X	0,7269	0,0574	< 0,001
Weitur® gealtert				X	0,7946	< 0,001
Zellen					X	< 0,001
leer						X

5.1.1.4 Zellviabilität der verschiedenen Zelllinien

Entsprechend der ANOVA-Analyse hatten die verschiedenen Zelltypen L929, GF1 und ohne Zellen eine signifikant unterschiedliche Zellviabilität (siehe Tab. 3, Zelltyp: $p < 0,001$). Die Extinktionen lagen im Bereich $0,28 \pm 0,03$ bis $0,3 \pm 0,03$ ohne Zellen, $0,42 \pm 0,04$ bis $0,54 \pm 0,11$ bei L929 und $0,47 \pm 0,1$ bis $0,59 \pm 0,13$ bei GF1 (siehe Abb. 15). Insgesamt lag ein signifikanter Unterschied der Zellviabilität zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten vor (siehe Tab. 3, Messung nach Stunden: $p < 0,001$).

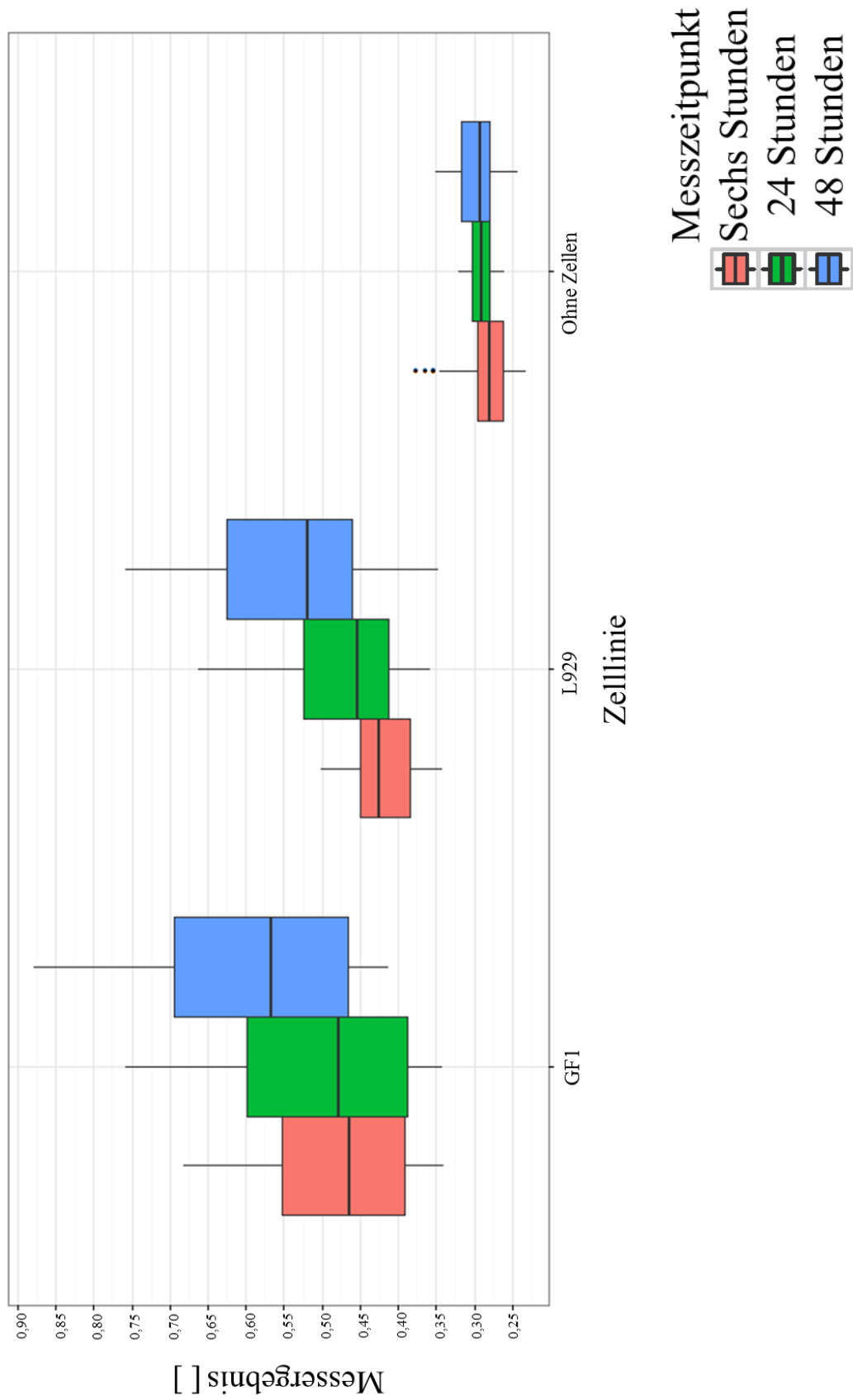


Abb. 15: Boxplots zur Zellviabilität der Zelllinien im Vorversuch. (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

5.1.1.5 Vergleich der Zelllinien

Die Ergebnisse zum Vergleich der Zellviabilität der Zelllinien wurden separat für alle drei Messzeitpunkte ermittelt (Tab. 5, 6 und 7). Nach sechs Stunden gab es signifikante Unterschiede der Zellviabilitäten von GF1 und L929: Die Zellviabilität bei GF1 war signifikant höher als bei L929 ($p < 0,001$). GF1 und L929 hatten außerdem signifikant höhere Messwerte als die zellfreien Proben (jeweils $p < 0,001$).

Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden waren im Gegensatz zu der Messung nach sechs Stunden keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität von L929 und GF1 festzustellen (jeweils $p > 0,05$). Im Vergleich zu den zellfreien Proben fielen weiterhin signifikant geringere Messwerte auf ($p < 0,001$ für alle Vergleiche).

Tab. 5: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach sechs Stunden (Vorversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	< 0,001	< 0,001
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

Tab. 6: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 24 Stunden (Vorversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	0,1871	< 0,001
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

Tab. 7: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 48 Stunden (Vorversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	0,0889	< 0,001
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

5.1.2 Hauptversuch

5.1.2.1 Übersicht: Einfluss Probekörper, Zelltypen, Zeit und Silikon

Laut den ANOVA-Ergebnissen des Hauptversuchs (Tab. 8) hatten die Testmaterialien im Gegensatz zum Vorversuch einen signifikanten Einfluss auf die Zytotoxizität ($p < 0,001$). Wie im Vorversuch war die Zellviabilität der verschiedenen Zelllinien signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Der Messzeitpunkt wirkte sich nicht signifikant auf die Zellviabilität aus ($p = 0,2594$). Des Weiteren wurden signifikante Interaktionen zwischen Zelltyp/Messzeitpunkt und Probekörper/Zelltyp festgestellt (jeweils $p < 0,001$). Als alleiniger Parameter hatte das Silikon, genau wie im Vorversuch, keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis und wirkte demnach nicht zytotoxisch ($p = 0,3299$).

Tab. 8: ANOVA-Ergebnisse zum Einfluss der verschiedenen Parameter im Hauptversuch.

Parameter	p
Probekörper	< 0,001
Zelltyp	< 0,001
Messung nach Stunden	0,2594
Silikon	0,3299
Probekörper: Zelltyp	< 0,001
Probekörper: Messung nach Stunden	0,8793
Zelltyp: Messung nach Stunden	< 0,001
Zelltyp: Silikon	0,3647
Messung nach Stunden: Silikon	0,6777
Probekörper: Zelltyp: Messung nach Stunden	0,3184
Zelltyp: Messung nach Stunden: Silikon	0,9644

Zusätzlich wurde eine ANOVA-Analyse zum Einfluss der Probekörper, des Zelltyps und der Interaktion Probekörper-Zelltyp separat für jeden Messzeitpunkt durchgeführt (Tab. 9). Die Probekörper hatten zu jedem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität (jeweils $p < 0,001$). Die Zelllinien unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Zellviabilität zu den drei Messzeitpunkten (jeweils $p < 0,001$). Es wurde zusätzlich eine signifikante Interaktion Probekörper-Zelltyp zu allen Messzeitpunkten festgestellt (jeweils $p < 0,05$).

Tab. 9: ANOVA-Ergebnisse bezüglich der Parameter Probekörper und Zelltyp separat für jeden Messzeitpunkt im Hauptversuch.

Messzeitpunkt	Parameter	p
6	Probekörper	< 0,001
	Zelltyp	< 0,001
	Probekörper: Zelltyp	< 0,001
24	Probekörper	< 0,001
	Zelltyp	< 0,001
	Probekörper: Zelltyp	< 0,001
48	Probekörper	< 0,001
	Zelltyp	< 0,001
	Probekörper: Zelltyp	0,0016

5.1.2.2 Zytotoxizität der unterschiedlichen Materialien

Die höchste Zellviabilität (geringste Zytotoxizität) wies GF1 bei der Negativkontrolle Glas nach sechs Stunden auf (Extinktion von $0,76 \pm 0,14$). Die niedrigste Zellviabilität wurde bei der Positivkontrolle aus unpolymerisiertem Orthocryl® LC bei GF1 nach 24 Stunden gemessen ($0,16 \pm 0,03$) (siehe Abb. 16). Entsprechend der ANOVA-Analyse konnten zu jedem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede der Zellviabilität und somit auch der Zytotoxizität in Bezug auf das Testmaterial ermittelt werden (Tab. 9, $p < 0,001$ für alle Vergleiche).

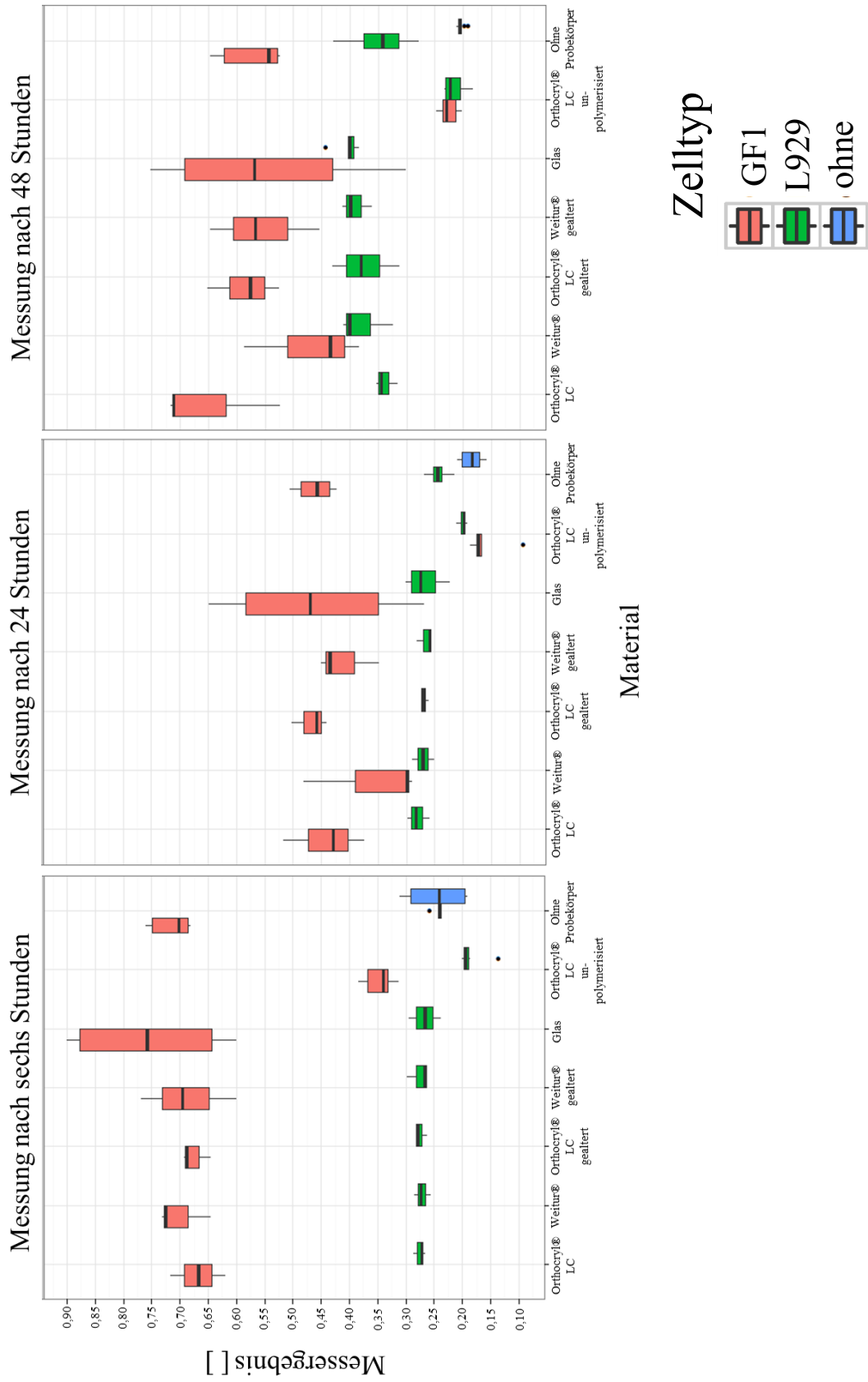


Abb. 16: Boxplots zum Einfluss der Materialien im Hauptversuch. (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

Die Abbildungen 17–28 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen der Probekörper der vier getesteten Materialien, der Positivkontrolle (nicht polymerisiertes Orthocryl® LC) und der Negativkontrolle (Glas). Abgebildet sind Aufnahmen nach sechs und 24 Stunden. Sowohl bei L929 als auch bei GF1 waren Zellen im direkten Umfeld der Probekörper adhären. Es zeigte sich subjektiv eine Vermehrung der Zellen im Laufe der Zeit.

Unter dem Mikroskop waren lediglich Zellen neben den Probekörpern zu erkennen. Es war nicht möglich zu beurteilen, ob sich die Zellen auch auf den Probekörpern niedergelassen hatten.

Bei der Positivkontrolle waren bereits nach sechs Stunden bei beiden Zelllinien keine Zellen mehr zu erkennen. Bei der Negativkontrolle wurde bei der visuellen Betrachtung, ähnlich wie bei den getesteten Materialien, ebenfalls eine direkte Nachbarschaft der Zellen zu den Probekörpern festgestellt. Auffällig war das direkte Anlagern der Zellen an das zum Festkleben verwendete Silikon, was in Abb. 19, 24 und 27 erkennbar ist. Dieser direkte Kontakt der Zellen zum Silikon war sowohl bei GF1 als auch bei L929 festzustellen.

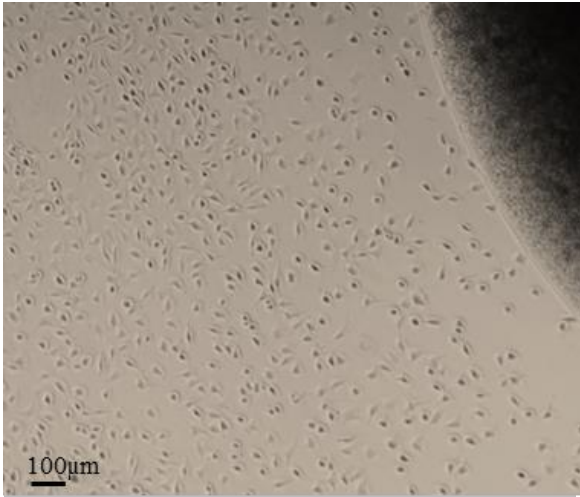


Abb. 17: Nicht gealtertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.

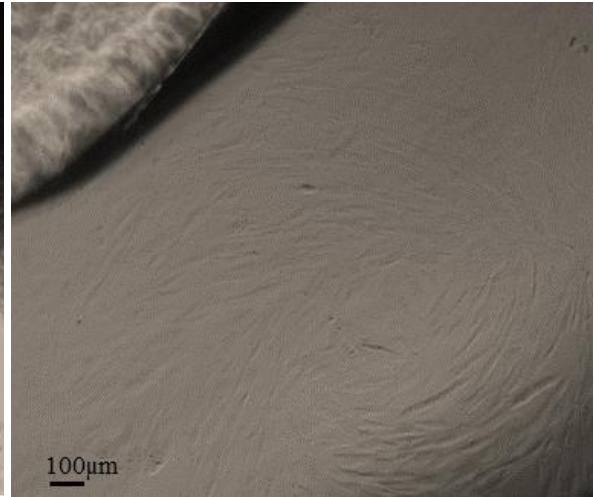


Abb. 18: Nicht gealtertes Orthocryl® LC, GF1, 24 Stunden.

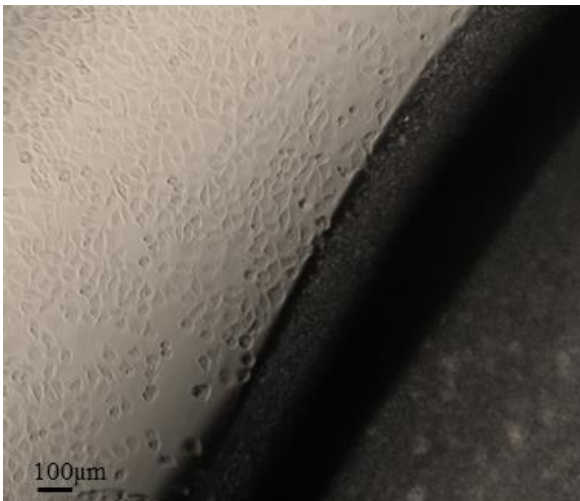


Abb. 19: Gealtertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.

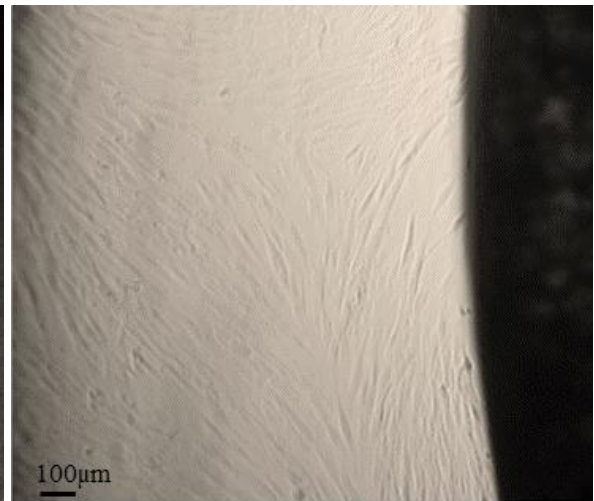


Abb. 20: Gealtertes Orthocryl® LC, GF1, 24 Stunden.

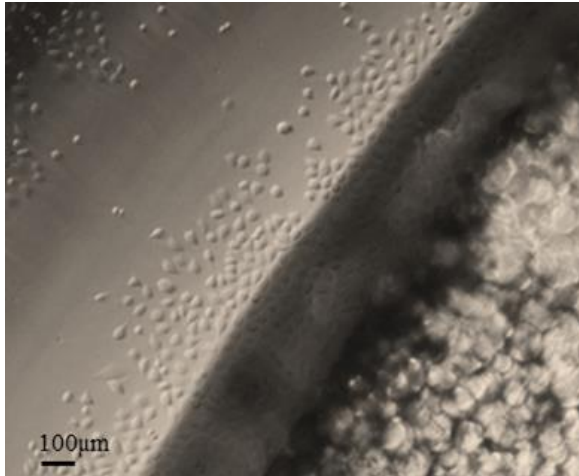


Abb. 21: Nicht gealtertes Weitur®, L929, sechs Stunden.

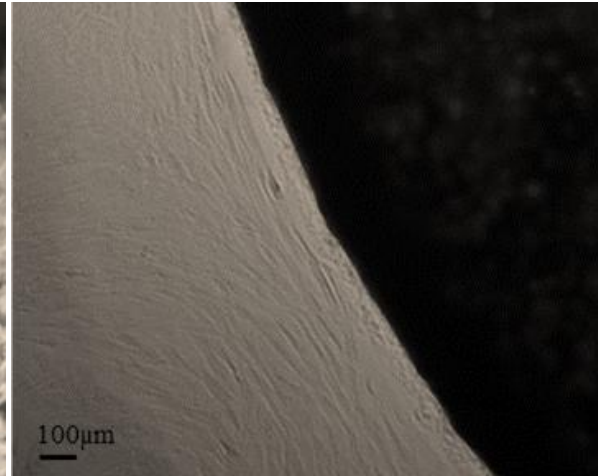


Abb. 22: Nicht gealtertes Weitur®, GF1, 24 Stunden.

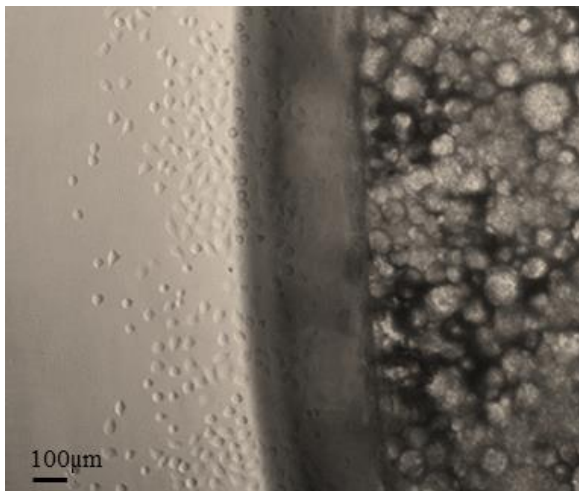


Abb. 23: Gealtertes Weitur®, L929, sechs Stunden.

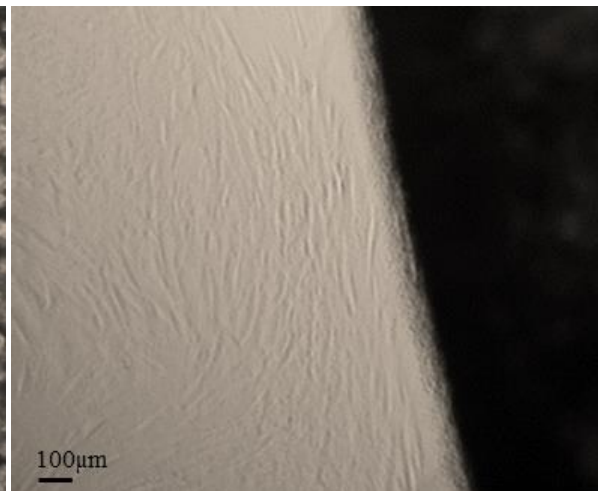


Abb. 24: Gealtertes Weitur®, GF1, 24 Stunden.

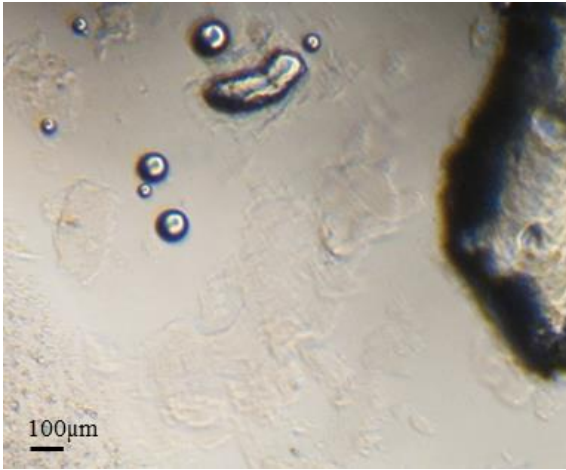


Abb. 25: Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC, L929, sechs Stunden.

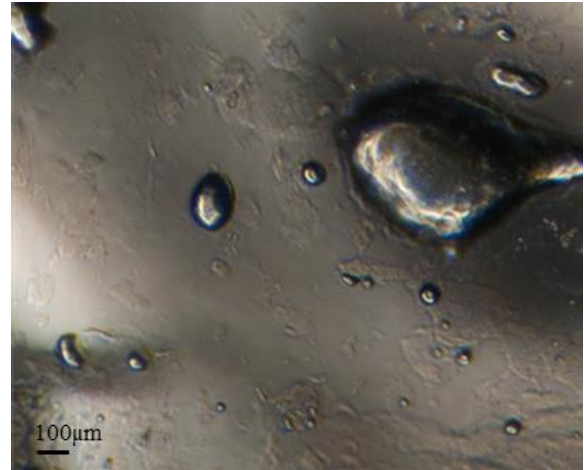


Abb. 26: Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC, GF1, sechs Stunden.

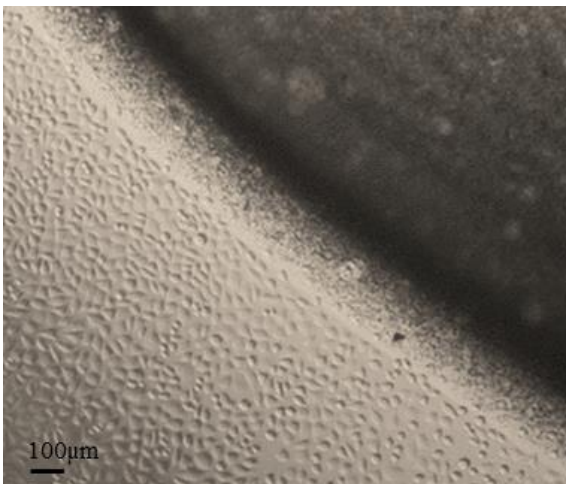


Abb. 27: Glas, L929, 24 Stunden.

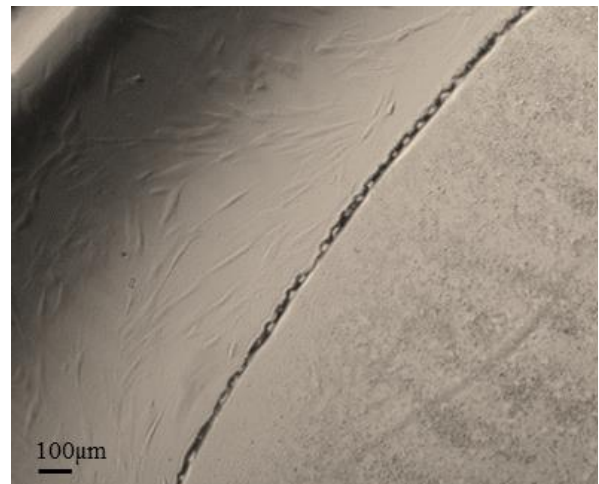


Abb. 28: Glas, GF1, sechs Stunden.

5.1.2.3 Vergleich der Materialien

Entsprechend der ANOVA-Analysen (siehe Tab. 8 und Tab. 9) waren bei beiden Zelltypen die Unterschiede zwischen den untersuchten Materialien signifikant (jeweils $p < 0,001$). Um die Probekörper paarweise auf signifikante Unterschiede zu vergleichen, wurde mit den Messergebnissen des Hauptversuchs ebenfalls ein Tukey Post-hoc-Test durchgeführt (Tab. 10).

Das nicht polymerisierte Orthocryl® LC reduzierte die Messwerte und somit die Zellviabilität signifikant im Vergleich zu den anderen Materialien ($p < 0,001$ für alle Vergleiche). Im Vergleich zu den Leerkontrollen ohne Zellen war keine Signifikanz zu ermitteln ($p = 1$). Demnach waren bei nicht polymerisiertem Orthocryl® LC keine Zellen als vital detektierbar. Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC kann daher als stark zytotoxisch beschrieben werden.

Zwischen den anderen vier Materialien, der Negativkontrolle Glas und den reinen Zellproben wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ($p > 0,05$ für alle Vergleiche). Demnach hatten weder Orthocryl® LC noch Weitur® einen signifikanten Einfluss auf die Zahl vitaler Zellen, d.h. beide Materialien können als nicht zytotoxisch klassifiziert werden. Auch die gealterten Varianten der Materialien beeinflussten die Zellviabilität nicht signifikant im Vergleich zu den nicht gealterten Proben (jeweils $p > 0,05$).

Tab. 10: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der Materialien im Hauptversuch.

	Orthocryl® LC	Orthocryl® LC gealtert	Weitur®	Weitur® gealtert	Glas	Unpol. Orthocryl® LC	Zellen	leer
Orthocryl® LC	X	1	0,9972	1	1	< 0,001	1	< 0,001
Orthocryl® LC gealtert		X	0,998	1	1	< 0,001	1	< 0,001
Weitur®			X	0,9998	0,9706	< 0,001	0,9996	< 0,001
Weitur® gealtert				X	0,9997	< 0,001	1	< 0,001
Glas					X	< 0,001	0,9986	< 0,001
Unpol. Orthocryl® LC						X	< 0,001	1
Zellen							X	< 0,001
leer								X

5.1.2.4 Zellviabilität der verschiedenen Zelllinien

Abbildung 29 zeigt die Messergebnisse beider Zelllinien und der zellfreien Proben nach sechs, 24 und 48 Stunden. Die Zelllinie GF1 hatte bei allen drei Messungen die höchste Zellviabilität (Maximum nach sechs Stunden: $0,64 \pm 0,16$). Nach 24 Stunden sank die Zellviabilität von GF1 ab ($0,39 \pm 0,14$), allerdings stieg sie nach 48 Stunden wieder an ($0,5 \pm 0,17$). Bei den zellfreien Proben waren die niedrigsten Werte zu verzeichnen ($0,19 \pm 0,02$ bis $0,24 \pm 0,05$). Die Unterschiede der Zellviabilität der verschiedenen Zelltypen waren signifikant ($p < 0,001$, siehe Tab. 8 und 9). Die Zellviabilität von L929 war im Vergleich zu den Vorversuchen niedriger (maximal $0,34 \pm 0,08$). Sie war nach sechs und 24 Stunden konstant und stieg nach 48 Stunden deutlich an. Dieser Unterschied der Zellviabilität im zeitlichen Verlauf war ebenfalls signifikant ($p < 0,001$, siehe Tab. 8).

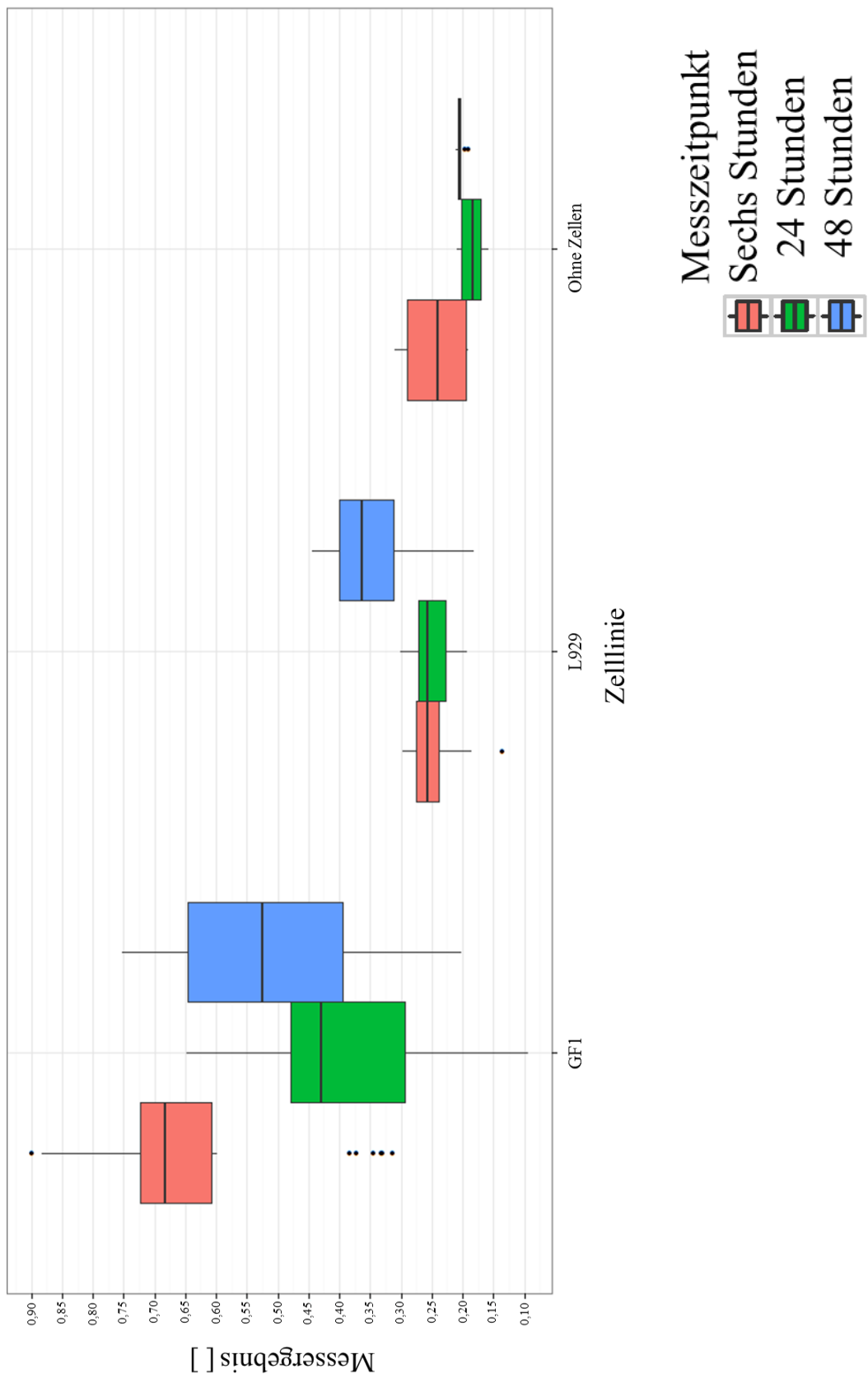


Abb. 29: Boxplots zur Zellviabilität der Zelllinien im Hauptversuch. (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

5.1.2.5 Vergleich der Zelllinien

Der Tukey Post-hoc-Test zum Vergleich der Zellviabilität der Zelllinien wurde im Hauptversuch ebenfalls für alle drei Messzeitpunkte durchgeführt (siehe Tab. 11, 12 und 13). GF1 hatte nach sechs, 24 und 48 Stunden eine signifikant höhere Zellviabilität als L929 (jeweils $p < 0,001$). Im Vergleich zu den zellfreien Proben hatte GF1 auch im Hauptversuch signifikant höhere Messergebnisse zu allen drei Zeitpunkten (jeweils $p < 0,001$).

Besonders auffällig zeigte sich im Hauptversuch die geringere Zellviabilität von L929 (siehe Abb. 29). Nach sechs und 24 Stunden bestanden keine signifikanten Unterschiede der Messwerte zu den zellfreien Proben (jeweils $p > 0,05$). Nach 48 Stunden hingegen war die Zellviabilität signifikant höher als bei den zellfreien Proben ($p = 0,0042$). L929 war daher nach sechs bzw. 24 Stunden nicht vollständig zugrunde gegangen und hatte sich nach 48 Stunden sogar wieder erholt.

Tab. 11: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach sechs Stunden (Hauptversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	< 0,001	0,9927
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

Tab. 12: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 24 Stunden (Hauptversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	< 0,001	0,1124
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

Tab. 13: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Zelltypen nach 48 Stunden (Hauptversuch).

	L929	GF1	ohne Zellen
L929	X	< 0,001	0,0042
GF1		X	< 0,001
ohne Zellen			X

5.1.2.6 Zytotoxizität des Silikons

Um zu beurteilen, ob das Silikon zum Einkleben der Probekörper einen Einfluss auf die Zellviabilität hatte, wurden Zellproben ohne Probekörper mit und ohne Silikon untersucht. Die Messergebnisse der verschiedenen Zelllinien zu den drei Messzeitpunkten sind in Abb. 30 dargestellt. Die Mittelwerte der Proben waren mit Silikon tendenziell höher, aber ohne statistische Signifikanz (jeweils $p > 0,05$, siehe Tab. 14). Bei GF1 lag das Maximum mit Silikon bei $0,75 \pm 0,02$ und ohne Silikon bei $0,68 \pm 0$ und bei L929 bei $0,37 \pm 0,06$ mit Silikon und bei $0,32 \pm 0,05$ ohne Silikon (Abb. 30). Nach ANOVA waren die Unterschiede der Proben mit und ohne Silikon insgesamt nicht signifikant (siehe Tab. 8, $p = 0,3299$). Damit bestätigte sich das Ergebnis des Vorversuchs, das Silikon reduzierte die Zellviabilität nicht signifikant und wirkte demnach nicht zytotoxisch. Ebenfalls bestanden keine Signifikanzen in Bezug auf die unterschiedlichen Messzeitpunkte und Zelllinien (Tab. 14, jeweils $p > 0,05$).

Tab. 14: ANOVA-Ergebnisse Silikon und Silikon-Zelltyp-Interaktion.

Messzeitpunkt	Parameter	p
6	Silikon	0,5244
	Zelltyp: Silikon	0,4652
24	Silikon	0,5990
	Zelltyp: Silikon	0,5130
48	Silikon	0,2388
	Zelltyp: Silikon	0,4832

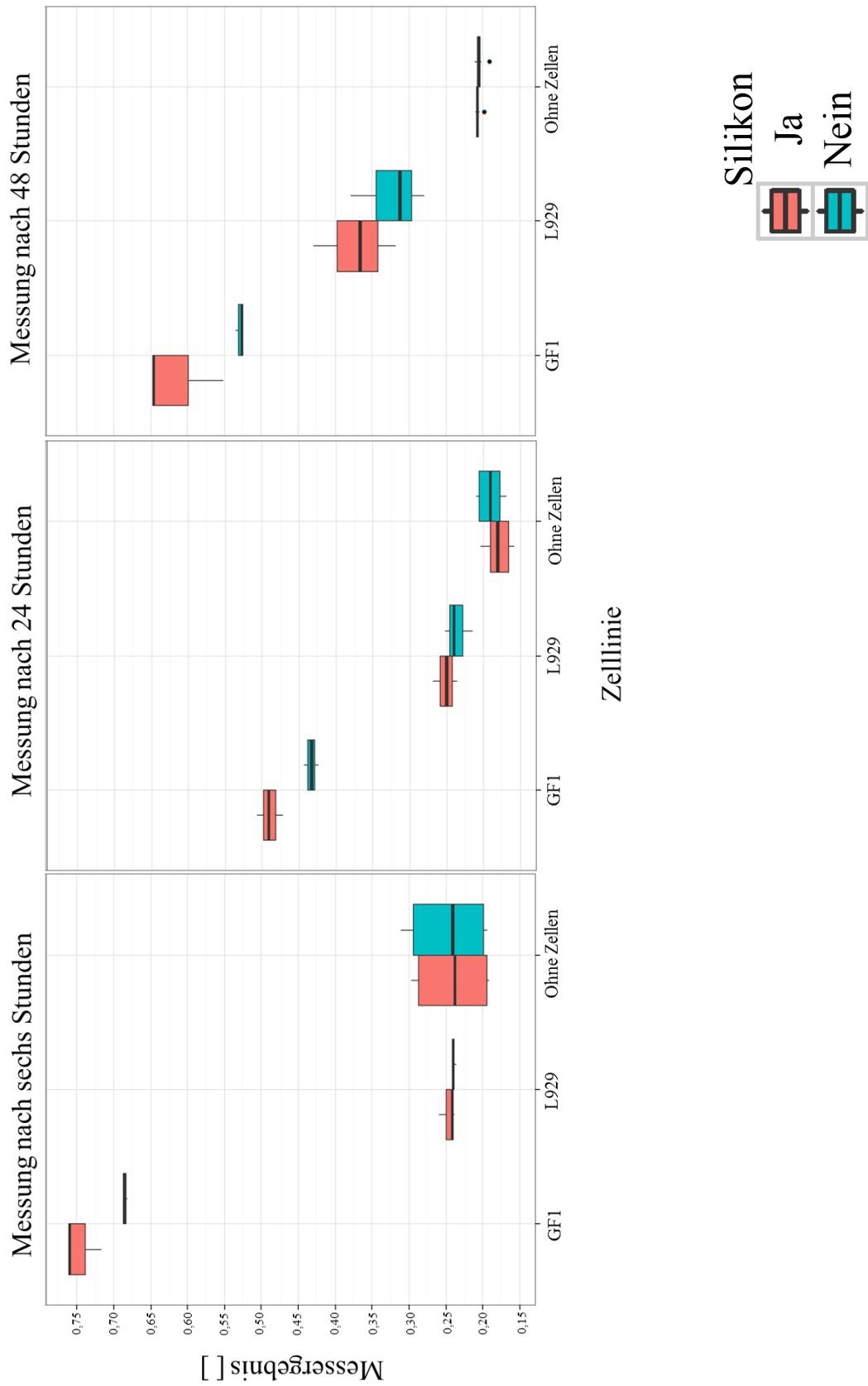


Abb. 30: Boxplots zum Einfluss des Silikons auf die Zellviabilität. (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

5.2 Rauheit

5.2.1 Oberflächenrauheit der Materialien

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Perthometer-Messung der vier untersuchten Materialien. Die Oberflächenrauheiten (R_A) betragen $0,5 \pm 0,06 \mu\text{m}$ bei Weitur® gealtert, $0,74 \pm 0,18 \mu\text{m}$ bei Weitur® nicht gealtert, $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m}$ bei Orthocryl® LC gealtert und $0,18 \pm 0,05 \mu\text{m}$ bei Orthocryl® LC nicht gealtert. Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen R_A der verschiedenen Materialien ($p < 0,001$) und zwischen den gealterten und nicht gealterten Materialien ($p = 0,0083$). Außerdem wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Material und Alterung festgestellt ($p < 0,001$, Tab. 15).

Tab. 15: ANOVA-Ergebnisse des Effekts von Material und Alterung sowie deren Interaktion auf die Oberflächenrauheit (R_A).

Parameter	p
Material	< 0,001
Alterung	0,0083
Material: Alterung	< 0,001

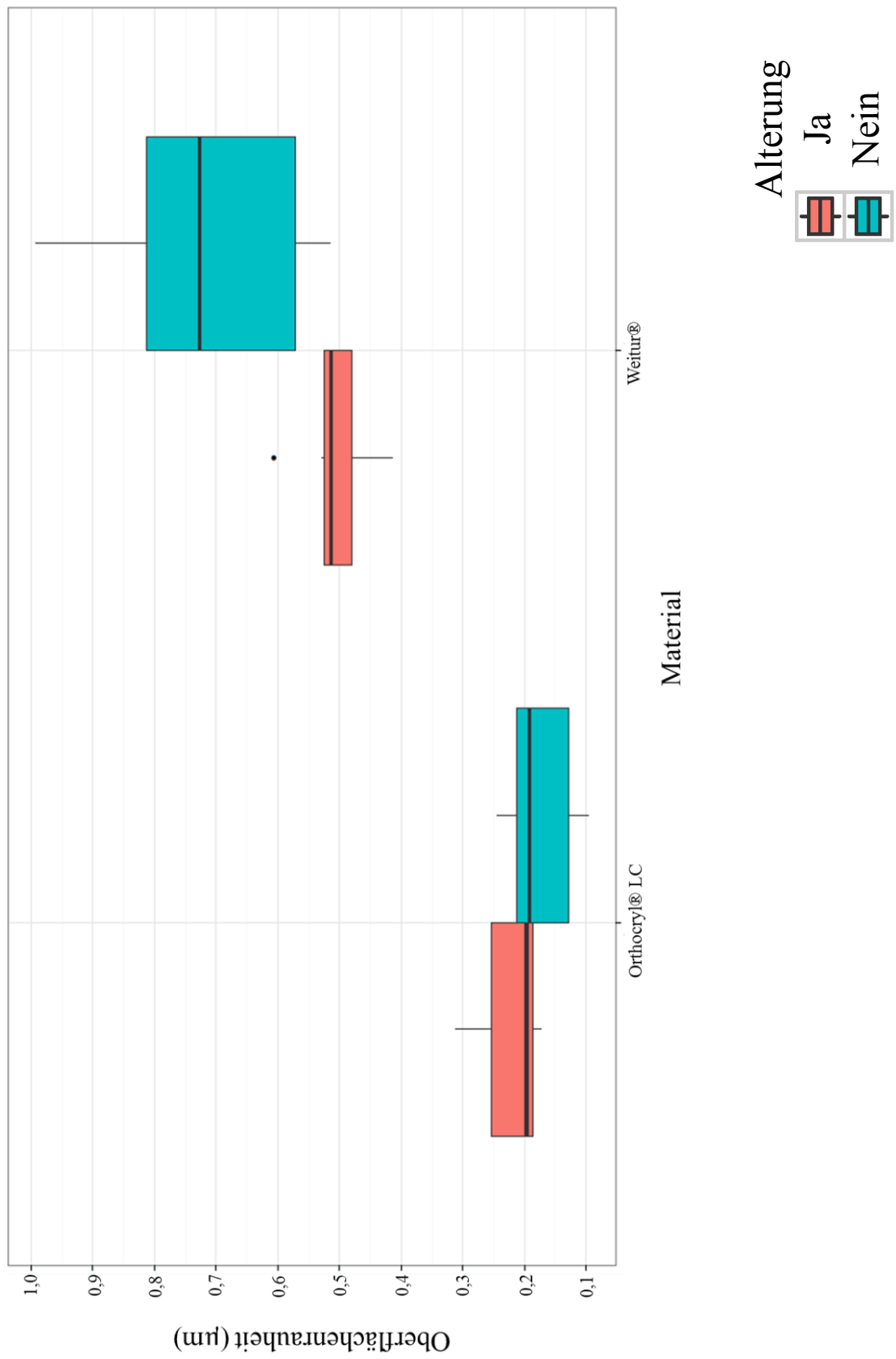


Abb. 31: Boxplots der Oberflächenrauheit (R_A).
 (Mittelwert, oberes und unteres Quartil, • = Ausreißer)

Die Abbildungen 32, 34, 36 und 38 zeigen jeweils die topografische Darstellung der Oberfläche eines einzelnen Probekörpers. Alle Probekörper hatten im peripheren Bereich Abflachungen, wobei diese bei nicht gealtertem Orthocryl® LC an nur zwei Seiten zu erkennen waren. Diese peripheren Abflachungen wurden bei Ermittlung von R_A nicht komplett berücksichtigt, da die erste und die letzte Einzelmessstrecke nicht in das Ergebnis einbezogen wurden.

Es waren zahlreiche Rillen auf allen Probekörpern erkennen, welche sich nach Polynomfilterung der topografischen Darstellungen noch deutlicher darstellten (Abb. 33, 35, 37 und 39). Die Rillen liefen bei allen vier Materialien parallel zueinander.

Blaue Bereiche auf den Darstellungen nach Polynomfilterung, die in der vorliegenden Studie eine Riefentiefe über 2 μm bedeuteten, waren vor allem bei Weitur® und Weitur® gealtert festzustellen. Gelbe und rote Bereiche, die eine Erhöhung der Oberfläche bedeuten, waren bei allen Probekörpern erkennbar.

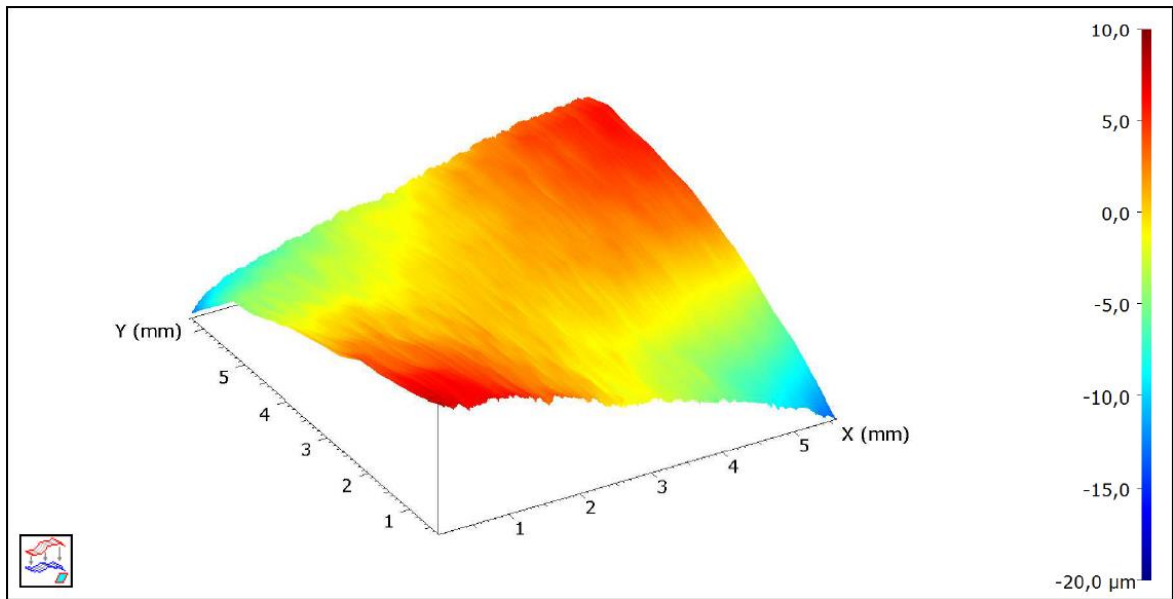


Abb. 32: Topografische Darstellung von Orthocryl® LC.

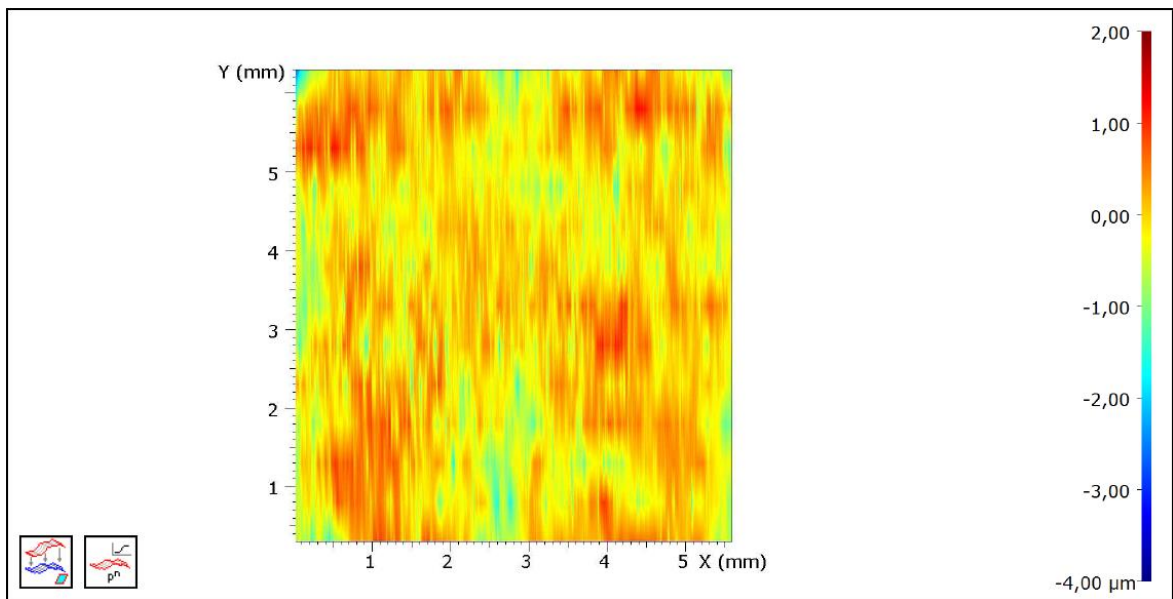


Abb. 33: Oberfläche von Orthocryl® LC nach Polynomfilterung.

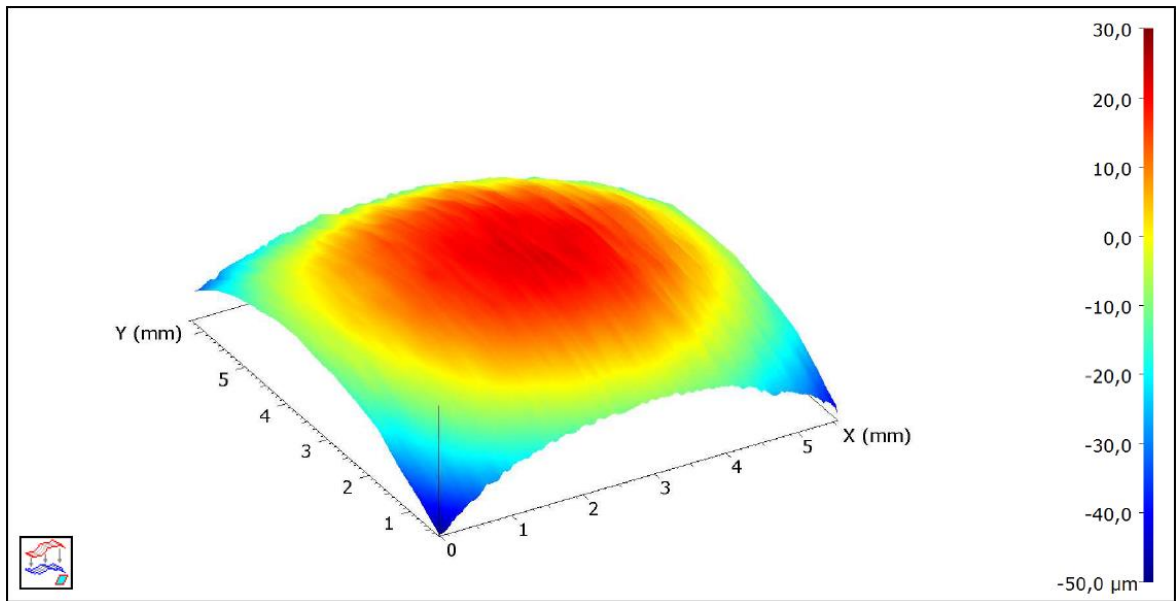


Abb. 34: Topografische Darstellung von Weiter®.

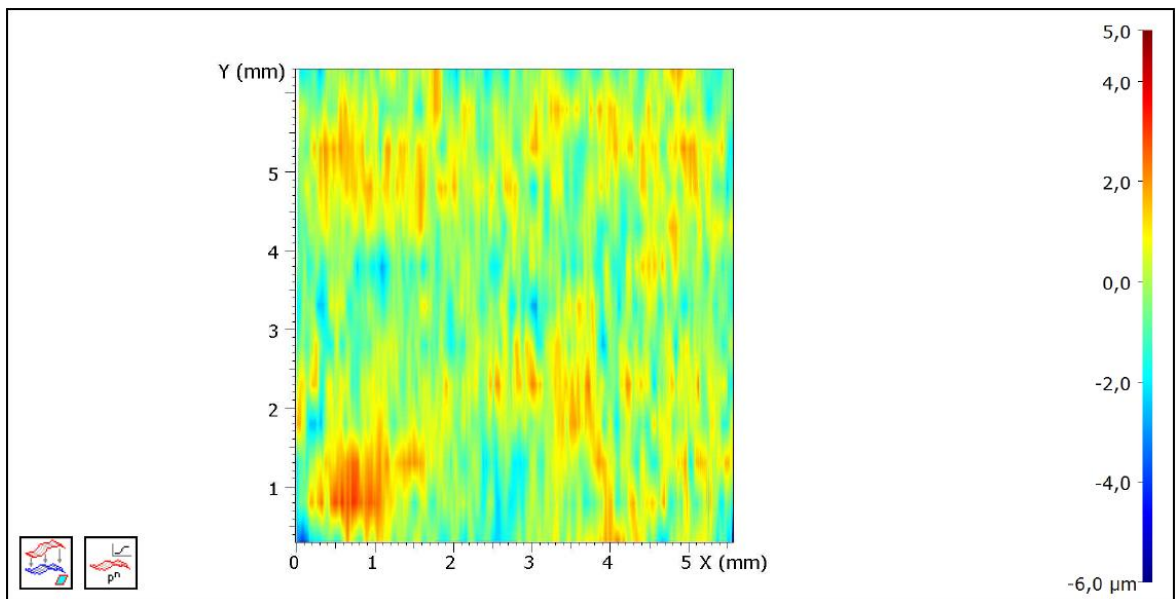


Abb. 35: Oberfläche von Weiter® nach Polynomfilterung.

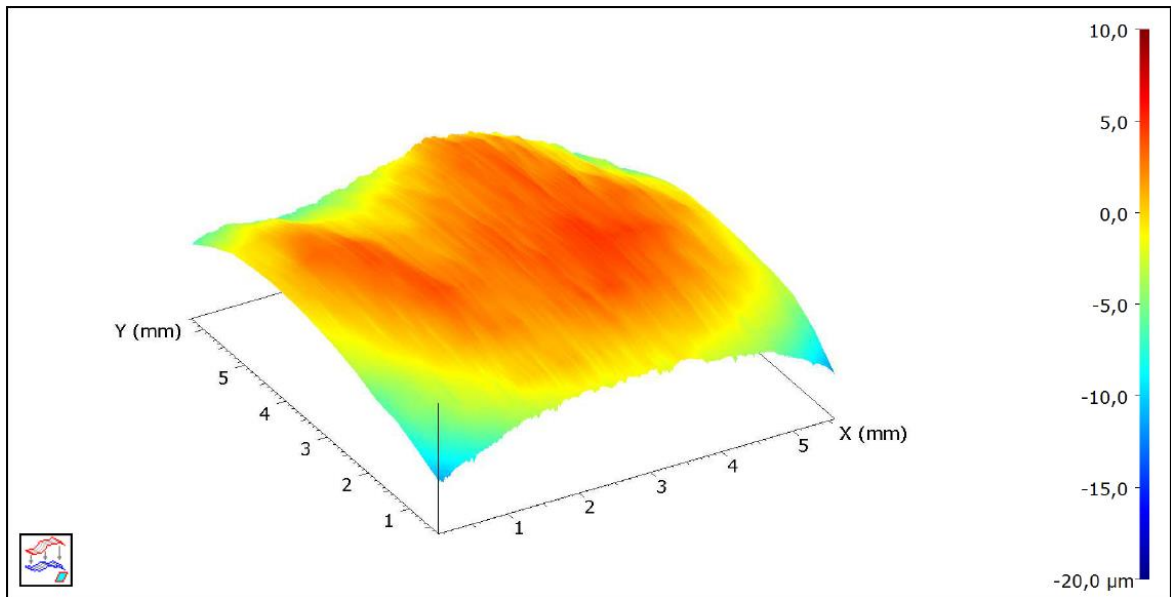


Abb. 36: Topografische Darstellung von Orthocryl® LC gealtert.

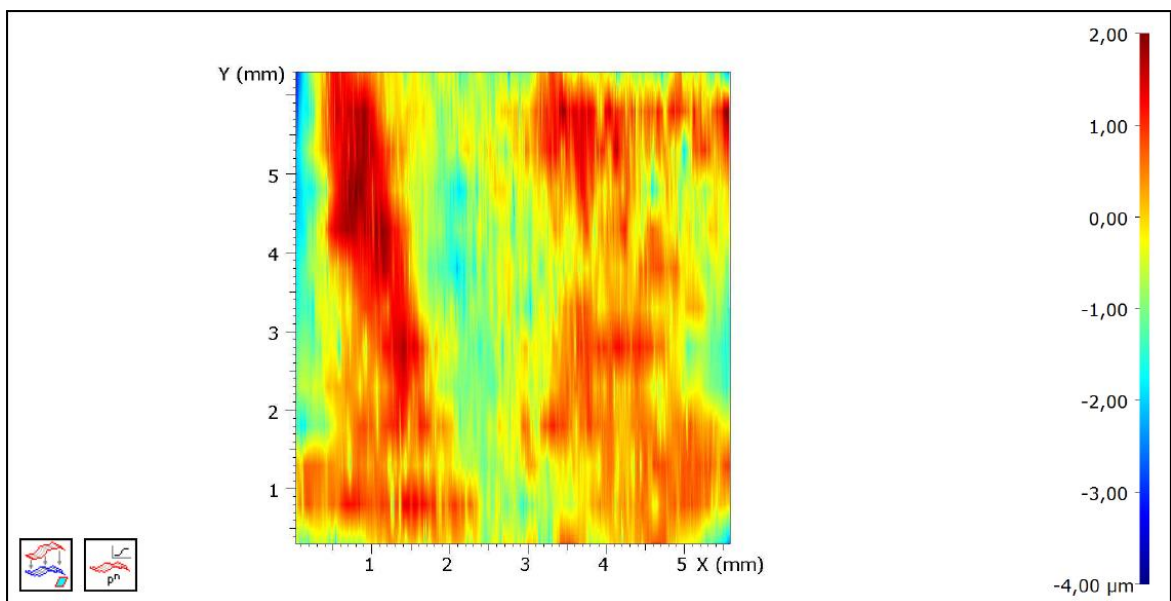


Abb. 37: Oberfläche von Orthocryl® LC gealtert nach Polynomfilterung.

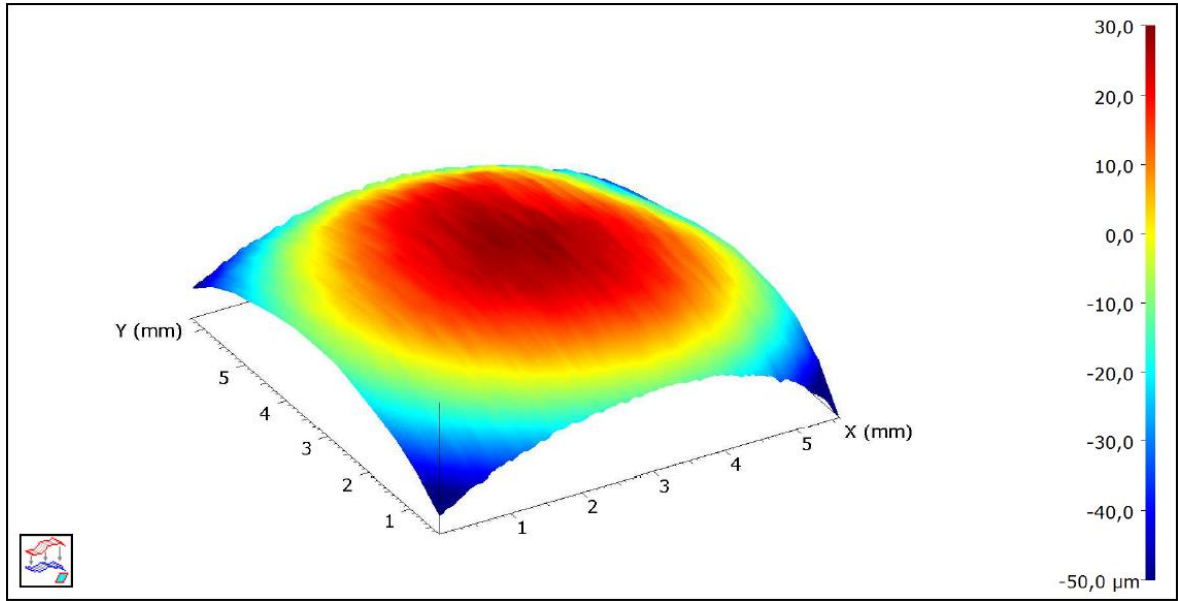


Abb. 38: Topografische Darstellung von Weitur® gealtert.

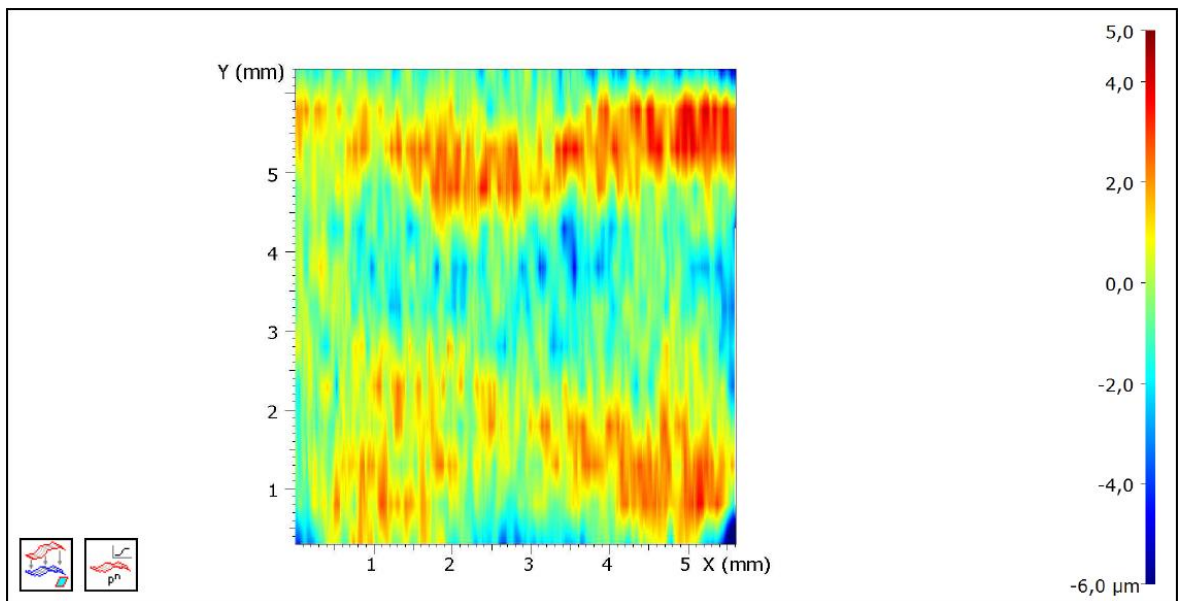


Abb. 39: Oberfläche von Weitur® gealtert nach Polynomfilterung

5.2.2 Vergleich der Oberflächenrauheit der Materialien

Weitur® nicht gealtert war in der vorliegenden Arbeit signifikant rauer als die drei anderen getesteten Materialien ($p < 0,001$ für alle Vergleiche, siehe Tab. 16). Gealtertes Weitur® hatte eine signifikant höhere Rauheit als die gealterten und nicht gealterten Orthocryl® LC-Probekörper (jeweils $p < 0,001$). Lediglich gealtertes und nicht gealtertes Orthocryl® LC zeigten keine signifikanten Unterschiede ihrer Rauheit ($p = 0,7419$).

Tab. 16: Ergebnisse des Tukey Post-hoc-Tests zum paarweisen Vergleich von R_A der Materialien.

	Orthocryl® LC	Orthocryl® LC gealtert	Weitur®	Weitur® gealtert
Orthocryl® LC	X	0,7419	< 0,001	< 0,001
Orthocryl® LC gealtert		X	< 0,001	< 0,001
Weitur®			X	< 0,001
Weitur® gealtert				X

5.3 Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität

Tabelle 17 zeigt die Zusammenhänge zwischen Zellviabilität und Rauheit bei GF1 und L929 zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten. Laut Pearson-Korrelationskoeffizient bestanden positive Korrelationen bei GF1 nach sechs Stunden und bei L929 nach 48 Stunden ($\text{Pearsons.r} > 0$). Diese Zusammenhänge waren nach Bonferroni-Holm adjustiertem p-Wert nicht signifikant (jeweils $\text{p.Holm} > 0,05$). Die negativen Korrelationen der anderen Zelltyp-Messzeitpunktvariationen waren ebenfalls nicht signifikant (jeweils $\text{p.Holm} > 0,05$). Somit war in der vorliegenden Studie ein Zusammenhang zwischen Rauheit und Zytotoxizität auszuschließen.

Tab. 17: Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität.

Zelltyp	Messzeitpunkt	Pearsons.r	p	p.Holm
GF1	6	0,97	0,0305	0,183
GF1	24	-0,94	0,0612	0,306
GF1	48	-0,94	0,0644	0,306
L929	6	-0,32	0,6776	1
L929	24	-0,6	0,4031	1
L929	48	0,59	0,4109	1

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Testmaterialien, Positiv- und Negativkontrollen

Das Medizinproduktegesetz (MPG) legt fest, wann Medizinprodukte, wie z.B. dentale Kunststoffe, auf dem Markt eingeführt werden können. Es regelt außerdem die Qualitätssicherung, Sicherheit und Unbedenklichkeit der medizinischen Produkte. Laut MPG müssen Sicherheitsdatenblätter nicht alle Inhaltsstoffe der Medizinprodukte auflisten. Anwender müssen im Zweifel zusätzliche Informationen durch den Hersteller beziehen (MPG 2015). Medizinprodukte müssen vor ihrer Markteinführung mit dem CE-Kennzeichen versehen werden und dafür ein Konformitätsbewertungsverfahren durchlaufen (MPG 2015). In diesem Rahmen erfolgen biologische Prüfungen zur Risikoabschätzung. Die Wirkung auf biologische Zellen und Gewebe muss ausreichend bekannt sein (MPG 2015; Richtlinie 93/42/EWG 2007). Die für biologische Prüfungen häufig verwendete ISO 10993-5 (2009) beurteilt Materialien *in vitro* als nicht zytotoxisch, wenn im Rahmen eines Zytotoxizitätstests mehr als 70 % vitale Zellen nachzuweisen sind. Es ist für den Anwender nicht möglich, exakte Angaben über Zytotoxizitäten durch den Hersteller zu erfahren oder diese anhand der Sicherheitsblätter zu beurteilen und zu vergleichen. Goiato *et al.* (2015) kamen in ihrem Review zu dem Ergebnis, dass es keinen einzigen nicht zytotoxischen dentalen Acrylatkunststoff gibt.

Der Hersteller ist für die Sicherheit seines Medizinprodukts verantwortlich (Richtlinie 93/42/EWG 2007). Trotzdem trägt auch der Zahnarzt als Anwender laut Konsenspapier zu Restaurationsmaterialien in der Zahnheilkunde (1997) Verantwortung. Er muss das für seinen Patienten „individuell richtige Material“ anwenden. Außerdem muss er entscheiden, ob ein Material seinem Patienten auch bei sachgemäßer Anwendung schaden könnte. Im Zweifel ist er dazu verpflichtet, auf Alternativen auszuweichen (Koch 1997).

Die kieferorthopädischen Kunststoffe Orthocryl® LC und Weitur® sind kommerziell erhältlich und weit verbreitet, aber erstaunlicherweise bisher nicht in Bezug auf ihre Zytotoxizität, Rauheit und mögliche Zusammenhänge untersucht worden. Laut Sicherheitsdatenblätter wirken beide Materialien *in vitro* nicht zytotoxisch (Dentaurum 2016; Johannes

Weithas KG 2016). Genaue Angaben zur Zellviabilität bei Exposition der Zellen auf oder in Nachbarschaft zu den Materialien werden nicht angegeben. Ein Vergleich der Zytotoxizität der beiden Materialien ist einzig durch die Angaben der Sicherheitsdatenblätter nicht möglich. Eine Beurteilung der Zytotoxizität von Orthocryl® LC und Weitur® anhand von Studien anderer kieferorthopädischer Kunststoffe ist nicht sinnvoll, da Studien zur Zytotoxizität dentaler Kunststoffe aufgrund vieler verschiedener Parameter nur schwer vergleichbar sind (Chaves *et al.* 2012).

Unter anderem werden vorhandene Restmonomere für Zytotoxizität *in vitro* verantwortlich gemacht (Rose *et al.* 2000; Kedjarune *et al.* 1999). Diese können beispielsweise aus bereits polymerisierten Kunststoffen heraus eluieren (Ferracane 1994; Mikai *et al.* 2006; Geurtsen 2005). Auch viele andere Komponenten dentaler Kunststoffe können *in vitro* zytotoxisch wirken (Geurtsen *et al.* 1998). Weitur® enthält das Monomer MMA und den Reaktionsinitiator DBPO. Beiden Inhaltsstoffen ist *in vitro* bereits eine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen worden (Rose *et al.* 2000; Hofmann 2003; Dahl *et al.* 1994; Kedjarune *et al.* 1999). Auch Orthocryl® LC enthält mit UDMA ein stark zytotoxisch wirkendes Monomer (Rose *et al.* 2000; Yoshii 1997; Geurtsen *et al.* 1998).

Auf Basis der aktuell vorhandenen Literatur kann keine eindeutige Aussage zur Zytotoxizität von Orthocryl® LC oder Weitur® getroffen werden. In ihrem Review fassten Chaves *et al.* (2012) zusammen, dass nur eine einzige aktuellere Studie zum direkten Vergleich von auto- und photopolymerisierenden Kunststoffen vorhanden ist. In dieser Studie wirkte das untersuchte Autopolymerisat signifikant zytotoxischer als das Photopolymerisat (Melilli *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu beurteilten Zentner *et al.* (1994) und Schendel *et al.* (1992) die von ihnen untersuchten Photopolymerisate signifikant toxischer als die Autopolymerisate. Wegen der großen Anzahl verschiedener Variablen in bereits durchgeführten Untersuchungen kann abschließend keine allgemeingültige Aussage über die Zytotoxizität dentaler Kunststoffe getroffen werden (Chaves *et al.* 2012). Goiato *et al.* (2015) und Moharamzadeh *et al.* (2009) fordern mehr Studien zur Beurteilung der Biokompatibilität dentaler Kunststoffe. Aus diesen Gründen wurden Weitur® und Orthocryl® LC als Testmaterialien für die vorliegende Studie ausgewählt.

Zur Herstellung der Probekörper wurde klarer Kunststoff beider Varianten verwendet. Die verschiedenen Farben von kieferorthopädischen Kunststoffen unterscheiden sich nicht signifikant in Bezug auf ihre Zytotoxizität (Retamoso *et al.* 2014; Schendel *et al.* 1992). Anhand der Sicherheitsdatenblätter konnte nicht nachvollzogen werden, ob die Hersteller identische Farbpigmente für Weitur® und Orthocryl® LC verwenden. Unterschiedliche Einflüsse verschiedener Farbpigmente und deren Interaktion mit der CCK8-Messlösung sollten daher ausgeschlossen werden.

Nach ISO 10993-5 (2009), an welche die vorliegende Studie angelehnt war, sollten bei Zytotoxizitätsanalysen zusätzlich zu den Testmaterialien immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle untersucht werden. Die Wahl der Positivkontrolle fiel auf unpolymerisiertes Orthocryl® LC. Urethandimethacrylat-basierte Lichtpolymerisate wirken in der Zellkultur bei 2,5 mg in der Petrischale stark zytotoxisch (Zentner *et al.* 1994). Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC enthält UDMA, daher eignete es sich sehr gut als Positivkontrolle für die vorliegende Studie. Urethandimethacrylat wirkt zytotoxischer als viele andere Monomere (Geurtsen *et al.* 1998). Rose *et al.* (2000) und Yoshii (1997) stuften UDMA zytotoxischer ein als MMA, das wiederum zytotoxischer eingestuft wird als andere Monomere (Hofmann 2003). Die zytotoxischen Effekte von MMA lassen sich im Rasterelektronenmikroskop bereits nach einer Minute erkennen (Dahl *et al.* 1994). Methylmethacrylat war dennoch für den vorliegenden Versuchsaufbau nicht geeignet: Beim Absaugen der Testlösung nach dem WST-8-Test wäre das flüssige MMA ebenfalls abgesaugt worden. So hätte der mögliche Einfluss von MMA bei den Messungen nach 24 und 48 Stunden in diesem Fall nicht berücksichtigt werden können. Das mit der Testlösung abgesaugte MMA hätte außerdem das Messergebnis des Spektralphotometers verfälschen können.

Glas wurde bereits von anderen Autoren als Negativkontrolle verwendet (Hensten-Pettersen und Wictorin 1981; Retamoso *et al.* 2014; Melilli *et al.* 2009). Die Glasprobekörper wurden ebenfalls desinfiziert und in die Well-Platten eingeklebt. Durch den Vergleich mit reinen Zellproben konnte ein möglich zytotoxischer Effekt von Desinfektion und Einkleben der Probekörper ausgeschlossen werden. Genau wie bei den geprüften Materialien hatten die Glasprobekörper einen Durchmesser von 10 mm.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Leerproben enthielten reines Medium. Hintergrund dafür war eine mögliche Wechselwirkung des Mediums mit dem WST-8-Test (Pfetzer 2011). Vom Hersteller des WST-8-Tests werden alle gängigen Medien, auch DMEM, als geeignet angegeben (Dojindo EU GmbH 2016a). Im Vorversuch wurde die Extinktion der Probekörper ohne Zellen separat getestet, um eine Interaktion der Probekörper mit der Messlösung auszuschließen. Die Extinktion der WST-8-Testlösung war mit und ohne Probekörper nahezu identisch. Die Probekörper hatten somit keinen unerwünschten Einfluss auf die Testlösung.

6.1.2 Herstellung und Konditionierung der Probekörper

Das Herstellungsverfahren von Probekörpern mittels Silikon-Dublierformen wurde von Prudil (2010) zur Herstellung von Kompositprobekörpern und von dos Santos *et al.* (2013) zur Herstellung von PMMA-Probekörpern angewendet. Alle Probekörper konnten so in exakt gleicher Größe und gleichem Volumen hergestellt werden. Probekörper sollen laut ISO 10993-5 (2009) mindestens eine glatte Oberfläche besitzen. Zusätzlich hatten die Probekörper in der vorliegenden Studie einen glatten Rand, falls die Zellen auch hier adhären werden sollten. Ata und Yavuzylmaz (2009) nutzten ebenfalls Prüfkörper von 10 mm Durchmesser und 1 mm Höhe. Als Nachteil stellte sich heraus, dass die sehr kleine Größe der Probekörper die manuelle mechanische Politur sehr erschwerte.

Zur Herstellung der Probekörper aus Weitur® wurde das Pulver des noch nicht polymerisierten Kunststoffes mit exakt drei Tropfen Monomer vermischt. Die Menge Monomer bei der Herstellung wirkt sich auf den Restmonomergehalt des polymerisierten Kunststoffes aus (Kedjarune *et al.* 1999). Daher musste die Monomermenge aller Weitur®-Probekörper identisch sein. Die Probekörper aus Weitur® wurden im Sprühverfahren hergestellt. Laut Öztürk *et al.* (2011) gibt es keine signifikanten Toxizitätsunterschiede bei der Verarbeitung der Kunststoffe durch Anteigen oder Sprühen.

Die Sauerstoffinhibitionsschicht musste vor den Zytotoxizitätstests der untersuchten Werkstoffe entfernt werden, da Photopolymerisate bei Belassen zytotoxischer wirken (Schendel *et al.* 1992; Rose *et al.* 2000). Ethanol allein entfernt die Sauerstoffinhibitionsschicht nicht vollständig (Bijelic-Donova *et al.* 2015), daher wurden die Probekörper im Anschluss zu-

sätzlich nach Herstellerangaben ausgearbeitet und poliert. Eine Politur entfernt die Sauerstoffinhibitionsschicht komplett (Welker 2000). Es sollten möglichst realistische Umstände geschaffen werden, denn auch Apparaturen, die im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung zum Einsatz kommen, werden an ihrer Oberseite ausgearbeitet und poliert. Autopolymerisate, die in Wasser polymerisiert werden, besitzen keine Sauerstoffinhibitionsschicht (Vallittu 1999). Dennoch erfolgten die o.g. Schritte analog zu den Photopolymerisaten, da alle Probekörper den gleichen Ausarbeitungsprozess durchlaufen sollten. Außerdem werden natürlich auch Autopolymerisate vor dem Einsatz beim Patienten ausgearbeitet und poliert. Die Ausarbeitung und Politur erfolgte laut Herstellerangaben mit Fräsen, Sandpapier, Bimsstein, Bürsten und Schwabbeln. Auch Serra *et al.* (2013) empfahlen im Rahmen ihrer Studie den Gebrauch dieser Polierutensilien. Es ist kritisch zu bewerten, dass in der vorliegenden Studie auf Poliervorrichtungen wie Drehmaschinen verzichtet wurde. Diese hätten den Poliervorgang standardisierter gemacht. Dennoch sollte die Bearbeitung der Proben unter realitätsnahen Gegebenheiten stattfinden. Der Ausarbeitungs- und Poliervorgang wurde analog zu den Abläufen in zahntechnischen Laboren durchgeführt, exakt wie die Politur von Apparaturen, die einem Patienten eingegliedert werden.

Kieferorthopädische Materialien sind täglich viele Stunden in Gebrauch (Schäfer *et al.* 2015; Witt *et al.* 1992). Der größte Anteil des Restmonomers, das in wässrige Umgebung abgegeben werden kann, eluiert schon in den ersten Stunden (Ferracane 1994; Stafford und Brooks 1985; Kopperud *et al.* 2011). Aus diesem Grund verringert sich die Zytotoxizität dentaler Kunststoffe nach einer Lagerung in Wasser signifikant (Ebrahimi Saravi *et al.* 2012; Rose *et al.* 2000; Tay *et al.* 2012). Um diesen Effekt zu untersuchen, aber auch um die Beanspruchung der Materialien beim täglichen Gebrauch zu simulieren, wurde ein Teil der Probekörper in einem Thermocycler künstlich gealtert.

Künstliche Alterung wird in der DIN 53508 (2000) in Bezug auf Kautschuk und Elastomere beschrieben. Dieses Verfahren wurde schon häufig zur künstlichen Alterung zahnmedizinischer Kunststoffe auf Acrylatbasis angewendet (Coordes 2013; Rzanny *et al.* 2007; Khanna *et al.* 2015; Bishara *et al.* 2007; Al Jabbari *et al.* 2014; Meriç *et al.* 2008). Materialabhängig kann das künstliche Altern durch einen Thermocycler die Zytotoxizität von Materialien verringern (Landayan *et al.* 2014; Park *et al.* 2004). Analog zu vorherigen Studien wurden die Temperaturen der Wasserbäder auf 5 °C und 55 °C festgelegt und 1000 Zyklen durchgeführt (Al Jabbari *et al.* 2014; Coordes 2013; Oguz *et al.* 2007).

Das Waschen der Probekörper wurde dem Sterilisieren vorgezogen. Zwar wird die Sterilisation in der ISO 10993-5 (2009) vorgeschrieben, dies war aber in der vorliegenden Studie nicht sinnvoll. Nach der Polymerisation kann gerade durch Hitze die Zytotoxizität der Materialien verringert werden (Jorge *et al.* 2007; Bural *et al.* 2011). Die Ergebnisse wären daher durch eine Heißsterilisation weniger aussagekräftig gewesen. Eine Sterilisation mit ultraviolettem (UV) Licht, wie sie von dos Santos *et al.* (2012) durchgeführt wurde, kam in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht infrage. Gerade die Zytotoxizität des photopolymerisierten Orthocryl® LC hätte durch das Licht im UV-Bereich beeinflusst werden können. Des Weiteren kann UV-Licht Oberflächeneigenschaften und somit auch die Adhäsionsbereitschaft von L929 auf PMMA-Oberflächen verändern (Welle *et al.* 2002). Als Alternative wurde auf die ISO 10993-12 (2009) zurückgegriffen. Nach dieser Norm ist das Waschen von Proben nach dem im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Ablauf sinnvoll, wenn eine Sterilisation der Materialien nicht möglich ist.

6.1.3 Vorbereiten der Well-Platten

Die Probekörper wurden vor dem Aussäen der Zellen in 48-Well-Platten eingeklebt. So sollte zusätzlicher Stress der Zellen durch möglichen Druck eines nachträglich eingebrachten Probekörpers vermieden werden. Fibroblasten können auch unter Probekörpern wachsen (Zentner *et al.* 1994). Durch das Einkleben konnte verhindert werden, dass sich Zellen an der unpolierten Unterseite der Probekörper niederließen.

Bei der Auswahl der Well-Platten fiel die Entscheidung auf 48-Well-Platten, obwohl der Hersteller des WST-8-Tests 96-Well-Platten empfiehlt (Dojindo EU GmbH 2016a). Vorteil der größeren Well-Vertiefungen war die Möglichkeit mit einer größeren Anzahl von Zellen zu arbeiten. Außerdem konnte so mit größeren Volumina gearbeitet werden, wodurch sich Pipettierfehler minimieren lassen (Rick 1976). Die Probekörper passten gut in die einzelnen Well-Vertiefungen hinein, dennoch war nicht zu viel Platz zum Rand des Wells vorhanden. So konnte sichergestellt werden, dass die Zellen in der Nähe oder sogar auf den Probekörpern adhärent werden würden. Die Zellen sollten möglichst einen direkten Kontakt zu den Probekörpern haben. Lichtmikroskopisch konnte nicht beurteilt werden, ob sich die Zellen direkt auf den Probekörpern niedergelassen hatten (Abb. 17–28). Es war

aber davon auszugehen, da Fibroblasten auf Kunststoffoberflächen und Glas durchaus adhären werden (Scholz 1996).

6.1.4 Zellkulturen

In-vitro-Versuche mittels Zellkultur haben den Vorteil, dass sie standardisiert, einfach durchzuführen und ethisch unbedenklich sind (Schmalz 1981). Wie schon beschrieben, sind die Ergebnisse von In-vitro-Untersuchungen und Tierversuchen teilweise ähnlich. Sie sollten immer am Anfang der Testkaskade stehen (Schmalz 1982). Daher wurde die vorliegende Studie als In-vitro-Studie durchgeführt.

L929-Mausfibroblasten wurden erstmals 1940 von Earle und Voegtlin beschrieben. Den Ursprung des Zellstammes findet man im subkutanen Fettgewebe einer männlichen, 100 Tage alten C3H/An Maus. „L“ steht für den Stamm L und 929 für den ersten Klon des Zellstammes. L929 wachsen adhären, werden nach ISO 10993-5 (2009) zur Testung von Zytotoxizitäten empfohlen und wurden bereits in vielen Studien zur Zytotoxizität dentaler Kunststoffe verwendet (Jorge *et al.* 2007; Retamoso *et al.* 2014; Schendel *et al.* 1992; Garza *et al.* 2012; Ebrahimi Saravi *et al.* 2012; Chaves *et al.* 2014; Hensten-Pettersen und Wictorin 1981; dos Santos *et al.* 2013; Ata und Yavuzylmaz 2009). Obwohl diese Zellen weder humane Zellen sind noch aus dem Anwendungsgebiet der Kunststoffe stammen, wurden sie von Schendel *et al.* (1992) für die Zytotoxizitätstestung dentaler Kunststoffe als geeignet befunden. In dieser Studie lieferten sie ähnliche Ergebnisse wie humane Zellen und waren sogar etwas sensitiver. Eine signifikant stärkere Empfindlichkeit von Mausfibroblasten gegenüber humanen Fibroblasten beschrieben Hanks *et al.* (1981). Thonemann *et al.* (2002) schilderten eine, im Vergleich zu humanen Zellen, empfindlichere Reaktion von L929 auch in Bezug auf den Effekt von UDMA. Trotz der Eignung von L929 sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Zellen in der vorliegenden Studie gesichert sein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hanks *et al.* (1981) und Thonemann *et al.* (2002) fanden Feigal *et al.* (1985) heraus, dass humane Zellen, in ihrer Studie Zellen der Zahnpulpa, empfindlicher als L929 reagierten. Diese Autoren beurteilten die humanen Zellen für Toxizitätsprüfungen als geeigneter als Mausfibroblasten.

Andere Autoren verwendeten Epithelzellen, Keratinozyten, Monozyten, Leukozyten oder Endothelzellen für Zytotoxizitätstests von dentalen Kunststoffen (Hensten-Pettersen und Wictorin 1981; Schendel *et al.* 1992; Cimpan *et al.* 2000; Yoshii 1997; Dahl *et al.* 1994). Diese Zellen stammen allerdings nicht aus dem direkten Anwendungsgebiet der Kunststoffe. Daher fiel für die Versuchsdurchführung im Rahmen der vorliegenden Studie die Entscheidung für humane Gingivafibroblasten. Fibroblasten sind bereits in vielen Studien zur Zytotoxizität dentaler Kunststoffe verwendet worden (Reichl *et al.* 2006; Kedjarune *et al.* 1999; Öztürk *et al.* 2011; Trubiani *et al.* 2012). Von beiden Zelllinien wurden nur Zellen der Passagen drei bis neun verwendet. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Zellkulturen aufgrund starker Belastung durch Passagieren schon vor dem Versuch beeinträchtigt sein könnten.

6.1.5 WST-8-Test

Der WST-8-Test eignete sich besonders für den durchgeführten Versuchsablauf, da WST-8 selbst nicht zytotoxisch auf Zellen wirkt (Schmitz 2011). In der ISO 10993-5 (2009) werden MTT und XTT für Zytotoxizitätstests empfohlen. MTT wird aktuell in den meisten Studien zur Testung der Zytotoxizität dentaler Kunststoffe verwendet (Goiato *et al.* 2015). Das WST-8 hat gegenüber MTT den Vorteil, dass die Zellen nach dem Test nicht zerstört werden müssen, um den Farbstoff freizusetzen, da WST-8-Formazan wasserlöslich und extrazellulär lokalisiert ist (Gstraunthaler und Lindl 2013). So war es in der vorliegenden Studie möglich, den Test nach 24 und 48 Stunden an denselben Zellen zu wiederholen. Ein weiterer Vorteil des WST-8-Tests ist, dass er im Vergleich zu anderen Testmethoden, u.a. auch MTT, deutlich sensitiver ist (Ginouves *et al.* 2014; Tominaga *et al.* 1999).

Der Hersteller empfiehlt für die verwendete WST-8-Testlösung CCK8 mindestens 5000 Zellen pro 100 µl Medium (Dojindo EU GmbH 2016a). Im Vorversuch hatte sich aber herausgestellt, dass in der durchgeführten Untersuchung 10000 Zellen pro cm², und somit pro 500 µl Medium, eine geeignete Menge für den WST-8-Test waren. Der Farbumschlag zeigte sich bei dieser Menge Zellen deutlich und die Ergebnisse waren gut zu beurteilen.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Überblick Ergebnisse Zytotoxizität

Es gibt viele verschiedene Studien zum Thema Zytotoxizität dentaler Kunststoffe, die zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Ata und Yavuzyilmaz 2009; Öztürk *et al.* 2011; Rose *et al.* 2000; Schendel *et al.* 1992; Hensten-Pettersen und Wictorin 1981; Akin *et al.* 2015). Die nicht einheitliche Studienlage ist damit zu erklären, dass viele Parameter in den einzelnen Studien sehr unterschiedlich sind (Chaves *et al.* 2012). In der vorliegenden Studie zeigten die Messergebnisse zur Zellviabilität für die beiden untersuchten Materialien in ihren gealterten und nicht gealterten Varianten geringe, nicht signifikante Unterschiede zu den reinen Zellproben und der Negativkontrolle (siehe Abb. 14 und Abb. 16, Tab. 4 und 10). Im Hauptversuch waren dennoch signifikante Unterschiede der Zytotoxizität der Probekörper erkennbar (siehe Tab. 8 und Tab. 9: Punkt Probekörper). Durch die paarweisen Vergleiche der Ergebnisse mittels Tukey Post-hoc-Test (siehe Tab. 4 und 10) stellte sich heraus, dass diese Signifikanz durch die Positivkontrolle, die nur im Hauptversuch untersucht worden war, verursacht wurde. Das unpolymerisierte Orthocryl® LC beeinflusste im Vergleich zu allen anderen Probekörpern, der reinen Zellprobe und der Negativkontrolle die Extinktion und somit die Zellviabilität signifikant. Im Gegensatz dazu wiesen die untersuchten Materialien im paarweisen Vergleich untereinander, zur Negativkontrolle (Glas) und zur reinen Zellprobe keine signifikanten Unterschiede auf.

Die ISO 10993-5 (2009) gibt für Zytotoxizitätstests mit MTT und XTT die Vorgabe, dass die Extinktion und somit auch die Zellviabilität mindestens 70 % des Ergebnisses der Negativkontrolle erreichen muss, damit ein Material als nicht zytotoxisch bewertet werden kann. Sinkt die Zellviabilität unter diesen Wert, ist der Prüfstoff als zytotoxisch einzustufen. Wendet man diese Vorgabe für den WST-8-Test der vorliegenden Studie an, ergibt sich die zur Errechnung des Prozentsatzes der Zellviabilität in Abb. 40 gezeigte Formel:

$$\frac{(\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion zellfreie Probe})}{(\text{Extinktion Negativkontrolle} - \text{Extinktion zellfreie Probe})} \times 100 = \text{Zellviabilität in \%}$$

Abb. 40: Formel zum Errechnen der Zellviabilität in %.

Die errechnete Zellviabilität für die untersuchten Probekörper Weitur® gealtert und nicht gealtert und Orthocryl® LC gealtert und nicht gealtert anhand der Mittelwerte ergibt: Bei GF1: W: 78,95 %, WA: 89,47 %, O: 100 %, OA: 97,37 %, bei L919: W: 100 %, WA: 100 %, O: 90 %, OA: 100 %. Somit ist nach ISO 10993-5 (2009) keiner der untersuchten, ausgehärteten Kunststoffe als zytotoxisch zu bewerten. Diese Aussage stützt sich allerdings in dieser Norm auf Interpretation des XTT- und MTT-Tests. Der in der vorliegenden Studie durchgeführte WST-8-Test ist sensitiver als der MTT-Test (Ginouves *et al.* 2014; Tomina-ga *et al.* 1999). Aufgrund der höheren Sensitivität ist damit zu rechnen, dass diese Kunststoffe auch im MTT- und XTT-Test als nicht zytotoxisch beurteilt worden wären.

Der Vergleich der Leerproben zur Negativkontrolle Glas zeigte keine signifikanten Unterschiede. Der Desinfektions- und Waschvorgang der Probekörper hatte somit keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der Glasprobekörper.

6.2.2 Vergleich der Zytotoxizität

Sowohl im Vor- als auch im Hauptversuch wurden keine signifikanten Unterschiede der Zytotoxizität der ausgearbeiteten Probekörper aus nicht gealtertem Orthocryl® LC, gealtertem Orthocryl® LC, nicht gealtertem Weitur® und gealtertem Weitur® festgestellt (Tab. 4 und Tab. 10). Melilli *et al.* (2009) verglichen in ihrer Studie ebenfalls ein Auto- und ein Photopolymerisat, wobei das Autopolymerisat signifikant zytotoxischer beurteilt wurde. Dem Photopolymerisat konnte hingegen eine exzellente Biokompatibilität bescheinigt werden. Weitur® zeigte im Vor- und Hauptversuch tendenziell insgesamt höhere Zytotoxizitäten als Orthocryl® LC. Wie in 6.2.1 beschrieben, liegt die Zellviabilität bei Weitur® mit 78,95% unter der von Orthocryl® LC. Dieser Unterschied ist nicht signifikant und steht daher im Widerspruch zu der These von Melilli *et al.* (2009). Da diese Autoren

zwei Kunststoffe anderer Hersteller untersuchten, ist ein direkter Vergleich der beiden Studien daher kritisch zu bewerten.

Sowohl Weitur® als auch Orthocryl® LC wurden im Anschluss an die Polymerisation und das Entfernen der Sauerstoffpolymerisationsschicht ausgearbeitet und poliert. Durch eine Politur wird die Sauerstoffinhibitionsschicht vollständig entfernt (Welker 2000). Schendel *et al.* (1992) beurteilten das Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht zur Reduktion der Zytotoxizität als besonders effektiv. Dadurch verlieren auch stark zytotoxisch wirkende Kunststoffe an Zytotoxizität (Rose *et al.* 2000). Das Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht und die Politur erwiesen sich schon in anderen Studien positiv in Bezug auf die Zellverträglichkeit (Retamoso *et al.* 2014; Trubiani *et al.* 2012). Die durchgeführten Maßnahmen zur Politur scheinen somit auch in der vorliegenden Studie die Zellverträglichkeit zu begünstigen. Auch *in vivo* konnte der Sauerstoffinhibitionsschicht kieferorthopädischer Werkstoffe schon eine schädigende Wirkung nachgewiesen werden (Schendel *et al.* 1994).

Der Vergleich zu nicht polierten Probekörpern ist in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt worden, sollte aber nach Interpretation der Ergebnisse in folgende Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau integriert werden. Hier könnten sich durch die höhere Zytotoxizität von UDMA ggf. Unterschiede in der Zytotoxizität der Materialien ergeben (Rose *et al.* 2000; Yoshii 1997).

6.2.3 Zytotoxizität des unpolymerisierten Orthocryl® LC

Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC wirkte signifikant zytotoxischer als gealterte und nicht gealterte Varianten von Weitur® und Orthocryl® LC. Die signifikant höhere Zytotoxizität bei Zellen, die nicht polymerisiertem Orthocryl® LC ausgesetzt waren, deckte sich auch mit dem lichtmikroskopischen Erscheinungsbild. Nach sechs Stunden waren bei beiden Zelllinien keine adhärenen oder lebenden Zellen mehr zu erkennen (Abb. 25 und 26).

Da sich die auspolymerisierten Probekörper nicht signifikant bezüglich ihrer Zytotoxizität unterschieden, ist ein Inhaltsstoff des noch nicht polymerisierten Orthocryl® LC für die Zytotoxizität verantwortlich gewesen. Dieser musste während der Polymerisation umgesetzt worden sein. Das unpolymerisierte Orthocryl® LC enthält das Matrixmonomer

UDMA, das *in vitro* stark zytotoxisch wirkt (Rose *et al.* 2000; Yoshii 1997; Geurtsen *et al.* 1998). Diese These wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt. Zu einem identischen Ergebnis kamen auch Retamoso *et al.* (2014) bei der Untersuchung eines UDMA-basierten dentalen Photopolymerisates. Neben UDMA könnten auch andere Bestandteile des unpolymerisierten Orthocryl® LC zytotoxische Effekte induziert haben (Geurtsen *et al.* 1998). Beispielsweise kann auch das zweite Matrixmonomer Polyethylenglycoldimethacrylat *in vitro* zytotoxisch wirken (Tamura *et al.* 2015). Anhand der vorliegenden Studie kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Inhaltsstoffe des unpolymerisierten Orthocryl® LCs für den zytotoxischen Effekt verantwortlich gewesen sind. Unabhängig davon, welche Inhaltsstoffe den zytotoxischen Effekt verursacht haben, sollte in Bezug auf die klinische Anwendung des Materials ein direkter Kontakt des unpolymerisierten Orthocryl® LC zu Haut oder Schleimhaut vermieden werden. Gerade bei sehr toxisch wirkenden Materialien besteht häufig eine Korrelation zwischen In-vitro-Untersuchung und Reaktion *in vivo* (Schmalz 1982).

Die errechnete Zellviabilität liegt für nicht polymerisiertes Orthocryl® LC mit GF1 bei 10,53 % und mit L929 sogar bei –10 %. Nicht polymerisiertes Orthocryl® LC ist somit auch laut ISO 10993-5 (2009) als zytotoxisch zu bewerten. Betrachtet man nun die Extinktion bei den einzelnen Zelllinien, reduzierte nicht polymerisiertes Orthocryl® LC die Zellviabilität bei GF1 und L929 zu jedem Messzeitpunkt besonders deutlich im Vergleich zu allen anderen Prüfkörpern, zur Negativkontrolle und der reinen Zellprobe (siehe Abb. 16). Die Extinktion war zum Teil sogar noch niedriger als bei der zellfreien Probe, was allerdings nicht signifikant war (siehe Tab. 10). Daher ist davon auszugehen, dass nicht polymerisiertes Orthocryl® LC keine direkte Interaktion mit der Testlösung CCK-8 eingegangen ist und somit die Extinktion der Testlösung nicht verfälscht hat.

6.2.4 Zytotoxizität von Orthocryl® LC

Polymerisiertes, ausgearbeitetes und poliertes Orthocryl® LC zeigte im Vor- und im Hauptversuch weder in gealterter noch in nicht gealterter Form signifikante Zytotoxizität (siehe Tab. 4 und 10). Dies deckte sich auch mit dem lichtmikroskopischen Erscheinungsbild (siehe Abb. 17–20). Zu einem übereinstimmenden Ergebnis kamen Akin *et al.* (2015)

bei der Untersuchung eines anderen Photopolymerisates, das ebenfalls UDMA-basiert war. Sie erhitzen das Material allerdings nach dem Aushärten für eine Stunde, was einen zusätzlichen Effekt auf die Zytotoxizität ausgeübt haben könnte (Bural *et al.* 2011). Melilli *et al.* (2009) erhitzen die Probekörper in ihrer Studie hingegen nicht. Genau wie in der vorliegenden Studie fanden sie keine signifikanten Unterschiede des Photopolymerisates zur Negativkontrolle Glas und die Zellviabilität lag bei fast 100 %. Sie bezeichneten das Photopolymerisat daher als biokompatibel. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie konnten Schendel *et al.* (1992) und Rose *et al.* (2000) bei dem von ihnen untersuchten Photopolymerisat Will-o-dont® eine geringe Zytotoxizität nachweisen. Nach Ausschluss von Sauerstoff bei der Polymerisation und anschließendem Abreiben mit einer speziellen Lösung zum Entfernen der Sauerstoffinhibitionsschicht hatte das Material keine zytotoxischen Effekte. In der vorliegenden Studie wurde zwar unter Sauerstoffkontakt polymerisiert, allerdings wurde die Sauerstoffinhibitionsschicht ebenfalls entfernt und es erfolgte anschließend eine Politur. Durch diese Maßnahmen kann eine sehr gute Zellverträglichkeit erreicht werden (Trubiani *et al.* 2012).

6.2.5 Zytotoxizität von Weitur®

Weitur® wirkte ebenfalls weder im gealterten noch im nicht gealterten Zustand signifikant zytotoxisch (siehe Tab. 4 und 10). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Schendel *et al.* (1992) bei der Untersuchung des Autopolymerisates Orthocryl®, welches ebenfalls nicht signifikant zytotoxisch wirkte. Auch Zentner *et al.* (1994) bewerteten einen von ihnen untersuchten autopolymerisierenden Kunststoff als nicht zytotoxisch. Allerdings evaluierten sie die Zytotoxizität nur anhand von lichtmikroskopischen Untersuchungen und konnten daher keine Aussage über die Stoffwechselaktivität der Zellen treffen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der genannten Studien konnten Rose *et al.* (2000) sehr wohl eine, wenn auch nach ihren Angaben geringe, Reduktion des Zellwachstums feststellen. Sie untersuchten allerdings andere kieferorthopädische Autopolymerisate, daher ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse auch in diesem Fall nicht aussagekräftig.

6.2.6 Effekt der Konditionierung

Schon eine Lagerung von dentalen Kunststoffen in Wasser reduziert die Restmonomerabgabe und somit auch die Zytotoxizität (Bural *et al.* 2011; Rose *et al.* 2000). Es wäre somit zu erwarten gewesen, dass die künstlich gealterten Probekörper im Vergleich zu den nicht gealterten Probekörpern eine geringere Zytotoxizität aufweisen würden. Bei Weitur® nicht gealtert fiel im Vergleich zu Weitur® gealtert die Extinktion und somit auch die Zellviabilität nach 24 Stunden im Vor- und Hauptversuch bei GF1 ab (siehe Abb. 14 und 16), was ggf. auf einen positiven Effekt der künstlichen Alterung, wie von Landayan *et al.* (2014) und Park *et al.* (2004) beschrieben, hindeuten könnte. Da insgesamt laut Tukey Post-hoc-Tests für den paarweisen Vergleich der Probekörper keine Signifikanzen vorlagen (siehe Tab. 4 und 10), kann in der vorliegenden Studie lediglich von einer Tendenz gesprochen werden. Landayan *et al.* (2014) stellten in ihrer Studie fest, dass der Effekt des Thermocyclings sehr materialabhängig ist. Wahrscheinlich konnte dadurch, dass alle polymerisierten Probekörper von vornherein schon nicht zytotoxisch wirkten, durch Thermocycling keine weitere Verbesserung der Zellverträglichkeit erreicht werden.

6.2.7 Viabilität der Zelllinien

Betrachtet man die Messergebnisse der unterschiedlichen Zelllinien, war die geringere Viabilität der L929-Mausfibroblasten im Vergleich zu GF1 auffällig (siehe Abb. 14–16 und 29). Der paarweise Vergleich der Zelllinien zeigte im Vorversuch nach sechs Stunden eine signifikant geringere Zellviabilität der Zelllinie L929 im Vergleich zu GF1. Nach 24 und 48 Stunden waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant (siehe Tab. 5–7). Im Hauptversuch war die Zellviabilität von L929 zu allen drei Messzeitpunkten signifikant geringer als bei GF1. Nach sechs und 24 Stunden war kein signifikanter Unterschied zu den zellfreien Proben zu erkennen. Erst nach 48 Stunden zeigte sich die Zellviabilität im Vergleich zu den zellfreien Proben signifikant erhöht (siehe Tab. 11–13).

Die nicht signifikanten Unterschiede von L929 zu den Leerproben könnten dahingehend interpretiert werden, dass alle Zellen zugrunde gegangen sein könnten. Die lichtmikrosko-

pischen Aufnahmen zeigten aber lebende Zellen (siehe Abb. 17, 19, 21, 23 und 27). Die signifikant erhöhte Zellviabilität im Vergleich zu den Leerproben nach 48 Stunden konnte nur zustande kommen, weil nach sechs und 24 Stunden noch lebende Zellen vorhanden gewesen waren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen der im Hauptversuch verwendeten L929-Passage einen weniger aktiven Stoffwechsel hatten. Es bestünde auch die Möglichkeit, dass insgesamt weniger lebende Zellen vorhanden gewesen waren. Eine Koppelung an eine zweite Testreihe, in der die Anzahl der überlebenden Zellen kontrolliert werden sollte, wird für folgende Studien ähnlichen Aufbaus als sinnvoll erachtet. In der vorliegenden Studie erfolgten regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sich eine große Anzahl von L929 in direkter Nachbarschaft zu den Probekörpern niedergelassen hatte. Im Gegensatz dazu waren bei der Positivkontrolle schon nach sechs Stunden sowohl bei GF1 als auch bei L929 keine Zellen mehr zu erkennen (siehe Abb. 25 und 26). Dies bestätigt ebenfalls die Theorie der weniger aktiven Zelllinie.

L929 reagieren empfindlicher als viele andere Zellen (Schendel *et al.* 1992; Hanks *et al.* 1981; Thonemann *et al.* 2002). Diese These wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt. Gerade nach sechs Stunden war die Zellviabilität von L929 im Vor- und Hauptversuch signifikant geringer gegenüber GF1. Diese Reduktion der Zellviabilität könnte aus einer hohen Empfindlichkeit von L929 resultieren. Möglicherweise wurden die Zellen durch die Arbeitsschritte des Auszählens und Aussäens in ihrer Viabilität eingeschränkt.

6.2.8 Effekt des Silikons

Zusätzlich zur Hauptfragestellung erfolgte die Beurteilung der Zytotoxizität des additionsvernetzten Silikons, mit dem die Probekörper in die Well-Platten eingeklebt worden waren. Es sollte sichergestellt werden, dass das Silikon die Ergebnisse der Zytotoxizität der Probekörper nicht beeinflusste. Da die Mittelwerte bei den Proben ohne Zellen zu jedem Zeitpunkt mit und ohne Silikon identisch waren, ist sichergestellt, dass das Silikon die Testsubstanz CCK8 und auch das Messergebnis des WST-8-Tests insgesamt nicht beeinflusste. Lichtmikroskopisch war zu erkennen, dass sich Zellen in direktem Kontakt zu dem

Silikon niedergelassen hatten (Abb. 19, 24 und 27). Die Messergebnisse der Zellproben mit und ohne Silikon zeigten weder im Vor- noch im Hauptversuch signifikante Unterschiede (siehe Tab. 3, 8 und 14). Die Extinktionen waren teilweise bei den Proben mit Silikon sogar minimal höher. Da das Silikon die Zellviabilität nicht signifikant beeinflusste, ist es zum Einkleben der Probekörper geeignet. Dies stimmt mit Untersuchungen von Ciapetti *et al.* (1998) zur Zytotoxizität von Silikon überein. In der Studie dieser Autoren wirkten additionsvernetzte Silikone auch nach längerem, direktem Zellkontakt nicht zytotoxisch.

6.2.9 Ergebnisse Rauheit

Die Probekörper wiesen mit bis zu $0,74 \pm 0,18 \mu\text{m}$ bei nicht gealtertem Weitur® bei dieser Studie eine verhältnismäßig hohe Rauheit auf (siehe Abb. 31). Vergleicht man dies mit den Ergebnissen vorheriger Studien, so liegen die Rauheitswerte deutlich über den Ergebnissen anderer Autoren (Al-Kheraif 2014; Alves *et al.* 2007; Bollen *et al.* 1997). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Probekörper in der vorliegenden Studie zum Ausarbeiten und Polieren nicht an eine Drehmaschine fixiert wurden. Das Ausarbeiten und der Poliervorgang erfolgten per Hand. Die Herstellung kieferorthopädischer Arbeiten im Zahntechniklabor sollte möglichst gut simuliert werden. Die Probekörper waren außerdem verhältnismäßig klein und ließen sich daher nur schwierig polieren. Aufgrund der Größe der Well-Platten des Zytotoxizitätstests, die ohnehin schon größer gewählt worden waren, war die Nutzung von größeren Probekörpern nicht möglich.

Beide Weitur®-Varianten waren signifikant rauer als gealtertes und nicht gealtertes Orthocryl® LC (Tab. 16). In einer Studie von Al-Kheraif (2014) waren Heißpolymerisate im Vergleich zu Photopolymerisaten tendenziell rauer, allerdings mit einer Differenz von $0,02 \mu\text{m}$ nicht signifikant. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können auch in Bezug auf die Rauheit durch die Materialien an sich erklärt werden. Es handelte sich nicht um die gleichen Kunststoffe und außerdem um ein Auto- statt einem Heißpolymerisat. Auch in der Politur per Hand kann wieder eine Ursache gefunden werden. Wie man auf den Abb. 32, 34, 36 und 38 erkennen kann, zeigte sich bei den topografischen Darstellungen aller untersuchten Probekörper eine Abflachung im peripheren Bereich. Diese sind wahrscheinlich dadurch entstanden, dass die Randbereiche stärker ausgearbeitet und poliert wurden als die

zentralen Bereiche. Dadurch ist auch zu erklären, dass bei nicht gealtertem Orthocryl® LC diese Abflachung nur an zwei Seiten erkennbar war. Zentral konnte an den massigen Poliermaschinen nur sehr schlecht poliert werden. Die topografischen Darstellungen nach Polynomfilterung zeigten bei allen Materialien eine ausgeprägte Rillenstruktur, die durch die Bearbeitungsrichtung beim Poliervorgang entstanden sein könnte (Abb. 33, 35, 37 und 39). Bei Weitur® gealtert und nicht gealtert sind ausgeprägtere Oberflächentiefen als bei beiden Orthocryl® LC-Probekörpern zu erkennen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wäre eine Versuchsdurchführung mit Erstellung einer größeren Anzahl an Topografien nötig. Die verhältnismäßig hohe Rauheit beider Weitur®-Varianten ist in Bezug auf den Patientenkomfort als ungünstig zu bewerten, da die meisten Patienten Unregelmäßigkeiten von intraoralen Oberflächen schon ab einem Wert von 0,25–0,5 µm wahrnehmen können (Jones *et al.* 2004).

Zum Effekt der künstlichen Alterung auf die Rauheit brachte die vorliegende Studie kein eindeutiges Ergebnis. Die nicht gealterten Weitur®-Probekörper zeigten sich signifikant rauer als die gealterten. Orthocryl® LC gealtert und nicht gealtert zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied (siehe Tab. 16). Das Autopolymerisat wurde in dieser Studie somit stärker durch die künstliche Alterung beeinflusst als das Photopolymerisat. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Weitur® vor der Konditionierung im Thermocycler deutlich rauer gewesen ist als Orthocryl® LC. So könnte der Effekt des Thermocyclers bei Weitur® stärker ausgefallen sein. Ayaz *et al.* (2015) konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen künstlich gealterten und nicht gealterten Probekörpern eines Prothesenkunststoffes aus PMMA feststellen. Auch bei Kompositen konnte nach künstlicher Alterung keine signifikante Veränderung der Oberflächenrauheit nachgewiesen werden (Tuncer *et al.* 2013). De Oliveira *et al.* (2014) beschrieben im Gegensatz dazu erhöhte Rauheit nach künstlicher Alterung. Allerdings wählten sie mit 20000 Zyklen eine deutlich stärkere Beanspruchung der Materialien, wodurch die abweichenden Ergebnisse zur vorliegenden Studie zu erklären wären.

6.2.10 Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zellviabilität

Zellen zeigen bei der Adhäsion auf Oberflächen eine von der Oberflächentopografie abhängige Orientierung (Weiss 1934). Gingivafibroblasten lagern sich bei einer Rillenstruktur längs der Rillen an (Brunette 1986). Dies geschieht auch bei Rillen, die deutlich tiefer sind als die Oberflächenrauheit in der vorliegenden Studie (Pfeiffer 2004). Betrachtet man die Topografien der hier untersuchten Probekörper nach Polynomfilterung, kann man ebenfalls eine deutliche Rillenstruktur erkennen (siehe Abb. 33, 35, 37 und 39). Diese Rillen oder Schleifspuren könnten durch die Bearbeitungsrichtung bei der manuellen Politur entstanden sein. In der zitierten Studie von Pfeiffer (2004) richteten sich die Zellen auch bei einer Rillentiefe von 2 µm nach diesen aus und wurden adhären. Somit scheint eine ausgeprägte Oberflächenstruktur eine Zelladhäsion nicht zu behindern. Geurtsen (2005) beschrieb die Oberflächenbeschaffenheit als einen Faktor, der den Restmonomergehalt des Werkstoffes beeinflusst. Da Restmonomere für Zytotoxizität *in vitro* verantwortlich sein können (Rose *et al.* 2000; Kedjarune *et al.* 1999), besteht die Möglichkeit, dass die Rauheit somit indirekt für zytotoxische Effekte verantwortlich ist. In der vorliegenden Studie konnten allerdings keine Zusammenhänge zwischen Rauheit und Zytotoxizität ermittelt werden (siehe Tab. 17). Auch die signifikant raueren Probekörper aus Weitur® zeigten im Vergleich zu Orthocryl® LC keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytotoxizität.

Die Oberflächenbeschaffenheiten von Kunststoffen können laut einer Studie von Trubiani *et al.* (2012) Zellen beeinflussen. Unpolierte Probekörper verursachten in der genannten Untersuchung neben einer Reduktion der Zellviabilität auch starke morphologische Veränderungen bei Gingivafibroblasten, welche bei polierten Probekörpern nicht festzustellen waren. Im Unterschied zu der Untersuchung von Trubiani *et al.* (2012) wurden in der vorliegenden Studie alle Probekörper auf die gleiche Art und Weise poliert. Es wurden keine unpolierten Probekörper in die Studie integriert, da die klinische Situation bei Anwendung der Materialien im Vordergrund stehen sollte und die Materialien in der Regel poliert in den Patientenmund eingebracht werden.

7 Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Studie war die Beurteilung und der Vergleich der Zytotoxizität der kieferorthopädischen Kunststoffe Weitur® und Orthocryl® LC. Zusätzlich wurde die Rauheit der Kunststoffe untersucht und mögliche Zusammenhänge zwischen der Rauheit und der Zytotoxizität beurteilt. Das Autopolymerisat Weitur® enthält im Gegensatz zum photopolymerisierenden Kunststoff Orthocryl® LC Methylmethacrylat und Dibenzoylperoxid. Orthocryl® LC basiert auf dem Monomer UDMA. In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 120 Probekörper hergestellt, nach Herstellerangaben ausgearbeitet und poliert. Um den täglichen Gebrauch und damit die Alterung der Werkstoffe zu simulieren, wurde die Hälfte der Probekörper beider Kunststoffe in einem Thermocycler künstlich gealtert.

Der Versuchsaufbau zur Zytotoxizität wurde mit den Zelllinien L929-Mausfibroblasten und GF1-Gingivafibroblasten durchgeführt. Die Probekörper wurden mit einem additionsvernetzten Silikon in 48-Well-Platten eingeklebt und anschließend 10000 Zellen pro Well ausgesät. Es erfolgte ein WST-8-Zytotoxizitätstest zur Beurteilung der Zellviabilität. Als Positivkontrolle kam nicht polymerisiertes Orthocryl® LC und als Negativkontrollen Glas und reine Zellproben zur Anwendung. Zusätzlich wurde das zum Festkleben verwendete Silikon separat auf zytotoxische Effekte untersucht. Der WST-8-Test wurde zu den Messzeitpunkten nach sechs, 24 und 48 Stunden durchgeführt und es erfolgten lichtmikroskopische Kontrollen der Zellen.

In der Untersuchung zeigte sich, dass die Probekörper beider Materialien, unabhängig von der Alterung, zu keinem Messzeitpunkt und bei keiner Zelllinie als signifikant zytotoxisch einzustufen waren. Auch der Vergleich untereinander zeigte keine signifikanten Unterschiede. Es fiel auf, dass die Positivkontrolle (nicht polymerisiertes Orthocryl® LC) schon nach kurzer Zeit signifikant zytotoxisch wirkte. Das zum Einkleben verwendete Silikon und die Negativkontrolle (Glas) reduzierten die Viabilität der Zellen nicht signifikant. Die Zelllinie L929 hatte im Vorversuch nach sechs Stunden und im Hauptversuch zu allen Messzeitpunkten im Vergleich zu GF1 eine signifikant geringere Zellviabilität. Bei der Rauheitsmessung war auffällig, dass beide Varianten des Werkstoffes Weitur® signifikant rauer waren als die Probekörper des Materials Orthocryl® LC. Künstliche Alterung verrin-

gerte die Rauheit bei Weitur® signifikant, bei Orthocryl® LC hingegen nicht signifikant. Es bestanden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Zytotoxizität und Rauheit in der vorliegenden Untersuchung.

8 Literaturverzeichnis

Aalto-Korte K, Alanko K, Kuuliala O, Jolanki R (2007): Methacrylate and acrylate allergy in dental personnel. *Contact Derm* 57, 324–330

Abuzar MA, Bellur S, Duong N, Kim BB, Lu P, Palfreyman N, Surendran D, Tran VT (2010): Evaluating surface roughness of a polyamide denture base material in comparison with poly (methyl methacrylate). *J Oral Sci* 52, 577–581

Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170, 211–224

Akin H, Tugut F, Polat ZA (2015): In vitro comparison of the cytotoxicity and water sorption of two different denture base systems. *J Prosthodont* 24, 152–155

Al Jabbari YS, Al Taweel SM, Al Rifaiy M, Alqahtani MQ, Koutsoukis T, Zinelis S (2014): Effects of surface treatment and artificial aging on the shear bond strength of orthodontic brackets bonded to four different provisional restorations. *Angle Orthod* 84, 649–655

Al-Kheraif AAA (2014): The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of heat-polymerized and visible light-polymerized acrylic denture base resins. *Saudi Dent J* 26, 56–62

Alves PVM, Lima Filho RM, Telles E, Bolognese A (2007): Surface roughness of acrylic resins after different curing and polishing techniques. *Angle Orthod* 77, 528–531

Ata SO, Yavuzylmaz H (2009): In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 91, 905–909

- Ayaz EA, Bağış B, Turgut S (2015): Effects of thermal cycling on surface roughness, hardness and flexural strength of polymethylmethacrylate and polyamide denture base resins. *J Appl Biomater Funct Mater* 13, e280-286
- Baker S, Brooks SC, Walker DM (1988): The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 67, 1295–1299
- Beckman KB, Ames BN (1997): Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633–19636
- Bereznowski Z (1994): Effect of methyl methacrylate on mitochondrial function and structure. *Int J Biochem* 26, 1119–1127
- Bereznowski Z (1995): In vivo assessment of methyl methacrylate metabolism and toxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 1311–1316
- Bereznowski Z (1997): Methacrylate uptake by isolated hepatocytes and perfused rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 675–679
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996): The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4, 14–19
- Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, Castro MF (2010): Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater* 26, e171-180
- Bijelic-Donova J, Garoushi S, Lassila LVJ, Vallittu PK (2015): Oxygen inhibition layer of composite resins: effects of layer thickness and surface layer treatment on the interlayer bond strength. *Eur J Oral Sci* 123, 53–60
- Bishara SE, Ostby AW, Laffoon JF, Warren J (2007): Shear bond strength comparison of two adhesive systems following thermocycling. A new self-etch primer and a resin-modified glass ionomer. *Angle Orthod* 77, 337–341
- Boeck G: *Kurzlehrbuch Chemie. 2., überarbeitete Auflage*; Thieme, Stuttgart 2008

- Boeckler AF, Morton D, Poser S, Dette K-E (2008): Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation. *Dent Mater* 24, 1602–1607
- Böhling HG, Borchard U, Drouin H (1977): Monomeric methylmethacrylate (MMA) acts on the desheathed myelinated nerve and on the node of Ranvier. *Arch Toxicol* 38, 307–314
- Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M (1997): Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 13, 258–269
- Bowen RL, Argentar H (1971): Amine Accelerators for Methacrylate Resin System. *J Dent Res* 50, 923–928
- Brunette DM (1986): Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 164, 11–26
- Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Bayraktar G (2011): Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci* 19, 306–312
- Caesar HH, Ernst S: *Die Nichtmetalle in der Zahntechnik: Zusammensetzung, chemisches und physikalisches Verhalten bei der Verarbeitung, Arbeitssicherheit und Gesundheitsschutz* (2). 4. Auflage; Neuer Merkur, München 1998
- Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET (2012): Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent* 107, 114–127
- Chaves CA, Vergani CE, Thomas D, Young A, Costa CA, Salih VM, Machado AL (2014): Biological effects of soft denture reline materials on L929 cells in vitro. *J Tissue Eng* 5, 1–8
- Chiu PP, McNamara JA, Franchi L (2005): A comparison of two intraoral molar distalization appliances: distal jet versus pendulum. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 128, 353–365

- Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A, Savioli F, Montanaro L (1998): Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. *J Biomed Mater Res* 42, 485–490
- Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, Skaug N (2000): The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 58, 217–228
- Combe EC, Dermann K: *Zahnärztliche Werkstoffe: Zusammensetzung, Verarbeitung, Anwendung*. Hanser, München 1984
- Coordes SL: Vergleich verschiedener Präparate zur Prävention von Demineralisationen im Bracketumfeld. *Med. Diss. Berlin* 2013
- Craig RG, Powers JM, Wataha JC: *Zahnärztliche Werkstoffe: Eigenschaften und Verarbeitung*. Elsevier Urban & Fischer, München 2006
- Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T (1994): Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthop Scand* 65, 147–153
- Dawjee SM, Khan MI, Hlongwa P (2009): The repositioning Nance appliance: a fixed functional appliance and case report. *J Maxillofac Oral Surg* 8, 68–73
- de Clerck JP (1987): Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent* 57, 650–658
- de Fries R, Mitsuhashi M (1995): Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 9, 89–95
- de Oliveira AL, Giro EM, Garcia PP, Campos JÁ, Phark JH, Duarte S (2014): Roughness and morphology of composites: influence of type of material, fluoride solution, and time. *Microsc Microanal* 20, 1365–1372

Dejobert Y, Piette F, Thomas P (2002): Contact dermatitis from benzoyl peroxide in dental prostheses. *Contact Derm* 46, 177–178

Dentaurum (2016): EG Sicherheitsdatenblatt: Orthocryl LC / Orthocryl LC Aufbisspaste, transparent, Materialnummer: 160-401. www.dentaurum.de/files/160-401-10.pdf, abgerufen am: 30.11.2016

Diedrich P: Bräcket-Adhäsivtechnik. In: Diedrich P, Berg R, Haunfelder D (Hrsg.): Therapie (Praxis der Zahnheilkunde Kieferorthopädie 2). Studienausgabe der 4. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2000, 169–188

DIN 53508 - Deutsche Norm: Prüfung von Kautschuk und Elastomeren - künstliche Alterung 2000

Dojindo EU GmbH (2016a): Gebrauchsanleitung Cell-Counting-Kit-8. http://www.dojindo.eu.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf, abgerufen am: 30.11.2016

Dojindo EU GmbH (2016b): Produktinformation Cell-Counting-Kit-8. <http://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>, abgerufen am: 30.11.2016

Doori DA, Huggett R, Bates JF, Brooks SC (1988): A comparison of denture base acrylic resins polymerised by microwave irradiation and by conventional water bath curing systems. *Dent Mater* 4, 25–32

dos Santos RL, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV, Ruellas ACO (2012): Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of glass ionomer cements reinforced with resin. *Eur J Orthod* 34, 362–366

dos Santos RL, Pithon MM, Carvalho FG, Ramos AA, Romanos MTV (2013): Mechanical and biological properties of acrylic resins manipulated and polished by different methods. *Braz Dent J* 24, 492–497

Earle WR, Voegtlin C (1940): A further study of the mode of action of methylcholanthrene on normal tissue cultures. *Public Health Rep* 55, 303–322

- Ebrahimi Saravi M, Vojdani M, Bahrani F (2012): Evaluation of cellular toxicity of three denture base acrylic resins. *J Dent (Tehran)* 9, 180–188
- Fakhouri J, Sarkis R, Chababi-Atallah M, Aftimos G (2008): Toxic effects of methyl methacrylate monomer on male genital tissues. In vitro study in rats. *J Med Liban* 56, 22–26
- Fang X, Jiang Y, Feng L, Chen H, Zhen C, Ding M, Wang X (2013): Blockade of PI3K/AKT pathway enhances sensitivity of Raji cells to chemotherapy through down-regulation of HSP70. *Cancer Cell Int* 13, 48
- Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J (1985): Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol* 30, 609–613
- Ferracane JL (1994): Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* 21, 441–452
- Floyd CJE, Dickens SH (2006): Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater* 22, 1143–1149
- Frank J, Pompella A, Biesalski H (2000): Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med* 29, 1096–1105
- Garza EG, Wadajkar A, Ahn C, Zhu Q, Opperman LA, Bellinger LL, Nguyen KT, Komabayashi T (2012): Cytotoxicity evaluation of methacrylate-based resins for clinical endodontics in vitro. *J Oral Sci* 54, 213–217
- Gebhart M, Geier J (1996): Evaluation of patch test results with denture material series. *Contact Derm* 34, 191–195
- Geurtsen W: Polymethylmethacrylat-Kunststoffe. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (Hrsg.): Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Elsevier Urban & Fischer, München 2005, 245–262

- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998): Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41, 474–480
- Ginouves M, Carme B, Couppie P, Prevot G (2014): Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *J Clin Microbiol* 52, 2131–2138
- Giunta J, Zablotsky N (1976): Allergic stomatitis caused by self-polymerizing resin. *Oral Surg Oral Med Pathol* 41, 631–637
- Glamann J, Hansen AJ (2006): Dynamic detection of natural killer cell-mediated cytotoxicity and cell adhesion by electrical impedance measurements. *Assay Drug Dev Technol* 4, 555–563
- Goiato MC, Freitas E, dos Santos D, de Medeiros R, Sonogo M (2015): Acrylic Resin Cytotoxicity for Denture Base--Literature Review. *Adv Clin Exp Med* 24, 679–686
- Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzato SMD, Menezes LM (2006): Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129, 431–435
- Gonçalves TS, Spohr AM, Souza RM de, Macedo de Menezes L (2008): Surface roughness of auto polymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods: an in situ evaluation. *Angle Orthod* 78, 931–934
- Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK (2010): Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dent Res J (Isfahan)* 7, 82–87
- Groß A (1979): Kunststoffe in der Zahnmedizin. *Chem unserer Z* 13, 142–146
- Gstraunthaler G, Lindl T: Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2013
- Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J (1965): Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *Pharm Sci* 54, 1545–1547

- Hanks CT, Anderson M, Craig RG (1981): Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. *J Oral Pathol* 10, 101–112
- Hasund A, Rudzki-Janson I, Bingler P: Edgewise-Technik: Standard-Edgewise und Straight-wire-System. In: Diedrich P, Berg R, Haunfelder D (Hrsg.): Therapie (Praxis der Zahnheilkunde Kieferorthopädie 2). Studienausgabe der 4. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2000, 189–220
- Haustein UF, Tegetmeyer L, Ziegler V (1985): Allergic and irritant potential of benzoyl peroxide. *Contact Derm* 13, 252–257
- He X, Li L, Su H, Zhou D, Song H, Wang L, Jiang X (2015): Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone)-and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery. *Int J Nanomedicine* 10, 1791–1804
- Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. 2. Auflage; Urban & Fischer, München 1999
- Hensten-Pettersen A, Wictorin L (1981): The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 39, 101–106
- Hofmann K: Untersuchungen der Zytotoxizität von zahnärztlichen Werkstoffen mit Hilfe des XTT-Tetrazoliumreduktionstests EZ4U an der humanen Zelllinie U937. Med. Diss. Jena 2003
- Hulsart-Billström G, Dawson JI, Hofmann S, Müller R, Stoddart MJ, Alini M, Redl H, El Haj A, Brown R, Salih V et al. (2016): A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur Cell Mater* 31, 312–322
- Inoue K, Hayashi I (1982): Residual monomer (Bis-GMA) of composite resins. *J Oral Rehabil* 9, 493–497
- ISO 10993-12: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien; International Organization for Standardization (ISO) 2009a

ISO 10993-5: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität; International Organization for Standardization (ISO) 2009b

Janda R: Kunststoffverbundsysteme: Grundlagen, Anwendung, Verarbeitung, Prüfung. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990

Janda R: Chemie und Physik zahnärztlicher Kunststoffe; In: Eichner K, Kappert HF (Hrsg.): Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung: Grundlagen und Verarbeitung. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2000, 173–210

Jiao Y, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Liu Q, Liu Y, Song Q, Yu F, Yu H (2016): N-Acetyl Cysteine Depletes Reactive Oxygen Species and Prevents Dental Monomer-Induced Intrinsic Mitochondrial Apoptosis In Vitro in Human Dental Pulp Cells. *PLoS One* 11, e0147858

Johannes Weithas KG (2016): Sicherheitsdatenblatt Weitur® KFO-St. http://www.weithas.de/documents/pdfs/kfo_st_sicherheitsdatenblatt.pdf, abgerufen am: 30.11.2016

Jones CS, Billington RW, Pearson GJ (2004): The in vivo perception of roughness of restorations. *Br Dent J* 196, 42-45

Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE (2003): Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent* 90, 190–193

Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ (2007): Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology* 24, 52–57

Kaaber S, Thulin H, Nielsen E (1979): Skin sensitivity to denture base materials in the burning mouth syndrome. *Contact Derm* 5, 90–96

Kanerva L, Estlander T, Jolanki R, Tarvainen K (1993): Occupational allergic contact dermatitis caused by exposure to acrylates during work with dental prostheses. *Contact Derm* 28, 268–275

Kedjarune U, Charoenworraluk N, Koontongkaew S (1999): Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 44, 25–30

Khanna A, Bhatnagar VM, Karani JT, Madria K, Mistry S (2015): A Comparative Evaluation of Shear Bond Strength Between Two Commercially Available Heat Cured Resilient Liners and Denture Base Resin with Different Surface Treatments. *J Clin Diagn Res* 9, 30–34

Kim K, Son KM, Kwon JH, Lim B-S, Yang H-C (2013): The effects of restorative composite resins on the cytotoxicity of dentine bonding agents. *Dent Mater J* 32, 709–717

Koch WH (1997): GZM-Dental-Produkte Kommission: Interview des Vorsitzenden der Kommission Dr. med. dent. W. H. Koch mit dem Referatsleiter für "Medizinprodukte und Normung" im Bundesministerium für Gesundheit Dr. rer. nat. Gert H. Schorn. *Thuring Zahnaerztebl* 5, 191–192

Kopperud HM, Kleven IS, Wellendorf H (2011): Identification and quantification of leachable substances from polymer-based orthodontic base-plate materials. *Eur J Orthod* 33, 26–31

Kramp B, Graumüller S (2004): Zungenbrennen - Diagnostik und Therapie. *Laryngo Rhino Otol* 83, 249–262

Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H (2013): A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 34, 4555–4563

Kwon JH, Park HC, Zhu T, Yang H-C (2015): Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. *Biomater Res* 19, 8

Lal J, Green R (1955): Effect of amine accelerators on the polymerization of methyl methacrylate with benzoyl peroxide. *J Polym Sci* 12, 403–409

Landayan JIA, Manaloto ACF, Lee J-Y, Shin S-W (2014): Effect of aging on tear strength and cytotoxicity of soft denture lining materials; *in vitro*. *J Adv Prosthodont* 6, 115–120

- Langley G, Evans T, Holgate ST, Jones A (2007): Replacing animal experiments: choices, chances and challenges. *Bioessays* 29, 918–926
- Lee DH, Lim B-S, Lee Y-K, Ahn S-J, Yang H-C (2006): Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater* 22, 1086–1092
- Lewis EA, Ogle RE, Sorensen SE, Zysik DA (1988): Clinical and laboratory evaluation of visible light-cured denture base resins and their application to orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 94, 207–215
- Lietz T, Schäfer R, Stolp K, Blankenstein F (2015): Kunststoffe für herausnehmbare kieferorthopädische Geräte - Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. *Quintessenz* 29, 47–60
- Lindström M, Alanko K, Keskinen H, Kanerva L (2002): Dentist's occupational asthma, rhinoconjunctivitis, and allergic contact dermatitis from methacrylates. *Allergy* 57, 543–545
- Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D (2002): Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol In Vitro* 16, 63–69
- Mainwaring G, Foster JR, Lund V, Green T (2001): Methyl methacrylate toxicity in rat nasal epithelium: studies of the mechanism of action and comparisons between species. *Toxicology* 158, 109–118
- Marino R, Capaccio P, Pignataro L, Spadari F (2009): Burning mouth syndrome: the role of contact hypersensitivity. *Oral Dis* 15, 255–258
- Marinova Z, Walitza S, Grunblatt E (2014): Real-time impedance-based cell analyzer as a tool to delineate molecular pathways involved in neurotoxicity and neuroprotection in a neuronal cell line. *J Vis Exp*, e51748
- Marxkors R, Meiners H: Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde. 5. Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2005

- Melilli D, Currò G, Perna AM, Cassaro A (2009): Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol* 58, 425–434
- Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE (2008): Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. *Dent Mater* 24, 1201–1206
- Mikai M, Koike M, Fujii H (2006): Quantitative analysis of allergenic ingredients in eluate extracted from used denture base resin. *J Oral Rehabil* 33, 216–220
- Mikov I, Turkalj I, Jovanović M (2011): Occupational contact allergic dermatitis in dentistry. *Vojnosanit Pregl* 68, 523–525
- Moharamzadeh K, Brook IM, van Noort R (2009): Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials* 2, 514–548
- Mortimer CE, Müller U, Beck J: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. 11. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63
- MPG (2015): *Medizinproduktegesetz: In der Fassung der Bekanntmachung vom 07.08.2002 (BGB1 S. 3146), zuletzt geändert durch Artikel 278 der Verordnung vom 31.08.2015 (BGB1 S. 1474)*
- Ni H, Zhao W, Kong X, Li H, Ouyang J (2014): NF-kappa B modulation is involved in celastrol induced human multiple myeloma cell apoptosis. *PloS One* 9, 553–558
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421–5426
- Oguz S, Mutluay MM, Dogan OM, Bek B (2007): Effect of thermocycling on tensile strength and tear resistance of four soft denture liners. *Dent Mater J* 26, 296–302

- Oishi T, Itamochi H, Kudoh A, Nonaka M, Kato M, Nishimura M, Oumi N, Sato S, Naniwa J, Sato S et al. (2014): The PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 reduces the growth of ovarian clear cell carcinoma. *Oncol Rep* 32, 553–558
- Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvik Kleven IJ (1988): Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res* 67, 1289–1294
- Öztürk F, Malkoc S, Ersöz M, Hakki SS, Bozkurt BS (2011): Real-time cell analysis of the cytotoxicity of the components of orthodontic acrylic materials on gingival fibroblasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 140, 243–249
- Park S-K, Lee Y-K, Lim B-S, Kim C-W (2004): Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *J Oral Rehabil* 31, 717–724
- Park Y-J, Chae K-H, Rawls HR (1999): Development of a new photoinitiation system for dental light-cure composite resins. *Dent Mater* 15, 120–127
- Paul J (1959): Environmental influences on the metabolism and composition of cultured cells. *J Exp Zool* 142, 475–505
- Peebles DJ, Ellis RH, Stride SDK, Simpson BRJ (1972): Cardiovascular effects of methylmethacrylate cement. *Br Med J* 1, 349–351
- Pfeiffer F: Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Gingiva-Fibroblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen. Med. Diss. Tübingen 2004
- Pfetzner N: Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen. Med. Diss. Würzburg 2011
- Prudil M: Einfluss der Füllkörper von Kompositmaterialien auf die initiale bakterielle Adhäsion. Med. Diss. Regensburg 2010
- Quast D, Viohl J: Chemische Zusammensetzung. In: Viohl J, Dermann K, Quast D, Venz S (Hrsg.): *Die Chemie zahnärztlicher Füllungskunststoffe*. Hanser, München 1986, 1–48
- Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD (1998): Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 26, 577–583

Reichl F-X, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, Folwaczny M, Glas J, Hickel R (2006): Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 80, 370–377

Restaurationsmaterialien in der Zahnheilkunde. In: Das Dental-Vademekum 1995. Ein Konsenspapier des Bundesministeriums für Gesundheit, Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte, der Bundeszahnärztekammer, Kassenzahnärztlichen Bundesvereinigung, Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung. 5. Ausgabe. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 1997, 1093-1094

Retamoso LB, da Cunha TMA, Pithon MM, dos Santos RL, Martins FO, Romanos MTV, Tanaka OM (2014): In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. *Dental Press J Orthod* 19, 66–70

Richtlinie 93/42/EWG (2007): Richtlinie 93/42/EMG des Rates vom 14. Juni 1993 über Medizinprodukte; zuletzt geändert durch Richtlinie 2007/47/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. September 2007

Rick W: Klinische Chemie und Mikroskopie: Eine Einführung. 4. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1976

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 142, 257–265

Rojas-Alcayaga G, Carrasco-Labra A, Danús P, Guzmán M-A, Morales-Bozo I, Urzúa B, Ortega-Pinto A (2012): Determination of susceptibility to sensitization to dental materials in atopic and non-atopic patients. *Med Oral Patl Oral Cir Bucal* 17, 320–324

Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF (2000): Beitrag zur biologischen Beurteilung kieferorthopädischer Kunststoffe. *Fortschr Kieferorthop* 61, 246–257

Rosenbluth SA, Weddingtin GR, Guess WL, Autian J (1965): Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. *J Pharm Sci* 54, 156–159

- Rossiwall B, Newesely H, Bartels R (1984): Verarbeitung und Bewertung von KFO-Autopolymerisaten. *Fortschr Kieferorthop* 45, 403–413
- Ruyter IE (1980): Release of formaldehyde from denture base polymers. *Odontol Scand* 39, 17–27
- Ruyter IE, Sjøvik IJ (1981): Composition of Dental Resin and Composite Materials. *Acta Odontol Scand* 39, 133–146
- Rzanny A, Göbel R, Küpper H (2007): Moderne Verblendkomposite - ein werkstoffkundlicher Vergleich. *Dtsch Zahnärztl Z* 62, 733
- Sadoh DR, Sharief MK, Howard RS (1999): Occupational exposure to methyl methacrylate monomer induces generalised neuropathy in a dental technician. *Br Dent J* 186, 380–381
- Schäfer K, Ludwig B, Meyer-Gutknecht H, Schott TC (2015): Quantifying patient adherence during active orthodontic treatment with removable appliances using microelectronic wear-time documentation. *Eur J Orthod* 37, 73–80
- Schendel KU, Lenhardt M, Fusenig NE, Komposch G (1992): Testung der Toxizität von in der Kieferorthopädie verwendeten Kunststoffen. *Fortschr Kieferorthop* 53, 263–272
- Schendel KU, Erdinger L, Komposch G, Sonntag HG (1994): Untersuchung kieferorthopädischer Materialien im HET-CAM-Test auf schleimhautreizende Wirkung. *Fortschr Kieferorthop* 55, 28–35
- Schendel KU, Erdinger L, Komposch G, Sonntag HG (1995): Neonfarbene Kunststoffe für kieferorthopädische Apparaturen. Untersuchungen zur Biokompatibilität. *Fortschr Kieferorthop* 56, 41–48
- Schmalz G: Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien: Möglichkeiten einer standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Thieme, Stuttgart 1981
- Schmalz G (1982): Korrelationsanalysen zwischen Zellkulturen und Tierversuch. *Dtsch Zahnärztl Z* 37, 184–186

- Schmalz G: Prüfung der Biokompatibilität. In: Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (Hrsg.): Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Elsevier Urban & Fischer, München 2005, 13–43
- Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller KA, Schweikl H (1997): Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci* 105, 86–91
- Schmitz S: Der Experimentator: Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2011
- Scholz WK (1996): Cell Adhesion and Growth on Coated or Modified Glass or Plastic Surfaces. *Mol Biol Cell* 7, 1411–1424
- Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006): Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 85, 870–877
- Schweska-Polly R (2004): Fortschritte in der gelenkbezüglichen kieferorthopädisch-kieferchirurgischen Therapie. *Inf Orthod Kieferorthop* 36, 205–218
- Seppäläinen AM, Rajaniemi R (1984): Local neurotoxicity of methyl methacrylate among dental technicians. *Am J Ind Med* 5, 471–477
- Serra G, de Morais LS, Elias CN (2013): Surface morphology changes of acrylic resins during finishing and polishing phases. *Dental Press J Orthod* 18, 26–30
- Shawkat ES, Shortall AC, Addison O, Palin WM (2009): Oxygen inhibition and incremental layer bond strengths of resin composites. *Dent Mater* 25, 1338–1346
- Shintani H, Tsuchiya T, Hata Y, Nakamura A (1993): Solid phase extraction and HPLC analysis of toxic components eluted from methyl methacrylate dental materials. *J Anal Toxicol* 17, 73–78
- Singh RD, Gautam R, Siddhartha R, Singh BP, Chand P, Sharma VP, Jurel SK (2013): High performance liquid chromatographic determination of residual monomer released from heat-cured acrylic resin. An in vivo study. *J Prosthodont* 22, 358–361

- Stafford GD, Brooks SC (1985): The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. *Dent Mater* 1, 135–138
- Tamura A, Fukumoto I, Yui N, Matsumura M, Miura H (2015): Increasing the repeating units of ethylene glycol-based dimethacrylates directed toward reduced oxidative stress and co-stimulatory factors expression in human monocytic cells. *J Biomed Mater Res A* 103, 1060–1066
- Tanaka J, Hashimoto T, Stansbury JW, Antonucci JM, Suzuki K (2001): Polymer Properties on Resins composed of UDMA and Methacrylates with the Carboxyl Group. *Dent Mater* 20, 206–215
- Tanoue N, Nagano K, Matsumura H (2005): Use of a light-polymerized composite removable partial denture base for a patient hypersensitive to poly(methyl methacrylate), polysulfone, and polycarbonate: a clinical report. *J Prosthet Dent* 93, 17–20
- Tansy MF, Martin JS, Benhaim S, Landin WE, Kendall FM (1977): GI motor inhibition associated with acute exposure to methyl methacrylate vapor. *J Pharm Sci* 66, 613–619
- Tay LY, Herrera DR, Quishida CCC, Carlos IZ, Jorge JH (2012): Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology* 29, 275–280
- Thomas S, Padmanabhan TV (2009): Methyl methacrylate permeability of dental and industrial gloves. *N Y State Dent J* 75, 40–42
- Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H (2002): Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18, 318–323
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K (1999): A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun* 36, 47–50
- Tränkmann J: Behandlung mit Plattenapparaturen. In: Diedrich P, Berg R, Haunfelder D (Hrsg.): *Therapie (Praxis der Zahnheilkunde Kieferorthopädie 2)*. Studienausgabe der 4. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2000, 135–156

- Trubiani O, Toniato E, Di Iorio D, Diomedede F, Merciaro I, D'Arcangelo C, Caputi S (2012): Morphological analysis and interleukin release in human gingival fibroblasts seeded on different denture base acrylic resins. *Int J Immunopathol Pharmacol* 25, 637–643
- Tschernitscheka H, Woltera S, Körner M (1998): Allergien auf Zahnersatzmaterialien. *Occup Environ* 46, 244–248
- Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N (1993): Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent* 21, 240–243
- Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N (1994): Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 71, 618–624
- Tuncer S, Demirci M, Tiryaki M, Unlü N, Uysal Ö (2013): The effect of a modeling resin and thermocycling on the surface hardness, roughness, and color of different resin composites. *J Esthet Restor Dent* 25, 404–419
- Urtasun N, Vidal-Pla A, Pérez-Torras S, Mazo A (2015): Human pancreatic cancer stem cells are sensitive to dual inhibition of IGF-IR and ErbB receptors. *BMC Cancer* 15, 223
- Vallittu PK (1999): Unpolymerized surface layer of autopolymerizing polymethyl methacrylate resin. *J Oral Rehabil* 26, 208–212
- Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S (1998): Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci* 106, 588–593
- van Loon LA, Bos JD, Davidson CL (1992): Clinical evaluation of fifty-six patients referred with symptoms tentatively related to allergic contact stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 74, 572–575
- Volta M, Hummel H, Mattern J (1977): Übereinstimmung von Zytostatikaeffekten in vivo und im Kurzzeittest (in vitro) bei der Leukämie L 1210. *Blut* 35, 65–74

- Weiss PA (1934): In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J Exp Zool* 68, 393–448
- Welker D: Prothesenkunststoffe. In: Meiners H, Lehmann KM (Hrsg.): *Klinische Materialkunde für Zahnärzte*. Hanser, München 1998, 249–277
- Welker D: Prothesenkunststoffe. In: Eichner K, Kappert HF (Hrsg.): *Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung: Grundlagen und Verarbeitung*, 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2000, 211–250
- Welle A, Gottwald E, Weibezahn KF (2002): Patterned polymer surfaces for cell culture applications. *Biomed Tech* 47, 401–403
- Wiedel A-P, Bondemark L (2015): Fixed versus removable orthodontic appliances to correct anterior crossbite in the mixed dentition - a randomized controlled trial. *Eur J Orthod* 37, 123–127
- Winkler C, Schäfer L, Felthaus O, Allerdings J, Hahnel S, Behr M, Bürgers R (2014): The bacterial adhesion on and the cytotoxicity of various dental cements used for implant-supported fixed restorations. *Acta Odontol Scand* 72, 241–250
- Wirtz U, Diedrich P: Kieferorthopädische Technik. In: Diedrich P, Haunfelder D (Hrsg.): *Spezifische kieferorthopädische Fragestellungen und interdisziplinäre Aufgaben (Praxis der Zahnheilkunde Kieferorthopädie 3)*. Studienausgabe der 4. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2002, 267–293
- Witt E: Funktionskieferorthopädie. In: Diedrich P, Berg R, Haunfelder D (Hrsg.): *Therapie (Praxis der Zahnheilkunde Kieferorthopädie 2)*. Studienausgabe der 4. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2000, 117–133
- Witt E, Bartsch A, Sahm G (1992): Tragezeitverordnungen bei herausnehmbaren Geräten - Ergebnisse einer Umfrage. *Fortschr Kieferorthop* 53, 124–130
- Witt E, Palla S (2002): Burning mouth. *Schmerz* 16, 389–394

Yamauchi M, Yamamoto K, Wakabayashi M, Kawano J (1990): In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dent Mater J* 9, 19–24

Yoshii E (1997): Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37, 517–524

Zeeck A, Grond S, Papastavrou I, Zeeck SC: *Chemie für Mediziner*. 8. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2014

Zentner A, Sergl HG, Kretschmer A (1994): Eine In-vitro-Untersuchung zweier in der Kieferorthopädie verwendeter Kunststoffe auf Zelltoxizität. *Fortschr Kieferorthop* 55, 311–318

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. dent. Ralf Bürgers für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und kompetente Betreuung.

Prof. Dr. med. dent. Nikolaus Gersdorff danke ich für die gute Betreuung in den Anfangszeiten meiner Arbeit. Genauso danke ich Herrn Zahnarzt Torsten Wassmann für die Einarbeitung in die Methode und die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung.

Dem Zelllabor der AG Orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge möchte ich für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung dieser Studie danken, besonderer Dank gilt hierbei Frau Andrea Bernhard und Frau Christa Bode.

Bei der Firma Mahr in Göttingen möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit der Rauheitsmessungen an ihren Geräten und in ihren Räumlichkeiten danken.