

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für  
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Schubert)

und dem Institut für Umwelttoxikologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. H. Foth)

Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als potentielle Knochenklebstoffe  
in der Kiefer- und Gesichtschirurgie -  
eine In-vitro-Untersuchung zur Zelltoxizität

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christian Heinzelmann  
geboren am 31.07.1980 in Halle/Saale

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert (Halle/Saale)  
2. Prof. Dr. Gisela Degen (Dortmund)  
3. Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hans Florian Zeilhofer (Basel/Schweiz)

verteidigt am: 14.09.2010

Meinen Eltern

**Einleitung:** Seit mehr als drei Jahrzehnten sind metallische Osteosynthesematerialien in der Kiefer-Gesichtschirurgie etabliert. Trotzdem existieren gerade bei dünnen oder wachsenden Knochenstrukturen Indikationsbeschränkungen. Filigrane Knochenfragmente durch eine chirurgische Knochenklebung zu verbinden, könnte im Sinne eines minimal invasiven Vorgehens eine Alternative zur Plattenosteosynthese in der MKG-Chirurgie darstellen.

**Zielstellung:** Im Zentrum der Arbeit standen experimentelle Untersuchungen zur Toxizität von ausgewählten Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten an einer Osteoblasten-explantatkultur aus dem Kieferbereich in vitro. Es sollte geprüft werden, ob diese Materialien aus biologischer Sicht als Knochenklebstoffe eingesetzt werden können.

**Material und Methode:** Getestet wurden die Klebstoffe Excite, Clearfil New Bond, Xeno III, Histoacryl und Cyano Veneer, weil sie das Spektrum gebräuchlicher Materialien abdecken und zudem durch unterschiedliche Reaktionen aktiviert werden. In Anlehnung an die europäische Norm zur Testung auf In-vitro-Zytotoxizität von Medizinprodukten (EN ISO 10993-5), wurde die Zellverträglichkeit der potentiellen Knochenklebstoffe auf die primäre humane Osteoblastenkultur bei direkter und indirekter Wirkung mittels Resazurin- und MTT-Test geprüft. Licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen sollten morphologische Veränderungen der Osteoblasten sichtbar machen. Spezifische Tests zur Gentoxizität (PARP-Assay) und Apoptoseinduktion (AnnexinV-Assay) erbrachten Einsichten zu Ausmaß und Mechanismen der Zellschädigung.

**Ergebnisse:** Alle getesteten Klebstoffe wirkten zytotoxisch auf die Osteoblasten. Sie beeinträchtigen den Zellstoffwechsel, indem sie die Aktivität von Dehydrogenasen senkten, die Zellatmung in den Mitochondrien störten und die Zellmembran schädigten. Außerdem hemmten die Testsubstanzen das Zellwachstum, verhinderten eine Zelladhäsion und führten zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Sie schädigten die DNA, so dass Doppelstrangbrüche entstanden und die Zellen eine Apoptose bzw. Nekrose einleiteten. Es konnten zeit- und konzentrationsabhängige toxische Effekte nachgewiesen werden. Die Cyanoacrylate zeigten sich weniger zellschädigend als die Dentinhaftvermittler. Das Ausmaß der Toxizität variierte beträchtlich in Abhängigkeit vom Klebstofftyp, von der Konzentration der Testsubstanzen und ihren Reaktionsprodukten und von der Kontaktzeit der Klebstoffe mit dem Kulturmedium.

**Schlussfolgerung:** Für die Toxizität der Klebstoffe sind vor allem lösliche Bestandteile wie Restmonomere und Degradationsprodukte verantwortlich, die zu einem oxidativen Zellstress führen. Die Klebstoffe Histoacryl, Cyano Veneer und Excite sind aus toxikologischer Sicht als Knochenklebstoffe im Kiefer-Gesichtsbereich am ehesten geeignet. Es sollte allerdings auf geringe Materialmengen und eine ausreichend lange Polymerisationszeit geachtet werden.

**Bibliographische Angaben:** Heinzlmann, Christian: Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als potentielle Knochenklebstoffe in der Kiefer- und Gesichtschirurgie - eine In-vitro-Untersuchung zur Zelltoxizität. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., Seiten 80, 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zielstellung.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>6</b>
3.1	Kultivierung von Osteoblasten.....	6
3.1.1	Anlage einer Explantatkultur aus dem Kieferbereich.....	6
3.1.2	Trypsinieren und Passagieren der Zellen.....	8
3.1.3	Nachweis der Alkalischen Phosphatase.....	8
3.2	Untersuchte potentiellen Knochenklebstoffe.....	9
3.2.1	Dentinhaftvermittler.....	10
3.2.2	Cyanoacrylate.....	11
3.3	Methodik - methodisches Vorgehen.....	11
3.4	Methodik: Direkte Wirkung – Resazurin-Assay.....	14
3.4.1	Methodische Grundlagen Resazurin-Assay.....	14
3.4.2	Versuchsablauf: Direkte Wirkung.....	15
3.4.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	17
3.5	Methodik: Indirekte Wirkung – MTT-Test.....	18
3.5.1	Methodische Grundlagen MTT-Test.....	18
3.5.2	Ansatz A: Zeitabhängige Wirkung.....	19
3.5.3	Ansatz B: Konzentrationsabhängige Wirkung.....	20
3.6	Untersuchungen zur Gentoxizität und zur Apoptoseinduktion.....	21
3.6.1	Immunzytochemische Bestimmung der PARP-Aktivität.....	22
3.6.2	Durchflusszytometrische Bestimmung von AnnexinV.....	23
3.7	Statistische Auswertung.....	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
4.1	Nachweis der Alkalischen Phosphatase als Osteoblastenzellmarker.....	26
4.2	Direkte Wirkung – Langzeitversuch.....	27
4.2.1	Resazurin-Assay.....	27
4.2.2	Lichtmikroskopie.....	30
4.2.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	36
4.3	Indirekte Wirkung.....	40
4.3.1	Ansatz A: Zeitabhängige Wirkung (MTT-Test).....	40

4.3.2	Ansatz B: Konzentrationsabhängige Wirkung (MTT-Test).....	43
4.4	Untersuchungen zur Gentoxizität und zur Apoptoseinduktion.....	47
4.4.1	Immunzytochemische Bestimmung der PARP-Aktivität.....	47
4.4.2	Durchflusszytometrische Bestimmung von AnnexinV.....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	Das Modell der Toxizitätstestung auf der Grundlage der Norm „EN ISO 10993“	52
5.2	Osteoblastenexplantatkultur aus dem Kieferbereich.....	54
5.3	Primäre Osteoblasten als Testkultur für toxikologische Untersuchungen.....	56
5.4	Zytotoxizität der Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate.....	57
5.4.1	Toxizität der Dentinhaftvermittler.....	59
5.4.2	Toxizität der Cyanoacrylate.....	60
5.5	Ursachen der Zytotoxizität der Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate.....	61
5.5.1	Ursachen der Toxizität der Dentinhaftvermittler.....	61
5.5.2	Ursachen der Toxizität der Cyanoacrylate.....	65
5.6	Gentoxizität und Apoptoseinduktion.....	66
5.7	Einsatz der Materialien als Knochenklebstoffe.....	69
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>78</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BEMA	Benzylmethacrylat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Bis-GMA	Bisphenol-A-(di)glycidylmethacrylat
CA	Cyanoacrylat
DA	Dentin Adhesive (Dentinhaftvermittler)
DAPI	Diamidine-Phenyl-Indol
DMBZ	Dimethoxybenzoin
DMEM	<u>D</u> ulbecco´s <u>m</u> odified <u>E</u> agl´s <u>m</u> edium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Effektive Dosis (in %)
EGDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
F	Fluoreszens
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Light Scatter
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathion-Disulfid
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
min	Minute
MMA	Methylmethacrylat
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid
NAC	N-acetylcystein
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-kappaB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-Buffered-Saline (Pufferlösung)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PI	Propidiumjodid

## Abkürzungsverzeichnis

---

REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	Reactive Oxygen Species
SSC	Side Light Scatter
TEGDMA	Triethylenglykoldimethacrylat
TEGMMA	Triethylenglykolmonomethacrylat
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
UDMA	Urethandimethacrylat

## 1 Einleitung

Seit mehr als drei Jahrzehnten sind die Osteosynthesen in der Kiefer-Gesichtschirurgie etabliert und die dafür verwendeten metallischen Materialien finden eine breite Anwendung in diesem Bereich. Einsatzmöglichkeiten der Osteosynthesematerialien reichen von der Traumatologie über die rekonstruktive Chirurgie und Umstellungsosteotomien bis hin zur dentalen Implantologie. Trotzdem existieren gerade bei dünnen oder wachsenden Knochenstrukturen Indikationsbeschränkungen. Schwierig erweist sich vor allem das sichere Einbringen von Osteosyntheseschrauben in filigrane Knochen, wie z.B. im Mittelgesicht, wobei durch das Bohren der Schraubenlöcher der Knochen zusätzlich geschwächt wird. Des Weiteren ist die Fixation von kleinen Knochenfragmenten mittels Plattenosteosynthese häufig problematisch und teilweise unmöglich. Außerdem ist eine Folgeoperation zur Entfernung der Platten und Schrauben in aller Regel notwendig. Dies stellt eine erneute Belastung für den Patienten und ein Infektionsrisiko dar.

Aus diesen und anderen Gründen scheint die Suche nach alternativen Osteosynthesematerialien angebracht. Eine elegante Ergänzung zu dem klassischen Verfahren könnte die Knochenklebung sein (Abb.1). Vorteile einer solchen Klebung bestehen vor allem in der geringen mechanischen Gewebetraumatisierung, der Vermeidung von Sekundäreingriffen und der einfachen Reposition von Knochenfragmenten in ihren ursprünglichen Verbund (Donkerwolcke et al., 1998). Der ideale Knochenklebstoff müsste eine stabile Haftkraft und gleichzeitig eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Außerdem sollte er bioresorbierbar, degradierfähig, nicht kanzerogen, sterilisierbar, wirtschaftlich sein sowie eine einfache klinische Anwendung ermöglichen und vor allem die Knochenneubildung nicht behindern (Giebel und Rimpel, 1981; Donkerwolcke et al., 1998; Heiss et al., 2004, 2005b). Bisher verfügten die geprüften Materialien entweder über eine zu geringe Haftkraft oder sie scheiterten an ihrer nicht ausreichenden Gewebeverträglichkeit (Heiss et al., 2004, 2006).

Die Biokompatibilität drückt aus, wie sich ein Werkstoff oder das Biomaterial in Wechselwirkung mit dem zu klebenden Gewebe und seiner Umgebung verhält (Wataha und Schmalz, 2001). Während man in der Vergangenheit Wert darauf legte, dass das Biomaterial keine Reaktion im Organismus zeigt, also bioinert sich verhält, ist bei der Knochenklebung eine Wechselwirkung mit der biologischen Umgebung durchaus erwünscht, um Abbauprozesse des synthetischen Materials und seine zelluläre Resorption in Gang zu setzen. Diese Degradation der Klebstoffe ist notwendig, um eine vollständige knöcherne Durchbauung des Frakturspaltes im Sinne einer Restitutio ad integrum zu erreichen.

Das Füge-Verfahren des Klebens findet heute schon eine vielseitige Anwendung in der Medizin. So werden Cyanoacrylate in der Weichgewebeschirurgie zur Klebung von Haut,



Lunge oder Niere eingesetzt. Ebenso werden auch in der Augenheilkunde zum Kleben von Hornhäuten synthetische Klebstoffmaterialien verwendet. Die Blutstillung über eine Fibrinklebung oder die Abdichtung perforierter Gefäße sind weitere medizinische Anwendungsgebiete von Klebstoffen. Auch in der konservierenden Zahnmedizin erfolgt die Befestigung von Kunststofffüllungen, Keramikinlays und Veneers am Zahn adhäsiv mittels eines Dentinhaftvermittlers. In der dentalen Traumatologie können mit diesen Materialien auch Schienen am Zahn befestigt werden.

Es gibt bisher nur wenige Studien zur Verwendung von Klebstoffsystemen zur Knochenklebung. Interessant sind die ersten experimentellen Arbeiten über die Anwendung von Adhäsionsosteosynthesen (Gosain, 2002). Hierbei wurde hauptsächlich Histoacryl, ein Cyanoacrylatklebstoff, eingesetzt, um Osteosyntheseplatten am Knochen festzukleben. Aber auch die alleinige Fixation von Knochenfragmenten über eine Klebung mit Cyanoacrylaten zeigte in einem Tierversuch an 6 Minischweinen hinsichtlich Stabilität und Histokompatibilität den Schrauben und Platten vergleichbare Ergebnisse (Amarante et al., 1995).

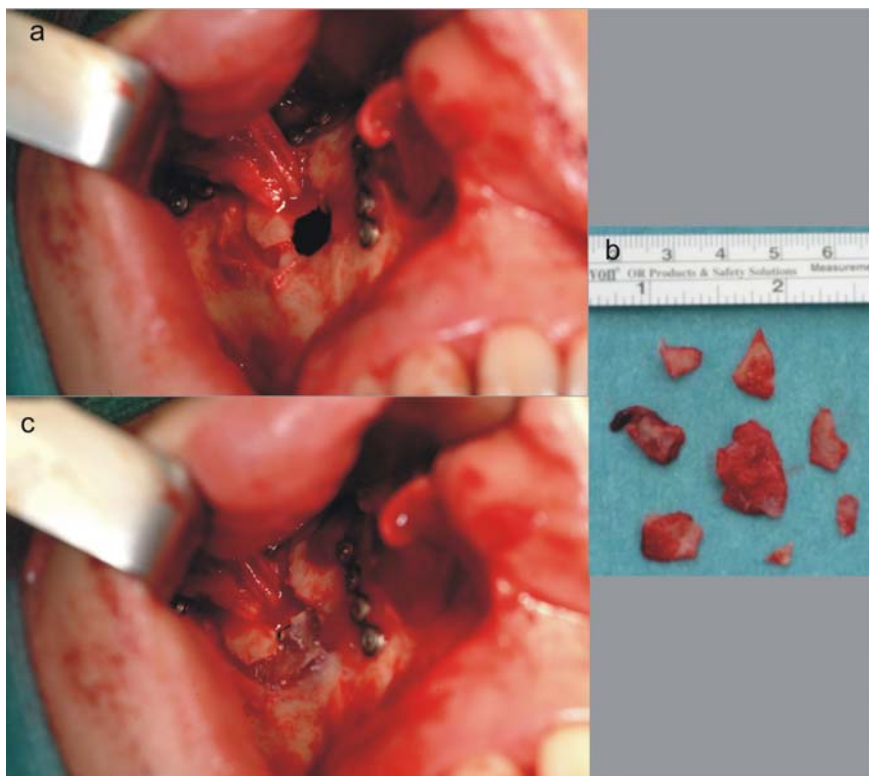
In den vergangenen Jahren hat vor allem die Arbeitsgruppe um Christian Heiss, Universität Gießen, *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu einem selbsthärtenden, resorbierbaren neuartigen Knochenklebstoff auf der Basis von funktionalisierten Oligolactiden durchgeführt (Heiss et al., 2004, 2005a.). Diese Klebstoffsysteme verfügen über eine gute Biokompatibilität und ein ausreichendes Degradationsverhalten. Die Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass der Abbau polymerer Klebstoffnetzwerke von Ethylenglycol-oligolactid-bismethacrylat (ELAMA) und der Comonomere (MMA und HEMALA-1,3) über eine Hydrolyse der Esterverbindung stattfindet (Heiss et al., 2004).

Die in der Weichgewebeschirurgie bereits erfolgreich eingesetzten Cyanoacrylate könnten auch eine Stoffgruppe für die Hartgewebeklebung darstellen. Besonders ihre Fähigkeit, in feuchter Umgebung schnell zu härten, macht diese Materialien für die klinische Anwendung interessant. Die Biokompatibilität der Cyanoacrylate wird allerdings immer wieder kritisch diskutiert. Während einige Autoren ein toxisches Potential der Cyanoacrylate fanden (Galil et al., 1984; Ciapetti et al., 1994a,b; Nitsch et al., 2005; Kaplan und Baysal, 2005) und eine entzündliche Reaktion speziell nach Applikation auf Knochengewebe feststellten (Hunter et al., 1976), bescheinigten andere diesen Materialien eine gute Bioverträglichkeit (Vasenius et al., 1988).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Knochen und Dentin erscheint auch die Anwendung von Dentinhaftvermittlern als Knochenklebstoff denkbar. Dentinhaftvermittler dienen in der Zahnmedizin der mikromechanischen Retention von Kunststofffüllungen am Dentin. Die Haftung wird über das Eindringen der amphiphilen Monomere in das Kollagengeflecht des Dentins („Hybridlayer“) und in die Dentinkanälchen („Tags“) erreicht. Ein weiterer praktischer Einsatzbereich dieser Adhäsive ist die Behandlung der

Dentinhypersensibilität. Erste, vielversprechende In-vitro-Studien zur Verwendung von Dentinhaftvermittlern als Knochenklebstoffe sind beschrieben worden (Meechan et al., 1994; Meechan und Cabe, 1995). In den letzten Jahren rückte die Frage nach der Zytotoxizität von Dentinhaftvermittlern und ihrer Bestandteile immer mehr in das Interesse wissenschaftlicher Studien. Ursache ist die zunehmende Bedeutung von Kompositen als Alternative zu den toxikologisch und ästhetisch kritisch betrachteten Amalgamfüllungen. Bereits heute stellen Komposite die am häufigsten verwendeten zahnärztlichen Materialien dar. Zahlreiche Publikationen konnten belegen, dass sowohl die Komposite als auch die Dentinhaftvermittler auf Pulpazellen und auf Zellen der Mundschleimhaut toxisch wirken (Dumsha et al., 1985; Cox et al., 1998; Geurtsen et al., 1999; Chen et al., 2003; Wiegand et al., 2006).

Bei der Durchsicht des internationalen Schrifttums bleibt die Frage nach der Toxizität von Cyanoacrylaten und der Dentinhaftvermittler in Bezug auf knöcherne Strukturen bis dato unbeantwortet. Während in jüngsten Studien der eigenen Arbeitsgruppe vor allen Dingen die Haft- und Zugfestigkeit von Dentinhaftvermittlern untersucht worden war (Bekes 2003; Maurer et al., 2004a, 2004b), stand im Zentrum der vorliegenden Arbeit die Prüfung der toxischen Wirkung von ausgewählten Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten in vitro. Ziel war es zu evaluieren, ob diese Materialien als Knochenklebstoffe von Frakturen in wenig belastetem Gebiet, wie dem Mittelgesicht, aus biologischer Sicht eingesetzt werden können.



**Abb.1:** Klinisches Anwendungsgebiet für Knochenklebstoffe; a.) Typischer Einbruch der Kieferhöhlenvorderwand im Rahmen einer lateralen Mittelgesichtsfraktur mit dem Entstehen kleiner Knochenfragmente (b.); Titanplattenosteosynthese infraorbital und paranasal (a.,c.) und Fixation der Fragmente in ihre ursprüngliche Position durch Klebung mit Histoacryl (c.)

## 2 Zielstellung

Die Fixation filigraner Knochenfragmente durch eine Klebung könnte im Sinne eines minimal-invasiven Vorgehens eine Alternative zur klassischen Plattenosteosynthese in der MKG-Chirurgie darstellen. Nachdem die mechanische Haftkraft von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten am Knochen bestätigt worden war (Bekes 2003, Maurer et al. 2004a,b), sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Materialien auch eine ausreichende Biokompatibilität besitzen, um sie als Knochenklebstoffe in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie einsetzen zu können.

Im Zentrum der Arbeit standen deshalb experimentelle Untersuchungen zur Prüfung der Toxizität von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten an primären humanen Osteoblasten aus dem Kieferbereich in vitro.

Mit einem komplexen Testmodell, das unterschiedliche Zellparameter prüfte, sollte die biologische Wirkung der Klebstoffe auf Knochenzellen möglichst umfassend evaluiert werden. Einerseits galt es herauszufinden, ob sich primäre Osteoblastenkulturen aus humanem Knochenmaterial des Kieferbereichs erfolgreich züchten lassen und ob andererseits diese Zellen geeignet sind, sensitiv, standardisiert und reproduzierbar die biologischen Wirkungen der Materialien zu erfassen.

Erste allgemeine Untersuchungen zur Zytotoxizität bzw. Zellvitalität sollten den Einfluss der Testsubstanzen auf den Zellstoffwechsel klären und durch spezifische Versuche zur Gentoxizität und zur Apoptose erweitert bzw. konkretisiert werden. Licht- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sollten toxische Effekte auch visuell sichtbar machen.

Die Toxizitätstestungen können prinzipiell an Zelllinien oder an primären Zellkulturen erfolgen. Dabei bieten Zelllinien die Möglichkeit, sehr viele Testreihen mit einer hohen Standardisierung und damit guten Vergleichbarkeit schnell und kostengünstig durchzuführen. Gleichzeitig sind diese käuflich erwerbbar Zellen immortalisiert, d.h. nahezu unendlich vermehrbar und einfach in ihrer Kultivierung.

Die Prüfung der Toxizität erfolgte an primären, eigens dafür gezüchteten Knochenzellkulturen aus dem menschlichen Kiefer. Diese direkt aus dem Gewebe isolierten Zellen stehen der In-vivo-Situation deutlich näher als Zelllinien. Aufbauende Untersuchungen sollten Erkenntnisse über eventuelle gentoxische Effekte der Materialien erbringen. Diese sind nur mit primären Kulturen sinnvoll, da Zelllinien einen veränderten Genpool aufweisen, der diese Zellen weit weniger empfindlich bzw. sogar resistent gegenüber derartigen Testungen macht. Für eine umfassende Evaluierung der Toxizität der potentiellen Knochenklebstoffe in vitro sind daher vor allem Primärzellen interessant.

Ursachen und Wege der Toxizität in den Knochenzellen aufzuklären, stand ebenfalls im Fokus der Untersuchungen. Auch mögliche Anpassungsreaktionen der Osteoblasten auf die potentiellen Knochenklebstoffe wurden evaluiert. Die Zusammenschau dieser In-vitro-Daten sollte Aussagen über den klinischen Einsatz der Klebstoffe ermöglichen.

Um die gemessenen toxischen Effekte der unterschiedlichen Materialien bewerten und einordnen zu können, wurden für die Anwendung der Dentinhaftvermittler und der Cyanoacrylate als Knochenklebstoffe vergleichbare Untersuchungsbedingungen geschaffen und eingehalten. Der experimentelle Ansatz sollte dabei standardisiert werden, um Fehler zu minimieren und in Zukunft weitere Materialien hinsichtlich ihrer Toxizität evaluieren zu können.

Nach Exposition von Osteoblasten mit Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten waren unter den Gesichtspunkten der oben genannten Zielstellung folgende Fragen zu klären:

- Welches Proliferationsverhalten zeigen die Osteoblasten?
- Wie verändert sich die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten?
- Sind Veränderungen der Zellmorphologie festzustellen?
- Welche toxischen Effekte zeigen die Osteoblasten im direkten und im indirekten Kontakt mit den Klebstoffen?
- Welche zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkungen sind zu beobachten?
- Welche essentiellen Zellfunktionen werden durch den Klebstoffkontakt geschädigt und in welchem Maße?
- Lassen sich genotoxische Effekte nachweisen?
- Lösen die Klebstoffe Apoptosevorgänge in den Zellen aus?
- Welche Aussagen lassen sich über die biochemischen Mechanismen der Toxizität treffen?
- Auf welche Inhaltsstoffe ist die toxische Wirkung der Klebstoffmaterialien vor allem zurückzuführen?

Die Gesamtheit der gewonnenen Daten sollte Aufschluss darüber geben, ob die untersuchten Materialien als Knochenklebstoffe in wenig belasteten Gebieten eingesetzt werden können.

## 3 Material und Methoden

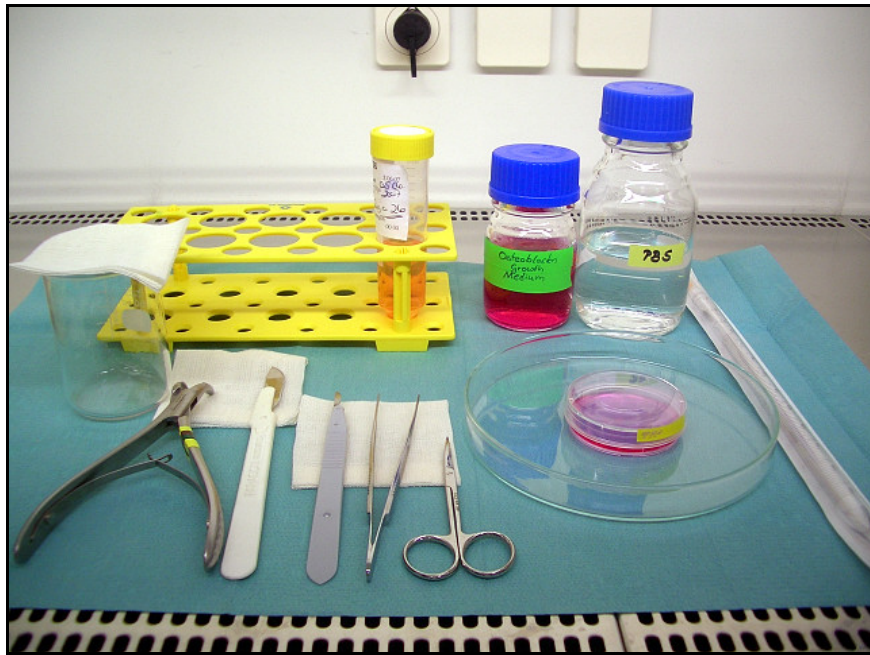
### 3.1 Kultivierung von Osteoblasten

#### 3.1.1 Anlage einer Explantatkultur aus dem Kieferbereich

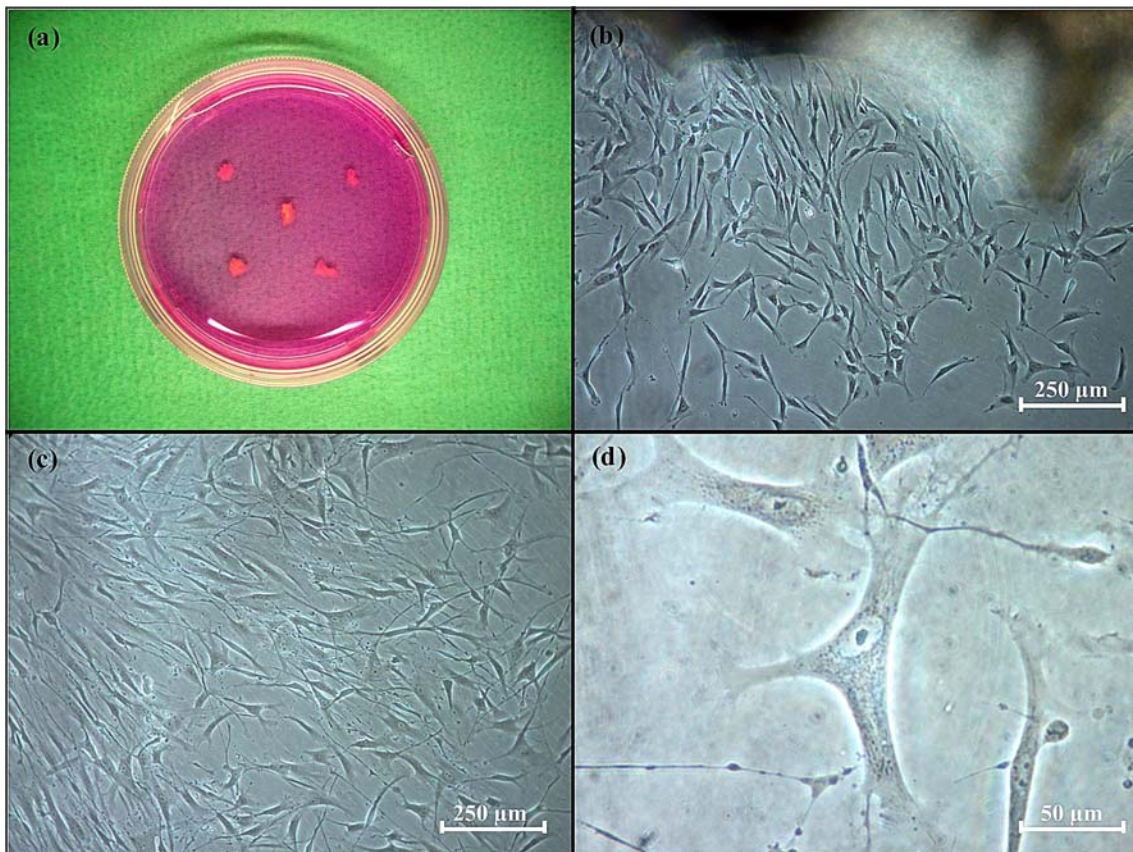
Im Rahmen von kieferchirurgisch indizierten operativen Eingriffen im Ober- und Unterkiefer wurde überschüssiges Knochenmaterial steril entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit Leibovitz (L15) Transport-Medium unter Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Die weitere Präparation der überwiegend spongiösen Knochenfragmente erfolgte unter Laborbedingungen (Abb.2). Die Zeitspanne zwischen Entnahme und Aufbereitung der Proben im Labor lag unter vier Stunden. Nach mehrmaliger Spülung der Proben mittels PBS-Pufferlösung, um unerwünschte Zellen wie Erythrozyten und Monozyten zu extrahieren sowie der mechanischen Säuberung von anhaftendem Weichgewebe, wurden die Knochenfragmente auf eine Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> mit einer Luer-Zange zerkleinert und in unbeschichtete Kulturschalen (Ø 6 cm) ausgesät (Abb.3a). Die Kultivierung der Primärzellen aus den Spongiosafragmenten erfolgte in Osteoblast Growth Medium (Firma Promocell) unter Zugabe von 10% Supplement Mix (Firma Promocell) und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die Anzüchtung der Zellen fand bei 37° C, 12,5% Sauerstoff und 5% Kohlenstoff bei Mediuernerneuerung alle sieben Tage statt. Nach ca. 10-14 Tagen war ein Auswachsen von Zellen aus den Knochenproben lichtmikroskopisch sichtbar (Abb.3b). Über die Zeit bildete sich am Boden der Kulturflasche ein adhärenter Zellrasen. Diese Zellen sind rein morphologisch schwer von Fibroblasten zu unterscheiden, so dass zur Charakterisierung ein qualitativer Nachweis der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase nötig war (3.1.3). Mit der ersten Proliferation der Zellen verband sich eine Verkürzung des Medienwechsels auf drei Tage. Nach ca. vier Wochen zeigten die Zellen eine Konfluenz von 90-100%, d.h. der Schalenboden war gleichmäßig und dicht mit Zellen besiedelt (Abb3c).

Insgesamt wurde das Resektionsmaterial von 28 Patienten (8 weibliche, 20 männliche) für die Untersuchung verwendet, davon stammten 16 Proben aus dem Unter- und 12 aus dem Oberkiefer. Das Durchschnittsalter der Spender lag bei 34 Jahren, der Median betrug 29 Jahre. Der jüngste Patient war 12, der älteste 54 Jahre alt.



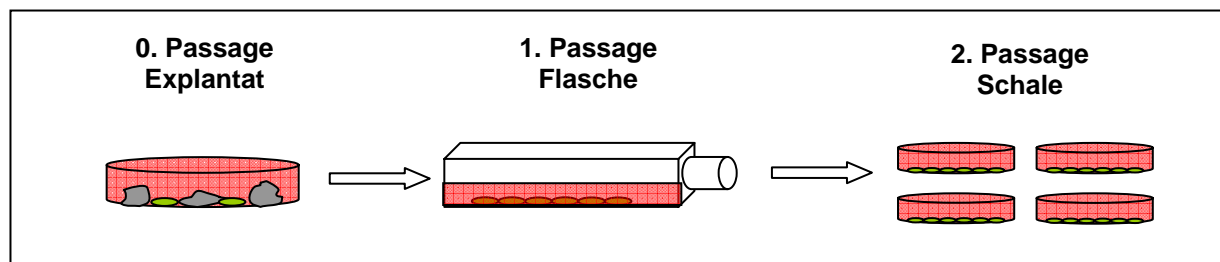
**Abb.2:** Arbeitsplatz zur Gewinnung einer humanen Osteoblastenexplantatkultur



**Abb.3:** Kultivierung humaner Osteoblasten aus dem Kieferbereich: (a) Aussaat von Knochenfragmenten in einer Kulturschale unter Zugabe von Osteoblast Growth Medium; (b) Auswachsen erster Osteoblasten aus einem Knochenstück nach Inkubation für 14 Tage; (c) subkonfluenter Zellmonolayer nach 4-wöchiger Kultivierung; (d) Osteoblast mit charakteristischer Morphologie, wie ein polygonales Soma mit ovalem Zellkern und einigen Fortsätzen, zahlreiche intrazelluläre Granula (raues endoplasmatisches Reticulum) lassen auf eine ausgeprägte Proteinbiosynthese der Zelle schließen

### 3.1.2 Trypsinieren und Passagieren der Zellen

Um eine für die Versuche ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Osteoblasten vom Boden abgelöst und neu ausgesät. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellkultur mit PBS gespült. Auf diese Weise werden Mediumreste entfernt, die das enzymatische Ablösen der Osteoblasten inhibieren würden. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und Inkubation für 5 min im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale. Durch Hinzufügen von 6 ml PBS wurde die Reaktion gestoppt, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 6 min bei 1100 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Unter lichtmikroskopischer Betrachtung wurden die Zellen einer Probe der Suspension in einer Fuchs/Rosenthal Zählkammer ausgezählt und anschließend 500.000 Zellen in einer 75cm<sup>3</sup> Kulturflasche ausgesät (Abb.4). Für die weitere Kultivierung diente DMEM unter Zusatz von 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin als Nährlösung. Nach Züchtung über 14 Tage erschien ein subkonfluent Monolayer. Diese Zellen wurden analog zu der oben beschriebenen Weise abtrypsinieren und in der für den jeweiligen Versuch benötigte Zellzahl ausgesät. Die Zellen der daraus entstehenden zweiten Passage bildeten das Ausgangsmaterial für alle Versuche (Abb.4).



**Abb.4:** Prinzipieller Ablauf der Kultivierung und Vermehrung von Primärzellen

### 3.1.3 Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Eine Charakterisierung der Zellen als Osteoblasten ermöglichte der Nachweis der Expression von alkalischer Phosphatase (AP). Im menschlichen Organsimus kommen drei Isoenzyme der alkalischen Phosphatase vor: Leber- Knochen- Niere- Typ, intestinaler Typ und plazentärer Typ. Im Knochen dient das Enzym der hydrolytischen Abspaltung von Phosphationen aus Phosphorsäureesterverbindungen. Diese werden in Matrixvesikeln gespeichert, im Zuge der Osteoidbildung mit Kalziumionen durch Exozytose freigesetzt und kristallisieren im Extrazellulärraum zu Hydroxylapatit aus (Geschwill, 2002). Im Rahmen von Knochenerkrankungen wie der Osteomalazie, Knochenmetastasen und Knochenbrüchen kann durch Steigerung der Osteoblastenaktivität die Konzentration an AP pathologisch

erhöht sein. Die alkalische Phosphatase stellt einen sensitiven und verlässlichen Marker der Aktivität von Osteoblasten dar (Leung et al., 1993).

Die Aktivität der AP wurde durch eine Zellfärbung qualitativ bestimmt, so dass die gezüchteten Zellen als Osteoblasten identifiziert werden konnten. Dazu wurden die kultivierten Zellen auf „Chamber slides“ ausgesät und nacheinander mit PBS, Aceton/PBS und Aceton fixiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Inkubationsmedium für eine bis drei Stunden. Die Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 mg Naphtol AS:MX Phosphat
- 0,25 ml N,N-Dimethylformid
- 25 ml Aqua dest.
- 25 ml Pufferlösung (2,4 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan + 100 ml Aqua dest.)
- 2 Tropfen MgSO<sub>4</sub>x 7H<sub>2</sub>O 10%
- 30 mg Fast Blue BB

Das Gemisch wurde ausreichend geschüttelt und vor Gebrauch filtriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült und für 5-10 min mit 0,1%-Kernechtrot behandelt. Die gefärbten Proben wurden erneut gewaschen und anschließend eingedeckt. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zeigt sich als blauer Niederschlag im Zytoplasma. Die Zellkerne sind rot gefärbt. Alle Proben wurden lichtmikroskopisch untersucht und das Ergebnis der Zellfärbung wurde mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 5000) fotografiert.

### 3.2 Untersuchte potentielle Knochenklebstoffe



Abb.5: Die getesteten Materialien in der Originalverpackung der Hersteller



In der Untersuchung wurden die biologischen Eigenschaften folgender Stoffklassen (Abb.5) analysiert:

1. Dentinhaftvermittler, die in der konservierenden Zahnheilkunde als adhäsives Befestigungsmaterial für Kunststofffüllungen, Keramikinlays und Veneers eingesetzt werden.
2. Cyanoacrylate, die bereits in der Weichgewebschirurgie erfolgreich als Klebstoffe verwendet werden.

### 3.2.1 Dentinhaftvermittler

Es wurden folgende Dentinhaftvermittlersysteme hinsichtlich ihrer Zytotoxizität auf Knochenzellen aus dem Kieferbereich getestet:

- **Clearfil New Bond** (KURARAY Co.LTD.,Osaka,J), ein chemisch härtendes Zwei-Flaschen-Bonding-Material,
- **Excite** (Vivadent Ets., Schaan/FL), ein lichthärtendes Einkomponenten-System und
- **Xeno III** (Dentsply De Trey, Konstanz, D.), ein selbstätzendes, selbstprimendes lichthärtendes Adhäsiv.

Einen Überblick über die genaue Zusammensetzung gibt Tabelle 1.

**Tab.1:** Chemische Zusammensetzung der untersuchten Dentinhaftvermittler

Clearfil New Bond	Excite	Xeno III
<b>Catalyst:</b>		<b>Flüssigkeit A:</b>
2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)	2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)	2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)
Bisphenol-A-diglycidil-methacrylat (Bis-GMA)	Bisphenol-A-diglycidil-methacrylat (Bis-GMA)	Wasser
10-Metacryloyloxydecyl-dihydrogenphosphat (MDP)	Ethanol	Ethanol
Hydrophobes aromatisches Dimethacrylat	Dimethacrylat	Butylhydroxytoluol (BHT)
Benzoylperoxide	Hochdisperses Siliciumdioxid Phosphonsäureacrylat Katalysatoren, Stabilisatoren	Hochdisperses Siliziumdioxid
<b>Universal:</b>		<b>Flüssigkeit B:</b>
N,N'-Diethanol-toluidine		Phosphorsäure-modifiziertes Methacrylat (Pyro-EMA)
Natriumbenzolsulfonat		Monofluorophosphazen-modif. Polymethacrylat (PEM-F)
Ethanol		Urethandimethacrylat Butylhydroxytoluol (BHT) Kampferchinon Ethyl-4-dimethylaminobenzoat

### 3.2.2 Cyanoacrylate

Als Vertreter der Cyanoacrylate wurden der Hautklebstoff **Histoacryl** (B.Braun, Melsungen, D) und der Reparatur- und Füllungswerkstoff **Cyano-Veneer** (Hager Werken, Duisburg, D), untersucht.

**Tab. 2:** Chemische Zusammensetzung der untersuchten Cyanoacrylate

Histoacryl	Cyano Veneer
Butyl-2-Cyanoacrylat	Ethyl-2-Cyanoacrylat
Farbstoff D&C violett No.2 blau	

### 3.3 Methodik - methodisches Vorgehen

In der Literatur wird kein genaues Vorgehen zur Testung der Zytotoxizität dentaler Materialien angegeben. Einen Überblick über die biologische Beurteilung von Medizinprodukten liefert allerdings die EN-ISO 10993. Nach dieser Norm stellen Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate Medizinprodukte dar, die mit Weichgewebe, Knochen oder Pulpa/Dentin in Dauerkontakt treten. Die EN-ISO 10993 besteht aus 18 Teilen, wobei sich Punkt 5 mit der Prüfung auf In-vitro-Zytotoxizität befasst. Diese Vorschrift gibt einen groben Leitfaden für diese Toxizitätstestung von polymerisierbaren Materialien, betont aber gleichzeitig, dass für jede Testsubstanz einzeln zu prüfen ist, welche Untersuchungen sinnvoll sind. Prinzipiell kann die Beurteilung der Zytotoxizität von Kunststoffen am unpolymerisierten Ausgangsmaterial oder am definitiven Polymerisat erfolgen. Die EN-ISO 10993-1 schlägt vor, die Toxizität der Medizinprodukte vorrangig in ihrem endgültigen Zustand zu prüfen. Daher wurden alle Untersuchungen zur Testung der biologischen Verträglichkeit der potentiellen Knochenklebstoffe mittels der Polymerisate durchgeführt.

Einen schematischen Überblick über den Versuchsaufbau liefert Abbildung 6. Dabei wurde in Anlehnung an die EN-ISO 10993-5 die Zytotoxizität der potentiellen Knochenklebstoffe auf die primäre humane Osteoblastenkultur bei *direkter* und *indirekter Wirkung* untersucht.

Unter der *direkten Wirkung* versteht man die Evaluation der Toxizität in unmittelbarem Kontakt des Klebstoffes mit den Zellen. Dazu wurde eine Probe der Testsubstanz in einer Kulturschale gehärtet, Osteoblasten dazugegeben und die Veränderung der Zellvitalität und der Zellmorphologie über sechs Wochen analysiert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichten eine spezifische Beurteilung des Kontaktbereiches zwischen Zellen und Klebstoff sowie der Klebstoffoberflächen.

Ziel des *indirekten Verfahrens* ist es, die Wirkung langlebiger löslicher toxischer Produkte der Testsubstanzen auf die Osteoblasten abzubilden. In einem ersten Schritt wurden polymerisierte Klebstoffprobekörper in Nährmedium gegeben und mit dem daraus entstandenen Klebstoffextrakt die Zellen in einem zweiten Schritt kultiviert. Die Osteoblasten hatten somit nur Kontakt mit den in Lösung gegangenen Klebstoffbestandteilen. Mögliche toxische Effekte der eluierten Stoffe auf die Zellkultur wurden zeit- und konzentrationsabhängig untersucht.

Um genauere Aussagen zum Ausmaß der Zellschädigung treffen zu können, wurden zusätzlich spezifische Tests zur Genotoxizität und zur Apoptoseinduktion in das methodische Repertoire aufgenommen. Da die DNA Träger der gesamten Erbinformation ist, hat eine toxische Schädigung dieser Strukturen fatale Folgen für die einzelne Zelle und den gesamten Organismus. Eine DNA-Schädigung kann zum Zelltod führen. Die Untersuchung zur Apoptose sollte klären, ob ein solcher Zelluntergang durch die Klebstoffe induziert wird. Darüber hinaus lässt sich mit diesem Test eine Apoptose von einer Nekrose unterscheiden. Die Apoptose als kontrollierter Zelltod findet für das umliegende Gewebe schonend statt, hingegen ist die unkontrolliert ablaufende Nekrose mit einer massiven Entzündung des umliegenden Gewebes verbunden. Durch alle diese Untersuchungen konnten komplexe Rückschlüsse zur toxischen Wirkung der Klebstoffe auf die Osteoblasten gezogen werden.

## Methodik der Toxizitätstestung

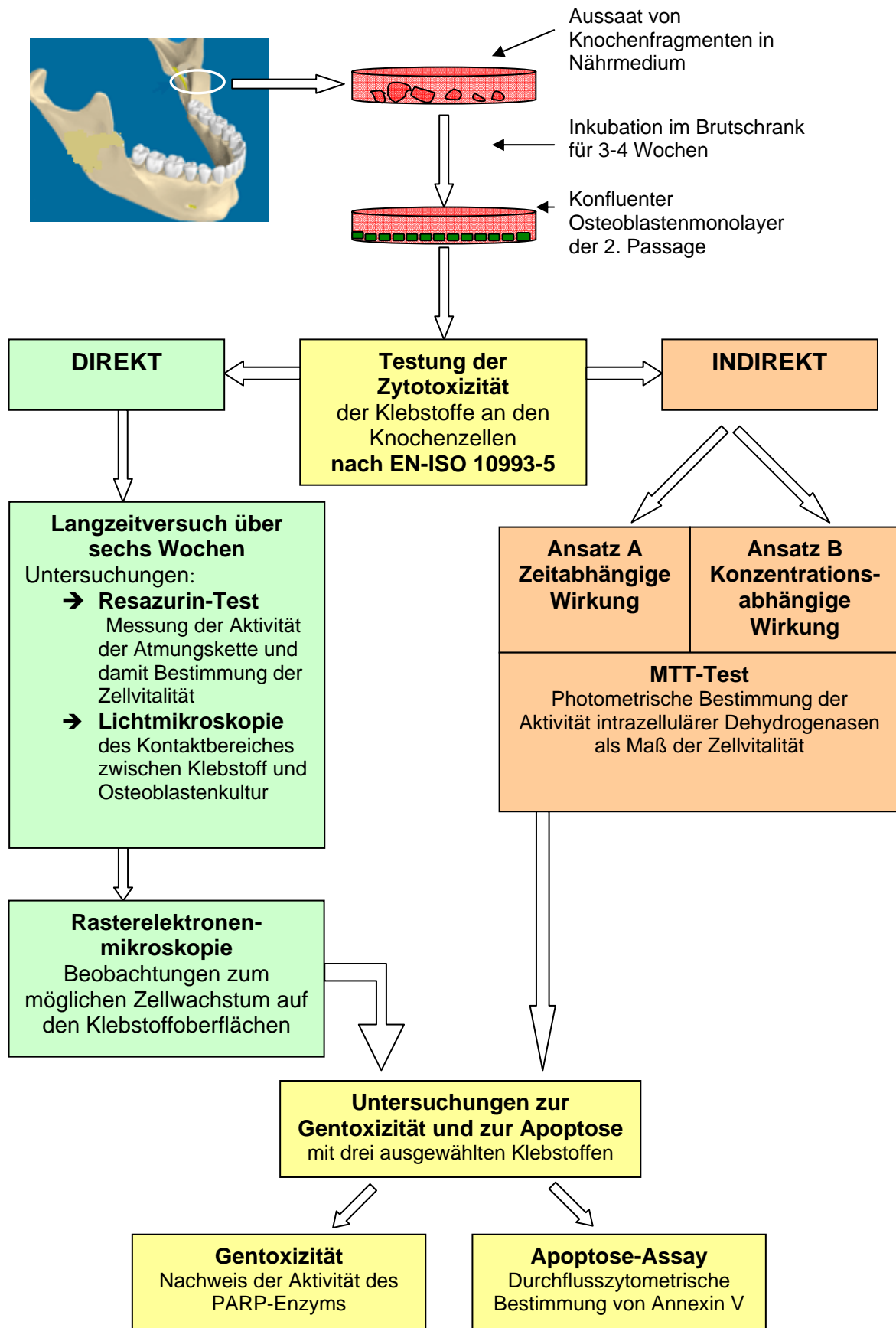


Abb.6: Schematische Darstellung der Methodik

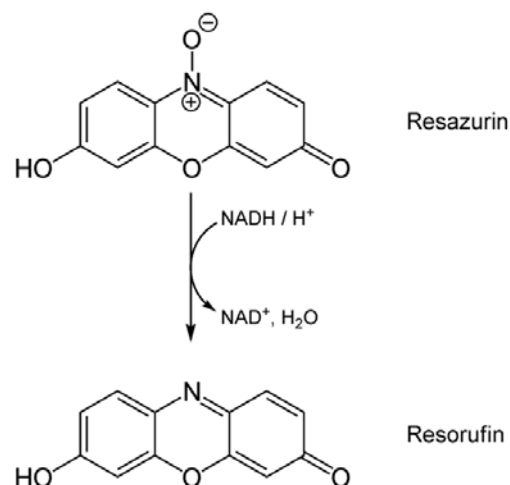
### 3.4 Methodik: Direkte Wirkung – Resazurin-Assay

Ziel dieses Versuches war es, die Vitalität, Proliferation und Morphologie der Osteoblasten in unmittelbarem Kontakt mit einer gehärteten Klebstoffprobe zu bewerten. Diese Untersuchung wurde als sechswöchiger Langzeitversuch angelegt.

#### 3.4.1 Methodische Grundlagen Resazurin-Assay

Als quantitative Messmethode zur Beurteilung der Zytotoxizität kam der Resazurin-Test (Alamar-Blue-Assay) zur Anwendung. Dieses als „non destruktive sampling“ bezeichnete Verfahren ermöglicht es dem Anwender, die Zellen nach Versuchsdurchführung weiter zu kultivieren, da zur Messung keine Zellyse notwendig ist. Das Salz Resazurin ist ein Oxidations- bzw. Reduktionsindikator (O'Brien et al., 2000) und misst die Zellatmung. Durch die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette vitaler Zellen wird das oxidierte blaue nicht fluoreszierende Salz Resazurin zu dem pinken, bei 590 nm stark fluoreszierenden Resosurfin reduziert (Holst et al., 2005), (Abb.7). Diese Reduktion benötigt freie Elektronen, die am Ende der Elektronentransportkette ständig neu entstehen und als Energielieferanten für die ATP-Synthese dienen. Die Fluoreszenzintensität des gebildeten Resosurfin kann anschließend im ELISA-Reader quantifiziert werden und ist direkt proportional zur Zellzahl, zur Stärke der Zellatmung und damit ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen (Gloeckner et al., 2001).

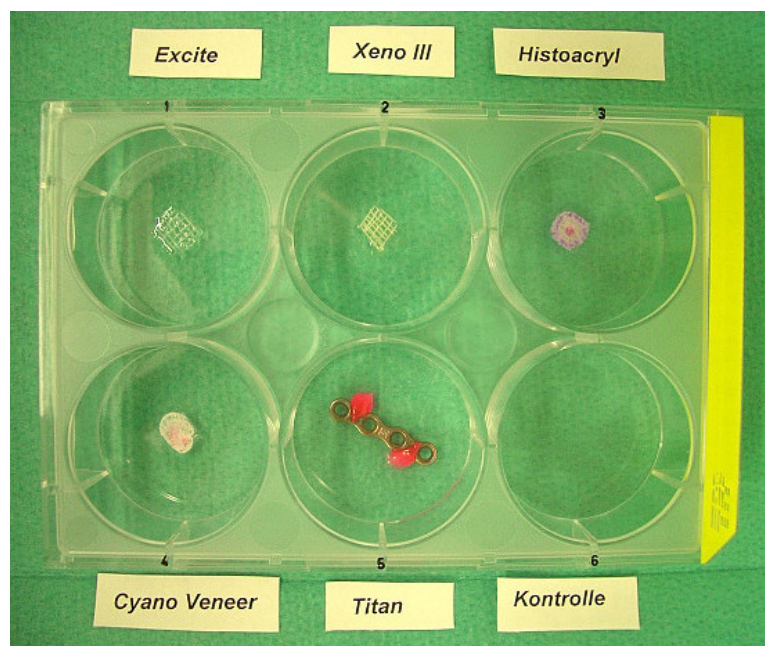
Zusätzlich wurde die Kontaktzone zwischen den Zellen und den Klebstoffen lichtmikroskopisch untersucht und über eine Digitalkamera morphologische Veränderungen der Zellen, die Zelldichte und eine mögliche Hofbildung um die Klebstoffproben festgehalten.



**Abb.7:** Chemische Umsetzung von Resazurin in fluoreszierendes Resosurfin

### 3.4.2 Versuchsablauf: Direkte Wirkung

Die Untersuchung erfolgte mittels 6er Wells, deren versiegelte Kavitäten zur besseren Retention der Klebstoffe im Applikationsgebiet mit einem Skalpell aufgeraut wurden (Abb.8). In die Mitte jeweils einer Kavität eines 6er Wells wurden 10 µl des potentiellen Klebstoffes pipettiert und anschließend nach Herstellerangaben polymerisiert. Die Dentinhaftvermittler Excite und Xeno III wurden über 40 s lichtpolymerisiert, die Cyanoacrylate Histoacryl und Cyano Veneer durch Zugabe eines Tropfens Nährmedium gehärtet. Eine Titanminiplatte (Firma Martin) wurde an zwei Punkten mit zahntechnischem Klebewachs am Boden einer weiteren Kavität fixiert. Die letzte Einsenkung des 6er Wells blieb unverändert und diente als Kontrolle (Abb.8). In analoger Weise wurden zwei weitere Wellplatten vorbereitet (n=3). Der Haftvermittler Clearfil Liner New Bond konnte in diesem Experiment nicht untersucht werden, da keine feste, langzeitstabile Klebstoffprobe hergestellt werden konnte. Das polymerisierte Methacrylat löste sich im Medium.



**Abb.8:** Versuchsaufbau der direkten Wirkung, 6er Well mit den polymerisierten Klebstoffproben, der befestigten Titanplatte und einer Leerprobe als Kontrolle

In jede Kavität der drei 6er Wells wurden 50.000 in DMEM suspendierte Osteoblasten pipettiert und anschließend alle Proben im Brutschrank bei 37° C, 12,5 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert.

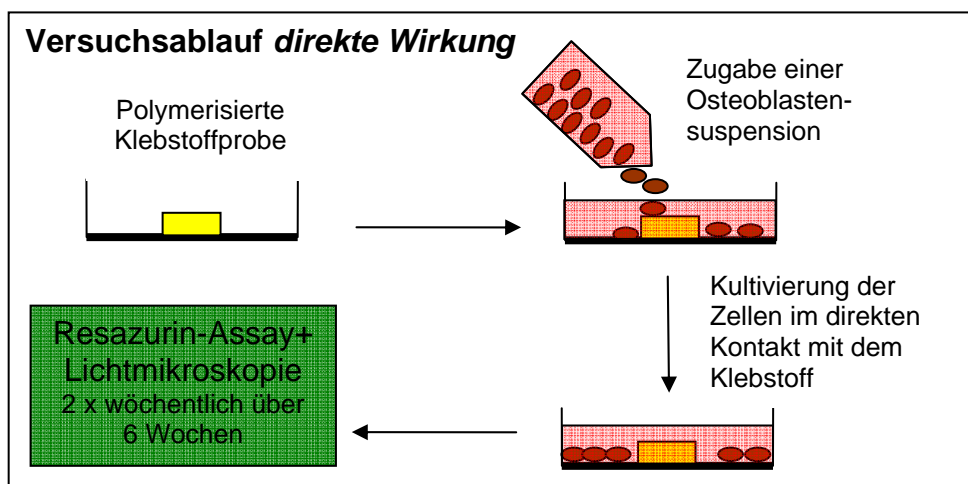
Die Untersuchung der Vitalität der Zellkulturen in direktem Kontakt mit den Testmaterialien erstreckte sich über einen Zeitraum von sechs Wochen. Der Resazurin-Test erfolgte 2x pro

Woche (Abb.9). Somit wurde die Aktivität der Atmungskette an 12 Tagen gemessen (nach 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42 Tagen) und jeweils der Kontaktbereich zum Klebstoff lichtmikroskopisch untersucht.

Zu Beginn des Resazurin-Tests musste eine Resazurin-Stammlösung hergestellt werden. Bei einer Zielkonzentration von 0,44 mmol/l Resazurin und einem Molekulargewicht des Salzes von 251,17 g/mol ergab sich eine Einwaage von 11 mg Resazurin Salz in 100 ml PBS. Die 10% ige Gebrauchslösung resultierte aus der Suspension von 2 ml dieser Stammlösung in 20 ml DMEM und wurde über einer 0,22 µm Membran steril filtriert.

Die Wellplatten wurden dem Brutschrank entnommen, das Medium abgesaugt und jeweils 1ml der Gebrauchslösung in die Kavitäten pipettiert. Zusätzlich wurde eine Probe der Resazurinlösung mitgeführt. Diese diente bei der späteren Messung als Leerwert (Blank). Die Inkubation aller Wellplatten erfolgte anschließend für 2 h im Brutschrank. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde der zellfreie Inkubationsüberstand resuspendiert und 100 µl in eine Einsenkung eines 96er Wells gegeben. Pro Klebstoff, Titanplatte bzw. Kontrolle wurden nach dem Prinzip der Doppelbestimmung zwei Kavitäten bestückt. Die restliche Resazurinlösung wurde aus den 6er Wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. In dieser Phase erfolgten die Lichtmikroskopie und die Fotografie der Proben. Danach wurde der Puffer entfernt, DMEM hinzugegeben und die Osteoblasten im Brutschrank weiter kultiviert.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte im ELISA-Reader (Tecan Genius) bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Aus den resultierenden Messwerten wurde für jede Probe der arithmetische Mittelwert berechnet, der Leerwert davon subtrahiert und die prozentuale Fluoreszenz in Relation zur Kontrolle als Maß der Zellvitalität bestimmt.



**Abb.9:** Methodik der Zytotoxizitätstestung in direktem Kontakt der Zellen mit den Klebstoffen

#### 3.4.3 Rasterelektronenmikroskopie

In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale (Andreas Cismak) wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Klebstoff-Proben angefertigt. Mit dieser Untersuchung galt es die Frage zu klären, ob ein Zellwachstum auf den Oberflächen der Testmaterialien über die Zeit stattfindet. Des Weiteren wurden Veränderungen der Zellmorphologie festgehalten.

Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte an drei ausgewählten Testsubstanzen, dem Dentinhaftvermittler Excite, dem Cyanoacrylat Histoacryl und der Titanplatte. Die Proben wurden analog der Arbeitsvorschrift für den Resazurin-Test vorbereitet und mit den Osteoblasten inkubiert. Nach einer Expositionszeit von sieben Tagen und 21 Tagen bei regelmäßigem Mediumwechsel fand die Fixierung der Zellen mit 2%igem Glutaraldehyd statt. Die weitere Aufbereitung erfolgte im Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale. Die Präparation der Proben umfasste folgende Schritte:

- Fixierung mit 2%iger Glutaraldehydlösung in PBS über 2 h
- Mehrmaliges Waschen mit PBS
- Nachfixieren mit 2%igem Osmiumtetroxid in PBS über 2 h
- Mehrmaliges Waschen mit PBS
- Entwässerung in Ethanol – Reihe: 30; 60; 80; 90; 96; 100% je 30 min
- Überführung in Hexamethyldisilazan in 3 Stufen 30, 70, 100% HMDS-Ethanol-Mischung je 15 min
- Lufttrocknung der Proben und „Besputtern“ mit Platin

Die aufbereiteten Proben wurden danach im Rasterelektronenmikroskop untersucht.



### 3.5 Methodik: Indirekte Wirkung - MTT-Test

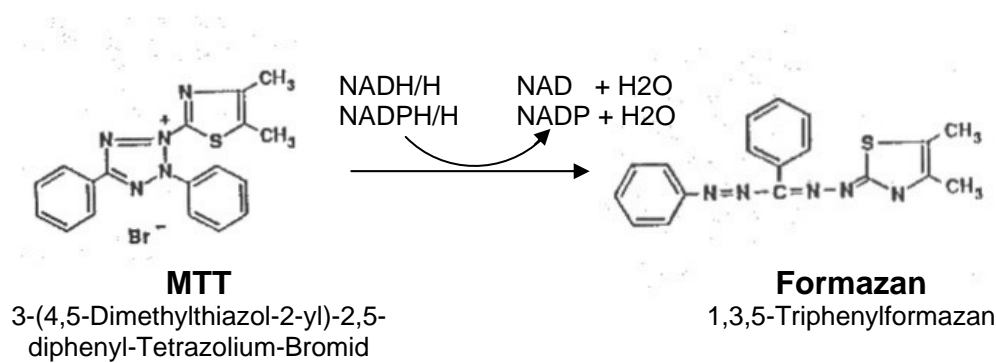
Die Prüfung der indirekten Wirkung diente der Beurteilung der Toxizität von löslichen Bestandteilen der Klebstoffe auf die Osteoblasten. Dazu wurden gehärtete Klebstoffpellets hergestellt und diese in Kulturmedium überführt, um einen wässrigen Klebstoffextrakt zu gewinnen. Anschließend wurden die Osteoblastenkulturen mit den so hergestellten Lösungen inkubiert. Im Ansatz A, der zeitabhängigen Wirkung, wurde die Kontaktzeit zwischen Klebstoffpellet und Kulturmedium variiert. Im Ansatz B, der konzentrationsabhängigen Wirkung, galt es, unterschiedliche Verdünnungen der Klebstoffeluate auf ihre Toxizität zu untersuchen (Abb.12).

Die Messung der zellschädigenden Wirkung der Klebstoffextrakte auf die Osteoblasten erfolgte durch den MTT-Test. Der MTT-Test ist ein weit verbreiteter, allgemeiner Zytotoxizitätstest, der bereits erfolgreich zur Evaluierung der In-vitro-Biokompatibilität von Dentinhaftvermittlern (Chen et al., 2003; Spagnuolo et al., 2004a, 2006; Wiegand et al., 2006) und Cyanoacrylaten (Ciapetti et al., 1994b; Nitsch et al., 2005) eingesetzt worden ist.

#### 3.5.1 Methodische Grundlagen MTT-Test

Die Erstbeschreibung dieses Vitalitätstestes geht auf Mosmann, 1983 zurück. Der MTT-Test ermöglicht die Bestimmung der Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen und gibt damit Auskunft über die Vitalität der Osteoblasten. Diese Enzyme katalysieren die Reduktion des gelben Farbstoffs MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid) in violette Formazan (Abb.10). Dieser Farbumschlag lässt sich photometrisch im ELISA-Reader bei 560nm quantifizieren.

Dazu werden die Zellen mit der MTT-Lösung inkubiert, anschließend werden die Osteoblasten durch Zugabe von Isopropanol/Ameisensäure lysiert, so dass das entstandene violette Formazan freigesetzt wird. Die Messung der Extinktion erfolgt photometrisch bei 560 nm im ELISA-Reader. Die Intensität der Färbung ist dabei Ausdruck des Stoffumsatzes von Tetrazolium in Formazan und direkt proportional zur Vitalität der Zellen. Die Reaktion läuft vor allem im endoplasmatischen Reticulum ab und benötigt die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH (Berridge et al., 1996). Ein geringer Teil des Farbstoffs wird zusätzlich in den Mitochondrien von der Succinat-Dehydrogenase gespalten (Mosmann, 1983). Der MTT-Test misst somit primär die Glykolyserate und liefert sekundär auch Aussagen zur Aktivität der Zellatmung (Gloeckner et al., 2001). Es handelt sich hierbei um einen unspezifischen Test, der eine hohe Sensitivität und Reliabilität besitzt (Ciapetti et al., 1994b).



**Abb.10:** Reduktion des gelben Farbstoffs MTT zu violetterm Formazan

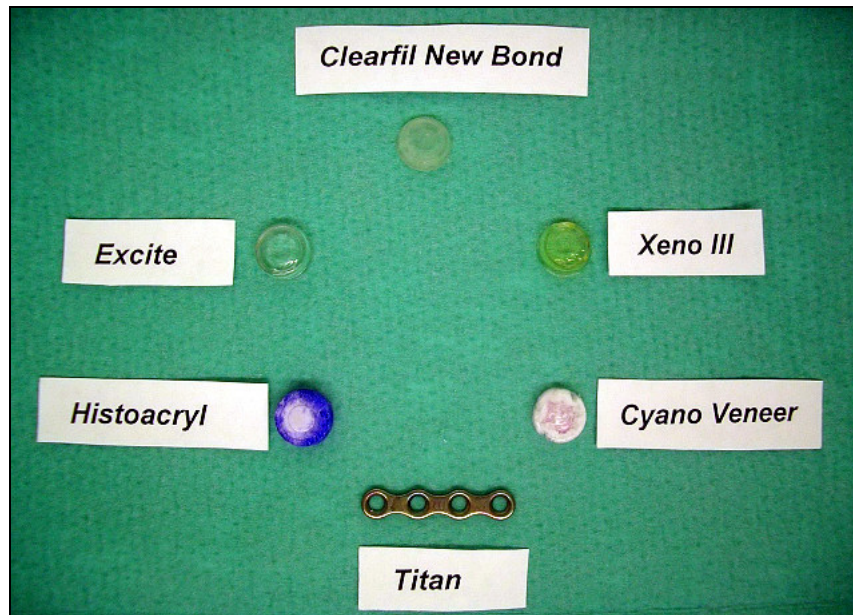
### 3.5.2 Ansatz A: Zeitabhängige Wirkung

Die potentiellen Knochenklebstoffe (Clearfil New Bond, Excite, Xeno III, Histoacryl und Cyano Veneer) wurden nach Herstellerangabe angemischt, jeweils 100 µl der Lösung in ein genormtes Nöpfchen (Deckel eines Eppendorf Röhrchen) pipettiert und dort polymersiert. Dieses Verfahren ermöglichte es, standardisiert annähernd konstant große Volumina mit vergleichbarer Oberflächengestalt und Größe herzustellen. Die Polymerisationsschrumpfung der Dentinhaftevermittler und die Expansion der Cyanoacrylate wurden nicht weiter berücksichtigt, da diese Volumenveränderungen nur 6-8% ausmachen.

Die ausgehärteten Pellets besaßen eine Größe von ca. 0,8 x 0,3 cm. Zusätzlich wurde eine Titan-Miniplatte (4-Loch ohne Steg) als Vergleich zum derzeitigen Goldstandard der Osteosynthese mitgeführt. Die polymerisierten Klebstoffpellets wurden dem Nöpfchen entnommen (Abb.11) und je ein Pellet bzw. eine Titanplatte in 5 ml Kulturmedium überführt. Als Kontrolle diente eine Probe des Nährmediums ohne ein Testmaterial. Die Kontaktzeiten der Probenkörper und des „Leermediums“ im Brutschrank betragen: 5 min, 30 min, 1 h, 6 h und 24 h bei 37° C. Nach Ablauf der Kontaktzeiten wurden die Klebstoff-Pellets entfernt und die Lösungen resuspendiert (Abb.12).

In einem zweiten Ansatz wurden drei Tage vor der Pelletherstellung in ein 24er Well 50.000 Osteoblasten pro Kavität ausgesät. Über die Zeit entstand ein subkonfluent Monolayer.

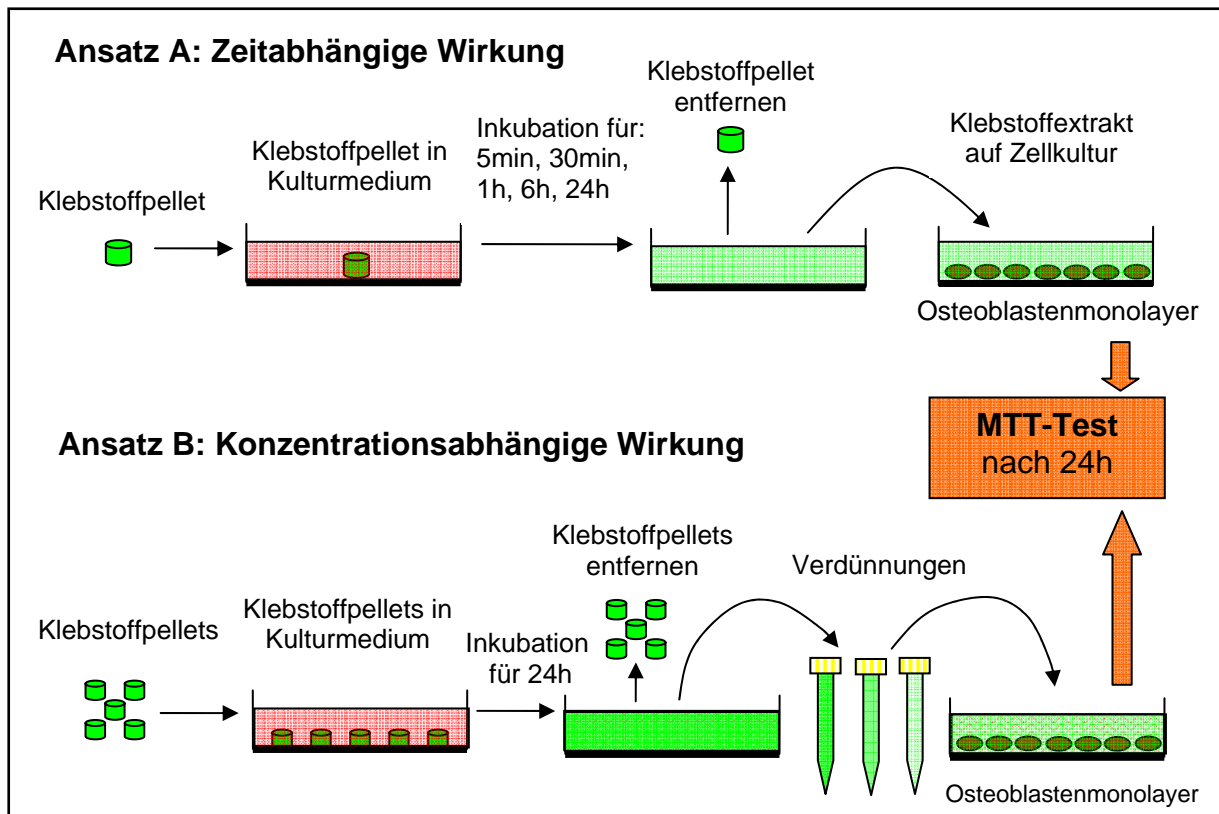
Diese Knochenzellkulturen wurden mit jeweils 1 ml des hergestellten Klebstoffextraktes versetzt. Der Kontrollkultur entsprechend, wurde das „Leermedium“ hinzugegeben. Nach dem Prinzip der Doppelbestimmung wurden pro Testsubstanz und zugehöriger Kontaktzeit zwei Kavitäten beschickt. Die Inkubation der so präparierten Well-Platten erfolgte für 24 h im Brutschrank. Danach erfolgte der MTT-Test als Maß der Dehydrogenasenaktivität und deren photometrische Auswertung bei 560 nm (Abb.12). Für die Beurteilung der Vitalität diente die Kontrolle als Referenzwert (100%). Die Untersuchung umfasste zehn Versuchsreihen.



**Abb.11:** Polymerisierte Pellets der untersuchten potentiellen Knochenklebstoffe und eine Titanminiplatte (Firma Martin) vor Inkubation in Kulturmedium

### 3.5.3 Ansatz B: Konzentrationsabhängige Wirkung

Analog zu dem im Versuchsansatz A beschriebenen Vorgehen wurden Pellets der Testsubstanzen hergestellt und jeweils fünf Pellets eines Klebstoffs in 5 ml DMEM unter den o.g. Bedingungen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Proben mit jeweils fünf Titanplatten ermöglichten einen Vergleich mit der Standardosteosynthese. Als Kontrolle diente eine Osteoblastenkultur ohne Testsubstanz. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Pellets bzw. die Titanplatten entfernt und das so hergestellte Test-Medium und das Kontrollmedium resuspendiert. Folgende Verdünnungen (Elutionen) wurden unter Zugabe von unbehandeltem Kulturmedium (DMEM) hergestellt: 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 10% und 5%. Je 1 ml der jeweiligen Verdünnung wurde in ein mit Osteoblasten beimpftes 24er Well pipettiert. Die Aussaat von 50.000 Osteoblasten erfolgte analog zu Ansatz A drei Tage zuvor, so dass ein subkonfluent adhaerenter Monolayer entstehen konnte. Die beimpfte Kultur wurde für 24 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert (Abb.12). Pro Konzentration wurde eine Doppelbestimmung der Stoffwechselaktivität mittels des MTT-Testes durchgeführt. Die Kontrolle diente hierbei erneut als Referenzparameter (100% Vitalität). Aus den Ergebnissen der Konzentrationsabhängigkeit ließ sich die mittlere effektive Dosis ( $ED_{50}$ ) ableiten. Darunter versteht man die Konzentration eines Stoffes, die eine Halbierung der Zellvitalität verursacht. Eine Abstufung der Materialien nach ihrer Toxizitätsstärke konnte anhand dieser  $ED_{50}$  Werte erfolgen.



**Abb.12:** Methodik der Zytotoxizitätstestung im indirekten Kontakt

### 3.6 Untersuchungen zur Gentoxizität und zur Apoptoseinduktion

Um einen komplexen Eindruck über die biologische Wirkung der Klebstoffe zu gewinnen, wurden Untersuchungen zur Gentoxizität und zur Apoptose in das methodische Repertoire aufgenommen. Für diese spezifischen Analysen wurden aus den Testsubstanzen drei potentielle Knochenklebstoffe ausgewählt, die im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz nach den bisherigen Ergebnissen aus toxikologischer Sicht am interessantesten erschienen. Einbezogen wurden der nach dem ED<sub>50</sub>-Ranking zellverträglichste Dentinhafvermittler und das am wenigsten zytotoxische Cyanoacrylat. Der Klebstoff mit der größten Haftkraft am Schweineknöchel, Clearfil New Bond (Bekes et al., 2003), stellte das dritte einbezogene Produkt dar. Das gentoxische Potential der Materialien wurde über eine immunzytometrische Messung der PARP-Aktivität evaluiert. Die Untersuchung zur Apoptose erfolgte durch den AnnexinV-Assay im Durchflusszytometer. Alle Versuche zur Induktion einer Apoptose wurden mit den jeweiligen ED<sub>50</sub>-Konzentrationen der Klebstoffe durchgeführt. Da das PARP-Enzym im Rahmen einer Apoptose gespalten wird (Núñez et al., 1998), mussten zur Untersuchung der Gentoxizität niedrigere Konzentrationen der Klebstoffe verwendet werden (ED<sub>80</sub>-Werte). Die Gewinnung dieser Extrakte erfolgte analog Ansatz B.

#### 3.6.1 Immunzytochemische Bestimmung der PARP-Aktivität

Täglich unterliegt das menschliche Erbgut chemischen und physikalischen Stressfaktoren aus der Umwelt, wodurch die DNA in ihrem Aufbau und ihrer Struktur geschädigt werden kann. Eine Schädigung der DNA kann dabei immense Konsequenzen für die einzelne Zelle, aber auch für den gesamten Organismus haben. Daher sind DNA-Reparaturmechanismen für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase von essentieller Bedeutung. Der enorme Energieeinsatz der Zelle für diesen Prozess zeigt, wie wichtig die DNA-Reparatur ist. Ein komplexes System unterschiedlicher Enzyme ist in der Lage, DNA-Strangbrüche zu reparieren. Ein wichtiger Bestandteil dieses Reparaturmechanismus ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1). Diese Transferase ist ein nukleäres Enzym mit einem Molekulargewicht von 113 kDA und besteht aus drei Domänen, einer c-terminalen NAD-bindenden Domäne, einer Automodifikationsdomäne und einer Domäne mit zwei Zinkfingermotiven am N-Terminus, die es dem Enzym ermöglicht, DNA-Schäden spezifisch zu erkennen und daran kovalent zu binden (Bouchard et al., 2003). PARP-1 katalysiert die Hydrolyse von NAD<sup>+</sup> zu ADP-Ribose und Nikotinamid und überträgt diese ADP-Ribose einerseits auf sich selbst (Auto-Poly-(ADP-Ribosyl)ierung), andererseits auf Chromatinproteine wie das Histon H1. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrfach, wodurch lange und verzweigte Poly-ADP-Ribose (PAR)-Ketten auf den Akzeptorproteinen entstehen. Die genaue Funktion des Enzyms im Rahmen der DNA-Reparatur ist bislang noch nicht bekannt. Gesichert ist, dass PARP konstitutiv exprimiert wird, die PARP-Bildung proportional zur Anzahl von DNA-Strangbrüchen erfolgt (Bürkle et al., 2001) und die Auto-Poly-(ADP-Ribosyl)ierung des Enzyms ein entscheidender Faktor für die Formation eines Proteinkomplexes ist, der den DNA-Schaden repariert (Sato und Lindahl, 1992). Weiterhin scheint die synthetisierte PAR-Kette als ATP-Lieferant für die DNA-Ligase III zu fungieren, wodurch die reparierten DNA-Enden wieder zusammengefügt werden (Oei u. Ziegler, 2000).

**Versuchsablauf des PARP-Assays:** Die Genotoxizität der potentiellen Knochenklebstoffe konnte durch Messung der PARP-Aktivität in den Osteoblasten untersucht werden. Der Nachweis der Aktivität des PARP-1-Enzyms und damit die durch genotoxische Einflüsse induzierten DNA-Strangbrüche erfolgten mittels der indirekten Immunzytochemie. Dabei wurde nicht das Enzym selbst, sondern die synthetisierte Poly(ADP-Ribose)-Kette (PAR) über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. In einem ersten Schritt wurde der Poly(ADP-Ribose)-Komplex mit einem spezifischen Monoklonalen-Maus-Antikörper (10H) markiert. Durch Applikation eines Sekundärantikörpers (Polyclonal-Goat-Mouse-Immunglobuline/FITC), der sich gegen den Primärantikörper richtete und mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelt war, konnte in einem zweiten Schritt diese Bindung sichtbar gemacht werden.

Osteoblasten wurden auf sterilen Deckgläschen kultiviert und bei Erreichen eines subkonfluenten Monolayers mit den ED<sub>80</sub> Konzentrationen von Clearfil New Bond, Excite und Histoacryl im Brutschrank bei 37° C über 24 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Probe. Um eine DNA-Schädigung zu simulieren, wurde einer weiteren Kultur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Konzentration von 0,1 mM für 5 min zugesetzt (Positivkontrolle). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lösungen entfernt, die Proben mit PBS vorsichtig gespült und mit eisgekühlter 10%iger Trichloressigsäure fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Deckgläschen in Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) bei -20° C für jeweils 5 min. Die aufbereiteten Proben wurden erneut mit PBS gespült und dem Monoklonalen-Maus-Antikörper (10H) in Blockierungspuffer im Verhältnis 1:150 bei Raumtemperatur exponiert. Nach 60 min wurden die Deckgläschen zunächst kurz und anschließend zweimal für 5 min gewaschen. Der FITC konjugierte Sekundärantikörper (Polyclonal Goat Mouse Immunoglobuline/FITC) wurde in Blockierungspuffer 50fach verdünnt und die Proben mit diesem Gemisch überschichtet. Die Einwirkzeit betrug erneut 60 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Deckgläschen erneut mehrfach mit PBS gespült und auf Objektträger unter Zugabe von DAPI-Mounting-Medium (=Diamidine-Phenyl-Indol) überführt. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels Zeiss Axioscope und der Software AQM Advance 6. In jeder Probe wurden 50 Zellkerne vermessen und daraus die mittlere Intensität bestimmt. Die verwendeten Filter besaßen eine Wellenlänge von 485 nm für FITC und 360 nm für DAPI. Zusätzlich wurden digitale Bilder des FITC-Signals und der DNA-Färbung mit DAPI angefertigt.

#### **3.6.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von AnnexinV**

In der Zytologie unterscheidet man zwei Formen des Zelluntergangs, die Apoptose und die Nekrose. Im Rahmen von Wachstums- und Differenzierungsprozessen in einem Organismus ist es auch nötig, gezielt Zellen zu eliminieren. Diesen Vorgang des „programmierten“ Zelluntergangs nennt man Apoptose. Man unterscheidet zwischen einer von außen (z.B. durch Immunzellen) in der Zielzelle induzierten Apoptose und einem inneren, von der Zelle selbst verursachten, Zelltod. Bei der von außen induzierten Apoptose wird über Botenstoffe (Zytokine, FasL) und zellmembranständige Rezeptoren (CD95/TNFR-1) eine intrazelluläre proteolytische Enzymkaskade (verschiedene Caspasen) eingeleitet, die den kontrollierten Zelluntergang zu Folge hat. Dieser Vorgang spielt für die normale Geweberegulation eine essenzielle Rolle. Durch DNA-Schäden oder Mangel an Sauerstoff in der Zelle können Apoptosevorgänge allerdings auch direkt von innen aktiviert werden. Am Ende löst sich die Zelle in kleine Vesikel auf, die von Makrophagen phagozytiert werden.

Bei zu großer Schädigung der Zelle ist diese nicht mehr in der Lage, eine Apoptose durchzuführen, es kommt zu einem unkontrollierten Zelluntergang, der Nekrose. Dabei schwillt die Zelle an, platzt und sämtliche zellulären Bestandteile werden freigesetzt. Zahlreiche toxische Substanzen und proteolytische Enzyme führen zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes und zu einer entzündlichen Begleitreaktion.

**Methodische Grundlagen:** Der Nachweis von apoptotischen Zellen ist mit der Durchflusszytometrie möglich. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das Streulichteigenschaften (Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht) und Fluoreszenzeigenschaften von mit Laserlicht angeregten Zellen automatisiert misst. Dieses Messverfahren weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf und ermöglicht durch die standardisierte Messung tausender Zellen eine hohe statistische Aussagekraft.

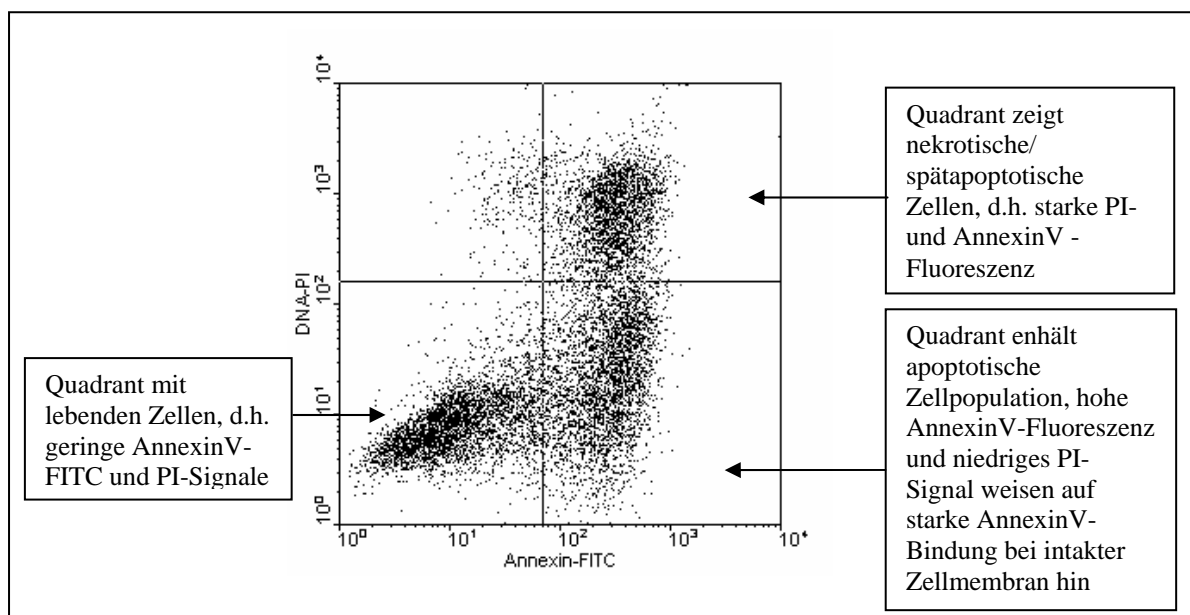
Eine typische Veränderung während der Apoptose stellt der Verlust der Polarität der Zellmembran dar. Es kommt zur Translokation von Phospholipiden wie dem Phosphatidylserin von der Innenseite der bilaminären Zytoplasmamembran an deren Außenseite. AnnexinV weist eine starke Affinität zu Phosphatidylserin auf, kann aber die intakte Zellmembran nicht passieren. Mittels der Markierung von AnnexinV mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC ist es möglich, die Bindung des Proteins an Phosphatidylserin im Durchflusszytometer und damit einen Zelluntergang nachzuweisen. Da nekrotische Zellen, aufgrund der Destruktion der Zellmembran, eine Bindung von AnnexinV an der Innenseite zulassen, ist eine Differenzierung zwischen einer Apoptose und einer Nekrose mit AnnexinV allein nicht möglich. Erst die Kombination mit einem zweiten Parameter, dem Propidiumjodid, lässt eine Unterscheidung von vitalen, apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen zu. Propidiumjodid kann mit der DNA interkalieren, sobald es durch Zellmembrandefekte nach intrazellulär gelangt. Somit zeigen apoptotische Zellen ein Fluoreszenzsignal auf FITC-AnnexinV, aber keines auf Propidiumjodid, wohingegen spätapoptotische/nekrotische Zellen AnnexinV und Propidiumjodid positiv reagieren. Vitale Zellen verhindern eine Bindung beider Stoffe und sind somit doppelt negativ.

**Versuchsablauf des AnnexinV-Assay:** Von allen drei ausgewählten Testsubstanzen wurden die jeweiligen ED<sub>50</sub>-Verdünnungen analog zum Ansatz B hergestellt. Mit diesem Klebstoffextrakt kultivierten wir die Osteoblastenkultur über 48 h. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig abtrypsiniert, zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Arbeitsvorschrift sah folgende Schritte vor:

- Antikörper: AnnexinV-FITC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Inkubationspuffer: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, ad 200 ml, pH=7,4
- Osteoblasten bei 1300 U/min für 3 min zentrifugieren
- Überstand dekantieren, 1 ml Inkubationspuffer hinzugeben und Pellet resuspendieren
- 100 µl der Zellsuspension in ein neues FACS-Röhrchen überführen

- 5 µl AnnexinV-FITC und 10µl Propidiumjodid 5% dazugeben
- Inkubation für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 400 µl Inkubationspuffer hinzufügen
- Messung Streulichteigenschaften und der Fluoreszenz von jeweils 10.000 Zellen im Durchflusszytometer (FSC 300, SSC 180, FITC 320, PI 360)

Als Software zur Messung und graphischen Darstellung diente das Programm FACS Diva Software. Aufgrund der Überlagerung der Fluoreszenzfilter von FITC und Propidiumjodid musste eine Kompensation der Messdaten erfolgen. Es war somit nötig, einen bestimmten Prozentsatz der Fluoreszenz von FITC von der Fluoreszenz des Propidiumjodids (PI) zu subtrahieren und umgekehrt. Die Größe der Kompensation betrug bei  $F(\text{FITC})=1,0\%$  von  $F(\text{PI})$  und bei  $F(\text{PI})=22,3\%$  von  $F(\text{FITC})$ . Die graphische Darstellung erfolgt in einem Dotplot, wobei jeder Punkt die Fluoreszenzeigenschaften einer einzigen Zelle darstellt. Die Einteilung des Diagramms in vier Quadranten ermöglichte eine Zuordnung von vitalen, apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Osteoblasten (Abb.13).



**Abb.13:** Darstellung der Fluoreszenzeigenschaft der Zellen im Dotplot nach Interaktion mit AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (durchflusszytometrische Zweiparameterdarstellung), (Riemschneider, 2001)

### 3.7 Statistische Auswertung

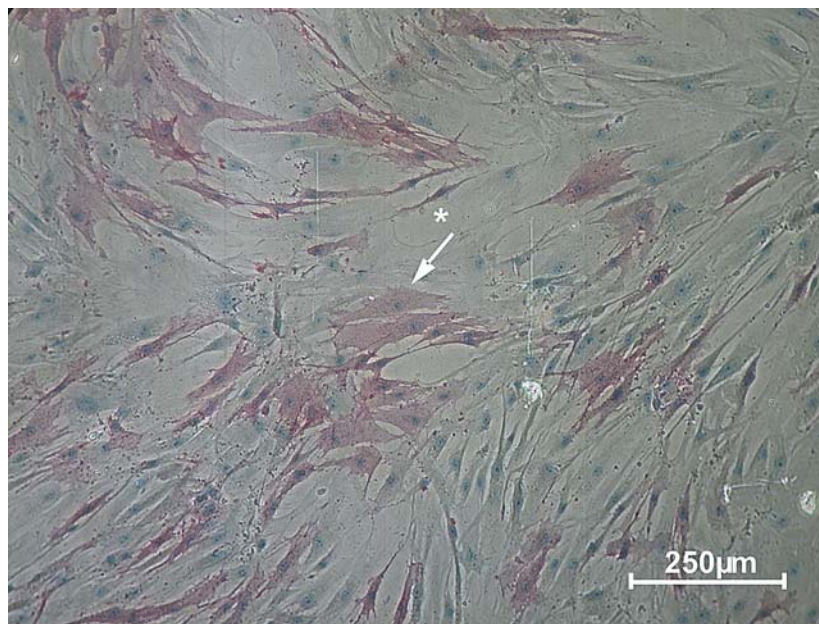
Die gewonnenen metrischen Daten wurden durch Mittelwertvergleiche, ein- und mehrfaktorielle Varianzanalysen mit der Statistiksoftware SPSS 15.0 auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5,0% festgelegt ( $p \leq 0,05$ ). Als Maß für die Streuung wurde jeweils der Standardfehler ermittelt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase als Osteoblastenzellmarker

Durch Anfärbung der Alkalischen Phosphatase konnte der überwiegende Teil der kultivierten Zellen als Osteoblasten identifiziert werden. AP-positive Zellen imponierten im Lichtmikroskop durch ihr violettes Zytoplasma (Abb.14). Es fanden sich auch viele Zellen ohne eine AP-Färbung. Dies heißt jedoch nicht zwangsweise, dass diese Zellen keine Osteoblasten sind. Besonders junge Osteoblasten müssen erst einen funktionsfähigen Proteinbiosyntheseapparat entwickeln, andere Zellen könnten sich nicht in der Synthesephase des Zellzyklus befinden und deshalb AP-negativ sein. Allerdings muss von einer gewissen Verunreinigung der Kulturen mit Fibroblasten ausgegangen werden. Fibroblasten ähneln im Phänotyp den Osteoblasten, exprimieren aber keine Alkalische Phosphatase.



**Abb.14:** Anfärbung der Alkalischen Phosphatase als ein spezifischer Marker für Osteoblasten. AP-positive Zellen imponieren durch ein violettes Zytoplasma (\*); lichtmikroskopische Aufnahme der Osteoblastenkultur nach 14-tägiger Anzucht.

## 4.2 Direkte Wirkung – Langzeitversuch

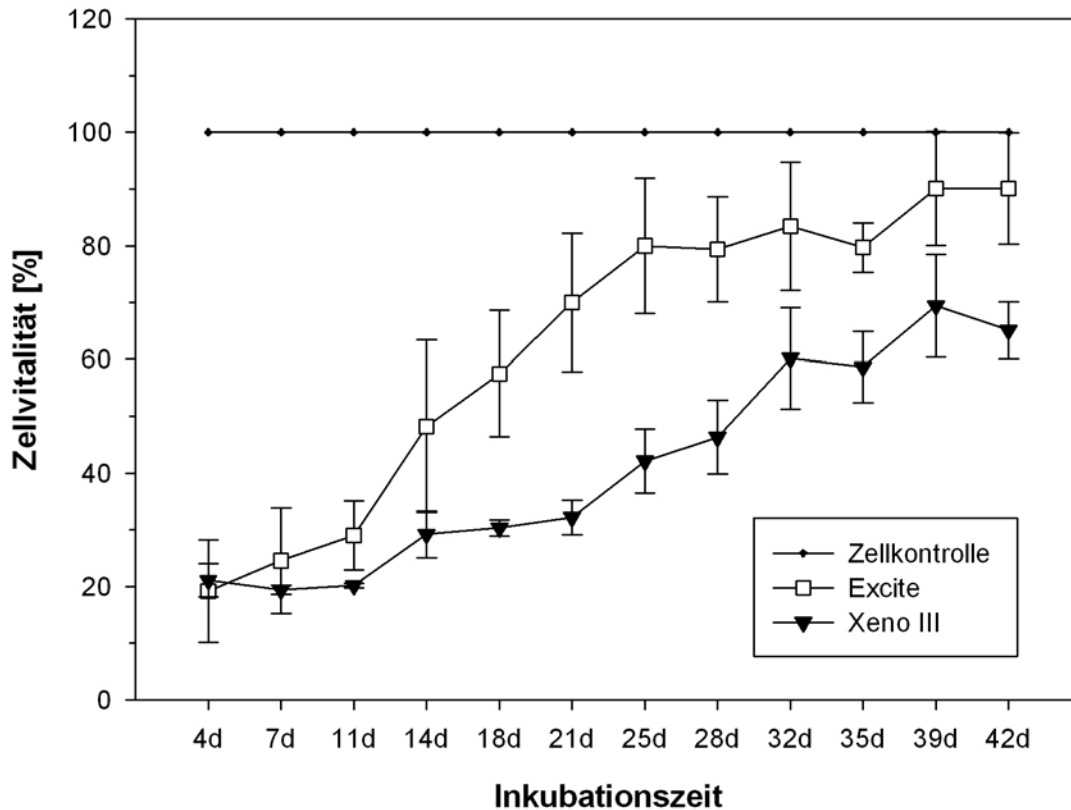
Ziel des Langzeitversuches war es, die Auswirkung der Testsubstanzen im Hinblick auf die Vitalität, das Wachstum und die Morphologie der Osteoblasten im Kontakt mit einer applizierten Klebstoffprobe über einen Zeitraum von sechs Wochen zu untersuchen. Mittels des Resazurin-Tests wurde die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette in den Knochenzellen als Maß ihrer Vitalität gemessen. Weiterhin sollten lichtmikroskopische Untersuchungen Auskunft über das Wachstumsverhalten der Osteoblasten im Kontaktbereich mit den Testsubstanzen geben. Clearfil New Bond konnte nicht untersucht werden, da die Klebstoffprobe instabil war und sich im Medium auflöste.

### 4.2.1 Resazurin Assay

Zu Beginn erwiesen sich alle potentiellen Knochenklebstoffe als stark toxisch auf die Osteoblasten. Dabei inhibierten die Dentinhaftvermittler die Zellatmung in höherem Maße (Vitalität nach 4 d ca. 20%) als die Cyanoacrylate (Vitalität nach 4 d ca. 50%). Trotz des anfänglichen Vitalitätseinbruchs, kam es bei allen Testmaterialien mit zunehmender Versuchsdauer wieder zu einem deutlichen Anstieg der Zellvitalität (Abb.15, 16).

**Dentinhaftvermittler:** Die mit Dentinhaftvermittlern in Kontakt stehenden Zellen zeigten nach anfänglich hohem Vitalitätsverlust (s.o.) einen Anstieg der Aktivität der Atmungskette. Diese Zunahme vollzog sich bei beiden Produkten nahezu linear über den gesamten Versuchszeitraum (Abb.15). Nach sechs Wochen waren die höchsten Vitalitätswerte zu verzeichnen. Die Zellprobe mit Xeno III erreichte eine Aktivität von 65,1%, was einer Verdreifachung der Zellvitalität im Vergleich zum Versuchsbeginn entspricht. Eine Aktivität von 90,1% in Relation zur Zellkontrolle war in der „Excite-Kultur“ nachweisbar. Somit nahm die mitochondriale ATP-Syntheseleistung über den Untersuchungszeitraum um den Faktor fünf zu. Trotz dieser starken Vitalitätszunahme der Osteoblasten, erreichten diese im Gegensatz zu den Cyanoacrylaten nicht die Werte der Zellkontrolle. Unter den Dentinhaftvermittlern war das lichterhärtende Adhäsiv Excite biologisch am verträglichsten. Die gemessenen Unterschiede im Vitalitätsverlust sind statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

## Direkte Wirkung Dentinhaftvermittler



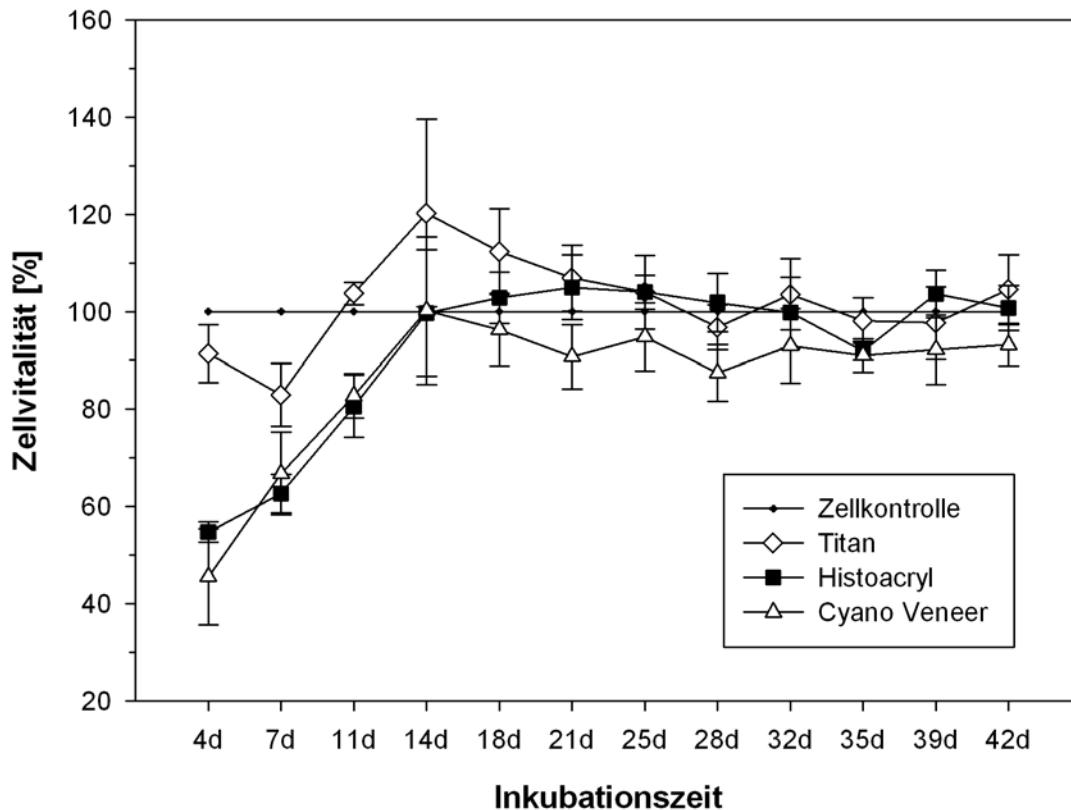
**Abb.15:** Ergebnisse des Resazurin-Tests im direkten Kontakt der Dentinhaftvermittlerproben mit den Osteoblastenkulturen über sechs Wochen, arithmetische Mittelwerte der Zellvitalität von je drei Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (100%)

**Cyanoacrylate:** Nach Inkubationszeit von 14 Tagen erreichten die mit Cyanoacrylaten behandelten Zellen die Aktivität der Zellkontrolle und ließen über den verbleibenden vierwöchigen Untersuchungszeitraum keine weitere Beeinträchtigung der Zellatmung erkennen. Die Vitalitätswerte der Osteoblasten unter Einfluss beider Cyanoacrylate lagen über die gesamte Versuchszeit eng beieinander. Geringfügig zellverträglicher erwies sich das Histoacryl gegenüber dem Cyano Veneer (Abb.16).

Die Titanplatte führte über den gesamten Versuchszeitraum zu keiner Beeinträchtigung der Zellvitalität.

Die statistische Auswertung ergab für beide Cyanoacrylate und für die Titanplatte im Mittel über alle Inkubationszeiten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ( $p > 0,05$ ).

## Direkte Wirkung Cyanoacrylate, Titan



**Abb.16:** Ergebnisse des Resazurin-Tests im direkten Kontakt der Cyanoacrylatproben und der Titanplatte mit den Osteoblastenkulturen über sechs Wochen, arithmetische Mittelwerte der Zellvitalität von je drei Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (100 %)

**Tab.3:** Ergebnisse des Resazurin-Tests, arithmetische Mittelwerte der Zellvitalität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Zellen mit den Klebstoffen (je drei Versuchsreihen in Doppelbestimmung), Vitalitätsangaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (100 %)

Zeit [Tag]	Zellvitalität [%]					
	Zellkontrolle	Excite	Xeno III	Histoacryl	Cyano Veneer	Titan
4	100,0	19,1	21,1	54,7	45,5	91,3
7	100,0	24,5	19,4	62,7	66,8	83,0
11	100,0	29,0	20,1	80,6	82,8	103,7
14	100,0	48,2	29,2	99,7	100,2	120,3
18	100,0	57,5	30,3	102,8	96,3	112,3
21	100,0	70,0	32,2	105,0	90,7	106,9
25	100,0	80,0	42,1	104,0	94,8	104,0
28	100,0	79,3	46,3	101,9	87,5	96,7
32	100,0	83,5	60,2	99,8	93,0	103,6
35	100,0	79,7	58,6	91,9	91,0	98,2
39	100,0	90,1	69,4	103,6	92,2	97,6
42	100,0	90,1	65,1	100,8	93,2	104,5

#### 4.2.2 Lichtmikroskopie

Der quantitative Resazurin-Test wurde durch eine qualitative Beurteilung der Zellkultur im Lichtmikroskop ergänzt. Die Aufnahmen zeigen, wie die Osteoblasten im Kontaktbereich zu den Klebstoffen bzw. zur Titanplatte wuchsen (Abb.17, 18, 19).

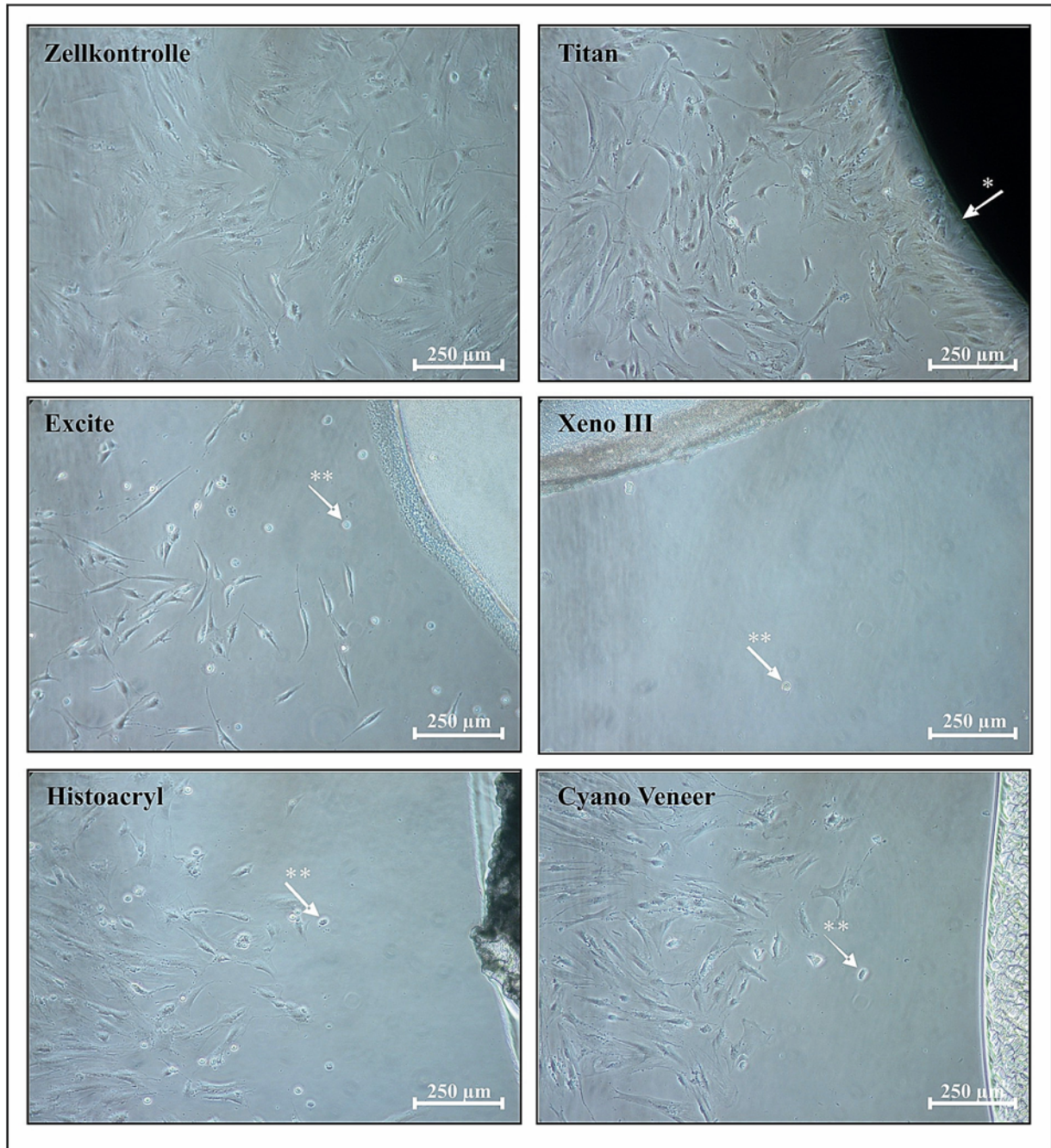
**Nach vier Tagen** zeigte sich im Lichtmikroskop folgendes Zellwachstum:

Die Zellkontrolle wies einen ca. 50%igen konfluenten, adhärennten Monolayer auf. Eine vergleichbare Zelldichte war in der Umgebung der Titanplatte zu beobachten. Die Osteoblasten lagerten sich direkt an das Titan an (Abb 17:\*)).

**Dentinhaftvermittler:** Im Kontaktbereich der Dentinhaftvermittler war eine stark verminderte Zellzahl auszumachen. Beim lichthärtenden Excite hatte sich ein zellfreier Hof um das Polymerisat gebildet, was ein deutliches Indiz für Zytotoxizität ist. Zahlreiche tote Zellen schwammen im Kulturmedium (Abb17 \*\*). Die zytotoxische Wirkung von Xeno III war noch ausgeprägter. In unmittelbarer Umgebung des Materials wuchsen keine Zellen.

**Cyanoacrylate:** Eine Hofbildung war auch bei den beiden Cyanoacrylaten festzustellen, wobei eine dichtere Zellpopulation als bei den Dentinhaftvermittlern und ein scharfer Übergang in den zellfreien Gürtel zu beobachten war (Abb.17). Auch bei diesen Proben fanden sich einige abgestorbenen Zellen im Nährmedium.

Zytotoxizität lag somit bei allen untersuchten potentiellen Knochenklebstoffen vor, allerdings differierte das Ausmaß erheblich. Die Dentinhaftvermittler stellten im Vergleich zu den Cyanoacrylaten den größeren Zellstressor dar. Das Osteosynthesematerial Titan hingegen ließ keinerlei zellschädigende Effekte auf die Osteoblastenkultur erkennen.



**Abb.17:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit den Testmaterialien nach einer Inkubationszeit von vier Tagen ( \* Zellen in direktem Kontakt mit der Titanoberfläche, \*\* abgestorbene nicht adhärenente Zellen )

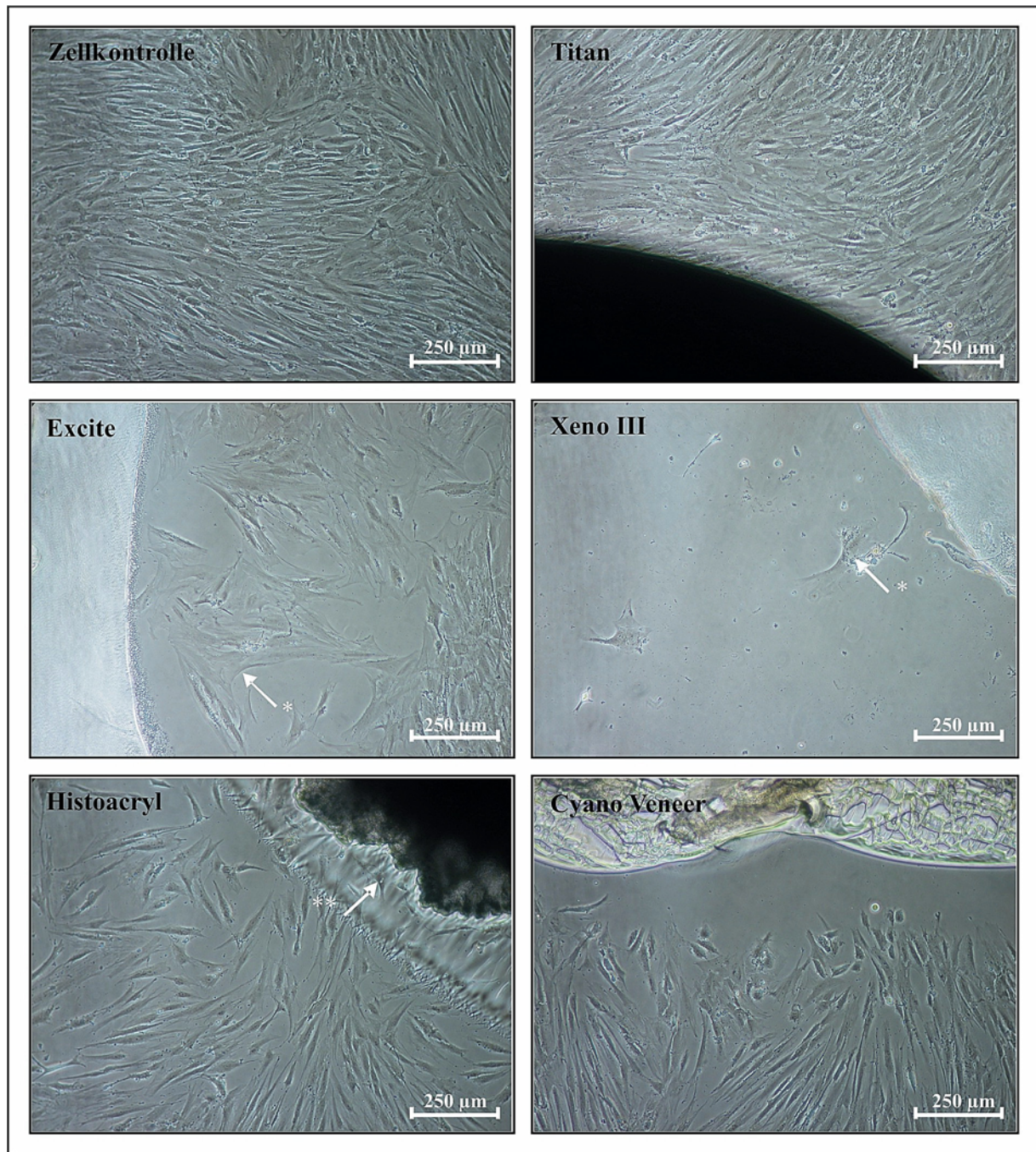
**Nach 14-tägiger Inkubation** war folgendes Zellwachstum zu beobachten:

Die Osteoblasten der Kontrolle und in der Umgebung der Titanplatte bildeten einen gleichmäßigen und dichten Zellrasen. Dabei wurde die Miniplatte regelrecht von den Knochenzellen eingemauert (Abb 18).

**Dentinhaftvermittler:** Im Kontaktbereich der Dentinhaftvermittler waren deutlich weniger Zellen zu beobachten, die besonders große Zellvolumina aufwiesen (siehe Abb.18 \*). Anders als nach vier Tagen, waren nach 14-tägiger Kontaktzeit mit Excite eine Proliferation der Osteoblasten und eine Reduktion der Breite des peripheren Hofes festzustellen. Nahezu zellfrei zeigte sich der Kontaktbereich um das Adhäsiv Xeno III. Die eigentliche Zellpopulation befand sich in großer Distanz zur Klebstoffprobe. Xeno III hemmte das Wachstum der Osteoblasten erheblich und zeigte sich insgesamt toxischer als Excite.

**Cyanoacrylate:** Die Zelldichte in der Umgebung der Cyanoacrylate war höher als bei den Dentinhaftvermittlern, aber lag unter der Konfluenz der „Titankultur“ und der Zellkontrolle. Beide Materialien führten zu einer ähnlichen Dichte an Osteoblasten. Jedoch wuchsen einige Osteoblasten direkt an das Histoacryl an bzw. sogar auf seiner Oberfläche (vgl. Abb.18 \*\*), während bei Cyano Veneer ein zellfreier Hof sichtbar war.

Auch nach 14-tägiger Inkubation zeigten sich im Lichtmikroskop die Cyanoacrylate weniger toxisch als die Dentinhaftvermittler. Die Titanplatte führte zu keinen sichtbaren Effekten.



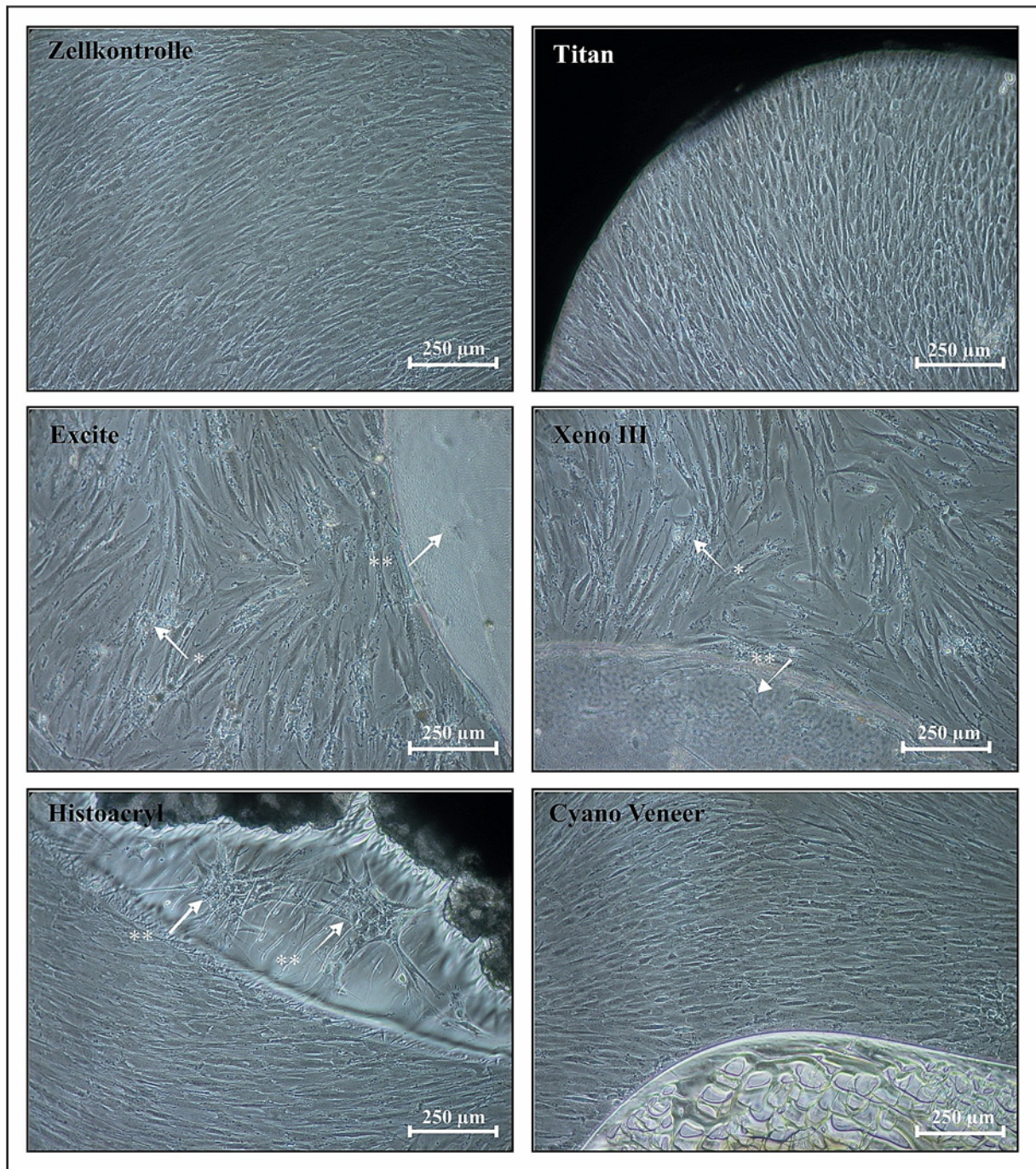
**Abb.18:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit den Testmaterialien nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen. ( \* großvolumige Zellen, \*\*Zellwachstum auf der Klebstoffoberfläche )



Die abschließende lichtmikroskopische Beurteilung der Osteoblastenkulturen fand nach **sechs Wochen** statt, einer Zeit, in der in vivo die knöcherne Durchbauung einer Fraktur soweit fortgeschritten ist, dass eine vollständige funktionelle Belastung erfolgen kann. Die Kontrolle zeigte einen extrem dichten, teilweise bereits mehrschichtigen Zellrasen. Die Osteoblasten lagen nicht wahllos verstreut, sondern sie bildeten einen strukturierten Zellverband (Abb.19). Eine geordnete, radiär auf die Miniplatte zuwachsende Kultur entstand bei der Titanprobe. Auch hier fanden sich sehr dicht wachsende und vereinzelt übereinandergelagerte Knochenzellen. Dabei wuchsen die Zellen direkt an die Osteosyntheseplatte an und schlossen diese vollständig und gleichmäßig dicht ein. Über den gesamten Untersuchungszeitraum ging von der Titanplatte keine Zellschädigung aus.

**Dentinhaftvermittler:** Eine geringere Zelldichte war bei den zwei getesteten Dentinhaftvermittlern zu erkennen (Abb.19). Dabei zeigte sich bei beiden Produkten ein ähnliches Bild. Die Zellen waren locker verteilt, ohne eine erkennbare strukturierte Anordnung. Im Vergleich zu den anderen Proben lagen große Zelleiber mit einigen Fortsätzen vor. Zwischen und auf den Zellen waren plaqueartige Ablagerungen erkennbar, die vermutlich Klebstoffbestandteile oder zelluläre Produkte darstellen. Im Gegensatz zur Betrachtung nach 14 Tagen, war ein zellfreier Hof sowohl bei Excite als auch bei Xeno III nicht mehr zu erkennen. Die Knochenzellen wuchsen direkt an das Polymerisat an. Aufgrund der Transluzenz der Adhäsive war es möglich, die Oberfläche der Materialien zu beurteilen. Bei beiden Dentinhaftvermittlern konnte vereinzelt ein Wachstum von Zellen auf den Klebstoffoberflächen beobachtet werden. Die auf der Xeno III-Oberfläche wachsenden Zellen ließen morphologische Zeichen einer toxischen Schädigung, wie eine kugelige Morphologie und eine Degeneration der Fortsätze, erkennen. Derartige Veränderungen waren in der „Excitekultur“ nicht sichtbar.

**Cyanoacrylate:** Ein Zellwachstum auf dem Klebstoff konnte auch bei Histoacryl festgestellt werden. Die Osteoblasten lagerten sich zu Haufen zusammen und standen über ihre Fortsätze miteinander in Verbindung (Abb.19). Bei beiden Cyanoacrylaten war die Zelldichte ähnlich hoch wie die der Kontrolle und der Titanprobe. Diese gleichmäßig starke Zellkonfluenz reichte bis direkt an den Klebstoff heran. Die Materialien wurden vollständig und dicht von den Osteoblasten umschlossen. Insgesamt ähnelte die Morphologie der Zellkultur sowohl bei Histoacryl als auch bei Cyano Veneer sehr stark der Titanprobe. Lichtmikroskopisch konnten nach einer Inkubationszeit von sechs Wochen keine toxischen Wirkungen der Cyanoacrylate auf die Osteoblasten festgestellt werden.

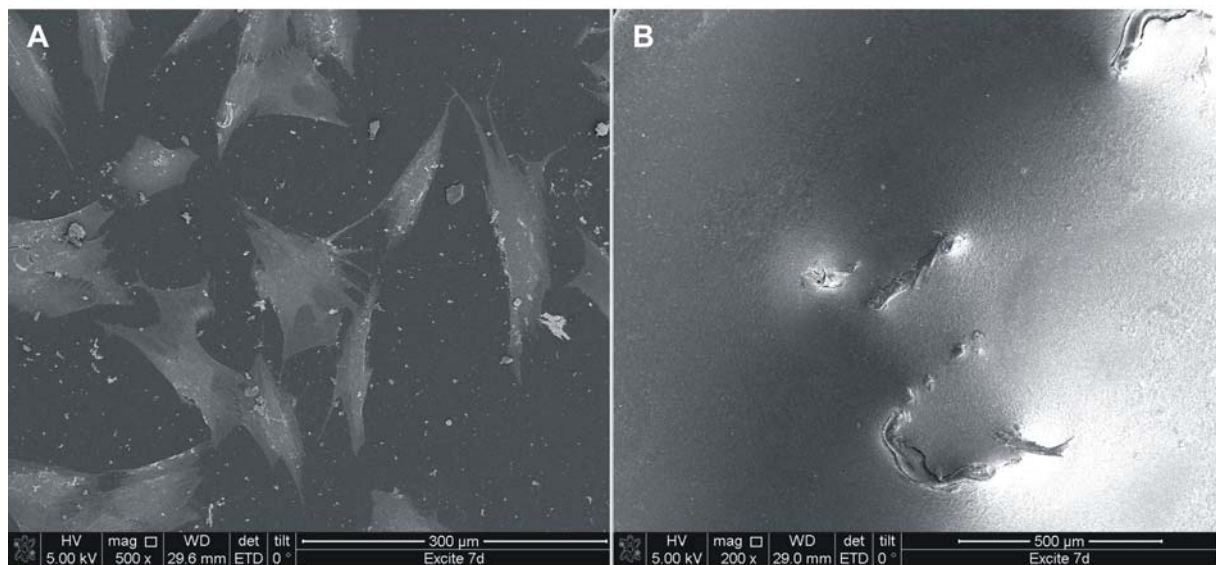


**Abb.19:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit den Testmaterialien nach einer Inkubationszeit von sechs Wochen. ( \* plaqueartige Ablagerungen, \*\* Zellwachstum auf der Klebstoffoberfläche )

### 4.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

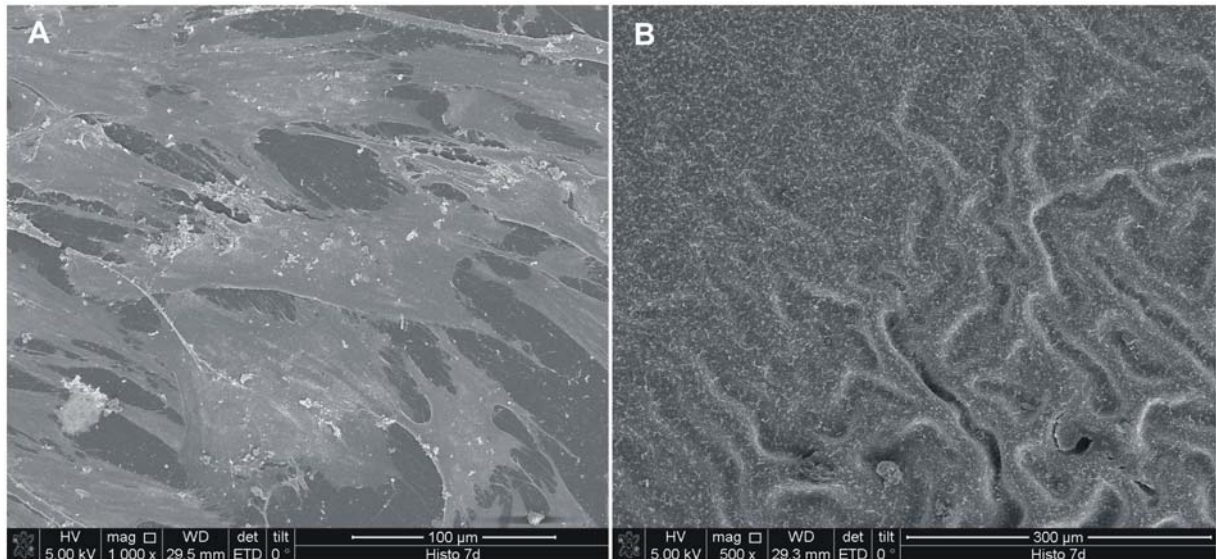
**Nach sieben Tagen** konnten folgende Ergebnisse gesichert werden:

**Excite:** Der Dentinhaftvermittler Excite ließ in seiner Umgebung ein Zellwachstum zu (Abb.20 A). Die Zellen lagen einzeln locker verstreut, waren polygonal geformt und wiesen nur spärliche Zellfortsätze auf, die auf keine ausgeprägte interzelluläre Kommunikation schließen lassen. Ein Wachstum auf der Oberfläche von Excite konnte nicht beobachtet werden (Abb.20 B). Die hell leuchtende Oberfläche des Dentinhaftvermittlers resultiert aus Atomen mit einer hohen Ordnungszahl wie z.B. Barium.



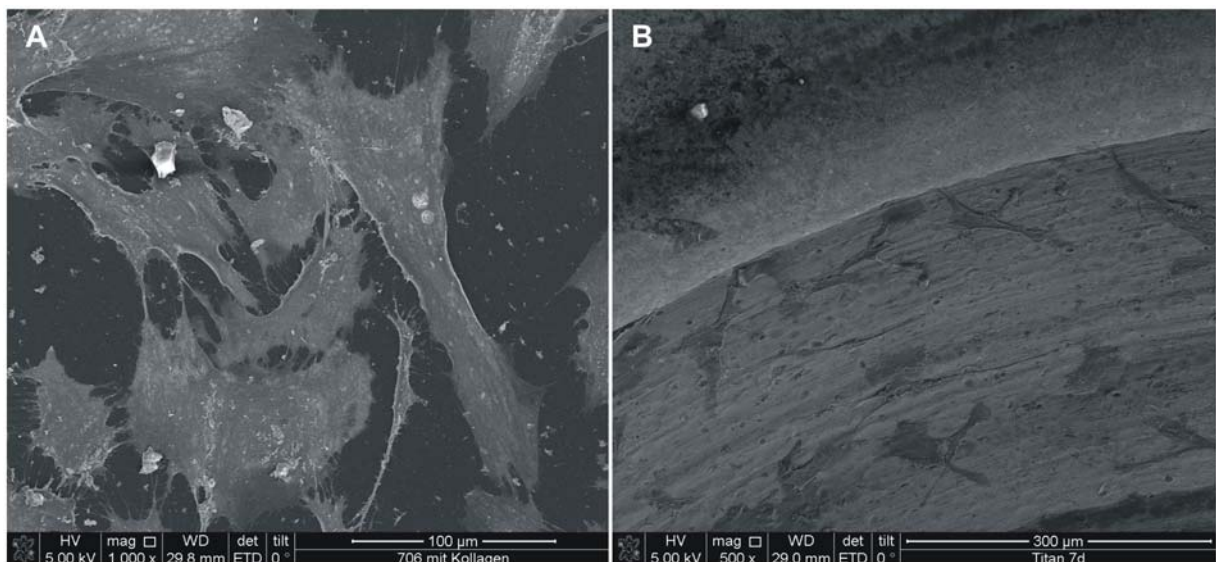
**Abb.20:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit Excite nach sieben Tagen; A: einzeln liegende Zellen in der Kulturschale; B: Klebstoffoberfläche ohne Zellbesiedlung

**Histoacryl:** Osteoblasten in Kontakt mit dem Cyanoacrylat Histoacryl proliferierten in sieben Tagen stärker als die „Excitekultur“. Es bildeten sich große, ausdifferenzierte Zellen mit sehr vielen Fortsätzen. Die Zellen lagen teilweise übereinander und bildeten ein komplexes engmaschiges Netzwerk (Abb.21 A). Allerdings fand kein Zellwachstum auf der Oberfläche des Cyanoacrylates statt (Abb.21 B).



**Abb.21:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit Histoacryl nach sieben Tagen; A: Osteoblasten bilden einen komplexen Zellverband mit ausgeprägten Zellfortsätzen; B: Klebstoffoberfläche ohne Zellbesiedlung

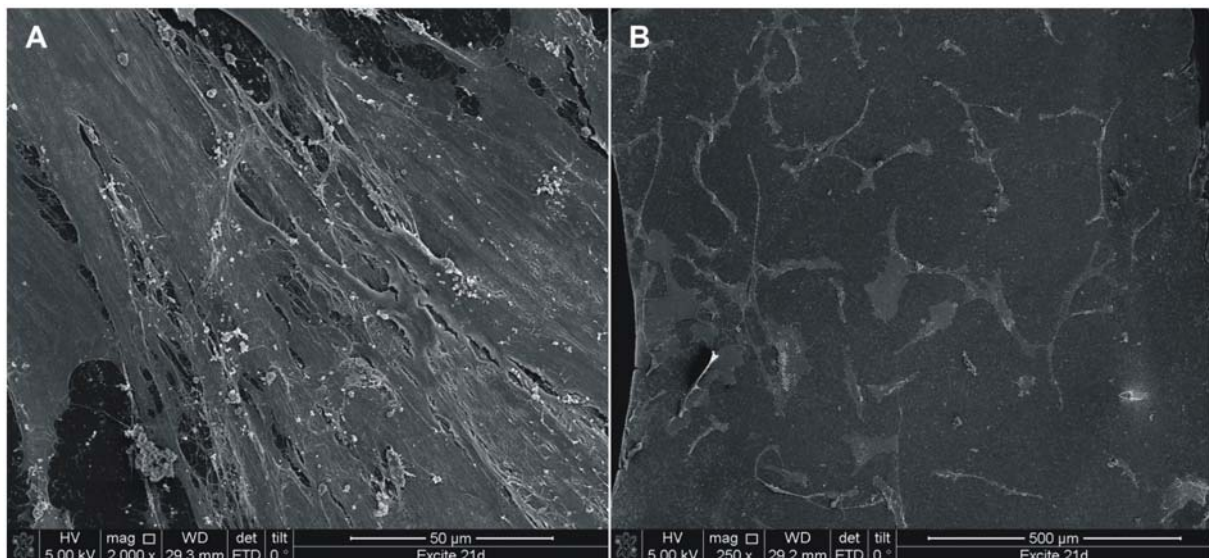
**Titan:** Das Zellbild ähnelte stark der „Histoacrylkultur“. Es fanden sich polymorphe vitale Osteoblasten unterschiedlicher Größe, die über zahlreiche Fortsätze ein funktionelles Zellgeflecht bildeten (Abb.22 A). Speziell im Bereich der Schraubenlöcher der Titanplatte konnten einzeln liegende Zellen beobachtet werden. Ein Zellverband vergleichbar mit den Osteoblasten in der Kulturschale existierte auf der Titanoberfläche jedoch nicht (Abb.22 B).



**Abb.22:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit einer Titanminiplatte nach sieben Tagen; A: ausdifferenzierter Osteoblastenmonolayer in der Kulturschale; B: Zellwachstum auf der Titanoberfläche

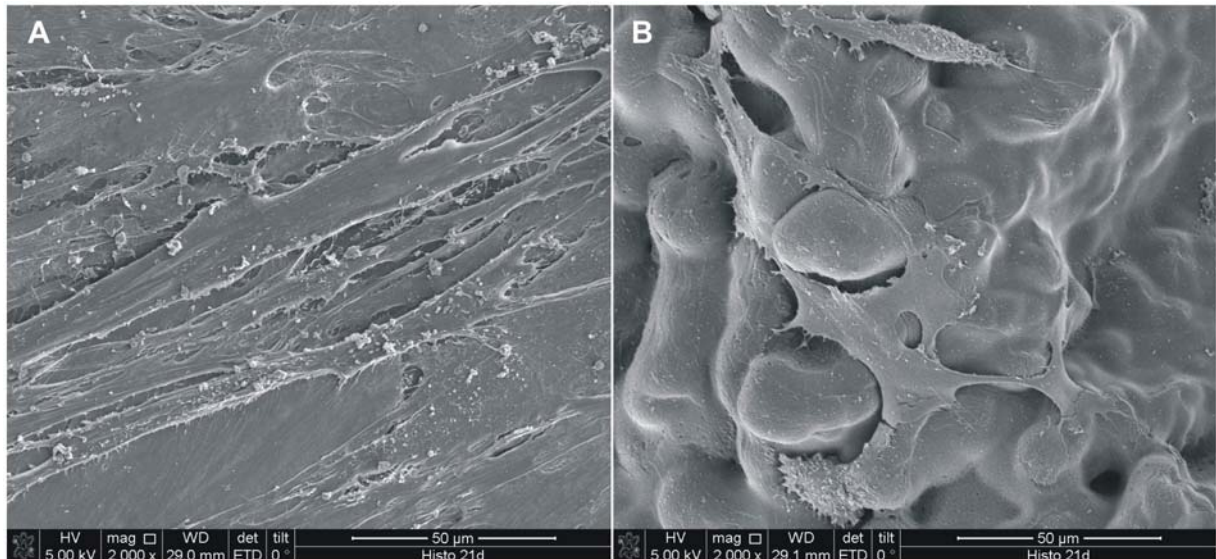
**Nach einer Kontaktzeit von 21 Tagen** mit den Klebstoffen zeigten die Osteoblasten folgendes Proliferationsverhalten:

**Excite:** Nach 21 Tagen konnte im Vergleich zur Probe nach sieben Tagen eine deutliche Proliferation der Osteoblasten in der Kulturschale und die Bildung eines Zellnetzwerkes festgestellt werden. Gleichzeitig zeigten sich rundliche weiße Zellauflagerungen, die womöglich exprimierte Proteine darstellen (Abb.23 A). Teilweise erfolgte eine Besiedlung der Exciteoberfläche mit Osteoblasten (Abb.23 B). Die Zellmorphologie unterschied sich jedoch von den Zellen auf der Kulturschale. Eine Degeneration der Zellfortsätze, das überwiegende Fehlen von Zellkontakten und die Schrumpfung des Zellkörpers deuten auf eine toxische Schädigung hin (Abb.23 B). Am Rande sei auf die veränderte Oberflächenfarbe und Struktur des Adhäsivs hingewiesen. Das ehemals glatte, schneeweiße Excite zeigte als Folge einer Erosion oder einer Degeneration eine gräulich gekörnte Oberfläche (Abb.23 B).



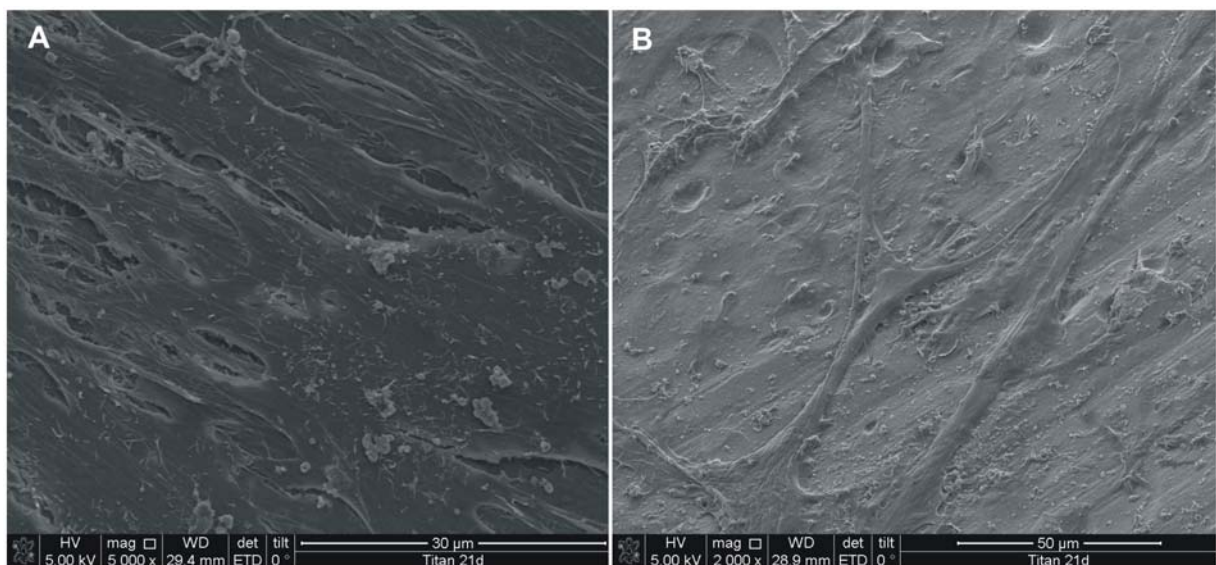
**Abb.23:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit Excite nach 21 Tagen; A: dichter Zellverband in der Kulturschale; B: Klebstoffoberfläche zeigt Zellbesiedlung

**Histoacryl:** Einen extrem dichten, teilweise mehrschichtigen Zellrasen zeigte die „Histoacrylkultur“ nach 21-tägiger Kultivierung (Abb.24 A). Die Osteoblasten wirkten im Gegensatz zur Probe nach sieben Tagen sehr dicht und gestreckt. Auf der Zelloberfläche waren zahlreiche weißliche Aggregationen zu erkennen, die entweder ausgefallene Mediumbestandteile oder zelleigene Proteine darstellen. Die Oberfläche des Cyanoacrylats wurde stellenweise von Osteoblasten besiedelt. Einige dieser Zellen zeigten eine polygonale Form mit Zellfortsätzen, andere waren abgerundet und fortsatzlos (Abb.24 B).



**Abb.24:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit Histoacryl nach 21 Tagen, A: hochkonfluenter Zellrasen; B: Osteoblastenwachstum auf der Histoacryloberfläche

**Titan:** Der ausgewachsene, komplex strukturierte Zellverband der Titankultur ließ auf seiner Oberfläche Eiweißaggregate erkennen, die Ausdruck einer ausgeprägten Proteinbiosynthese sein könnten (Abb.25 A). Die direkt auf der Titanoberfläche wachsenden Osteoblasten bildeten über lange ausgeprägte Zellfortsätze ebenfalls ein Zellnetzwerk. Zeichen einer toxischen Schädigung, wie eine Abkugelung der Zellen oder eine Fortsatzdegeneration, waren nicht erkennbar (Abb.25 B).



**Abb.25:** REM-Aufnahmen der Osteoblasten in direktem Kontakt mit einer Titanminiplatte nach 21 Tagen; A: konfluenter, engmaschiger Zellverband mit Proteinaggregation B: differenzierte Osteoblasten auf der Titanoberfläche

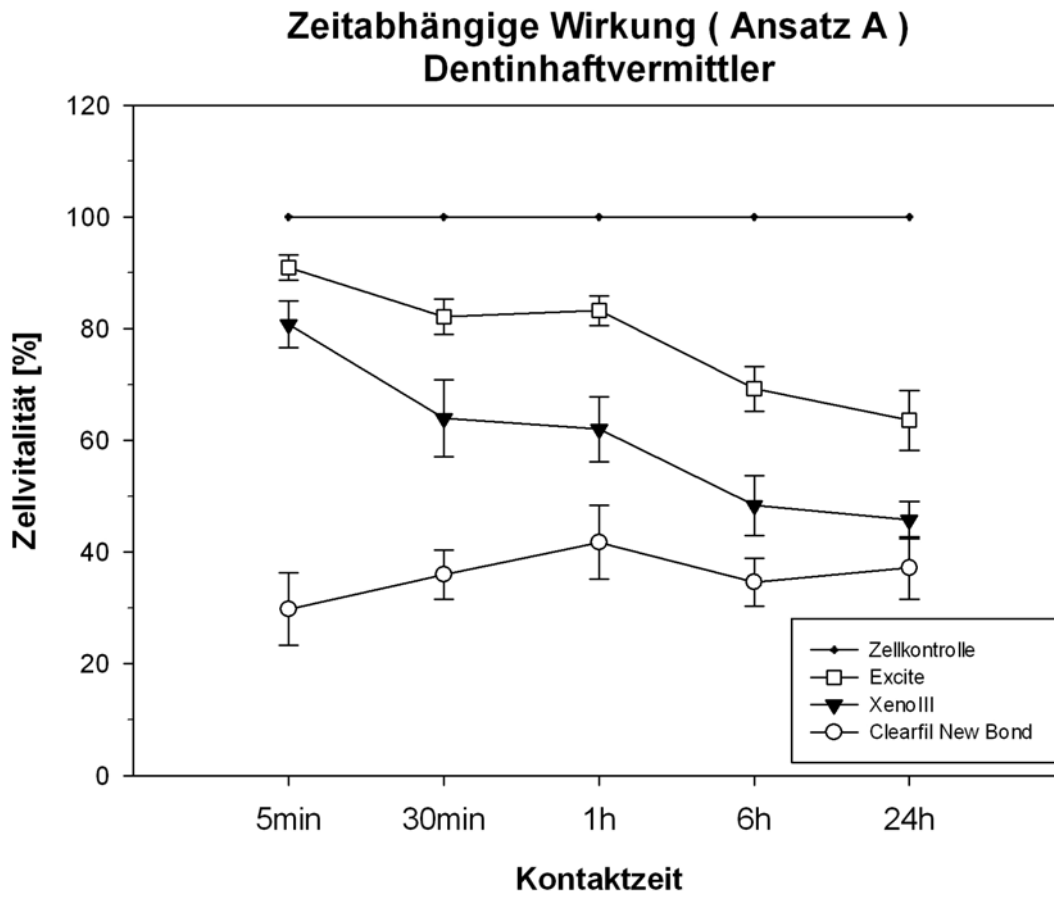
### 4.3 Indirekte Wirkung

#### 4.3.1 Ansatz A: Zeitabhängige Wirkung (MTT-Test)

Die Ergebnisse des MTT-Tests in Abhängigkeit von der Kontaktzeit der Klebstoffe mit dem Kulturmedium sind in Form arithmetischer Mittelwerte und den jeweiligen Standardfehlern in den Abbildungen 26 und 27 sowie in der Tabelle 4 dargestellt. Die relative Vitalität [%] der Zellen bestimmte sich aus der Extinktion der jeweiligen Probe in Relation zur Extinktion der unbehandelten Zellkontrolle (100% Vitalität). Der Versuch umfasste 10 Messungen in Doppelbestimmung.

Bei allen getesteten potentiellen Knochenklebstoffen kam es zum Rückgang der Aktivität der Dehydrogenasen in den Zellen und damit zur Abnahme ihrer Vitalität (Abb.26, 27). Das Ausmaß der Toxizität differierte deutlich in Abhängigkeit vom Typ des Adhäsivs und von der Kontaktzeit der Klebstoffpellets mit dem Kulturmedium. Alle Testsubstanzen, außer dem Adhäsiv Clearfil New Bond, zeigten mit Zunahme der Kontaktzeit eine kontinuierliche Abnahme der Vitalität der Osteoblasten. Im Vergleich der beiden geprüften Klebstoffklassen erwiesen sich die Dentinhaftvermittler zellschädigender als die Cyanoacrylate. Beim Osteosynthesematerial Titan waren keine toxischen Effekte auf die Knochenzellen nachweisbar (Abb.27).

**Dentinhaftvermittler:** Unter den Dentinhaftvermittlern hemmte das chemisch härtende Clearfil New Bond die Aktivität der Enzyme am stärksten. Bereits nach einer Kontaktzeit von fünf Minuten war ein starker zytotoxischer Effekt zu verzeichnen (Zellvitalität nur noch 29,8%; vgl. Tab.4). Über den Zeitraum von 24 h blieb diese toxische Wirkung nahezu konstant (Zellvitalität von 35-42%). Als Dentinhaftvermittler mit den geringsten zytotoxischen Effekten auf die Osteoblasten erwies sich das lighthärtende Adhäsiv Excite. Nach 5 min erreichte die Vitalität 91% und nach 24 h noch 64% der Zellkontrolle (Tab.4). Die Ergebnisse für den selbstkonditionierenden Dentinhaftvermittler Xeno III lagen zwischen den Werten von Excite und Clearfil New Bond (Abb.26).

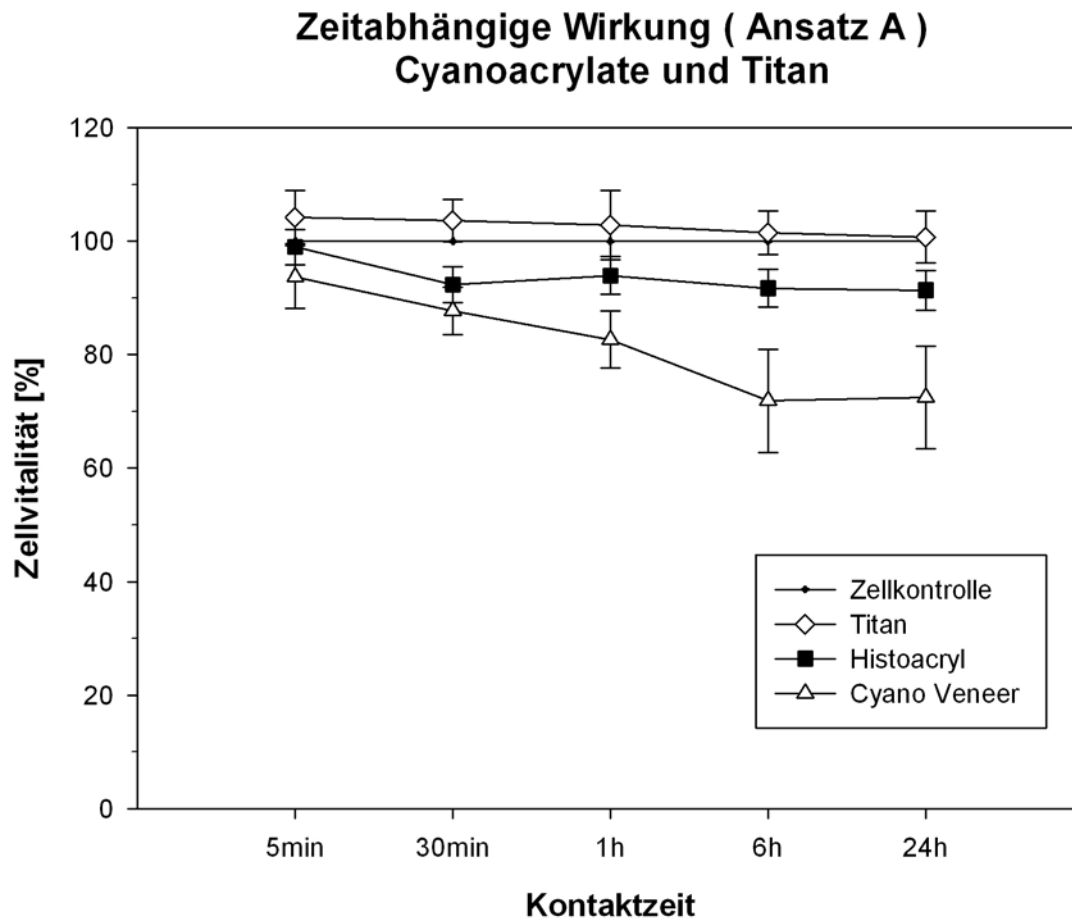


**Abb.26:** Ergebnisse des MTT-Tests in Abhängigkeit von der Kontaktzeit (Ansatz A) der Dentinhaftvermittler mit Kulturmedium. Darstellung der arithmetischen Mittelwerte der Zellvitalität von je 10 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (100%)

**Cyanoacrylate:** In der Gruppe der Cyanoacrylate stellte sich Histoacryl weniger zellschädigend als Cyano Veneer dar (Abb.27). Die Vitalität der Osteoblasten fiel zu keinem Zeitpunkt unter 90% der Zellkontrolle. Als einziger Klebstoff zeigte Histoacryl im Mittel keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $p=0,184$ ). Damit erwies sich Histoacryl in der zeitabhängigen Wirkung unter allen getesteten Klebstoffen als zellverträglichstes Material. Nach kurzer Expositionszeit waren die Ergebnisse von Cyano Veneer mit denen von Histoacryl vergleichbar (nach 30 min Vitalität 87,7% bei Cyano Veneer und 92,3% bei Histoacryl; Tab.4). Bei längeren Kontaktzeiten zeigte Cyano Veneer im Gegensatz zu Histoacryl eine deutliche Zunahme der Toxizität (Zellvitalität 24h = 72,5%).

Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ergab, dass die Unterschiede der gemessenen Vitalitätswerte bei allen getesteten Klebstoffen, außer dem Cyanoacrylat Histoacryl ( $p=0,184$ ), im Mittel über die Zeit hochsignifikant zur Zellkontrolle waren ( $p \leq 0,001$ ). Die Werte für die Titanplatte lagen im Bereich der Zellkontrolle. Die geringfügigen Unterschiede hier waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,584$ ).





**Abb.27:** Ergebnisse des MTT-Tests in Abhängigkeit von der Kontaktzeit (Ansatz A) der Cyanoacrylate und der Titanplatte mit Kulturmedium. Darstellung der arithmetischen Mittelwerte der Zellvitalität von je 10 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (100%)

**Tabelle 4:** Ergebnisse der indirekten Wirkung (MTT-Test) in Abhängigkeit von der Kontaktzeit (Ansatz A), arithmetische Mittelwerte von 10 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Vitalitätsangaben in Prozent in Bezug zur Kontrolle (=100%)

Kontaktzeit	Zellvitalität [%]						
	Clearfil	Excite	Xenolll	Histoacryl	Cyano Veneer	Titan	Kontrolle
5min	29,8	90,9	80,8	98,9	93,7	104,2	100,0
30min	36,0	82,1	64,0	92,3	87,7	103,6	100,0
1h	41,8	83,3	62,0	93,9	82,7	102,9	100,0
6h	34,6	69,3	48,3	91,7	71,9	101,4	100,0
24h	37,2	63,6	45,7	91,4	72,5	100,7	100,0

#### 4.3.2 Ansatz B: Konzentrationsabhängige Wirkung (MTT-Test)

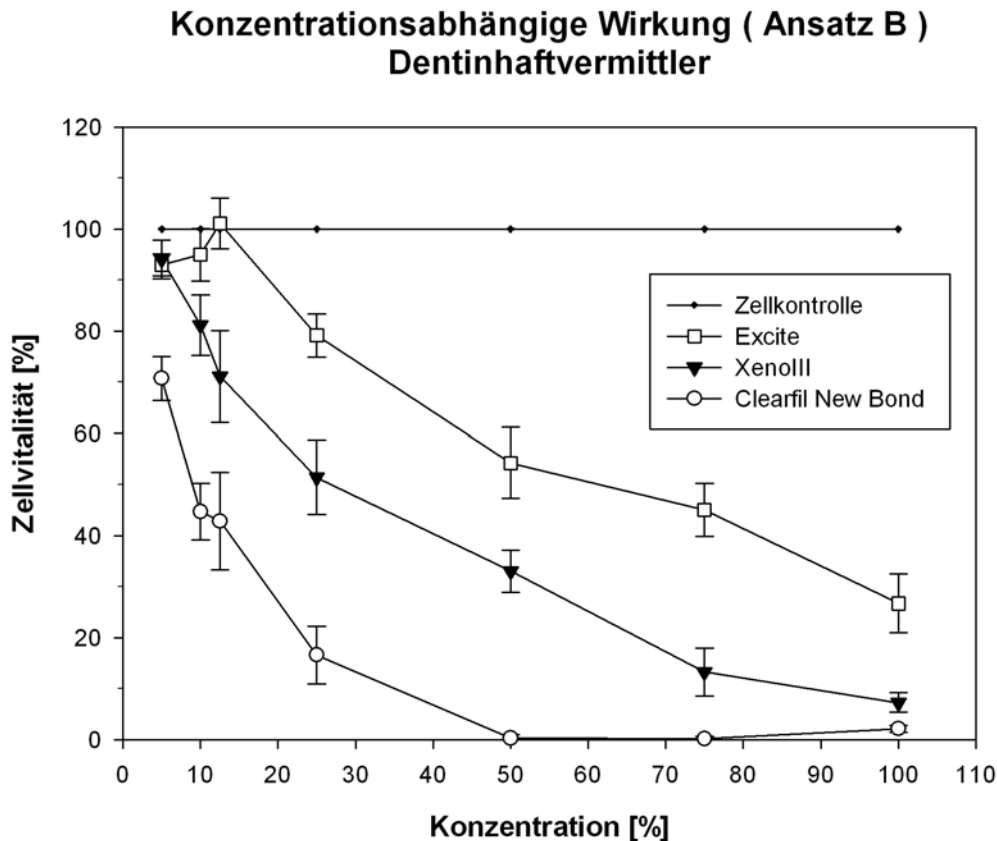
Im Versuchsansatz B wurden in fünf Testreihen sieben Elutionen der Testsubstanzen (5,00%-100%) hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung auf die Osteoblasten untersucht. Der MTT-Test als Indikator der Dehydrogenasenaktivität diente auch hier als Messinstrument für die Zellvitalität. Die Enzymaktivität der Zellkontrolle wurde auf 100% festgelegt und bildete jeweils die Referenz für die Messwerte der anderen Proben. Einen Überblick über die Ergebnisse geben die Abbildungen 28, 29 und die Tabelle 5.

Bei steigender Konzentration der löslichen Klebstoffbestandteile reagierten die Zellen mit einer Verminderung ihrer Zellvitalität. Analog zum Versuchsansatz A zeigten sich die Dentinhaftvermittler zytotoxischer als die Cyanoacrylate.

**Dentinhaftvermittler:** Die Dosis-Wirkungskurve für die getesteten Adhäsive zeigte einen annähernd asymptotischen Verlauf (Abb.28). Der lighthärtende Dentinhaftvermittler Excite war am geringsten zellschädigend. Niedrige Konzentrationen von 5% bis 12,5% blieben ohne toxischen Effekt. Ein statistisch nachweisbarer Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) zur Zellkontrolle ergab sich erst bei einer Eluatdosis von 50%. Wurde die Konzentration höher, nahm die Vitalität der Osteoblasten jedoch deutlich ab (Vitalität von 26,7% bei  $c=100\%$ ; Tab.5). Die Kurve für Excite ließ einen Schwellenwert für eine toxische Wirkung erkennen. Darunter versteht man die Maximalkonzentration eines Stoffes, bei der an der Zielzelle gerade noch keine toxische Reaktion festzustellen ist. Der Schwellenwert für Excite betrug ca. 12,5%.

Zellen, die mit Eluaten des selbstkonditionierenden Haftvermittlers Xeno III behandelt worden waren, zeigten bei zunehmender Konzentration ebenfalls einen kontinuierlichen Abfall der Dehydrogenasenaktivität (Abb.28). Das Spektrum reichte von 94,1% Vitalität bei 5%iger Lösung bis nur noch 7,3% Vitalität in der maximalen Dosis (Tab.5).

Das chemisch härtende Clearfil New Bond verursachte die stärksten zytotoxischen Effekte. Selbst geringe Konzentrationen der Stammlösung inhibierten die Enzymaktivität (Vitalität von 70,7% bei  $c=5\%$ ; Tab.5). Die Kurve verläuft deutlich asymptotisch und zeigt ab einer Dosis von 50% kaum noch eine messbare Zellvitalität (Abb.28). Die erfassten Unterschiede waren bei allen getesteten Konzentrationen von Clearfil statistisch signifikant.

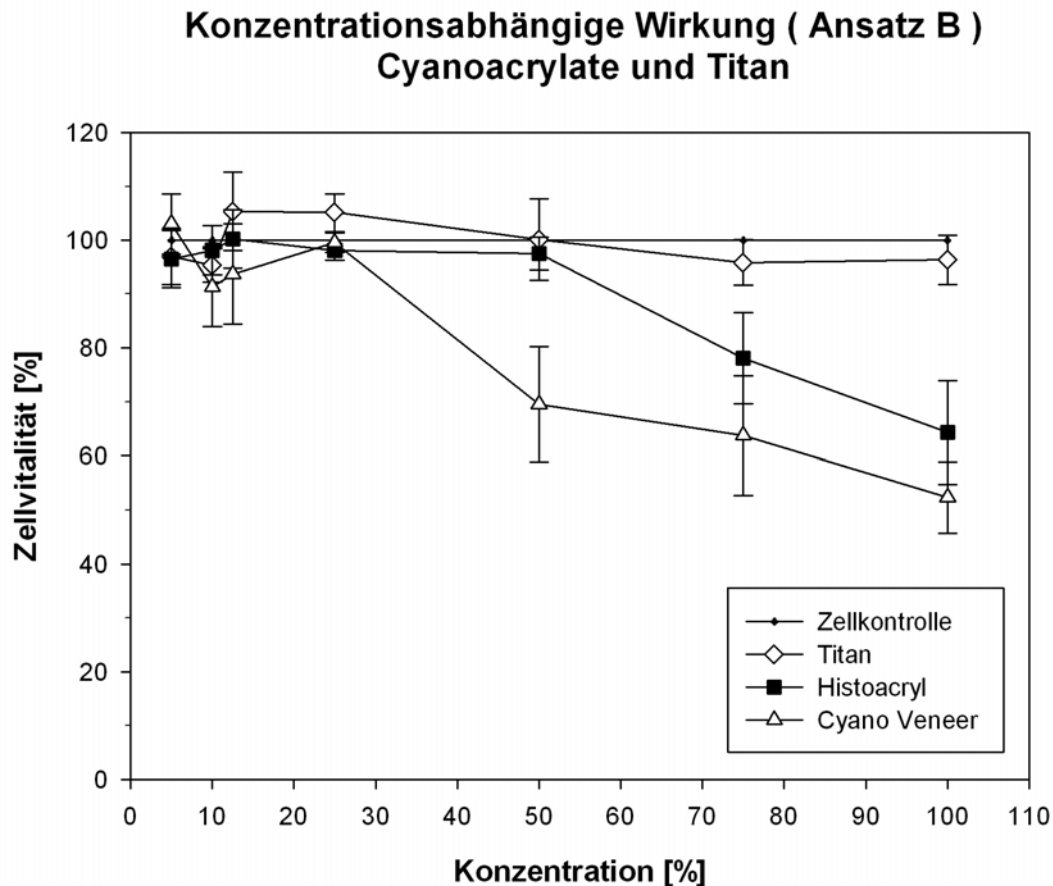


**Abb.28:** Ergebnisse des MTT-Tests in Abhängigkeit von der Konzentration der Dentinhaftvermittler (indirekte Wirkung, Ansatz B), arithmetische Mittelwerte der Zellvitalität von 5 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle

**Cyanoacrylate:** Beide Cyanoacrylate erwiesen sich in niedrigen Konzentrationen als zellverträglich (Abb.29). Im Dosisbereich zwischen 5% bis 25% ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Vitalitätswerte in Bezug zur Zellkontrolle (Vitalität bei  $c=25\%$ : Histoacryl 98,1%,  $p>0,05$ ; Cyano Veneer 99,6%,  $p>0,05$ ). Eine deutliche Abnahme der Vitalität erfolgte bei Cyano Veneer ab einer 50%igen Lösung (Vitalität=69,5%; Tab.5). Histoacryl ließ in dieser Verdünnung mit 97,6%iger Enzymaktivität keine toxische Wirkung erkennen. Ein zellschädigender Effekt dieses Weichgewebeklebstoffs war erst bei höherer Konzentration festzustellen (Vitalität=78,10% bei  $c=75\%$ ). Unverdünnte Lösungen ( $c=100\%$ ) beider Substanzen führten jedoch annähernd zu einer Halbierung der Aktivität der Dehydrogenasen (Tab 5). Während für Excite der Schwellenwert für Toxizität bei 12,5% lag, betrug er für die Cyanoacrylate Cyano Veneer ca. 25% und Histoacryl ca. 50%.

Die Titaneluate zeigten über den gesamten Messbereich keine zytotoxische Wirkung auf die Osteoblasten. Geringe Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,862$ ).

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% in Bezug zur Kontrolle fand sich im Mittel bei allen potentiellen Knochenklebstoffen, dabei waren die Messwerte für Histoacryl signifikant ( $p=0,026$ ) und für Clearfil New Bond, Excite, Xeno III und Cyano Veneer hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $p\leq 0,001$ ).



**Abb.29:** Ergebnisse des MTT-Tests in Abhängigkeit von der Konzentration der Cyanoacrylate und der Titanplatte (indirekte Wirkung, Ansatz B), arithmetische Mittelwerte der Zellvitalität von je 5 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Angaben in Prozent im Vergleich zur Zellkontrolle (=100%)

**Tab.5:** Zytotoxizität bei unterschiedlichen Konzentrationen der Klebstoffe bei indirekter Wirkung nach Inkubation über 24h (AnsatzB), arithmetische Mittelwerte von 5 Versuchsreihen in Doppelbestimmung, Vitalitätsangaben in Prozent im Vergleich zur Zellkontrolle (=100%)

Eluat- konzentration	Zellvitalität [%]						
	Clearfil New Bond	Excite	Xeno III	Cyano Veneer	Histoacryl	Titan	Kontrolle
5,0%	70,7	93,0	94,1	103,0	96,5	96,9	100,0
10,0%	44,7	95,0	81,2	91,3	98,1	95,3	100,0
12,5%	42,9	101,1	71,1	93,7	100,2	105,3	100,0
25,0%	16,6	79,1	51,4	99,6	98,1	105,1	100,0
50,0%	0,3	54,3	33,1	69,5	97,6	100,1	100,0
75,0%	0,2	45,0	13,3	63,7	78,1	95,9	100,0
100,0%	2,2	26,7	7,3	52,3	64,3	96,3	100,0

Aus den Ergebnissen konnte die mittlere effektive Dosis ( $ED_{50}$ ) ermittelt werden. Dabei handelt es sich um die Konzentration eines Stoffes, die eine 50%ige Reduktion der Vitalität der exponierten Zellen verursacht. Je größer die dafür notwendige Dosis ist, desto geringer ist das zytotoxische Potential der Testsubstanz einzustufen. Die  $ED_{50}$ -Werte ermöglichten ein Ranking der Adhäsive nach ihrer Toxizitätsstärke (siehe Tab.6).

Für die Cyanoacrylate und die Titanproben konnten keine definitiven  $ED_{50}$ -Konzentrationen bestimmt werden, da selbst die unverdünnten Stammlösungen zu keiner Halbierung der Vitalität führten. Ein Ranking war jedoch durch die Angabe des größten gemessenen Vitalitätsverlustes möglich.

Unter den getesteten Materialgruppen war das Titan mit einer Zellvitalität von 96,3% in der unverdünnten Lösung nicht toxisch (Platz1). Danach folgte die Gruppe der Cyanoacrylate und als am zellschädigsten erwiesen sich die Dentinhaftvermittler. Mit einer Enzyminhibition auf 64,3% bei Inkubation mit der Stammlösung zeigte sich unter den Cyanoacrylaten Histoacryl verträglicher (Platz 2) als Cyano Veneer (Platz 3, max. Enzymhemmung auf 52,3%). Die Eluate der Dentinhaftvermittler schädigten die Zellen stärker und ließen  $ED_{50}$ -Konzentrationen bestimmen. Das lichthärtende Adhäsiv Excite ergab einen  $ED_{50}$ -Wert von 62,2% (Platz 4). Deutlich toxischer erwiesen sich der selbstkonditionierende Haftvermittler Xeno III mit einem  $ED_{50}$  von 27,5% (Platz 5) und das chemische Polymerisat Clearfil New Bond mit einer  $ED_{50}$ -Dosis von nur 9,0% (Platz 6) (Tab.6).

**Tab.6.:** Einstufung der potentiellen Knochenklebstoffe nach ihrer Toxizitätsstärke; Angabe der Zellvitalität bei 100%iger Eluatkonzentration (=7 Pellets in 7ml Medium für 24h), den ermittelbaren  $ED_{50}$ -Werten und dem daraus resultierenden Toxizitätsranking; (CA = Cyanoacrylat, DA = Dentinadhäsiv; 1=geringste Zytotoxizität, 6= höchste Zytotoxizität)

Material	Testmedium	Eluat-konzentration	Vitalität	$ED_{50}$ -Werte	Ranking
Titan	Lösung aus 7 polymerisierten Klebstoffpellets in 7ml Kulturmedium für 24 Stunden	100%	96,30%	---	1.
Histoacryl (CA)		100%	64,30%	---	2.
Cyano Veneer (CA)		100%	52,30%	---	3.
Excite (DA)		100%	26,70%	62,2%	4.
Xeno III (DA)		100%	7,30%	27,5%	5.
Clearfil New Bond (DA)		100%	2,20%	9,0%	6.

## 4.4 Untersuchungen zur Genotoxizität und zur Apoptoseinduktion

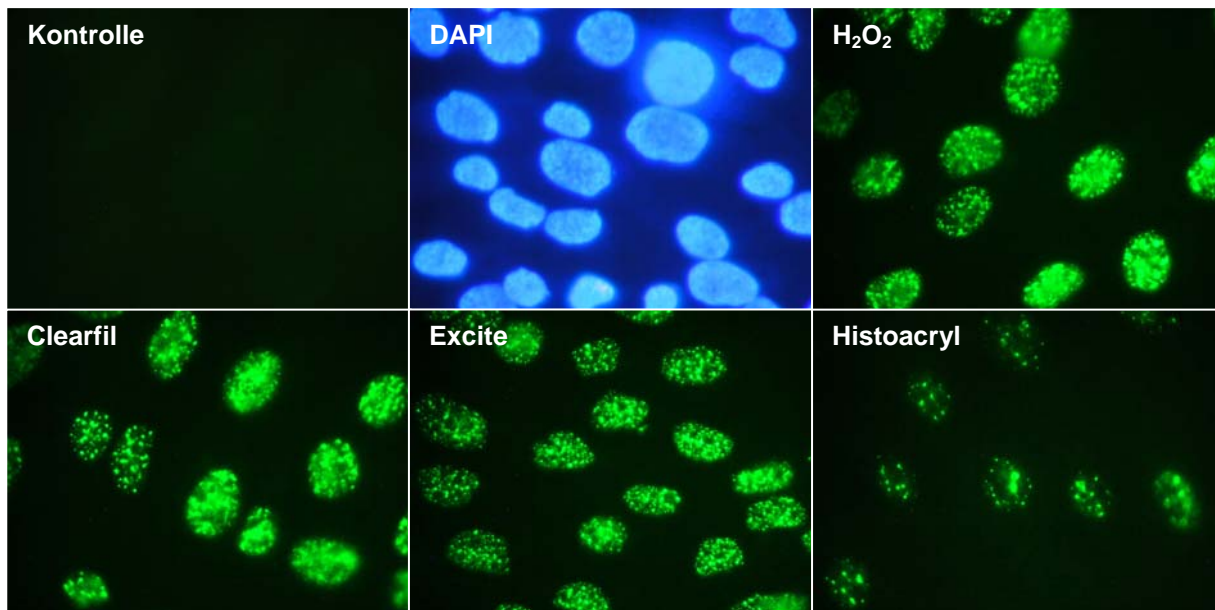
### 4.4.1 Immunzytochemische Bestimmung der PARP-Aktivität

Nachdem die Zytotoxizität der Klebstoffe umfassend untersucht wurde, sollte eine mögliche genotoxische Wirkung der Testsubstanzen über eine immunzytochemische Bestimmung der Aktivität des PARP-1 Enzyms evaluiert werden. Dieses Enzym wird ausschließlich durch DNA-Strangbrüche aktiviert und stellt einen wichtigen Faktor bei der DNA-Reparatur dar. Das Reaktionsprodukt von PARP-1, die Poly-ADP-Ribose, kann über eine indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Der PARP-Assay ermöglicht somit die Detektion von Strangbrüchen in der DNA, die durch die Klebstoffe induziert sein könnten.

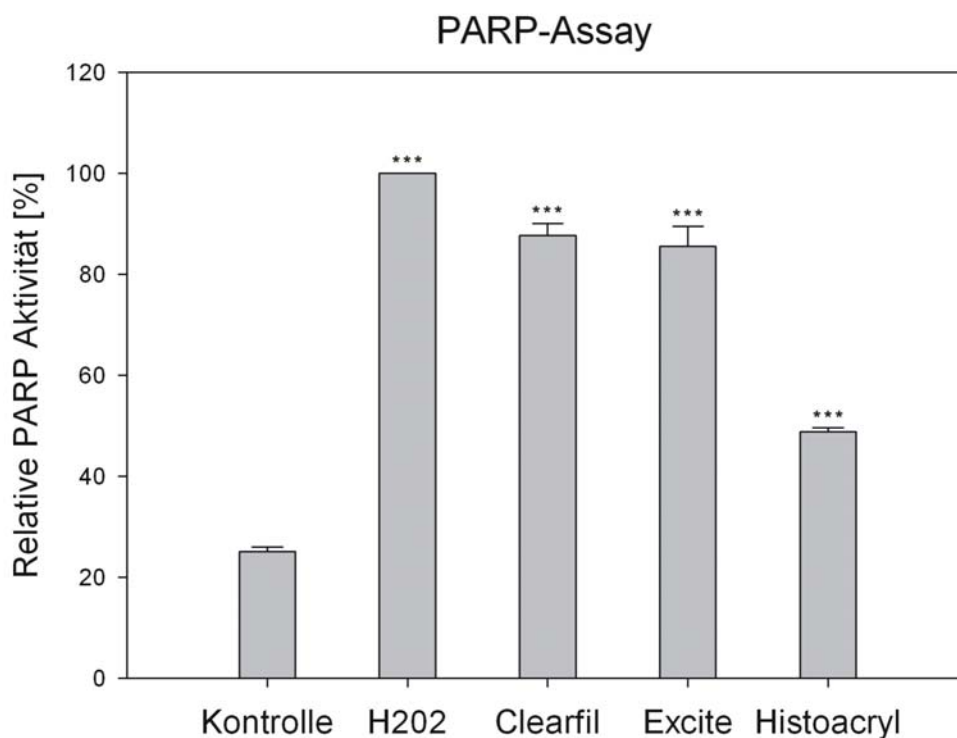
Es zeigte sich, dass alle Testsubstanzen zu einer Aktivierung von PARP-1 führten. Die im Fluoreszenzmikroskop grün leuchtenden Zellkerne signalisierten die Bildung von Poly-ADP-Ribose-Ketten und waren ein Indiz für eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch die Klebstoffe (Abb.30). Die Intensität der Fluoreszenz erschien bei Histoacryl schwächer als bei den Dentinhaftvermittlern Clearfil New Bond und Excite (Abb.30). Da die Stärke der Fluoreszenz mit der Anzahl an Strangbrüchen korreliert, kann von einer geringeren Genotoxizität dieses Cyanoacrylats im Vergleich zu den Dentinhaftvermittlern ausgegangen werden.

Unbehandelte Osteoblasten dienten als Negativkontrolle und zeigten keine PARP-Aktivität (Abb.30). Stark fluoreszierende Zellkerne fanden sich hingegen bei den mit  $H_2O_2$  exponierten Osteoblasten (Positivkontrolle). Mittels der DAPI-Färbung (blau) konnten die fluoreszierenden Strukturen als Zellkerne identifiziert werden.

Die quantitative Analyse der Ergebnisse (Abb.31) zeigt, dass die durch Clearfil und Excite induzierte PARP-Aktivität und damit die Genotoxizität dieser beiden Dentinhaftvermittler annähernd dem Schädigungspotential von  $H_2O_2$  (Positivkontrolle) entsprechen. Wie bereits auf den Fluoreszenzbildern ersichtlich, erwies sich das Cyanoacrylat Histoacryl als weniger DNA-schädigend. Der geringe Messwert der Negativkontrolle resultierte aus der Hintergrundfluoreszenz und täuschte lediglich eine PARP-Aktivität vor. Insgesamt zeigten sich hochsignifikante Unterschiede der PARP-Aktivität aller Proben zur unbehandelten Kontrolle ( $p \leq 0,001$ ).



**Abb.30:** Immunzytochemischer Nachweis der Aktivität von PARP-1 nach Inkubation der Osteoblasten mit den ED<sub>80</sub>-Eluaten der Klebstoffe für 24h. Die unbehandelte Kontrolle zeigt keine PARP-1-Expression. Der blaue Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) diente dem Nachweis nukleinsäurehaltiger Zellkerne. Sowohl die Positivkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch die Klebstoffe Clearfil, Excite und Histoacryl führten zu einer Aktivierung des PARP-1-Enzyms (grün fluoreszierende Zellkerne); Vergrößerung 100x



**Abb.31:** Quantitative Auswertung des PARP-Assays nach Messung der Fluoreszenzintensität. Darstellung des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung aus 3 Versuchsreihen (Messung von je 50 Zellkernen), Angabe der PARP-Aktivität in Prozent im Vergleich zur Positivkontrolle (\*\*\*) hochsignifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ( $p \leq 0,001$ )

#### 4.4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung von AnnexinV

Mit dieser Untersuchung galt es die Frage zu klären, in welchem Ausmaß eine Schädigung der Zellen stattfindet. Geringe Zellschädigungen können durch intrazelluläre Reperaturmechanismen kompensiert werden, größere hingegen induzieren einen Zelltod, der entweder kontrolliert und damit für das umliegende Gewebe schonend abläuft (Apoptose) oder unkontrolliert als Nekrose, die mit einer entzündlichen Reaktion verbunden ist.

Als Indikator für eine Apoptose diente die Bindung von AnnexinV an Phosphatidylserin, die im Durchflusszytometer analysiert wurde. Drei potentielle Knochenklebstoffe wurden ausgewählt und die Osteoblasten analog zu Ansatz B den ED<sub>50</sub>-Konzentrationen der Klebstoffeluate für 48 Stunden exponiert. Getestet wurden die Dentinhaftvermittler Clearfil New Bond und Excite und das Cyanoacrylat Histoacryl. Da für Histoacryl kein ED<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden konnte, wurde die unverdünnte Stammlösung untersucht.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zur Apoptose sind in Abb.32 grafisch und in Abb.33 quantitativ dargestellt. Eine Quadranteneinteilung ermöglichte eine Zuordnung von vitalen, apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen (Abb.32).

Die Kontrolle zeigte einen überwiegenden Anteil vitaler Zellen (73%), 18% der Zellen erwiesen sich als nekrotisch und ca. 6% apoptotisch. Die relativ große nekrotische Fraktion lässt sich durch den Vorgang des Ablösens der Zellen vom Schalenboden mittels Trypsin erklären, wobei einige Zellen sterben. Der geringe apoptotische Anteil kann als natürlicher Prozess im Rahmen von Zellerneuerungen gewertet werden. Die potentiellen Knochenklebstoffe führten zu einer deutlichen Erhöhung der apoptotischen, aber auch teilweise der nekrotischen Zellpopulation (Abb.32, 33).

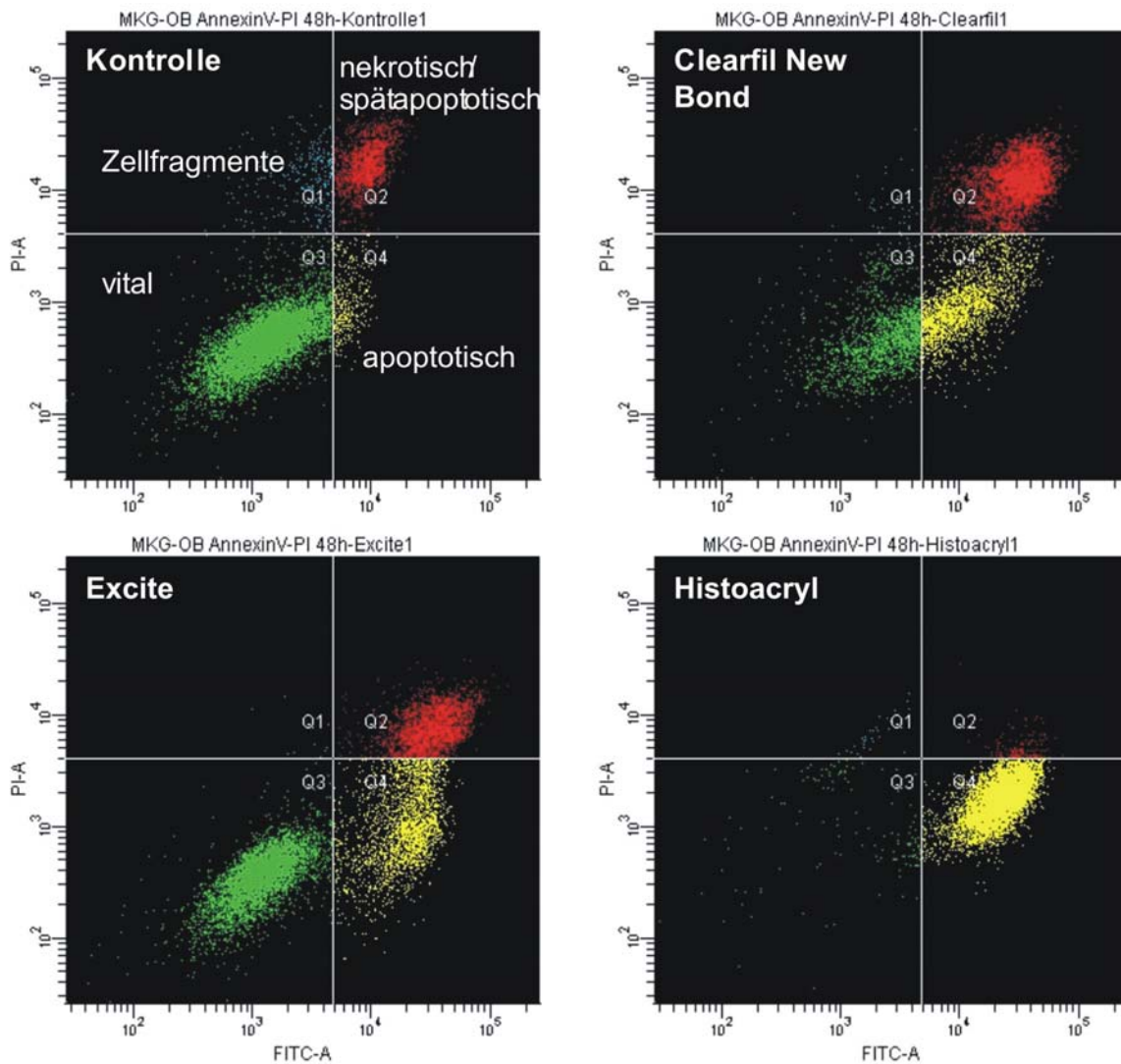
**Dentinhaftvermittler:** Lediglich 21% vitale Zellen fanden sich bei dem chemischen Polymerisat Clearfil New Bond, der überwiegende Anteil war nekrotisch (43,4%) und 34,4% der Osteoblasten gingen in Apoptose. Das lichterhärtende Material Excite induzierte in den meisten Zellen den programmierten Zelltod (42,7%), aber auch viele nekrotische Osteoblasten waren messbar (37,5%). Nur ein Fünftel aller Zellen konnte der vitalen Population zugeordnet werden (Abb.33).

**Cyanoacrylate:** Einen besonders großen Anteil apoptotischer Osteoblasten verursachte Histoacryl. Über 76% der Zellen gingen in den programmierten Zelltod. Der vitale Zellanteil reduzierte sich auf 4% und die nekrotische Population betrug 18,8% (Abb.33).

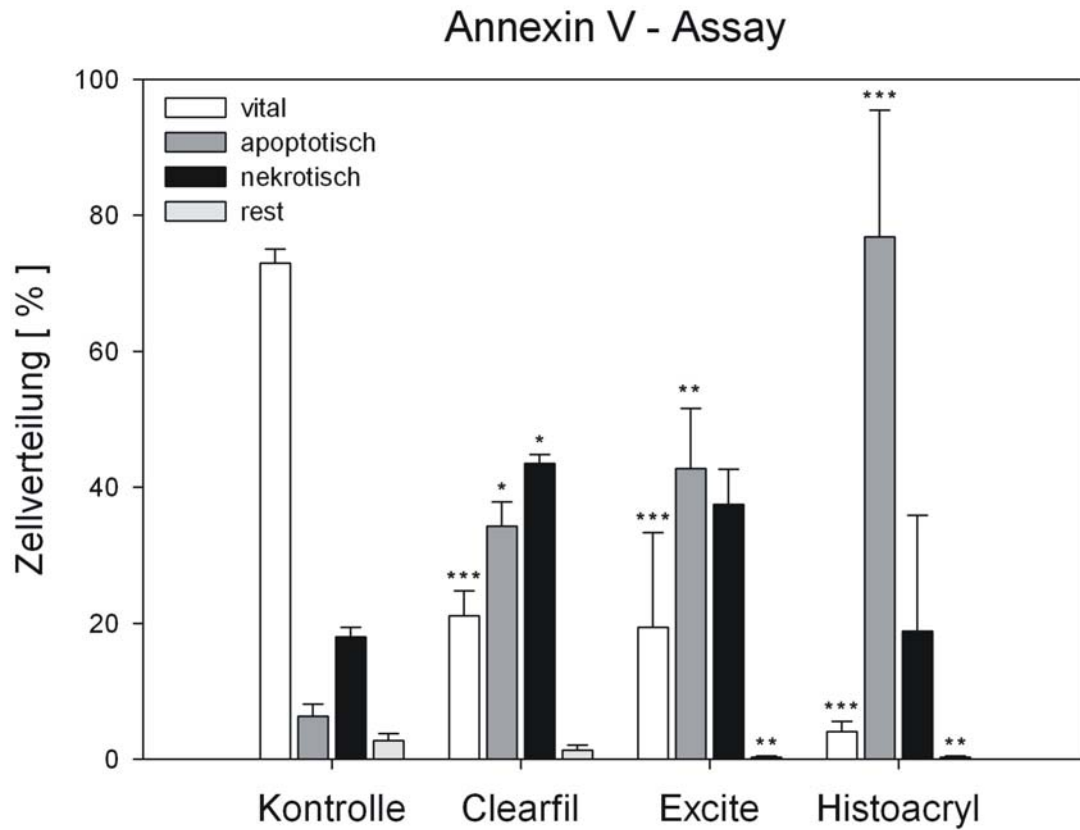
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle Testsubstanzen das Potential besitzen, eine Apoptose in den Osteoblasten zu induzieren. Die beiden Dentinhaftvermittler Clearfil New Bond und Excite führten zu einer Rechtsverschiebung der Zellwolke (Abb.32) und damit zu einem erhöhten Anteil apoptotischer und spätapoptotisch/nekrotischer Zellen.



Das getestete Histoacryl induzierte in den Osteoblasten ausschließlich eine Apoptose. Weiterhin lagen kaum noch vitale Zellen vor, was auf eine toxische Schädigung hinweist. Eine Ursache für die Toxizität des sonst zellverträglichen Histoacryls könnte im verwendeten Spendermaterial liegen. Aber auch die Tatsache, dass für Histoacryl keine ED<sub>50</sub>-Lösung, sondern die unverdünnte Stammlösung eingesetzt wurde, kann für den Verlust vitaler Zellen verantwortlich sein.



**Abb.32:** Durchflusszytometrische Messung von Annexin V - FITC und Propidiumjodid an humanen Osteoblasten nach Inkubation mit den ED<sub>50</sub> Eluaten der Testsubstanzen für 48h; Dotplot der Zellpopulation: Q3=vital; Q4=apoptotisch; Q2 = spätapoptotisch / nekrotisch; Q1=Zelltrümmer



**Abb.33:** Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V - FITC und Propidiumjodid an humanen Osteoblasten nach Inkubation mit  $ED_{50}$ -Eluaten der Testsubstanzen für 48h ; (n=6) ( \* signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, \* =  $p \leq 0,05$  ; \*\* =  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  )

## 5 Diskussion

Die Osteosynthese von Frakturen des Mittelgesichts gestaltet sich aufgrund des Zusammenfügens filigraner, pergamentartiger Knochenstrukturen schwierig. Einfach und zugleich innovativ könnte es sein, die Knochenfragmente miteinander zu verkleben. Das Verfahren ist aussichtsreich, wenn eine langfristig stabile Verbindung des Knochens erreicht wird, ein ungehinderter Heilungsprozess stattfinden kann und das umliegende Gewebe nicht geschädigt wird. Das stellt an die Knochenklebstoffe spezifische Anforderungen. Vor allem müssen diese Materialien u.a. eine gute Haftkraft besitzen, biokompatibel und resorbierbar sein (Giebel und Rimpler, 1981; Donkerwolcke et al., 1998; Heiss et al., 2005b).

Mit dieser Arbeit galt es zu klären, ob die untersuchten Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate eine genügende Biokompatibilität besitzen, um sie zur Knochenklebung einsetzen zu können. Die vorliegende Studie befasste sich mit der Prüfung der Zelltoxizität dieser Materialien auf primäre Osteoblastenkulturen aus dem Kieferbereich. Die Evaluation der Klebstoffe erfolgte anhand der europäischen Leitlinie zur Testung auf In-vitro-Zytotoxizität von Medizinprodukten.

### 5.1 Das Modell der Toxizitätstestung auf Grundlage der Norm „EN ISO 10993“

Die Testverfahren zur Biokompatibilitätsprüfung in vitro bzw. in vivo sind von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und die spätere erfolgreiche klinische Anwendung von Biomaterialien. Einen Leitfaden für die biologische Untersuchung von Medizinprodukten gibt die Norm EN ISO 10993. Diese ist in 18 Unterpunkte gegliedert. Teil 5 befasst sich mit der Testung auf In-vitro-Zytotoxizität und Teil 12 erläutert Verfahren der Probenvorbereitung und der Anwendung von Referenzmaterialien bei der biologischen Beurteilung. Die Norm 10993-5 liefert Anhaltspunkte zur Methodik der Zytotoxizitätstestung und betont ausdrücklich, dass im Hinblick auf das spätere Einsatzgebiet für jedes einzelne Material genau abzuwägen ist, welche biochemischen Verfahren und welche morphologischen Parameter zur Prüfung sinnvoll sind.

Der Norm entsprechend wurden die potentiellen Knochenklebstoffe einer Zytotoxizitätstestung nach direktem und nach indirektem Kontakt mit der Zellkultur unterzogen. Die Zellen können entweder mit einem Extrakt des Testmaterials (entspricht der indirekten Wirkung) oder im direkten Kontakt mit der Probe (entspricht der direkten Wirkung) getestet werden. Die Applikation der Zellen in direktem Kontakt mit den Klebstoffen

simulierte dabei am ehesten die klinische Situation, in der die Adhäsive unmittelbar den knöchernen Frakturändern aufliegen. Die Prüfung erfolgte auch am gewonnenen Originalextrakt und an einer Serie von Verdünnungen mit Kulturmedium (indirekte Wirkung), um Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erkennen und den Einfluss gelöster Klebstoffbestandteile auf die Knochenzellen zu evaluieren.

Die Klebstoffe wurden in polymerisierter Form hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung untersucht (EN ISO 10993-12). Klinisch begründbar ist dieses Vorgehen damit, dass erst das Polymerisat die Adhäsion und die Stabilität der Osteosynthese gewährleistet und die Materialien in dieser Form über längere Zeit mit dem umliegenden Gewebe in Kontakt kommen. Die mögliche toxische Wirkung der Rohstoffe blieb hierbei weitestgehend unberücksichtigt (Janda et al., 2007). Jedoch wurde auch die Toxizität der Ausgangsstoffe teilweise erfasst, da die Polymerisation nie vollständig verläuft (Tanaka et al., 1991; Geurtsen et al., 1998) und sich in den Eluaten immer unpolymerisierte Restmonomere befinden (Ferracane, 1994).

Auch in anderen Untersuchungen wurden die toxischen Eigenschaften von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten überwiegend anhand der biologischen Wirkung ihrer eluierten Bestandteile ermittelt (Ciapetti et al., 1994b; Geurtsen et al., 1999; Kaga et al., 2001; Mantellini et al., 2003; Spagnuolo et al. 2004; Wiegand et al., 2006).

Die Proben wurden über den Versuchszeitraum von sechs Wochen steril gehalten, da eine bakterielle Kontamination eine Verfälschung der Messwerte zur Folge hätte. Ein 80%iger konfluenter Zellrasen diente als Testkultur, dies entspricht dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Osteoblastenkultur (Lindl, 2002). Die 100%ige Konfluenz des Monolayers hätte eine erhöhte Toleranz gegenüber toxischen Einflüssen zur Folge. Eine sehr niedrige Zelldichte würde zu einem schwachen Messsignal mit einer starken Streuung der Messwerte führen. Die Zellen wurden mindestens einmal subkultiviert, bevor eine Prüfung der Toxizität erfolgte.

Unser Untersuchungsmodell bestand aus mehreren sehr differenzierten Testverfahren, um die Auswirkung der potentiellen Knochenklebstoffe auf möglichst viele unterschiedliche Zellparameter erfassen zu können. Ziel war es, den Grad und die Mechanismen der Zellschädigung durch die Adhäsive beurteilen zu können. Die Toxizität der eluierten Bestandteile der Klebstoffe (indirekte Wirkung) wurde mittels des MTT-Tests quantifiziert. Dieses Verfahren misst die Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen als Maß für die Zellvitalität und lässt Rückschlüsse auf die Glykolyserate (Berridge et al., 1996) und auf die Funktion der Zellatmung zu (Mosmann, 1983). Eine Beurteilung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette ermöglichte der Resazurin Test, der zur Bestimmung der direkten Wirkung der Klebstoffe auf die Zellkultur eingesetzt wurde. Dabei wird die

Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette in den Mitochondrien gemessen, welche ebenfalls ein Vitalitätsparameter darstellt (O'Brien et al., 2000; Gloeckner et al., 2001).

Diese allgemeinen Tests zur Prüfung der Zellvitalität wurden zusätzlich durch spezifische Untersuchungen zur Gentoxizität und zur Apoptoseinduktion erweitert. Mit diesen Verfahren sollte eruiert werden, ob die Klebstoffe einerseits eine Schädigung der DNA verursachen und andererseits zu einem toxisch induzierten Zelltod führen können. Strangbrüche in der DNA und damit ein gentoxischer Effekt der Adhäsive ließen sich über eine immunhistochemische Untersuchung der Aktivität des Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) indirekt nachweisen.

Die Untersuchung der Induktion einer Apoptose in den Zellen erfolgte mittels des Annexin-V-Assays im Durchflusszytometer. Das Prinzip besteht im Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- an die Außenseite der Zellmembran und markiert damit den Verlust der Polarität der Zytoplasmamembran. Dieser Vorgang ist typisch für die frühe Phase der Apoptose.

Mit diesem Testsystem konnten differenzierte Aussagen zur Toxizität der Klebstoffe auf unterschiedlichste Zellkompartimente gewonnen werden. Dazu gehörten vor allem toxische Wirkungen in den Mitochondrien (Resazurin/MTT-Test), im Endoplasmatischen Reticulum (MTT-Test), im Zytosol (MTT-Test), im Zellkern (PARP-Assay) und auf die Zellmembran (Annexin V-Assay). Im Sinne eines toxischen Screenings ist dieses Modell nicht nur zur biologischen Bewertung von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten geeignet. Auch andere Klebstoffe oder plastische Füllungsmaterialien können in diesem Versuchssystem auf ihre Toxizität untersucht werden. Die gewonnenen komplexen Daten liefern Hinweise auf die spätere in vivo Wirkung der Substanzen.

### **5.2 Osteoblastenexplantatkultur aus dem Kieferbereich**

Die angewandte und schon beschriebene Kultivierungstechnik (siehe 3.1) ermöglichte es, Osteoblasten aus Knochenfragmenten des menschlichen Kiefers zu züchten. Durch Anfärbung der alkalischen Phosphatase konnte der überwiegende Teil der proliferierenden Zellen als Osteoblasten identifiziert werden. Die Osteoblasten stellten sich im Lichtmikroskop als große polygonale flach gestreckte Zellen mit einem runden Zellkern und zahlreichen Fortsätzen dar. Trotz sorgfältiger Säuberung der Proben von anhaftendem Weichgewebe und mehrmaliger Spülung ist von einer Kontamination der Kultur mit Fibroblasten auszugehen, so dass es sich bei den gezüchteten Zellen um eine Mischkultur aus Osteoblasten mit einem geringen Anteil von Fibroblasten handelte. Auch in der klinischen

Anwendung ist davon auszugehen, dass der Klebstoff nicht nur in Kontakt mit dem Knochen tritt, sondern gleichfalls mit dem bindegewebigen Periost, den Blutgefäßen und dem anliegenden Weichgewebe. Selbst die von Biotechnologiefirmen kultivierten und käuflich erwerblichen primären Osteoblastenkulturen sind nicht frei von Fibroblasten.

Die zur Züchtung notwendigen Knochenproben stammten aus überschüssigem Knochenmaterial, welches bei verschiedenen kieferchirurgischen Eingriffen im Ober- und Unterkiefer wie operativen Weisheitszahnentfernungen, Wurzelspitzenresektionen und Umstellungsosteotomien anfiel. Anschließend wurden mit Hilfe einer Luer-Zange Knochenfragmente der Größe von 2-3 mm<sup>3</sup> hergestellt und diese in Kulturschalen unter Zugabe von Kulturmedium ausgesät. Diese Form der Isolierungstechnik bietet gegenüber der Aussaat von gemahlten Knochenspänen Vorteile in Bezug auf Wachstum und Differenzierung von humanen Osteoblasten des Kiefers (Springer et al., 2004; Pradel et al., 2005). Eine Zerlegung von Knochenmaterial in möglichst kleine Partikel, verbunden mit der daraus resultierenden Oberflächenvergrößerung, ergibt nicht gleichzeitig eine höhere Zellproliferation. Eine Ursache dafür liegt in der mechanischen Zerstörung von Osteoblasten durch den Vorgang des Zerkleinerns in einer Knochenmühle (Springer et al., 2004). Die Art des Knochens scheint ebenfalls einen Einfluss auf den Kultivierungserfolg zu haben. So konnten aus spongiossem Knochen deutlich mehr Osteoblasten gewonnen werden, als aus Kompaktaprobe (Springer et al., 2004). In der Literatur wird die Verwendung von Proben aus dem Oberkiefer zur Züchtung empfohlen (Pradel et al., 2005). Folglich könnte sich der hohe Spongiosaanteil in der Maxilla günstig auf eine Kultivierung von Osteoblasten auswirken.

Für die beschriebenen Untersuchungen wurden 16 Proben aus dem Unterkiefer und lediglich 12 aus dem Oberkiefer verwendet. Aus beiden Spenderregionen ließen sich erfolgreich Osteoblasten kultivieren. Das Knochenmaterial bestand fast ausschließlich aus der Spongiosa des Kieferknochens. Ohne quantitativ näher untersucht worden zu sein, scheint das Patientenalter Einfluss auf das Wachstumspotential der Zellen zu haben. Knochenproben junger Erwachsener unter 30 Jahren zeigten eine schnellere Proliferation der Osteoblasten als die älterer Patienten.

In der Literatur wird neben der mechanischen Aufbereitung eine weitere interessante Methode zur Gewinnung von Primärzellen beschrieben, die Enzympräparation. Durch enzymatische Spaltung von Knochengewebe mittels Trypsin, Kollagenasen, Pronasen u.a. ist es dabei möglich, aus Knochenfragmenten Einzelzellen zu isolieren und diese zu kultivieren (Lindl, 2002).

Vergleichende Untersuchungen dieser beiden Kultivierungsmethoden könnten sicherlich hilfreich sein, um die Effektivität der Züchtung von Osteoblasten aus der Maxilla bzw. der Mandibula weiter zu optimieren.

### 5.3 Primäre Osteoblasten als Testkultur für toxikologische Untersuchungen

Die kultivierten humanen primären Osteoblasten aus dem Kieferbereich sind gemäß der Norm EN ISO 10993-5 zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten geeignet. Zwar sollten prinzipiell etablierte Zelllinien, wie beispielsweise American Type Culture Collection CCL1 (NCTC-Clone 929) oder CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), bevorzugt werden, jedoch ist bei spezifischen Fragestellungen der Einsatz von Primärkulturen, also organotypischen Kulturen, die direkt aus dem lebenden Gewebe gewonnen werden, erlaubt (EN ISO 10993-5). Die Testung der Zytotoxizität von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten als Knochenklebstoffe im Mittelgesichtsbereich ist sicherlich als eine Untersuchung für einen spezifischen Anwendungsbereich zu werten.

Primärkulturen können zur Toxizitätstestung von verschiedenen Medizinprodukten verwendet werden, da sie am genauesten die In-vivo-Situation im Labor simulieren. Nachteile von Primärzellen sind die limitierte Lebenszeit, die im Vergleich zu Zelllinien begrenzte Zellzahl und ihre laborintensive bzw. zeitaufwändige Isolierung und Kultivierung (Demirici et al., 2007). Zusätzlich unterliegen sie einer hohen Spendervariabilität. Zelllinien sind „unsterbliche“ Zellkulturen aus einer Gewebeart, die durch zufällige Mutation (Tumorzellen) oder durch gezielte Veränderung der Expression von Telomerasegenen die Fähigkeit besitzen, sich unendlich zu teilen (Lindl, 2002). Durch diese Immortalisation können große Mengen an Zellklonen in kurzer Zeit gezüchtet werden. Die gewonnenen Kulturen bestehen nur aus einem Zelltyp, sind reproduzierbar, vergleichbar, kostengünstig und einfach zu kultivieren. Zu beachten sind jedoch die relative Resistenz dieser Zellen gegenüber toxischen Einflüssen und die bei der Züchtung notwendige Arbeitssicherheit (Rasche, 2003).

Gemäß ihres begrenzten Einsatzgebietes im bzw. am Zahn wurden Dentinhaftvermittler bisher überwiegend an den dort vorherrschenden Zelltypen auf ihre Toxizität geprüft. Zur Testung wurden Primärzellen, wie beispielsweise humane dentale Pulpazellen (Chen et al., 2003) und humane Gingivafibroblasten (Spagnuolo et al., 2006), aber auch Zelllinien, wie Odontoblast-Like-Cells (MDPC-23) und Pulpazellen (OD21) der Maus (Mantellini et al., 2003) oder Maus 3T3 Fibroblasten (Geurtsen et al., 1999), verwendet.

Aufgrund ihrer Indikation zur Weichgewebeklebung wurden die zellschädigenden Effekte der Cyanoacrylate fast ausschließlich an Fibroblastenkulturen untersucht (Ciapetti et al., 1994a, b; Kaplan et al., 2005). Die Osteoblastenkultur aus dem Kieferbereich wurde u.a. zur Evaluation der biologischen Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien (Wiedemann-Al-Ahmad et al., 2002) und von Implantatoberflächen (Rasche, 2003) genutzt.

Die Prüfung der Zytotoxizität von Dentinhaftvermittlern oder Cyanoacrylaten an einer humanen Osteoblastenkultur wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die Ergebnisse

der vorliegenden Untersuchung haben gezeigt, dass sich die Toxizität von Methacrylat- bzw. Cyanoacrylat-Klebstoffen an einer primären Osteoblastenkultur aus dem Kieferbereich erfolgreich messen lässt.

### 5.4 Zytotoxizität der Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate

Die Ergebnisse ließen erkennen, dass sowohl aus den polymerisierten Dentinhaftvermittlern als auch aus den gehärteten Cyanoacrylaten Inhaltsstoffe in das Kulturmedium eluiert werden. Der MTT-Test zeigte, dass diese Eluate auf die Osteoblasten zellschädigend wirken. Das Ausmaß der Toxizität variierte allerdings beträchtlich in Abhängigkeit vom Klebstofftyp, von der Eluatkonzentration (vgl. Ansatz B) und von der Kontaktzeit der Klebstoffpellets mit Kulturmedium (vgl. Ansatz A). Die Untersuchung der indirekten Wirkung der Klebstoffe auf die Osteoblasten ergab eine geringere Zellschädigung durch die Cyanoacrylate im Vergleich zu den Dentinhaftvermittlern. Ein Ranking der Testmaterialien nach ihrer Toxizitätsstärke ermöglichten die ED<sub>50</sub>-Werte. Danach ergaben sich folgende Toxizitätsstärken der Materialien in aufsteigender Reihenfolge: Titan < Histoacryl < Cyano Veneer < Excite < Xenoll < Clearfil New Bond.

Das Ausmaß der Zellschädigung innerhalb der drei getesteten Dentinhaftvermittler, aber auch innerhalb der beiden Cyanoacrylate, unterschied sich zumeist signifikant. Allerdings zeigten die Dosis-Wirkungskurven, die Zeit-Wirkungskurven und die Kurven des Langzeitversuches sowohl bei den Dentinhaftvermittlern als auch bei den Cyanoacrylaten jeweils einen sehr ähnlichen Verlauf. Teilweise lag ein nahezu paralleler Kurvenverlauf vor. Dies lässt vermuten, dass die verschiedenen Dentinhaftvermittler ähnliche oder sogar gleiche toxische Substanzen eluieren, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Gleiches gilt für die Cyanoacrylate. Folglich könnten die zellschädigenden Effekte in der Gruppe der Dentinhaftvermittler bzw. der Cyanoacrylate jeweils auf den gleichen toxikokinetischen und toxikodynamischen Mechanismen beruhen.

Die Untersuchung der direkten zellschädigenden Wirkung der Klebstoffe auf die Osteoblasten im Langzeitversuch erbrachte nach kurzer Expositionszeit bei allen getesteten Produkten einen hohen Vitalitätsverlust. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen fand sich ein zellfreier Hof um die Polymerisate und viele Zellen ließen Anzeichen einer Apoptose, wie eine Abrundung der Zelle, ein Verlust der Zelladhäsion und eine Degeneration der Zellfortsätze, erkennen. Diese Schädigung war bei den Dentinhaftvermittlern ausgeprägter als bei den Cyanoacrylaten. Die Osteoblasten zeigten im Kontakt mit den Dentinhaftvermittlern anfänglich eine starke Abnahme ihrer Zellvitalität, jedoch mit



zunehmender Kontaktzeit stieg die Vitalität wieder an, was als Indiz für eine geringere Toxizität zu werten ist. Nach sechs Wochen zeigten die Zellen eine Vitalität von 70-90% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die licht- und die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen belegten auch visuell diese messbare Abnahme der Zytotoxizität. So verschwand der zellfreie Hof um die Klebstoffprobe über den Versuchszeitraum und die Osteoblasten lagerten sich, vor allem bei den Cyanoacrylaten, direkt dem Polymerisat an. Im Rasterelektronenmikroskop konnte nach 21-tägiger Kultivierung sogar ein Zellwachstum auf den Klebstoffoberflächen von Histoacryl und Excite festgestellt werden. Eine Zellbesiedlung war auf den lediglich für sieben Tage inkubierten Proben nicht sichtbar.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die direkten zytotoxischen Effekte ebenfalls mehrheitlich durch lösliche Bestandteile der Klebstoffe verursacht werden (Ferracane 1994; Geurtsen et al, 1999, 2000; Schmalz et al., 2006) und dass die verbleibenden Polymere weitgehend biokompatibel sind. Auch Janda stellte 2007 fest, dass die Zytotoxizität der Monomere eine temporäre Erscheinung ist und verschwindet, wenn die Monomere in den polymeren Zustand übergegangen sind.

Im Resazurin-Assay zeigte sich die höchste Zytotoxizität der Klebstoffe in der ersten Versuchswoche. Somit scheinen die schädlichen Bestandteile hauptsächlich in den ersten Tagen in Lösung zu gehen (Geurtsen et al., 2000, Schmalz et al., 2006). Diese Beobachtungen belegen auch Studien zu Elutionsraten von Kompositen, die in ihrem organischen Anteil weitestgehend den Dentinhaftvermittlern entsprechen. So stellten Ferracane & Condon, 1990 fest, dass 75% der löslichen Stoffe von Kompositen innerhalb weniger Stunden extrahiert werden. Bereits nach ein paar Tagen schienen die Elutionsvorgänge weitestgehend abgeschlossen zu sein, da es zu keiner Gewichtsänderung der Komposite mehr kam.

Die Extraktion erfolgt in Form einer logarithmischen Kurve und ist abhängig von der Art des Lösungsmittels (Ferracane, 1994). Organische Lösungen wie etwa ein 75%iges Ethanol-Wasser-Gemisch stellen ein effektiveres Elutionsmittel als reines Wasser dar (Schmalz et al., 2006). Für diesen Unterschied scheint die größere Fähigkeit organischer Lösungen, das Polymernetzwerk zu penetrieren, die Öffnungen zwischen den Polymerketten zu erweitern und somit die Diffusion von Monomeren zu begünstigen, ursächlich zu sein (Ferracane, 1994).

In vivo erfolgt eine Elution vor allem durch den Speichel in der Mundhöhle oder durch Blut bzw. Gewebsflüssigkeiten im Frakturbereich. Aufgrund ihres organischen und ihres wässrigen Anteils ist von einem Elutionsvermögen dieser Stoffe auszugehen, das zwischen reinem Wasser und Ethanol liegt. Auch das in dieser und in anderen Arbeiten (Ciapetti et al.,

1994b; Geurtsen et al., 1999) als Lösungsmittel verwendete Kulturmedium mit Serum dürfte ein derartiges Elutionspotential besitzen.

Generell ergab die Untersuchung, dass die Zytotoxizität der getesteten Klebstoffe von der Art und der Menge der löslichen Komponenten abhängt. Dies bestätigen Studien an Dentinhaftvermittlern von Ranthanathien et al., 1995; Geurtsen et al., 1998, 1999; Wiegand et al., 2006; Demirici et al., 2007 und an Cyanoacrylaten von Ciapetti et al., 1994b und Nitsch et al., 2005.

### 5.4.1 Toxizität der Dentinhaftvermittler

In der Gruppe der dentalen Adhäsive verursachte das Lichtpolymerisat Excite die geringste Vitalitätsreduktion der Osteoblasten, gefolgt von dem selbstätzenden, lighthärtenden Adhäsiv Xeno III und dem chemisch härtenden Clearfil New Bond. Excite führte bei kurzer Kontaktzeit (bis 1h) oder in höherer Verdünnung (c=12,5%) zu keinem bzw. zu nur einem geringen Abfall der Zellvitalität. Erst steigende Konzentrationen und längere Elutionszeiten verursachten deutliche toxische Effekte. Diese Beobachtungen stehen in Kontrast zu den Ergebnissen von Demirici et al., 2007, der die Zytotoxizität von Excite und verschiedenen Self-Etching-Adhäsiven im unpolymerisierten Zustand an transformierten-Pulpa-Zellen untersuchte. Der von ihm durchgeführte Crystal-Violett-Assay ergab, dass unpolymerisiertes Excite die höchste Toxizität auf Pulpazellen unter allen getesteten Dentinhaftvermittlern aufwies. Dieser Unterschied der Ergebnisse zwischen dem unpolymerisierten und gehärtetem Excite zeigt, dass sich durch die Polymerisation das toxische Potential eines Produktes verändert und eine Untersuchung der Ausgangsstoffe keinen Rückschluss auf die biologischen Eigenschaften des fertigen Polymerisats zulässt (Janda et al., 2007).

Das getestete Self-Etching-Adhäsiv Xeno III erwies sich in unserer Untersuchung toxischer als Excite. Selbstätzende Systeme besitzen in der Zahnmedizin den Vorteil, dass eine Konditionierung der Dentinoberfläche mit Phosphorsäure entfällt, da diese Dentinhaftvermittler bereits saure Monomere zur Oberflächenmodifikation enthalten. Die sauren Monomere führten in unserer Untersuchung teilweise zu einer deutlichen Senkung des pH-Wertes im Kulturmedium (pH=4), was per se toxisch für die Zellkultur ist (Lindl, 2002). Somit beruht die Toxizität von Xeno III nicht nur auf den eluierten Bestandteilen, sondern zusätzlich auf einer pH-Wert-Senkung im Medium. Eine zellschädigende Wirkung von Xeno III ergaben auch Untersuchungen von Wiegand et al. 2006, welche über eine Perfusion von Dentinprüfkörpern die In-vitro-Zytotoxizität von verschiedenen Self-Etch-Adhäsiven ebenfalls mittels MTT-Test an L929-Mausfibroblasten evaluierten.

Als das Produkt mit der insgesamt stärksten Zytotoxizität auf die Osteoblasten erwies sich der Dentinhaftvermittler Clearfil New Bond. Bereits niedrige Konzentrationen ( $c=5\%$ ) der gelösten Bestandteile und eine sehr kurze Expositionszeit (5 min) zwischen Adhäsiv und Kulturmedium führten zu einem deutlichen Vitalitätsverlust der Zellen. Die starke Zytotoxizität von Clearfil nach einer Kontaktzeit von lediglich 5 min muss durch eine große Menge löslicher, unpolymerisierter Bestandteile auf der Klebstoffoberfläche verursacht worden sein, da eine Stoffdiffusion aus dem Pelletinneren mehr Zeit benötigt hätte. Es ist denkbar, dass die Polymerisation des chemisch härtenden Clearfil New Bonds, trotz Beachtung der Herstellerangabe, zum Zeitpunkt der Applikation noch nicht abgeschlossen war, da eine chemische Polymerisation länger dauert und schlechter steuerbar ist als eine Lichthärtung. Dieser niedrige Polymerisationsgrad dürfte zu der großen Fraktion eluierbarer toxischer Bestandteile geführt haben.

Auch ist bekannt, dass der Luftsauerstoff an der Oberfläche der Dentinhaftvermittler die Polymerisation verhindert. Diese sogenannte Sauerstoffinhibitionsschicht ist in der zahnmedizinischen Füllungstherapie gewünscht, da sie eine Verbindung der Kompositfüllung mit der Dentinhaftvermittlerschicht ermöglicht. In unserer Untersuchung scheinen die Monomere der Inhibitionsschicht maßgeblich zur Toxizität von Clearfil New Bond, aber auch von Xeno III und Excite beigetragen zu haben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Entfernung der Inhibitionsschicht durch eine Politur oder durch Beschleifen die Menge an Restmonomeren reduziert und die Zytotoxizität senkt (Schmalz et al., 2005).

### 5.4.2 Toxizität der Cyanoacrylate

Die beste Zellverträglichkeit unter allen getesteten Klebstoffen zeigte das Butyl-2-Cyanoacrylat Histoacryl. Toxische Effekte waren erst bei höheren Konzentrationen ( $c>50\%$ ) und längeren Inkubationszeiten (24 h) zu verzeichnen. Auch andere Untersuchungen fanden eine gute Zellverträglichkeit der Butyl-2-Cyanoacrylate. So zeigten Ciapetti et al., 1994b ebenfalls mittels einer MTT-Testung von Cyanoacrylat-Eluaten an Lymphozyten, dass die Butyl-Cyanoacrylate deutlich weniger toxisch sind als die Ethyl-Cyanoacrylate in verschiedenen Darreichungsformen (flüssig bzw. als Gel). Eine gute In-vivo-Verträglichkeit der Butyl-Cyanoacrylate hatten schon vorher Vasenius et al., 1988 nachgewiesen. Nach Applikation von Histoacryl auf die Femurcondylen von Ratten konnte weder eine Entzündung noch eine Fremdkörperreaktion beobachtet werden.

In unserer Studie zeigte das Ethyl-2-Cyanoacrylat Cyano Veneer analog zu den Ergebnissen von Ciapetti et al., 1994a, 1994b einerseits eine höhere Zytotoxizität als Histoacryl, andererseits erwies es sich verträglicher als alle Dentinhaftvermittler. Die Toxizität korreliert

anscheinend mit der Kettenlänge der Cyanoacrylate mit dem Ergebniss, dass langkettige Verbindungen wie Histoacryl biokompatibler sind als die kurzkettigen wie Cyano Veneer (Tseng et al., 1990; Ciapetti et al., 1994b; Nitsch et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe um Ciapetti et al. untersuchte 1994 in einem ähnlichen Versuchsmodell verschiedene Cyanoacrylate hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung auf L929 Mausfibroblasten in direktem Kontakt. Sie beschrieben nach 24- bis 72-stündiger Exposition ebenfalls starke zytotoxische Effekte, so u.a. einen durch Zelltod entstandenen zellfreien Hof, ein Fehlen der Zelladhäsion und eine Vakuolisierung des Zellkerns. Interessanterweise nahm in unserer Untersuchung die zellschädigende Wirkung der Klebstoffe über den Versuchszeitraum von sechs Wochen kontinuierlich ab und die Vitalität der Osteoblasten stieg an, so dass bei beiden Cyanoacrylaten nach 14-tägiger Kultivierung die Aktivität der Zellkontrolle erreicht wurde. Dieses Untersuchungsergebnis korreliert mit einer Studie von Thumvanit et al., 1999, die zeigte, dass die Elution zytotoxischer Substanzen aus Cyanoacrylaten innerhalb von zwei Wochen abgeschlossen ist.

### **5.5 Ursachen der Zytotoxizität der Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate**

#### **5.5.1 Ursachen der Toxizität der Dentinhaftvermittler**

Viele Studien befassten sich mit der Identifizierung der eluierbaren Bestandteile von Kunststofffüllmaterialien. Diese löslichen Komponenten können die strukturelle Stabilität der Materialien beeinflussen und zu ungünstigen lokalen Gewebereaktionen oder sogar zu systemischen Effekten führen (Schmalz et al., 1998). Bereits 1981 hatten Braden & Pearson über eine Infrarotspektroskopie die Extraktion von Restmonomeren aus Bis-GMA- und Urethan-basierten Kompositen nachgewiesen, und 1986 identifizierten Okamoto et al. mittels einer HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) die Monomere TEGDMA und Bis-GMA in Eluatensubstraten verschiedener Komposite.

Extrahierbare Bestandteile von Dentinhaftvermittlern untersuchte die Arbeitsgruppe von Geurtsen et al., 1999. Eine Analyse der wässrigen Extrakte über eine Gas-Chromatographie und Massen-Spektrometrie (GC/MS) ergab in vier der fünf Extrakte das hydrophile Monomer HEMA. In einigen der Proben konnten verschiedene Ethylenglykolmethacrylate wie TEGDMA, EGDMA und TEGMMA identifiziert werden. Zusätzlich fand sich in allen untersuchten Extrakten der Photoinitiator Kampferchinon. Geurtsen et al., 1999 kamen zu dem Schluss, dass es sich bei den eluierten Bestandteilen vor allem um kleine (Ko-) Monomere und Zusatzstoffe wie Polymerisationsinitiatoren handelt. Zahlreiche In-vitro-Studien zeigten, dass besonders die Kunststoffmonomere der Dentinhaftvermittler zytotoxisch sind (Hanks et al., 1991; Wataha et al., 1999; Kaga et al., 2001). Diese freien

Monomere, die Restmonomere, sind eine Folge der unvollständigen freien radikalischen Polymerisation der Dentinhaftvermittler. Bei diesem Vorgang reagieren große Dimethacrylate, sogenannte Basismonomere (wie Bis-GMA), miteinander und mit kleineren Ko-Monomeren (HEMA, TEGDMA) zu einem Polymernetzwerk. Die Ko-Monomere führen zu einer Quervernetzung der Matrix, die die Beweglichkeit der Monomere einschränkt und die Polymerisation verzögert, so dass 25% bis 50% der Methacrylatgruppen im gehärteten Material nicht reagiert haben (Ferracane, 1994). Allerdings ist der Großteil dieser Methacrylate nicht löslich, da diese Monomere an einem Ende mit der Polymerkette reagiert haben und nur am anderen Ende eine ungebundene C=C-Doppelbindung vorliegt. Derartige Monomere werden als anhängende Methacrylatgruppen bezeichnet (Ferracane, 1994). Insgesamt entfallen ca. 2-7% der unreaktierten Methacrylate auf eluierbare Restmonomere (Tanka et al., 1991). Ziel sollte es daher sein, einen maximalen Konversionsgrad der Methacrylate zu erreichen (Janda, 2007), um den Anteil der Restmonomere so weit wie möglich zu senken. Ein hoher Konversionsgrad und damit eine geringe Zytotoxizität, kann durch eine ausreichend lange Polymerisationsdauer und durch die Verwendung von geeigneten Polymerisationslampen erreicht werden (Kaga et al., 2001; Wiegand et al., 2006). So zeigte sich bereits, dass die Polymerisation von Dentinhaftvermittlern mit konventionellen Halogenlampen in vitro zu einer geringeren Zellschädigung führte als bei Härtung mittels Light-Emitting-Diode (LED) Lampen (Spagnuolo et al., 2004a).

Neben dem Konversionsgrad hängt die Menge der löslichen Monomere auch von ihrem Molekulargewicht und ihren chemischen Eigenschaften ab. So eluieren kleine hydrophile Monomere wie HEMA oder TEGDMA leichter und schneller in wässriger Lösung als größere lipophile Monomere wie Bis-GMA (Bouillaguet et al., 1996; Thonemann et al., 2002). Aufgrund ihrer guten Membrangängigkeit weisen lipophile Monomere wie Bis-GMA jedoch ein größeres zytotoxisches Potential auf (Oliveira Mamede et al., 2004). Ratanasathien et al., untersuchten 1995 verschiedene Monomere dentaler Adhäsive hinsichtlich ihrer Zytotoxizität auf Mausfibroblasten und stellten anhand der ED<sub>50</sub>-Werte folgendes Toxizitätsranking auf: Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>>>HEMA.

Diese Ergebnisse bestätigten prinzipiell Geurtsen et al., 1998, die 35 verschiedene Monomere und Additive von Dentinhaftvermittlern auf ihre Toxizität in der Zellkultur prüften. Anhand der ED<sub>50</sub>-Werte zeigten sich Bis-GMA, UDMA und DMBZ stark zytotoxisch auf Fibroblasten, wohingegen die Monomere HEMA, BEMA und der Photoinitiator Kampferchinon moderate toxische Effekte verursachten. Die höchste Zytotoxizität auf Fibroblasten fand sich für den Photostabilisator 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (HMBP) und den Inhibitor 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol.

In unserer Untersuchung enthielten alle geprüften Dentinhaftvermittler das hydrophile (Ko-) Monomer HEMA. Als Basismonomere beinhalteten Clearfil New Bond und Excite das Bis-

GMA, während Xeno III eine UDMA-Komponente aufweist. Die Lichtpolymerisate Excite und Xeno III enthielten als Initiator Kampferchinon, das als Radikalbildner sowohl ein zytotoxisches als auch eine mutagenes Potential besitzt (Geurtsen et al., 1999). Aufgrund der guten Löslichkeit im wässrigen Kulturmedium und des hohen prozentualen Anteils in Dentinhaftvermittlern, dürften die gemessenen toxischen Effekte der eluierten Bestandteile vor allem auf das hydrophile Monomer HEMA zurückzuführen sein. Zumindest stellt HEMA den mengenmäßig größten Anteil in den Eluaten von Dentinadhäsiven dar (Geurtsen et al., 1999).

Neue Studien zeigen, dass HEMA und TEGDMA zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = Reactive Oxygen Species) führen (Spagnuolo et al., 2004a, 2004b und 2006; Chang et al., 2004; Demirici et al., 2007). Gleichfalls gilt Kampferchinon, das die Licht-Polymerisation in den meisten Dentinhaftvermittlern initiiert, als ein potenter Radikalbildner und damit als ein ROS-induzierendes Agens (Schweikl et al., 2006). ROS, zu deren Vertretern u.a. das Wasserstoffperoxid, das Superoxidradikal und das Hydroxylradikal gehören, sind aufgrund ihrer ungepaarten freien Außenelektronen hochreaktive und damit für die Zelle sehr gefährliche Moleküle. Beispielsweise sind diese Stoffe in der Lage, Fettsäuren miteinander zu vernetzen und damit die Integrität der Zellmembran zu stören. Des Weiteren führen ROS zur Schädigung im Aufbau von Proteinen und Nukleinsäuren, so dass Signaltransduktionswege gestört und Genexpressionen verändert werden (Demirici et al., 2007). Auch für vorzeitige Alterungsprozesse scheinen ROS verantwortlich zu sein (Lu et al., 2008). Als Folge des aeroben Zellstoffwechsels entstehen, besonders in den Mitochondrien, in den Peroxisomen und durch das Cytochrom-P450-Enzym, ständig kleine ROS-Mengen (Schweikl et al., 2006). Neben dieser endogenen Produktion können durch Exposition gegenüber UV-Licht, durch ionisierende Strahlung oder durch Aufnahme anthropogener Fremdstoffe, die sogenannten Xenobiotika, zusätzlich exogen ROS erzeugt werden. Zur Entgiftung dieser reaktiven Moleküle besitzt jede Zelle Antioxidantien wie Glutathion (GSH), das durch seine Thiolgruppe die Fähigkeit besitzt, ROS in stabile, reaktionsträge und damit für die Zelle harmlose Stoffe zu reduzieren (Emmler et al., 2004). Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutathionperoxidase unter Bildung des oxidierten Dimers Glutathion-Disulfid (GSSH) katalysiert. So kann beispielsweise Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) mittels Glutathion in zwei Moleküle Wasser ( $2H_2O$ ) detoxifiziert werden. Zusätzlich besitzt Glutathion als intrazellulärer Scavenger die Fähigkeit, Xenobiotika durch eine Konjugation über die Niere zu eliminieren (Emmler et al., 2004). Durch eine gesteigerte Exposition gegenüber ROS kann es zu einer Überlastung des schützenden zelleigenen Antioxidationsystems kommen. Dieser als oxidativer Stress bezeichnete Zustand führt zu den oben beschriebenen zellschädigenden Effekten. Die Monomere HEMA und TEGDMA verursachen eine derartige Imbalance im intrazellulären Redoxstatus, einerseits durch Steigerung der Produktion von

ROS, andererseits durch eine schnelle Depletion von Glutathion (Stanislawski et al., 2003; Chang et al., 2005; Schweikl et al., 2006). Eine GSH-Depletion kann infolge der vermehrten ROS-Produktion auftreten, die den Glutathion-Pool erschöpft und zu einer Akkumulation von Glutathion-Disulfid führt (Chang et al., 2005). Zusätzlich kann es auch über eine direkte Konjugation von GSH mit Monomeren wie HEMA zu einer Depletion von Glutathion kommen (Chang et al., 2005). Diese als Michael-Addition bezeichnete Reaktion führt zu einer kovalenten S-C Bindung zwischen dem Methacrylatester von Monomeren wie HEMA und Glutathion. Die molekularen Mechanismen der ROS-Bildung durch die Kunststoffmonomere sind bislang nicht geklärt (Schweikl et al., 2006). Es konnte allerdings in einigen Studien gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Gabe von Antioxidantien wie N-Acetylcystein, Ascorbat und Trolox (Vitamin E) die durch HEMA und TEGDMA verursachte Zytotoxizität abgeschwächt wird (Stanislawski et al., 2003; Spagnuolo, 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Abnahme der Aktivität intrazellulärer Dehydrogenasen nach Kontakt mit Eluaten der Dentinhaftvermittler dürfte eine Folge des durch Monomere in den Osteoblasten induzierten oxidativen Stresses sein. Auch die Reduktion der Zellatmung im direkten Ansatz könnte in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung von Sauerstoffradikalen stehen.

Die Polymermatrix der Dentinhaftvermittler ist keineswegs biologisch stabil, sondern steht in Wechselwirkung mit einer Reihe von Enzymen. Da es sich bei den meisten Kunststoffmonomeren um Esterverbindungen handelt, sind unspezifische Esterasen wie das Enzym Cholinesterase (CE) oder die im Speichel vorhandene Pseudocholinesterase (PCE) in der Lage, diese Esterbindungen hydrolytisch zu spalten (Emmler, 2004). Vor allem die anhängenden Methacrylatgruppen sind Angriffen der Esterasen ausgesetzt (Ferracane et al., 1994). Infolge dieser Degradation entstehen Intermediate, die ihrerseits ein zytotoxisches Potential entfalten können. Bereits im Jahr 1992 fanden Larsen et al., dass Mono- und Dimethacrylate durch die Esterasen zu Methacrylsäure und in ihren korrespondierenden Alkohol hydrolysiert werden. Ethylenglykol, ein Alkohol aus der Hydrolyse von HEMA, konnte in Eluaten von Dentinadhäsiven nachgewiesen werden, blieb aber ohne toxischen Effekt auf die getestete Fibroblastenkultur (Geurtsen et al., 1999). Die Methacrylsäure hingegen besitzt ein geringes zytotoxisches Potential, das nach den Ergebnissen von Ratanathanien et al., 1995 unter der Toxizität von TEGDMA und HEMA einzuordnen ist. Im Gegensatz dazu ermittelte Emmler, 2004 für die Methacrylsäure eine im Vergleich zu HEMA toxischere Wirkung. Die Bildung von Formaldehyd durch Oxidationsprozesse in der Inhibitionsschicht von Kompositen konnte in einer Studie nachgewiesen werden, allerdings schienen die Konzentrationen für toxische Effekte zu gering zu sein (Oysaed et al., 1988). In der Literatur finden sich keine weiteren Arbeiten, die diese Formaldehydbildung bestätigen. Somit dürfte die Methacrylsäure das Degradationsprodukt sein, welches zur toxischen Wirkung der

Dentinhaftvermittler beiträgt. Aufgrund der im Serum des Kulturmediums vorhandenen Esterasen, erfolgt eine enzymatische Degradation der Methacrylate auch *in vitro* (Ciapetti et al., 1994a). Die gemessene Abnahme der Vitalität der Osteoblasten und die beobachteten zytotoxischen Effekte auf die Zellen könnten somit teilweise auch auf der Bildung von Methacrylsäure beruhen.

### 5.5.2 Ursachen der Toxizität der Cyanoacrylate

Eine zytotoxische Wirkung zeigten die Cyanoacrylate sowohl nach direktem Kontakt mit den Osteoblasten als auch über ihre extrahierten Bestandteile. Im Vergleich zu den Dentinadhäsiven wurden die Enzymaktivität und die Zellatmung der Osteoblasten durch diese Acrylatklebstoffe weniger beeinträchtigt. Bei den Cyanoacrylaten wurden die Zellfunktionen erst bei höheren Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten gehemmt. Die Vitalitätsabnahme der Osteoblasten im indirekten Ansatz zeigte, dass analog zu den Dentinhaftvermittlern die Zellschädigung durch lösliche Bestandteile und Degradationsprodukte der Cyanoacrylate erfolgt. Innerhalb der beiden getesteten Produkte ergab die Untersuchung anhand des ED<sub>50</sub>-Wertes für das Butyl-Cyanoacrylat Histoacryl eine geringere Zytotoxizität als für das Ethyl-Cyanoacrylat Cyano Veneer. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten anderer Autoren, die den langkettigen Butyl-Cyanoacrylaten die höhere Biokompatibilität bescheinigen (Ciapetti et al., 1994; Nitsch et al., 2005). Es gibt Anzeichen, dass die Zytotoxizität mit der Kettenlänge der Cyanoacrylate korreliert und die Toxizität mit zunehmender Molekülgröße abnimmt (Tseng et al., 1990; Ciapetti et al., 1994b). Die Ursache dürfte in der höheren Degradationsgeschwindigkeit von kurzkettigen Cyanoacrylaten (Methyl-CA, Ethyl-CA) im Vergleich zu langkettigen Derivaten (Isobutyl-CA, Isoesyl-CA) liegen (Tseng et al., 1990).

Ähnlich wie bei den Dentinadhäsiven erfolgt die Degradation der Cyanoacrylate enzymatisch durch Esterasen. Durch diesen Abbau entstehen toxische Substanzen wie Cyanessigsäure und insbesondere Formaldehyd, welche für die *in vivo* und *in vitro* Toxizität der Cyanoacrylate verantwortlich sein können (Tseng et al., 1990; Nitsch et al., 2005). Papatheofanis und Barmada stellten 1992 fest, dass Cyanoacrylate zu einer Steigerung der Superoxid-Anionen-Produktion und der LDH-Freisetzung in polymorphkernigen Leukozyten führen. Im Gegenzug konnte durch Applikation von Ascorbinsäure (Vitamin C) als Antioxidanz die Superoxid-Anion- und LDH-Freisetzung gehemmt und die intrazelluläre Glutathion-Menge erhöht werden. Somit könnte die Zytotoxizität der Cyanoacrylate wie bei den Dentinhaftvermittlern auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Folgen von oxidativem Zellstress beruhen. Der in unserer Arbeit beobachtete



Attachementverlust der Zellen könnte durch eine ROS induzierte Zerstörung von Membranfetten verursacht worden sein.

Insgesamt stimmen unsere Ergebnisse mit den Literaturdaten überein. In diesem Zusammenhang sei noch mal auf die Arbeiten von Ciapetti et al., 1994 hingewiesen, die analog zu unserem Versuchsansatz die Toxizität der Cyanoacrylate im direkten Kontakt und in einem Elutionstest untersuchten und ebenfalls den Butyl-Cyanoacrylaten im Vergleich zu den Ethyl-Derivaten eine geringere Zytotoxizität bescheinigten. Aus toxikologischer Sicht erscheint somit das moderat zytotoxische Histoacryl als Knochenklebstoff am ehesten geeignet zu sein.

### **5.6 Gentoxizität und Apoptoseinduktion**

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Bestandteile aller untersuchten potentiellen Knochenklebstoffe das toxische Potential besitzen, die Aktivität unspezifischer Enzyme zu reduzieren, die Funktion der Zellatmung zu stören und die Zellmorphologie zu verändern. Ziel der weiteren Untersuchungen war es zu ermitteln, ob durch die Klebstoffe auch die DNA der Osteoblasten geschädigt wird und ob als Folge der Zytotoxizität ein programmierter Zelluntergang (Apoptose) in den Osteoblasten induziert wird. Die Gentoxizität der Klebstoffe ließ sich über die Bestimmung der Aktivität des PARP-Enzyms indirekt nachweisen. Dieses wird ausschließlich bei DNA-Strangbrüchen aktiviert, daher ist der Nachweis von PARP spezifisch für das Vorliegen einer DNA-Schädigung. Die immunzytochemische Analyse der PARP-Aktivität als Maß der Gentoxizität ergab, dass alle drei getesteten Adhäsive (Clearfil New Bond, Excite und Histoacryl) zu Strangbrüchen in der DNA führen. Eine zusätzliche Messung der Fluoreszenzintensität ermöglichte, die Aktivität von PARP zu quantifizieren und zeigte für beide Dentinhaftvermittler doppelt so hohe Werte im Vergleich zu den Cyanoacrylaten. Somit scheinen die getesteten Dentinhaftvermittler eine deutlich größere gentoxische Wirkung auf die Osteoblasten zu erzielen, als das untersuchte Butyl-2-Cyanoacrylat Histoacryl.

Eine gentoxische Wirkung von dentalen Kunststoffmaterialien wird auch in der Literatur diskutiert und wurde bereits durch verschiedene Methoden nachgewiesen (Schweikl et al., 2001; Kleinsasser et al., 2006; Demirci et al., 2007).

In dieser Untersuchung wurde die Gentoxizität von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten mittels des PARP-Assays erstmalig analysiert. Schweikl et al., 2001 evaluierten die Gentoxizität verschiedener Monomere anhand der Bildung von Mikrokernen als Anzeichen einer Chromosomenabberration in V79-Zellen. Es zeigte sich, dass die Monomere TEGDMA

und HEMA konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Anzahl von Mikrokernen führen. Eine moderne, sensitive und valide Möglichkeit der Erfassung der Gentoxizität bietet der COMET-Assay. Mittels dieser Einzelzellgelelektrophorese konnte die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch TEGDMA, HEMA und UDMA bereits nachgewiesen werden (Kleinsasser et al., 2006). Das gentoxische Potential scheint in Abhängigkeit von der Methacrylatzusammensetzung der Dentinhaftvermittler stark zu variieren (Schweikl et al., 2006). In einer aktuellen Studie verursachte beispielsweise Excite keine, dagegen der Primer des Haftvermittlers AdheSE eine fast 6-fache Erhöhung der Anzahl von Mikrokernen in einer V79-Zellkultur (Demirici et al., 2007).

Es werden zwei Möglichkeiten für eine DNA-Schädigung durch die Monomere diskutiert (Schweikl et al., 2006). Einerseits könnte eine Michael-Addition zwischen der Carbonyl-Funktion der Acrylate und dem nukleophilen Zentrum der DNA zu einer Quervernetzung der Doppelhelix führen, andererseits die Genmutationen aber auch auf der Bildung von ROS durch die Monomere beruhen. Es ist bekannt, dass die ROS gentoxisch sind, da diese Radikale DNA-Basen oxidieren und die DNA-Stränge modifizieren können (Foth et al., 2005). Der ROS-Bildner Kampferchinon dürfte somit ebenfalls zur beobachteten DNA-Schädigung durch die Dentinhaftvermittler beigetragen haben.

Der gentoxischen Wirkung des Cyanoacrylats Histoacryl könnten ähnliche Mechanismen zugrunde liegen. So sind eine direkte Interaktion des Acrylats mit der DNA sowie eine indirekte Schädigung über ROS oder durch die Freisetzung von Formaldehyd vorstellbar. Mutagene Effekte von Methyl-Cyanoacrylaten wurden bereits vor mehr als 20 Jahren in einem in vitro Salmonella-Mikrosomen-Assay erkannt (Rietveld et al., 1987).

Die Ergebnisse des PARP-Assays in der eigenen Untersuchung zeigten, dass die Zelle über eine Aktivierung des PARP-Enzyms bestrebt ist, einen Reparaturmechanismus in Gang zu setzen, um die durch die Klebstoffe verursachten DNA-Strangbrüche zu beheben. Dieser als Basen-Exzisions-Reparatur (BER) bezeichnete Vorgang ermöglicht die effektive Reparatur speziell von ROS induzierten DNA-Schäden (Schweikl et al., 2006). Infolge der verursachten Schädigung des Erbgutes kann es zu einer Blockierung im Zell-Zyklus kommen. Ein derartiger Zell-Zyklus-Arrest gibt der Zelle Zeit, Reparaturmechanismen einzuleiten, um die Integrität des Genoms zu erhalten.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass HEMA und TEGDMA zu einem Zell-Zyklus-Arrest in Pulpazellen und Gingiva-Epithel-Zellen führen (Chang et al., 2005; Schweikl et al., 2007). Die Gabe des ROS-Scavengers N-acetylcystein scheint auf die Zellen protektiv zu wirken, da NAC das Ausmaß der durch die Monomere verursachten DNA-Schädigung reduziert und damit einen Zell-Zyklus-Arrest verhindert (Schweikl et al., 2007).

Schwere und nicht reparierbare Defekte im Erbgut verhindern eine physiologische Homöostase und induzieren Mechanismen, die den programmierten Zelluntergang, die

Apoptose, einleiten. Dieser aktive, über proteolytische Enzymkaskaden vermittelte und kontrolliert stattfindende Prozess führt zur Auflösung der Zelle in kleine Vesikel, die von Makrophagen phagozytiert werden können. Die Apoptose ist, im Gegensatz zur unkontrolliert ablaufenden und mit einer Entzündung verbundenen Nekrose, für das umliegende Gewebe schonend.

Wie bereits festgestellt werden konnte, ist eine Apoptose eng mit dem PARP-Enzym assoziiert. Das Schlüsselenzym Caspase 3 leitet die Apoptose ein, indem es PARP spaltet, wodurch eine DNA-Fragmentation erfolgt (Núñez et al., 1998).

In unserer Untersuchung wurde in den Osteoblasten über eine durchflusszytometrische Bestimmung von AnnexinV eine potentielle Apoptoseinduktion durch die Klebstoffe ermittelt. Der Test basiert auf dem Nachweis der Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innen- an die Außenseite der Zellmembran, einem ausschließlich in der frühen Phase der Apoptose stattfindenden Prozess (Martin et al., 1995). Nach Exposition der Zellen mit den eluierten Klebstoffbestandteilen zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle die Dentinhaftvermittler Excite und Clearfil New Bond zu einer deutlichen Steigerung der apoptotischen und nekrotischen Zellpopulation führten. Das Cyanoacrylat Histoacryl dagegen verursachte ausschließlich eine Apoptose in den Osteoblasten.

Die Induktion des programmierten Zelltodes durch die Dentinhaftvermittler war ebenfalls über eine AnnexinV-Analyse bereits nachgewiesen worden (Mantellini et al., 2003). Das Ausmaß der Apoptose in den untersuchten Zelllinien war abhängig vom Polymerisationsgrad des getesteten Adhäsivs Single Bond. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die apoptotische Wirkung der Dentinhaftvermittler auf ihren löslichen Komponenten beruht. Besonders das leicht eluierbare hydrophile Monomer HEMA induziert eine Apoptose in primären Fibroblasten und in Zelllinien (Spagnuolo et al., 2004; Samuelsen et al., 2008). Die Ursache könnte erneut in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) liegen. Über eine direkte Interaktion mit wichtigen zelleigenen Molekülen oder durch Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen können ROS zum Zelltod per Apoptose führen (Foth et al., 2005; Schweikl et al., 2006). Gleichzeitig kommt es infolge der ROS-Induktion durch HEMA zu einer Aktivierung von zelleigenen Schutzmechanismen, wie dem Transkriptionsfaktor NF-kappaB, die einer Apoptose entgegenwirken (Spagnuolo et al., 2004b).

Die ROS scheinen insgesamt eine zentrale Rolle sowohl in der Zyto- als auch für die Gentoxizität von Dentinhaftvermittler einzunehmen (Schweikl et al., 2006). Die in dieser Untersuchung erfasste Abnahme von Enzymaktivitäten und die Reduktion der Zellatmung in den Mitochondrien sowie die festgestellte DNA-Schädigung könnten auf durch die ROS-Bildung induzierten oxidativem Zellstress beruhen, der zu einem Zell-Zyklus-Arrest oder einer Apoptoseeinleitung in den Osteoblasten führt.

## 5.7 Einsatz der Materialien als Knochenklebstoffe

Die Ergebnisse zeigen, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich der toxischen Wirkung der einzelnen Materialien auf die Osteoblasten gibt. Unter den getesteten Produkten verursachten die beiden Cyanoacrylate Histoacryl und Cyano Veneer sowie der Dentinhaftvermittler Excite die geringsten Zellschäden. Somit scheinen Histoacryl, Cyano Veneer und Excite aus toxikologischer Sicht als Knochenklebstoffe im Kiefer-Gesichtsbereich am ehesten geeignet zu sein.

In Bezug auf die mechanischen Eigenschaften verfügen beide Cyanoacrylate zwar über eine geringe, aber dennoch ausreichende Klebekraft, um im wenig belasteten Gebiet angewendet zu werden (Maurer et al., 2004a, 2004b). Der guten Verträglichkeit des Dentinhaftvermittlers Excite steht seine geringe Haftkraft *in vitro* gegenüber. In Zugversuchen an Schweineknöchel ermittelten Bekes, 2003 und Maurer et al., 2004a, 2004b für Excite eine Haftkraft von lediglich 2,97 MPa (Knochen-Komposit-Klebung), dagegen zeigte das in unserer Studie am stärksten toxische Clearfil New Bond mit Werten von ca. 8,00 MPa (Knochen-Komposit-Klebung) und 6,39 MPa (Knochen-Knochen-Klebung) die größte Adhäsionskraft unter allen getesteten Produkten. Eine Knochenklebung mittels Clearfil New Bond ist aufgrund der Zytotoxizität des Materials jedoch nicht zu empfehlen. Die geringe Haftkraft von Excite könnte für die klinische Anwendung im mechanisch wenig beanspruchten Mittelgesicht, speziell bei der Fixation kleiner Knochenfragmente, dennoch ausreichend sein (Bekes, 2003). Somit ist aus mechanischer und toxikologischer Sicht der Einsatz von Excite als Knochenklebstoff vorstellbar.

Eine weitere interessante und innovative Indikation für die Klebung mit Excite könnte die Augenheilkunde bieten. Die Therapie einer schweren Verätzung der Hornhaut besteht initial in der adhäsiven Befestigung einer Kontaktlinse auf dem freiliegenden Hornhautstroma. Hierzu wird häufig Histoacryl verwendet, welches regelmäßig zu entzündlichen Veränderungen und Reizzuständen des Auges führt. Proprawa untersuchte 2004 *in vitro* eine alternative Klebung mit Excite und postulierte eine im Vergleich zu Histoacryl bessere Gewebeverträglichkeit des Materials bei ausreichender Haftkraft, so dass durch den Einsatz des Dentinhaftvermittlers ein besseres klinisches Ergebnis erreicht werden könnte.

Die evaluierte *In-vitro*-Toxizität der Klebstoffe lässt in einem gewissen Rahmen auch Aussagen in Bezug auf die *In-vivo*-Wirkung zu. Aufgrund der zur Klebung kleiner Knochenfragmente notwendigen geringen Materialmengen und des regional begrenzten Einsatzgebietes ist eine systemische Wirkung der Klebstoffe unwahrscheinlich. Eine lokale Toxizität, verbunden mit einer Entzündung und Wundheilungsstörung im Applikationsgebiet, könnte allerdings durchaus möglich sein. Besonders die in dieser Arbeit festgestellte Induktion einer Apoptose und eines Zell-Zyklus-Arrestes in den Osteoblasten könnte die

Wundheilung verzögern und damit die knöchernen Durchbauung der Fraktur behindern. Da die Menge der für die Toxizität verantwortlichen löslichen Bestandteile über die Zeit abnimmt, dürften diese lokalen Irritationen vor allem in der initialen Phase nach der Klebung auftreten. In vivo ist es wahrscheinlich, dass zytotoxische Effekte auf die Osteoblasten aufgrund ihres schützenden Osteoidmantels abgeschwächt werden. Dieser protektive Effekt von Hartgeweben ist in der Zahnheilkunde schon länger bekannt. So erbrachten zahlreiche Untersuchungen, dass das Dentin als Barriere für die Penetration von Adhäsivbestandteilen in die Pulpa fungiert und die dortigen Zellen vor einer toxischen Schädigung schützt (Bouillaget et al., 1996; Schmalz et al., 2006; Wiegand et al., 2006; Demirici et al., 2007). Bezüglich der Hautklebung mit Cyanoacrylaten erfüllt das avitale, verhornte Stratum corneum eine ähnliche Schutzfunktion, indem es als Distanzhalter die vitalen Zell- und Bindegewebsschichten vom Klebstoff trennt (Nitsch et al., 2005).

Aus all diesen Daten kann für den klinischen Einsatz geschlussfolgert werden, dass die Knochenklebstoffe nicht direkt auf die Bruchflächen appliziert werden sollten, da die dortigen proliferierenden Zellen noch nicht von Osteoid umgeben sind und damit den toxischen Effekten der Adhäsive ausgesetzt wären. Dies könnte zu einer Störung der Frakturheilung führen. Auch im Hinblick auf die Degradation erscheint eine direkte Klebung der Bruchflächen nicht sinnvoll. Ein idealer Knochenklebstoff müsste in dem Maße degradieren, wie eine Knochenneubildung stattfindet (Donkerwolcke et al., 1998; Heiss et al., 2004). Da diese knöchernen Regeneration zahlreichen Variablen unterliegt, ist dieses Ziel schwer realisierbar. Nach Heiss et al. 2004 führt einerseits eine zu rasche Degradation zur Instabilität der Fraktur, andererseits behindert eine zu langsame Degradation die knöchernen Durchbauung. Um diesen Problemen auszuweichen, scheint eine flächige Applikation der Knochenklebstoffe auf die Kortikalis im Sinne einer Schienung der beiden Frakturrenden erstrebenswert. Dadurch wird eine flächige Kraftverteilung erreicht (Giebel und Rimpler, 1981) und gleichzeitig eine primäre Frakturheilung ermöglicht, da die Bruchflächen direkt in Kontakt treten können (Heiss et al., 2005b). Eine toxische Schädigung des aufliegenden Weichgewebes kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

In Bezug auf die klinische Anwendung der potentiellen Knochenklebstoffe sei noch auf eine mögliche allergisierende Wirkung der Materialien hingewiesen. Speziell die Inhaltsstoffe der Dentinhaftvermittler wie die Monomere HEMA und TEGDMA sowie Epoxydharze konnten als Allergene identifiziert werden (Geurtsen et al., 2000; Schweikl et al., 2006). Aber auch Bestandteile der Cyanoacrylate besitzen ein allergenes Potential (Leggat et al., 2007). Das Risiko einer allergischen Reaktion besteht weniger für den Patienten, sondern vielmehr für das den Substanzen dauerhaft ausgesetzte zahnärztliche bzw. ärztliche Personal. In diesem Zusammenhang wurde bereits häufig über das Auftreten einer allergischen Kontaktdermatitis (Allergie Typ IV) bei dieser Berufsgruppe berichtet (Karnerva et al., 1994; Janda et al., 2007).

## 6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Testsystem ermöglichte eine umfassende Evaluation der Zytotoxizität von Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten in vitro und könnte im Sinne eines Screeningverfahrens auch zur toxikologischen Prüfung anderer Materialien eingesetzt werden. Die Untersuchungen erfolgten an eigens aus dem Kieferbereich gezüchteten primären Osteoblasten. Eine Kultivierung dieser Zellen aus überschüssigem Knochenmaterial von Patienten konnte erfolgreich durchgeführt werden, und durch Anfärbung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase ließen sich die proliferierenden Zellen als Osteoblasten identifizieren. Insgesamt erwiesen sich die Zellen als geeignet, um sensitiv und reproduzierbar unterschiedliche toxische Effekte der potentiellen Knochenklebstoffe nachzuweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Dentinhaftvermittler als auch die Cyanoacrylate ein zytotoxisches Potential besitzen. Bezüglich des Ausmaßes der Toxizität bestehen allerdings deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen getesteten Produkten. Die toxischen Effekte der Klebstoffe werden durch ihre löslichen Bestandteile vermittelt und sind abhängig von ihrer Konzentration und von der Expositionszeit bzw. -dauer. Hydrophile Monomere wie HEMA und TEGDMA, aber auch der Lichtinitiator Kampferchinon, stellen eluierbare toxische Inhaltsstoffe der Dentinhaftvermittler dar. Die Zytotoxizität der Cyanoacrylate scheint vor allem auf löslichen Acrylatmonomeren und den Degradationsprodukten Formaldehyd und Cyanessigsäure zu beruhen. Diese Elution findet hauptsächlich innerhalb der ersten Tage nach der Anwendung der Klebstoffe statt. Über die Zeit sinkt somit stetig die Menge der eluierbaren Bestandteile, was zu einer Abnahme der Zellschädigung führt. Die verbleibenden Polymere sind für die Osteoblasten deutlich weniger toxisch. Die dennoch messbaren zytotoxischen Effekte könnten auf Hydrolyseprodukte dieser Polymere, wie der Methacrylsäure aus den Dentinhaftvermittlern sowie dem Formaldehyd und der Cyanessigsäure aus den Cyanoacrylaten, zurückzuführen sein.

Beide Klebstofftypen verursachen eine Schädigung unterschiedlichster Zellkompartimente und beeinträchtigen den Zellstoffwechsel. Beispielsweise wird die Aktivität von Enzymen des Zellmetabolismus wie die Dehydrogenasen gesenkt, die Zellatmung in den Mitochondrien gestört und die Zellmembran geschädigt. Zusätzlich hemmen die Testsubstanzen das Zellwachstum, verhindern die Zelladhäsion und führen zum Verlust von Zellkontakten. Vor allem die Dentinhaftvermittler interagieren mit der DNA der Zellen und induzieren Strangbrüche in der DNA-Doppelhelix. Über zelleigene Reparaturmechanismen versuchen die Osteoblasten diese Schädigung zu beseitigen. Infolge der vielfältigen Störungen der Zellstruktur, der Zellhomöostase und insbesondere des Genoms können

Reperaturmechanismen nicht mehr greifen, so dass die Osteoblasten den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten. Auch diese Effekte sind auf lösliche Bestandteile der Testsubstanzen zurückzuführen. Die Toxizität scheint auf der insbesondere durch die Monomere HEMA und TEGDMA induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu beruhen, die über eine Imbalance im zellulären Redoxstatus zur Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren führt. Ziel sollte es daher sein, den Polymerisationsgrad der Klebstoffe zu erhöhen, um die Menge der löslichen Restmonomere zu senken. Dies kann beispielsweise über eine ausreichend lange Polymerisationszeit und bei den Lichtpolymerisaten durch Verwendung von geeigneten Polymerisationslampen erreicht werden. Auch der Einsatz von per se schnell- und hochpolymerisierenden Substanzen dürfte zur Senkung der Zellschädigung sinnvoll sein.

Aus toxikologischer Sicht scheint prinzipiell eine Knochenklebung mit den Testsubstanzen möglich. Dabei sollte auf den Einsatz geringer Materialmengen und auf eine ausreichend lange Polymerisationszeit Wert gelegt sowie eine direkte Applikation in den Frakturspalt vermieden werden. Besonders die vergleichsweise geringe Toxizität des Dentinhaftvermittlers Excite sowie der Cyanoacrylate Histoacryl und Cyano Veneer sollte zu weiterführenden Untersuchungen ermutigen. Hierbei dürften In-vitro-Versuche zum Einfluss der Klebstoffe auf die Expression von knochenspezifischen Proteinen wie der alkalischen Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ 1 interessant sein, um die toxische Wirkung der Materialien auf den Knochenstoffwechsel erfassen zu können. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf den Einfluss der Klebstoffe hinsichtlich der Frakturheilung zu.

Für eine klinische Anwendung müsste insbesondere das Degradationsverhalten der Materialien genauer evaluiert werden. Idealerweise sollte dieser Abbau vollständig erfolgen und zeitlich mit der Knochenneubildung korrelieren. Die bisherigen umfangreichen Ergebnisse zur In-vitro-Toxizität und zur Haftkraft am Schweinekiefer lassen bereits an eine Evaluierung der In-vivo-Wirkung dieser potentiellen Knochenklebstoffe im Tierversuch denken. Hierbei sollte der Fokus vor allem auf die Untersuchung von pathohistologischen Veränderungen im Grenzbereich zwischen Knochen und Klebstoff liegen.

Insgesamt können Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als Knochenklebstoffe das chirurgische Repertoire der MKG-Chirurgie erweitern und im Sinne eines minimal-invasiven Vorgehens eine schonende Versorgungsalternative im wenig belasteten Gebiet darstellen. Darüber hinaus könnte die weitere Forschung an synthetischen Klebstoffen nicht nur fruchtbringend für das Gebiet der MKG-Chirurgie, sondern überall dort hilfreich sein, wo es um das Zusammenfügen von filigranen Knochenteilen geht oder um die feste Verankerung von Biomaterialien im Organismus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Amarante MTJ, Constantinescu MA, O'Connor D, Yaremchuk MJ (1995) Cyanoacrylate fixation of caniofacial skeleton. An experimental study. *Plast Reconstr Surg* 4:639-646.
- Bekes K (2003) Die Haftkraft verschiedener Dentinhaftvermittler auf kortikalem Schweineknöchel in vitro. Diss. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- 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.
- Bouillaget S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J22 (1996) In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*:244-248.
- Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology* 31:446-454.
- Bürkle A (2001) PARP-1: A regulator of genomic stability linked with mammalian longevity. *Chembiochem* 2:725-728.
- Chen RS, Liu CC, Tseng, WY, Jeng JH, Lin CP (2003) Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 31:223-229.
- Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A (1993) In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14:359-364.
- Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, Pizzoferrato A (1994a) Cytotoxicity testin of cyanoacrylates using direct contact assay on cell cultures. *Biomaterials* 15(2):92-96.
- Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, Pizzoferrato A (1994b) Toxicity of cyanoacrylates in vivo using extract dilution assay on cell cultures. *Biomaterials* 15(1):63-67.
- Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH (2005) Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 26:745-753.
- Demirici M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H (2008) The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 24:362-371.
- Donkerwolcke M, Burny F, Muster D (1998) Tissues and bone adhesives – historical aspects. *Biomaterials* 19:1461-1466.
- Dumsha TC, Sydskis RJ (1985) Cytotoxicity testing of a dentin bonding system. *Oral Surg Oral Med Oral Path*:637-641.
- Emmler J (2004) In-vitro-Toxizität von Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ferracane J (1994) Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehab* 21:441-452.



Ferracane JL (1990) Condon JR: Rate of elution of leachable components from composite. Dent Mater 6:282-287.

Foth H, Degen GH, Bolt MB (2005) New aspects in the classification of carcinogens. Arh Hig Rada Toksikol 56:167-175.

Galil KA, Schofield ID, Wrigth GZ, Ryall (1984) Cytotoxic effect of two cyanoacrylates. J Dent Res 63:325 (Abstract no.1389).

Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G (1998) Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. J Dent Res 77:2012-2019.

Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G (1999) Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. J Biomed Mater Res 48:772-777.

Geurtsen W: Biocompatibility of resin-modified filling materials (2000) Crit Rev Oral Biol Med 11(3):333-355.

Geschwill K (2002) In-vitro Biokompatibilitätstestung modifizierter Apatit- und Oxidkeramiken in der humanen Osteoblastenkultur. Diss. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

Giebel G, Rimpler M (1981) Klebungen am Skelettsystem, 50 Jahre Hilfsstoffe für den Chirurgen (Teil 1). Biomed Tech 26:35-40.

Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD (2001) Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye AlamarBlue™. J Immunol Methods 252:131–138.

Gosain AK, Song L, Corrao MA, Pintar FA (1998) Biomechanical evaluation of titanium, biodegradable plate and screw and cyanoacrylate glue fixation in craniofacial surgery. Plast Reconstr Surg 101:582-591.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res 70:1450-1455.

Heiss C, Hahn N, Pokinskyj P, Wenisch S, Stahl J-P, Meyer C, Schnettler R (2004) Eigenschaften und Degradation eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers. Biomed Technik 49:163-169.

Heiss C, Hahn N, Wenisch S, Alt V, Pokinskyj P, Horas U, Kilian O, Schnettler R (2005a) The tissue response to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive. Biomaterials 26(12):1389-1396.

Heiss C, Schnettler R (2005b) Bioresorbable bone adhesives. Historical perspective and state of the art. Unfallchirurg 108(5):348-355.

Heiss C, Kraus R, Schluckebier D, Stiller A-C, Wenisch S, Schnettler R (2006) Bone adhesives in trauma and orthopedic surgery. Europ J Trauma 32(2):141-148.

Holst CM, Oredsson SM (2005) Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. Toxic *in vitro* 19:379-387

Hunter KM (1976) Cyanoacrylate tissue adhesive in osseous repair. *The British journal of oral surgery* 14(1): 80-6.

Janda R (2007) Toxikologie der polymerisierbaren Füllungsmaterialien. *Der Freie Zahnarzt* 10:56-63.

Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H (2001) The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929. *Dent Mater* 17: 333-339.

Kaplan M, Baysal K (2005) *In vitro* Toxicity Test of Ethyl 2-Cyanoacrylate, a Tissue Adhesive Used in Cardiovascular Surgery, by Fibroblast Cell Culture Method. *The Heart Surgery Forum* 8(3) E169 - E172.

Karnerva L, Estlander T, Jolanki R (1994) Occupational skin allergy in the dental profession. *Dermatol Clin* 12:517-532.

Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li KC, Lee KM (1993) Plasma and bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg* 75(2):288-292.

Lindl T: Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5.Aufl. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin 2002.

Lu T, Finkel T (2008) Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* 314:1918-1922.

Mantellini MG., Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE (2003) Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 82(8):592-596.

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie R, LaFace DM., Green DR (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556.

Maurer P, Bekes K, Gernhardt CR, Schaller HG, Schubert J (2004a) Comparison of the bond strength of selected adhesive dental systems to cortical bone under in vitro conditions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(4): 377-81.

Maurer P, Bekes K, Gernhardt CR, Schaller HG, Schubert J (2004b) Tensile bond strength of different adhesive systems between bone and composite compared: an in vitro study. *Int J Craniomaxillofac Surg* 32(2): 85-9.

Meechan JG, McCabe JF, Beynon AD (1994) Adhesion of composite resin to bone – a pilot study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 32:91-93.

Meechan JG, McCabe JF (1995) A comparison of the bond strength of two different dentine-bonding agents to bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 53 :284-287.

Mosman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.

Nitsch A, Pabyk A, Honig JF, Verheggen R, Merten HA (2005) Cellular, histomorphologic, and clinical characteristics of a new octyl-2-cyanoacrylate skin adhesive. *Aesth Plast Surg* 29:53-58.

Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245.

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.

Oei SL, Ziegler M (2000) ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 275 (90):23234-23239.

Oliveira Mamede L F, Walther U, El Mahdi K, Haffner C, Kehe K, Seiss M, Hickel R, Folwaczny M, Reichl FX (2004) Zytotoxizität von (Ko)Monomeren an primären humanen Gingiva- und Pulpa-fibroblasten. *Dtsch Zahnärztl Z* 59:648–649.

Oysaed H, Ruyter I. E., Sjøvik Kleven IJ (1988) Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res* 67:1289-1294.

Papatheofanis FJ, Barmada R (1992) Increased superoxide anion production in polymorphonuclear leucocytes on exposure to isobutyl-2-cyanoacrylate. *Biomaterials* 13: 403-407.

Poprawa A (2004) Untersuchungen zur Verbesserung der Kompatibilität und der Adhäsion zwischen dem künstlichen Epithel und der Hornhaut mittels eines Dentinhaftvermittlers. Diss. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

Pradel W, Tenbrieg P, Lauer G (2005) Influence of harvesting technique and donor site location on *in vitro* growth of osteoblastlike cells from facial bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(6):860-866.

Rasche C (2003) Entwicklung einer Biokompatibilitätsuntersuchung nach ISO 10993-5 für biodegradierbare Implantatmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Diss. Ruhr Universität Bochum.

Rathanathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB (1995) Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74:1602-1606.

Riemschneider S (2001) Zur Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei UV-vermittelten Veränderungen an Keratinozyten unter besonderer Berücksichtigung von Wachstum, Apoptose und DNS-Modifikationen. Diss. Math Nat Tech Fakultät Universität Halle.

Rietveld EC, Garnaat MA, Seutter-Berlage F (1987) Bacterial mutagenicity of some methyl-2-cyanoarylates and methyl 2-cyano-3-phenylacrylates. *Mutat Res* 188:97-104.

Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE (2008) HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis *in vitro*. *Dent Mat* 24:134-140.

Satoh MS, Lindahl T (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356:356-358.

Schmalz G (1998) The biocompatibility of non amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 104:696-706.

Schmalz G, Arenholdt-Bindslev D: Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 2005.

Schmalz G, Geurtsen W, Arenholdt-Bindslev D (2006) Die Biokompatibilität von Komposit-Kunststoffen. *Zm* 96;3:34-42.

Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80:1615-1620.

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 85(10):870-877.

Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S (2004a) Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Invest* 8: 81-85.

Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S (2004b) NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 83:837-842.

Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S (2006) Effect of N-acetyl-L-cystein on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 27:1803-1809.

Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Härle F, Hedderich J, Açil Y (2004) Particulated bone grafts-effectiveness of bone cell supply. *Clin. Oral Impl. Res.*15:205–212.

Stanislawski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili Majd E, Goldberg M, Perianin A (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 66:476-482.

Tanka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamakai M (1991) Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehab* 18:353.

Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, 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.

Thumvanit V, Kedjarune U (1999) Cytotoxicity of polymerised commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust Dent J* 44:248-252.

Tseng Y, Tabata Y, Hyon S, Ikada Y (1990) In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res* 24:1355-1367.

Vasenius J (1988) Is n-butyl-2-cyanoacrylate a biocompatible coating material for biodegradable fracture fixation devices? An experimental study on rats. *Clin Mater* (3):133-143.

Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA, Lewis LB, Lockwood PE, Ergle JW, Mettenburg DJ (1999) In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Invest* 3:144-149.

Wataha JC, Schmalz G (2001) Konzepte zur Biokompatibilität. *Zahnärztliche Mitteilungen* 16:34.

Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwalda R, Lauer G, Hübner U, Schmelzeisen R (2002) How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *Biomaterials* 23:3319-3328.

Wiegand A, Caspar C, Becker K, Werner C, Attin T (2006) In-vitro-Untersuchung zur Zytotoxizität von Self-Etch-Adhäsivsystemen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 116:614–621.

## 8 Thesen

1. Seit mehr als drei Jahrzehnten sind metallische Osteosynthesematerialien in der Kiefer-Gesichtschirurgie etabliert. Trotzdem existieren gerade bei dünnen oder wachsenden Knochenstrukturen Indikationsbeschränkungen. Filigrane Knochenfragmente durch eine chirurgische Knochenklebung zu verbinden, könnte im Sinne eines minimal-invasiven Vorgehens eine Alternative zur Plattenosteosynthese in der MKG-Chirurgie darstellen.
2. Im Zentrum der Arbeit standen experimentelle Untersuchungen zur Prüfung der Zytotoxizität von ausgewählten Dentinhaftvermittlern und Cyanoacrylaten an primären humanen Osteoblasten aus dem Kieferbereich in vitro. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Materialien als Knochenklebstoffe in der MKG-Chirurgie eingesetzt werden können.
3. Getestet wurden die Klebstoffe Excite, Clearfil New Bond und Xeno III (Dentinhaftvermittler) sowie Histoacryl und Cyano Veneer (Cyanoacrylate), weil sie das Spektrum gebräuchlicher Materialien repräsentieren und zudem durch unterschiedliche Reaktionen aktiviert werden.
4. Das methodische Vorgehen entsprach der europäischen Norm (EN ISO 10993-5), einem Leitfadensystem zur Testung auf In-vitro-Zytotoxizität von Medizinprodukten. Mit diesem Testsystem ist es gelungen, differenzierte Einsichten zur Toxizität der untersuchten Klebstoffe auf unterschiedlichste Zellkompartimente zu gewinnen. Dazu gehören vor allem Erkenntnisse über toxische Effekte in den Mitochondrien (Resazurin/MTT-Test), im Endoplasmatischen Reticulum (MTT-Test), im Zytosol (MTT-Test), im Zellkern (PARP-Assay) und auf die Zellmembran (AnnexinV-Assay).
5. Alle untersuchten Klebstoffe besitzen ein zytotoxisches Potential. Es wurden zeit- und konzentrationsabhängig toxische Effekte nachgewiesen. Die gemessenen Unterschiede im Grad der Toxizität zwischen den einzelnen Materialien sind statistisch signifikant.

6. Bei den Dentinhaftvermittlern zeigte sich das lichthärtende Excite weniger zellschädigend als das selbstätzende Xeno III und das chemisch härtende Clearfil New Bond. Eine wesentliche Ursache dafür dürfte im Reaktionsmechanismus des Polymerisationsprozesses liegen. Lichthärtende Materialien polymerisieren im Vergleich zu chemisch härtenden Kunststoffen in höherem Maße aus und weisen deshalb einen geringeren toxisch wirkenden Rest-Monomer-Gehalt auf. Als das Produkt mit der insgesamt stärksten Zytotoxizität erwies sich der Dentinhaftvermittler Clearfil New Bond.
7. Die beste Zellverträglichkeit zeigte das Butyl-2-Cyanoacrylat Histoacryl. Insgesamt sind die Cyanoacrylate signifikant geringer zellschädigend als die Dentinhaftvermittler. Ein Ranking der Testmaterialien anhand ihrer ED<sub>50</sub> Werte ergab folgende Toxizitätsstärken in aufsteigender Reihenfolge: Titan < Histoacryl < Cyano Veneer < Excite < Xeno III < Clearfil New Bond.
8. Die Zytotoxizität der getesteten Klebstoffe ist vor allem abhängig von Art und Dosis der im wässrigen Milieu löslichen Bestandteile. Das Ausmaß der Toxizität variierte beträchtlich in Abhängigkeit vom Klebstofftyp, von der Eluatkonzentration und von der Kontaktzeit der Klebstoffe mit dem Kulturmedium.
9. Die toxischen Substanzen (Restmonomere und Additive) gehen hauptsächlich in den ersten Tagen nach der Anwendung der Klebstoffe in Lösung. Da über die Zeit die Menge der löslichen Bestandteile sinkt, nimmt die Zellschädigung ab und die Vitalität der Zellen wieder zu. Die licht- und die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen belegen auch visuell diese messbare Abnahme der Zytotoxizität.
10. Bei allen auf Gentoxizität getesteten Adhäsiven (Clearfil New Bond, Excite und Histoacryl) ließen sich Doppelstrangbrüche in der DNA der Osteoblasten und damit gentoxische Effekte über eine immunzytochemische Bestimmung der PARP-Aktivität indirekt nachweisen. Die getesteten Dentinhaftvermittler besitzen ein deutlich größeres gentoxisches Potenzial als das Butyl-2-Cyanoacrylat Histoacryl.
11. Infolge der DNA-Schädigung durch die Dentinhaftvermittler und die Cyanoacrylate wird eine Apoptose in den Osteoblasten induziert.

12. Die Abnahme von Enzymaktivitäten und die Reduktion der Zellatmung in den Mitochondrien sowie die festgestellte DNA-Schädigung könnten auf oxidativem Zellstress beruhen, der durch „Reaktive Sauerstoffspezies“(ROS) ausgelöst wird und eine Apoptose in den Zellen einleitet.
13. Die integrative biologische Antwort der Osteoblasten auf die verschiedenen Klebstoffe ist ähnlich, allerdings mit unterschiedlichem Ausmaß des Schädigungspotentials. Folglich könnten die zellschädigenden Effekte der verschiedenen Dentinhaftvermittler und Cyanocrylate jeweils auf gleichen toxikokinetischen und toxikodynamischen Mechanismen beruhen und sollten durch gleichartige Strategien beherrschbar sein.
14. Histoacryl, Cyano Veneer und Excite sind aus toxikologischer Sicht als Knochenklebstoffe im Kiefer-Gesichtsbereich am ehesten geeignet. Dabei sollte auf den Einsatz geringer Materialmengen und auf eine ausreichend lange Polymerisationszeit Wert gelegt sowie eine direkte Applikation in den Frakturspalt vermieden werden.
15. Eine adhäsive Osteosynthese mit diesen Klebstoffen erweitert das chirurgische Repertoire der MKG-Chirurgie und stellt eine schonende Versorgungsalternative zur herkömmlichen Plattenosteosynthese in wenig belasteten Gebieten dar.

## Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Christian Heinzelmann  
geboren am: 31.07.1980  
in: Halle/Saale  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Dr. Gisela Heinzelmann (geb. Zschoke)  
Dipl. Phys. Horst Heinzelmann

### Schulbildung:

1987-1991 Grundschule: 9. Polytechnische Oberschule Halle/Neustadt  
1991-1999 Gymnasium: Latina „August Hermann Francke“ in Halle/Saale  
1999 Abitur

### Zivildienst:

1999-2000 Zivildienst in der Tagespflege der Volkssolidarität Halle e.V.

### Studium:

2000-2005 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle  
Nov. 2005 Approbation als Zahnarzt  
2006-2010 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und am Universitätsspital Basel  
Juni 2010 Approbation als Arzt  
2004-2009 Doktorand an der Klinik und Poliklinik für Mund,- Kiefer und plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle und am Institut für Umwelttoxikologie der MLU-Halle-Wittenberg

### Berufsausübung:

2007-2010 Tätigkeit als Zahnarzt im Bereitschaftsdienst an der Universitätspoliklinik für Zahnärztliche Prothetik an Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Seit Juni 2010 Arzt in der Weiterbildung zum Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgen an der Klinik und Poliklinik für Mund,- Kiefer und plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle, den 30. September 2009

Christian Heinzelmann

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich noch keine andere Arbeit als Promotion an dieser oder einer anderen Medizinischen Fakultät eingereicht habe.

Halle, den 30. September 2009

Christian Heinzelmann

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidi Foth für die stets engagierte und motivierende Begleitung der Arbeit und die Möglichkeit, die experimentellen Untersuchungen am Institut für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchführen zu können. Ihre wissenschaftlichen Impulse, die zahlreichen Gespräche und ermutigenden Worte haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Gleichfalls bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert für die gewährte Unterstützung, die wissenschaftliche Anleitung sowie die Durchsicht des Manuskripts. Seine kreativen und kritischen Anmerkungen und Hinweise waren für das Erstellen der Arbeit sehr hilfreich.

Herrn PD Dr. Dr. Peter Maurer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die grundlegende Wegbereitung der Arbeit und für die wohlwollende Begleitung in der ersten Phase.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Felix Glahn aus dem Team der Umwelttoxikologie für die vielen anregenden Gespräche und die kreativen Hinweise im alltäglichen Forschungsprozess.

Frau Angela Rosemeier aus der Abteilung für Experimentelle Orthopädie danke ich herzlich für die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Herrn Andreas Cismak vom Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik Halle/Saale danke für die Anfertigung der raserelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Nicht zuletzt möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Umwelttoxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danken, das durch seine Hilfsbereitschaft zum Gelingen des Dissertationsprojekts beigetragen hat. Dies gilt insbesondere für Christine Regener, Tina Röder, Irmgard Martin, Hartmut Auffarth, Dr. Felix Glahn, Jan Wiese, Dr. Abdel-Rahman Torky, Mohamed Ahmad

## Veröffentlichungen und Förderung der Arbeit

### Publikationen:

Heinzelmann C: In-vitro-Untersuchungen zur Zelltoxizität von potentiellen Knochenklebstoffen. Zahnärztliche Nachrichten 8-2009: 33-34

### Wissenschaftliche Vorträge:

Heinzelmann C: „Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als potentielle Knochenklebstoffe in der Mund-, Kiefer-, und plastischen Gesichtschirurgie – eine in vitro Untersuchung zur Biokompatibilität.“, anlässlich der 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische- und Wiederherstellungschirurgie in Hannover im September 2007

Heinzelmann C: „Dentinhaftvermittler als potentielle Knochenklebstoffe in der Kiefer- und Gesichtschirurgie“, anlässlich des 12. Jahreskongresses der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in Bad Hofgastein im Januar 2008

Heinzelmann C: „Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als potentielle Knochenklebstoffe in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie eine In-vitro-Studie zur Zelltoxizität“, anlässlich der Verleihung des Erwin-Reichenbach-Förderpreises 2008 im Rahmen des Zahnärztetages Sachsen-Anhalt in Magdeburg 2009

### Posterbeiträge:

Heinzelmann C: Zelltoxische Untersuchung von Dentinhaftvermittlern als Knochenkleber in der Kiefer-Gesichtschirurgie; 19. Wettbewerb DGZMK/BZÄK Dentsply Förderpreis Deutschland im Rahmen des Zahnärztetages in Berlin 2005

Heinzelmann C, Glahn F, Maurer P, Ahmad M, Schubert J, Foth H: Dentin adhesive agents and cyanoacrylates as potential bone adhesives in cranio-maxillofacial and plastic surgery- an in vitro study of cell toxicity; 46<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Sept. 2009 Dresden, Germany

### Wissenschaftliche Preise:

Erwin-Reichenbach-Förderpreis 2008 der Zahnärztekammer des Landes Sachsen-Anhalt  
Heinzelmann C: Dentinhaftvermittler und Cyanoacrylate als potentielle Knochenklebstoffe in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie eine In-vitro-Studie zur Zelltoxizität.

### Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt:

Die Arbeit wurde gefördert nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes-Sachsen-Anhalt vom 01.04.2006 bis 31.08.2008.