

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

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover

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

von

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

Zusammenfassung

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

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

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

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

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

Bei der Verwendung von primären Zellen ist die Frage, inwieweit diese Zellen für reproduzierbare Zytotoxizitätstest verwendet werden können, von großer Wichtigkeit, da sich

mit zunehmender Passagenzahl die Morphologie und die Biochemie dieser Zellen stark verändert.

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

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

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

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

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

Schlagwörter:

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

Keywords:

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

1. Einleitung

1.1 Begründung zur Notwendigkeit biologischer Prüfungen von zahnärztlichen Materialien

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

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

1.2 Die biologische Testung von Materialien

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

Die American Dental Association (ADA) erarbeitete 1976 eine Reihe von Richtlinien, die für die Standardisierung von Tests zur Analyse von dentalen Materialien herangezogen werden sollten. Diese Richtlinien sind in den letzten Jahren überarbeitet worden und finden in den heutigen europäischen und internationalen Normen ihre Anwendung (EN 30993, ISO/TR 7450-1984). Die Materialien sollen dabei auf folgende biologische Effekte untersucht werden:

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

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

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

1.2.1 Zellkulturen

Schon seit 30 Jahren werden Zell- und Gewebekulturen verschiedenster Art zur Bestimmung zytotoxischer Effekte von zahnärztlichen Materialien, wie Wurzelkanalfüllungsmaterialien, Füllungsmaterialien, Unterfüllungsmaterialien etc. benutzt. Die Untersuchungen dentaler Materialien in den In-vitro-Studien bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber den In-vivo-Modellen, da sich hierbei einzelne Zelltypen isolieren und die Umgebungsparameter genauer definieren lassen. Desweiteren sind die Testverfahren relativ gut reproduzier- und standardisierbar, somit ökonomisch und im Gegensatz zu den häufig angewandten Tierversuchen ethisch unbedenklich.

Die Prüfung einer möglichen Toxizität kann mit den unterschiedlichsten Zellkulturen

durchgeführt werden. Die Problematik, die sich dabei ergibt ist, daß je nach Herkunft der Zellart ein verändertes Verhalten auf das zu untersuchende Material auftreten kann.

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

Man unterscheidet dabei zwischen Dauerzellkulturen und primären Zellkulturen.

1.2.2 Dauerzellkulturen

Dauerzellkulturen, oft auch permanente oder immortalisierte Zellkulturen genannt, sind spontan oder gezielt so transformiert worden, daß sie unbegrenzt passagiert und auf Vorrat über Jahre gehalten werden können.

Die wesentliche Eigenschaft von permanenten Zelllinien ist, daß diese Zellen Klone, ausgehend von einer Zelle, darstellen. Somit sind diese Zellen genetisch, morphologisch und physiologisch gleich. Erst dadurch lassen sich viele molekularbiologische und biochemische Untersuchungen in ausreichender Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführen, da die charakteristischen Eigenschaften der Zellen erhalten bleiben.

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

1.2.3 Primäre Zellkulturen

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

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

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

Die EG-Leitlinien zur Prüfung von Impfstoffen definieren die Primärzellen als Kulturen von Zellen, die sich nicht von denen im tierischen Ursprungsgewebe unterscheiden, aus denen sie hergestellt wurden. Ein wesentlicher Vorteil des primären Zellkulturmodells gegenüber den Dauerzellkulturen ist die bessere Anpassung des Zellkulturmodells an die In-vivo-Lebensbedingungen. Die Heterogenität des Zellgewebes ist aber auch ein Ausdruck des physiologischen Zustandes des Herkunftsgewebes, da diese Zellen unterschiedliche Differenzierungsrichtungen mit ähnlichem oder unterschiedlichem Phänotyp aufweisen. Desweiteren können Zellen verschiedensten Alters vorhanden sein und in die Kultur mit übernommen werden. Dieses ist ein Zustand, der den In-vivo-Bedingungen stark ähnelt (Heidemann, 1982).

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

Tab 1.: Unterschiede zwischen primären Zellen und Dauerzellkulturen

(nach Zalkind 1979).

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

1.5 Methoden zur Bestimmung der Toxizität in der Zellkultur mittels Fluoreszenzfarbstoffen

Seit vielen Jahre werden fluoreszierende Farbstoffe zur spezifischen Lokalisation bestimmter Stoffe in Zellen und auf Zellmembranen, wie z.B. bei der indirekten Immunfluoreszenz, benutzt. Weiterhin haben sich die Fluoreszenzfarbstoffe als Alternative zu radioaktiven Methoden z.B. bei der Bestimmung der DNA-Sequenz mit fluoreszenzgekoppelten Basenanalogen bewährt.

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

Jedoch sind bisher noch keine Untersuchungen zur Bestimmung der ED₅₀ mit fluoreszierenden Farbstoffen in der Zellkultur durchgeführt worden.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der ED₅₀ mittels fluoreszierenden Farbstoffen bietet die DNA-Markierung mit den Bisbenzimidderivaten Hoechst H 33342 und H 33358. Diese Farbstoffe binden sich spezifisch und quantitativ an die DNA und fluoreszieren im gebundenen Zustand (Latt, 1976; Arnd-Jovin and Jovin, 1977). Im Gegensatz zu H 33258 und anderen DNA-Farbstoffen wird H 33342 von lebenden Zellen etwa um den Faktor 1000fach besser aufgenommen (Blaheta et al., 1991) und ist selbst relativ untoxisch für die Zellen (Arnd-Jovin and Jovin, 1977; Durand and Olive, 1982).

Da sich der Hoechst Farbstoff quantitativ, d. h. stöchiometrisch an die DNA bindet, können Zellzahlbestimmungen mit diesem Farbstoff durchgeführt werden. Blaheta et al. (1991) beschrieben eine Methode der Zellzählung mittels Markierung mit den Bisbenzimid H 33342 und H 33258.

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

Die Fluoreszenzintensität kann quantitativ mit speziell entwickelten Geräten, sogenannten Fluoreszenzscannern direkt in der Mikrotiterplatte gemessen werden,

wobei es verschiedene Meßprinzipien gibt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Scanner strahlt eine Halogenlampe Licht in definierter Wellenlänge (Exzitation) durch die Unterseite der Mikrotiterplatte aus, die dabei durch den Farbstoff entstehende Fluoreszenz (Emission) wird gleichzeitig von der Unterseite der Platte gemessen. Der Durchgang für die Messung einer 96-well-Platte beträgt dabei weniger als 1 min. Die Messwerte stellen relative Fluoreszenzeinheiten dar, die im Computer weiter verarbeitet und berechnet werden können. Mit diesem Gerät ist es möglich, auch mit relativ wenig Zellmaterial ED₅₀- Bestimmungen durchzuführen. Zugleich können mehrere Farbstoffe, die sich durch verschiedene Wellenlängen bei Exzitation und Emission unterscheiden, durch verschiedene Filterkombinationen quantitativ in derselben Mikrotiterplatte detektiert werden. Eine andere Möglichkeit die Biokompatibilität einer Substanz zu untersuchen, ist die Messung der Membranintegrität an Zellen, da für die Funktion der Zelle die Membran von essentieller Bedeutung ist. Eine der möglichen Methoden zur Messung der Membranintegrität ist die Messung des Überstandes von ⁵¹Cr (Brunner et al., 1968). Dabei wird ⁵¹Cr₂O₇²⁻ von den Zellen aufgenommen und intrazellulär reduziert zu ⁵¹Cr, das dann nicht mehr freigesetzt werden kann. Bei einer Schädigung der Zellmembran ist eine erhöhte Radioaktivität im Überstand nachzuweisen.

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

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

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

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes als Zellzahlparameter wird ebenfalls zur Bestimmung der Toxizität herangezogen. Die Messung von Zellen in der Mikrotiterplatte kann mit dem fluoreszierenden Farbstoff Sulforhodamin 101 erfolgen. Dieser Farbstoff ist ein Derivat des Sulforhodamins B. Dabei werden die Zellen nach

Fixierung und Permeabilisierung mit dem Farbstoff inkubiert. Sulforhodamin 101 ist ein aminoxanthener Farbstoff mit zwei Sulfogruppen. Das Sulforhodamin 101 bindet sich an freie Aminogruppen in Proteinen. Diese Bindung ist stöchiometrisch und kann durch Abführen des Überstandes und Lösen des gebundenen Sulforhodamins durch pH-Änderung gemessen werden.

Sulforhodamine sind die empfindlichsten fluoreszierenden Farbstoffe für die Proteinbestimmung (Brinkley, 1991).

1.6 Materialien

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

1.6.2 Kunststoffe

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

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

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

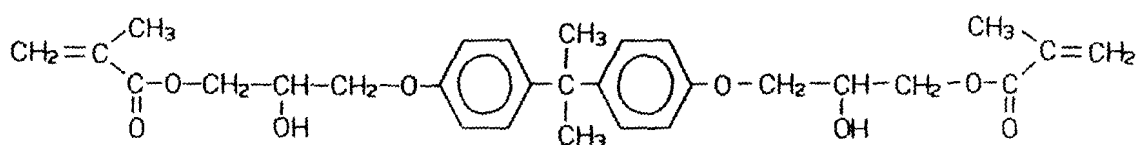


Abb 1: Bisphenol-a-Glycidyl-methacrylat (Bis-GMA), Bowen-Monomer

Durch die Verwendung von Makromolekülen erhöhte sich die Viskosität des Materials. Mit dem Einsatz von sogenannten Verdünnern, den Komonomeren, konnte eine bessere Verarbeitungsqualität erreicht werden. Die Bezeichnung "Verdünner" ist chemisch gesehen nicht korrekt, da die Komonomere als Mono-, Di- oder Trimethacrylate mit den Monomeren kopolymerisieren und somit in den Kunststoff eingebaut werden. Sie dienen nur zur besseren Verarbeitung des Kunststoffes vor der Polymerisation. Die Polymerisation eines Füllungsmaterials läßt sich in zwei Funktionsarten aufteilen: in eine chemische und in eine lighthärtende Polymerisation.

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

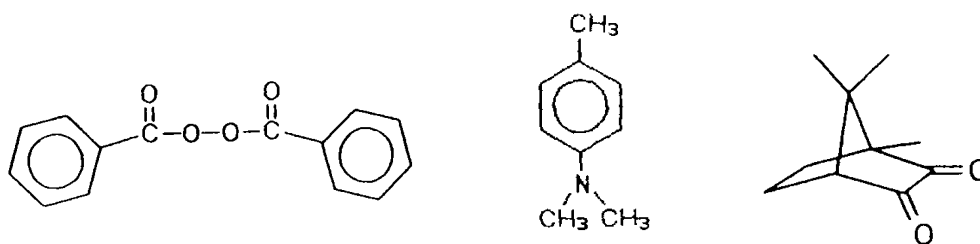


Abb 2.:

Dibenzoylperoxid (DBPO), N,N Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) und Campherquinon (CQ)

DBPO zerfällt in zwei Carboxylradikale, welche die Polymerisation starten. Als Koinitiatoren für DBPO fungieren tertiäre Amine. Das Amin N,N-Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) geht mit DBPO einen Charge-Transfer-Komplex ein, der dann unter Bildung eines Amin- und eines Carboxylradikals zerfällt. Die Toxizität von tertiären Aminen ist bekannt. Die LD₅₀-Dosis bei Ratten beträgt bei tertiären Aminen 25 mg/kg. Der hohe Restgehalt und die unbefriedigende Monomer-Polymer-Konversion der heute verfügbaren gefüllten Kunststoffe (Assmussen, 1975) bedingen neben einer

biologischen Unverträglichkeit auch Veränderungen der physikalischen Eigenschaften. Dies kann zur Folge haben, daß sich das Material verfärbt oder auch zu einer mangelhaften Standfestigkeit des Komposites führt. Es ist bekannt, daß alle im unpolymerisierten Komposit vorliegenden Komponenten extrahierbar sind (Ferrance, 1990, Spahl 1990, Jontell, 1995 Geurtsen, 1997, 1998, 1999, Hamid, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, daß sich Monomere und die Additiva bis zu 2 Gew.% innerhalb von 14 Tagen nach Start der Polymerisation aus dem Kunststoff herauslösen lassen.

Mittels der Gaschromatographie/Massenspektroskopie und der IR-Spektroskopie und anschließendem Vergleich der IR-Spektren in der Literatur konnten eine Reihe von Substanzen aus polymerisierten und unpolymerisierten Kompositextrakten identifiziert werden. Interessanterweise ließen sich mehr Substanzen aus den polymerisierten als aus den unpolymerisierten Extrakten identifizieren. Das bedeutet, daß während der Polymerisation zusätzliche organische Substanzen als Reaktions- oder Abbauprodukte entstehen. Die Herkunft dieser Produkte ist in den meisten Fällen noch unklar, nur bei Camphersäureanhydrid (CSA) und Hydroxyepicampher (HC) läßt sich die Herkunft aus dem Campherquinon herleiten (Spahl, 1991, 1995 und 1998, Geurtsen, 1998;).

Angesichts dieser Daten und der nachgewiesenen Zytotoxizität von modernen Kompositen (Geurtsen, 1987) ist zu vermuten, daß einige Nebenwirkungen der in dieser Studie gefundenen Substanzen darauf zurückzuführen sind. Deshalb sollte eine Biokompatibilitätsprüfung nicht nur an dem ausgehärteten Komposit, sondern auch an den Einzelbestandteilen dieser Füllungswerkstoffe durchgeführt werden. Dadurch ergäbe sich die Möglichkeit, schon im Vorfeld hochtoxische oder mutagene Substanzen zu eliminieren, die dann später zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnten. Bisher wurden allerdings erst verhältnismäßig wenige Untersuchungen zur biologischen Verträglichkeit von Einzelbestandteilen zahnärztlicher Komposite durchgeführt (Geurtsen, 1988, 1998, Hensten-Petersen, 1978, Hanks, 1991, Wataha, 1994, Li, 1999), jedoch wurde bisher kein Vergleich der Zytotoxizitäten von Substanzen mit chemisch ähnlicher Funktion vorgenommen, um einen Vergleich der Zytotoxizitäten innerhalb von Funktionsklassen (Monomere, Komonomere, Inhibitoren, Initiatoren, Additiva etc.) zu erhalten. Von Hanks (1991) wurden insgesamt 11 Einzelsubstanzen von Füllungswerkstoffen an einer Dauerzelle getestet. Die Ergebnisse zeigten für alle untersuchten Substanzen eine hohe Toxizität. Die ED₅₀-Werte von BIS-GMA, UEDMA, TEGDMA und anderen Glycidylmethacrylaten lagen zwischen 10 - 100 µmol/L.

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

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

Für die Prüfung der Mutagenität eines Werkstoffes ist in der EN 30993 der Ames-Test vorgeschrieben. Bisher wurden schon einige Monomere und Bestandteile von Kompositen im Ames-Test überprüft (Hensten-Petersen et al., 1978, Geurtsen, 1988, Schweikl, 1994). Genotoxische Effekte traten in diesen Studien nicht auf. Der Ames-Test (Ames, 1962) beruht auf der Bildung von Revertanten von speziellen histidinauxotrophen Mutanten der Bakterienstämme des Stammes *Salmonella typhimurium* (Ames-Test, Ames et al., 1973, 1979). Auf der Suche nach einer schnelleren und kostengünstigeren Methode wurde der *umu*-Test als Alternative zum Ames-Test entwickelt (Reifferscheid, 1993). Dieser Test läßt sich innerhalb eines Tages ausführen und auswerten, während der Ames Test mehrere Tage benötigt.

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

Beim *umu*-Test werden nicht wie bei dem klassischen Ames-Test die durch die Rückmutation entstandenen Bakterienkolonien (*his*-Revertanten) gezählt, sondern man bestimmt die Aktivität der induzierten Gensequenzen, die ein Maß für die Genotoxizität darstellen, durch die kolorimetrische Bestimmung der Genaktivität, die sich dadurch leicht bestimmen läßt, daß die Gene mit dem Enzym β -Galaktosidase gekoppelt werden (Shinagawa et al., 1983). Die β -Galaktosidase läßt sich durch den Zusatz von *o*-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid (ONPG) nachweisen. Das ONPG wird dabei von der β -Galaktosidase in seine gefärbten Komponenten gespalten. Die Farbintensität ist ein Maß für die Mutagenität einer Substanz. Ein weiterer Vorteil des *umu*-Mikrotests gegenüber dem Ames-Test ist nicht nur der Zeitvorteil, sondern die gleichzeitige Messung der Genotoxizität durch die Ermittlung der Induktionsrate und der allgemeinen Zytotoxizität einer Substanz durch Messung der Zellzahl anhand der optischen Dichte.

Der *umu*-Test wird bereits seit Jahren in der Umweltanalytik zur Untersuchung von

Gentoxizitätsprofilen an Fließgewässern angewendet (Reifferscheid, 1990, 1991). Für den *umu*-Test steht eine DIN-Vorschrift kurz vor der Verabschiedung; eine ISO-Version ist in Vorbereitung.

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

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

Deshalb kann nicht ohne Weiteres aus Ergebnissen mit einem bakteriellen System wie dem *umu*-Mikrotest auf die Wirkung in eukaryontischen Organismen geschlossen werden. Die EN 30993 fordert deshalb neben dem Ames-Test auch einen Gentoxizitätstest in einem eukaryontischen System. Der DNA-Synthese-Inhibitionstest (DIT-Test) beruht auf der Tatsache, daß Veränderungen an der DNA meist zu einer Verringerung der replikativen DNA-Syntheserate dieser Zellen führt. Dieser Test wurde bereits erfolgreich zur Detektion von Kanzerogenen eingesetzt (Heil, 1992). Dabei wird angenommen, daß die Bindung von karzinogenen Substanzen an die DNA die Synthese hemmt. Dieser nichtradioaktive Test beruht auf dem Einbau und dem enzymatischen Nachweis eines Thymidinanalogons, dem Bromdesoxyuridin (BrdU). Das eingebaute BrdU wird dann mit Hilfe eines primären und eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers mit anschließender Substratinduktion mittels O-Phenyldiamin (OPD) im Sandwich-Verfahren detektiert. Eine anschließende Proteinmessung ergibt in Verbindung mit dem gebildeten OPD eine zellzahlkorrigierte DNA-Synthese. Als gentoxisch wird eine Substanz bezeichnet, bei der die zellzahlkorrigierte DNA-Synthese 50% oder weniger der Kontrolle erreicht.

Ein Absinken der DNA-Synthese weist hierbei auf einen gentoxischen Schädigungsmechanismus hin. Eine einzige DNA-Läsion ist dabei außreichend, um die Initiation der Replikation aller Replikone eines Clusters zu inhibieren (Painter, 1986), und ein einziges DNA-Addukt hemmt die (durch die DNA-Polymerasen erfolgende) Kettenelongation (Villiani et al., 1978).

1.9 Problemstellung

Bisher sind nur wenige dieser Materialien auf Zytotoxizität hin untersucht worden. Um eine Abschätzung des Toxizitätspotentials schon bei der Entwicklung neuer Materialien zu erkennen, ist es unerlässlich die ED_{50} nicht nur aus Eluat, sondern auch der jeweiligen Einzelsubstanzen zu bestimmen. Das Ziel dieser Arbeit sollte sein, die ED_{50} dieser Einzelbestandteile innerhalb der jeweiligen Materialklasse zu ermitteln und hinsichtlich ihrer Zytotoxizität zu bewerten. Weiterhin werden in diesen Arbeiten meist Dauerzellkulturen eingesetzt, die dem "oralen" Zielgewebe nicht oder nur bedingt entsprechen. Daher ist eine weitere wichtige biologische Fragestellung die Vergleichbarkeit der Zytotoxizität von Dauerzellkulturen mit nicht transformierten Zellkulturen, die direkt dem oralen Zielgewebe entnommen worden sind. Für die vergleichende Untersuchung stehen primäre Zelllinien zur Verfügung, die aus der Gingiva, der Wurzelhaut und der Pulpa von Zähnen gewonnen wurden. Für die Vergleichbarkeit der Toxizität sollte ein Testsystem gefunden werden, das es ermöglicht, mit verhältnismäßig wenig Zellmaterial reproduzierbare Daten zu bekommen. Dazu sollte auf der Basis von Fluoreszenzfarbstoffen (Hoechst 33342, BCECF-AM und Sulforhodamin 101) ein Testsystem für die Bestimmung der ED_{50} in der Zellkultur für adhärente Zellen entwickelt werden. Zudem sollten Kultur- und Inkubationsbedingungen eingehalten werden, die es gewährleisten, daß die Substanzen in der gesamten Proliferationsphase auf die Zellen einwirken können. Die mögliche Gentoxizität und Mutagenität der in der Zahnmedizin verwendeten Substanzen spielt durch die lange Verwendungsdauer von Kompositen eine wichtige Rolle. Deshalb sollte an einigen ausgewählten Substanzen eine mögliche mutagene Wirkung dieser Substanzen mit zwei Kurzzeittestsystemen ermittelt werden. Da der *umu*-Mikrotest ein prokaryontisches System darstellt und Ergebnisse aus dem *umu*-Test nicht ohne weiteres auf Zellkulturen humaner Zellen übertragen werden können, sollte mit einem eukaryontischen Testsystem, dem DNA-Synthese-Inhibitionsstest (DIT-Test) Aufschluß über eine möglicherweise vorhandene DNA-synthesebeeinflussende Wirkung dieser Substanzen gefunden werden.