

**Aus dem Zentrum der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des  
Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Poliklinik der Zahnerhaltungskunde  
(Direktor: Prof. D. Heidemann)**

**Zytotoxizität fünf verschiedener Dentinadhäsive in einer Kombination mit  
einer Präkonditionierung mittels eines Gemisches aus Phosphor- und  
Flusssäure – In-vitro-Untersuchung an Gingivafibroblasten mit Hilfe des  
Agar-Diffusionstests**

**DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main**

**vorgelegt von  
Martina Clemens  
aus Darmstadt**

**Frankfurt am Main, 2006**

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent: Priv.-Doz. Dr. S. Gerhard-Szep  
Koreferent: Prof. Dr. H. Ch. Lauer  
Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. **Problemstellung**

## 2. **Literaturübersicht**

### 2.1. Adhäsivsysteme

2.1.1. Die Rolle der Schmierschicht (Smear-Layer-Schicht)

2.1.2. Die Konditionierungsarten und Konditionierungsmittel

2.1.3. Die verschiedenen Dentin-Adhäsivsysteme

### 2.2. Zellkulturen

2.2.1. Die Zellkulturtypen

2.2.2. Die Aussagekraft von Zellkulturtests

### 2.3. Zellkulturmedien

### 2.4. Spezielle Kulturgefäße

2.4.1. Gefäßtypen

2.4.2. Gefäßvorbehandlung mit Zellkultursubstraten

### 2.5. Prüfungen zur Toxizitätsbestimmung

2.5.1. Die Agardiffusionsprüfung

2.5.2. Die Filterdiffusionsprüfung

2.5.3. Die Pulpa- und Dentinanwendungsprüfung

2.5.4. Die Pulpaüberkappungsprüfung

2.5.5. Die endodontische Anwendungsprüfung

### 2.6. Versuchsaufbauten für Zytotoxizitätstests

### 2.7. Zytopathologische Zellveränderungen

## 3. **Material und Methode**

### 3.1. Materialien

3.1.1. Die untersuchten Stoffe

- 3.2. . Zellzüchtung
  - 3.2.1. Fibroblastenzüchtung aus Explantaten
  - 3.2.2. Zusammensetzung des Nährmediums
  - 3.2.3. Subkultivierung
- 3.3. Versuchsaufbau
  - 3.3.1. Herstellung der Dentinscheiben
  - 3.3.2. Herstellung des Agars
  - 3.3.3. Versuchsanordnung
  - 3.3.4. Vorversuche
    - 3.3.4.1. 1. Vorversuch
    - 3.3.4.2. 2. Vorversuch
  - 3.3.5. Hauptversuche
    - 3.3.5.1. 1. Versuch
    - 3.3.5.2. 2. Versuch
    - 3.3.5.3. 3. Versuch
    - 3.3.5.4. 4. Versuch
- 3.4. Mikroskopische Auswertung
- 3.5. Statistik und Darstellung der ermittelten Daten

## 4. **Ergebnisse**

- 4.1. Vorversuche
- 4.2. Hauptversuche – quantitative Ergebnisse
  - 4.2.1. Dentinscheibendicke 500  $\mu\text{m}$  – 100  $\mu\text{m}$
  - 4.2.2. Dentinscheibendicke 500  $\mu\text{m}$
  - 4.2.3. Dentinscheibendicke 400  $\mu\text{m}$
  - 4.2.4. Dentinscheibendicke 300  $\mu\text{m}$
  - 4.2.5. Dentinscheibendicke 200  $\mu\text{m}$
  - 4.2.6. Dentinscheibendicke 100  $\mu\text{m}$
- 4.3. Hauptversuche – qualitative Ergebnisse
  - 4.3.1. Syntac Sprint
  - 4.3.2. Syntac Single Component

4.3.3. Prime & Bond

4.3.4. Scotchbond 1

4.3.5. Optibond Solo

4.4. Übersicht der statistischen Ergebnisse

4.4.1. Dentinadhäsive

4.4.1.1. Ranking der Materialien laut statistischer Auswertung

4.4.2. Gemisch

5. **Diskussion**

5.1. Das Zellkulturmodell

5.2. Zytotoxizität in Abhängigkeit zur Dicke und Konditionierung der Prüfkörper

5.3. Zytotoxizität in Abhängigkeit zu Inhaltsstoffen und Expositionsdauer

5.4. Untersuchungen zur Zytotoxizität anderer Stoffe

6. **Zusammenfassung**

7. **Anhang**

8. **Literaturverzeichnis**

9. **Danksagung**

10. **Lebenslauf**

11. **Schriftliche Erklärung**

# 1. PROBLEMSTELLUNG

In den vergangenen Jahren sind die zahnfarbenen Versorgungen mittels Keramik oder Kunststoff zu einem essentiellen Bestandteil einer jeden ästhetisch wertvollen Restauration geworden. Die Nachfrage nach zahnfarbenen Restaurationen aus Komposit, Kompomer und Keramik wurde durch ein wachsendes Ästhetikbewusstsein und die zunehmende Ablehnung von Amalgam seitens des Patienten stark belebt (**HALLER 1997**). Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass sich die Indikationen für Keramiken, Komposite und somit auch für Dentinadhäsive ständig erweitern. Während die sehr gute Haftung von Kompositen am Zahnschmelz seit Jahren bekannt ist, so ist es insbesondere das Gebiet der Dentinhaftung, auf welchem in den letzten Jahren rasante Entwicklungen zu beobachten sind (**SCHÄFER 1999**). Durch die Entwicklung der Dentinadhäsive können Komposite heute sogar in nicht schmelzbegrenzten Bereichen eingesetzt werden (**HALLER 1992**). Da Dentinadhäsive in nahen und lang anhaltenden Kontakt mit vitalem Dentin kommen, ist ihr Einfluss auf das Pulpengewebe von großem Interesse (**HUANG 2002**).

Alle im Mund präsenten Flüssigkeiten, die biologisch und chemisch aggressiv reagieren können, können eine Hypersensibilität, eine Demineralisation oder gar eine Bakterieninvasion triggern (**GREGOIRE et al 2003**). Zusätzlich zu den werkstoffkundlichen Eigenschaften bestimmt die Biokompatibilität die Eignung eines Materials (**GEURTSEN 1987**). Es ist daher wichtig und unerlässlich, im Mund zu verwendende Produkte auf ihre Zytotoxizität zu testen, um die angewandten Mittel und Materialien, wie auch die Applikationsmethoden, aus biologischer Sicht beurteilen zu können (**LANGELAND 1965**).

Als Grundlage für die Beurteilung biologischer Eigenschaften von zahnärztlichen Werkstoffen im Allgemeinen und von Komposit-Kunststoffen im Speziellen dienen Prüfverfahren, die national und international als Standardprogramme bzw. Entwürfe in der DIN EN ISO 7405: 1997 vorliegen (**SCHMALZ 1985**).

Die Toxizität verschiedener zahnärztlicher Materialien kann mittels Zellkulturversuchen untersucht werden, allerdings niemals die Gewebeantwort, da diese wiederum von Faktoren wie Speichelfluss, Bakterienflora, pH-Wert, Biorythmus usw. abhängig ist (**KUNKEL 2001**). Dennoch hofft man, relevante Rückschlüsse von in-vitro-Versuchen mit Primärzellkulturen auf in-vivo-Bedingungen ziehen zu können (**KUNKEL 2001**).

Ziel dieser Studie war es, die Zytotoxizität von fünf Dentinadhäsiven und von einem Gemisch aus 9,5 %iger Flusssäure und 36%iger Phosphorsäure auf humane Pulpazellen zu testen. Es kam ein von **HEIDEMANN 1985** und **GEURTSSEN 1985** erprobtes Modell einer Primärzellkultur aus humanen Gingivafibroblasten in Verbindung mit dem Agardiffusionstest zur Anwendung.

Studien haben gezeigt, dass Dentin die Toxizität von Kunststoffen und Dentinadhäsiven dadurch reduziert, dass es die Diffusion dieser Substanzen vom Kavitätenboden zur Pulpa limitiert (**BOUILLAGET et al 1998**). Da als natürliche Barriere zwischen Gingivafibroblasten und appliziertem Material das Dentin dient, wurde in dieser Studie die natürliche Situation durch Applikation verschieden dicker Dentinscheiben aus humanen, kariesfreien Molaren auf die Zellen und durch Aufbringen der zu testenden Materialien auf eben diese Dentinscheiben imitiert. Physiologische und pathologische Zellveränderungen innerhalb des Fibroblastenrasens wurden erfasst, mikroskopisch und anschließend statistisch ausgewertet.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. ADHÄSIVSYSTEME

Die Adhäsion dentaler Kunststoffe an Dentin und Schmelz hat in den letzten vierzig Jahren, seit **BUONCORE** die Säureätztechnik zur Verbesserung der Adhäsion von kunststoffbasierenden Materialien an den Schmelz eingeführt hat, enorme Fortschritte gemacht. Mit den neuen Adhäsivsystemen ist es nun möglich, eine Haftung von Füllmaterialien am Dentin zu erzeugen, außerdem sind randdichte Restaurationen bei substanzschonender Präparation auch im Bereich des Dentins machbar (**BLUNCK 2004**).

Adhäsion ist per definitionem das Haften von zwei Körpern aneinander (**PSCHYREMBEL 257. Auflage**). Die Haftung kommt entweder durch chemische oder mechanische Kräfte zustande, wobei letztere bei der Füllungstherapie eine übergeordnete Rolle spielen.

Mikroporositäten und Rauigkeiten bieten den Füllungsmaterialien Retentionsstellen, über die eine Verankerung stattfinden kann. Man benötigt folglich ein Adhäsivsystem, das möglichst dünnfließend ist und die Oberfläche sehr gut benetzt, um sich mikromechanisch zu verankern (**BLUNCK 2004**). Ziel einer jeden Vorbehandlung der zu füllenden Kavität sollte es also sein, eine große, retentive und benetzbare Haftfläche zu erreichen, damit ein optimaler Halt möglich ist (**BLUNCK 2004**).

Dentin enthält 33 Vol-% organische Bestandteile, hauptsächlich Kollagen, und 22 Vol-% Wasser. Die mineralischen Bestandteile machen ca. 45 Vol-% der Dentinmasse aus (**HALLER 1992**). Von der Schmelz-Dentin-Grenze ausgehend, verlaufen Dentinliquor enthaltende Dentinkanälchen Richtung Pulpa, die Anzahl und der Durchmesser der Kanälchen nehmen zur Pulpa hin zu. Die Tubulusflüssigkeit steht unter einem konstanten, nach außen gerichteten, hydrostatischen Druck von 25-30 mm Hg (**SWIFT et al 1995**).



Jedes Dentinkanälchen ist direkt umgeben von einem Ring aus peritubulärem Dentin, das weniger mineralisierte Dentin zwischen den Kanälchen bezeichnet man als intertubuläres Dentin (**SWIFT et al 1995**). Die Proteinkomponente des Dentins ist verantwortlich für seine niedrige Oberflächenenergie, die es von der des geätzten Schmelzes unterscheidet (**ALI & WILLIAMS 1992**). Hieraus folgt, dass Dentin ein feuchtes Substrat ist, auf dem sich mit den von der Schmelzhaftung her bekannten Bonding Agentien keine Haftung erzielen lässt (**HALLER 1997**). Da Kunststoffe aufgrund ihrer langkettigen organischen Moleküle hydrophobe Substanzen sind, ist ein inniger Verbund zwischen Dentin und Kunststoff ohne weiteres nicht möglich (**SCHÄFER 1999**). Der Vorbehandlung des Dentins mit Primern kommt also bei der Herstellung eines dauerhaften Dentin-Komposit-Verbundes eine Schlüsselrolle zu (**HALLER 1997**).

#### 2.1.1. Die Rolle der Schmierschicht (Smear-Layer-Schicht)

Die Smear-Layer-Schicht entsteht auf der Zahnoberfläche nach Bearbeitung mit schnellrotierenden Instrumenten und besteht aus Debris, anorganischen Bestandteilen, Schleifpartikeln, denaturiertem Kollagen und Bakterien, Blut und Speichel (**BALEVI 1995**). Die Schmierschicht ist 0,5-5 µm dick und per Wasserspray nicht entfernbar. Die Größe der Smear-Layer-Partikel variiert zwischen 0,05-10 µm (**PASHLEY 1993**). Ein positiver Aspekt in klinischer Sicht ist die Verbolzung der angeschliffenen Dentintubuli durch diese Partikel und damit die Absenkung der Dentinpermeabilität (**SCHÄFER 1999**). Die Schmierschicht hat einen gravierenden Einfluss auf die primäre Dentinhaftung. Einerseits erschwert sie die Adaption von Füllungsmaterialien an die Kavitätenwand, andererseits verzögert sie sowohl den Austritt von Dentinliquor als auch den Eintritt von Bakterien in die Tubuli (**HALLER 1992, PASHLEY 1978**).

Durch Dentinkonditionierung mit EDTA-Lösungen (wie z. Bsp. bei *Denthesive Cleaner, Gluma Cleanser*) wird die Schmierschicht vollständig von den angeschnittenen Dentintubuli und dem intertubulären Dentin entfernt (**HALLER**

1992). Hierbei werden Kollagenfasern freigelegt und die Permeabilität des Dentins steigt an (**HALLER 1994**).

Bei manchen Adhäsivsystemen wird die Schmierschicht jedoch nicht ganz aufgelöst oder modifiziert. Die Penetration der Primermonomere findet statt, wenn sich die Schmierschicht in Lösung befindet. Ein Teil der gelösten Bestandteile wird beim Trocknen der Kavität zerstäubt, der andere Teil sickert zusammen mit dem Monomer in die Tubuli bzw. fällt nach dem Verdunsten des Lösungsmittels aus (**HALLER 1992**). Die modifizierte Schmierschicht verhindert nicht das Eindringen von Wasser, was langfristig gesehen die Haftfestigkeit der Komposite herabsetzt (**HALLER 1994**).

### 2.1.2. Die Konditionierungsarten und Konditionierungsmittel

Handelsübliche Konditionierungsmittel enthalten 5-16%iges EDTA (*Denthesive, Gluma*), 10-40%ige Phosphorsäure (*All Bond 2, Clearfil Photobond, Optibond*), 10%ige Maleinsäure (*Scotchbond Multi Purpose*), 2,5%ige Salpetersäure (*Mirage Bond, Tenure*), Oxalsäure (*Gluma*) oder 10%ige Zitronensäure (*Clearfil Liner Bond, Super Bond D Liner*) (**HALLER 1994**).

Normalerweise dringt die Säure in die Dentintubuli ein und penetriert das Dentin bis zu einer Tiefe von 100 µm, nachfolgend diffundiert sie in das peritubuläre Dentin und entfernt Hydroxylapatitteilchen in einem Bereich von bis zu 10 µm (**LEINFELDER 1999**). Die Demineralisierungstiefe variiert analog zu den benutzten Säuren, deren Konzentrationen und pH-Wert, der Applikationszeit und der Viskosität (**LOPES 2003**). Dieser Ätzvorgang bewirkt eine Dentinoberfläche mit freiliegenden Kollagenfasern. Je stärker die Säure bzw. je länger die Verweildauer auf dem Dentin, desto dicker ist die Kollagenschicht (**SUH 1993**). Wenn die applizierte Säure zu stark ist oder zu lange auf dem Dentin verweilt, besteht das Risiko der Denaturierung der Kollagen-Proteine in eine gelartige Struktur, anstatt die gewünschte fibrilläre Struktur beizubehalten (**BALEVI 1995**).

Wird sklerosiertes Dentin behandelt, ist es möglich, dass der Konditionierer die Tubuli nicht eröffnen kann. Um in diesem Fall eine Haftung zu erzielen, muss die Ätzzeit erhöht werden (**SÖDERHOLM 1997**).

Die Dentinätzung mit Phosphorsäure bei Kavitätenverschluss mittels Adhäsivsystem und Komposit führt zu Pulpairritationen, deren Schweregrad mit dem Ausmaß der bakteriellen Besiedelung korrelieren kann (**FUJITANI et al 1992**). Allerdings bietet sich hier die Möglichkeit der gleichzeitigen Vorbehandlung von Schmelz und Dentin. **SILVERSTONE** fand 1974 heraus, dass mit Phosphorsäurekonzentrationen zwischen 30% und 40% die Schmelzoberflächen mit den größten Retentionsflächen erreicht werden können (**SWIFT et al 1995**). Phosphorsäure demineralisiert das intertubuläre Dentin bis zu einer Tiefe von ca. 7 µm.

Bei Ätzung mit anderen Säuren wurde eine signifikant schlechtere Schmelz- und Dentinhaftung gemessen als bei der Ätzung mit Phosphorsäure (**HALLER 1994**). Bei gleicher Applikationsstelle und -dauer demineralisiert 10%ige Maleinsäure Dentin nur bis zu einer Tiefe von ca. 3 µm (**SWIFT et al 1995**). **NAKABAYASHI** benutzte 1982 ein Gemisch aus 10%iger Zitronensäure und 3%igem Eisenchlorit, erreichte aber ebenfalls nur eine Demineralisierungstiefe von ca. 2 µm.

Die Schmelz-Ätz-Technik geht auf **BUONCORE 1955** zurück und beinhaltet eine Anstrahlung der Kavität im Schmelzrandbereich. Damit soll erreicht werden, dass die Schmelzprismen senkrecht angeschnitten werden, da die Ätzwirkung so vorteilhafter ist gegenüber lateral getroffenen Prismen (**HELLWIG 1999**). Selektiv wird nachfolgend der Schmelz mit 37%iger Phosphorsäure angeätzt, wobei in der Regel eine Schmelzschicht von ca. 10 µm irreversibel verloren geht (**BUONCORE 1955**). Die Benetzbarkeit des Schmelzes wird so, durch Erhöhung der Oberflächenenergie, verbessert (**BLUNCK 2004**). Bei der Total-Etch-Technik werden Schmelz und Dentin gleichzeitig konditioniert, da sich eine exakte Unterscheidung zwischen Schmelz und Dentin und die getrennte

Applikation der Konditionierer äußerst schwierig gestalten kann (**BLUNCK 2004**).

### 2.1.3. Die verschiedenen Dentin-Adhäsivsysteme

Während der vergangenen vierzig Jahre fanden innerhalb der Entwicklung der Bondingsysteme immer wieder Verbesserungen und Veränderungen, was die Chemie, den Mechanismus, die Anzahl der Komponenten, die Anwendungsart und die Effektivität betrifft, statt (**DUNN 2004**). Die Einteilung in die verschiedenen Generationen, wurde basierend auf der An- oder Abwesenheit, bzw. der Art und Weise, wie die Smear-Layer-Schicht behandelt wird, vorgenommen (**SANTINI 1998**).

#### ف Adhäsive der 1. Generation:

Die im Jahre 1965 auf den Markt gebrachten Adhäsive der 1. Generation sind heute alle nicht mehr erhältlich, da sie größtenteils nicht hydrolysebeständig waren. Zumeist enthielten sie u.a. Glycerophosphorsäure, Cyanoacrylate und Polyurethanol. Vor allem die Glycerophosphorsäure entfernte die Schmierschicht vollständig, was den chemischen Verbund mit dem Kunststoff ermöglichen sollte (**SCHÄFER 1999**). Die niedrige Haftkraft von ca. 3 MPa war allerdings unadequat um die Retention des Kunststoffs zu gewährleisten (**SUH 1993**). Zwei der bekanntesten Produkte aus dieser Generation waren *Cervident* und *Cosmic Bond* (**CHARLTON 1996**).

#### ف Adhäsive der 2. Generation:

Die Produkte der 2. Generation wurden ca. 20 Jahre nach denen der ersten Generation entwickelt, sind jedoch bis auf die Produkte *Scotchbond* und *Bondlite* alle nicht mehr auf dem Markt (**SCHÄFER 1999**). Unter Erhaltung der Schmierschicht sollten die Adhäsive eine Verbindung zu anorganischen oder

organischen Bestandteilen des Dentins erzielen, was klinisch jedoch nur in unbefriedigendem Maße möglich war (**SCHÄFER 1999**). Der Hauptgrund für das Versagen dieser Bonding Agentien war, dass sie sich mehr mit der Smear-Layer-Schicht als mit dem Dentin selbst verbanden und durch die Kohäsivkraft der Schmierschicht limitiert waren (**SWIFT et al 1995**). Man erreichte lediglich eine Haftkraft von ca. 6 MPa (**SUH 1993**).

ف Adhäsive der 3. Generation:

Mit den Produkten dieser Generation kamen völlig neuartige Haftvermittler auf den Markt. Grundsätzlich bestehen diese Systeme aus 3 verschiedenen Komponenten - den Konditionierern, den Primern und den Adhäsiven (**SCHÄFER 1999**).

Die Konditionierer bestehen aus schwachen oder stärkeren Säuren oder aus Chelatoren, die die Schmierschicht vollständig entfernen oder das Dentin zumindest partiell demineralisieren oder die Schmierschicht in ihrer Struktur verändern können (**SCHÄFER 1999**). Die Dentintubuli werden eröffnet und das enthaltene kollagene Netzwerk freigelegt.

Wichtigstes Ziel der Primerbehandlung ist die Herabsetzung der Oberflächenspannung des Dentins und damit die Erhöhung der Benetzbarkeit für die nachfolgende Komponente – das Adhäsiv (**BLUNCK 2004**). Die Primer enthalten hydrophile Monomere oder Monomergemische, die in das freigelegte Kollagen, mit Hilfe von Lösungsmitteln wie Ethanol oder Aceton, eindringen können (**SCHÄFER 1999**). Die polar gebauten Monomere, deren hydrophiler Kopf in das Dentin eindringen kann und deren hydrophober Schwanz sich mit dem Bonding verbindet, tragen dazu bei, dass ein Kontakt mit dem Bonding möglich wird (**HALLER 1997**).

Die Adhäsive enthalten ungefüllte BIS-GMA-, TEGDMA- oder UDMA-Komposite. Die Monomere der Adhäsive kopolymerisieren mit denen der Primer, so dass sie dann als Verbindung zum aufpolymerisierten Komposit dienen können (**SCHÄFER 1999**). Nach der Polymerisation des Adhäsivs bilden sich im demineralisierten intertubulären Dentin Kunststoffzapfen aus, die sogenannten „tags“. Diese oberflächliche kunststoffimprägnierte Schicht des Dentins wurde 1985 zum ersten Mal von **NAKABAYASHI et al** beschrieben und als

„Hybridschicht“ bezeichnet und ist der eigentliche „Klebmechanismus“ der meisten Bondingsysteme (SWIFT et al 1995). Idealerweise sollte die Polymerisation des Bondingsystems die Permeabilität des Dentins so reduzieren, dass chemische Attacken limitiert werden (GREGOIRE et al 2003). Mithilfe dieser Drei-Komponenten-Systeme werden Haftkräfte von ca. 18-25 MPa erzielt (CHARLTON 1996).

Nach HALLER 1997 kann man innerhalb der 3. Generation drei Gruppen differenzieren:

- Dentinhaftung durch Erhalt der Schmierschicht ( z. Bsp. bei *Prisma Universal Bond 3, XR Bond* )
- Dentinhaftung durch vollständige Schmierschichtentfernung ( z. Bsp. bei *Gluma* oder *Denthesive I* )
- Dentinhaftung durch Wiederausfällung der gelösten Schmierschichtbestandteile bei Verwendung maleinsäurehaltiger Primer ( z. Bsp. *Syntac* , *Scotchbond 2, Art Bond* )

ف Adhäsive der 4. Generation:

Bei den Produkten der 4. Generation wurde versucht die Anzahl der Komponenten auf zwei zu reduzieren. Konditionierer und Primer wurden zusammengefasst zu selbstkonditionierenden Primern, die zur Entfernung oder zur Modifikation der Schmierschicht 0,8- bis 4-prozentige Maleinsäure enthalten (SCHÄFER 1999). Zu dieser Gruppe gehören Adhäsivsysteme wie *Optibond SL*, *All Bond 2*, *Scotchbond MP* oder *Clearfil Liner Bond 2*.

ف Adhäsive der 5. Generation:

Hierzu zählen so genannte „One-Bottle-Produkte“, die Mitte der 90er Jahre eingeführt wurden (DUNN 2004) und bei denen selbstkonditionierender Primer und Bonding zu einer Komponente zusammengefasst wurden. Das Gemisch muss in zwei Schichten aufgetragen werden ( „double-coating“ ) und das Dentin sollte nicht übermäßig getrocknet werden. Man nennt dies „wet-bonding“ (SCHÄFER 1999). Beispiele für diese Adhäsivgruppe sind Produkte wie *Prime & Bond*,

*Syntac Single Component, Solist, One Step* oder *Bond 1, Scotchbond 1, Syntac Sprint* oder *Optibond Solo*.

ف Adhäsive der 6. Generation:

Die 6. Generation, die Ende der 90er Jahre eingeführt wurde, ist selbstkonditionierend und aus mehreren Komponenten bestehend.

Die Adhäsive wurden so vereinfacht, dass sie nur noch einmal aufgetragen und polymerisiert werden mussten (SCHÄFER 1999). Allerdings müssen Primer und Adhäsiv vor der Applikation erst vermischt werden (DUNN 2004). Dieser Generation zugehörig sind Produkte wie *Adper Prompt-L-Pop, Xeno III* oder *One up Bond*.

ف Adhäsive der 7. Generation:

Die zuletzt, d.h. Ende 2002, eingeführten Bondingprodukte sind selbstkonditionierend und aus einer Komponente bestehend. Konditionierer, Primer und Adhäsiv sind hier zusammengefasst zu so genannten „All-in-One-Adhäsivsystemen“ (DUNN 2004), so dass ein separates Auftragen mehrerer Komponenten gänzlich entfällt. Systeme wie *i-Bond* oder *Clearfil S<sup>3</sup>-Bond* zählen zu dieser Gruppe.

## 2.2. ZELLKULTUREN

### 2.2.1. Zellkulturtypen

1971 unterscheidet HALLE zwischen Gewebe-, Organ- und Zellkulturen. Die älteste Kultivierungsart, die *Gewebekultur* bzw. *Explantatkultur*, geht auf HARRISON 1907 zurück. Zum Anlegen einer solchen Kultur werden aus Geweben mechanisch per Schere oder Skalpell ca. 1 mm<sup>3</sup> große Fragmente entnommen, die in Kulturgefäße explantiert werden, in denen dann Zellen aus dem Explantat auswachsen, die in der Regel epitheloid- oder fibroblastenartig und entdifferenziert sind. (MAUERSBERGER 1971).

Schon seit 1920 existieren Bestrebungen, Zellen anstelle von Explantaten zu kultivieren (**BLOOM 1960, ROBBINS und JENTZSCH 1967, STORB et al 1966**). Die reine *Zellkultur* unterscheidet sich von der Gewebekultur dadurch, dass bei Kultivierungsbeginn schon isolierte Zellen vorliegen (**MAUERSBERGER 1971**).

Mit Enzympräparationen kann man Gewebe verschiedenster Art in Einzelzellen zerlegen (**LINDL & BAUER 1987**). Nach **DULBECCO 1952** und **MOSCONA 1952** ist es möglich lebende Zellen mittels proteolytischer Enzyme wie Trypsin, Elastase oder Kollagenase oder aber mit EDTA (**RINALDINI 1958**) zu isolieren. Desweiteren existiert noch der Begriff *Organkultur*. Bei dieser Kultivierungsart wird das Auswachsen der Zellen aus den Gewebe- bzw. Organfragmenten bewusst verhindert, um die geordneten Gewebsstrukturen zu bewahren (**PAUL 1980**).

Definitionsgemäß versteht man unter dem Begriff „Primärkultur“ alle in-vitro-Züchtungen von Zellen, Geweben und Organen, die direkt aus dem Organismus entnommen wurden (**LINDL & BAUER 1987**). Wenn die Zellen sich wiederholt teilen ist es möglich, sie zu übertragen bzw. zu passagieren. Man bringt sie in Suspension und sät sie zusammen mit frischem Kulturmedium in ein anderes Gefäß aus (**PAUL 1980**). Auch hier greift man auf die Methode der Trypsinierung zurück. Vor Einwirkung der Trypsinlösung werden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, da Medienreste den Prozeß negativ beeinflussen können. Unter dem Phasenmikroskop kann man erkennen, dass sich die Zellen bei optimaler Einwirkungszeit von der Unterlage abheben und abkugeln (**LINDL & BAUER 1987**). Die noch lose anhaftenden Zellen werden abpipetiert und in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium eingesät.

Der Vorteil bei Primärkulturen ist laut **HEIDEMANN 1982** der hohe Differenzierungsgrad der Zellen und die damit verbundene Aussagekraft und Übertragbarkeit des Modells. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivität erlauben



sie außerdem eine Beurteilung zytopathologischer Effekte unterschiedlichen Ausmaßes und deren Reversibilität (**KUNKEL 2001**). Man bezeichnet die zum ersten Mal passagierten Zellen als *Primärzelllinie*. Nach mehr als siebenzig Passagen nennt man sie *etablierte Zelllinie* oder *Dauerzellkultur*, vorausgesetzt zwischen jeder Passage liegt ein Zeitraum von mindestens drei Tagen (**ZALKIND 1979**).

### 2.2.2. Aussagekraft von Zellkulturtests

Die Methode der Zellkulturzüchtung erlaubt Aussagen über die Anzahl der adhärennten Zellen, über den mitotischen Index und eine Einschätzung der pathologischen Änderungen innerhalb einer Zelllinie (**KUNKEL 2001**). Die Zellen werden nach Auflage eines Prüfkörpers unter dem Phasenmikroskop beobachtet und mit einer Zellkontrolle aus dem gleichen Versuchsansatz verglichen, so dass festgestellt werden kann, ob die Reaktionen pathologisch oder physiologisch sind (**ZALKIND 1971**).

Die Zellkulturtests sind laut **SCHMALZ 1994** ein aprobat Mittel um das biologische Verhalten zahnärztlicher Materialien zu verstehen, wenn die verschiedenen Einschränkungen der Tests in die Interpretation der Resultate mit einbezogen werden. Das Schneiden, Sterilisieren und Desinfizieren der Dentinscheiben verändert das Adsorptionsverhalten verglichen mit der in-vivo-Situation. Dazu kommt noch, dass die statische Situation im Testsystem nicht den Blutfluss in der Pulpa reflektiert. Ein anderer wichtiger Aspekt ist die Zeitspanne zwischen der Applikation des Materials und dem Zeitpunkt des Auftretens der toxischen Effekte. In vivo kann sich ein anfänglicher Pulpaschaden nämlich noch regenerieren, in vitro nicht (**SCHMALZ, SCHWEIKL, ESCH et al 1996**). Einer der Hauptnachteile der Zellkultursysteme ist die Unfähigkeit der Systeme die Dentinflüssigkeit zu imitieren, die in vivo vorhanden ist, so dass die komplexen Zellantworten, zu denen die Pulpa fähig ist, nicht reproduzierbar sind (**MERYON & BROOK 1989**).

Die Tests mit Zellkulturen können die Anzahl der teuren, zeitaufwendigen in-vivo-Experimente und der Tierversuche reduzieren (**SRIVASTAVA & GORHAM 1990**). Die Zellkulturmethoden für Zytotoxizitätstests für zahnärztliche Materialien haben wichtige technische Vorteile gegenüber Tierversuchen: Sie sind schnell und leicht durchzuführen und kostengünstig. Zusätzlich sind sie besser standardisierbar als in-vivo-Experimente (**SCHMALZ & SCHWEIKL 1994**).

Laut **KLÖTZER 1988** haben die Zellkulturtests nur bezüglich der Zytotoxizität, nicht aber bezüglich der Biokompatibilität eine Aussagekraft, da für die biologische Verträglichkeit auch kanzerogene, mutagene und sensibilisierende Eigenschaften ausgeschlossen werden müssen, deren Ausschluss aber in der Zellkultur unmöglich ist (**KUNKEL 2001**). Ein komplettes Ersetzen der in-vivo-Versuche durch in-vitro-Versuche ist laut **BROWNE 1987** niemals möglich, da man die in vivo- Bedingungen nicht ganz exakt nachahmen kann.

### **2.3. ZELLKULTURMEDIEN**

Für die aus dem Organismus entnommenen Zellen muss unter in-vitro-Bedingungen ein Milieu geschaffen werden, welches die Proliferation, das Wachstum, die Differenzierung und spezifische Zellfunktionen zulässt. Hierzu müssen alle Substanzen, die die Zellen nicht selbst synthetisieren können, von außen zugeführt werden (**LINDL & BAUER 1987**).

Man unterscheidet natürliche, semisynthetische, konditionierte und synthetische Nährmedien (**MAUERSBERGER 1971**). Da die Komponenten von natürlichem Serum (z. Bsp. Plasma, Salzlösung, Glukose, Embryoextrakt) bestimmten Schwankungen unterliegen und eine Standardisierung der Versuchsbedingungen so schlecht möglich ist, werden heutzutage hauptsächlich synthetische Nährmedien verwendet (**MAUERSBERGER 1971**). Erstmals konnte **WHITE 1946** ein vollständig synthetisches und auch wirkungsvolles Nährmedium herstellen. Ein solches Nährmedium enthält Zellulosederivate (Agar,

Methylzellulose, Dextrane), Salzlösung, Kohlenhydrate, Aminosäuren und makromolekulare Nichtproteine, Vitamine und anorganische Puffersubstanzen. Für ein optimales Wachstum ist jedoch bis heute ein Zusatz von Serum zu dem Medium notwendig (**LINDL & BAUER 1987**), außerdem je nach Formulierung Glutamin und Natriumhydrogenkarbonat.

Die Seren liefern den Zellen Wachstumshormone, Bindungsproteine, zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente und neutralisierende Stoffe wie Albumin und Immunglobuline.

Nachteilig ist, dass sie oft toxische Stoffe, bakterielle Toxine und Mikroorganismen wie Viren oder Mycoplasmen, Bakterien und Pilze, sowie Antikörper dagegen, enthalten (**LINDL & BAUER 1987**). Man verwendet fetales Kälberserum (FKS), reines Kälberserum (KS) oder Serum von neugeborenen Kälbern (NKS). In der Regel werden die Seren den Medien in einer Konzentration von ca. 5-25% zugesetzt.

Natriumhydrogenkarbonat wird den Medien als Puffersubstanz und als essentieller Nahrungsbestandteil zugesetzt (**LINDL & BAUER 1987**).  $\text{NaHCO}_3$  gleicht erhöhte  $\text{CO}_2$  Gehalte und erniedrigte pH-Werte aus bis zum Gleichgewicht von pH 7,4. Glutamin ist in den meisten Kulturen die wachstumsbegrenzende Aminosäure (**LINDL & BAUER 1987**).

Um Kontaminationen und den damit verbundenen Verlust der Kultur zu vermeiden, sollten den in der Zellzüchtung verwendeten Medien Antibiotika zugesetzt werden. Üblicherweise werden Dihydrostreptomycinsulfat und Penicillin-G-Natrium oder ersatzweise Gentamycin gegen grampositive und gramnegative Bakterien verwendet (**LINDL & BAUER 1987**). Zur Vermeidung von Pilzbefall wird in der Regel noch Amphotericin B zugegeben.

Kultivierte Zellen brauchen zu ihrem Wachstum und der Vitalerhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Nährstoffe von den Zellen metabolisiert werden oder im Laufe der Zeit zerfallen (**LINDL & BAUER 1987**).

## 2.4. SPEZIELLE KULTURGEFÄSSE

### 2.4.1. Gefäßtypen

Alle im Handel erhältlichen Kultiviergefäße müssen den zu kultivierenden Zellen als Stützgerüst zum Anheften und Ausbreiten dienen.

Bekannte Materialien hierzu sind Plasma, perforierte Zellophanfolien, Glas oder Produkte aus Polystyren und Zelloidin (**MAUERSBERGER 1971**), aus denen Kultivierflaschen, Pipettiergefäße, Petrischalen, Kultivierplatten und dergleichen hergestellt werden.

Die bis 1940 empfohlenen Methoden zur Kultivierung von Explantaten und Zellen auf Glas setzte sich auf die Dauer nicht durch, in heutiger Zeit werden somit hauptsächlich Polystyrenunterlagen verwendet. Diese nicht sehr preiswerten Gefäße aus Kunststoff werden von vielen Firmen schon gebrauchsfertig und steril verpackt angeliefert, so dass eine Vorbehandlung, wie z. Bsp. Waschen und Sterilisieren, entfällt (**MAUERSBERGER 1971**).

Petrischalen benötigen stets einen Brutschrank, der eine kontrollierte Luftfeuchtigkeit (100 %) besitzt, da die Ventilation bei Petrischalen sehr viel stärker ist als bei dicht zu verschließenden Kulturflaschen. Die Gefahr der Kontamination der Kultur ist bei ihnen viel größer, da die Oberfläche der Kultur bei offenem Deckel ganz der Außenluft ausgesetzt ist (**LINDL & BAUER 1987**). Sehr von Vorteil ist bei Petrischalen allerdings die Tatsache, dass die zu untersuchende Fläche sehr gut zugänglich ist, da es, nicht wie in der Flasche, keine Ecken und Nischen, gibt.

### 2.4.2. Gefäßvorbehandlung mit Zellkultursubstraten

Durch Vorbeschichtung der Kulturgefäße kann man erreichen, dass die Zellen besser überleben oder dass bestimmte Differenzierungsvorgänge überhaupt erst in-vitro möglich gemacht werden können (**LINDL & BAUER 1987**). Für die

Adhäsion der Zellen sind divalente Kationen oder bestimmte Proteine entscheidend (LINDL & BAUER 1987).

In zunehmendem Maße wird von der günstigen Wirkung von Kollagen auf Prozesse des Anheftens, Ausbreitens und Wachstums von Zellen auf Nährmedien berichtet (MAUERSBERGER 1971). HAUSCHKA und KÖNIGSBERG 1966 fanden heraus, dass Kollagen das Wachstum von Zellen auf synthetischer Unterlage fördert. Auch Fibronectin begünstigt die Anheftung von Fibroblasten an die Unterlage, bei Epithelzellen spielt hierzu das Laminin eine übergeordnete Rolle.

Übersichten über die Reaktionen und Wechselwirkungen zwischen Zelle und Unterlage sowie zwischen Zelle und Zelle finden sich bei CURTIS 1962 und HARRIS 1961 (MAUERSBERGER 1971).

## 2.5. PRÜFUNGEN ZUR TOXIZITÄTSBESTIMMUNG

Klinische Anwendungsprüfungen dienen der Ermittlung der Toxizität von Werkstoffen, wobei der zu untersuchende Werkstoff entsprechend dem vorgesehenen, zahnärztlichen Verwendungszweck angewendet wird (KLÖTZER & SCHMALZ 1986). Ein zahnärztlicher Werkstoff ist per definitionem eine Substanz oder Verbindung von Substanzen, die eigens für die Verwendung berechtigter Personen in der zahnärztlichen Praxis und/oder damit verbundenen Verfahren hergestellt und/oder vorgelegt wurde (DIN EN ISO 7405:1997). Laut SCHMALZ und GEURTSEN 1994 werden zahnärztliche Materialien als Medizinprodukte eingestuft, unterliegen somit den EU-Richtlinien (KUNKEL 2001) und sollten nur mittels Testreihen getestet werden, die auch in der europäischen Norm enthalten sind. Die Relevanz der Prüfung und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen reduziert sich oder wird umso unsicherer, je einfacher die Prüfsysteme sind.

Die schädigende Noxe ist nicht notwendigerweise immer eine chemische Noxe. Pulpaschäden können auch durch Bakterieneinschluß, Abbindungswärme des in die Kavität eingebrachten Materials, Wasserentzug oder -aufnahme o.ä. verursacht werden (**KLÖTZER & SCHMALZ 1986**).

Grundlage dieser Versuchsreihe ist die deutsche Norm für präklinische Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten – Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe (DIN EN ISO 7405:1997). Sie enthält geeignete, auf dem gegenwärtigen Stand des Wissens auf diesem Gebiet basierende Verfahren zur Prüfung der Verträglichkeit von Dentalwerkstoffen.

Folgende Prüfverfahren werden u.a. beschrieben:

- ف Agardiffusionsprüfung
- ف Filterdiffusionsprüfung
- ف Pulpa- und Dentinanwendungsprüfung
- ف Pulpaüberkappungsprüfung
- ف Endodontische Anwendungsprüfung

Diese Prüfverfahren werden nachfolgend erläutert.

### 2.5.1. Die Agardiffusionsprüfung

Diese Prüfung dient der Erfassung der lokalen, akuten und unspezifischen Zytotoxizität von Prüfsubstanzen (DIN V 13930:1990).

Verwendet werden Zellen der American Type Culture Collection oder alternativ L929 Mausfibroblasten, Epithelzellen, Tumorzellen, humane Fibroblasten o.ä. . Als Nährmedium dient Eagle`s Basal Medium mit Bikarbonat, HEPES und newborn calf serum. Zur Herstellung der Agarüberschichtung wird doppelt konzentriertes Nährmedium ohne HEPES zu gleichen Teilen mit 3%igem Agar in Aqua dest. gemischt. Der Vitalfarbstoff wird durch Mischung einer Stammlösung aus 1%iger, wässriger Neutralrotlösung im Verhältnis 1:100, mit Kochsalzlösung

verdünnt, hergestellt (DIN EN ISO 7405:1997). Die Neutralrotlösungen müssen vor Lichteinfall geschützt werden, da dieser nach Applikation des Neutralrots das Zellwachstum verringert, die Anfärbung erscheint dann blass und verfälscht das Ergebnis. Solche Petrischalen sind nicht auszuwerten (DIN V 13930:1990).

Die Zellen werden bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, auf eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und inkubiert. Der Agar wird auf 100 °C erhitzt und danach auf 48°C abgekühlt, anschließend wird Nährmedium zugegeben. Die Agar-Nährmedium-Lösung erstarrt bei Raumtemperatur und die Zellen werden mit Neutralrot eingefärbt. Von jedem Werkstoff wird eine Probe auf eine Petrischale gegeben, je eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt und für 24 Stunden inkubiert (DIN EN ISO 7405:1997).

Die Zellreaktion ist eine Funktion der Konzentration und der Toxizität löslicher Komponenten der Prüfsubstanz, welche durch den Agar diffundiert sind. Die Gradierung der Ergebnisse erfolgt nach dem Entfärbungsindex bzw. dem Lysis-Index, aus dem jeweils die Zellreaktion bestimmt wird (DIN V 13930:1990).

### 2.5.2. Die Filterdiffusionsprüfung

Ziel dieser Prüfung ist es die unspezifische Zytotoxizität des zu prüfenden Werkstoffs nach Diffusion durch einen Zelluloseacetatfilter nachzuweisen (DIN EN ISO 7405:1997).

Das Nährmedium und der Agar werden analog zu 2.5.1. hergestellt. Neben den in 2.5.1. schon angeführten möglichen Zellen können bei diesem Prüfverfahren auch Dauerzell-Linien vom Stamme Hela (Epithelzellen) verwendet werden (DIN V 13930). Für eine Succinatdehydrogenasefärbung sind Succinat-Lösung, Nitroblautetrazolium-Chlorid-Lösung und Phenazin-Methosulfat-Lösung vorzubereiten. Für eine Hydrolase-Färbung wird eine Stammlösung Fluorescindiacetat hergestellt. Die Zellzahl wird auf  $1,5 \times 10^5$  Zellen eingestellt.

Die Zelluloseacetatfilter, die einen Durchmesser von 47 mm und eine Porengröße von 0,45 µm haben, werden auf den Agar aufgebracht und die Prüfkörper darüber gelegt, danach wird für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Prüfkörper und Filter entfernt und die Enzymaktivität mittels Färbung beurteilt (DIN EN ISO 7405:1997).

### 2.5.3. Die Pulpa- und Dentinanwendungsprüfung

Die Gewebeverträglichkeit von zahnärztlichen Werkstoffen in Kontakt mit Dentin und Pulpa wird bei dieser Prüfungsart getestet (DIN EN ISO 7405:1997).

Affen, Hunde, Frettchen oder Miniaturschweine sind geeignete Gattungen für diese Versuche. Nach Betäubung der Tiere werden die Zähne von Zahnstein und Belägen gereinigt und desinfiziert. Kavitäten der Klasse V werden bis zu einer Restdentindicke von 1 mm ohne Pulpaeröffnung präpariert und die Prüfstoffe unter Beachtung der Verarbeitungsanleitung eingebracht. Die Tiere werden auf verändertes Fressverhalten und Schleimhautveränderungen beobachtet. Nach ca. sieben Tagen werden sie durch überdosierte Anästhesie getötet und die betreffenden Zähne mit umliegendem Weichgewebe extrahiert, fixiert, demineralisiert und in Längsrichtung zersägt. Die Schnitte werden mit Hematoxin und Eosin eingefärbt und die Gewebe, vor allem aber die Odontoblasten, histologisch auf Entzündungszeichen untersucht (DIN EN ISO 7405:1997).

### 2.5.4. Die Pulpaüberkappungsprüfung

Ziel dieser Prüfungsart ist es, die Gewebeverträglichkeit von Pulpaüberkappungswerkstoffen in Kontakt mit der Pulpa zu untersuchen (DIN EN ISO 7405:1997).

Die Auswahl der Tiere und die Vorbereitung der Zähne erfolgt in der wie schon in 2.5.3. beschriebenen Art und Weise, jedoch wird die Pulpa hierbei bewusst



iatrogen eröffnet. Die Prüfwerkstoffe werden drucklos auf die offene Pulpa aufgetragen, die Abdeckung erfolgt mit Zinkoxid-Eugenol-Zement und der Kavitätenverschluss mit einer Kompositfüllung. Auch die Weiterbehandlung nach sieben Tagen Versuchsdauer und die histologische Untersuchung erfolgen analog zu 2.5.3. (DIN EN ISO 7405:1997).

### 2.5.5. Die endodontische Anwendungsprüfung

Mit dieser Prüfungsart ist es möglich die Gewebeverträglichkeit von zahnärztlichen Werkstoffen in Kontakt mit Dentin und Pulpa zu untersuchen (DIN EN ISO 7405:1997).

Bevorzugt werden Incisiven oder Eckzähne mit abgeschlossenem Wurzelwachstum der o.g. Gattungen verwendet. Die Zähne werden analog zu 2.5.3. vorbereitet, Röntgenbilder des periapikalen Bereichs angefertigt, die Pulpa mittels Extirpationsnadel entfernt und der Kanal aufbereitet. Nachfolgend werden die Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff abgefüllt und die Trepanationsöffnung verschlossen. Nach ca. 28 Tagen werden die Zähne der getöteten Tiere extrahiert, fixiert, geröntgt und in Längscheiben geschnitten, die dann histologisch auf Gewebeveränderungen untersucht werden (DIN EN ISO 7405:1997).

## 2.6. VERSUCHSAUFBAUTEN FÜR ZYTOTOXIZITÄTSTESTS

Biokompatibilität ist laut **SCHMALZ 1994** definitionsgemäß die Fähigkeit eines Materials in einer bestimmten Applikationsart keine Abwehrreaktionen des Substrats hervorzurufen, es also nicht zu schädigen. Der Bedarf an biokompatiblen Materialien bedingt folglich einen Bedarf an Zytotoxizitätstests.

Das Hauptziel eines jeden Versuchs zur Zytotoxizität ist es, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die momentan existierenden internationalen Standards, die in vitro Versuche beinhalten, decken spezifisch zahnärztliche Materialien (ISO

TR 7405) und medizinische Produkte, die zahnärztliche Materialien enthalten (ISO 10993), ab. Durch die Reproduzierbarkeit ist es möglich, Daten, auch von verschiedenen Laboratorien, zu vergleichen (**SCHMALZ 1994**).

Dentin als Barriere zwischen Zellen und Testmaterial wurde als erstes von **TYAS 1977** und später von **MERYON 1984** benutzt. Da humanes Dentin nicht unbegrenzt verfügbar ist, wurden zumeist bovine Dentinscheiben für die Versuche benutzt (**SCHMALZ 1994**). Nach **SCHMALZ** und **SCHWEIKL 1994** kann man den Dentin-Barriere-Test mittels einer modifizierten Perfusionskammer durchführen. Verschieden dicke bovine Dentinscheiben werden zwischen zwei Glasplatten platziert, in denen jeweils zentral ein Bohrloch von ca. fünf Millimeter Durchmesser vorhanden ist.

Auf der Pulpenseite werden L929 Mausfibroblasten eingesät und inkubiert, auf der gegenüberliegenden Seite Wattepellets mit verschiedenen konzentrierten Phenollösungen appliziert. Nach der Inkubation wird die Zytotoxizität durch Auszählen der Zellen und Darstellen der Zellen mit Fluoresceinacetat festgestellt.

Einen anderen Pulpa-Kammer-Test, den NPC-Test, beschreiben **HANKS** und **WATAHA et al 1992**. Die benutzte Apparatur besteht aus einer Dentinscheibe, die mit Epoxid Zement am Boden eines Nylon-Zylinders befestigt wird. Der Apparat wird erst dehydriert, dann rehydriert mit Medium und auf einen Nylon-Washer gestellt, auf dem 3T3 Zellen gezüchtet werden. Die zu prüfenden Adhäsive werden in den Zylinder eingegeben, polymerisiert und die Zellantwort dokumentiert. **PASHLEY** stellte **1990** fest, dass in vitro Studien dieser Art die maximale Empfindlichkeit eines Lebend-Testsystems zeigen. Trotzdem ist jedoch die Wahrscheinlichkeit klinischer Schwierigkeiten sehr niedrig, wenn schon in vitro keine Zytotoxizität festgestellt wurde.

Auch **MERYON** und **BROOK** versuchten **1989** mit einem Testsystem der klinischen Situation, mit Dentin als Barriere zwischen Füllungsmaterial und Pulpa, nachzukommen. Hier wurden Dentinscheiben aus extrahierten humanen Weisheitszähnen verwendet, die von basal an einem Pyrex Zylinder befestigt und

dann auf eine Petrischale mit Monolayer-Zellrasen gestellt wurden. Die Smear-Layer-Schicht des Dentins wurde mittels Säure entfernt und nach Aufbringen der Adhäsive die Zellreaktion beobachtet. Nachteilig bei dieser Methodik ist, dass die in- vivo vorhandene Tubulusflüssigkeit, nicht in den Versuch mit einplanbar ist und so die sehr komplexe Zellantwort nicht vollständig reproduzierbar ist.

**DOHERTY** zeigte **1982** zum ersten Mal ein Direkt-Kontakt-Testsystem, bei dem getestet wird, indem das Material direkt auf einen Tropfen steriles Silikonadhäsiv aufgebracht wird. Auch **SRIVASTAVA** und **GORHAM 1990** beschreiben einen Adhäsiv-Film-Test, der anerkannt wurde, um potentielle zytotoxische Reaktionen auf Pulpazellen zu verhindern. Dieser in-vitro-Test benutzt einen sterilen Streifen aus einem auf Acrylat basierendem medizinischen Adhäsiv als Substrat.

Das Testmaterial wird auf dem Streifen fixiert und auf die in der Petrischale gewachsenen Zellen gelegt. Durch den engen Kontakt zwischen Material und Zellen können toxische Komponenten des Testmaterials, falls vorhanden, auf das Kulturmedium einwirken und dort die Zellpopulation stören.

Der Agar-Overlay-Test benutzt ebenfalls humane Dentinscheiben, die mit zu testendem Material benetzt werden und mit dem Material nach oben auf der Dentinscheibe auf Agar gelegt werden, der einen Zellrasen enthält. Nach der Inkubation werden die Zellen nach dem von **STANFORD 1980** beschriebenen Response-Index (RI) beurteilt, der zwei Zahlen von null bis fünf beinhaltet. Die erste Zahl kennzeichnet den Index, der von der Zone der Entfärbung abhängig ist. Die zweite Zahl ist ein Lysis-Index abhängig von dem Prozentsatz der Zell-Lyse. Ein Wert von 5/5 beispielsweise bedeutet totale Entfärbung und 80 % Zelltod (**DUMSHA & SYNDISKIS 1985**).

Zellaktivitätstests basieren auf der Turn-Over-Rate verschiedener Substanzen, z. Bsp. der Aktivität verschiedener Enzyme, die gemessen wird. Mittels eines Filter-Tests kann beispielsweise die Aktivität der Succinatdehydrogenase, die in den Mitochondrien lokalisiert ist, untersucht werden. Die älteste, am meisten

verwendete Methode ist das Benutzen der Proliferationsrate und das Auszählen der Zellen (**SCHMALZ 1994**).

## **2.7. ZYTOPATHOLOGISCHE ZELLVERÄNDERUNGEN**

Die morphologischen Unterschiede der Zellen werden einerseits bestimmt durch ihre Herkunft von verschiedenen Gewebeelementen des Organs und andererseits durch ihren physiologischen Zustand (**ZALKIND 1971**).

Fibroblasten sind Zellen von zumeist spindelförmiger oder unregelmäßiger Form. Sie sind, wie der Name schon sagt, faserbildend (**LINDL & BAUER 1987**).

Die Zellen sind schlank, langgestreckt, mit oval, rundlichem Kern und ihr Verhältnis von Kern zu Cytoplasma ist im Vergleich zu Epithelzellen relativ klein (**PAUL 1980**). Fibroblasten vermehren sich sehr rasch mit einer Verdopplungszeit von ca. 1,5 bis 3 Tagen und bilden retikulumartige Schichten und einschichtige Zellrasen aus (**HALLE 1971**). Bei zu hoher Zelldichte wird zunächst durch die sogenannte Kontakthemmung die Proliferation eingestellt, d. h. auch die DNS-, RNS- und die Proteinsynthese sind stark eingestellt bis vermindert (**KUNKEL 2001**). Wenn die Zellkultur nachfolgend nicht passagiert wird, stirbt die gesamte Kultur ab.

**HAYFLICK UND MOORHEAD 1967** fanden heraus, dass die Fibroblasten nach ca. neun Monaten in eine Phase der sogenannten Senilität kommen, in der sich die Wachstumsgeschwindigkeit verlangsamt bis letztendlich, nach einigen Wochen, der Zelltod eintritt.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen muss nicht immer gleich sein und hängt ab von den äußeren Bedingungen. So vermindert sie sich, sobald der pH-Wert vom optimalen Wert von 7,2 bis 7,4 abweicht. Für die meisten Zellen entspricht der optimale osmotische Druck und die optimale Temperatur denen der in- vivo herrschenden Gegebenheiten. Beidseits dieses Optimums fällt die

Wachstumsgeschwindigkeit sofort ab (**PAUL 1980**). Schon bei geringfügigen Änderungen der Rahmenbedingungen im Versuch wie z. Bsp. Temperaturschwankungen, Abweichungen der Serummenge oder der Zusammensetzung des Nährmediums, Veränderungen der Lichtverhältnisse oder Kontaminationen kann es zu pathologischen Zellveränderungen kommen (**KUNKEL 2001**), die gewöhnlicherweise in der immer parallel anzufertigenden Zellkontrolle nicht vorkommen sollten.

Ebenso kommt es bei Einwirkung toxischer Substanzen zu charakteristischen Zellveränderungen (**KUNKEL 2001, HEIDEMANN 1985**):

- ف Abrundung/Abkuglung der Zelle mit Verschiebung des Zellkerns an den Zellrand
- ف Pyknose (Schrumpfung des Zellkerns)
- ف Karyorhexis (Zellkernzerfall)
- ف Karyolyse (Zellkernauflösung)
- ف Potocytose (Zellkern bläht sich seifenblasenförmig auf, Plasmateile aus dem Zytoplasma schnüren sich ab; Potocytose stellt den Übergang zwischen reversibler und irreversibler Zellschädigung dar)
- ف Retraktion der Zellrasenränder
- ف Ausbildung von Retraktionsfäden an den Fibroblasten
- ف Adhäsionsverlust ( vollständige Ablösung der Zellen vom zu untersuchenden Substrat

Die Vakuolen und Granulationen, die von der Phagozytosefähigkeit der Fibroblasten abhängig sind, sind bei toxischen Schäden ebenfalls beeinträchtigt (**FISCHER 1930**).

Ebenso kann es laut **PUZA & NOVAK 1974** zu Störungen in der Zellteilung kommen, die in einer Kernverdopplung deutlich werden.

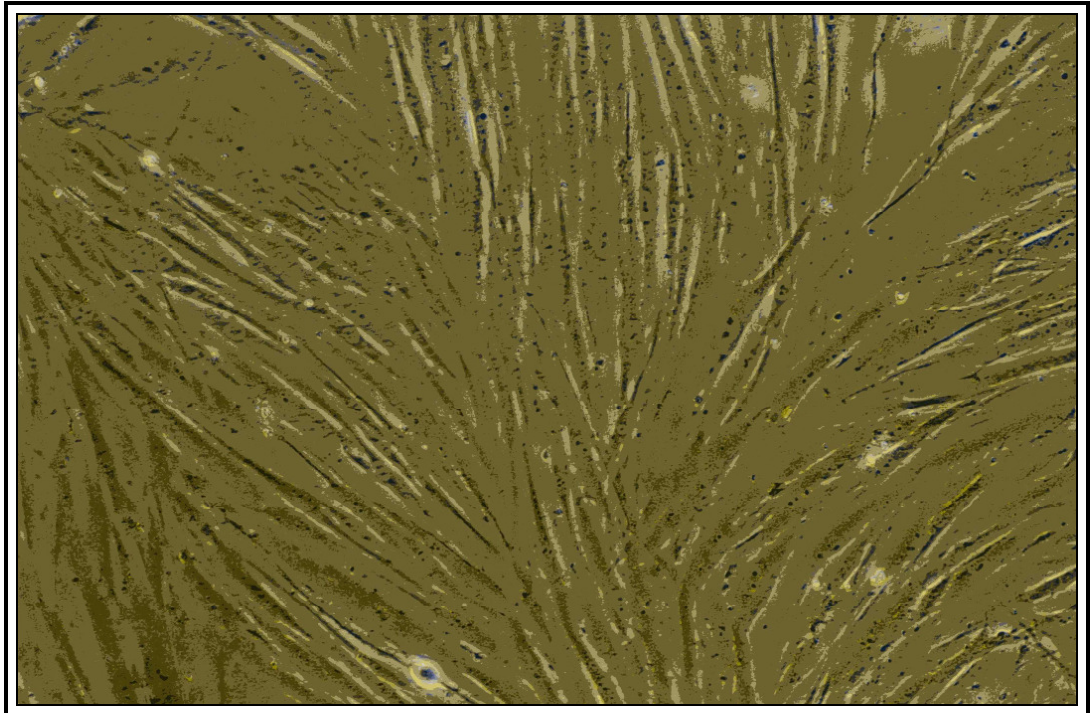


Abbildung 1: Ausbildung von Retraktionsfäden bei der Zellkontrolle 0

### **3. MATERIAL UND METHODE**

#### **3.1. MATERIALIEN**

##### **3.1.1. Die untersuchten Stoffe**

In der vorliegenden Studie wurden folgende Dentin-Adhäsive untersucht:

**1. Prime & Bond NT/DE TREY/D-Konstanz**

Dental-Adhäsiv auf Nano Technologie Basis

verwendete Charge: K-0170-KJ3-70-1 Code 5, P&B

**2. Optibond Solo Plus/KERR/D-Karlsruhe**

verwendete Charge: Nr. 909040 Code 5, Opt

**3. Scotchbond 1/3 M MEDICA/D-Borken**

Dental Adhesive System

verwendete Charge: Nr.4242, Code 5, SC 1

**4. Syntac Single Component/VIVADENT/D-Ellwangen**

lichthärtender, multifunktionseller Einkomponenten - Haftvermittler

verwendete Charge: Nr.908927, Code 5, SSC

**5. Syntac Sprint /VIVADENT/D-Ellwangen**

Ein – Schicht Adhäsiv

verwendete Charge: Nr. 911049, Code 5, SPR

<i>Haftvermittler</i>	<i>Zusammensetzung</i>
<i>Prime &amp; Bond NT</i>	Di- und Trimethacrylate, amorphes Siliziumdioxid, PENTA, Photoinitiatoren, Stabilisatoren, Aceton, Cetylaminhydrofluoride, Nanofüller
<i>Optibond Solo</i>	GPDM, BisGMA, HEMA, Ethanol, Cycloheptadione, Dimethylaminobenzoate, Methylphenol, Silikondioxide, Bariumaluminiumborosilikate, Na <sub>2</sub> SiF <sub>6</sub>
<i>Scotchbond 1</i>	BisGMA, Dimethylacrylate, UDMA, GDMA, Ethanol, modif. Polyacrylsäure, Wasser, HEMA
<i>Syntac Single Component</i>	MMPAA, HEMA, Maleinsäure, Fluoridverbindung, Initiatoren, Stabilisatoren, Wasser
<i>Syntac sprint</i>	MMPAA, HEMA, Maleinsäure, Fluoridverbindung, Katalysatoren, Stabilisatoren, Aqua dest., Aceton

Tabelle 1: Zusammensetzungen der Haftvermittler laut Produktinformation der Hersteller

BisGMA = Bisphenol-A-Diglycidyl-Ether-Dimethylacrylat

GDMA = Glyceroldimethacrylat

GPDM = Glycerolphosphatdimethacrylat

HEMA = 2 Hydroxyethyl-Methacrylat

HMMA = Hydroxymethyl-Methacrylat

MMPAA = Methacrylatmodifizierte Polyacrylsäuren

Na<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub> = Disodiumhexafluorosilikat

PENTA = Dipentaerytritol-pentamethacryloyloxyphosphat



UDMA = Urethanmethacrylat

Verarbeitungsanleitung für die Haftvermittler (laut Hersteller)

1. Prime & Bond NT
  1. *De Trey Conditioner* 15 sec. auftragen und einwirken lassen
  2. *De Trey Conditioner* 15 sec. absprayen. Dentin 2 sec. trocknen lassen
  3. P & B reichlich auftragen (5 sec.) und 30 sec. einwirken lassen
  4. Überschüsse 2 sec. verblasen und 20 sec. lighthärten lassen
  
2. Optibond Solo
  1. *Kerr Gel Etchant* 15 sec. auftragen und einwirken lassen
  2. *Kerr Gel Etchant* 15 sec. absprayen. Dentin 2 sec. trocknen lassen
  3. Optibond Solo 15 sec. dünn applizieren und 20 sec. lighthärten lassen
  4. Wiederholung von Schritt 3
  
3. Scotchbond 1
  1. *Etchant* 15 sec. auftragen und einwirken lassen, 10 sec. absprayen
  2. Wasserüberschüsse verblasen (2 sec.). Dentin wird feucht belassen
  3. SC 1 zweimal auftragen (10 sec.), leicht verblasen
  4. Lichtpolymerisation (10 sec)
  
4. Syntac Single Component
  1. *Email Preparator GS* 15 sec. auftragen und einwirken lassen
  2. *Email Preparator GS* 15 sec. absprayen. Dentin 2 sec. trocknen lassen

3. Syntac SC 5 sec. auftragen, 20 sec. einwirken lassen
4. Leicht verblasen (2 sec.), 20 sec. lighthärten
5. Zweite Schicht Syntac SC auftragen (5 sec.), sofort verblasen (2 sec.)
6. Lichtpolymerisation 20 sec.

#### 5. Syntac Sprint

1. *Email Preparator GS* 15 sec. auftragen und einwirken lassen
2. *Email Preparator GS* 15 sec. absprayen. Dentin 5 sec. trocknen.
3. Syntac Sprint 10 sec. einmassieren und 15 sec. einwirken lassen
4. Überschüsse verblasen, 20 sec. lighthärten

Desweiteren wurde noch ein Gemisch aus 9,5%iger Flusssäure (HF) und 36%iger Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) getestet.

## 3.2. ZELLZÜCHTUNG

### 3.2.1. Fibroblastenzüchtung aus Explantaten

Ein wichtiger Bestandteil des in dieser Studie verwendeten Versuchsaufbaus waren die Zellkulturen aus Fibroblasten, die in einem Zellkulturlabor angezüchtet wurden. Auf diese Zellen wurden die zu untersuchenden Proben aufgelegt und anschließend auf Zellveränderungen beobachtet.

In dieser Studie wurden humane Gingivafibroblasten auf ihr Verhalten nach Applikation von fünf verschiedenen Dentinadhäsiven bzw. einem Gemisch aus Flusssäure und Orthophosphorsäure untersucht. Als Explantatmaterial diente entzündungsfreies orales menschliches Gewebe, welches bei chirurgischen oder

parodontalchirurgischen Eingriffen (Weisheitszahnentfernung, Lappen-OP, Osteotomien, FST, Gingivektomien etc.) gewonnen wurde.

Zur Keimreduzierung wurden die Gewebeteile zunächst über Nacht in Hanks balanced salt solution (Gibco BRL Nr. 042-04060, Gibco-Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland) bei 4°C im Kühlschrank gelagert und anschließend mit 5 ml Bikarbonat und Antibiotikazusatz (Gibco-Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland) gewaschen, um Verunreinigungen oder weitere Keime zu entfernen. Als Substrat für die Gewebeproben dienten sterile oberflächenvorbehandelte Gewebekulturflaschen aus Polystyrol (Fa. Cellstar, 250 ml, D-Frickenhausen) und Polystyrolpetrischalen (Fa. Falcon, Becton & Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA 07417-1886), auf die 1 mm<sup>3</sup> große, vorher per Skalpell zugeschnittene, Gewebestücke aufgelegt wurden. Nach Antrocknen der Proben bei Raumtemperatur wurde in jedes Kulturgefäß 5 ml Nährmedium, bestehend aus BME, Tryptose Phosphat, L-Glutamin, MEM, Kälberserum, Natriumbikarbonat und destilliertem Wasser, zugegeben. Da Gewebeteile nie unter sterilen Bedingungen aus dem Mund entnommen werden können, wurde Streptothenat und Amphotericin B zugesetzt, um in einem möglichst keimarmen Milieu arbeiten zu können.

Die Kulturgefäße wurden in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C mit 4%igem CO<sub>2</sub> – Gehalt und sehr hoher Luftfeuchtigkeit von ca. 95% inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 5 Tagen, anschließend immer in einem Rhythmus von zwei bis drei Tagen. Nach ca. 18 bis 24 Tagen sprossen erste Fibroblasten aus, die nach ca. zwei bis drei Tagen eine Monolayer-Kultur bildeten.

### 3.2.2. Zusammensetzung des Nährmediums

Bei der Zellzüchtung kommt der Zusammensetzung des Nährmediums eine ganz entscheidende Rolle zu. Die Zellen benötigen auch unter in-vitro-Bedingungen ein Milieu, in welchem ein Wachstum, eine Proliferation, ein Aufrechterhalten des

Stoffwechsels, kurz ein Überleben, möglich ist. Im Nährmedium sollten ausreichend Stoffe enthalten sein, die dies ermöglichen und sie sollten individuell den Bedürfnissen der verschiedenen Zelltypen entsprechend, angepasst sein.

Die ersten Nährmedien wurden im Jahre **1907** von **ROSS GREENVILLE HARRISON** angewendet. Erst **1955** entwickelte **EAGLE** das erste chemische Medium, welches noch heute Anwendung findet und auch die Grundlage in dieser Studie war – das Basalmedium (BME).

Das in dieser Studie zur Züchtung der Gingivafibroblasten verwendete Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

100 ml	BME (Basal Medium Eagle, 10x) Nr.: 16010-084, Gibco BRL Life, Technologies Ltd., Paisley, Schottland
10 ml	L-Glutamin (100x) Nr.: 25030-024, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
10 ml	MEM (nicht essentielle Aminosäuren) Nr.: 11140-035, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
90 ml	Tryptosephosphat Nr.: 18050-047, Gibco BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
100 ml	NKS (Newborn calf serum) Nr.: 16020-084, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
27,5 - 40 ml	Natriumbikarbonat Nr.: 25080-060, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
1 ml	Penicillin Grünenthal, 1 Mega
1 ml	Streptothenat Fa. Fatol Arzneimittel
10 ml	Amphotericin B Nr.: 15290-018, Invitrogen GmbH Karlsruhe

in 670 ml	Aqua inieciabla, reinst, steril Braun AG, Melsungen
-----------	--

Tabelle 2: Zusammensetzung des Nährmediums

Im Nährmedium enthalten sind unter anderem alle die Stoffe, die von den Zellen selbst nicht synthetisiert werden können. So tragen zum Beispiel Salzlösung, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Vitamine und Puffer bzw. Neutralisationssysteme zu optimalen Wachstumsbedingungen bei. Wachstumshormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren und Spurenelemente bekommen die Zellen aus den zugesetzten Seren. In unserer Versuchsreihe wurde 10%iges Kälberserum von neugeborenen Kälbern verwendet, da es einen hohen Anteil an Antikörpern (gamma-Globulinen) enthält. Um die Kultur vor Bakterien und Pilzen zu schützen, wurden Antibiotika und Antimykotika beigemischt.

### 3.2.3. Subkultivierung

Fibroblasten wachsen am besten und schnellsten bei einem pH-wert von 7,2 bis 7,4. Ist ein dichter Zellrasen gewachsen, so sollte eine sogenannte Subkultivierung durchgeführt werden.

Bei zu hoher Zelldichte kommt es zu dem Phänomen der Kontakthemmung, was bedeutet, dass sich die Proliferation, die RNS- und DNS-Synthese bzw. auch die Proteinsynthese, einstellt, die Zelllinien würden folglich nicht mehr weiter wachsen. Durch Passagierung kann man die Maximaldichte der Zellen verdünnen. Hierzu verwendet man Trypsin EDTA, ein proteolytisch aktives Enzym, welches die Zellen dissoziiert und somit lebende Zellen isoliert.

In dieser Studie wurden die Zellkulturen jeweils mit 5 ml Trypsin EDTA Lösung (Trypsin EDTA, Nr. 25300-054, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Trypsinierungsprozess wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) kontrolliert, um die optimale Einwirkzeit feststellen zu können. Nachdem sich die Fibroblasten leicht

abgekugelt hatten, wurde das Trypsin abgegossen, der Zellrasen mit frischem Nährmedium versehen, dessen enthaltenes Kälberserum spontan die Wirkung des Trypsins unterbindet, und die abgekugelten Zellen mit einem Zellschaber vollständig vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension gut verblasen und die Zelldichte mittels Zählkammer ermittelt.

In diesem Fall wurde die Zelldichte auf  $2,4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Nach der ersten Subkultivierung wird die Primärkultur definitionsgemäß als Zelllinie bezeichnet. Die durch das Trypsin EDTA abgekugelten Fibroblasten hefteten sich innerhalb weniger Stunden wieder am Petrischalenboden an und konnten dann erneut proliferieren und zur weiteren Subkultivierung zur Verfügung stehen.

### 3.3. VERSUCHSAUFBAU

#### 3.3.1. Herstellung der Dentinscheiben



Abbildung 2: Eingelegte extrahierte Molaren vor der Einbettung in Kunststoff

Die verwendeten extrahierten humanen Molaren wurden zunächst, nach der Extraktion, in 0,1%ige Thymollösung eingelegt. Verwendet wurden nur einwandfreie, ungefüllte, unfrakturierte Molaren.

Da die Objektspannklammern des zum Sägen benutzten Leitz-Sägemikrotoms nur runde Gegenstände entsprechenden Durchmessers aufnehmen können, wurden die Molaren, nach Entfernung jeglicher Gewebereste, mittels einer vorher aus Silikon hergestellten Gussform in einen Zweikomponentenkunststoff (Technovit 1130 b / Fa. Kulzer & Co) eingebettet. So wurden Kunststoffzylinder mit einem Durchmesser von ca. zwei Zentimetern hergestellt, die dann problemlos in die Spannklammern des Sägemikrotoms eingespannt werden konnten. Pro Kunststoffzylinder wurde jeweils ein Molar eingebettet.

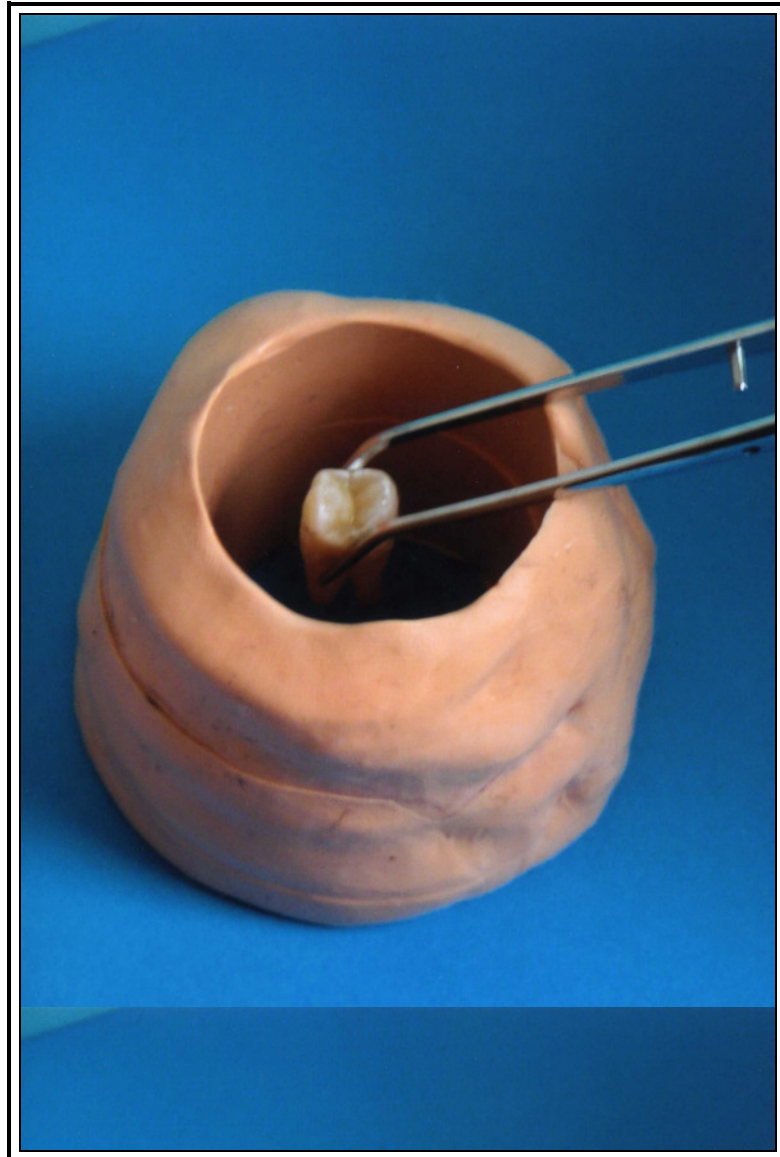


Abbildung 3: Zur Einbettung verwendete Gussform





Abbildung 4: Technovit 4004 / Fa. Kulzer

Beim Schneiden von unentkalktem Knochen mit herkömmlichen Mikrotomen können Probleme auftreten, die keine optimalen Ergebnisse zulassen: Bedingt durch das bei den Mikrotomen angewandte Prinzip des spanabhebenden Verfahrens mit Hilfe von Messern mit bestimmten Keilwinkeln, sind Deformierungen während des Schneidevorgangs nicht zu vermeiden. Daraus resultieren z. Bsp. Risse, die eine einwandfreie Beurteilung der Schnitte nicht mehr zulassen.

Andere Hartmaterialien wie z. Bsp. Steine, Mineralien, Keramik o. ä. sind mit herkömmlichen Mikrotomen nicht schneidbar, da sie beim Schneidevorgang vollständig zerbröseln.

Das Leitz-Sägemikrotom allerdings dient speziell zum Schneiden extrem harter und spröder Materialien. Das Sägeverfahren erlaubt die Herstellung vollständig verformungsfreier Schnitte von den Objekten.

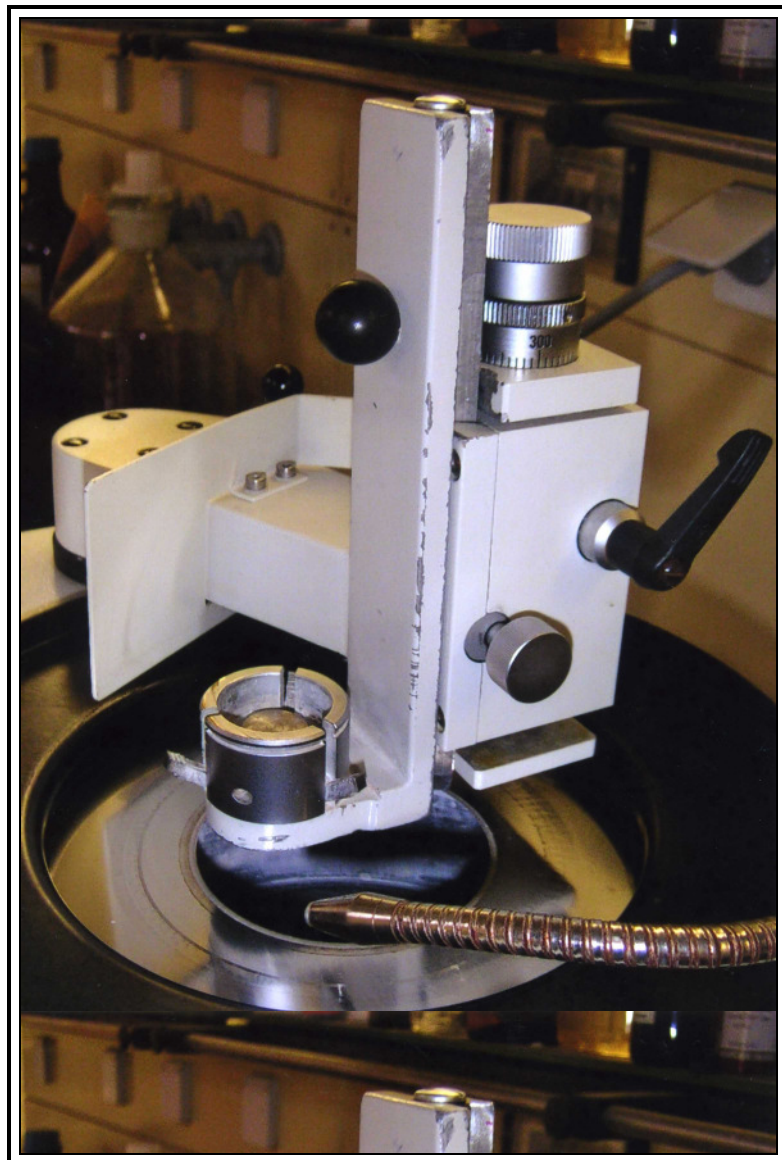


Abbildung 5: Leitz-Sägemikrotom

Kernstück des Mikrotoms ist eine diamantbeschichtete Innenlochsäge, die peripher gespannt ist und so, trotz der geringen Dicke von ca. 280  $\mu\text{m}$  über eine sehr gute Stabilität verfügt. Der im Innenraum der Lochsäge geführte Objekthalter ist mit Spannzangen verschiedener Durchmesser von oben beschickbar.

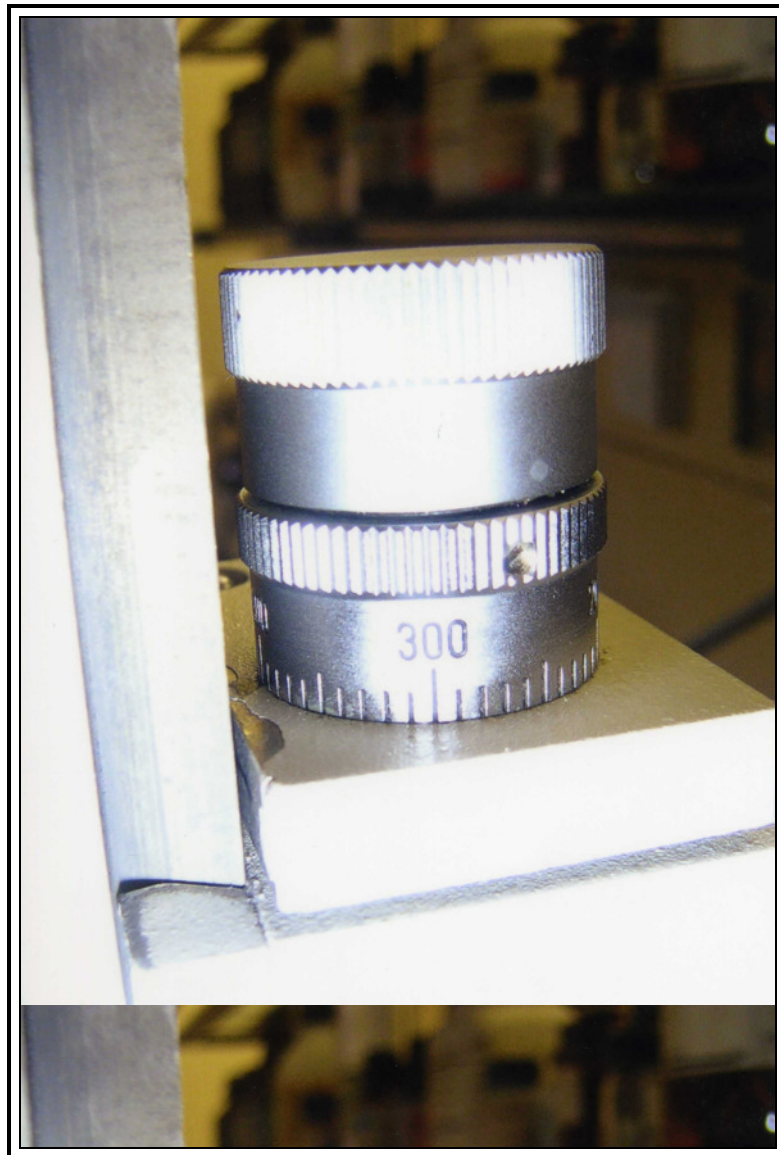


Abbildung 6: Rändelschraube zur Einstellung der Schichtdicke des zu schneidenden Objektes

Zum Schneidevorgang wird der Objektträger mit einer langsamen Geschwindigkeit gegen die mit ca. 600 U/min rotierende Säge geführt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, ist eine Wasserkühlung vorhanden.

Die Schnittdicke ist jeweils von Hand mittels einer Schraube einstellbar, deren Skalierung in 10 µm Schritte eingeteilt ist. Bei jeder Schnittdickeneinstellung muss die Dicke des Sägeblattes berücksichtigt und zur gewünschten Schnittdicke addiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass, bedingt durch die Toleranzen in der Sägeblattstärke, Toleranzen bis ca. +/- 50 µm auftreten können. Desweiteren kann auch die geringe vertikale Laufunruhe, die besonders bei länger benutzten Sägeblättern auftreten kann, zu Ungenauigkeiten führen.

Die erreichbaren Schnittdicken sind also von folgenden Faktoren abhängig:

- Art des Objektes. Je härter und homogener, um so dünner kann gesägt werden
- Qualitätszustand der Säge.
- Vorschubgeschwindigkeit. Bei langsameren Geschwindigkeiten sind dünnere Schnitte möglich.
- Objektgröße.

Unter günstigen Bedingungen sind Schnittdicken von bis zu 50 µm möglich. Für die meisten Objekte liegt die optimale Schnittdicke bei 80-100 µm. Diese Angaben gelten allerdings in erster Linie für kunststoffeingebettete, unentkalkte Knochen.

In dieser Studie wurden aus n=500 extrahierten humanen Molaren insgesamt n=250 Dentinscheiben a jeweils 50 Stück der Dicken: 500 µm, 400 µm, 300 µm, 200 µm, 100 µm hergestellt. Beim Sägen der Scheiben wurde darauf geachtet, dass immer eine gleichmäßige Umdrehungszahl, Wasserkühlung und Einbettung eingehalten wurde, um möglichst einheitliche, gleichmäßig dicke Schnitte zu erhalten. Nach Kontrolle der Unversehrtheit per Auge und Mikroskop wurde die Dicke der Scheiben nachgemessen, jegliche Technovit-Reste entfernt und die Dentinscheiben bis zur Verwendung in sterilem destilliertem Wasser, welches nach jeweils 3-4 Tagen gewechselt wurde, bei Zimmertemperatur gelagert.

### 3.3.2. Herstellung des Agars

Eine 3%ige Agarlösung aus 3 g Agar (Agar, reinst, gepulvert, Merck, Art.Nr.: 1.01615.0100) und 97 g Aqua dest. (Aqua inieciabla, reinst, steril, Braun AG, Melsungen) wird auf dem Magnetrührer für zehn Minuten erhitzt, dann auf 47°C abgekühlt und mit der auf 47°C erwärmten, doppelt konzentrierten Nährlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Agarlösung sollte erst nach einer Quellzeit von ca. 15 Minuten erhitzt werden, da dies nach dem Ausgießen einen besonders klaren Agar ergibt, der sich äußerst gut zum Mikroskopieren eignet. Wird der Agar zu schnell oder zu hoch erhitzt, kann es zu Ausflockungen innerhalb des Gemischs kommen, was den Agar für die Versuchsreihe unbrauchbar macht. Auch ein zu schnelles Abkühlen verändert die Konsistenz des Agars so, dass er unbrauchbar wird. Es sollten also folglich, um Fehlerquellen zu vermeiden, die angegebenen Zeiten und Temperaturen eingehalten werden.

### 3.3.3. Versuchsanordnung

Vor dem eigentlichen Versuchsansatz wurde eine entsprechende Anzahl von Dentinscheiben bei Zimmertemperatur zwei Stunden in steriler Ringer-Lösung mit Antibiotika eingelegt und kurz vor der weiteren Verwendung mit sterilem Filterpapier abgetrocknet. Die Antibiotika wurden der Ringer-Lösung zugesetzt, um eine bakterielle Kontamination der Dentinscheiben zu vermeiden. Eine Sterilisation im Gassterilisator wurde ganz bewusst vermieden, um die Dentinscheiben durch die Erhitzung nicht zu verändern. Verwendet wurden humane Fibroblasten aus der Gingiva (primäre Zelllinie V9/00 in der 17. Passage bzw. V10/00 in der 15. bis x. Passage).

Von den für 24 Stunden inkubierten Petrischalen mit Fibroblastenkulturen wird das Nährmedium abgegossen und je 5 ml der Agar-Nährmediumlösung in die Petrischalen pipettiert.

Bei größeren Mengen müssen die Pipetten angewärmt werden, da die Lösung sonst klumpig wird. Der Agar erstarrt bei Zimmertemperatur in etwa 15 Minuten.

In den Versuchen wurde die Agarschicht immer mit einer frisch hergestellten, im Brutschrank auf 37°C erwärmten 0,01%igen Neutralrotlösung beschichtet und für 30 Minuten inkubiert. Das Neutralrot Certistain der Firma Merck stellte sich als verträglich heraus.

Für den Agardiffusionstest wird das Nährmedium doppelt konzentriert angesetzt:

200 ml	BME (Basal Medium Eagle, 10x) Nr.: 16010-084, Gibco BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
20 ml	L-Glutamin (100x) Nr.: 25030-024, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
20 ml	MEM (nicht essentielle Aminosäuren) Nr.: 11140-035, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
180 ml	Tryptosephosphat Nr.: 18050-047, Gibco BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
200 ml	NKS (Newborn calf serum) Nr.: 16020-084, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
75 ml	Natriumbikarbonat Nr.: 25080-060, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2 ml	Penicillin Grünenthal, 1 Mega
2 ml	Streptothenat Fa. Fatol Arzneimittel
20 ml	Amphotericin B Nr.: 15290-018, Invitrogen GmbH Karlsruhe
in 335 ml	Aqua inieciabla, reinst, steril Braun AG, Melsungen

Tabelle 3: Zusammensetzung des Nährmediums für den Agardiffusionstest

Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, der sich sehr gut zur Darstellung bestimmter Membraneffekte eignet. Gesunde Zellen nehmen ihn in das Zytoplasma auf und geschädigte Zellen geben ihn ab, was sich in Form einer hellen Zone unter der oder um die Prüfsubstanz herum zeigt. Die Graduierung erfolgt nach dem Entfärbungsindex bzw. Lysis-Index, aus dem die Zellreaktionen bestimmt werden können. Nach einigen Vorversuchen wurde auf die Zugabe der aus Konzentrat verdünnten Neutralrotlösung verzichtet, da es trotz vorsichtiger Beigabe und abgestufter Konzentration schon während der Inkubationszeit zu Abkugelungen im Gingivafibroblastenrasen kam.

Versuchsweise wurde das Neutralrot nicht nur in PBS sondern auch in Ringerlösung aufgelöst, doch trotzdem kam es zu toxischen Reaktionen. Bei der frisch hergestellten Neutralrotlösung kam es zu weniger toxischen Reaktionen. Länger als 24 Stunden konnten die mit Neutralrot versehenen Petrischalen jedoch nicht beobachtet werden, da es spätestens nach 48 Stunden nach Versuchsanfang zu ersten Abkugelungen kam. Im Gegensatz hierzu wuchsen die nur mit Agarlösung beschichteten Fibroblastenrasen, außer an den Kontaktstellen mit den zu testenden Materialien, zum Teil mehrere Wochen sehr gut weiter. Desweiteren ist bei der Arbeit mit Neutralrot darauf zu achten, dass Lichteinfall verhindert wird, da dieser das Zellwachstum verringert, was die Platten blass erscheinen lässt und sie unauswertbar macht. Es wurde daher in dieser Versuchsreihe unter speziellem Licht (UV-C Licht, Wellenlänge 253,7 nm) gearbeitet.

Die mit den verschiedenen Adhäsiven ( Gemisch siehe Ansatz ) versehenen Dentinscheiben werden direkt auf den mit Agar beschichteten Fibroblastenrasen aufgelegt ( + und – Kontrollen werden mitgeführt ) und abermals für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Ohne es im Protokoll besonders zu erwähnen, wurden in den Hauptversuchen immer reine Zellkontrollen mitgeführt, die der gleichen Fibroblastenrasenaussaat wie im Versuch entsprachen und ebenfalls mit Agar und mit Neutralrot beschichtet wurden. Nur bei der Zellkontrolle 00 wurde kein Agar und Neutralrot zugegeben. Die Zellkontrolle 00 diente lediglich als interne Vitalitätskontrolle der Zellen.

Die Auswertung der Versuchspetrischalen erfolgte durch den Entfärbungs-Index:

Entfärbungsindex	Beschreibung
0	keinerlei Zone der Entfärbung erkennbar
1	Entfärbung nur unter der Prüfsubstanz
2	Zone nicht größer als 0,5 cm von der Prüfsubstanz
3	Zone nicht größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz
4	Zone größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz
5	die gesamte Kultur ist entfärbt

Tabelle 4: Beschreibung des zur Auswertung der Versuche benutzten Entfärbindexes

Der in den DIN-Vorschriften erwähnte Lysis-Index konnte bei den Versuchen nicht benutzt werden, da die Zellen nicht lysieren, sondern zum Teil wie fixiert aussehen bzw. abkugeln.



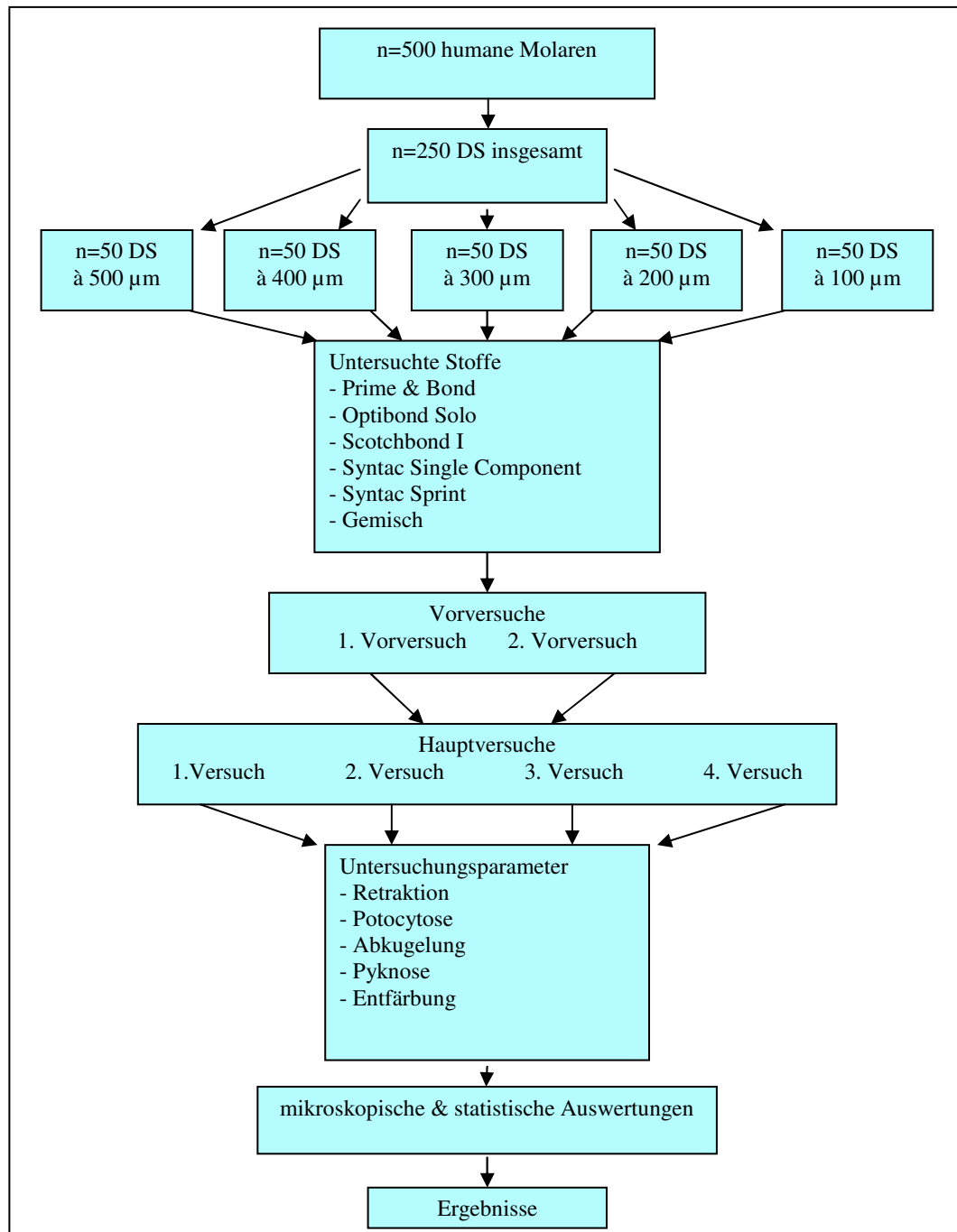


Abbildung 7:  
Übersicht des Versuchsaufbaus

DS =  
Dentinscheiben

### 3.3.4. Vorversuche

#### 3.3.4.1. 1. Vorversuch

Vierundzwanzig Stunden alte Fibroblastenrasen-Kulturen in Petrischalen (Zellen aus V 1/01 in der 7. Passage) werden nach Vorschrift mit 3 % Agar-Lösung bedeckt (Medium wurde vorher abgegossen). Nach dem Erstarren des Agar werden je 5 ml einer frisch hergestellten, 0,01%igen Neutralrotlösung in PBS dazupipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Neutralrot abgegossen und die zu testenden Materialien wie folgt dazu gegeben:

A	Cell Co (nur Agarlösung und Neutralrot)
B	Cell Co (dito)
1a	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)
1b	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)
2a	10 µl Prime & Bond NT
2b	10 µl Prime & Bond NT
3a	10 µl Optibond Solo
3b	10 µl Optibond Solo
4a	10 µl Scotchbond 1
4b	10 µl Scotchbond 1
5a	10 µl Syntac Single Component
5b	10 µl Syntac Single Component
6a	10 µl Syntac Sprint
6b	10 µl Syntac Sprint
7a	10 µl Conditioner 36 werden direkt auf die Agarschicht pipettiert
7b	10 µl Conditioner 36 (dito)

Tabelle 5: Verwendete Stoffe im ersten Vorversuch

Die zu testenden Haftvermittler werden nach Vorschrift auf einem sterilen Deckglas angesetzt und nach dem Polymerisieren mit dem Material nach unten

*direkt* auf den Agar gelegt. Ein vorheriges Anätzen des Deckgläschens erfolgt nicht.

### 3.3.4.2. 2. Vorversuch

24 Stunden alte Fibroblastenrasen-Kulturen in Petrischalen (Zellen aus V 1/01 in der 7. Passage) werden nach Vorschrift mit 3%ige Agar-Lösung bedeckt (Medium wurde vorher abgegossen). Nach dem Erstarren des Agar werden je 5 ml einer frisch hergestellten, 0,01%igen Neutralrotlösung in PBS dazupipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Neutralrot abgegossen und die zu testenden Materialien wie folgt dazu gegeben:

Die zu testenden Haftvermittler werden nach Vorschrift auf einem sterilen Deckglas angesetzt und nach dem Polymerisieren mit dem Material nach unten *direkt* auf den Agar gelegt. Ein vorheriges Anätzen des Deckgläschens erfolgt nicht.

A	Cell Co (nur Agarlösung und Neutralrot)
B	Cell Co (dito)
1a	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)
1b	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)
2a	10 µl Prime & Bond NT
2b	10 µl Prime & Bond NT
3a	10 µl Optibond Solo
3b	10 µl Optibond Solo
4a	10 µl Scotchbond 1
4b	10 µl Scotchbond 1
5a	10 µl Syntac Single Component
5b	10 µl Syntac Single Component
6a	10 µl Syntac Sprint
6b	10 µl Syntac Sprint
7a	10 µl Conditioner 36 werden direkt auf die Agarschicht pipettiert
7b	10 µl Conditioner 36 (dito)

Tabelle 6: Verwendete Stoffe im zweiten Vorversuch

### 3.3.5. Hauptversuche

#### 3.3.5.1. 1. Versuch

Vierundzwanzig Stunden alte Fibroblastenrasen-Kulturen in Petrischalen (Zellen aus V 13/02 in der 10. Passage, Aussaat  $2,8 \times 10^6$  /ml) werden nach Vorschrift mit 3%iger Agar-Lösung bedeckt (Medium wurde vorher abgegossen). Nach dem Erstarren des Agar werden je 5 ml einer frisch hergestellten 0,01%igen Neutralrotlösung in PBS dazupipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Neutralrot abgegossen.

Die Dentinscheiben werden mit je 5 µl Gemisch (aus HF 9,5% und H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 36%) für 15 Sekunden angeätzt, mit 5 ml steriler Ringer-Lösung ab gespült und 2 Sekunden getrocknet. Danach werden je 5 µl des entsprechenden Haftvermittlers auf die Dentinoberfläche einschichtig aufgetragen und nach Vorschrift weiterverarbeitet (Auftragen, Einwirken, Verblasen, Aushärten, siehe Verarbeitungsanleitung). Die behandelten Dentinscheiben werden mit der Materialseite nach oben direkt auf den Agar gelegt. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach unter dem Phasenmikroskop ausgewertet.

0	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
00	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
I	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)

II	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)
A	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 500 µm)
B	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 400 µm)
C	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 300 µm)
D	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 200 µm)
E	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 100 µm)
2a	5 µl Prime & Bond NT: DS 500 µm
2b	5 µl Prime & Bond NT: DS 400 µm
2c	5 µl Prime & Bond NT: DS 300 µm
2d	5 µl Prime & Bond NT: DS 200 µm
2e	5 µl Prime & Bond NT: DS 100 µm
3a	5 µl Optibond Solo: DS 500 µm
3b	5 µl Optibond Solo: DS 400 µm
3c	5 µl Optibond Solo: DS 300 µm
3d	5 µl Optibond Solo: DS 200 µm
3e	5 µl Optibond Solo: DS 100 µm
4a	5 µl Scotchbond 1: DS 500 µm
4b	5 µl Scotchbond 1: DS 400 µm
4c	5 µl Scotchbond 1: DS 300 µm
4d	5 µl Scotchbond 1: DS 200 µm
4e	5 µl Scotchbond 1: DS 100 µm
5a	5 µl Syntac Single Component: DS 500 µm
5b	5 µl Syntac Single Component: DS 400 µm
5c	5 µl Syntac Single Component: DS 300 µm
5d	5 µl Syntac Single Component: DS 200 µm
5e	5 µl Syntac Single Component: DS 100 µm
6a	5 µl Syntac Sprint: DS 500 µm
6b	5 µl Syntac Sprint: DS 400 µm
6c	5 µl Syntac Sprint: DS 300 µm
6d	5 µl Syntac Sprint: DS 200 µm
6e	5 µl Syntac Sprint: DS 100 µm
7a	5 µl Gemisch: DS 500 µm
7b	5 µl Gemisch: DS 400 µm
7c	5 µl Gemisch: DS 300 µm
7d	5 µl Gemisch: DS 200 µm
7e	5 µl Gemisch: DS 100 µm

Tabelle 7: Verwendete Stoffe im ersten Versuch (DS = Dentinscheibe)

## 3.3.5.2. 2. Versuch

Ansatz wie im 1. Versuch. Zellen aus V 13/02 in der 11. Passage.

0	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
00	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
I	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)
II	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)
A	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 500 $\mu\text{m}$ )
B	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 400 $\mu\text{m}$ )
C	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 300 $\mu\text{m}$ )
D	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 200 $\mu\text{m}$ )
E	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 100 $\mu\text{m}$ )
2a	5 $\mu\text{l}$ Prime & Bond NT: DS 500 $\mu\text{m}$
2b	5 $\mu\text{l}$ Prime & Bond NT: DS 400 $\mu\text{m}$
2c	5 $\mu\text{l}$ Prime & Bond NT: DS 300 $\mu\text{m}$
2d	5 $\mu\text{l}$ Prime & Bond NT: DS 200 $\mu\text{m}$
2e	5 $\mu\text{l}$ Prime & Bond NT: DS 100 $\mu\text{m}$
3a	5 $\mu\text{l}$ Optibond Solo: DS 500 $\mu\text{m}$
3b	5 $\mu\text{l}$ Optibond Solo: DS 400 $\mu\text{m}$
3c	5 $\mu\text{l}$ Optibond Solo: DS 300 $\mu\text{m}$
3d	5 $\mu\text{l}$ Optibond Solo: DS 200 $\mu\text{m}$
3e	5 $\mu\text{l}$ Optibond Solo: DS 100 $\mu\text{m}$
4a	5 $\mu\text{l}$ Scotchbond 1: DS 500 $\mu\text{m}$
4b	5 $\mu\text{l}$ Scotchbond 1: DS 400 $\mu\text{m}$
4c	5 $\mu\text{l}$ Scotchbond 1: DS 300 $\mu\text{m}$
4d	5 $\mu\text{l}$ Scotchbond 1: DS 200 $\mu\text{m}$
4e	5 $\mu\text{l}$ Scotchbond 1: DS 100 $\mu\text{m}$
5a	5 $\mu\text{l}$ Syntac Single Component: DS 500 $\mu\text{m}$

5b	5 µl Syntac Single Component: DS 400 µm
5c	5 µl Syntac Single Component: DS 300 µm
5d	5 µl Syntac Single Component: DS 200 µm
5e	5 µl Syntac Single Component: DS 100 µm
6a	5 µl Syntac Sprint: DS 500 µm
6b	5 µl Syntac Sprint: DS 400 µm
6c	5 µl Syntac Sprint: DS 300 µm
6d	5 µl Syntac Sprint: DS 200 µm
6e	5 µl Syntac Sprint: DS 100 µm
7a	5 µl Gemisch: DS 500 µm
7b	5 µl Gemisch: DS 400 µm
7c	5 µl Gemisch: DS 300 µm
7d	5 µl Gemisch: DS 200 µm
7e	5 µl Gemisch: DS 100 µm

Tabelle 8: Verwendete Stoffe im zweiten Versuch (DS = Dentinscheibe)

### 3.3.5.3. 3. Versuch

Ansatz wie im 1. Versuch. Zellen aus V 13/02 in der 11. Passage.

0	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
00	Cell Co (nur normales Medium ohne Agar und Neutralrotlösung)
I	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)
II	Cell Co (Agar und Neutralrotlösung)
A	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 500 µm)
B	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 400 µm)
C	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 300 µm)
D	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 200 µm)
E	Cell Co (Agar + Neutralrotlösung + DS 100 µm)
2a	5 µl Prime & Bond NT: DS 500 µm
2b	5 µl Prime & Bond NT: DS 400 µm
2c	5 µl Prime & Bond NT: DS 300 µm
2d	5 µl Prime & Bond NT: DS 200 µm

2e	5 µl Prime & Bond NT: DS 100 µm
3a	5 µl Optibond Solo: DS 500 µm
3b	5 µl Optibond Solo: DS 400 µm
3c	5 µl Optibond Solo: DS 300 µm
3d	5 µl Optibond Solo: DS 200 µm
3e	5 µl Optibond Solo: DS 100 µm
4a	5 µl Scotchbond 1: DS 500 µm
4b	5 µl Scotchbond 1: DS 400 µm
4c	5 µl Scotchbond 1: DS 300 µm
4d	5 µl Scotchbond 1: DS 200 µm
4e	5 µl Scotchbond 1: DS 100 µm
5a	5 µl Syntac Single Component: DS 500 µm
5b	5 µl Syntac Single Component: DS 400 µm
5c	5 µl Syntac Single Component: DS 300 µm
5d	5 µl Syntac Single Component: DS 200 µm
5e	5 µl Syntac Single Component: DS 100 µm
6a	5 µl Syntac Sprint: DS 500 µm
6b	5 µl Syntac Sprint: DS 400 µm
6c	5 µl Syntac Sprint: DS 300 µm
6d	5 µl Syntac Sprint: DS 200 µm
6e	5 µl Syntac Sprint: DS 100 µm
7a	5 µl Gemisch: DS 500 µm
7b	5 µl Gemisch: DS 400 µm
7c	5 µl Gemisch: DS 300 µm
7d	5 µl Gemisch: DS 200 µm
7e	5 µl Gemisch: DS 100 µm

Tabelle 9: Verwendete Stoffe im dritten Versuch (DS = Dentinscheibe)

#### 3.3.5.4. 4. Versuch

Direkter Vergleich zwischen Conditioner 36 (Gruppe A) und Gemisch (Gruppe B)  
 Die Dentinscheiben werden jeweils 15 Sekunden angeätzt und 15 Sekunden abgespült, danach werden die entsprechenden Haftvermittler (5 µl) nach Vorschrift aufgetragen.



2A) Prime & Bond	a) 300 µm	2B) Prime & Bond	a) 300 µm
	b) 200 µm		b) 200 µm
	c) 100 µm		c) 100 µm
3A) Optibond Solo	a) 300 µm	3B) Optibond Solo	a) 300 µm
	b) 200 µm		b) 200 µm
	c) 100 µm		c) 100 µm
4A) Scotchbond 1	a) 300 µm	4B) Scotchbond 1	a) 300 µm
	b) 200 µm		b) 200 µm
	c) 100 µm		c) 100 µm
5A) Syntac Single Component	a) 300 µm	5B) Syntac Single Component	a) 300 µm
	b) 200 µm		b) 200 µm
	c) 100 µm		c) 100 µm
6A) Syntac Sprint	a) 300 µm	6B) Syntac Sprint	a) 300 µm
	b) 200 µm		b) 200 µm
	c) 100 µm		c) 100 µm

Tabelle 10: Verwendete Stoffe im vierten Versuch (Cell Co 0 + 00 nur mit Medium, Cell Co I + II mit Agar und Neutralrotlösung)

### 3.4. MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

Zur Ermittlung, Beschreibung und Auswertung von physiologischen und pathologischen Zellreaktionen bzw. -veränderungen an den gezüchteten Gingivafibroblasten und deren Wachstum, wurden 48 Stunden nach Versuchsansatz die Versuchsansätze mit einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) bei 1,25-fachem Tubusfaktor, 10- bis 25-facher

Objektivvergrößerung und 10-facher Okkularvergrößerung begutachtet und dies nachfolgend dokumentiert.

Die Interpretation der Toxizität ist relativ einfach und gut reproduzierbar. Die Reaktion der Zelle ist eine Funktion der Konzentration und Zytotoxizität der in der geprüften Substanz befindlichen gelösten, diffusiblen Bestandteile.

Eine positive Antwort ist ein guter Hinweis auf das Vorhandensein toxischer, diffusibler Stoffe in der Prüfsubstanz.

Die Auswertung der Zellreaktionen erfolgt nach dem Entfärbungsindex. Die Entfärbungszonen werden mit einer in das Okkular eingesetzten, auf Millimeter geeichten, Skalierung untersucht. Es wird gemessen, inwieweit die Zellen unterhalb der Prüfsubstanz bzw. um diese herum entfärbt sind, und die Reaktion wird dem jeweiligen Indexwert zugeordnet.

Entfärbungsindex	Beschreibung
0	keinerlei Zone der Entfärbung erkennbar
1	Entfärbung nur unter der Prüfsubstanz
2	Zone nicht größer als 0,5 cm von der Prüfsubstanz
3	Zone nicht größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz
4	Zone größer als 1,0 cm von der Prüfsubstanz
5	die gesamte Kultur ist entfärbt

Tabelle 11: Beschreibung des zur Auswertung der Versuche benutzten Entfärbungsindex

Der in den DIN-Vorschriften erwähnte Lysis-Index konnte in dieser Studie nicht verwendet werden, da die Zellen nicht alle lysieren, sondern teilweise wie fixiert aussehen bzw. abkugeln und in bestimmten Übergangsstadien verharren.

Über einen am Phasenkontrastmikroskop angebrachten Fototubus (Fluovert, Fa. Leica, Bensheim, Deutschland) konnten zur Dokumentation verschiedene Stadien der Zellreaktionen auf die unterschiedlichen untersuchten Stoffe in verschiedenen Vergrößerungen fotografisch festgehalten und dann ausgewertet werden. Auf diese Art und Weise ließen sich farbige Bilder der in 2.7. beschriebenen Zellreaktionen herstellen.

### 3.5. STATISTIK UND DARSTELLUNG DER ERMITTELTEN DATEN

Die Versuchsergebnisse der Zytotoxizitätstestung der Dentinadhäsive mittels Agardiffusionstest werden in dieser Studie durch Säulendiagramme graphisch dargestellt.

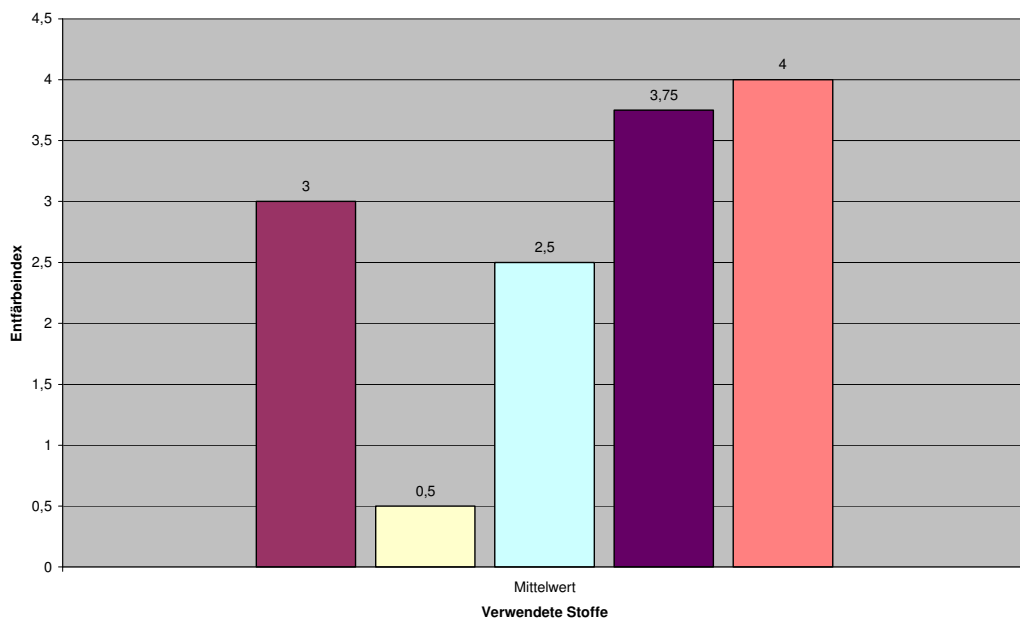


Abbildung 8: Aufbau eines Mittelwertsäulendiagramms

Der Mittelwert ist per definitionem ein nach einer bestimmten Vorschrift rechnerisch aus einer Reihe von Messwerten ermittelte Kenngröße für die Messreihe. Hier wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Er ist der Quotient aus der Summe der Messwerte und ihrer Anzahl. Neben dem Mittelwert wurde zusätzlich die Standardabweichung, der Median-, Maximal- und Minimalwert ermittelt. Die x-Achse des Diagramms bezeichnet die verwendeten, auf ihre

Zytotoxizität getesteten, Stoffe. Die y-Achse trägt den Entfärbungsindex, über den die Zytotoxizität gemessen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test, einem Anova-Testverfahren mit einem Signifikanzwert von  $p < 0,05$ . Die Korrektur nach Bonferroni erfasste die paarweise verglichenen Gruppen bezüglich ihrer Signifikanz mit dem entsprechenden Z-Wert.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. VORVERSUCHE**

Ziel der Vorversuche war es auszutesten, ob und wie die verschiedenen Adhäsivsysteme ohne eine natürliche Barriere aus Dentin auf die Zellkultur wirken, d.h. ob eine Toxizität gegenüber den Zellen besteht oder ob eines der Materialien sowieso keine Zellschädigung hervorruft. Dies war zum Ausschluss falscher Ergebnisse aus den Hauptversuchen nötig, da bei einer nicht toxischen Reaktion in den Hauptversuchen unterschieden werden musste, ob keine toxische Reaktion vorlag, weil das Material tatsächlich nicht schädlich für die Zellen war, oder weil es nicht durch die Dentinscheibe diffundieren konnte. Zusätzlich wurde ausgetestet, ob der Versuchsaufbau in seiner Anordnung brauchbar und die Versuche letztendlich so, wie geplant, durchführbar waren.

Hierzu wurden in beiden Vorversuchen die zu testenden Haftvermittler nach Vorschrift auf einem sterilen Deckglas angesetzt und nach dem Polymerisieren mit dem Material nach unten direkt auf den Agar gelegt. Ein vorheriges Anätzen des Deckgläschens erfolgte nicht. Die Petrischalen wurden in den Brutschrank gegeben und der Ansatz für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen nach den in 2.7. beschriebenen Untersuchungsparametern unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht.

Bei allen getesteten Materialien ergab sich eine starke Toxizität. Für jede der Proben konnte ein Entfärbungsindex von 4 bis 5 festgestellt werden. Dies entspricht einer Entfärbung von größer als 1 cm um die Prüfsubstanz herum bzw. einer kompletten Entfärbung, was bedeutet, daß bei allen geprüften Substanzen die Zellen entweder komplett oder nahezu komplett abgestorben waren.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei jedem der getesteten Materialien eine Applikation direkt auf die Pulpa zum Zelltod führen würde. Es ist notwendig, dass eine Dentinschicht zwischen Pulpa und Dentinadhäsiv verbleibt, um die Pulpa nicht irreversibel zu schädigen.

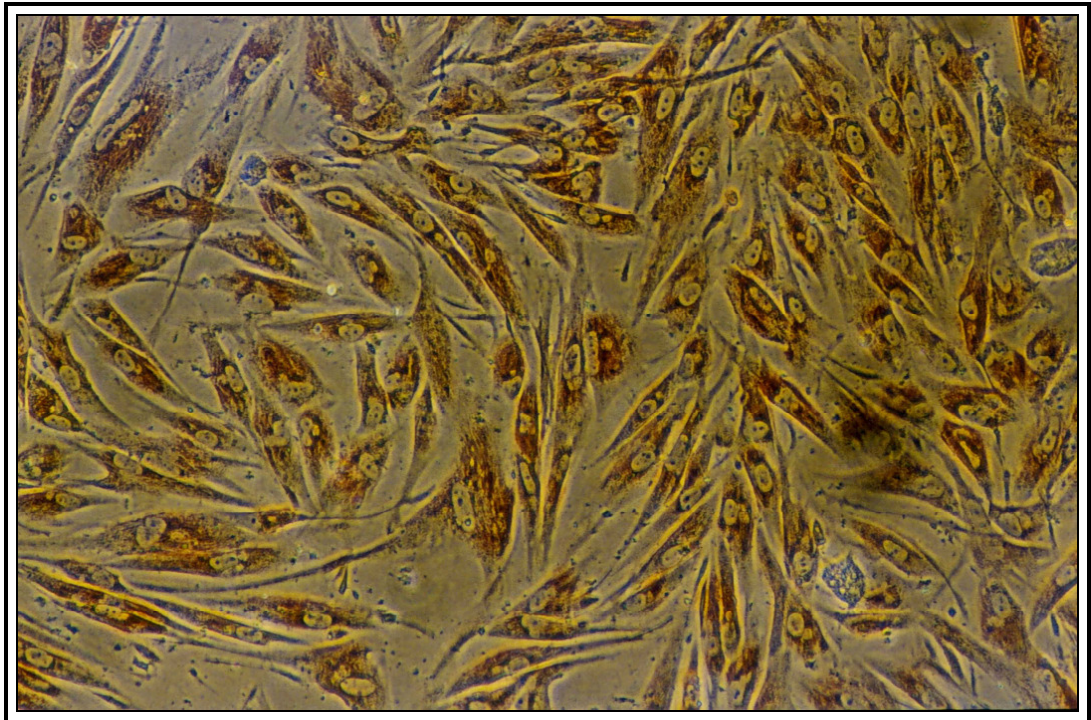


Abbildung 9: Zellkontrolle A bei 10-facher Objektivvergrößerung

Für die Betrachtung der Hauptversuche bedeutete dies, dass bei der Applikation einer Dentinscheibe zwischen Haftvermittler und Zellen und somit der Nachahmung der natürlichen Situation im Mund, eine Differenzierung der toxischen Reaktion abhängig von der Dentindicke und der damit verbundenen Diffusionsbarriere für die Adhäsive, möglich war.

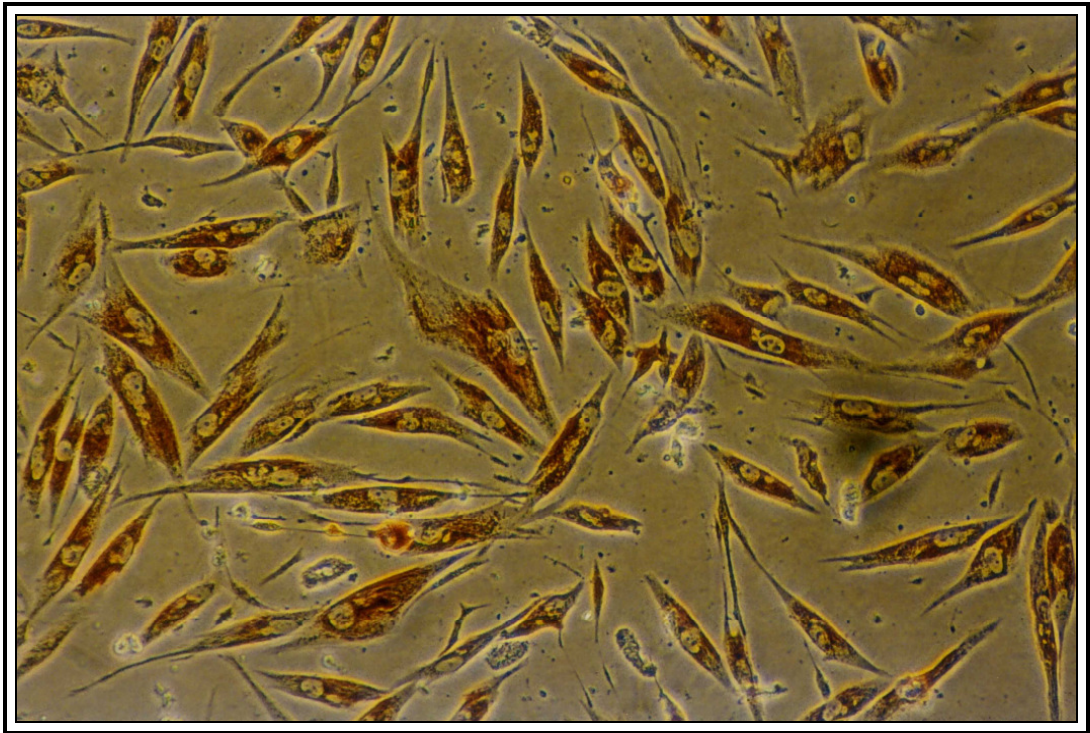


Abbildung 10: Optibond Solo direkt unter dem Deckglas bei 10-facher Objektivvergrößerung;  
Entfärbeindex 4

Daraus resultiert auch, dass ein mögliches, vollständiges Überleben der Zellen unterhalb der mit Haftvermittler beschickten Dentinscheibe, bei Ausschluss eines Fehlers innerhalb der Versuchsanordnung, mit der Dicke der Dentinscheibe zu tun haben muss, da die Materialien direkt alle toxisch gegenüber den Zellen waren.

Die automatisch immer mitgeführte Zellkontrolle zeigte, sowohl im ersten als auch im zweiten Vorversuch, einen normal gewachsenen Fibroblastenrasen mit durchweg gefärbten, vitalen Zellen.

## 4.2. HAUPTVERSUCHE – QUANTITATIVE ERGEBNISSE

Bei jedem Material wurde als Vergleichsgruppe eine Zellkontrolle mitgeführt. Die Zellreaktionen innerhalb der Versuche wurden nach den schon im Abschnitt 2.7. (zytopathologische Zellveränderungen) beschriebenen Parametern (normale Zellen, tote Zellen, veränderte Zellen etc. ) ausgezählt und anschließend statistisch ausgewertet, um eine allgemeingültige Aussage ableiten zu können.

Um eine bessere und verständlichere Übersicht und Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen getesteten Materialien zu erhalten, wurden für jedes Material bei den verschiedenen Parametern der Mittelwert, die Standardabweichung, der Median, der Maximal- und Minimalwert ermittelt.

Der Mittelwert beinhaltet alle ermittelten Werte, ist der Quotient aus der Summe der Messwerte und ihrer Anzahl und gibt Aufschluss über den Durchschnittswert vorliegender Werte. Die Standardabweichung gibt dem gewöhnlichen Mittelwert eine qualitative Bedeutung. Sie ist eine Maßzahl der Streuung. Wird in der Statistik eine Auswertung über eine Menge von Werten benötigt, gibt die Standardabweichung ein sinnvolles Maß für die Streuung um den Mittelwert an. Sie ist das Maß für die Abweichung von Einzelmesswerten einer Messreihe von ihrem arithmetischen Mittelwert. Dies bedeutet, dass je höher eine Standardabweichung ist, desto größer ist auch die Abweichung von den Mittelwerten. Der Median ist der Wert einer Verteilung, unter dem oder über dem gleich viele Werte liegen. Er halbiert bei aufsteigender Sortierung der Messwerte die Messreihe. Maximal- und Minimalwert geben den höchsten bzw. niedrigsten Wert einer Reihe an.



#### 4.2.1. Dentinscheibendicke 500 $\mu\text{m}$ -100 $\mu\text{m}$

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Versuche bei allen Dentinscheibendicken konnten nach dem Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test für alle getesteten Materialien und für die Zellkontrolle statistisch signifikante Werte ermittelt werden.

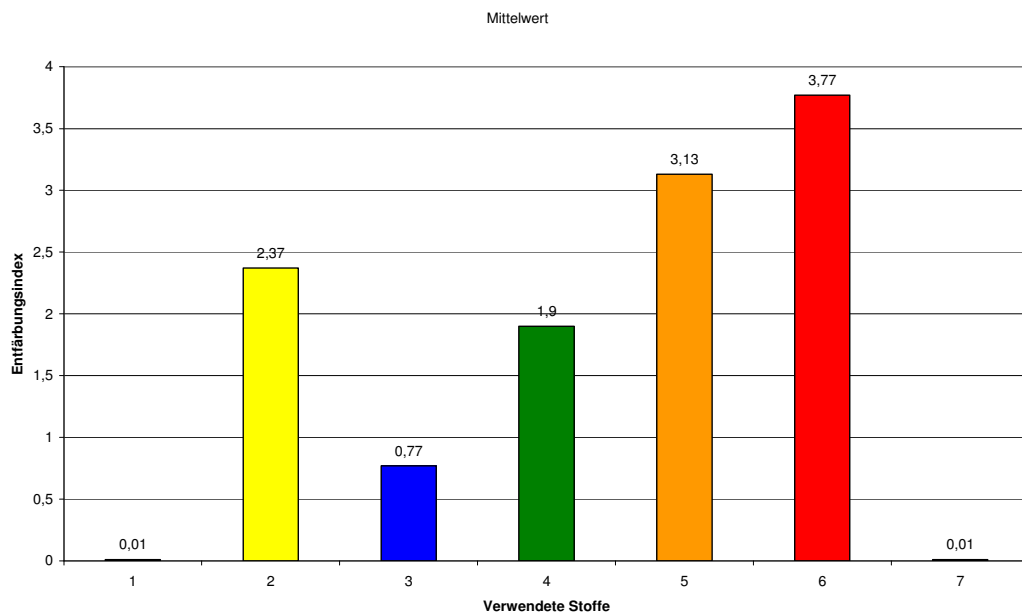


Abbildung 11: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	2,37	0,77	1,90	3,13	3,77	0,01
Stabwn	0,00	0,40	0,53	0,60	0,43	0,42	0,00
Median	0,00	2,50	0,50	2,00	3,00	4,00	0,00
Max	0,00	2,00	0,00	0,50	2,50	3,00	0,00
Min	0,00	3,00	2,00	2,50	4,00	4,00	0,00
Signifikanz *	2,4,5,6	1,7	5,6	1,6,7	1,3,7	1,3,4,7	2,4,5,6

Tabelle 12: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 500-100  $\mu\text{m}$ ; \* nach Bonferroni

Syntac Sprint, mit einem Mittelwert von 3,77 verursachte die stärkste toxische Reaktion und war signifikant unterschiedlich gegenüber allen getesteten Materialien außer gegenüber Syntac Single Component. Syntac Single Component verhielt sich, bei einem Mittelwert von 3,13 nicht gravierend anders als Syntac Sprint und war außer zur Zellkontrolle und zum Gemisch nur zu Scotchbond 1 und Optibond Solo signifikant unterschiedlich. Prime & Bond war signifikant unterschiedlich zu Zellkontrolle, Gemisch, Optibond Solo und Syntac Sprint. Optibond Solo mit einem Mittelwert von 0,77 und Scotchbond 1 mit einem Mittelwert von 1,90 zeigten signifikant unterschiedliche Werte zu Zellkontrolle und Gemisch, Syntac Single Component und Syntac Sprint.

#### 4.2.2. Dentinscheibendicke 500 $\mu\text{m}$

Im Vergleich zur Zellkontrolle waren bei 5 von 6 getesteten Materialien statistisch signifikante Werte ermittelbar. Lediglich für Optibond Solo konnten keine Signifikanzwerte ermittelt werden.

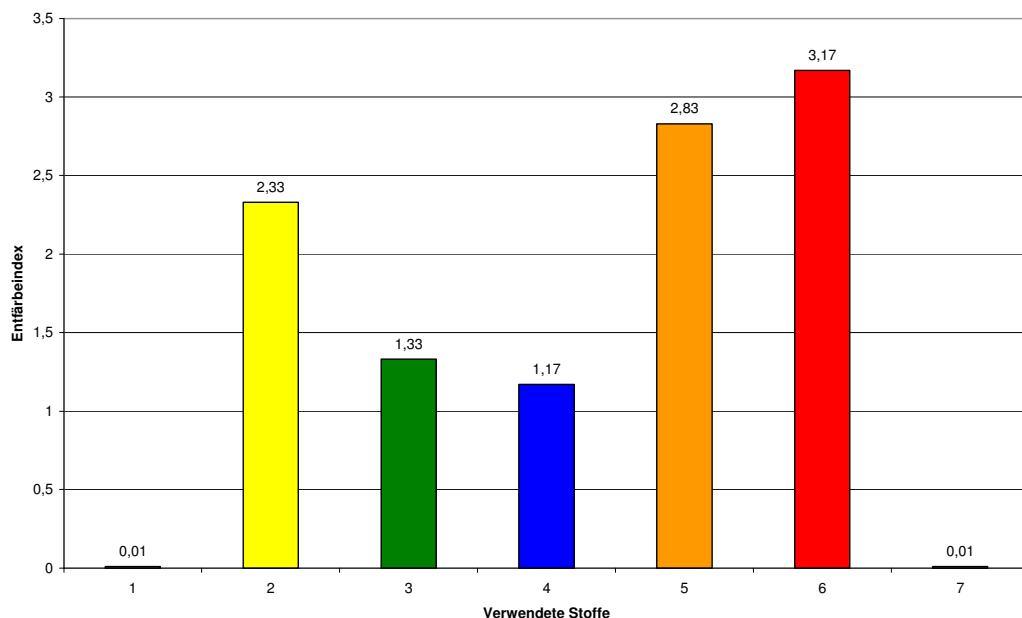


Abbildung 12: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	2,33	1,33	1,17	2,83	3,17	0,01
Stabwn	0,00	0,29	0,76	0,58	0,29	0,29	0,00
Median	0,00	2,50	1,50	1,50	3,00	3,00	0,00
Max	0,00	2,00	0,50	0,50	2,50	3,00	0,00
Min	0,00	2,50	2,00	1,50	3,00	3,50	0,00
Signifikanz *	6	-	-	-	-	1,7	6

Tabelle 13: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 500 µm; \* nach Bonferroni

Anhand des Mittelwertes und der durchschnittlichen Standardabweichung zeigte Syntac Sprint mit 3,17 den schlechtesten Wert, war also somit am meisten toxisch. Danach folgen Syntac Single Component (2,83) und Prime & Bond (2,33) sowie Scotchbond 1 (1,17). Daraus lässt sich schließen, dass Scotchbond 1 die Zellen bei einer Dentinscheibendicke von 500 µm am wenigsten schädigte. Entsprechend gestalten sich auch die Signifikanzwerte. Syntac Sprint war signifikant unterschiedlich zur Zellkontrolle, zu Scotchbond 1 und dem Gemisch. Syntac Single Component und Prime & Bond waren nur zur Zellkontrolle und zu dem Gemisch signifikant unterschiedlich. Scotchbond 1 war lediglich zu Syntac Sprint signifikant unterschiedlich.

#### 4.2.3. Dentinscheibendicke 400 µm

Mittels des Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Tests konnten statistische Signifikanzen für die Zellkontrolle, Prime & Bond, Optibond Solo, Syntac Single Component, Syntac Sprint und das Gemisch ermittelt werden. Lediglich Scotchbond wies keine signifikanten Werte auf.

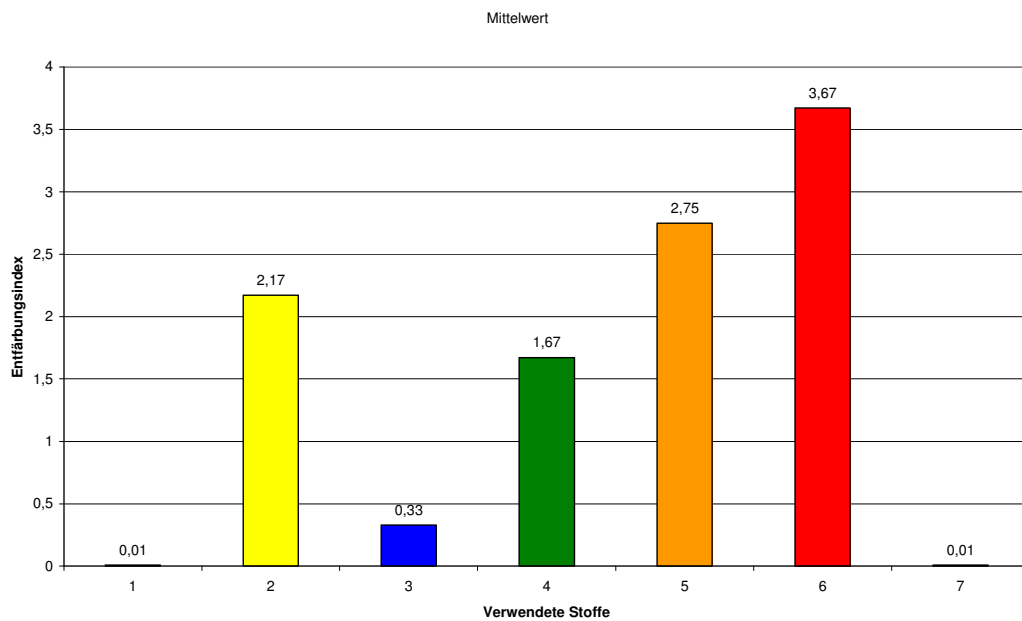


Abbildung 13: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	2,17	0,33	1,67	2,75	3,67	0,01
Stabwn	0,00	0,29	0,29	0,29	0,25	0,58	0,00
Median	0,00	2,00	0,50	1,50	2,75	4,00	0,00
Max	0,00	2,00	0,00	1,50	2,50	3,00	0,00
Min	0,00	2,50	0,50	2,00	3,00	4,00	0,00
Signifikanz *	6	-	-	-	-	1,7	6

Tabelle 14: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 400 µm; \* nach Bonferroni

Im Mittel konnte bei Syntac Sprint mit einem Wert von 3,67 die stärkste toxische Wirkung auf den Fibroblastenrasen festgestellt werden. Nicht nur die Zellen, die unmittelbar unter der Prüfsubstanz waren, wurden entfärbt, sondern auch alle Zellen in einem Umkreis von einem Zentimeter um die Prüfsubstanz herum. Es ergaben sich signifikant unterschiedliche Werte zur Zellkontrolle, Gemisch und Optibond Solo.

Die wenigsten geschädigten bzw. veränderten Zellen wurden bei Optibond Solo ausgezählt, es lag im Mittel eine Entfärbeindex von 0,33 vor. Dies bedeutet, dass bei Optibond Solo die Zellen gar nicht bzw. lediglich direkt unter der Prüfsubstanz entfärbt wurden. Es ergaben sich lediglich zu Syntac Single Component und zu Syntac Sprint signifikant unterschiedliche Werte.

#### 4.2.3. Dentinscheibendicke 300 µm

Bei einer Dentinscheibendicke von 300 µm konnten außer bei der Zellkontrolle bei Optibond Solo, Syntac Single Component, Syntac Sprint und dem Gemisch statistisch signifikante Werte ermittelt werden.

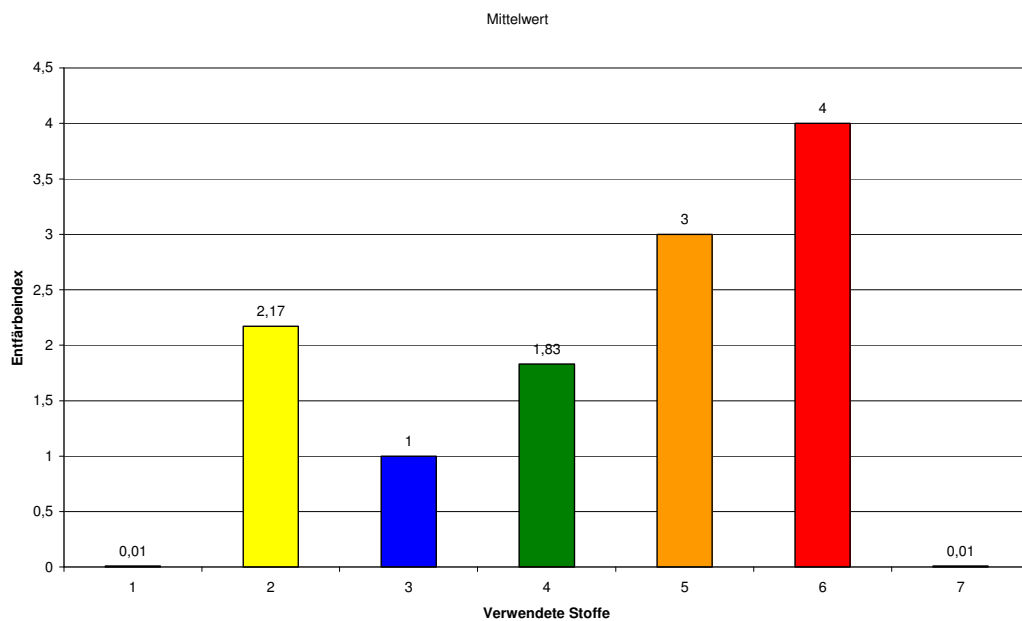


Abbildung 14: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	2,17	1,00	1,83	3,00	4,00	0,01
Stabwn	0,00	0,29	0,50	0,58	0,00	0,00	0,00
Median	0,00	2,00	1,00	1,50	3,00	4,00	0,00
Max	0,00	2,00	0,50	1,50	3,00	4,00	0,00
Min	0,00	2,50	1,50	2,50	3,00	4,00	0,00
Signifikanz *	6	-	-	-	-	1,7	6

Tabelle 15: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 300 µm; \* nach Bonferroni

Am wenigsten auffällig war Optibond Solo bei einem Mittelwert von 1, veränderte Zellen wurden hier lediglich direkt unter der Prüfsubstanz ausgezählt. Optibond Solo war lediglich signifikant unterschiedlich zu Syntac Sprint. Syntac Single Component war signifikant unterschiedlich zur Zellkontrolle und zum Gemisch und ähnlich toxisch wie Syntac Sprint. Die meisten Zellen veränderten sich bei Syntac Sprint, es hatte bei einem Mittelwert von 4 die stärkste toxische Wirkung und ist signifikant unterschiedlich zur Zellkontrolle, zu Optibond Solo und zu dem Gemisch.

#### 4.2.5. Dentinscheibendicke 200 µm

Statistische Signifikanzen konnten außer bei der Zellkontrolle bei Optibond Solo, Syntac Single Component sowie bei Syntac Sprint mittels des Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Tests festgestellt werden.

Wie auch in Abbildung 15 dargestellt verhielt sich Syntac Sprint mit einem Mittelwert von 4 bei einer Dentinscheibendicke von 200 µm am stärksten toxisch. Es war signifikant unterschiedlich zur Zellkontrolle, Optibond Solo und dem Gemisch. Syntac Single Component war im Mittel kaum weniger toxisch und nur zu Zellkontrolle und Gemisch signifikant unterschiedlich.

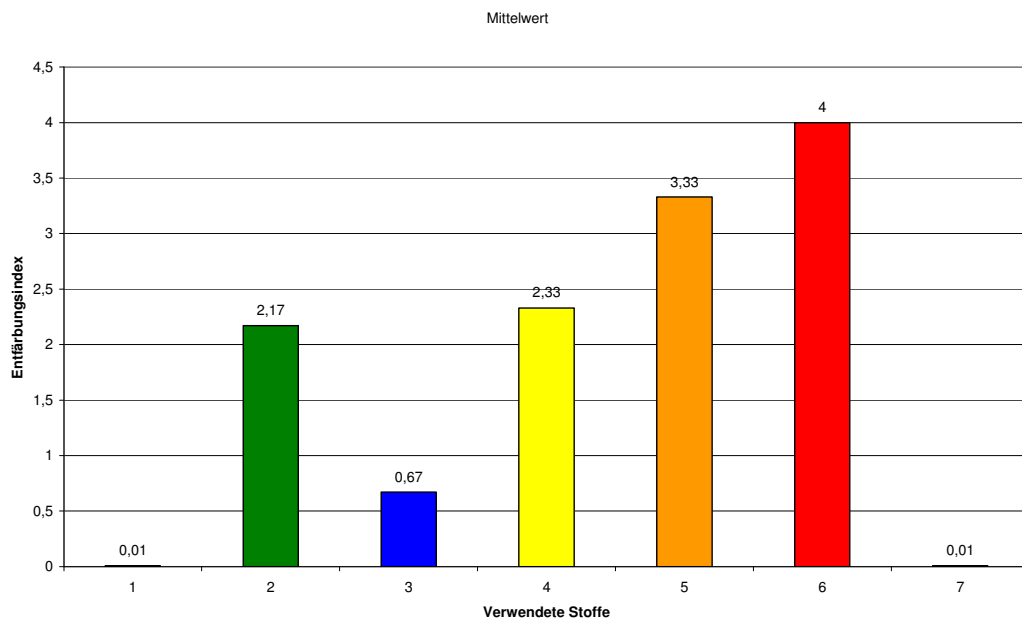


Abbildung 15: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	2,17	0,67	2,33	3,33	4,00	0,01
Stabwn	0,00	0,29	0,29	0,29	0,29	0,00	0,00
Median	0,00	2,00	0,50	2,50	3,50	4,00	0,00
Max	0,00	2,00	0,50	2,00	3,00	4,00	0,00
Min	0,00	2,50	1,00	2,50	3,50	4,00	0,00
Signifikanz *	6	-	-	-	-	1,7	6

Tabelle 16: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 200 µm; \* nach Bonferroni

Bei Optibond Solo mit einem Mittelwert von 0,67 und einem signifikanten Unterschied lediglich zu Syntac Sprint konnten nur direkt unter der Prüfschicht vereinzelt veränderte Zellen ausgezählt werden, die Wirkung war somit am wenigsten schädlich.

#### 4.2.6. Dentinscheibendicke 100 µm

Belegt durch den Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test wiesen die Zellkontrolle, Prime & Bond, Optibond Solo, Syntac Single Component, Syntac Sprint und das Gemisch bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm eine statistische Signifikanz auf.

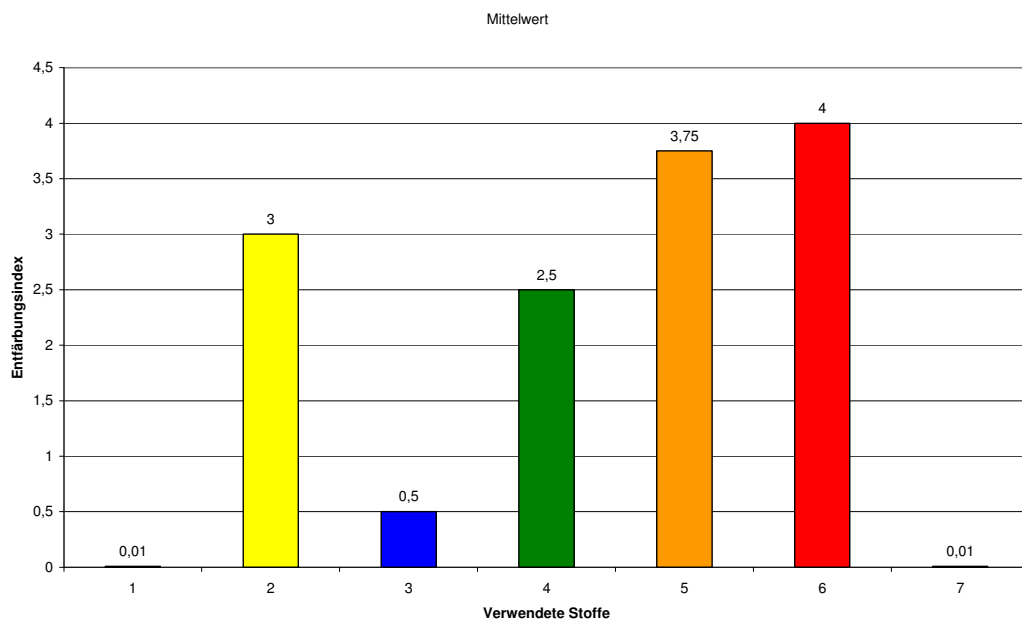


Abbildung 16: 1=Zellkontrolle; 2=Prime & Bond; 3=Optibond Solo; 4=Scotchbond; 5=Syntac Single Component; 6=Syntac Sprint; 7=Gemisch

Material	Zellkontrolle	PB	OS	SB	SsC	SS	Gemisch
Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert	0,01	3,00	0,50	2,50	3,75	4,00	0,01
Stabwn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
Median	0,00	3,00	0,50	2,50	3,75	4,00	0,00
Max	0,00	3,00	0,50	2,50	3,50	4,00	0,00
Min	0,00	3,00	0,50	2,50	4,00	4,00	0,00
Signifikanz *	6	-	-	-	-	1,7	6

Tabelle 17: Geschädigte Zellen der untersuchten Dentinadhäsive und des Gemischs bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm; \* nach Bonferroni



Wie die Abbildung 16 zeigt lag zwischen den Mittelwerten von Optibond Solo und Syntac Sprint die größte Differenz. Optibond Solo hatte bei einem Mittelwert von 0,5 die geringsten toxischen Auswirkungen auf die Fibroblasten und war nur signifikant unterschiedlich zu Syntac Sprint. Syntac Sprint hingegen verursachte bei einem Mittelwert von 4 die stärksten Entfärbungsreaktionen und war signifikant unterschiedlich zu Zellkontrolle, Optibond Solo und Gemisch. Die restlichen Dentinadhäsive, Prime & Bond sowie Syntac Single Component, waren im Mittel nahezu gleich toxisch bei Werten von 2,5 bis 3,75 und lediglich signifikant unterschiedlich zu Zellkontrolle und Gemisch.

### **4.3. HAUPTVERSUCHE – QUALITATIVE ERGEBNISSE**

Mit der Auswertung der Petrischalen aus allen Versuchen mittels Entfärbungsindex ging eine genaue mikroskopische Untersuchung der Zellreaktionen einher. Wird in einer Zellkultur der Ausdruck Zytotoxizität verwendet, muß der toxische Effekt des schädigenden Agens genau beschrieben werden, so zum Beispiel Änderungen in der Morphologie, der Anheftungsbedingungen, des Wachstums und vieles mehr.

Da gesunde Zellen den im Versuch verwendeten Vitalfarbstoff Neutralrot in ihr Zytoplasma aufnehmen, wurden alle rot eingefärbten Zellen als lebendig und voll funktionsfähig eingestuft. Geschädigte Zellen geben das Neutralrot ab, es bildet sich eine helle Zone unter bzw. um die Prüfsubstanz herum. Um das Ausmaß der Zellschädigung dokumentieren zu können wurde als Maß für die Abstufung der Schädigung der Entfärbungsindex verwendet ( wie schon in 3.3. beschrieben ).

Mikroskopisch erkennbar sind daneben nicht nur die Entfärbung sondern auch die für ein langsames Absterben der Zelle typischen Reaktionsabläufe. Wie schon in 2.7. beschrieben kommt es bei Einwirkung toxischer Substanzen zu ganz charakteristischen Zellveränderungen.

### 4.3.1. Syntac Sprint

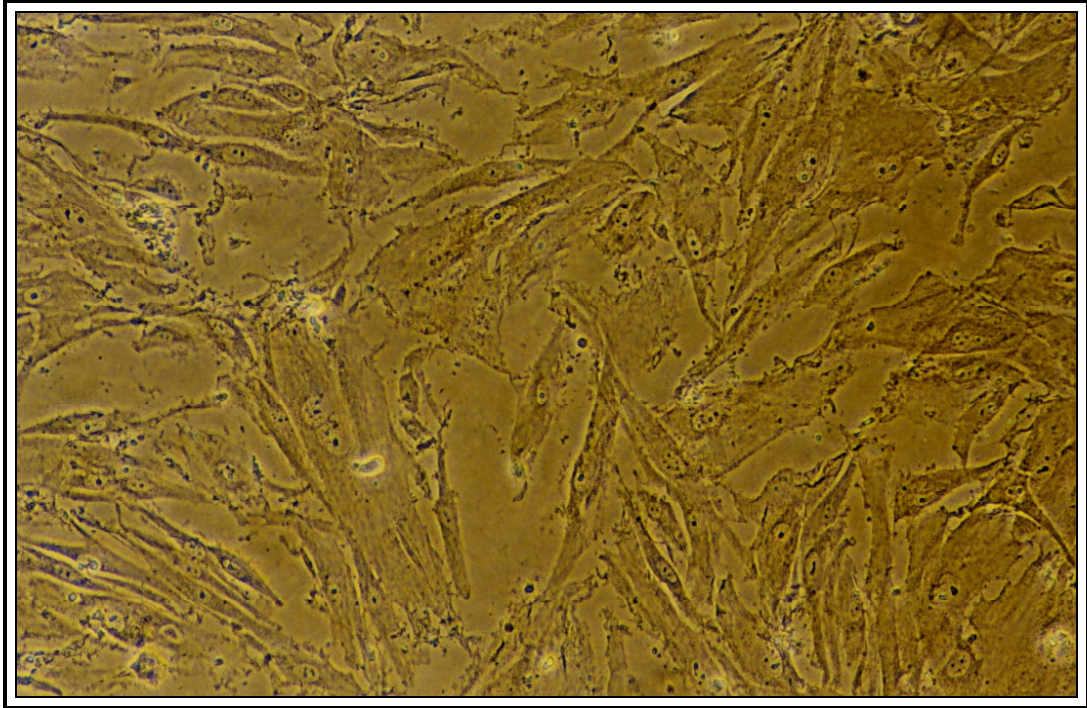


Abbildung 17: Syntac Sprint bei einer Dentinscheibendicke von 500 µm; Zellen direkt unterhalb der Dentinscheibe

Bei der Auswertung der Versuche bei allen Dentinscheibendicken zeigte sich immer wieder, dass Syntac Sprint die am meisten toxische Substanz war. Bei allen Proben kam es zur Entfärbung von etwa einem Zentimeter der Fibroblastenfläche unter bzw. um die Substanz herum.

Abbildung 17 zeigt deutlich die ausgebildeten Retraktionsfäden an den Fibroblasten. Die Störung des physiologischen Zustandes der Zellen führt dazu, dass sich die ohnehin schon langgestreckte, spindelförmige Fibroblastenzelle noch ein wenig mehr streckt und am Zellende einen fadenförmigen Fortsatz, den Retraktionsfaden, bildet. In diesem Zustand ist die Zellschädigung allerdings noch reversibel.

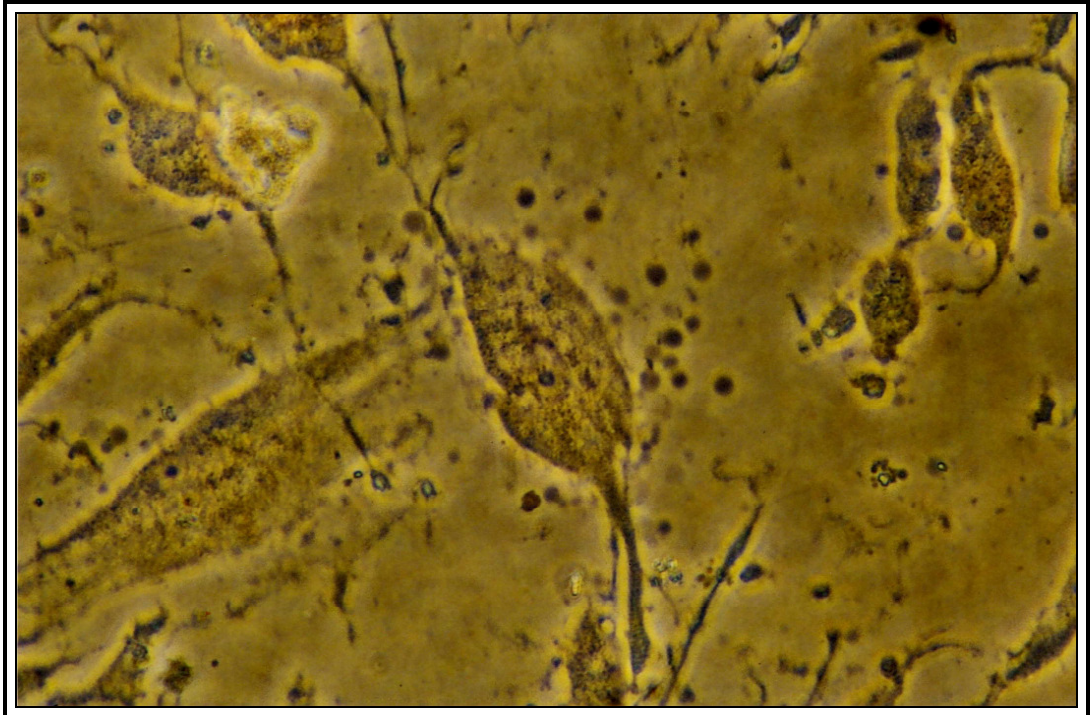


Abbildung 18: Syntac Sprint bei einer Dentinscheibendicke von 100  $\mu\text{m}$  bei 25-facher Objektivvergrößerung; bis 0,5 cm um Prüfsubstanz herum

In der Ausschnittvergrößerung von Abbildung 18 erkennt man im Zentrum eine sich abschnürende Zelle. Die Zelle befindet sich im Stadium der Potocytose, der Zellkern bläht sich typischerweise seifenblasenförmig auf und Plasmateile aus dem Zytoplasma schnüren sich ab. Die Potocytose stellt den Übergang zwischen reversibler und irreversibler Zellschädigung dar.

In Abbildung 19 haben sich vereinzelte Fibroblasten schon ganz abgekugelt. Der Retraktionsfaden ist verschwunden, der Zellkern hat sich an den Zellrand verschoben und die Zelle erscheint aufgequollen. Die Zelle ist nun irreversibel geschädigt und stirbt ab.

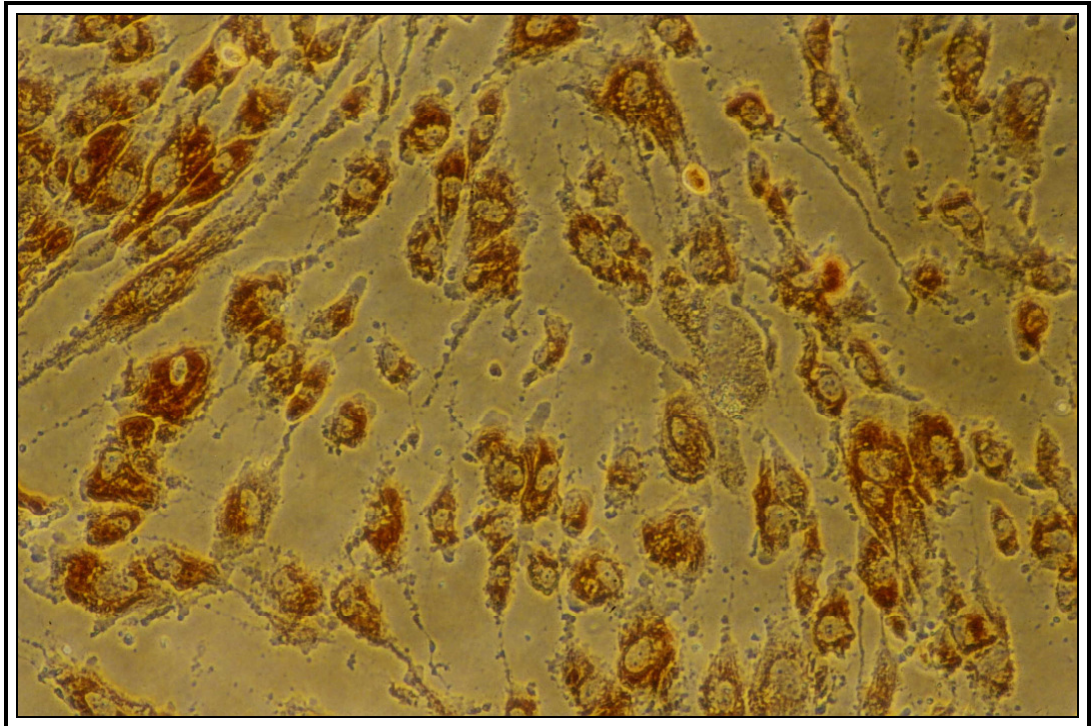


Abbildung 19: Syntac Sprint bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm; bis 1 cm um Prüfsubstanz herum

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei Syntac Sprint selbst bei einer Dentinbarriere von 500 µm noch Zellen geschädigt werden. Hier ist es allerdings noch möglich, dass sich die Zelle an die Situation adaptiert und weiterlebt.

Verbleibt jedoch weniger Dentin zwischen Fibroblastenzellen und Haftvermittler, ruft dies eine Zellschädigung hervor, von der sich die Zelle in der Regel nicht wieder erholen kann.

#### 4.3.2. Syntac Single Component

Bei Syntac Single Component kam es unabhängig von der Dentinscheibendicke direkt unterhalb der Prüfsubstanz immer zum totalen Zelltod ähnlich wie bei Syntac Sprint. Die Zellen waren immer unter bzw. in einem Radius von 0,5 bis 1 Zentimeter um die Prüfsubstanz herum entfärbt. Syntac Single Component war daher auch als toxisch einzustufen, wenngleich die Reaktionen nicht ganz so stark waren wie bei Syntac Sprint.

Ähnlich den Reaktionen bei Syntac Sprint erkennt man auf Abbildung 20 Zellen in der Abschnürungsphase. Die Zellen sind aufgebläht und die Retraktionsfäden verkürzt oder schon gar nicht mehr vorhanden. Vereinzelt sind die Zellkerne am Zellrand zu sehen.

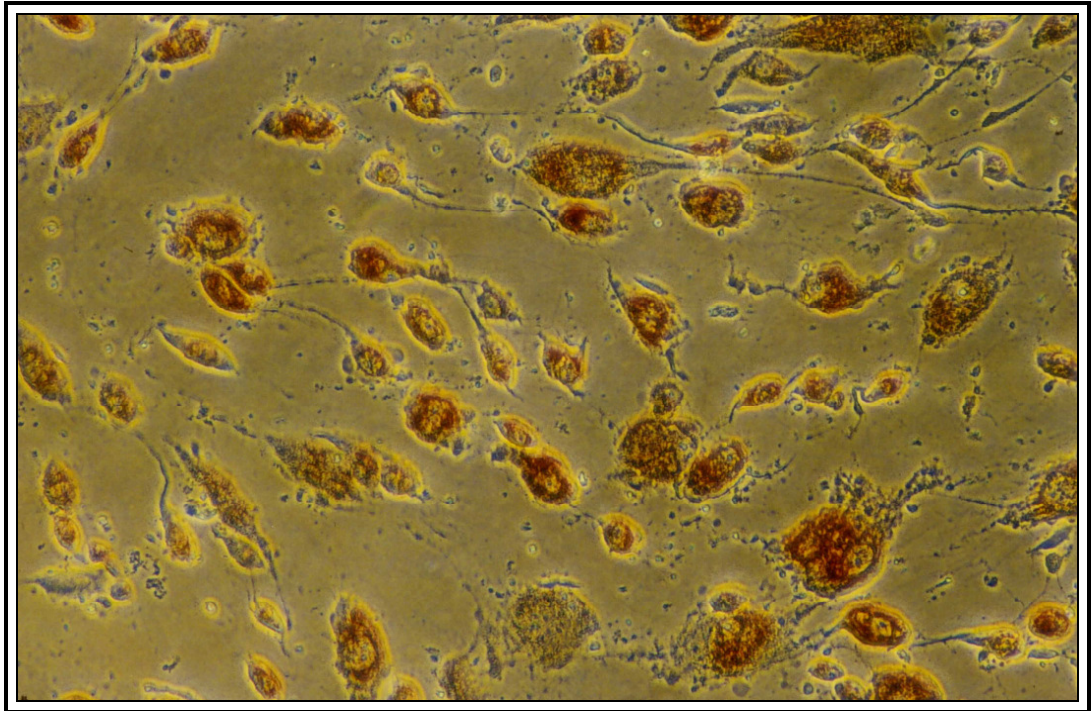


Abbildung 20: Syntac Single Component bei einer Dentinscheibendicke von 500  $\mu\text{m}$ ; bis 0,5 cm um Prüfsubstanz herum

Haben sich die Fibroblasten ganz abgeschnürt erkennt man sogenannte „Bubbles“. Nahe dem oberen Bildrand in der Bildmitte von Abbildung 21 ist eine solche „Bubble“ zu sehen. Einer solchen Aufblähung oder Abrundung folgt der Zelltod mit Schrumpfung und Auflösung des Zellkerns, die Zelle löst sich schließlich vom ernährenden Substrat ab.

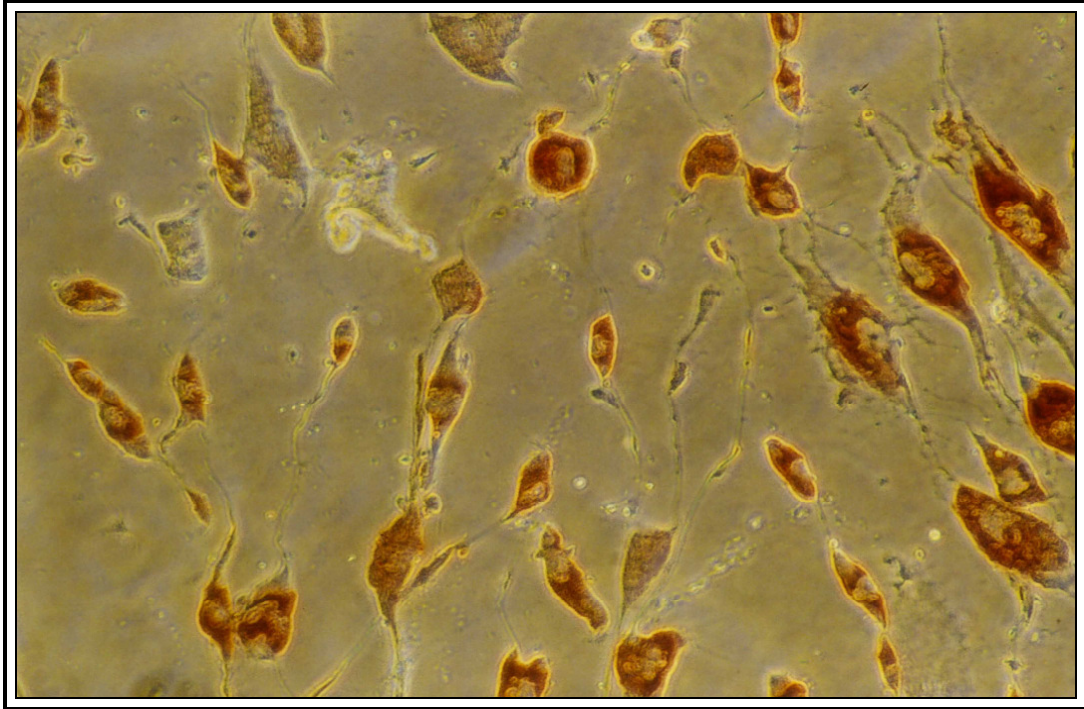


Abbildung 21: Syntac Single Component bei einer Dentinscheibendicke von 400  $\mu\text{m}$ ; bis 1 cm um Prüfsubstanz herum

#### 4.3.3. Prime & Bond

Bei Prime & Bond konnten ganz entfärbte Zellen nur unter bzw. bis zu 0,5 cm um die Prüfsubstanz herum ausgezählt werden. Ab einem Zentimeter um die Prüfsubstanz herum wurde immer ein völlig normaler Fibroblastenrasen vorgefunden. Auf Abbildung 22 erkennt man den Übergang zwischen geschädigten Zellen und nicht geschädigten Zellen. Bei fast allen Zellen findet man noch die typischen Retraktionsfäden vor. Die rechte Bildseite zeigt die Hemmzone. Hier sind die Zellen schon entfärbt, d.h. der Vitalfarbstoff Neutralrot wurde schon abgegeben, die Zellen sind in diesem Bereich schon irreversibel geschädigt. Auf der linken Bildseite erkennt man die Übergangszone. Die Zellen sind noch vital und gefärbt.

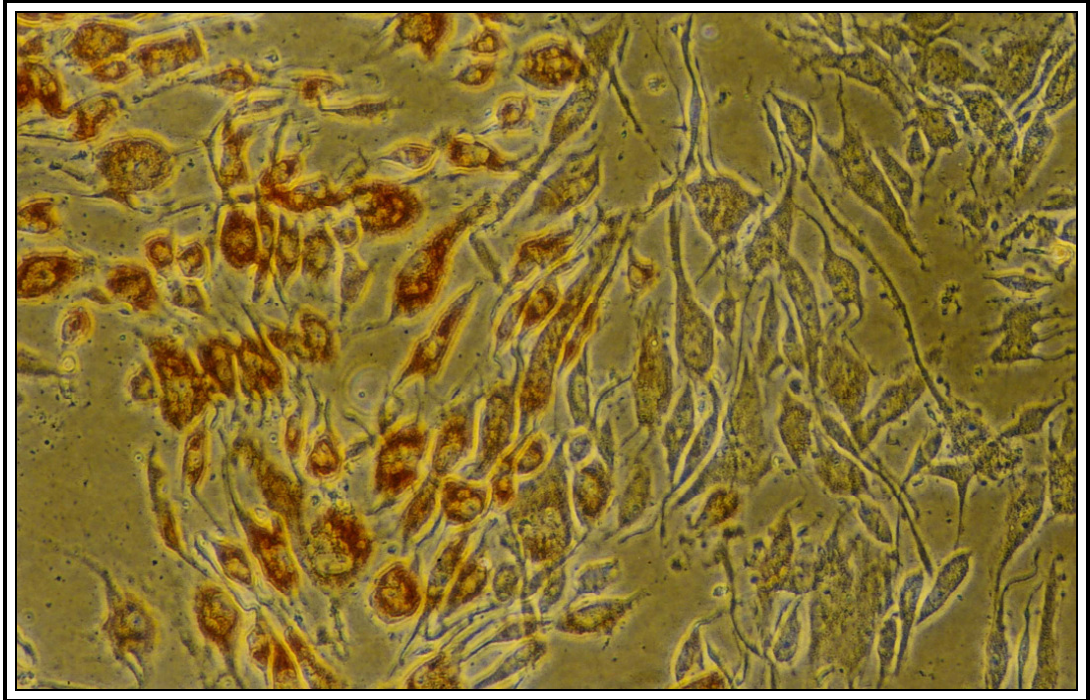


Abbildung 22: Prime & Bond bei einer Dentinscheibendicke von 500  $\mu\text{m}$ ; Hemmzone bis Übergangszone bei 0,5 cm

Auch auf Abbildung 23 sind verschiedene Stadien der Zellen zu sehen. Alle Zellen sind schon geschädigt, haben Retraktionsfäden ausgebildet. Im rechten Bilddrittel oben erkennt man eine Zelle, die sich schon abkugelt hat und deren Farbe nicht mehr ganz so rot erscheint. Dies entspricht dem Stadium der Potocytose, in dem sich der Zellkern aufbläht und die Zelle sich insgesamt wieder zusammen zieht. Eine Zellschädigung dieser Art kann schon irreversibel sein.

Bei allen Proben und in allen Versuchen zeigte sich direkt unter der Dentinscheibe ein Bild ähnlich der Abbildung 24. Alle Zellen sind entfärbt, die Zellkerne sind, falls überhaupt noch vorhanden, an den Zellrand verschoben und geschrumpft. Dies entspricht einem 100%igen Zelltod.

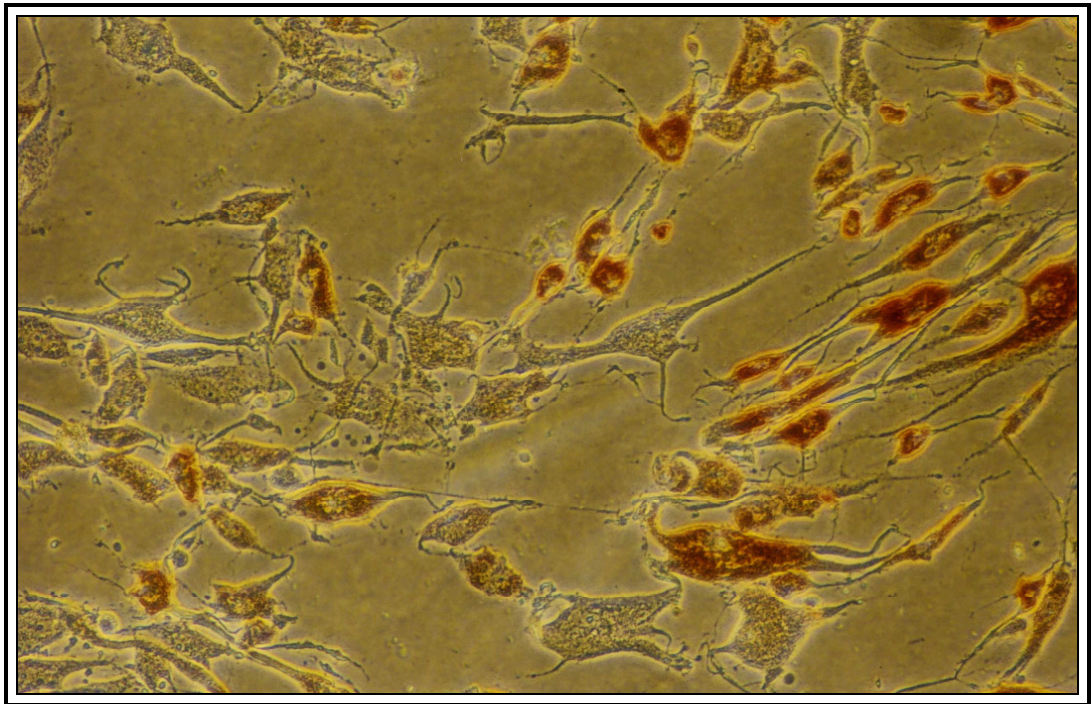


Abbildung 23: Prime & Bond bei einer Dentinscheibendicke von 300 µm; bis 0,5 cm um die Prüfsubstanz herum

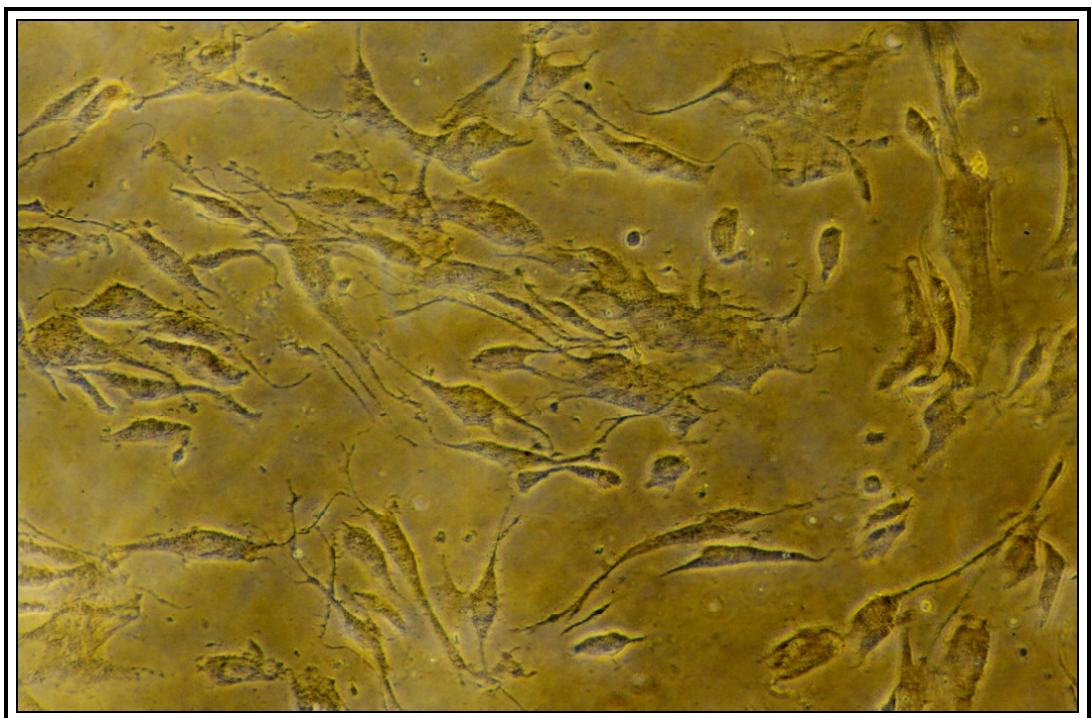


Abbildung 24: Prime & Bond bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm; direkt unter der Dentinscheibe



#### 4.3.4. Scotchbond 1

Bei dem Haftvermittler Scotchbond 1 konnten ähnliche Ergebnisse wie bei Prime & Bond dokumentiert werden.

Entfärbte Zellen konnten hier nur unter bzw. teilweise auch bis 0,5 cm um die Prüfsubstanz herum ausgezählt werden. Die Reaktionen waren insgesamt nur geringfügig schwächer als bei Prime & Bond.

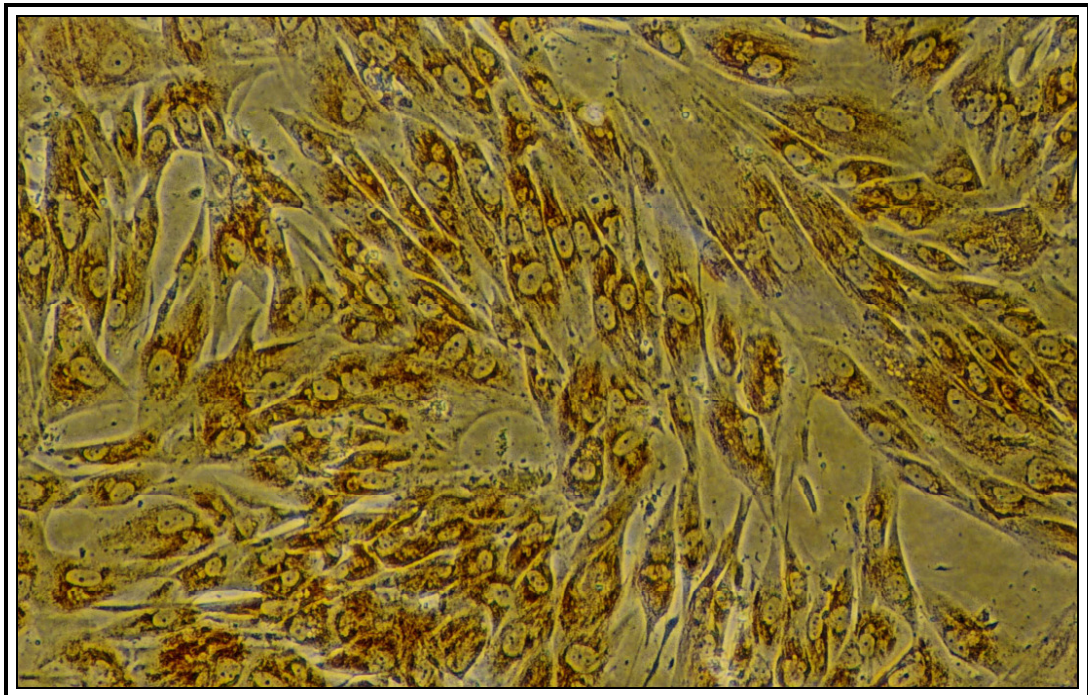


Abbildung 25: Scotchbond 1 bei einer Dentinscheibendicke von 500  $\mu\text{m}$ ; direkt unterhalb der Dentinscheibe

Diese Abbildung 25 aus dem ersten Versuch zeigt einen schwach geschädigten Fibroblastenrasen. Die Fibroblasten sind leicht retrahiert, vereinzelte Vakuolisierungen sind zu erkennen. In den anderen beiden Versuchen waren direkt unter der Dentinscheibe die Zellen immer abgestorben. Dieser Ausreißer des Ergebnisses im ersten Versuch lässt sich auf die in diesem Versuch nur lose vorhandenen Haftung des Materials auf der Dentinscheibe zurückführen.

Bei allen drei Versuchen kam es, wie in Abbildung 26 gut zu erkennen ist, bei einer Dentinscheibendicke von 100  $\mu\text{m}$  zum totalen Zelltod. Keine der Zellen enthält noch den Vitalfarbstoff, die Zellkerne sind geschrumpft oder gar nicht mehr vorhanden.

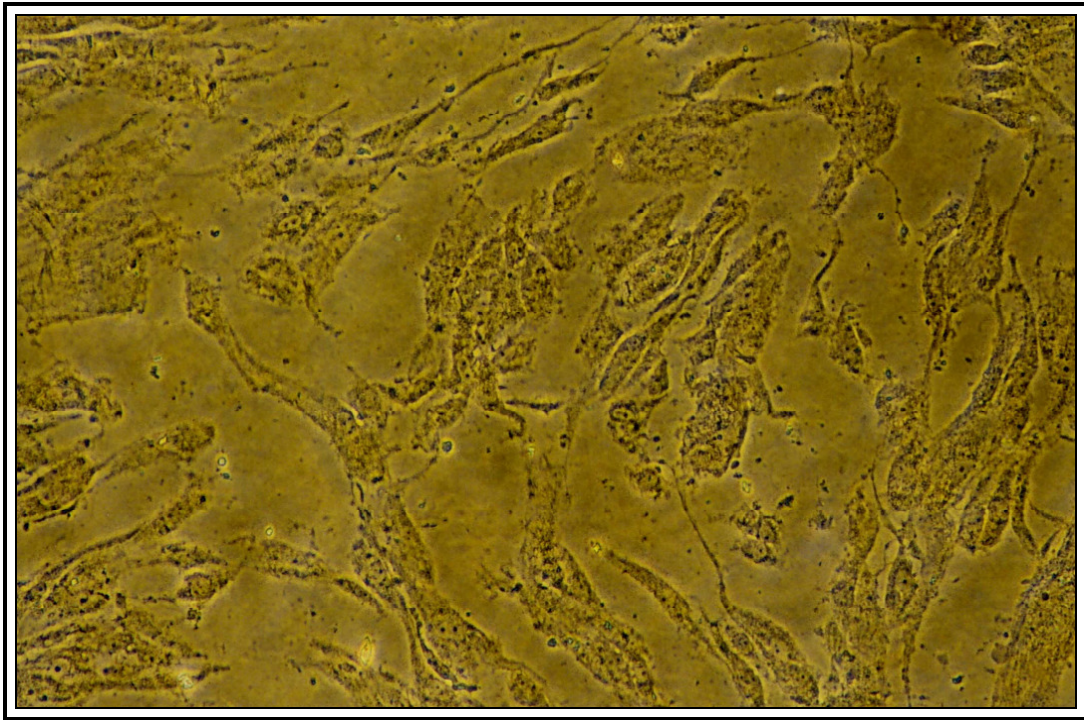


Abbildung 26: Scotchbond 1 bei einer Dentinscheibendicke von 100  $\mu\text{m}$ ; direkt unterhalb der Dentinscheibe

#### 4.3.5. Optibond Solo

Die insgesamt besten Ergebnisse in allen Versuchen wurden bei der Benutzung von Optibond Solo erzielt. Hier wurden, wenn überhaupt, nur vereinzelte entfärbte Zellen direkt unterhalb der Prüfsubstanz gefunden. Selbst bei den ganz dünnen Dentinscheibenbarrieren wurden die Zellen nur reversibel geschädigt, so dass dieser Haftvermittler als am besten verträglich eingestuft werden kann.

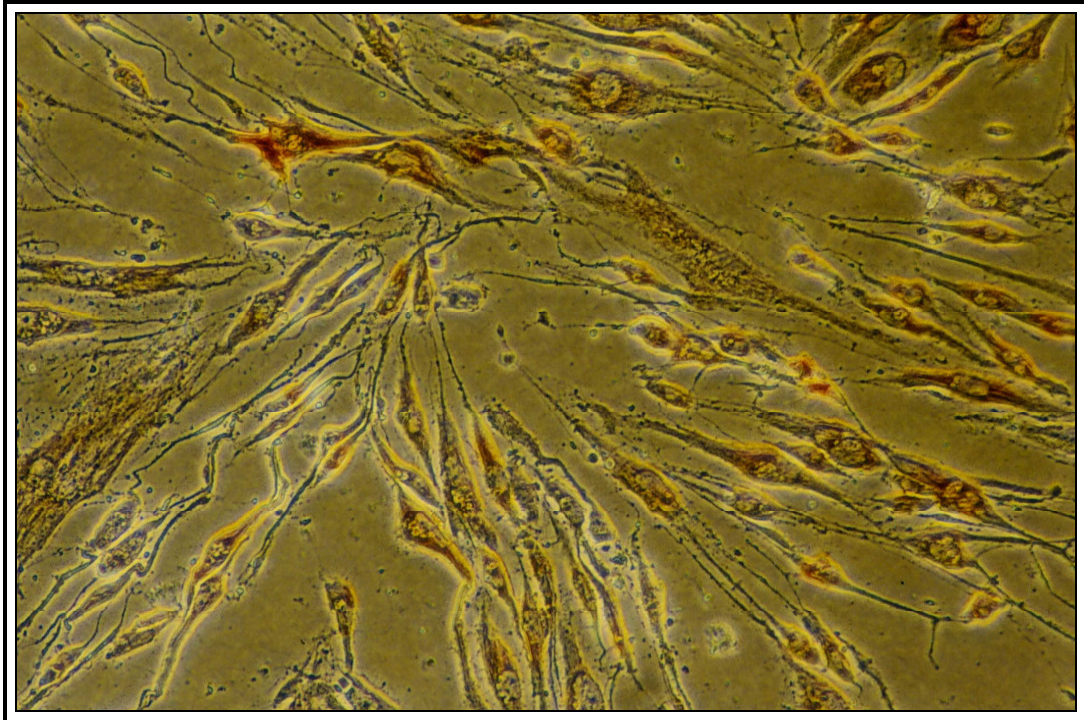


Abbildung 27: Optibond Solo bei einer Dentinscheibendicke von 500  $\mu\text{m}$ ; bis 0,5 cm um die Prüfsubstanz herum

Vereinzelt sind Fibroblasten, die sich beginnen zu retrahieren, zu erkennen. Die meisten Zellen jedoch sind normale, langgestreckte Fibroblastenzellen. Einige Zellen auf Abbildung 27 sind schon abgekugelt und somit irreversibel geschädigt. Man erkennt mehrere „Bubbles“, wie zum Beispiel im rechten Bild Drittel am oberen Bildrand. Der Zellkern sitzt hier nicht mehr im Zentrum der Zelle, sondern ist an den Zellrand verschoben. Einige Zellen jedoch sind noch völlig vital und haben ihre natürliche Form.

Auch bei einer ganz geringen Dentinbarriere von 100  $\mu\text{m}$  findet man bei Optibond Solo einen größtenteils normalen Zellrasen vor. Einige Zellen beginnen sich zu retrahieren, eine Reaktion, die die Zelle verkraftet ohne daran zu Grunde zu gehen. Abkugelungen oder Vakuolisierungen kommen kaum vor.

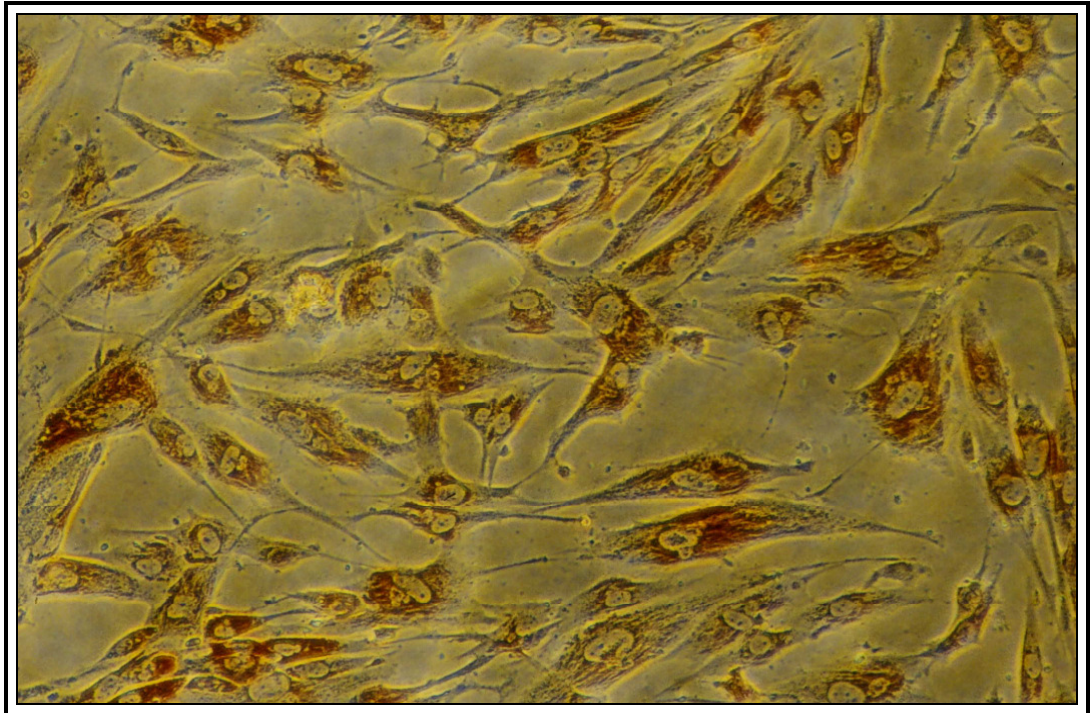


Abbildung 28: Optibond Solo bei einer Dentinscheibendicke von 200 µm; direkt unterhalb der Dentinscheibe

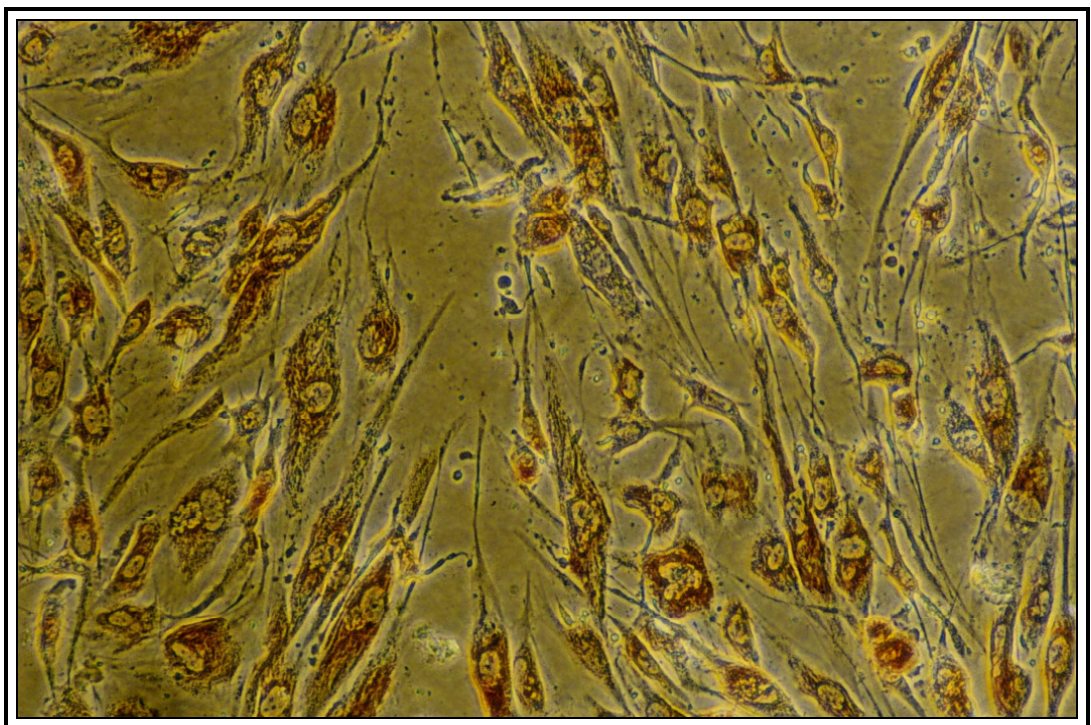


Abbildung 29: Optibond Solo bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm; direkt unterhalb der Dentinscheibe

## 4.4. ÜBERSICHT DER STATISTISCHEN ERGEBNISSE

In der vorliegenden Studie wurde mittels Agardiffusionstest die Toxizität verschiedener Dentinadhäsivsysteme und eines Säuregemischs aus Phosphor- und Fluorssäure anhand des Entfärbeindex getestet. Um eine bessere Übersicht über die statistisch signifikanten Werte zu erlangen, wurden die Werte tabellarisch zusammengefasst, graphisch dargestellt und nach den Schichtdicken der verwendeten Dentinscheiben geordnet.

### 4.3.1. Dentinadhäsive

Wie schon unter 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3., 4.2.4. und 4.2.5. beschrieben konnten anhand der Werte für Syntac Sprint, Syntac Single Component, Prime & Bond, Scotchbond 1 und Optibond Solo statistische Signifikanzen festgestellt werden. Ausgehend von den Mittelwerten bzw. den statistisch signifikanten Werten war Syntac Sprint bei allen Dentinscheibendicken immer am meisten toxisch, es ergaben sich für diesen Stoff Mittelwerte zwischen 3,17 und 4. Dies bedeutet, dass bei Syntac Sprint nicht nur die Zellen direkt unter der Prüfsubstanz, sondern auch alle Zellen in einem Umkreis von 1 cm oder mehr um die Prüfsubstanz herum, geschädigt wurden. Es war immer zur Zellkontrolle, zum Gemisch und zu allen anderen getesteten Haftvermittlern, außer zu Syntac Single Component, unterschiedlich.

Ähnliche, bzw. nahezu gleiche, Reaktionen verursachte Syntac Single Component. Dies zeigt sich darin, dass auch für diesen Haftvermittler signifikant unterschiedliche Werte zu allen anderen Proben ermittelt werden konnten, außer zu Syntac Sprint.

Scotchbond 1 und Prime & Bond bilden laut der ausgewerteten Ergebnisse das Mittelmaß. Bei Scotchbond 1 lagen die Mittelwerte zwischen 1,17 und 2,5, bei Prime & Bond zwischen 2,17 und 3.

Es wurden signifikant unterschiedliche Werte zu Syntac Sprint, Syntac Single Component, zu Optibond Solo, zum Gemisch und zur Zellkontrolle ermittelt. Am wenigsten schädlich für die Fibroblasten, bei allen Dentinscheibendicken außer bei den Messungen bei 500 µm, war Optibond Solo. Es wurden Mittelwerte zwischen 0,33 und 1,33 und signifikant unterschiedliche Werte vor allem zu Syntac Sprint ermittelt.

#### 4.3.1.1. Ranking der Materialien laut statistischer Auswertung (in Reihenfolge mit zunehmender Zytotoxizität)

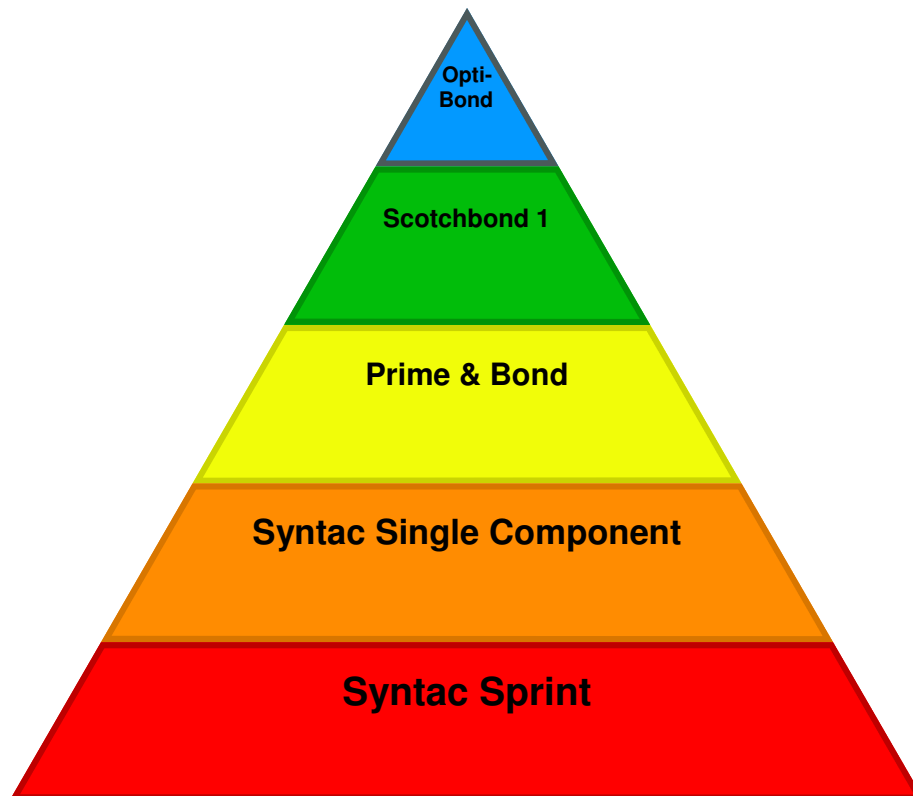


Abbildung 30: Ranking der Materialien laut statistischer Auswertung

### 4.3.2. Gemisch

Im vierten Versuch wurde getestet inwiefern die verwendeten Ätzmittel eine Auswirkung auf die Toxizität hatten. Hierzu wurde Conditioner 36 ( siehe Doktorarbeit N. Jahr) und das in dieser Studie verwendete Gemisch aus Flusssäure und Phosphorsäure direkt verglichen. Dentinscheiben der Dicke 300  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  wurden in der Kontrollgruppe A mit dem herkömmlichen Conditioner 36 und in der Kontrollgruppe B mit dem Gemisch aus 36%iger Phosphor- und 9,5%iger Flusssäure angeätzt und nachfolgend mit den Haftvermittlern laut Anwendungsvorschrift benetzt. Daneben wurden als zusätzliche Kontrollgruppe bei jeweils zwei Petrischalen 5  $\mu\text{l}$  des Ätzmittels direkt auf die Agaroberfläche aufgetropft.

Für das Gemisch ergab sich bei keiner der untersuchten Dentinscheibendicken eine Toxizität. Bei allen Proben konnte keinerlei Entfärbung unter oder um die Probe herum festgestellt werden. Dies entsprach einem Entfärbungsindex von 0. Die Werte für das Gemisch waren signifikant unterschiedlich zu allen Werten der Haftvermittler, lediglich zu den Werten der Zellkontrolle war das Gemisch nicht signifikant unterschiedlich. Dies lässt den Schluß zu, dass die Konditionierung des Dentins allein, ohne Verwendung eines Haftvermittlers, nicht schädlich für die Pulpazellen ist.

Im direkten Vergleich ließen sich folgende Ergebnisse ermitteln:

Versuchsnummer	DS-Dicke	Entfärbungsindex
2 A a	300 $\mu\text{m}$	2
2 A b	200 $\mu\text{m}$	3
2 A c	100 $\mu\text{m}$	3
2 B a	300 $\mu\text{m}$	2
2 B b	200 $\mu\text{m}$	2
2 B c	100 $\mu\text{m}$	2

3 A a	300 µm	1
3 A b	200 µm	0,5
3 A c	100 µm	>1
3 B a	300 µm	<0,5
3 B b	200 µm	<0,5
3 B c	100 µm	0,5
4 A a	300 µm	2
4 A b	200 µm	3
4 A c	100 µm	3
4 A a	300 µm	1,5
4 A b	200 µm	2
4 A c	100 µm	>2
5 A a	300 µm	3
5 A b	200 µm	4
5 A c	100 µm	4
5 B a	300 µm	3
5 B b	200 µm	3,5
5 B c	100 µm	3,5
6 A a	300 µm	4
6 A b	200 µm	4
6 A c	100 µm	4,5
6 B a	300 µm	4
6 B b	200 µm	4
6 B c	100 µm	4,5

Tabelle 18: Direkter Vergleich zwischen Conditioner 36 und Gemisch

- a) 5 µl Conditioner direkt auf Agar getropft: Entfärbeindex 4
- b) 5 µl Conditioner direkt auf Agar getropft: Entfärbeindex 4
- c) 5 µl Gemisch direkt auf Agar getropft: Entfärbeindex 3,5
- d) 5 µl Gemisch direkt auf Agar getropft: Entfärbeindex 3,5



Im direkten Vergleich wurde ausgetestet ob bei unterschiedlichen Conditionern, abhängig von der unterschiedlichen Ätzstärke und der damit verbundenen unterschiedlichen Diffusionstiefe der Haftvermittler, unterschiedliche Ergebnisse zu verzeichnen waren.

Bei Conditioner 36 waren die Zellen immer etwas stärker entfärbt als bei dem getesteten Gemisch, der Entfärbeindex war bei Conditioner immer geringfügig höher. Die direkte Applikation der Ätzmittel auf die Zellen ergab ebenfalls einen höheren Entfärbeindex für Conditioner 36 als für das Gemisch.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Dentinmasse von Conditioner 36 offenbar besser bzw. stärker angeätzt wird und dadurch die Haftvermittler tiefer in Richtung der Fibroblastenzellen diffundieren können, was letztendlich zu einer stärkeren toxischen Reaktion der Zellen führen kann. Das Gemisch verursachte schwächere Reaktionen, was auf das weniger aggressive Ätzverhalten zurückzuführen ist.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. DAS ZELLKULTURMODELL

Dentinadhäsive werden bei der Verarbeitung dentaler Kunststoffe verwendet um den Kontakt zwischen restaurativem Material und den präparierten Kavitätswänden herzustellen. Da sie hierbei in nahen und intensiven Kontakt mit vitalem Dentin kommen, ist ihr Einfluß auf das pulpare Gewebe von großem Interesse. Folglich sollten dentale Haftvermittler eine gute Biokompatibilität besitzen (**HUANG / CHANG 2002**).

Allgemein lässt sich feststellen, dass die Materialien und Methoden unterschiedlich intensive Gewebereaktionen hervorrufen können. So wird sich der Patient im Falle einer akuten Pulpitis der Symptome bewusst; es können jedoch auch ernste Pulpaschäden ohne klinisch beurteilbare Symptome entstehen und verbleiben. Demnach reichen klinische Symptome zur Beurteilung von Pulpaschäden keinesfalls aus (**LANGELAND 1965**), die Zellkultur ist ein zusätzliches Mittel der Wahl (**HEIDEMANN / LAMPERT 1980**). Die Toxizität eines dentalen Materials kann demnach in in-vitro-Tests, Tierversuchen oder klinischen Studien evaluiert werden (**SCHMALZ 1994**).

Biokompatibilität kann definiert werden als die Fähigkeit eines Materials nach Applikation die erwartete Funktion zu erfüllen, ohne dabei den Wirt zu reizen oder zu schädigen. Eine ungünstige Reaktion kann mit der Toxizität des Materials zusammenhängen, aber auch mit anderen Faktoren wie z. Bsp. Bakterienakkumulation am oder unter dem Material. Aus diesem Grunde sollte die Toxizität als einer von vielen Gründen für eine Unverträglichkeit eines Materials betrachtet werden (**SCHMALZ 1994**).

Aus denen im Tierexperiment beobachteten Reaktionen lassen sich keine direkten Schlussfolgerungen auf die Reaktionen beim Menschen ableiten. Bei Prüfverfahren an tierischen Zähnen fehlt die Übereinstimmung der Mengenverhältnisse zwischen Hart- und Weichgewebe. Prüfungen an menschlichen Zähnen haben den offenkundigen Vorteil, dass die beobachteten Reaktionen die direkte Antwort auf die Fragestellung geben können (**LANGELAND 1965**). Nachteilig ist dagegen, dass die Zähne nicht immer ohne weiteres verfügbar sind.

Seit 1948 entwickelte sich das Interesse an Zellkulturtests als potentiell Mittel zur Untersuchung von Biomaterialien (**SRIVASTAVA / GORHAM 1990**). Die bei in-vitro-Versuchen benutzten biologischen Systeme sind Organkulturen, kultivierte Zellen oder Zellorganellen. Am meisten verbreitet sind die Tests, bei welchen Zellkulturen benutzt werden (**SCHMALZ 1994**).

Auch **SPANGBERG 1978** und **NAKAMURA 1984** empfehlen Zellkulturtests als Mittel der Wahl zur Bestimmung der Toxizität dentaler Materialien. **NOVAK** und **PUZA 1977** hielten Zellkulturtests ebenfalls für am besten geeignet. Die Vorteile bei in-vitro-Versuchen sind kontrollierte Versuchsbedingungen, niedrige Kosten, schnelle Ergebnisse und keine ethischen Probleme (**SCHMALZ 1994**). Allerdings ist die Simulation der in-vivo-Situation immer eine Schwierigkeit und die Daten sind somit oft nicht gut auf Patienten übertragbar (**MJOR 1977**, **LANGELAND 1979**). Wenngleich sich in-vitro-Versuche besser standardisieren lassen (**BROWNE / TYAS 1979**), gibt es doch limitierende Faktoren wie z. Bsp. die im in vitro Versuch nicht vorhandene Mundhöhle (**SCHMALZ 1998**).

Der Kontakt zwischen Zellen und Material kann direkt, indirekt oder über Eluate, die anstelle des Materials selbst benutzt werden, hergestellt werden. Bei direktem Kontakt wachsen die Zellen auf oder neben dem Testmaterial. Bei indirektem Kontakt werden Material und Zellen durch eine Barriere getrennt (**SCHMALZ 1994**).

Dentin als Barriere zwischen Zellen und dem zu testenden Material wurde als erstes von **TYAS 1977** benutzt, später von **MERYON 1884**, **HUME 1988** und **HANKS 1989**. Diese Autoren benutzten alle aus Weisheitszähnen gewonnenes, in Scheiben geschnittenes, humanes Dentin oder hieraus gepresste Dentinchips.

In der Literatur finden sich Zellkulturtests mit unterschiedlichen, benutzten Zellarten. **SCHMALZ** fand **1994** heraus, dass das primäre Zellkultursystem tendenziell sensibler reagiert als permanente Zelllinien. Die am meisten benutzten Zelllinien sind: L-929-Mausfibroblasten, humane epitheliale Zellen, BHK-21 (C-13) Fibroblasten und humane Gingivafibroblasten (**SCHUSTER et al 2001**).

**AL-NAZHAN** und **SPANGBERG** fanden **1990** heraus, dass sich humane Gingivafibroblasten besser für Toxizitätsstudien eignen als Mausfibroblasten (L-929-Zellen), da die Golgi-Apparate der Gingivafibroblasten im Versuch viel öfter identifiziert werden konnten. Bei den L-929-Zellen waren diese Organellen bereits nach vier Stunden Materialeexposition fast vollständig zerstört (**KUNKEL 2001**).

Auch **HENSTEN-PETTERSON** und **HELGELAND** untersuchten **1991** humane Epithelzellen, Gingivaepithelzellen und Gingivafibroblasten im Bezug auf deren Sensitivität bei drei verschiedenen Kompositen und fanden heraus, dass die Gingivafibroblasten die empfindlichste Zellkultur zur Zytotoxizitätstestung waren (**KUNKEL 2001**). Unter Einbeziehung der Empfehlung von **HEIDEMANN** und **GEURTSSEN 1985** und in Anlehnung an **JAHR 2005** wurde auch in der vorliegenden Studie das Zellkulturmodell mit humanen Gingivafibroblasten als Mittel der Wahl zur Testung der Toxizität ausgewählter Dentinadhäsive eingesetzt. Mit primären Gingivafibroblasten (heterogene, nicht so häufig passagierte Zellen) sind auch Langzeitversuche zum Verhalten des Materials in der Kultur möglich (**HEIDEMANN / GEURTSSEN 1981**).

Die Beschreibung der Zellmorphologie (siehe 2.7.), Membraneffekte, Synthese zellulärer Makromoleküle, Zellaktivität und Proliferationsrate kann als Indikator für Zellschäden benutzt werden (**SCHMALZ 1998**).

Membraneffekte lassen sich am besten mit Neutralrot darstellen. In vitalen Zellen wird dies gespeichert und bei Membranschäden in das umliegende Medium abgegeben. Umgekehrt verhält es sich mit Trypanblau, das in tote Zellen aufgenommen wird, in vitale Zellen jedoch nicht. Zellaktivitätstests basieren auf der Bestimmung der Turn – Over – Rate, bei der die Aktivität einiger Enzyme, wie zum Beispiel der Succinat Dehydrogenase, gemessen wird. Die Aktivität von unspezifischen Hydrolasen kann man mit Fluorescin Diacetat nachweisen (**SCHMALZ 1994**). Die am längsten benutzte Methode um Zellschäden zu bestimmen ist die Messung der Proliferationsrate, da die direkte Zellzählung am einfachsten durchzuführen ist. Die Wahl der Untersuchungsmethode muss immer auf der gewünschten Information basieren.

In Anlehnung an **MERYON** und **BROOK 1989**, die bei ihrem Versuchsaufbau nicht nur die Zellzahl bestimmten, sondern auch die Veränderungen der Zellmorphologie untersuchten, wurden in der vorliegenden Studie, ähnlich der Studie von **JAHR 2005**, zytopathologische Zellveränderungen (wie in 2.7. beschrieben) als Parameter für die Einstufung der Toxizität herangezogen.

Analog zu den in der Europäischen Norm EN ISO 7405:1997 beschriebenen Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe, wurde der Entfärbeindex als Beurteilungskriterium für die Toxizität gewählt. Da der Vitalfarbstoff Neutralrot von geschädigten Zellen abgegeben wird, stand die Entfärbung in unmittelbarem Zusammenhang mit der von dem applizierten Material ausgehenden Toxizität und konnte als Kriterium zur Beurteilung herangezogen werden.

Es gibt eine große Anzahl von Testmethoden, die manchmal auch verschiedene Ergebnisse für das gleiche Material zulassen. Dies verlangt nach standardisierten Testmethoden mit dem Ziel Reproduzierbarkeit hervorzurufen. Wie in 2.5.

beschrieben existieren verschieden nationale und internationale Standards für biologische Tests (**SCHMALZ 1994**).

Zellkulturtests, die zur Toxizitätsbestimmung dentaler Materialien benutzt werden, sind ein gutes Mittel um das biologische Verhalten dieser zu untersuchen, wenn die Einschränkungen, die sie beinhalten, mit in die Überlegungen, besonders aber in die Interpretation der Resultate, einbezogen werden.

## **5.2. ZYTOTOXIZITÄT IN ABHÄNGIGKEIT ZUR DICKE UND KONDITIONIERUNG DER PRÜFKÖRPER**

Alle Stoffe, die sich aus einem Material herauslösen, können unter Umständen biologische Reaktionen hervorrufen. Laut den Autoren entsteht eine Gewebereaktion aufgrund der Konzentration, der Verweildauer der Materialien und dem Gewebe selbst ( **SCHUSTER et al 1996** ).

**TANRIVERDI et al 1993** sehen das Dentin als anatomische und physiologische Verlängerung der Pulpa. Materialien, die auf Dentin appliziert werden, sollten aus diesem Grund biokompatibel sein und die biologische Integrität der dentalen Gewebe nicht irritieren.

In der vorliegenden Studie wurde die Zytotoxizität fünf verschiedener Dentinadhäsive in Kombination mit einer Präkonditionierung mittels eines Gemisches aus Phosphor- und Flusssäure ermittelt. In in-vitro-Versuchen an Gingivafibroblasten mit Hilfe des Agar-Diffusionstests wurde die Wirkung von Prime & Bond, Optibond Solo, Scotchbond, Syntac Single Component und Syntac Sprint getestet und anschließend statistisch ausgewertet.

Wie schon in 3.3.5. beschrieben wurden zunächst Zellen gezüchtet und dann mit Agar bedeckt. Dentinscheiben der Dicke 500 µm, 400 µm, 300 µm, 200 µm und 100 µm werden mittels Phosphor- und Flusssäuregemisch konditioniert und die

Dentinadhäsive nach Verarbeitungsvorschrift aufgebracht. Die so vorbehandelten Scheiben werden dann mit der mit Haftvermittler benetzten Seite nach oben auf den Agar aufgelegt.

In einer Studie von **JAHN 2005** wurde die gleiche Methodik angewendet. Zur Konditionierung der Dentinscheiben wurde hier allerdings reine Phosphorsäure benutzt. Neben den oben schon angeführten Dentinadhäsiven untersuchte Jahn zusätzlich noch Etch & Prime, welches ausschließlich mit Phosphorsäure zu verarbeiten war und deshalb in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde.

Die Zytotoxizität eines Haftvermittlers wird beeinflusst durch die Dicke der Dentinschicht, die als natürliche Barriere zwischen aufgebrachtem Stoff und Pulpazellen verbleiben sollte. Schon **SCHMALZ und SCHWEIKL 1994** testeten aus inwiefern die Toxizität eines Stoffes mit der Dicke der zwischen Stoff und Pulpa verbleibenden Dentinschicht zusammenhängt. Hierzu verwendeten sie als toxischen Stoff eine Phenollösung, die auf Dentinschichten verschiedener Dicke aufgebracht und auf eine Mausfibroblastenkultur aufgelegt wurde. Die Autoren versuchten auf diese Art und Weise die in-vivo-Situation möglichst genau zu simulieren. Sie fanden heraus, dass der zytotoxische Effekt der variierenden Phenolkonzentrationen eine Funktion der intermittierenden Dentinscheibe ist. Bei einer Dentinscheibendicke von 500  $\mu\text{m}$  zeigten sich unabhängig von der Phenolkonzentration jeweils nur leicht toxische Reaktionen. Bei einer Dentinscheibendicke von 100  $\mu\text{m}$  hingegen war sogar die niedrigste Phenolkonzentration sehr stark toxisch. Den stärksten schützenden Effekt für die Zellen entdeckte man bei 700  $\mu\text{m}$  dicken Scheiben.

In den Vorversuchen der vorliegenden Studie wurde ausgetestet, welche Reaktionen ein direkter Kontakt der Testmaterialien mit den Gingivafibroblasten hervorrufen könnte. Die Haftvermittler wurden nach Vorschrift auf sterilen Deckgläschen angesetzt und nachfolgend mit dem Material nach unten auf die gezüchteten Zellen aufgelegt. Die Fibroblasten unter den Deckgläschen wurden bei allen Materialien, bis auf vereinzelte Zellen, alle entfärbt. Aber auch die noch nicht ganz abgestorbenen Zellen wiesen schon enorme Schäden auf und zeigten

Abkugelungen, Retraktionen und Stadien der Potocytose. Hieraus lässt sich schließen, dass ein direkter Kontakt von Haftvermittler und Pulpa zum Zelltod der Pulpazellen führt und der Zahn somit irreversibel geschädigt wird.

Dies konnte in der Studie von **JÄHR 2005** in den Vorversuchen bestätigt werden. Auch hier waren nur toxische Reaktionen der Zellen auf den direkten Kontakt mit den Dentinadhäsiven erkennbar. Um die Situation im Mund möglichst genau zu simulieren wurde die natürliche Barriere Dentin in dieser Studie mit einbezogen und ausgetestet inwieweit die Dicke der verbleibenden Dentinschicht zwischen Pulpa und Haftvermittler die Toxizität der Dentinadhäsive beeinflusst.

Laut **MERYON / BROOK 1989** ist der Nachteil eines solchen Versuchsaufbaus die Unfähigkeit des Systems den in-vivo vorhandenen Fluss des Dentinfluids nachzuahmen, was bedeutet, dass die komplexen zellulären Antworten auf äußere Reize, zu denen die Pulpa zweifelsohne fähig ist, nicht komplett reproduzierbar sind.

Tatsächlich konnten in der vorliegenden Studie innerhalb der einzelnen Versuche unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Zytogenität festgestellt werden. Tendenziell verhielten sich die Materialien innerhalb ihrer spezifischen Gruppe gleich, bei allen Materialien konnte eine toxische Reaktion festgestellt werden.

Mit Ausnahme der Ergebnisse aus 4.2.2. und 4.2.5. war bei allen Versuchen Syntac Sprint das Adhäsiv, welches die stärksten Schädigungen an den Zellen hervorrief, gefolgt von Syntac Single Component, das nur geringfügig schwächere Reaktionen verursachte. Als mäßig toxisch ließ sich Prime & Bond einstufen, ebenso wie Scotchbond. Die wenigsten toxischen Reaktionen verursachte Optibond Solo. Es konnten hier Entfärbeindexe zwischen 0,5 und 2 ausgewertet werden, was darauf schließen lässt, dass die durch Optibond Solo hervorgerufenen Schäden reversibel und für die Zelle gerade so verkraftbar sind. Bei den Dentinscheibendicken 200  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  wichen die Ergebnisse etwas von den oben genannten ab. Bei der Testung mit der 500  $\mu\text{m}$  Dentinbarriere war Scotchbond am wenigsten schädlich, Scotchbond war bei 200  $\mu\text{m}$  stärker toxisch



als Prime & Bond. Diese Ausreißer könnten durch mögliche Haarrisse in den Dentinscheiben ausgelöst worden sein.

Es ist möglich, dass beim Vorbereiten des Versuchsaufbaus bzw. während der Vorbehandlung der Dentinscheiben Risse entstanden sind, die ein vermehrtes Durchdringen des Haftvermittlers durch die Scheibe zuließen. Ebenso wäre ein solches Ergebnis durch ein Penetrieren des Haftvermittlers über den Dentinscheibenrand hinaus erklärbar.

In der Studie von **JÄHR 2005** wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Ebenfalls schnitt Syntac Sprint hier bei allen Versuchen mit den schlechtesten Ergebnissen ab. Bis auf einen Ausreißer im 300 µm – Versuch erzielte Optibond Solo die besten Werte und war somit am wenigsten pathogen.

Eine Erklärung für ausreißende Werte innerhalb beider Studien kann auch die Zusammensetzung der verwendeten Dentinscheiben liefern. Laut **HELLWIG et al 1999** ergeben sich für das pulpennahe Dentin und das pulpenferne Dentin verschiedene Werte für Anzahl und Dichte der Dentinkanälchen. Der Durchmesser und das Volumen der Dentinkanälchen hängt auch vom Alter des untersuchten Zahnes ab. Pulpennah besteht ungefähr 80 % der Querschnittsfläche des Dentins aus den Lumina der Dentinkanälchen. Peripher beträgt dieser Wert nur etwa 4 %.

Absolute Zahlen zum Durchmesser, zur Dichte und Häufigkeit der Dentinkanälchen müssen allerdings immer kritisch betrachtet werden, da sie individuell sehr unterschiedlich sind und zudem sehr stark von den angewendeten Untersuchungsparametern abhängen. Es liegt also nahe, dass in Dentinschnitten aus pulpennahem Dentin das Penetrationsvermögen der Dentinadhäsive stärker war als in Schnitten aus pulpenfernem Dentin. Auch **SWIFT et al 1995** kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Dentinkanälchen koronales Dentin weniger permeabel ist als Dentin, welches nahe der Pulpa geschnitten wurde. In der Vorbereitung der Versuche bzw. beim Sägen der Schnitte wurde dies bei beiden Studien nicht berücksichtigt.

Doch nicht nur die Dicke der Dentinscheibe oder deren Querschnittsfläche, sondern auch die Art und Weise der Präkonditionierung dieser ist von mitentscheidender Wichtigkeit.

Dentinkonditionierer basieren auf schwachen bzw. sogar starken Säuren oder aber auf Chelatoren, deren Effekte nicht nur von der jeweiligen Konzentration abhängen, sondern auch von der Verweildauer auf dem Dentin ( **SANTINI 1998, SCHÄFER 1999** ). Laut **HALLER 1994** gilt jedoch eine direkte Schädigung der Pulpa durch die zur Vorbehandlung verwendeten Säuren heute als unwahrscheinlich. Einige Autoren empfehlen die Verwendung von Säuren mit möglichst niedriger Osmolarität, da es bei stark hypertonen Ätzgels zur Aspiration von Dentinliquor mit Verlagerung von Odontoblastenfortsätzen in die Tubuli kommen kann.

Neben der am meisten verwendeten 37%igen Phosphorsäure kann auch 5-16%iges EDTA, 10%ige Zitronensäure, 10%ige Maleinsäure, Oxalsäure oder 2,5%ige Salpetersäure verwendet werden. Die Anwendung der aufgeführten Säuren führt bei Zähnen mit vitaler Pulpa zu einer Erhöhung der Dentinpermeabilität. Einige Studien zeigen jedoch, dass mit schwächeren Säuren nur signifikant niedrigere Haftwerte bei der gleichen Applikationsdauer erreicht werden konnten (**SWIFT et al 1995, HALLER 1994** ).

In der Studie von **JAHR 2005** wurden die Dentinscheiben mit 36%iger Phosphorsäure angeätzt, vergleichsweise wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Ätzgemisch aus Phosphor- und Flusssäure benutzt. Bei gleicher Aufschichtung und Einwirkzeit der Ätzmittel ergaben sich bei beiden Studien folgende Unterschiede:

Der unter 3.3.5.4. beschriebene direkte Vergleich beider Konditionierungsmittel zeigte, dass das Ätzvermögen des von **JAHR** verwendeten Conditioners 36 signifikant stärker war. Nach Konditionierung des Dentins mit Conditioner 36

waren die Zellen immer etwas stärker entfärbt, dies zeigte sich in entsprechenden Differenzen zwischen den Entfärbeindices ( siehe 4.3.2. ).

Es liegt die Annahme nahe, dass bei stärkerer Ätzstärke und Konditionierung das Penetrationsvermögen und somit die Diffusionstiefe der Dentinadhäsive entsprechend ansteigt. In der vorliegenden Untersuchung und in der Studie von **JAHR 2005** konnte dies bestätigt werden. Wenn auch nur in ganz geringem Maße, mit Differenzen zwischen den Entfärbeindexen von  $< 0,5$ , wurden die gezüchteten Zellen in der Untersuchung von **JAHR 2005** immer etwas stärker entfärbt als in der vorliegenden Studie, was einer stärkeren Schädigung gleichzusetzen ist. Im Bezug auf das Ätzverhalten war das hier verwendete Konditionierungsgemisch als weniger aggressiv einzustufen.

Selbst der Vergleich der Konditionierer bei Applikation der Mittel direkt auf die Gingivafibroblasten ( siehe 4.3.2. ) zeigte das gleiche Ergebnis. Auch hier ließen sich für den Conditioner 36 signifikant größere Entfärbeindexwerte ermitteln, was die oben angeführte Aussage bestätigt. Die Tatsache, dass bei Applikation beider Ätzmittel nahezu alle Zellen abstarben, zeigt, dass ein Kontakt des Konditionierers mit den Pulpazellen in-vivo vermieden werden sollte.

In 3.3.5.1., 3.3.5.2. und in 3.3.5.3. wurde zusätzlich zu den verschiedenen Dentinadhäsiven noch die Wirkung des Phosphor- / Flusssäuregemisches untersucht und statistisch ausgewertet. Die Dentinscheiben wurden konditioniert und auf die gezüchteten Zellen aufgelegt, lediglich das Auftragen eines Haftvermittlers wurde bewusst unterlassen. Bei keiner der Proben konnte unter den Dentinscheiben eine Entfärbung festgestellt werden, alle Zellen überlebten. Hieraus lässt sich ableiten, dass das Anätzen der Dentinbarriere vor der Pulpa allein nicht gefährlich für die Zellen sein kann. Dieselben Erkenntnisse lassen sich aus der Studie von **JAHR 2005** gewinnen. Bei gleichem Versuchsaufbau testete **JAHR** die Wirkung des Ätzmittels Conditioner 36 aus und kam zu dem gleichen Ergebnis wie in der vorliegenden Studie. Es konnten ausschließlich Entfärbeindexe von 0 ausgewertet werden, die Zellen unter den Dentinscheiben überlebten.

Die mittels Entfärbeindex gemessene Stärke der toxischen Reaktion war bei 4.2.2., 4.2.3., 4.2.4., 4.2.5. und 4.2.6. nahezu die gleiche, d.h. unabhängig von der Dentinscheibendicke ergaben sich immer für Syntac Sprint die schlechtesten und für Optibond Solo die besten Werte. Hieraus lässt sich schließen, dass weniger die Dicke der Dentinbarriere als das aggressive Diffusionsverhalten einiger Haftvermittler für das Absterben der Pulpazellen verantwortlich ist.

In einer Studie von **HANKS et al 1992** wurde die zytotoxische Konzentration zweier Haftvermittler ( Gluma und Scotchbond 2 ) und der darin enthaltenen Stoffe Glutaraldehyd ( GLUT ) und 2-Hydroxyethylmethacrylat ( 2-HEMA ) anhand von Monolayer-Kulturen mit BALB / 3T3 Zellen untersucht. Die Autoren stellten fest, dass die getesteten Stoffe Matrixenzyme der Fibroblastenmitochondrien veränderten, wenn sie in hoher Konzentration vorkamen. Sie schlussfolgerten, dass GLUT zwar toxischer sei als 2-HEMA, dass jedoch beide eine pathogene Wirkung auf die kultivierten Zellen hatten. Andere Studien wiederum zeigen, dass auch enthaltenes Bis-GMA oder das Comonomer TEGDMA eine wesentliche Rolle bei der zytotoxischen Wirkung auf die Zellen spielen ( **CAUGHMAN et al 1991, LEFEVRE 1994, ANTONUCCI 1983, GEURTSEN 1988, SPAHL 1991, RATANASATHIEN 1995** ).

Zwar lassen sich aus diesen Untersuchungen keine direkten Bezüge zu der vorliegenden Studie ziehen, jedoch ist hiernach durchaus von einer Schädigung der Zellen durch zu hohe Konzentrationen der in den Dentinadhäsiven enthaltenen Inhaltsstoffe auszugehen.

Die Adhäsive Syntac Sprint und Syntac Single Component, die bei **JAHR 2005** und in der vorliegenden Studie bei gleichen Versuchsbedingungen gleich schlecht abschnitten, ähneln sich sehr bezüglich ihrer Inhaltsstoffe ( siehe 3.1. ). Beide enthalten, im Unterschied zu allen anderen untersuchten Stoffen, Maleinsäure. Die anderen Adhäsive Prime & Bond und Optibond enthalten gar keine Säure,

Scotchbond 1 eine modifizierte Polyacrylsäure. Es ist anzunehmen, dass die Maleinsäure die Zellen in beiden Studien offensichtlich stärker gereizt hat.

Die werkstoffkundliche Zusammensetzung der Komposite, die heute als Basis für die auf dem Markt erhältlichen Dentinadhäsive gelten, wurden von mehreren Zytotoxizitätsstudien untersucht. Die Aussagen der einzelnen Autoren weichen teilweise stark voneinander ab. **MERYON 1989**, **NERONI 1990**, **RATHBURN 1991**, **RATANASATHIEN 1995** und **ARENHOLD-BINDSLEV 1994** beschrieben einige der untersuchten Dentinadhäsive ( wie zum Beispiel Gluma, Scotchbond 2, Dentin-Adhesit etc. ) und deren Komponenten als toxisch.

**RATANASATHIEN** untersuchte **1995** die Zytotoxizität von vier verschiedenen Dentinadhäsiv-Komponenten – HEMA, Bis-GMA, TEGDMA und UDMA – und ihre Effekte bei unterschiedlichen Kombinationen untereinander. Man nahm an, dass Interaktionen zwischen den Komponenten der Haftvermittler die Zytotoxizität der Materialien erhöhen könnte. Innerhalb der Studie konnte bestätigt werden, dass die Inhaltsstoffe der Adhäsive untereinander reagieren und die Zellen reizen können, der Mechanismus der Interaktionen konnte jedoch nicht erklärt werden. Laut **SCHMALZ et al 2002** sind die Komponenten TEGDMA oder HEMA sowohl allein, als auch in Kombination mit der Applikation eines Komposits fähig, durch das Dentin zu diffundieren und einen Pulpenschaden hervorzurufen. Er fand desweiteren heraus , dass Bis-GMA und UDMA stärkere Zellschädigungen verursachten wie die TEGDMA oder HEMA.

In der vorliegenden Untersuchung waren in den weniger toxischen Dentinadhäsiven Optibond Solo und Scotchbond 1 Bis-GMA und UDMA enthalten, jedoch waren trotzdem die Adhäsive Syntac Sprint und Syntac Single Component, die HEMA enthalten, stärker toxisch. Es liegt tatsächlich die Annahme nahe, dass die Kombination der Inhaltsstoffe deren toxische Wirkung bestimmt.

Es war jedoch nicht Gegenstand dieser Studie die reinen Inhaltsstoffe und deren unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten zu untersuchen, sodass keine

Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit die Veränderung dieser Parameter tatsächlich unterschiedliche Ergebnisse aufweisen kann.

### **5.3. ZYTOTOXIZITÄT IN ABHÄNGIGKEIT ZU INHALTSSTOFFEN UND EXPOSITIONSDAUER**

Es existieren eine große Anzahl von verschiedenen in-vitro-Testmethoden. Fast jede dieser Methoden basiert auf drei Komponenten: einem biologischen System, dem Zell- / Materialkontakt und dem korrespondierendem System. Neben den standardisierten Testmethoden, die in den DIN-Normen festgelegt sind, werden auch nicht standardisierte Methoden, die sehr spezielle wissenschaftliche Problematiken aufgreifen, angewendet.

Die in dieser Studie behandelte Frage nach der Toxizität der Haftvermittler lässt sich auf vielerlei Arten untersuchen.

So testete **SCHMALZ et al 2002** die Wirkung von All-Bond 2, Prime & Bond, Syntac Single Component, Syntac Classic und Prompt-L-Pop mittels eines in vitro-Dentinbarrieretests. Er benutzte eine modifizierte Zellkulturperfusionskammer aus Polykarbonat. Die Originalmembran, die normalerweise als Substrat für das Zellwachstum dienen sollte, wurde ausgetauscht gegen eine von einem speziellen Halter gehaltene Dentinscheibe. Somit wurde die Zellkulturkammer durch die Dentinscheibe in zwei Abteile geteilt. Die ca. 500 µm dicken Dentinscheiben, gewonnen aus bovinen Schneidezähnen, wurden auf einer Seite angeätzt und dann autoklaviert. Die aus bovinen Pulpazellen gezüchtete Zellkultur wurde in Kontakt mit der „pulpalen“ Seite der Dentinscheibe gebracht. Nach 24-stündiger Perfusion der Kammern mit Kulturmedium wurden die Haftvermittler auf der geätzten „Kavitätenseite“ der Dentinscheibe aufgebracht und dann 24 Stunden inkubiert. Die Toxizität wurde mittels Messung der Enzymaktivität (MTT-Untersuchung) ermittelt. Hierzu wurde durch Benutzung von Dimethylsulfoxid aus den Zellmitochondrien blaues Formazanprecipitat extrahiert und dieses bei einer Wellenlänge von 540 nm spectrophotometrisch untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass Haftvermittler mit niedrigem pH-Wert keinen Effekt auf die Zellen hatten. Das Material mit dem niedrigsten pH, Prompt-L-Pop, erhöhte die Zellaktivität sogar.

Ähnlich der Ergebnisse in der vorliegenden Studie reduzierte Syntac Classic hingegen statistisch signifikant die Lebensfähigkeit der getesteten Zellen auf 73,4%. **SCHMALZ** führte die zytotoxische Reaktion der Zellen durch Syntac Classic auf das enthaltene Glutaraldehyd bzw. auf das TEGDMA zurück.

In einer anderen Studie von **KOLINIOTOU-KOUBIA et al 2001** untersuchte man lichtpolymerisierte und nichtlichtpolymerisierte Dentinadhäsive im Vergleich. Man brachte jeweils 3, 5 und 10 µl Syntac, Solobond, Bond 1, Scotchbond 1 und Heliobond auf eine Petrischale auf, bestrahlte sie mit Licht und bedeckte sie dann mit einer Zellsuspension aus L-929 Zellen in einer Konzentration von 40000 Zellen/ml. In einer zweiten Untersuchungsgruppe wurden die Adhäsive nicht lichtgehärtet, aber ebenso mit Zellsuspension bedeckt. Als Kontrollen dienten Zellsuspensionen mit Petrischalen ohne Dentinadhäsive. Nach einer Inkubationszeit von 24 und 72 Stunden wurden die Zellen mit einer Lösung aus Trypsin und EDTA gelöst, mit Trypanblau angefärbt und überlebende Zellen mit einem Neubauer Hämocytometer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurde der Prozentsatz der überlebenden Zellen ermittelt und statistisch ausgewertet. Heliobond, Syntac und Bond 1 zeigten relativ niedrige Toxizitäten, während bei Solobond und Scotchbond 1 starke Toxizitäten beobachtet werden konnten. Die Dauer der Exposition hatte einen starken Effekt auf die Zellreaktionen. So resultierte aus einer längeren Expositionsdauer ein höheres Vorkommen negativer Reaktionen. Das Lichthärten der Haftvermittler polymerisiert die enthaltenen Bestandteile und reduziert die Anteile der freien Monomere und Substanzen, die als Noxen wirken könnten. Sind diese Adhäsive nicht vollständig polymerisiert, so ist es sogar nach 100 Tagen noch möglich, dass TEGDMA oder HEMA in den Pulpazellen aufzufinden sind (**GERZINA & HUME 1994**). Hieraus lässt sich ableiten, dass die stärkere oder schwächere

Toxizität eines Haftvermittlers unter anderem auf die prozentuale Gewichtung der Inhaltsstoffe zurückzuführen ist.

Sowohl Scotchbond als auch Syntac enthalten HEMA in nicht geringer Menge. Wie auch in der vorliegenden Studie bestätigt, ist es also möglich, dass die toxischen Reaktionen durch diesen Inhaltsstoff hervorgerufen wurde.

**HUANG & CHANG 2002** nutzten eine einfache kolorimetrische Untersuchungsmethode, entwickelt von **MOSMANN 1982**, zur Messung der Zytotoxizität. Zur Untersuchung von Clearfil SE Bond , Heliobond, Prime & Bond NT, Single Bond, Scotchbond und Syntac Single Component, wurde jedes der Materialien auf einen Zellulosestreifen aufgebracht, polymerisiert und in Polyethylenflaschen eingebracht. Jede der Proben wurde zweimal verdünnt und extrahiert und die Eluate für die Studie benutzt. Humane Pulpazellen wurden in frisches Medium gegeben und gezüchtet. Die Zellen wurden für 20 Stunden mit jeweils 200 µl Haftvermittler- eluat behandelt, danach wurden jeweils 50 µl 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zugegeben und dann für vier Stunden inkubiert. Die optische Dichte wurde bestimmt durch Trennung der Färbung mit Dimethylsulfoxid und die spektrophotometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Scotchbond verursachte stärkere toxische Reaktionen als die anderen Materialien. Da auch in dieser Studie alle Materialien zytotoxische Effekte hatten gehen Huang und Chang davon aus, dass bestimmte Substanzen, die aus den Haftvermittlern freigesetzt wurden, die Reaktionen auslösten. Schließlich verursachen laut **GEURTSEN et al 1998** Inhaltsstoffe der Adhäsive, wie zum Beispiel Bis-GMA, TEGDMA oder UDMA genau diese Effekte.

Die Bestimmung der Zellantwort durch Kontrolle der Succinyl-Dehydrogenase-Aktivität machten sich **BOUILLAGET et al 1998** zu nutze. Da die Permeabilität des Dentins ein Faktor ist, der ein Kriterium ist, welches die Diffusionskraft der Adhäsive und somit auch entscheidend das Auftreten von Pulpaschäden beeinflusst, teilte Bouillaget die verwendeten menschlichen Dentinscheiben in Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Durchlässigkeit ein.



Nach Vorbehandlung der Dentinscheiben durch Anätzen mit Zitronensäure, Lagerung in Ethanol zur Bakterieninhibition und Rehydrierung durch Gentamycin-Lösung wurde mit der Methode von **PASHLEY et al 1987**, bei der Mikroliter Wasserfluss pro Minute ins Verhältnis gesetzt werden zu Quadratcentimeter Wasserdruck, die Einteilung vorgenommen. Nach Applikation der Adhäsivsysteme Aelitebond, Optibond, Prisma Universalbond und Scotchbond Multipurpose auf das Dentin, wurde es in einen Polystyren-Zylinder gegeben und dieser auf eine Kulturplatte aufgeklebt, so dass ein Kontakt des Dentins zum Kulturmedium möglich war. Das Medium wurde eine Woche lang täglich gewechselt, die eluierten Fraktionen wurden auf kultivierte humane Fibroblasten gegeben und nachfolgend die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität mittels Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Resultate der Versuche zeigten, dass die Komponenten der vier Haftvermittler eine Suppression des Zellmetabolismus bewirkten. **BOUILLAGET** fand heraus, dass Dentinscheiben mit hoher Permeabilität mehr Diffusion der Adhäsivkomponenten erlaubten, dass aber der toxische Effekt abhängig vom Material war. Daneben war auch das Zeitintervall zwischen der Applikation des Adhäsivs und der Sammlung des Eluats von Interesse. Die Materialien waren bei kurzen Intervallen am stärksten zytotoxisch. Bei Intervallen bis zu 120 Stunden war die Schädigung weniger stark. Auch die Dauer der Eluatherstellung hatte einen bemerkenswerten Effekt auf die Zytotoxizität. Die nach kurzer Zeit entnommenen Eluate waren generalisiert toxischer als die später entnommenen. Scotchbond zeigte wesentlich stärkere Succinatdehydrogenase-Suppression als die anderen Haftvermittler.

In einer anderen Studie von **DEMARCO et al 2001** wurde die Biokompatibilität von Scotchbond und Clearfil Liner Bond in in-vivo und in-vitro-Tests untersucht. Für den in-vivo-Test wurden 20 zur Extraktion bestimmte Molaren präpariert und die Pulpa partiell eröffnet. In 16 Zähnen wurde eine Adhäsiv-Überkappung der

Pulpa vorgenommen und die Kavität mit Kunststoff verschlossen. In den restlichen 4 Zähnen wurden Pulpenüberkappungen mit  $\text{Ca(OH)}_2$  durchgeführt und die Kavitäten mit Zinkoxid-Eugenol-Zement verschlossen.

Im in-vitro-Test wurden die Materialien auf mit NIH-3T3-Zellen kultivierten Petrischalen aufgebracht und die Wachstumskurven ausgewertet.

Bei allen mit  $\text{Ca(OH)}_2$  behandelten Zähnen zeigten sich in der histologischen Auswertung Dentinbrückenbildungen ohne jegliche Reizantwort. Bei Clearfil Liner Bond konnten leichte Reizungen beobachtet werden. Die mit Scotchbond behandelten Pulpen zeigten leichte bis sehr starke Reizungen, es konnten keine mineralisierten Bereiche beobachtet werden. Im in-vitro-Versuch war die Zytotoxizität beider Adhäsive gleich, beide lösten statistisch höhere zytotoxische Effekte aus. Laut Demarco steht die fehlende Bildung von Dentinbrücken bei Scotchbond in Abhängigkeit zur Zytotoxizität der Komponenten wie HEMA, bis-GMA und TEGDMA. Diese Substanzen können nachweislich die Proteinbiosynthese, die Synthese von DNA und die zelluläre Respirationskapazität reduzieren. Man nimmt an, dass das Vorhandensein von großen Anteilen von HEMA in Scotchbond die Differenzierung von mesenchymalen Zellen der Odontoblasten verhindert.

Auch **SCHALLER et al 1985** untersuchten, neben verschiedenen Kavitätenlacken und Schmelzadhäsiven, die Dentinadhäsive Clearfil Bond, Dentin Adhesit, Durafill-Dentin-Adhäsiv und Scotchbond. Die Materialien wurden auf Objektträger aufgestrichen, auspolymerisiert, in Leighton-Tubes eingelegt und mit Zellsuspension aus Mausfibroblasten überflutet. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit Hämatoxilin-Eosin angefärbt. Die ausgezählte Zellzahl wurde ins Verhältnis zur Zellzahl der materialfreien Kontrollgruppen gesetzt und somit die relative Zellzahl (RZZ) in Prozent ermittelt. Mit einer RZZ von 96% war Dentin Adhesit am verträglichsten. Während bei Scotchbond auf dem Material selbst keine lebenden Zellen gefunden werden konnten, zeigte eine RZZ von 38% auf der freien Seite eine abgeschwächte zytotoxische Fernwirkung an. Von Scotchbond liegen bereits

histologische Untersuchungsergebnisse vor. **INOKOSHI et al 1982** sowie **VAN LEEUWEN et al 1982** berichten über leichte Pulpreaktionen bei Anwendung dieser Materialien. **MATSUMURA et al 1979** beobachten bei nur bei sehr dünnen Dentindecken deutliche Pulpreaktionen.

In einer Studie von **BRAUNER et al 1988** wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau benutzt. Die Dentinkleber Gluma Dentin Bond, Dentin-Adhesive, Dentin-Adhesit und Scotchbond wurden in einer Versuchsreihe direkt auf Objektträger appliziert und nachfolgend mit humanen Gingivafibroblasten bezüchtet. In einer weiteren Versuchsreihe wurden nach Applikation der Testmaterialien durch Dekantieren des Mediums Extrakte hergestellt und diese unter Anwesenheit von Thymidin<sup>3</sup>H Gingivafibroblasten zugegeben. Jeweils fünf Kulturen dienten der Ermittlung der Protein- und DNS-Syntheseleistung und weitere fünf Kulturen wurden zur morphologischen Bewertung und zur Erfassung der Einzelzell-Synthese verwendet. Bis auf Dentin-Adhesit hemmten alle Adhäsive bei der direkten Applikation die DNS-Synthese ebenso wie die Proteinbiosynthese zu nahezu 100%. Bei der indirekten Applikation wurden konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen der Dentinkleber auf das Zellwachstum festgestellt. Die Autoren führten die Ergebnisse auf die Zusammensetzung der Produkte zurück. Scotchbond beinhaltet als Monomer Bis-GMA und als Zusatz ein flüchtiges Monomer, das die Viskosität senken soll. Aufgrund der Ergebnisse empfehlen Brauner et al die Vermeidung direkten Kontaktes zwischen Pulpa und Adhäsiv.

Nicht nur die Zytotoxizität sondern auch die Mutagenität der heutzutage verwendeten Dentinadhäsive ist von großem Interesse. So untersuchten **SCHWEIKL und SCHMALZ 1994** die Mutagenität von Prisma Universal Bond, Pertac Universal Bond und Syntac und deren Inhaltsstoffe 2-Hydroxymethylmethacrylat (HEMA) und Methymethacrylat (MMA) unter Benutzung des Ames-Tests. Jeweils 100 Milligram jedes Materials wurden in je 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) oder in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Glutaraldehyd wurde in Wasser aufgelöst.

In dreifacher Ausführung wurden je 100 µl jedes Eluates auf mit *Salmonella typhimurium* bewachsene Platten aufgebracht und die Mutagenität bestimmt.

Es zeigte sich, dass die DMSO- und die physiologischen Kochsalz-Eluate von Prisma Universal Bond und Pertac Universal Bond keinerlei Mutagenität gegenüber den Zellen hatten. Ebenso hatten die DMSO- und die Kochsalz-Eluate von HEMA, MMA und Syntac Primer keinerlei mutagene Wirkung.

Im Gegensatz hierzu wirkte aber das Syntac-Adhäsiv in DMSO bzw. auch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst mutagen auf *Salmonella typhimurium*. Resultierend aus diesen Ergebnissen untersuchten **SCHWEIKL** und **SCHMALZ** zusätzlich noch Glutaraldehyd, welches laut Hersteller zu 5 % in Syntac-Adhäsiv enthalten ist, als Reinsubstanz und entdeckten eine Mutagenität in dosisabhängiger Stärke. In der Literatur finden sich ähnliche Ergebnisse zur Toxizität von Glutaraldehyd.

So bewiesen auch **LEVIN et al 1982**, **MARNETT et al 1985** und **RUIZ-RUBIO et al 1985** mittels Ames-Test die genotoxische Aktivität von Glutaraldehyd bei *Salmonella* Zellen und **SAKEGAMI et al 1988** mittels Umu-Test die Mutation von Lymphozyten-Zellen durch Glutaraldehyd. Obwohl **HILL et al 1991** herausfanden, dass Glutaraldehyd enthaltende Bondingmittel Bakterien töten, die die Pulpa schädigen könnten, ist deren Biokompatibilität äußerst fraglich. So raten Schweickl und Schmalz zur Entwicklung eines Haftvermittlers der eben diese Komponente nicht enthält.

Die Ergebnisse aller dieser Versuche müssen mit Vorsicht und Zurückhaltung interpretiert werden. Der Toxizitätsgrad kann auf vielerlei Art sehr leicht bestimmt werden. Bei der Beurteilung der Dentinadhäsive muss allerdings berücksichtigt werden, dass ein nach den Versuchsergebnissen als zytologisch einstuftbares Material dennoch in klinischer Anwendung sehr erfolgreich sein kann, wenn es aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften einen dauerhaften Halt einer Restauration gewährleistet. Bei Nichterfüllung dieser Funktion kann auch ein nicht toxisches Dentinadhäsiv zur klinischen Anwendung unbrauchbar und wenig biokompatibel sein.

## 5.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT ÄHNLICHER STOFFE

Da das Interesse an der Verträglichkeit zahnärztlicher Materialien stetig wächst und mit immer größer werdender Wichtigkeit behaftet wird, ist es wichtig nicht nur die Toxizität verschiedener Haftvermittler zu testen sondern auch zahnärztliche Kunststoffe, Kompomere und Zemente zu untersuchen.

**SCHEDLE et al 1998** verglichen in ihrer Studie die zytotoxischen Effekte von sechs verschiedenen lichthärtenden Kompositen, einem Kompomer, einem Glass-Ionomer, zwei Glass-Ionomer-Zementen, zwei Zink-Phosphat-Zementen, einem Calcium-Hydroxid-Lack, einem Komposit-Zement und einem Carboxylat-Zement mit jeweils dem selben standardisierten Zell-Kultur-System. Die Proben wurden auf L-929 Fibroblasten aufgelegt und deren toxische Reaktion mittels Auszählung der danach noch lebenden Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit einem Flow-Zytometer, welches mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm bestückt wurde, ausgezählt und die Anzahl mit der Anzahl der Zellen aus den Kontrollgruppen verglichen.

Die getesteten Komposit-Materialien Charisma, Z-100, Heliomolar, Tetric, Degufill H, Herculite XRV waren ausnahmslos alle schädlich für die Zellen. Die chemisch härtenden Komposite verursachten stärkere toxische Reaktionen wie die lichthärtenden Komposite. Die Untersuchung des Komposits in Kombination mit dem passenden Adhäsivsystem zeigte noch stärkere toxische Reaktionen. So war zum Beispiel die Kombination Degufill H und Degufill Bond wesentlich schädlicher als Degufill H allein. Ähnliches ergab sich bei der Kombination

Herculite XRV/Optibond Light Cure und Herculite XRV/Optibond Dual Cure. Die beiden Adhäsive allein ergaben wiederum niedrigere Toxizitäten. Der Calcium-Hydroxid-Liner Dycal war überhaupt nicht zytotoxisch, während die Kombination mit dem zugehörigen Komposit Dyract zu allen Zeitpunkten toxische Reaktionen verursachte.

**SCHEDLE et al** fanden heraus, dass aus den untersuchten Kompositen Monomere freigesetzt wurden, da sie in Speichel und Formaldehyd oder Methacrylsäure instabil sind und sich sehr leicht aus den genannten Substanzen herauslösen. Die Analyse verschiedener Bis-GMA Proben zeigte, dass Bis-GMA die primär lösliche Komponente verschiedener Kunststoffe ist und dass das Entfernen von Bis-GMA zu einem Rückgang der Toxizität um 90 % führt. **HEIDEMANN und LAMPERT 1980** fanden heraus, dass keine Unterschiede zwischen der Toxizität unpolymerisierter und polymerisierter Kompositproben bestand. Die Ergebnisse von **SCHEDLE et al** hingegen demonstrierten, dass Kombinationen aus Kompositen mit ungehärteten Bondingsubstanzen mehr zytopathologische Reaktionen hervorriefen verglichen mit Kombinationen aus Kompositen mit gehärteten Bondings. **SCHEDLE et al** schlossen weiter, dass das Entstehen einer chronischen Toxizität durch das Benutzen von Bondingmaterialien eher unwahrscheinlich ist und dass die Vorteile des Verhinderns von Mikrolecks das potentielle Risiko von toxischen Reaktionen in-vitro bei weitem überschreiten. Diese Schlussfolgerungen stützen ebenso das Benutzen der Haftvermittler als Pulpaüberkappungsmittel (**COX und SUZUKI 1994**) oder zur Auskleidung der Kavität (**GORACCI et al 1995**).

**HANKS et al 1992** untersuchten in ihrer Studie die Haftvermittler Gluma und Scotchbond 2 sowie deren Inhaltsstoffe Glutaraldehyd (GLUT) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) mittels Betrachtung der Veränderungen der Zellen nach Diffusion der genannten Materialien durch 500 µm dicke Dentinscheiben. Benutzt wurden Monolayer-Kulturen aus BALB/c 3T3 Zellen in einer in-vitro-Pulpakammer. Diese Apparatur besteht aus einem Nylonzylinder, auf dessen Boden eine Dentinscheibe befestigt wird und der auf einer mit der

Zellkultur bewachsenen Petrischale aufgebracht wird. Die zu testenden Materialien wurden innerhalb des Zylinders auf das Dentin aufgetropft und die Reaktionen auf der „Zellseite“ der Dentinscheibe mittels Succinyldehydrogenaseaktivitätstestung (MTT) beurteilt.

GLUT inhibitierte sehr stark die DNA- und Proteinsynthese, es unterdrückte enorm die mitochondriale Enzymantwort und war schon in sehr geringen Dosen wie 0,04  $\mu\text{mol/Liter}$  sehr toxisch. Auch HEMA verursachte ansteigende inhibierende Effekte bei allen gemessenen metabolischen Parametern. Es erlaubte kein Auffinden von DNA-Synthese und verhinderte ebenso wie GLUT die Proteinsynthese und mitochondriale Aktivität. Insgesamt war GLUT als etwas toxischer als HEMA einzustufen. Frühere Studien von **HILL** und **BERRY 1991** hatten zum Ergebnis, dass GLUT-enthaltende Haftvermittler wünschenswert seien, das GLUT das Vermögen habe, Bakterien, denen die Pulpa ausgesetzt sein könnte, zu töten.

Warum also gibt es diese starken Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der in-vitro Studien und den Gebrauchsstudien?

Hanks et al sahen die Ursachen hierfür einerseits in Variablen, die im in-vitro-Versuch nicht zu kontrollieren waren und andererseits in den unterschiedlichen in-vivo-Konditionen. Beispiele für unkontrollierbare Variablen sind :

- ف die Zeit, die der Haftvermittler bis zur Trocknung oder Polymerisation auf dem Dentin verbleiben darf (dies entspricht der Diffusionszeit)
- ف das Einwirken von HEMA, poly-HEMA, Bis-GMA und TEGDMA auf unpolymerisierten Kunststoff und die Tiefe der Polymerisation von HEMA
- ف der Grad der Verstopfung der Dentintubuli durch polymerisierte Materialien
- ف der Effekt des feuchten Milieus bei der Polymersisation
- ف die Summe der Adsorptionen aller enthaltenen Bestandteile der Mittel an den Wänden der Dentintubuli
- ف die unterschiedlichen zeitlichen Rahmen für in-vitro Studien und Gebrauchsstudien

Die gleichen Materialien und einen nahezu gleichen Versuchsaufbau benutzten **MERYON** und **BROOK 1989** in ihrer Studie. Es wurden die Haftvermittler ICI Dental, Gluma und Scotchbond 2 und die durch sie ausgelösten Reaktionen von BHK-21 Fibroblasten bei Dentinscheibendicken zwischen 100 und 500 µm untersucht.

Bei einer Dentinscheibendicke von 100 µm waren alle drei Materialien sehr stark zytotoxisch, was sich in starken Alterationen in der Zellmorphologie und einer deutlichen Reduktion der Zellzahl zeigte. Bei der Dentinscheibendicke von 500 µm waren ebenfalls alle Materialien toxisch, allerdings nicht so stark wie bei 100 µm dicken Scheiben. Im direkten Vergleich war Gluma am stärksten und ICI Dental am schwächsten toxisch. Eine andere vorausgehende Studie, die die Wirkung der genannten Materialien auf Zellen, ohne das Zwischenschalten einer Dentinscheibe, untersuchte, demonstrierte in allen Fällen eine totale Zellyse. Dies unterstreicht die Annahme, dass Dentin schon in gewisser Weise die Pulpa schützt. Trotzdem scheint es jedoch nicht den Effekt mancher Materialien zu neutralisieren.

Aufgrund der in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse und durch eine Vielzahl unterstützender Literatur (**JAHR 2005, KUNKEL 2001, HEIDEMANN / LAMPERT 1980, HUANG / CHANG 2002, LANGELAND 1965, SCHMALZ 1994, SRIVASTAVA / GORHAM 1990, SPANGBERG 1978, NAKAMURA 1984, NOVAK / PUZA 1977, MJOR 1977, SCHUSTER et al 2001, AL-NAZHAN / SPANGBERG 1990, HEIDEMANN / GEURTSSEN 1985, MERYON / BROOK 1989, SCHMALZ / SCHWEIKL 1994, SWIFT et al 1995, SANTINI 1998, SCHÄFER 1999, HALLER 1994, HANKS et al 1992, KOLINIOTOU-KOUBIA et al 2001**), kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Zytotoxizität der untersuchten Dentinadhäsive in Abhängigkeit zu

1. der Dentinbarriere, d.h. der Dicke der zwischen Material und Zellen verbleibenden Dentinschicht
2. dem verwendeten Konditionierungsmittel und in Abhängigkeit dazu dem Penetrationsvermögen und der Diffusionstiefe der jeweiligen Haftvermittler



3. der Oberflächenbeschaffenheit, d.h. der Dichte der auf der Querschnittsfläche angeschnittenen Dentinkanälchen
  4. den Inhaltsstoffen / Komponenten der Dentinadhäsive
  5. dem Restmonomergehalt
- und deren Kombinationen steht.

ad 1.

Bei allen untersuchten Materialien, vor allem aber bei den Materialien Syntac Single Component und Syntac Sprint, wurde deutlich, dass dünnere, zwischen Haftvermittler und Zellen verbleibende, Dentinbarrieren stärkere Schädigungen an den Zellen nach sich ziehen. Dies zeigte sich an den stetig zunehmenden Entfärbeindexen bei abnehmenden Dentinscheibendicken.

ad 2.

Dentinkonditionierer basieren auf schwachen bzw. sogar starken Säuren oder aber auf Chelatoren, deren Effekte nicht nur von der jeweiligen Konzentration abhängig sind, sondern auch von der Verweildauer auf dem Dentin. Die Anwendung von Säuren führt bei Dentin zu Erhöhung der Dentinpermeabilität durch vermehrtes Anätzen und somit auch Eröffnen der Dentinkanälchen. Dies wiederum begünstigt das Penetrationsverhalten der Haftvermittler positiv, es kann somit mehr toxisches Material in Richtung Pulpazellen diffundieren.

ad 3.

Pulpennah besteht ungefähr 80 % der Querschnittsfläche des Dentins aus den Lumina der Dentinkanälchen, peripher beträgt dieser Wert nur etwa 4 %. Es liegt nahe, dass in Dentinschnitten aus pulpenahem Dentin das Penetrationsvermögen der Dentinadhäsive stärker war als in Schnitten aus pulpenfernem Dentin.

ad 4.

Da sich sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von **JAHR 2005** unabhängig zur Dentinscheibendicke für die mittels Entfärbeindex gemessene Stärke der toxischen Reaktion immer für Syntac Sprint die schlechtesten und für Optibond Solo die besten Werte feststellen ließen, kann davon ausgegangen werden, dass neben der Dentinscheibendicke auch das aggressive Diffusionsverhalten für die Zytotoxizität eine gravierende Rolle spielt, welches

fraglos auch mit den Inhaltsstoffen der Adhäsive zusammenhängt. In Studien von **HANKS et al 1992**, **RATANASATHIEN 1995**, **SCHMALZ et al 2002** wurden die Haftvermittlerkomponenten GLUT, 2-HEMA, Bis-GMA, TEGDMA und UDMA auf ihre Toxizität untersucht und alle der untersuchten Stoffe riefen Zellschäden hervor. Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination der jeweiligen Inhaltstoffe deren toxische Wirkung bestimmt.

ad 5.

Das Lichthärten der Haftvermittler polymerisiert die enthaltenen Bestandteile und reduziert die Anteile der freien Monomere und Substanzen, die als Noxen wirken könnten. Sind die Adhäsive nicht vollständig polymerisiert, so ist es sogar nach einer Dauer von mehr als 100 Tagen noch möglich die toxischen Stoffe in den Pulpazellen nachzuweisen.

Anlehnend an die vorliegende Studie können folgende Empfehlungen für die klinische Anwendung der getesteten Materialien abgegeben werden:

- ث Die Dentinadhäsive Syntac Single Component und Syntac Sprint können für die klinische Anwendung nicht empfohlen werden, da sie beide statistisch signifikant am schlechtesten abschnitten als alle anderen in der Studie getesteten Haftvermittler
- ث Am besten schnitt das Material Optibond Solo ab, die Adhäsive Scotchbond und Prime & Bond waren als mittelmäßig toxisch einzustufen ohne untereinander einen großen Unterschied aufzuweisen.
- ث Haftvermittler sollten niemals in direkten Kontakt mit Pulpazellen gebracht werden, da die Gefahr einer toxischen Reaktion zu hoch und tunlichst zu vermeiden ist.

Die Ergebnisse aus Zellkulturtests sollten allerdings immer mit Vorsicht und Zurückhaltung interpretiert werden. Der Toxizitätsgrad kann leicht bestimmt werden. Bei der Beurteilung der Dentinadhäsive muss aber berücksichtigt werden, dass ein nach den Testergebnissen als toxisch eingestuftes Material dennoch bei klinischer Anwendung erfolgreich sein kann, wenn es aufgrund seiner

physikalisch-chemischen Eigenschaften einen dauerhaften, mikroleakagefreien Randschluss der Restauration gewährleistet. Bei Nichterfüllung dieser Funktion kann unter Umständen auch ein als verträglich eingestuftes Dentinadhäsiv bei klinischer Anwendung wenig biokompatibel sein.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden fünf Dentinadhäsive (Prime & Bond, Optibond Solo, Scotchbond, Syntac Single Component und Syntac Sprint) sowie ein Gemisch aus Phosphor- und Flußsäure bezüglich ihrer Zytotoxizität anhand des Agar-Diffusionstests mit humanen Gingivafibroblasten untersucht.

In den Vorversuchen wurden die zu testenden Haftvermittler auf sterilen Deckgläsern angesetzt, den gezüchteten Zellen ausgesetzt und deren Reaktion mittels Mikroskop beurteilt. Mittels dieser Vorversuche sollte untersucht werden, inwieweit überhaupt eine Zytotoxizität unter den zu testenden Mitteln vorlag oder ob es auch Mittel gab, die gar nicht toxisch auf die Zellen wirkten.

In den ersten drei Hauptversuchen wurden die Dentinscheiben der Größe 500 µm, 400 µm, 300 µm, 200 µm und 100 µm zur Konditionierung mit dem Gemisch aus Phosphor- und Flußsäure vorbehandelt, mit dem jeweiligen Haftvermittler nach Vorschrift bedeckt und nachfolgend auf die gezüchteten Zellen aufgelegt. Der vierte Versuch diente dem direkten Vergleich zwischen dem in dieser Studie verwendeten Ätzmisch und dem in einer vergleichbaren Studie verwendeten Ätzmittel Conditioner 36.

In der vorliegenden Studie konnte eine Zytotoxizität aller untersuchten Dentinadhäsive und auch des untersuchten Gemischs aus Phosphor- und Flußsäure beobachtet werden. In der Gruppe der Dentinadhäsive schnitt das Material Optibond Solo am besten ab, gefolgt von Scotchbond, Prime & Bond und Syntac Single Component. Die stärkste Zytotoxizität wies das Material Syntac Sprint auf. Auch das Ätzmittelgemisch aus Phosphor- und Flußsäure war im Vergleich zu dem Testpartner Conditioner 36 gleich schädlich für die Gingivafibroblastenzellen.

In the presented study five dentin adhesives and a mixture of phosphoric-and hydrofluoric acid was tested concerning their cytotoxicity by agar diffusion test with human gingiva fibroblasts.

In the pre-tests the clinging media were mixed on sterile cover glasses, were exposed to the cultivated cells and their reaction was controlled with the help of a microscope. By the means of the pre-tests the cytotoxicity of those media should be proved and it should be shown if there were media that didn't have a toxic effect on the cells. In the first three main tests the dentin slices size 500  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  were treated with a mixture of phosphorus- and hydrofluoric acid to be prepared, were covered with the respective sticking material as directed and were put onto the cultured cells afterwards. The fourth test concerned the direct comparison of the in this study used corrosive agent and the one called Conditioner 36 of a comparable study.

The presented study showed a cytotoxicity of all tested dentin adhesives and also of the tested mixture of phosphoric- and hydrofluoric acid. Optibond Solo showed the best results, followed by Scotchbond, Prime & Bond and Syntac Single Component. The strongest kind of cytotoxicity was observed using Syntac Sprint. The corrosive mixture of phosphoric- and hydrofluoric acid caused the same damages for the gingiva fibroblasts in comparison with Conditioner 36.

## 7. ANHANG

### Versuchsprotokoll vom 1. Vorversuch

A	Cell Co (nur Agarlösung und Neutralrot)	Noch nicht sehr schöner dichter FR
B	Cell Co (dito)	wie A
1a	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)	Alle F entfärbt, teilweise auch AK (ebenfalls entfärbt)
1b	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)	wie 1a, EI 5
2a	10 µl Prime & Bond NT	Unter DG alle F entfärbt, um DG HZ mit entfärbten F, danach z.T. noch gefärbte Z, Retr., AK, Vak., Poto., tote F. EI 4
2b	10 µl Prime & Bond NT	wie 2a, EI 4
3a	10 µl Optibond Solo	Unter DG alle F abgestorben, Poto. kommt vor, um DG bis PR z.T. noch leicht gefärbte aber stark geschädigte F (AK, Retr.fäden, tote F) EI 4
3b	10 µl Optibond Solo	wie 3a
4a	10 µl Scotchbond 1	Unter DG u. Material alle F entfärbt, um DG ebenfalls, nur direct an PR noch vitale aber bereits stark abgerundete F vorhanden, EI 4-5
4b	10 µl Scotchbond 1	wie 4a, EI 4-5
5a	10 µl Syntac Single Component	Unter DG u. Mat. alle F abgestorben (wie fix.), restl. F weisen bis PR starke Schäden auf (Retr., Poto....) obwohl z.T. noch leichte Färbung vorliegt, EI 4-5
5b	10 µl Syntac Single Component	wie 5a
6a	10 µl Syntac Sprint	Unter DG alle F entfärbt, ÜZ bis PR mit leicht noch angefärbten aber abgekugelten F, EI 4-5
6b	10 µl Syntac Sprint	wie 6a
7a	10 µl Conditioner 36 werden direkt auf die Agarschicht pipettiert	Alle F abgestorben, ÜZ bis PR mit noch gefärbten, aber stark geschädigten F, EI 4-5
7b	10 µl Conditioner 36 (dito)	wie 7a

## Versuchsprotokoll vom 2. Vorversuch

A	Cell Co (nur Agarlösung und Neutralrot)	Schöner, nicht ganz dichter vitaler FR
B	Cell Co (dito)	wie A
1a	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)	Alle F entfärbt (z.T. wie angedaut, auch Poto., Pyknose, AK), 100% Zelltod, EI 5
1b	10 µl Etch & Prime (fertiges Gemisch)	wie 1b
2a	10 µl Prime & Bond NT	Unter DG alle F entfärbt, um DG HZ 1-2, danach bis PR stark geschädigte aber noch vitale F, EI 4-5
2b	10 µl Prime & Bond NT	wie 2a
3a	10 µl Optibond Solo	Unter DG weitestgehend alle F entfärbt (z.T. wie angedaut, am DG Rand stark geschädigte aber z.T. noch gefärbte F vorhanden, am DG ZU 1,0, AK u. tote F kommen vor, EI 4
3b	10 µl Optibond Solo	wie 3a, EI 4
4a	10 µl Scotchbond 1	Unter DG alle F entfärbt z.T. wie angedaut, etwas außerhalb F ebenfalls entfärbt aber vielfach AK mit Poto., nur am PR noch gefärbte aber stark geschädigte F vorhanden, EI 4-5
4b	10 µl Scotchbond 1	wie 4a, EI 4-5
5a	10 µl Syntac Single Component	Unter DG alle F abgestorben (wie fix. bis angedaut), restl. F ebenfalls entfärbt aber mehr abgerundet, nur am PR noch gefärbte aber stark geschädigte F vorhanden, EI 4-5
5b	10 µl Syntac Single Component	wie 5a, EI 4-5
6a	10 µl Syntac Sprint	Um und unter DG alle F entfärbt, zum PR hin noch stark geschädigt aber noch vitale F vorhanden, EI 4-5
6b	10 µl Syntac Sprint	wie 6a, EI 4-5
7a	10 µl Conditioner 36 werden direkt auf die Agarschicht pipettiert	Alle F entfärbt, danach ÜZ, restl. F weitgehend normal erscheinend, EI 3-4
7b	10 µl Conditioner 36 (dito)	wie 7a, EI 3-4

## Versuchsansatz: 1a

Nr.	DS in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärb- Index
A CellCo	0,5 x 0,6	500 µ	sehr schöner FR wie CC 0 + I	sehr schöner FR wie CC 0 + I	sehr schöner FR wie CC 0 + I	sehr schöner FR wie CC 0 + I	0
B CellCo	0,5 x 1,0	400 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0
2a Prime & Bond	0,7 x 1,0	500 µ	100 % Zelltod	Retr. bis AK,Vak,Zelltod	Retr. bis normaler FR	normaler FR	2,5
2b Prime & Bond	0,7 x 0,8	400 µ	100 % Zelltod	„	„	„	2,5
3a Optibond solo	0,5 x 0,6	500 µ	100 % Zelltod	80 % Zelltod,Retr.,AK	normaler FR	normaler FR	2
3b Optibond solo	0,8 x 0,9	400 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0
4a Scotchbond 1 *	0,5 x 0,6	500 µ	leichte Retr. aller FB,Vak.	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0,5
4b Scotchbond 1 *	0,6 x 0,6	400 µ	100 % Zelltod,AK	Zelltod,Retr.,normaler FR	„	„	2
5a Syntac sC	0,5 x 0,7	500 µ	100 % Zelltod **	Zelltod ,AK	Retr.,normaler FR	normaler FR	2,5
5b Syntac sC	0,6 x 1,1	400 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,AK	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	2,75
6a Syntac sprint	0,6 x 1,1	500 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.	normaler FR	3
6b Syntac sprint	0,6 x 1,0	400 µ	„	„	„	Retr.,Poto.,normaler FR	4
7a Gemisch	0,5 x 1,0	500 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0
7b Gemisch	0,6 x 0,9	400 µ	„	„	„	„	0

\* (4 a-e ) Material haftet nur *lose* auf DS

\*\* Zelltod,FB aber nicht ganz entfärbt



## Versuchsansatz: 1b

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbungs-Index
C CellCo	0,5 x 1,0	300 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0
D CellCo	0,7 x 0,8	200 µ	“	“	“	“	0
2c Prime & Bond	1,0 x 1,1	300 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK bis Retr.,Vak.,Poto	normaler Fr	normaler FR	2
2d Prime & Bond	0,8 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	“	“	“	2
3c Optibond solo	0,8 x 1,0	300 µ	wenige AK bis Retr.,normaler FR,Vak.	normaler FR	normaler FR	normaler FR	<0,5
3d Optibond solo	0,9 x 1,0	200 µ	Retr.,AK,Zelltod,auch vitale FB	„	„	„	1
4c Scotchbond 1	0,9 x 0,9	300 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	2,5
4d Scotchbond 1	0,7 x 1,1	200 µ	100 % Zelltod	“	“	“	2,5
5c Syntac sC	0,9 x 1,1	300 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.	Zelltod,AK,Retr.	Retr.,normaler FR	3
5d Syntac sC	0,8 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.,Poto.	„	„	3,5
6c Syntac sprint	1,0 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.	Retr.,normaler FR	4
6d Syntac sprint	1,0 x 1,2	200 µ	„	„	AK,Retr.	Retr.,AK,normaler FR	4
7c Gemisch	1,0 x 1,3	300 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0
7d Gemisch	0,9 x 1,1	200 µ	„	„	„	„	0

## Versuchsansatz: 1c

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbungs-Index
E CellCo	0,5 x 1,0	100 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0
2e Prime & Bond	0,5 x 0,8	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.,Zelltod	normaler FR	3
3e Optibond solo	0,8 x 1,1	100 µ	wenig Retr. + AK,größtenteils normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0,5
4e Scotchbond 1	1,0 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	80 % Zelltod,Retr.,AK	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	2,5
5e Syntac sC	0,6 x 1,1	100 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.	Zelltod,AK,Retr.	Retr.,normaler FR	3,5-4
6e Syntac sprint	0,5 x 1,1	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,AK	Retr.,AK,normaler FR	4
7e Gemisch	1,0 x 1,0	100 µ	wie CC A	wie CC A	wie CC A	wie CC A	0

## Versuchsansatz: 2a

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbungs-Index
A CellCo	0,7 x 0,7	500 µ	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	0
B CellCo	0,6 x 1,0	400 µ	„	„	„	„	0
2a Prime & Bond	0,5 x 0,5	500 µ	100 % Zelltod, FB z. T. noch gefärbt	Zelltod, Retr., AK	Retr., normaler FR	normaler FR	2,5
2b Prime & Bond	0,5 x 1,0	400 µ	„	Zelltod, Retr., AK	normaler FR	„	2,0
3a Optibond solo	0,5 x 1,1	500 µ	100 % Zelltod	50 % Zelltod, Retr., normaler FR	normaler FR	„	1,5
3b Optibond solo	0,5 x 1,0	400 µ	z. T. tote FB, Retr., normaler FR	normaler FR	„	„	0,5
4a Scotchbond 1 *	0,5 x 1,0	500 µ	100 % Zelltod	Zelltod, Retr., normaler FR	normaler FR	normaler FR	1,5
4b Scotchbond 1 *	0,6 x 0,9	400 µ	100 % Zelltod	„	„	„	1,5
5a Syntac sC**	0,5 x 0,8	500 µ	100 % Zelltod	Zelltod, Retr., AK	Retr., Poto.	normaler FR	3
5b Syntac sC	0,5 x 0,7	400 µ	100 % Zelltod	Retr., Ak	Retr., norm. FR	normaler Fr	2,5
6a Syntac sprint	0,6 x 0,9	500 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod, Retr.	Retr., normaler FR	3,5
6b Syntac sprint	0,6 x 1,0	400 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod, AK, Retr.	Retr., normaler FR	4
7a Gemisch	0,5 x 0,8	500 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler Fr	0
7b Gemisch	0,7 x 0,9	400 µ	„	„	„	„	0

\* (4a – 4e) Material haftet *nicht* fest auf DS

\*\* Zelltod, FB jedoch nicht ganz entfärbt

## Versuchsansatz: 2b

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbe- Index
C CellCo	0,6 x 0,9	300 µ	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	0
D CellCo	0,7 x 0,1	200 µ	„	„	„	„	0
2c Prime & Bond	0,8 x 1,1	300 µ	100 % Zelltod	Zelltod, Retr.,Poto., Zelltod s. Foto	Retr., normaler FR	normaler FR	2,5
2dPrime & Bond	0,9 x 0,7	200 µ	„	Zelltod, AK, Retr.	Retr., normaler FR	„	2,5
3c Optibond Solo	1,0 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	tote FB, Retr., normaler FR	normaler FR	normaler FR	1,5
3d Optibond Solo	1,0 x 1,0	200 µ	vitale FB am Retrahieren	normaler FR	normaler FR	„	0,5
4c Scotchbond 1 *	0,8 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	AK, Retr., normaler FR	„	„	1,5
4d Scotchbond 1	0,6 x 1,0	200 µ	„	Zelltod, AK, Retr.	normaler FR	normaler FR	2
5c Syntac SC	0,6 x 0,9	300 µ	„	AK, Retr., Zelltod	AK, Retr., Zelltod	normaler FR	3
5d Syntac SC	0,9 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,AK	AK, Retr.	normaler FR	3
6c Syntac Sprint	0,6 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod, AK, Retr.	Retr., normaler FR am PR	4
6d Syntac Sprint	0,5 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	„	„	„	4
7c Gemisch	1,0 x 1,0	300 µ	normaler FR	normaler FR	normaler Fr	normaler FR	0
7d Gemisch	0,9 x 1,1	200 µ	„	„	„	„	0

\* (4a- 4e) Material haftet *nicht* fest auf DS

## Versuchsansatz: 2c

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbe- Index
E CellCo	0,6 x 0,9	100 µ	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	FR wie CC I	0
2e Prime & Bond	1,0 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Retr., AK, tote FB	normaler FR	< 3l
3e Optibond Solo	1,0 x 1,0	100 µ	Retr., z. T. normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0,5
4e Scotchbond 1 *		100 µ	100 % Zelltod	Zelltod, Retr., Bubbles	Retr., normaler FR	normaler FR	2,5
5e Syntac SC	0,8 x 0,9	100 µ	100 % Zelltod	80 % Zelltod, AK	Zelltod, Retr., AK	AK, Bubbles, Poto., normaler FR	4
6e Syntac Sprint	0,7 x 1,1	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod, AK, Retr.	nur am PR normaler FR	4
7e Gemisch	0,7 x 1,0	100 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0

\* (4a – 4e) Material haftet *nicht* fest auf DS

## Versuchsansatz: 3a

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbungs-Index
A CellCo	0,5 x 0,9	500 µ	wie CC I	wie CC I	wie CC I	wie CC I	0
B CellCo	-	-	-	-	-	-	-
2a Prime & Bond	0,5 x 0,8	500 µ	100 % Schädigung, vital gefärbte FB noch vorhanden	geschädigte FB, Retr., AK, Bubbles	normaler FR	normaler FR	2
2b Prime & Bond	0,8 x 1,2	400 µ	„	„	„	„	2
3a Optibond Solo	0,8 x 0,9	500 µ	normaler FR, wenige FB retrahiert	normaler FR	„	„	< 0,5
3b Optibond Solo	0,5 x 0,7	400 µ	tote FB, Retr., normaler FR	„	„	„	0,5
4a Scotchbond 1	0,4 x 0,8	500 µ	100 % Zelltod	Retr., AK, normaler FR	normaler FR	normaler FR	1,5
4b Scotchbond 1	0,5 x 0,5	400 µ	100 % Zelltod	AK, Retr., Zelltod	Retr., normaler FR	normaler FR	1,5
5a Syntac SC	0,5 x 0,8	500 µ	100 % Zelltod	Retr., Zelltod, Bubbles	Retr., Bubbles	normaler FR	3
5b Syntac SC	0,6 x 0,8	400 µ	100 % Zelltod	Zelltod, AK	AK, Retr.	„	3
6a Syntac Sprint	0,5 x 0,5	500 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod, AK, Retr., Bubbles	normaler FR	3
6b Syntac Sprint	0,8 x 1,0	400 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	„	„	3
7a Gemisch	0,5 x 0,5	500 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0
7b Gemisch	0,5 x 0,6	400 µ	„	„	„	„	0

## Versuchsansatz: 3b

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbe-Index
C CellCo	0,6 x 1,1	300 µ	FR wie in CC I	FR wie in CC I	FR wie in CC I	FR wie in CC I	0
D CellCo	0,8 x 1,0	200 µ	“	“	“	“	0
2c Prime & Bond	0,7 x 1,3	300 µ	100 % Schädigung,Bubbles,z.T.vital gefärbt,z.. T. wie fixiert	100 % Schädigung	normaler FR	normaler FR	2
2d Prime & Bond	0,6 x 1,0	200 µ	„	„	„	„	2
3c Optibond Solo	0,8 x 1,1	300 µ	tote FB,Retr.,normaler FR	wenig tote FB,Retr.,normaler FR	normaler FR	normaler FR	1
3d Optibond Solo	1,0 x 1,0	200 µ	Retr.,tote FB,normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0,5
4c Scotchbond 1	1,0 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	50 % Zelltod,AK,Retr.	normaler FR	normaler FR	1,5
4d Scotchbond 1	1,0 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Retr.,normaler FR	normaler FR	2,5
5c Syntac SC	0,6 x 1,2	300 µ	100 % Zelltod	AK,Retr.,Zelltod	Zelltod,AK,Retr.	normaler FR	3
5d Syntac SC	1,0 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	„	„	Retr.,normaler FR	3,5
6c Syntac Sprint	1,0 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,Bubbles,Poto.	Retr.,tote FR am PR	4
6c Syntac Sprint	0,9 x 1,0	200 µ	„	„	„	„	4
7c Gemisch	0,8 x 1,4	300 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0
7d Gemisch	1,1 x 1,1	200 µ	„	„	„	„	0

## Versuchsansatz: 3c

Nr.	DS Größe in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	Entfärbungs-Index
E CellCo	0,6 x 1,1	100 µ	FR wie in CC I	FR wie in CC I	FR wie in CC I	FR wie in CC I	0
2e Prime & Bond	1,0 x 1,2	100 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,AK	Zelltod,Retr.,AK	normaler FR	3
3e Optibond Solo	0,8 x 1,0	100 µ	Retr.,Vak.,normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0,5
4e Scotchbond 1	1,0 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.,AK	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	2,5
5e Syntac SC	1,0 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	80 % Zelltod,AK	Zelltod,AK,Retr.	AK,Retr.,normaler FR	3,5
6e Syntac Sprint	1,0 x 1,1	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.,normaler FR um PR	4
7e Gemisch	0,9 x 1,0	100 µ	normaler FR	normaler FR	normaler FR	normaler FR	0



## Versuchsansatz: 4

Nr.	DS in cm	DS Dicke	FR unter DS	FR um DS bis 0,5 cm	bis 1,0 cm	größer 1,0 cm	EI
2 A a	0,8 x 1,1	300 µ	alle FB stark geschädigt,größtenteils entfärbt,Potocytose	starke Retr.,FB z. T. noch gefärbt	normaler FR	normaler FR	2
2 A b	0,7 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Retr.	Retr.,einzelne tote FB	normaler FR	3
2 A c	1,0 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	„	„	normaler FR	3
2 B a	0,8 x 1,0	300 µ	alle FB stark geschädigt,Zelltod	starke Retr.	normaler FR	normaler FR	2
2 B b	0,6 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	normaler FR	normaler FR	normaler FR	2
2 B c	1,0 x 1,1	100 µ	100 % Zelltod	starke Retr.	normaler FR	normaler FR	2
3 A a	0,9 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod,Retr.	normaler FR	normaler FR	normaler FR	1
3 A b	0,8 x 1,0	200 µ	Retr.,vitaler FR,tote FB	„	„	„	0,5
3 A c	0,6 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod,Retr.	„	„	„	>1,0
3 B a	0,7 x 1,0	300 µ	normaler FR,wenige tote FB	„	„	„	<0,5
3 B b	1,0 x 1,0	200 µ	nur wenige FB entfärbt,normaler FR	„	„	„	<0,5
3 B c	0,6 x 1,0	100 µ	nur wenige FB entfärbt,Vak.,norm.FR	„	„	„	0,5
4 A a	0,7 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	Entf.,Retr.,AK	normaler FR	normaler FR	2
4 A b	1,0 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Entf.,AK,Retr.	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	3
4 A c	1,0 x 1,2	100 µ	100 % Zelltod	„	Retr.,AK,tote FB,normaler FR	normaler FR	3
4 B a	0,8 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	Retr.,AK,normaler FR	normaler FR	normaler FR	1,5
4 B b	1,0 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	Zelltod,AK,Retr.,Entf.,normaler FR	Retr.,normaler FR	normaler FR	2
4 B c	0,8 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	Zelltod,Vak.,Retr.	Retr.,normaler FR	normaler FR	>2
5 A a	0,9 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	AK,Retr.,Vak.	AK,Retr.	normaler FR	3
5 A b	0,8 x 1,0	200 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.	AK,Retr.,normaler FR	4
5 A c	0,7 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.	AK,Retr.,normaler FR	4
5 B a	0,9 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	AK,Retr.	AK,Retr.	normaler FR	3
5 B b	0,5 x 0,9	200 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.	AK,Vak.,Retr.,normaler FR	3,5
5 B c	0,9 x 1,0	100 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod	AK,Retr.,Vak.	AK,Retr.,normaler FR	3,5
6 A a	0,9 x 0,9	300 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod,Bubbles	AK,Retr.,tote FB	AK,Retr.,normaler FR	4
6 A b	0,7 x 0,9	200 µ	„	„	„	AK,Retr.,Vak.,normalere FR	4
6 A c	0,9 x 0,8	100 µ	„	„	„	normaler FR nur am PR	4,5
6 B a	1,0 x 1,0	300 µ	100 % Zelltod	100 % Zelltod,Bubbles	AK,Retr.,tote FB	AK,Retr.,normaler FR	4
6 B b	1,0 x 1,0	200 µ	„	„	„	„	4
6 B c	0,9 x 1,1	100 µ	„	„	„	normaler FR nur am PR	4,5
a)	5 µl Conditioner direkt auf Agaroberfläche getropft (Präzipitat 3 cm Durchmesser)						4
b)	„ „ „ „ „ „						4
c)	5 µl Gemisch direkt auf Agaroberfläche getropft (Präzipitat 1 cm Durchmesser)						3,5
d)	„ „ „ „ „ „ (Präzipitat 1,5 cm Durchmesser)						3,5

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
A+B Cell Co	1	500 $\mu$	0
	2	500 $\mu$	0
	3	500 $\mu$	0
	1	400 $\mu$	0
	2	400 $\mu$	0
	3	400 $\mu$	0
	1	300 $\mu$	0
	2	300 $\mu$	0
	3	300 $\mu$	0
	1	200 $\mu$	0
	2	200 $\mu$	0
	3	200 $\mu$	0
	1	100 $\mu$	0
	2	100 $\mu$	0
	3	100 $\mu$	0

Bitte beachten: Die 500  $\mu$  bzw. 400  $\mu$  dicken DS waren z. T. nicht besonders schön (zum Teil sehr klein bzw. gebrochen)

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
2) Prime & Bond	1	500 $\mu$	2,5
	2	500 $\mu$	2,5
	3	500 $\mu$	2
	1	400 $\mu$	2,5
	2	400 $\mu$	2
	3	400 $\mu$	2
	1	300 $\mu$	2
	2	300 $\mu$	2,5
	3	300 $\mu$	2
	1	200 $\mu$	2
	2	200 $\mu$	2,5
	3	200 $\mu$	2
	1	100 $\mu$	3
	2	100 $\mu$	<3
	3	100 $\mu$	3

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
3) Optibond Solo	1	500 $\mu$	2
	2	500 $\mu$	1,5
	3	500 $\mu$	<0,5
	1	400 $\mu$	0
	2	400 $\mu$	0,5
	3	400 $\mu$	0,5
	1	300 $\mu$	<0,5
	2	300 $\mu$	1,5
	3	300 $\mu$	1
	1	200 $\mu$	1
	2	200 $\mu$	0,5
	3	200 $\mu$	0,5
	1	100 $\mu$	0,5
	2	100 $\mu$	0,5
	3	100 $\mu$	0,5

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
4) Scotchbond 1	1	500 $\mu$	0,5
	2	500 $\mu$	1,5
	3	500 $\mu$	1,5
	1	400 $\mu$	2
	2	400 $\mu$	1,5
	3	400 $\mu$	1,5
	1	300 $\mu$	2,5
	2	300 $\mu$	1,5
	3	300 $\mu$	1,5
	1	200 $\mu$	2,5
	2	200 $\mu$	2
	3	200 $\mu$	2,5
	1	100 $\mu$	2,5
	2	100 $\mu$	2,5
	3	100 $\mu$	2,5

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
5) Syntac SC	1	500 $\mu$	52,5
	2	500 $\mu$	3
	3	500 $\mu$	3
	1	400 $\mu$	2,75
	2	400 $\mu$	2,5
	3	400 $\mu$	3
	1	300 $\mu$	3
	2	300 $\mu$	3
	3	300 $\mu$	3
	1	200 $\mu$	3,5
	2	200 $\mu$	3
	3	200 $\mu$	3
	1	100 $\mu$	3,5-4
	2	100 $\mu$	4
	3	100 $\mu$	3,5

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärbe-Index
6) Syntac sprint	1	500 $\mu$	3
	2	500 $\mu$	3,5
	3	500 $\mu$	3
	1	400 $\mu$	4
	2	400 $\mu$	4
	3	400 $\mu$	3
	1	300 $\mu$	4
	2	300 $\mu$	4
	3	300 $\mu$	4
	1	200 $\mu$	4
	2	200 $\mu$	4
	3	200 $\mu$	4
	1	100 $\mu$	4
	2	100 $\mu$	4
	3	100 $\mu$	4

## Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen 1-3:

Material	Versuchs-Nummer	DS-Schnittdicke	Entfärb-Index
7) Gemisch	1	500 $\mu$	0
	2	500 $\mu$	0
	3	500 $\mu$	0
	1	400 $\mu$	0
	2	400 $\mu$	0
	3	400 $\mu$	0
	1	300 $\mu$	0
	2	300 $\mu$	0
	3	300 $\mu$	0
	1	200 $\mu$	0
	2	200 $\mu$	0
	3	200 $\mu$	0
	1	100 $\mu$	0
	2	100 $\mu$	0
	3	100 $\mu$	0

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ali SA, Williams DF: The characteristics and performance of dentine bonding agents. *Clin Mater* 14 (3), 243-54, (1993)
2. Al Nazhan S, Spangberg L: Morphological cell changes due to the chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929-cells. *J of Endod* 16 (3), (1990 March)
3. Arenhold-Binslev D, Ebbehoj E, Horsted-Bindle P: Cytotoxicity of conditioners and bonding agents. *J Dent Res* 73, 952, (1994)
4. Balevi B: Making sense of dentin bonding agents. *Oral Health* 85 (3), 29-30, 32, 34, quiz 35, (1995 Mar)
5. Blunck U: Sichere Langzeitergebnisse bei Einhaltung der Arbeitsschritte. *Die Zahnarzt Woche Spezial - Restaurative Zahnheilkunde* 3/2004
6. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J: The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil* 25 (1), 45-51, (Jan 1998)
7. Brauner A, Kruger W, Kaden P, Lampert F, Mittermayer C: Effect of dentin adhesives on cell cultures of human gingival fibroblasts. *Dtsch Zahnärztl Z* 43 (3), 396-9, (Mar 1988)
8. Browne RM, Tyas MJ: Biological testing of a dental restorative materials in vitro - a review. *J Oral Rehabil* 6, 365, (1979)

9. Browne RM: In vitro assessment of toxicity of dental materials - does it have a role? Abstr. Paper, Conference: In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials, Birmingham, (1987)
10. Caughman WF, Caughman GB, Wilburn T, Dominy BS, Schuster GS: Glass ionomer and composite resin cements: effect on oral cells. *J Prosthet Dent* 63: 513, (1990)
11. Charlton DG: Dentin bonding: past and present. *Gen Dent* 44 (6), 498-507, quiz 515-6, (1996 Nov-Dec)
12. Christen O, Regad C, Neroni M, Thoenen S, Holz J: Modele substituif d'essai biologique in vitro: I. Methode normalisee a l'aide de cellules pulpairees humaines. *J Biol Buccale* 17(4), 275-285, (1989)
13. Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, Pizzoferrato A: Cytotoxicity testing of cyanoacrylates using direct contact assay on cell cultures. *Biomaterials* 15 (1), 63-7, (1994 Jan)
14. Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Sudanese A, Marraro D, Toni A, Pizzoferrato A: Toxicity of cyanoacrylates in vitro using extract dilution assay on cell cultures. *Biomaterials* 15 (2), 92-6, (1994 Jan)
15. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araujo VC, Matson E: Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int* 32 (3), 211-20, ( 2001 Mar)
16. DIN Präklinische Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten – Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe. DIN EN ISO 7405: 1997

17. DIN V 13930 Biologische Prüfung von Dentalwerkstoffen. Beuth Verlag Gmbh / Berlin 1990
18. Duden, Fremdwörterbuch Duden Band 5. 5. Auflage, Dudenverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 1990
19. Duke ES: Adhesive bonding directions: Where are things going? *Compend Contin Educ Dent* 20 (11), 1010 - 2, 1014, (1999 Nov)
20. Dumsha TC, Sydiskis RJ: Cytotoxicity testing of a dentin bonding system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 59(6), 637-641, (1985)
21. Dunn J: Ein Adhäsivsystem der siebten Generation. *ZMK* (20) (6/2004)
22. Ekstrand K, Hensten-Pettersen A, Kullmann A: Denture adhesives: cytotoxicity, microbial contamination, and formaldehyde content. *J Prosthet Dent* 69 (3), 314-7, (1993 Mar)
23. Fischer A: Gewebezüchtung. R. Müller & Steinicke Verlag, München, 3. Auflage 1930
24. Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA: Flüssigkeitskulturen zur Prüfung der Wirkung zahnärztlicher Werkstoffe auf das Bakterienwachstum. *Dtsch Zahnärztl Z* 47, 826-831, (1992)
25. Geurtsen W, Heidemann D: Alterations caused by a composite in two different cell cultures. *J Dent Res* 62, 665 Abstr. Nr. 142, (1983)
26. Geurtsen W: Untersuchungen zur zellulären Verträglichkeit zahnärztlicher Komposit-Füllungsmaterialien am Modell transformierter und nicht transformierter Zellen. *Med Habilschr. Mainz* (1985)



27. Geurtsen W: Untersuchungen zur zellulären Verträglichkeit von Kompositen für den Seitenzahnbereich. Dtsch Zahnärztl Z 42, 960-963, (1987)
28. Gregoire G, Joniot S, Guignes P, Millas A: Dentin permeability: self-etching and one-bottle dentin bonding systems. J Prosthet Dent 90 (1), 42-9, (2003 Jul)
29. Griffiths D, Langeland K: The need of biologic evaluation of dental materials. Int Endod J 14, 102, (1981)
30. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J: Agar diffusion method for toxicity screening plastics on cultured cell monolayers. J Pharm Sci 54: 1545-1547, (1965)
31. Halle W: Die Zell- und Gewebezüchtung - Eine Übersicht. In: Mauersberger B (Hrsg): Aktuelle Probleme in der Zellzüchtung, Fischer Verlag, Stuttgart 1971
32. Haller B: Aktueller Stand der Komposit-Dentinhaftung. Zahnärztl Mitteilung 18, 86-97, (1992)
33. Haller B: Untersuchungen zum Mechanismus und zur Wirksamkeit von Komposit-Dentinhaftmitteln. Med Habilitationsschrift, Würzburg 1992
34. Haller B: Mechanismus und Wirksamkeit von Dentinhaftvermittlern. Dtsch Zahnärztl Z 49 (10), 750-759, (1994)
35. Haller B: Einkomponenten-Adhäsive – Aktueller Entwicklungsstand. Dtsch Zahnärztekalendar 1997, Hanser, München, Wien 1997

36. Haller B: Klassifikation von Bondingsystemen. Quintessenz 50, 10, 1021-1033, (1999)
37. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE: Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. J Endod 18 (12), 589-596, (1992)
38. Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J: In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. J Endod 25 (2): 89-92, (1999 Feb)
39. Heidemann D, Lampert F: Menschliche Gingiva in der Zellkultur. Dtsch Zahnärztl Z 35, 430, (1980)
40. Heidemann D: Die Bestimmung der Biokompatibilität von zahnärztlichen Materialien anhand primärer Zellen. Deutscher Zahnärztekalender 1982, Hanser, München, Wien 1982
41. Heidemann D: Die Kultivierung menschlicher Gingivazellen und deren Anwendung in der Bioverträglichkeits-Untersuchung. Med Habilschrift, Mainz 1985
42. Hellwig, Klimek, Attin: Einführung in die Zahnerhaltung/2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, (1999)
43. Heymann H: Update on adhesive dentistry : an interview with Dr. Harald Heymann. Dent Today 15 (1),42, 44-5, (1996 Jan)
44. Hornbrook DS: Practical adhesive dentistry. Dent Today13 (2), 84, 86, 88-9, (1994 Feb)

45. Huang FM, Chou MY, Chang YC: Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 24 (1), 157-63, (2003 Jan)
46. Huang FM, Chang YC: Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J* 35 (11), 905-9, (2002 Nov)
47. Kasten FH, Felder SM, Gettleman L, Alchediak T: A model culture system with human gingival fibroblasts for evaluating the cytotoxicity of dental materials. *In Vitro* 18 (7), 650-660, (1982)
48. Klötzer WT, Schmalz G: DIN-Standard 13930: biological testing of dental materials II. Application tests. Comparable standards
49. Klötzer WT: Prüfungen der biologischen Reaktionen der lebenden Gewebe auf zahnärztliche Kunststoffe. *Dt Zahnärztl Z* 30, 126-131, (1975)
50. Klötzer WT: Grenzen der Biokompatibilitätstestung in der Zellkultur. *Quintessenz, Zahnärztl Lit* 39, 2417, (1988)
51. Koliniotou-Koubia E, Dionysopoulos P, Koulaouzidou EA, Kortsaris, Papadogiannis Y: In vitro cytotoxicity of six dentin bonding agents. *J Oral Rehabil* 28 (10), 971-5, (2001 Oct)
52. Kunkel A: Zytotoxizität von Kompositen und Dentin-Adhäsiven. In-vitro-Untersuchungen an Gingivafibroblasten. Inaugural – Dissertation, Frankfurt am Main 2001
53. Langeland K: Biologische Prüfverfahren zur Beurteilung zahnärztlicher Materialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 20, 1291, (1965)

54. Lehmann F, Leyhausen G, Geurtsen W: Cytotoxic alterations in different fibroblast cultures caused by matrix monomers. *J Dent Res* 72, 219, Abstr. No. 929, (1993)
55. Leinfelder KF: Is there a standardized procedure for bonding?. *J Am Dent Assoc* 130 (10), 1491-2, (1999 Oct)
56. Lindl & Bauer: *Zell- & Gewebekultur*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1987
57. Lopes GC, Vieira LC, Monteiro S Jr, Caldeira de Andrada MA, Bara CM: Dentin bonding: effect of degree of mineralization and acid etching time. *Oper Dent* 28 (4), 429-39, (2002 Jul-Aug)
58. Lutz F, Krejci I, Schüpbach P: Adhäsivsysteme für zahnfarbene Restaurationen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 5, 537-549, (1993)
59. Mauersberger B: *Aktuelle Probleme in der Zellzüchtung*. Fischer Verlag, Stuttgart 1971
60. Meryon SD, Brook AM: In vitro cytotoxicity of three bonding agents. *J Dent* 17, 279-283, (1989)
61. Mjor IA: Testing of dentin adhesives. *J Dent Res* 79 (4), 892, (2000 Apr)
62. Mohamed AF: Adhesives and dentin bonding systems : literature review. *Egypt Dent J* 41 (1), 969-979, (1995 Jan)
63. Neroni M, Regad C, Christen O, Thoenen S, Holz J: 6 dentin adhesive products subjected to controls in vitro. *J Biol Buccale* 18 (4), 271-85, (1990 Dec)

64. Neroni M, Regad C et al: Six produits adhesifs dentinaires soumis au controle in vitro. *J Biol Buccale* 18, 271-285, (1990)
65. Novak L, Puza V: Einige Methoden zur biologischen Testung der stomatologischen Materialien mittels Zellkulturen. *Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Zentralbl* 65 (8), 859-862, (1977)
66. Pashley DH: Dentin bonding agents. *Current Opinions Dent* 2 (VI), 46, (1992)
67. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA: Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintess Int* 24, 618, (1993)
68. Paul J : Zell- und Gewebekulturen. De Gruyter Verlag, Berlin 1980
69. Puza V, Novak L: Cell cultures as atool for testing the toxicity of stomatological materials. *Sh Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 17 (1-2), 65-123, (1974)
70. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage
71. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74 (9), 1602-1606, (1995)
72. Roeder LB: Review of dentin bonding agents. *J Gt Houst Dent Soc* 69 (5), 12-3, (1997 Dec)
73. Santini A: Biocompatibility of dentine bonding agents. 1. Factors associated with function. *Prim dent Care* 5 (1), 15-9, (1998 Jan)

74. Santini A: Biocompatibility of dentine –bonding agents. 2. Pulpal considerations. *Prim Dent Care* 5 (2), 69-72, (1998 Apr)
75. Saukel B: Die Anwendung von Haftvermittlern in der Füllungstherapie, *Med Diss, Mainz*, 1988
76. Schäfer E: Geschichtliche Entwicklung, Klassifizierung und Haftungsmechanismen der Dentinadhäsive. Teil I: Grundlagen der Dentinadhäsion und Adhäsive der 1. bis zur 3. Generation. *ZWR*, 108, Nr. 4, 218-225, (1999)
77. Schäfer E: Geschichtliche Entwicklung, Klassifizierung und Haftungsmechanismen der Dentinadhäsive. Teil II: Von der Einführung der 4. Generation bis zu den sogenannten Ein-Schicht-Adhäsiven. *ZWR*, 108, Nr. 5, 306-311, (1999)
78. Schaller HG, Klaiber B, Gotze W, Benz M: Toxicity tests of dentin and enamel adhesives used as cavity liners in cell culture. *Dtsch Zahnärztl Z* 40 (9), 929-34, (1985 Sep)
79. Schedle A, Farnz A, Rausch-Fan X, Splitter A, Lucas T, Samorapoom-pichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G: Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers, and cements. *Dent Mater* 14 (6), 429-440, (1998)
80. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H: Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin bar test in vitro. *J Endod* 28 (3), 188-92, (2002 Mar)
81. Schmalz G: The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 106 (2 Pt 2) ,696-706, (1998 Apr)

82. Schmalz G: Über die Empfindlichkeit verschiedener In-vitro-Testsysteme bei der biologischen Materialprüfung. Dtsch Zahnärztl Z 32, 878-879, (1977)
83. Schmalz G: Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Materialien – Möglichkeiten der standardisierten Prüfung in der Zellkultur. Thieme Verlag, Stuttgart 1981
84. Schmalz G: The use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. J Dent 22, 6-11, (1994)
85. Schmalz H, Hoffmann M, Weis K, Schweikl H: Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. J Endod 26 (5), 284-7, (2000 May)
86. Schmalz G, Schweikl H, Eibl M: Growth kinetics of fibroblasts on bovine dentin. J Endod 20 (9), 453-6, (1994 Sept)
87. Schmalz G, Garhammer P, Schweikl H: A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. J Endod 22 (5), 249-52, (1996 May)
88. Schmalz G, Schuster U, Nuetzel K, Schweikl H. An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. J Endod 25 (1), 24-9, (1999 Jan)
89. Schmalz G, Schweikl H: Characterization of an in vitro dentin barrier test using a standard toxicant. J Endod 20 (12), 592-4, (1994 Dec)
90. Schmalz G, Schweikl H, Esch J, Hiller KA: Evaluation of a dentin barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. J Endod 22 (39), 112-5, (1996 Mar)

91. Schmalz G: Biological properties of composite filling materials. Dtsch Zahn-ärztl Z 40 (9), 897-901, (1985 Sept)
92. Schüler Duden Mathematik I + II, 2. Auflage, 1982
93. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C: Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. J Endod 27(4), 259-65, (2001 Apr)
94. Schweikl H, Schmalz G: Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents as mutagens in mammalian cells in vitro. J Biomed Mater Res 36 (3), 284-8, (1997 Sept)
95. Schweikl H, Schmalz G, Gottke C: Mutagenic activity of various dentine bonding agents. Biomaterials 17 (14), 1451-6, (1996 Jul)
96. Schweikl H, Schmalz G, Bey B: Mutagenicity of dentin bonding agents. J Biomed Mater Res 28 (9), 1061-7, (1994 Sep)
97. Soderholm KJ: Technique sensitivity of dentin bonding. Gen Dent 45 (3), 218-22, (1997 May-Jun)
98. Srivastava S, Gorham SD, Courtney JM: Screening of in vitro cytotoxicity by the adhesive film test. Biomaterials 11 (2), 133-7, (1990 Mar)
99. Stanley HR, Swerdlow H, Buoncore MG: Pulp reactions to anterior restorative materials. Am Dent A J 75, 132-141, (1967)
100. Suh BI: A 4<sup>th</sup> generation universal bonding system. Asian J Aesthet Dent 2 (1), 19-25, (1994)



101. Suh BI : All bond – Fourth generation dentin bonding system. *J Esthet Dent* 3, 139, (1991)
102. Swift EJ, Perdigao J, Heymann HO: Bonding to enamel and dentin: A brief history and state of the art. *Quintessence Int* 26, 95-110, (1995)
103. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D: Cytotoxicity of modern dentin adhesives-in vitro testing on gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 63 (1), 53-60, (2002)
104. Tagami J, Tao L, Pashley DH: Correlation among dentin depth, permeability and bond strength of adhesive resins. *Dent Mater* 6, 45, (1990)
105. Thonemann B, Federlin M, Schmalz G, Grundler W: Total bonding vs selective bonding: marginal adaption of Class 2 composite restorations. *Oper Dent* 24 (5), 261-71, (1999 Sept-Oct)
106. Tanriverdi F, Gunday M, Atalay T: Pulp responses to three dentine bonding agents in dogs` teeth. *J Marmara Univ Dent Fac* 1 (4), 321-6, (1993 Sep)
107. Van Meerbeck B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G: Dentinhaftung: Mechanismen und klinische Resultate. *Dtsch Zahnärztl Z* 49, 997-984, (1994)
108. Van Meerbeck B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G: Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different Dentin adhesive systems. *J Dent Res* 71, 1530, (1992)
109. Wakefield C, Dan Sneed W, Draughn R, Tyler N: Composite bonding to dentin and enamel: Effect of humidity. *General dentistry* 1996

110. Willershausen B, Schafer D, Pistorius A, Schulze R, Mann W: Influence of resin-based restoration materials on cytotoxicity in gingival fibroblasts. Eur J Med Res 27, 4 (4), 149-155, (1999)

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Susanne Szep-Gerhard für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die exzellente fachliche Betreuung. Dank der konstruktiven Kritik und der permanenten Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren, ermöglichte sie mir erst die Anfertigung der Arbeit. Neben ihren Anregungen und Ideen gab sie mir auch immer die Gelegenheit meine eigenen Vorstellungen einzubringen und umzusetzen. Für all das Engagement, vor allem aber für die hervorragende Hilfestellung und Geduld während der gesamten Zeit, möchte ich mich herzlich bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei dem Leiter des Zentrums der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Prof. Dr. D. Heidemann für die Möglichkeit, die Doktorarbeit so durchführen zu können, sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die sehr gute Ausbildung während des gesamten Studiums, bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Karin Ronge, ohne deren mikrobiologisches Fachwissen und Können die Zellkulturversuche nicht möglich gewesen wären, für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfe im Labor.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die langjährige Unterstützung. Sie ermöglichten damit mein Studium und auch diese Arbeit. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, die die gesamte Arbeit immer wieder bezüglich sprachlicher oder stilistischer Fehler Korrektur gelesen hat.

Ein Dankeschön gilt auch meiner Studienkollegin Nadine Jahr für die mentale Unterstützung während der gesamten Zeit. Für die vielen Ratschläge zu Computerprogrammen, Formatierungen, graphischen Ausarbeitungen etc. bedanke ich mich herzlich bei Jens Vogel, Steffen Schupp, Carolin Müller und Henning Schenk.

## 10. LEBENSLAUF

Name: Clemens  
Vorname: Martina  
Adresse: Wilhelm-Leuschner-Str. 44  
64293 Darmstadt  
Geburtsdatum: 19.02.1977  
Geburtsort: Darmstadt  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung:

1983-1987 Grundschule der Erich-Kästner-Schule in Darmstadt  
1987-1989 Förderstufe der Erich Kästner Schule in Darmstadt  
1989-1996 Gymnasium Justus-Liebig-Schule in Darmstadt

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

April 1997: Beginn des Zahnmedizinischen Studiums an der Johann Wolfgang v. Goethe-Universität in Frankfurt a.M.  
März 1998: Bestandene naturwissenschaftliche Vorprüfung  
September 2000: Bestandene zahnärztliche Vorprüfung  
Juni 2003: Approbation als Zahnärztin

Seit Februar 2002: Arbeit an meiner Dissertation bei Prof. Dr. D. Heidemann (Johann Wolfgang Goethe-Universität/ Frankfurt am Main), welche sich mit der Toxizitätstestung verschiedener Dentinadhäsive mittels Agardiffusionstest beschäftigt.

### Bisherige Tätigkeiten:

01.09.2003-31.12.2004  
Tätigkeit als Vorbereitungsassistentin in Praxis Dr. Udo Steinheisser, Dieburg  
01.01.2005-30.09.2005  
Tätigkeit als Vorbereitungsassistentin in Praxis Dr. Nold, Büttelborn  
01.10.2005 bis jetzt  
Tätigkeit als Juniorpartner in Praxis Dr. Nold

Darmstadt, den 06.09.2006

Martina Clemens

## 11. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Zytotoxizität fünf verschiedener Dentinadhäsive in einer Kombination mit einer Präkonditionierung mittels eines Gemisches aus Phosphor- und Flusssäure – In-vitro-Untersuchung an Gingivafibroblasten mit Hilfe des Agar-Diffusionstests“

in dem Zentrum der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Susanne Szep-Gerhard ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Darmstadt, den 06.09.2006

Martina Clemens