

Aus dem  
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
komm. Vorstand: Univ.-Prof. Dr. P. Eyer

Angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Dr. F.X. Reichl

Vorgelegt über  
Univ.-Prof. Dr. H. Ammer  
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

## **In-vitro-Toxizität von Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Judith Emmler  
aus  
Benediktbeuern

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

**Meinen Eltern  
gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zahnärztliche Restaurationsmaterialien</b>	<b>1</b>
1.1.1	Etablierung	1
1.1.2	Einteilung	2
1.1.3	Komposite	2
1.1.4	Freisetzung von Komponenten und Metabolismus	4
1.1.5	Biokompatibilität	7
<b>1.2</b>	<b>Vergleichssubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Pifithrin-<math>\alpha</math></b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Zytokine</b>	<b>11</b>
1.4.1	Interleukin 6	13
1.4.2	Interleukin 8	13
1.4.3	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1	14
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Materialien</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Reaktionssysteme</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Zellkulturmedien und -seren</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Material für molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultur der A549-Zelllinie</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung</b>	<b>22</b>
3.2.1	Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA	24
3.2.2	Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten	24
3.2.3	Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA	25
3.2.4	Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien	25

3.2.5	Auswertung und Statistik	26
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine</b>	<b>26</b>
3.3.1	Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay	26
3.3.1.1	Proteinbestimmung	26
3.3.1.2	Bioplex-Immunoassay	27
3.3.1.3	TGF- $\beta$ 1-ELISA	28
3.3.1.4	Auswertung und Statistik	29
3.3.2	Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR	29
3.3.2.1	RNA-Isolierung	30
3.3.2.2	RNA-Formaldehydgel	31
3.3.2.3	Photometrische Quantifizierung und Reinheitsbestimmung	31
3.3.2.4	RT (Reverse Transkriptase)-PCR	32
3.3.2.5	Multiplex-PCR	33
3.3.2.6	Gelelektrophorese	34
3.3.2.7	Densitometrische Auswertung	34
3.3.2.8	Auswertung und Statistik	34
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Kultur der A549-Zelllinie</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung</b>	<b>35</b>
4.2.1	Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA	35
4.2.2	Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten	37
4.2.3	Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA	40
4.2.4	Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien	41
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine</b>	<b>42</b>
4.3.1	Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay	42
4.3.2	Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR	46

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Auswahl von Testsubstanzen, eingesetzter Dosis, Versuchszelllinie und Referenzmaterial</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung</b>	<b>52</b>
5.2.1	Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA	52
5.2.2	Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten	55
5.2.3	Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA	61
5.2.4	Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien	65
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine</b>	<b>65</b>
5.3.1	Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay	65
5.3.2	Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR	69
<b>5.4</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\gamma$ -GCS	Gamma-Glutamyl-Cystein-Synthetase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
95 %-CI	95 %-Konfidenzintervall
AMV	Avian-Myeloblastosis-Virus
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Bis-GMA	Bisphenol-A-(di)glycidylmethacrylat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CE	Cholesterinesterase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Effektkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay
FKS	Fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung [9,81 m/s <sup>2</sup> ]
g	Gramm
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduzierte Form
h	Stunde
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IL-6	Interleukin 6

## Abkürzungsverzeichnis

---

IL-8	Interleukin 8
Konz.	Konzentration
L	Liter
M	Molar
MA	Methacrylat
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
n	Stichprobenzahl
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduzierte Form
ng	Nanogramm
nm	Nanometer (Wellenlänge)
OD	Optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
PCE	Pseudocholinesterase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
RA	Reaktionsansatz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
S.E.M.	Standardfehler
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
T	Temperatur
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEG	Triethylenglykol
TEGDMA	Triethylenglykoldimethacrylat



## Abkürzungsverzeichnis

---

TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
U	Einheiten
UDMA	Urethandimethacrylat
UDP	Uridin-Diphosphat
UV	Ultraviolett

# **1. Einleitung**

## **1.1 Zahnärztliche Restaurationsmaterialien**

### **1.1.1 Etablierung**

In der modernen Zahnheilkunde steht zur Restauration kariöser Defekte eine Vielzahl an Füllungsmaterialien unterschiedlicher Werkstoffgruppen zur Verfügung. Bei der Auswahl des - im konkreten Fall - indizierten Werkstoffes sind neben rein funktionellen Gesichtspunkten in den vergangenen Jahren zunehmend auch ästhetische Aspekte in den Vordergrund gerückt (Vallittu et al. 1996). So kommt es, dass sich das Spektrum an Rekonstruktionsmöglichkeiten der Zahnhartsubstanz im Laufe der vergangenen Jahre gravierend verändert hat: Zahnfüllungen aus Gold sind zur Wiederherstellung der Kaufunktion schon seit über 2000 Jahren bekannt (Stahl 1966). Auch Werkstoffe auf Amalgambasis wurden bereits während der Tang Dynastie in China (618-907 A.D.) für Zahnrestorationen verwendet (Bjorklund 1989). Hingegen wurden die ersten zahnfarbenen Materialien auf Kunststoffbasis (Bowen 1962; Bowen 1965) erst vor etwa 20 Jahren kommerziell eingeführt und haben sich seitdem zunehmend in der Füllungstherapie etabliert.

Bis heute stand selten ein Medizinprodukt oder Arzneimittel so lang anhaltend in der öffentlichen Diskussion wie das Zahnfüllungsmaterial Amalgam (Harhammer 2001). Nach wie vor herrscht Unstimmigkeit darüber, ob die Freisetzung von Quecksilber aus Amalgamzahnfüllungen gesundheitsschädliche Auswirkungen hat (Roulet 1997). Als Ergebnis dieser Kontroverse wurde 1997 vom Bundesgesundheitsministerium in Zusammenarbeit mit dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) sowie verschiedenen wissenschaftlichen und zahnärztlichen Expertengremien ein Konsenspapier zu den in der Zahnheilkunde verwendeten Restaurationsmaterialien herausgegeben (Bundesministerium für Gesundheit et al. 1997). In diesem wurden neben dem Nachweis einer Allergie als Gegenanzeige auch weitere Empfehlungen bezüglich der Anwendung von Amalgam gegeben, aus denen sich gewisse relative Kontraindikationen im Sinne eines vorbeugenden Gesundheitsschutzes ableiten lassen (Harhammer 2001). Ferner wurde in diesem Zusammenhang aber auch darauf hingewiesen, dass die Auswahl des geeigneten Füllungsmaterials nach wie vor der alleinigen Kompetenz des behandelnden Zahnarztes unterliegt.

Zwar stellt Amalgam gegenwärtig vor allem wegen seiner längeren Haltbarkeit sowie seiner

leichteren Verarbeitbarkeit in vielen Fällen noch immer das überlegene Restaurationsmaterial dar (Roulet 1997). Aufgrund der Indikationseinschränkungen und der daraus resultierenden Verunsicherung in der Bevölkerung sowie infolge gestiegener ästhetischer Ansprüche werden jedoch von den Patienten in letzter Zeit verstärkt zahnfarbene Werkstoffe für Restaurationen gewünscht (Heil et al. 1996; Vallittu et al. 1996; Geurtsen 1998; Sarkar 2000). Insbesondere diese zahnfarbenen Füllungswerkstoffe haben deshalb innerhalb der vergangenen Jahre eine stetige Weiterentwicklung erfahren (Peutzfeld 1997) und das Spektrum ihrer Anwendungsmöglichkeiten hat sich laufend erweitert.

### **1.1.2 Einteilung**

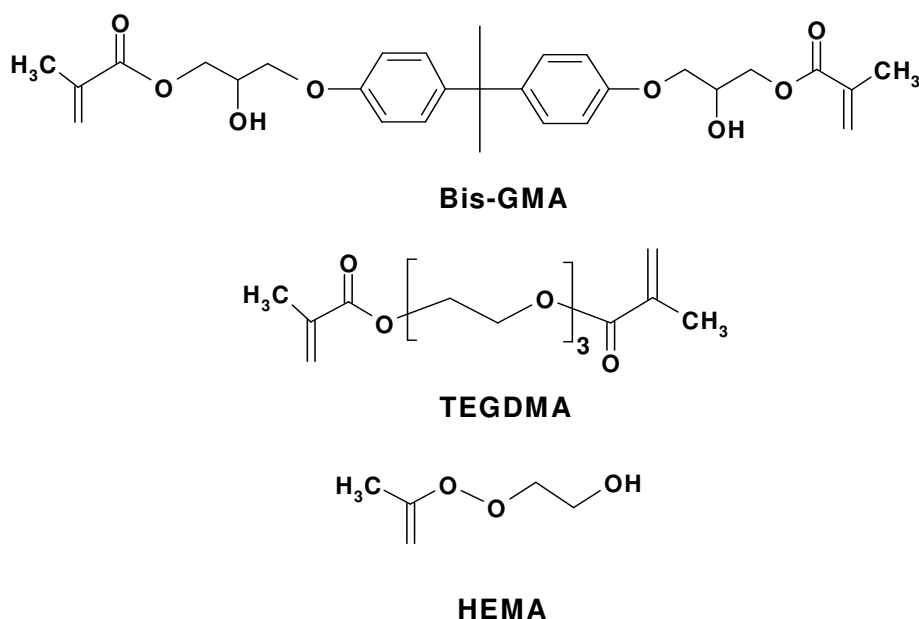
Man unterscheidet heute bei dentalen Füllungsmaterialien zwischen direkten und indirekten Materialien (Hickel 1998a). Während die direkten Materialien plastisch verarbeitbar sind und somit unmittelbar als Füllung appliziert werden können, müssen so genannte indirekte Materialien (z.B. Inlays, Kronen) erst außerhalb des Mundraumes gestaltet werden. Weiterhin können die zahnfarbenen direkten Materialien nach der stattfindenden Abbindereaktion, d.h. nach ihrem Aushärtevorgang, unterteilt werden. Dabei wird zwischen so genannten Glasionomerzementen (GIZ) und Kompositen unterschieden. Während die Glasionomerzemente über eine Säure-Base-Reaktion und unter Wasserfreisetzung härten, findet die lichtinduzierte Polymerisation der Komposite ohne Wasserabspaltung statt. Da die Füllungsglasionomerzemente im Vergleich zu Kompositen eine schlechtere Biegefestigkeit aufweisen, wird heute den Kompositen in der Füllungstherapie größtenteils der Vorzug gegeben (Reichl 2003).

### **1.1.3 Komposite**

Komposite sind Kunststoffe, die aus einer organischen Matrix mit eingebetteten anorganischen Füllmaterialien bestehen (Eick et al. 2002). Als Monomere für die Bildung der Kunststoffpolymermatrix werden überwiegend Mono- und Di-Methacrylate eingesetzt (Peutzfeld 1997). Diese kann man je nach ihrer Zusammensetzung in schwere Basismonomere, wie z.B. Bisphenol-A-(di)glycidylmethacrylat (BisGMA) oder Urethandimethacrylat (UDMA), und leichte Komonomere, z.B. Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), unterteilen. Als weitere organische Bestandteile müssen den Kompositen außerdem Photoinitiatoren oder thermische Initiatoren beigelegt

werden, deren Funktion darin besteht, die freie radikalische Polymerisation der Methacrylate in Gang zu setzen (Buonocore 1970; Eick et al. 2002). Als anorganische Füllmaterialien können einerseits fein gemahlene Quarze mit einer Partikelgröße größer 1 µm dienen, die man auch als Makrofüller bezeichnet. Andererseits können aber auch pyrogene Siliziumdioxidpartikel mit einer Partikelgröße von kleiner als 0,1 µm als so genannte Mikrofüller verwendet werden. Für zahnärztliche Restaurationen werden heutzutage in erster Linie so genannte Hybridkomposite eingesetzt (Ernst et al. 2003), die eine Kombination aus Makro- und Mikrofüllern beinhalten. Die Verbindung der beiden Phasen von Kompositen wird durch die Beimengung eines Haftvermittlers erzielt. Hierzu wird bifunktionelles Silan verwendet, welches als Kopplungsagens die Bindung der anorganischen Füllkörper an die organische Matrix ermöglicht (Debnath et al. 2003).

Die Komonomere TEGDMA und HEMA (s. Abb. 1) werden in dentalen Kompositen häufig als Diluenten eingesetzt, um die Verarbeitbarkeit der Kunststoffe durch Herabsetzung ihrer Viskosität zu verbessern (Vankerckhoven et al. 1982; Kehe et al. 2001). Ihre Verwendung in der Zahnheilkunde ist jedoch nicht nur auf diese Funktion als Verdüner in derartigen Füllungswerkstoffen beschränkt. Auch in Dentinadhäsiven, kunststoffhaltigen Zementen, Klebstoffen für Inlays, Kronen, Veneers, orthodontische Brücken und Keramiken sowie in Unterfüllungen für Amalgam- und Goldfüllungen und als Fissurenversiegler kommen die beiden Komonomere TEGDMA und HEMA häufig zum Einsatz (Reichl 2003).



**Abbildung 1: Strukturformeln des Basismonomers Bisphenol-A-(di)glycidylmethacrylat (Bis-GMA; so genanntes „Bowen-Monomer“) sowie der beiden Komonomere Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) .**

#### **1.1.4 Freisetzung von Komponenten und Metabolismus**

Die lichtinduzierte Polymerisation von Restaurationsmaterialien auf Methacrylsäurebasis läuft in Abhängigkeit verschiedener Einflussfaktoren (z.B. Lichtintensität und -qualität, Schichtdicke, Füllstoffgehalt, verwendete Photoinitiatoren) häufig nur unvollständig ab (Park et al. 1999; Halvorson et al. 2003; Janke et al. 2003; Kauppi et al. 2003; Le Bell et al. 2003; Lovell et al. 2003). Bei der Umwandlung der Monomere in die Polymermatrix können deshalb in unterschiedlichem Umfang große Mengen an unvernetzten Matrixbestandteilen entstehen (Ferracane et al. 1984). Insbesondere die anschließende Freisetzung dieser so genannten Restmonomere erweist sich bei der Anwendung der dentalen Kunststoffe als problematisch. So können die hier untersuchten Komonomere TEGDMA und HEMA bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ablauf der Polymerisationsreaktion aus Kunststoffrestaurationen in Konzentrationen im Mikrogramm-Bereich freigesetzt werden (Hume et al. 1996; Geurtsen 1998; Geurtsen 2000; Issa et al. 2004).

Unvernetzte Monomere können jedoch nicht nur in der initialen Phase nach Ablauf des Polymerisationsprozesses aufgrund mangelnder Monomer-Konversionsraten in hohen Konzentrationen auftreten (Lonnroth et al. 1997; Geurtsen 2000). Auch nach dem Legen einer Kunststofffüllung können solche Restmonomere erst sukzessive mit dem Speichel aus der Polymermatrix ausgewaschen werden (Lee et al. 1998; Geurtsen 2000), zumal mit zunehmender Tragedauer auch durch Abrasion (= Abrieb durch zwischengelagerte Partikel aus Nahrung und Umwelt) und Erosion (= flächiger Substanzverlust, hervorgerufen durch über längere Zeit wiederkehrende exogene Säureeinwirkung) laufend weitere Bestandteile aus den Kunststoffrestaurationen in die Mundhöhle freigesetzt werden (Ferracane 1994; Sarkar 2000; Ortengren et al. 2001).

Somit können die aus zahnärztlichen Restaurationsmaterialien ständig frei werdenden Komponenten nach ihrer Freisetzung verschluckt und im Darm resorbiert werden (Reichl et al. 2001a; Reichl et al. 2001b; Reichl et al. 2002b). Die Komonomere TEGDMA und HEMA können zudem innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen durch das Dentin in die Pulpahöhle diffundieren, wo sie auch Anschluss an den systemischen Kreislauf erhalten (Gerzina et al. 1995; Hume et al. 1996). Ferner stellt auch die inhalative Aufnahme von Mikropartikeln (Lonnroth et al. 1997) beim Legen der Füllung und ihre anschließende Resorption im Lungengewebe eine weitere mögliche Aufnahmequelle dar. In diesem Zusammenhang haben Studien gezeigt, dass selbst die Verwendung protektiver Handschuhe und Gesichtsmasken zahnärztliches Personal nur bedingt vor der intensiven Exposition bei der Verarbeitung

komonomerhaltiger Restaurationsmaterialien schützen kann (Lonroth et al. 1998; Andreasson et al. 2003; Nakamura et al. 2003).

Bisher haben sich Untersuchungen zur Degradation dentaler Restaurationsmaterialien vorwiegend auf den Verlust ihrer mechanischen Funktion oder physikalischen Struktur konzentriert (Santerre et al. 2001). Als weiterer Schwerpunkt stand außerdem lange Zeit die Freisetzung unvernetzter Restmonomere im Zentrum des Forschungsinteresses. Erst seit Beginn der neunziger Jahre wurde auch der enzymkatalysierte Abbau der Monomere in Überlegungen bezüglich der Entstehung toxischer Effekte miteinbezogen. Aus Kompositen freigesetzte Komonomere können bereits in der Mundhöhle durch diverse Speichelenzyme (z.B. Pseudocholinesterase und Cholesterinesterase) gespalten werden (Santerre et al. 2001; Jaffer et al. 2002). Die am Abbau beteiligten Enzyme stammen dabei vorwiegend von oralen Mikroorganismen, Speicheldrüsen, gingivaler Flüssigkeit, polymorphkernigen Leukozyten, Epithelzellen sowie Nahrungsbestandteilen (Chauncey 1961). Darüber hinaus können noch weitere Enzymaktivitäten (z.B. durch Bakterienakkumulation) bei zusätzlich in der Mundhöhle stattfindenden Entzündungsreaktionen (z.B. Periodontitis) frei werden (Nakamura et al. 1983). Insgesamt variiert der auf dentale Restaurationsmaterialien einwirkende enzymatische Angriff also temporär sowohl in seinem Ausmaß als auch in seiner individuellen Zusammensetzung.

Auch Komonomere, die über die oben beschriebenen Mechanismen in die systemische Blutzirkulation gelangt sind, können im Organismus weiter verstoffwechselt werden (Reichl et al. 2002a). Von einer multilokulären Degradation dieser Komponenten durch die Aktivität verschiedenster im Körper vorliegender Enzyme ist deshalb auszugehen (Yourtee et al. 2001). Angesichts dieser Erkenntnisse war in der Vergangenheit schon häufiger auf die Notwendigkeit hingewiesen worden, die - beim Abbau der Kunststoffmaterialien entstehenden - Stoffwechselprodukte in toxikologische Untersuchungen miteinzubeziehen (Bean et al. 1994). Im Zuge solcher Forderungen wurde der Metabolismus von radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA und  $^{14}\text{C}$ -HEMA bei in-vivo-Versuchen am Meerschweinchen genauer untersucht (Durner 2000). Für die Verstoffwechslung der beiden untersuchten Komonomere wurde dabei folgender - in Abbildung 2 dargestellter - Abbauweg im Organismus angenommen:

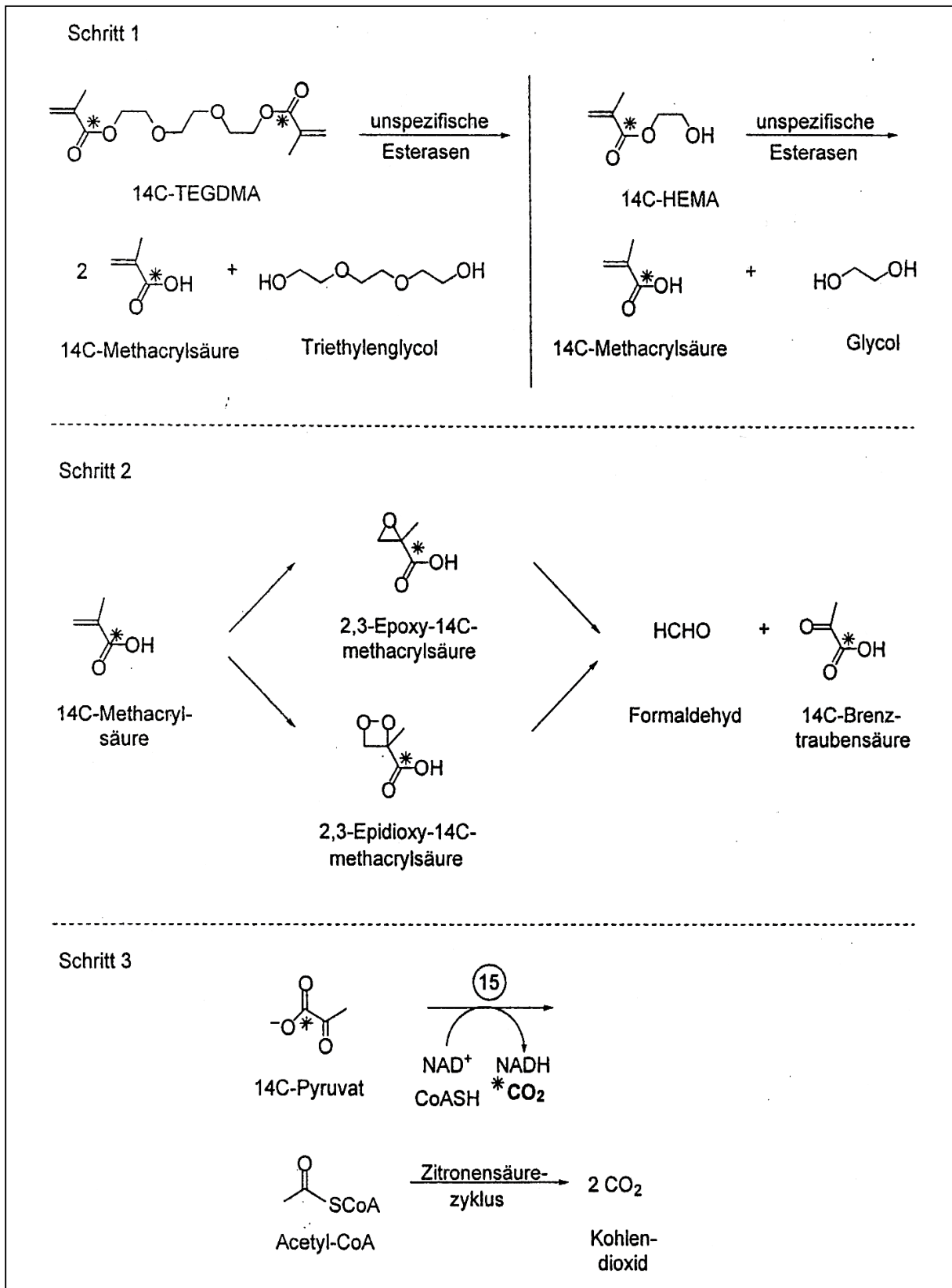


Abbildung 2: Abbau von <sup>14</sup>C-TEGDMA bzw. <sup>14</sup>C-HEMA durch oxidative Spaltung der Doppelbindung nach Durner (2000). (\* = <sup>14</sup>C-markiert; (15) = Pyruvat-Dehydrogenase, EC 1.2.4.1).

Der Metabolisierung von TEGDMA und HEMA geht demnach zunächst eine Esterspaltung mittels unspezifischer Esterasen voraus (Munksgaard et al. 1990; Durner 2000). Im zweiten Schritt wird durch die oxidative Spaltung der C-C–Doppelbindung der entstehenden <sup>14</sup>C-Methacrylsäure ein intermediäres Epoxid gebildet, das im weiteren Verlauf zu <sup>14</sup>C-Pyruvat und Formaldehyd umgewandelt wird. In dem vorgeschlagenen dritten Reaktionsschritt wird <sup>14</sup>C-Pyruvat schließlich unter Abspaltung von <sup>14</sup>C-Kohlendioxid zu Acetyl-CoA decarboxyliert und in den Zitronensäurezyklus eingeschleust (s. Abb. 2).

Von besonderer Bedeutung bei dem beschriebenen Abbauweg ist, dass die bei der Verstoffwechslung des Komonomers TEGDMA entstehenden toxischen Intermediate aufgrund ihrer molaren Verhältnisse zusätzlich einem kumulativen Effekt unterliegen könnten, indem aus nur einem TEGDMA-Molekül zwei Moleküle Methacrylsäure bzw. toxisches Epoxid generiert werden können.

Generell stellt die Epoxidierung im Organismus einen der wichtigsten metabolischen Schritte dar, welcher in der Entstehung potentieller toxischer Effekte münden kann. Epoxide sind chemisch instabile Verbindungen, von denen man weiß, dass sie kovalent an Nukleinsäuren und Gewebeproteine binden können (Yamamoto et al. 2002). Auch die für die Verstoffwechslung der Komonomere postulierten Epoxide sind daher vermutlich als toxisch einzustufen. Über die Toxizität der möglicherweise beim Abbau von TEGDMA und HEMA intermediär gebildeten 2,3-Epoxy-methacrylsäure bzw. 2,3-Epidioxy-methacrylsäure liegen bisher noch keine Daten vor.

Zusätzlich ist bekannt, dass lösliche und mikrosomale Epoxidhydrolasen in der Lage sind, zytotoxische und mutagene Epoxide als Teil des Detoxifikationsprozesses in eukaryotischen Zellen zu ihren korrespondierenden Dihydrodiolen zu hydrolysieren (Wistuba 1986). In Analogie zu Toxizitätsstudien, in denen auch für diese Dirole toxische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Moran et al. 1997; Nesnow et al. 2002), wurde auch das entsprechende Dihydrodiol 2,3-Dihydroxy-methacrylsäure, welches möglicherweise bei Abreaktion des Epoxids im physiologischen Milieu entsteht (Mitchell et al. 2002), in die Untersuchungen miteinbezogen.

### **1.1.5 Biokompatibilität**

Allgemein werden zahnärztliche Restaurationsmaterialien, da sie über längere Zeit als Fremdkörper im Körper verbleiben, gemäß den Richtlinien 93/42/EWG des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 14. Juni 1993 als Medizinprodukte der Klasse IIa



eingestuft. Als solche unterliegen sie seit dem 14.06.1998 ausschließlich dem europäischen und deutschen Medizinprodukterecht. Dieses besagt, dass die entsprechenden Produkte vor ihrem Inverkehrbringen auf die Erfüllung gewisser grundlegender Anforderungen geprüft und zertifiziert werden müssen. Die Einhaltung dieser Kriterien liegt in der Verantwortlichkeit der Hersteller sowie spezieller Prüfstellen, welche von den zuständigen Behörden benannt und überwacht werden. Die Erfassung und Bewertung der Risiken bei der Anwendung solcher Produkte obliegt dem BfArM.

Sowohl Einsatzmöglichkeiten als auch Einsatzdauer von dentalen Restaurationsmaterialien hängen neben ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften im Wesentlichen von ihrer biologischen Verträglichkeit - ihrer so genannten Biokompatibilität - ab. Prinzipiell kann die Bioverträglichkeit eines Stoffes in verschiedene Komplexe unterteilt werden. Dazu gehören die Allergenität (Auslösung von allergischen Reaktionen), Toxizität (Giftigkeit), Mutagenität (Induktion von Veränderungen im genetischen Material von Zellen) und Onkogenität (Erzeugung von Tumoren) der zu untersuchenden Substanzen (Heintzenberg 2002).

Die gemäß Medizinproduktegesetz durchzuführenden Biokompatibilitätsprüfungen stellen vorklinische Prüfungen dar, die nach genau festgelegten Normen durchgeführt werden. Dentale Restaurationsmaterialien müssen laut Vorschrift auf ihre Konformität mit den Normen ISO 10993 (Direkt-Kontakt-Test), EN 30993 und DIN EN ISO 7405:1997 untersucht werden. Damit ein neuer Werkstoff in den Verkehr gebracht werden darf, muß er zwar bezüglich seiner Eignung bewertet, jedoch nicht notwendigerweise klinisch getestet werden (Hickel 1998b). Inwieweit überdies Differenzen zwischen den Deutungen derartiger Tests und der tatsächlichen Verträglichkeit bestehen, ist umstritten, nachdem in solchen Testsystemen keine Abbauprodukte der Materialien, wie sie durch Enzymkontakt entstehen können, berücksichtigt werden (Bean et al. 1994; Wataha et al. 2001). Durch das CE-Kennzeichen auf einem Produkt wird also lediglich bestätigt, dass die grundlegenden Anforderungen nach den Vorgaben des Medizinproduktegesetzes erfüllt sind und dass ein Konformitätsverfahren für das Produkt durchlaufen ist. Ferner muß beachtet werden, dass die Verträglichkeit solcher Materialien nicht allein von ihren Eigenschaften, sondern auch von der individuellen Reaktionsbereitschaft des Patienten abhängig ist. Eine sichere Voraussage über ihre Verträglichkeit ist deshalb selbst bei untersuchten Stoffen nie möglich und es bleibt stets ein unbekanntes individuelles Restrisiko zurück, das durch keine Voruntersuchung ausgeschlossen werden kann (Heintzenberg 2002).

Nachdem in den letzten Jahrzehnten bei zahnärztlichen Werkstoffen auf Kunststoffbasis in erster Linie physikalische Eigenschaften wie Bruch- und Biegefestigkeit, Abrasionsverhalten

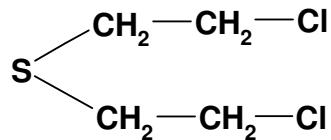
oder Farbstabilität im Mittelpunkt der Forschung standen, wird gegenwärtig auch die Frage ihrer Biokompatibilität vermehrt untersucht. Ganz im Gegensatz zu Amalgamfüllungen, die bis Anfang der neunziger Jahre überwiegend eingesetzt wurden, ist bei den Füllungsmaterialien aus Kunststoff das Maß wissenschaftlicher Erkenntnisse bezüglich ihrer Bioverträglichkeit noch vergleichsweise gering (Geurtsen 1998; Schmalz 1998). Aus diesem Grund sind die Dentalpolymere innerhalb der vergangenen Jahre zunehmend ins Blickfeld der Wissenschaft gerückt (Schedle et al. 1998).

In zahlreichen Veröffentlichungen wurden immer wieder Fälle beschrieben, in denen bei zahnärztlichem Personal nach Kontakt mit den verschiedenen Inhaltsstoffen von Kompositen Dermatiden, Konjunktividen sowie gastrointestinale Beschwerden aufgetreten waren (Mathias et al. 1979; Lonnroth et al. 1997). Ebenso wurde im Zuge der steigenden Anzahl an Studien, die sich seither mit möglichen gesundheitsschädlichen Auswirkungen dieser Stoffgruppe befassen, wiederholt auf die zytotoxische Wirkung verschiedener Inhaltsstoffe hingewiesen (Yoshii 1997; Schedle et al. 1998). Vor allem die beiden Komonomere TEGDMA und HEMA, welche aus Kompositen und Dentinadhäsiven bereits innerhalb weniger Stunden nach der Polymerisation in Mikrogramm-Konzentrationen freigesetzt werden, gehören zu den am häufigsten mit negativen lokalen und systemischen Effekten assoziierten Bestandteilen (Geurtsen 2000; Issa et al. 2004). Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit bereits wiederholt intensivere Toxizitätsstudien für diese Kompositkomponenten gefordert (Geurtsen et al. 1997). Die Komonomere TEGDMA und HEMA wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit näher auf ihre Zytotoxizität und ihr entzündungsförderndes Potential untersucht.

### **1.2 Vergleichssubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid**

Um Aussagen über die in-vitro-Toxizität von dentalen Restaurationsmaterialien treffen zu können, müssen die gewonnenen Untersuchungsergebnisse zunächst anhand geeigneter Vergleichssubstanzen eingeordnet und bewertet werden. In verschiedenen Studien wurden für TEGDMA und HEMA neben ihren zellschädigenden Effekten auch mehrfach entzündungsfördernde Eigenschaften postuliert (Schmalz et al. 2000). Überdies macht die mögliche Entstehung von hochreaktiven Metaboliten (z.B. Epoxiden) beim Abbau der Komonomere auch ein Auftreten DNA-schädigender Effekte denkbar (Nuhn 1993; Reichl et al. 2002a). Aus diesem Grund wurde als positives Referenzmaterial für die durchzuführenden Zytokinstudien eine Substanz ausgewählt, welche bei Testung eine reproduzierbare zytotoxische und proinflammatorische Reaktion erzeugt.

Das in Abbildung 3 dargestellte 2,2'-Dichlordiethylsulfid (Schwefellost) stellt den Prototypen einer erbgutschädigenden und entzündungsfördernden Substanz dar. Schwefellost ist ein Alkylanz und gehört zur Gruppe der Lostverbindungen. Für dieses Agens sind DNA-schädigende Effekte und die Induktion proinflammatorischer Zytokine in der Literatur sicher beschrieben worden (Arroyo et al. 1999; Arroyo et al. 2000; Arroyo et al. 2001).



**Abbildung 3: Chemische Struktur von 2,2'-Dichlordiethylsulfid (Schwefellost).**

Loste sind Verbindungen mit ausgeprägten lokal schädigenden Eigenschaften und von hoher systemischer Toxizität. Letztere beruht auf der Bildung eines hochreaktiven und stark elektrophilen Carbeniumions mit hoher Affinität zu verschiedenen nukleophilen Zentren, wie Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxyl-, Carboxyl-, Phosphat- und Imidazolgruppen. Durch kovalente Bindung oder Alkylierung können Loste mit den genannten Gruppen interagieren und dadurch die Funktion zahlreicher Moleküle des Organismus, wie Proteine, Enzyme und Aminosäuren empfindlich stören. Nach Aufnahme über Augen und Haut sowie oral oder inhalatorisch entfaltet Schwefellost seine schädigende Wirkung vorwiegend an Wechselgeweben mit hoher Zellteilungsrate. Ähnlich wie die beim Abbau der Komonomere möglicherweise entstehenden intermediären Epoxide reagiert S-Lost mit der DNA vorwiegend am Stickstoff (N7) des Guanins. Dadurch kommt es zu Doppelstrangbrüchen und Fehlpaarungen, die für die mutagenen und teratogenen Effekte von 2,2'-Dichlordiethylsulfid verantwortlich gemacht werden. Aufgrund der Reagibilität beider Chlorethylgruppen kann es dabei mitunter auch zur Quervernetzung zweier DNA-Stränge - der so genannten „bifunktionalen Alkylierung“ - kommen (Dacre et al. 1996; Lindsay et al. 1997).

### **1.3 Pifithrin- $\alpha$**

Mehrere Studien aus der Vergangenheit belegen, dass nach Exposition mit Komonomeren bei verschiedenen in-vitro-Zellkulturen sowohl antiproliferative als auch zytotoxische Effekte auftreten können (Kehe et al. 2001; Issa et al. 2004). Über die genauen Mechanismen, welche zur Induktion solcher Zellschäden führen, ist hingegen noch relativ wenig bekannt. Kürzlich

wurde nachgewiesen, dass das Komonomer TEGDMA bei primären humanen Gingivafibroblasten (Janke et al. 2003) und A549-Zellen (Bahnmann et al. 2002b) konzentrations- und zeitabhängig zum so genannten programmierten Zelltod (Apoptose) führt. In weiteren Studien wurde beobachtet, dass die Apoptoserate bei Pulpazellen in Kontakt mit Dentinadhäsiven vom Polymerisationsgrad der Materialien abhängt (Mantellini et al. 2003). Welche Regulatoren an der Übermittlung dieser zytotoxischen Effekte beteiligt sind, bleibt nach wie vor ungeklärt. Durch die gezielte Blockade eines wichtigen Regulationsweges beim programmierten Zelltod sollten deshalb Erkenntnisse über die an der Zytotoxizität der Komonomere beteiligten Mechanismen gewonnen werden.

In der Tumorthherapie wurde im Jahre 1999 erstmals die chemische Verbindung 2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyethanon (Pifithrin- $\alpha$ ) eingesetzt, nachdem sich herausgestellt hat, dass es mit Hilfe dieser Substanz gelingt, einen bedeutenden Kontrollpunkt bei der Unterdrückung von abnormalem Zellwachstum - nämlich das Tumorsuppressorgen p53 - temporär zu blockieren (Komarov et al. 1999). Als Signaltransduktor nach Zellschädigungen kommen dem Tumorsuppressor insbesondere zwei wichtige Funktionen zu: Nach einer Schädigung der Zell-DNA wird einerseits über die Aktivierung des p53-Gens sichergestellt, dass die geschädigten Zellen nicht in ihrem Zellzyklus fortschreiten können. Durch den Zyklusarrest können dann verschiedene DNA-Reparaturmechanismen stattfinden, so dass eine Replikation des geschädigten Genoms unterbunden wird. Andererseits kann durch den aktivierten Tumorsuppressor bei irreparablen Schädigungen der Zelle aber auch ihr Untergang via Apoptose induziert werden (Komarova et al. 2001).

Mit Hilfe dieser Schutzfunktionen des Tumorsuppressors p53 wird also sowohl die Weitergabe veränderter genetischer Information von einer Zellgeneration auf die nachfolgende verhindert als auch die Ausmerzung sublethal geschädigter Zellen durch Induktion des programmierten Zelltods forciert (Komarov et al. 1999). In den durchgeführten Versuchen wurde Pifithrin- $\alpha$  somit als synthetischer Antagonist von p53 eingesetzt, um eine etwaige Beteiligung dieses Signaltransduktors an der Vermittlung zellschädigender Effekte von Komonomeren aufzuklären.

### **1.4 Zytokine**

Im Rahmen vergangener Studien wurden für verschiedene Inhaltsstoffe aus dentalen Restaurationsmaterialien bereits häufiger proinflammatorische Eigenschaften postuliert (Hansasuta et al. 1993; Costa et al. 1999). Bei der Beurteilung der Biokompatibilität von

Dentalmaterialien kann daher insbesondere die Induktion bzw. Regulationsänderung von Entzündungsmediatoren wertvolle Hinweise auf beginnende zytotoxische Vorgänge liefern (Schmalz et al. 1998; Schmalz et al. 2001). Besonders im frühen Stadium nach Exposition beziehungsweise nach Anwendung sublethaler Konzentrationen sind Sekretion und Expression solcher Biomarker als Indikatoren latenter Zellschäden von hoher Relevanz. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Regulationsvorgänge ausgewählter inflammatorischer Zytokine nach einer Zell-Exposition mit dem Komonomer TEGDMA genauer untersucht.

Zytokine sind kleine, niedermolekulare Proteine/Glykoproteine, die als Botenstoffe eines dynamischen Zellkommunikationsnetzwerkes fungieren. Im Organismus kommen sie vorwiegend transient vor und sind dementsprechend schon in extrem niedrigen Konzentrationen im Nano- bis Pikogrammbereich biologisch wirksam. Die meisten Zytokine werden als wasserlösliche Moleküle sezerniert, wobei auch membranverankerte beziehungsweise an die extrazelluläre Matrix gebundene Formen existieren. In ihrer Eigenschaft als pleiotrope (d.h. multifunktionale) Mediatoren werden sie von einer Vielzahl verschiedener Zellen produziert und können über spezifische Oberflächenrezeptoren ihrer jeweiligen Zielzellen unterschiedliche Wirkungen vermitteln (Walsh et al. 2000). Neben autokrinen, d.h. auf die produzierende Zelle selbst wirkenden Effekten, können Zytokine auch parakrine (= auf die Nachbarzellen gerichtete) sowie endokrine (= systemische) regulatorische Funktionen erfüllen. Innerhalb ihres kreuzregulatorischen Netzwerks können diese Botenstoffe zudem sowohl synergistische als auch antagonistische Wirkungen entfalten. Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen, zu denen beispielsweise die Immunantwort, Entzündungsreaktionen, die Wiederherstellung von Geweben, die Angiogenese sowie neoplastische Entartungen von Zellen gehören. Ein Ungleichgewicht der Zytokinproduktion und -interaktion ist deshalb an der Entstehung vieler pathologischer Prozesse maßgeblich beteiligt (Kondo et al. 2000).

Die Gruppe der Zytokine umfasst zahlreiche Vertreter, darunter Interleukine, Interferone, Chemokine und andere (Vilcek 1998). Im Nachfolgenden sind die - zur Bewertung proinflammatorischer Effekte der Komonomere ausgewählten - Entzündungsmarker IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 kurz bezüglich ihrer Funktion näher beschrieben. Bei früheren Untersuchungen zu entzündungsfördernden Eigenschaften von Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien wurde insbesondere diesen Zytokinen große Bedeutung beigemessen (Schmalz et al. 1998).

### **1.4.1 Interleukin 6**

Interleukin 6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin, welches sowohl von T- und B-Lymphozyten als auch nicht-lymphatischen Zellen (wie Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Granulozyten, glatten Muskelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten) nach Stimulation sezerniert wird. Weil IL-6 unter anderem die finale Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen bewirkt, wird es oft auch „B-Zell-Differenzierungsfaktor“ genannt (Ishihara et al. 2002).

Zu weiteren wichtigen biologischen Aktivitäten dieses Zytokins zählen die Aktivierung von T-Zellen mittels IL-2-Rezeptorsynthese, die Induktion der Synthese von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten gemeinsam mit IL-1 und TNF- $\alpha$ , synergistische Effekte mit IL-3 im frühen Stadium der Hämato- und Thrombopoese sowie die Induktion des Wachstums und der Proliferation von Keratinozyten, Plasmozytomen, Myelomen und Hybridomen (Hirano 1998). Bei der Immunabwehr spielt IL-6 somit eine entscheidende Rolle. Infolgedessen wird die Dysregulation seiner Expression häufig mit der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, wie z.B. verschiedener Autoimmunerkrankungen und chronisch-inflammatorischer Prozesse, in Verbindung gebracht (Hirano 1998; Schmalz et al. 2000). Auch als Parameter zur Evaluierung der biologischen Aktivität von dentalen Restaurationsmaterialien ist IL-6 besonders in subtoxischen Konzentrationen geeignet (Schmalz et al. 1998; Schmalz et al. 2000).

### **1.4.2 Interleukin 8**

Interleukin 8 (IL-8) gehört zu einer neuen Klasse von Zytokinen, welche übergeordnet auch als Chemokine bezeichnet werden. Diese Gruppe verdankt ihren Namen der ausgeprägten Fähigkeit migratorische Immunzellen anzulocken. Bei IL-8 handelt es sich ebenfalls um ein inflammatorisches Zytokin, welches nach endo- oder exogener Stimulation von vielen Zelltypen (u.a. Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Bronchialepithelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten, Mesangialzellen und Chondrozyten) produziert wird. Bei einigen Tumorzelllinien konnte überdies auch eine konstitutive Ausschüttung von IL-8 nachgewiesen werden (Mizuno et al. 1994).

Bezüglich seiner Fähigkeit, spezifisch neutrophile Granulozyten zu aktivieren, unterscheidet sich IL-8 von allen anderen Zytokinen und wird deshalb oft als „Neutrophile aktivierender Faktor“ bezeichnet. Nach ihrer Anheftung an das Endothel (Adhäsion) ist IL-8 maßgeblich

am Austreten dieser Entzündungszellen in geschädigtes Gewebe (Extravasation) beteiligt. Durch Migration gelangen die aktivierten Granulozyten daraufhin entlang eines chemischen Gradienten in das Entzündungsgebiet („Chemotaxis“) und können dort mittels Freisetzung verschiedener Enzyme („Degranulation“) und unter Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen („respiratory burst“) ihre Aufgabe in der Immunabwehr wahrnehmen (Lösch et al. 2000).

Auch IL-8 kann daher als ein wichtiger Marker entzündlicher Prozesse angesehen werden (Konig et al. 1999). Darüberhinaus wird dieses Zytokin häufig mit der Entstehung verschiedener Lungenkrankheiten assoziiert. Durch seine Wirkung als potenter angiogenetischer Faktor kommt ihm zudem auch eine entscheidende Bedeutung bei Prozessen wie der Wundheilung und Tumorentstehung zu (Wuyts et al. 1998; Schmalz et al. 2000). Auch im Zusammenhang mit proinflammatorischen Reaktionen nach Exposition mit Bestandteilen aus dentalen Restaurationsmaterialien wurde schon eine gesteigerte Synthese von IL-8 beobachtet (Schmalz et al. 2000).

### **1.4.3 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1**

Die multifunktionale Familie der TGF- $\beta$ -Mediatoren setzt sich aus drei strukturell und funktionell eng verwandten Isoformen zusammen, von denen der Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) die prävalente Form darstellt (Khalil et al. 1996). Allen Isotypen ist gemeinsam, dass sie als Vorläufer in latenten inaktiven Komplexen sezerniert und erst bei Bedarf zu aktiven Homodimeren gespalten werden. Neben einem kleineren Komplex, bestehend aus einem TGF- $\beta$ -Dimer und dem nicht-kovalent gebundenen „Latency associated Peptide“ (LAP), existiert zusätzlich noch ein größerer an das LAP mittels Disulfidbrücke gebundener Komplex, der auch als „latent TGF- $\beta$  binding Protein“ (LTBP) bezeichnet wird. Zweck einer solchen Komplexierung ist einerseits die Stabilisierung des Zytokins, wodurch unkontrollierte Interaktionen mit Rezeptoren unterbunden werden. Zum anderen wird über diesen Mechanismus auch die Speicherung des TGF- $\beta$ -Moleküls in seiner inaktiven Form ermöglicht. Die Depotbildung von latentem Wachstumsfaktor in der extrazellulären Matrix konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Khalil 1999). Neben der biologischen Aktivierung durch Proteasen kann die Freisetzung von gebundenem TGF- $\beta$ 1 unter in-vitro-Bedingungen auch durch Ansäuerung erfolgen.

Charakteristischerweise induziert TGF- $\beta$ 1 eine Vielzahl biologischer Aktivitäten und ist an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt. Nachdem der Wachstumsfaktor nahezu von allen Zellen sezerniert wird und diese entsprechend auf ihrer Oberfläche TGF- $\beta$ -

Rezeptoren exprimieren, ist die biologische Antwort komplex und hängt stark vom jeweiligen Zelltyp sowie von den begleitenden physiologischen Bedingungen (Konzentration, Präsenz anderer Faktoren) ab. Bei einigen Prozessen kann TGF- $\beta$ 1 zudem auch wichtige autokrine Funktionen erfüllen, da es zur Stimulation seiner eigenen Synthese befähigt ist.

Aufgrund seiner Kontrollfunktion bei der Zellproliferation und -differenzierung ist TGF- $\beta$ 1 unmittelbar an fundamentalen Vorgängen im Organismus, wie der Organ- und Gewebsentwicklung, sowie an Prozessen der Immunabwehr und Tumorigenese beteiligt. Dabei entfaltet der Wachstumsfaktor zumeist bimodale Aktivitäten: So kann TGF- $\beta$ 1 beispielsweise bei der Zellproliferation mitogen wirken, aber es werden durch den Mediator in Abhängigkeit von Zelllinie und -typ auch verschiedene antiproliferative Effekte induziert. Auch bei der Angiogenese besitzt der Wachstumsfaktor einerseits fördernde und andererseits hemmende Eigenschaften. Neben wenigen immunstimulierenden Funktionen, wie z.B. die Aktivierung von Makrophagen, ist sein Einfluss auf die Immunantwort meist supprimierender Natur. Dies zeigt sich vor allem in der ausgeprägten Fähigkeit von TGF- $\beta$ 1, die Proliferation von T- und B-Lymphozyten zu unterbinden und die Sekretion weiterer Zytokine zu beeinflussen, wodurch deren aktivierende Wirkung bei den Effektorzellen aufgehoben wird (Derynck et al. 1998).

Durch seine Fähigkeit, die Ablagerung extrazellulärer Matrixkomponenten zu generieren, ist TGF- $\beta$ 1 auch häufig an der Entstehung fibrosierender Prozesse beteiligt. Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 gehört damit zu den Hauptkomponenten, welche die körpereigene Immunabwehr dirigieren und den Wundheilungsprozess nach einer Entzündungsreaktion steuern (Chen et al. 1999; Wahl 1999; Coker et al. 2001; Chambers et al. 2003).



## **1.5 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Zytotoxizität und des proinflammatorischen Potentials von Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien mit Hilfe verschiedener in-vitro-Verfahren.

1. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Komonomere TEGDMA und HEMA bei verschiedenen Zelllinien zeit- und dosisabhängige zytotoxische Effekte hervorrufen. Hierzu durchgeführte Toxizitätstests haben ergeben, dass die Schädigung exponierter Zellen stark von der verwendeten Untersuchungszelllinie und dem jeweiligen Monomertyp abhängt. Untersucht wurde deshalb:

Der zeitliche zytotoxische Effekt der Komonomere TEGDMA und HEMA auf die humane Lungentumorzelllinie A549.

2. Wie bereits aus früheren Untersuchungen hervorgeht, werden aus dentalen Restaurationsmaterialien auf Kunststoffbasis laufend unvernetzte Bestandteile mit dem Speichel eluiert. Diese so genannten Restmonomere können daraufhin verschluckt und im Darm resorbiert werden oder über die Diffusion durch das Dentin in die Blutzirkulation gelangen. Für die anschließende Verstoffwechslung freigesetzter Komonomere wurde die Entstehung toxischer Metabolite postuliert. Untersucht wurde deshalb:

Der Einfluss der Komonomere TEGDMA und HEMA sowie wichtiger - bei ihrem Abbau entstehender - Metabolite auf die Zellvitalität von humanen A549-Lungentumorzellen.

3. Bei der Untersuchung zelltoxischer Effekte kann insbesondere die Art induzierter Zellschäden wichtige Hinweise über die Toxizität der zu untersuchenden Substanzen liefern. In-vitro-Versuche an Zellkulturen haben gezeigt, dass das Komonomer TEGDMA bei exponierten Zellen dosisabhängig Apoptosen induziert. Für die Induktion dieser Form des Zelltods existieren mehrere Signalwege. Das Tumorsuppressorprotein p53 stellt einen bedeutenden Signaltransduktor bei der Apoptose dar. Untersucht wurde deshalb:

Der Einfluss des synthetischen p53-Antagonisten Pifithrin- $\alpha$  auf die zytotoxische Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA bei humanen A549-Lungentumorzellen.

4. Bei in-vitro-Toxizitätsstudien können die in der frühen postexpositionellen Phase ablaufenden Regulationsvorgänge wichtige Hinweise über eine mögliche Induktion entzündlicher Prozesse durch dentale Restaurationsmaterialien liefern. Nachdem sich zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine zytotoxischen Effekte manifestieren, eignet sich insbesondere die Untersuchung proinflammatorischer Zytokine dazu, potentielle entzündliche oder schädigende Vorgänge zu detektieren. Untersucht wurde deshalb:  
Die Genexpression und Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 nach 4-stündiger Exposition von humanen A549-Lungentumorzellen mit dem Komonomer TEGDMA bzw. der entzündungsfördernden Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

Agarosegeldokumentation	Fluor-S MultiImager, BioRad (München)
Agarosegelkammer	Mini Sub Cell GT, BioRad (München)
Autoklav	Varioklav, H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Heizrührgerät	KMO Heizrührer, IKA (Staufen)
Inkubator	Inco 2, Memmert (Schwabach)
Lichtmikroskop	IM35, Zeiss (Jena)
Mikrotiterplattenlesegerät	MRX Revelation, Dynex Technologies (Virginia, USA)
MSI Minishaker	IKA (Staufen)
pH-Meter	Piccolo ATC pH-Meter, HANNA Instruments (Kehl a. R.)
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf (Hamburg)
Schüttelgerät	KS 250 basic, IKA Labortechnik (Staufen)
Spannungsgerät	Power Pac 1000, BioRad (München)
Sterilbank	HERA Safe, Heraeus (Osterode)
Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Hamburg)
Tischschüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries (N.Y., USA)
Tischzentrifuge	MiniSpin, Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	Heraeus (München)
Waage BP 1105	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus (Osterode)

### 2.2 Chemikalien

Albumin Standard (2 mg/mL)	Pierce (Illinois, USA)
2,2'-Dichlordiethylsulfid	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr (München)
2,3-Dihydroxy-2-methyl-propionsäure (Diol)	mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. M. Seiss zur Verfügung gestellt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Taufkirchen)

## Materialien

---

EDTA	Merck (Darmstadt)
2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure (Epoxid)	mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. M. Seiss zur Verfügung gestellt
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol absolut, p.A.	Merck (Darmstadt)
Ethidium Bromide Solution (10 mg/mL)	Promega (Mannheim)
Formaldehyd (37 %)	Merck (Darmstadt)
HEMA	ESPE (Seefeld)
Hepes	Sigma (Taufkirchen)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt)
Loading Buffer (5x)	BioRad (München)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
Methacrylsäure	Merck (Darmstadt)
Molecular Ruler	BioRad (München)
MOPS	Sigma (Taufkirchen)
NaCl	Sigma (Taufkirchen)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Sigma (Taufkirchen)
Natriumazid	Fluka (Taufkirchen)
Natriumhydroxid	Sigma (Taufkirchen)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Peq GOLD Universal Agarose	peQLAB (Erlangen)
2-(2-Imino-4,5,6,7-terahydrobenzo- thiazol-3-yl)-1-p-tolyethanon (Pifithrin- $\alpha$ )	Calbiochem (Schwalbach)
RNase AWAY <sup>®</sup>	Molecular Bio-Products, Fisher Scientific (Ingolstadt)
Salzsäure 37 % rauchend, p.A.	Merck (Darmstadt)
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	Quiagen (Hilden)
TEGDMA	ESPE (Seefeld)
Triethylenglykol	Merck (Darmstadt)
Tris/Acetic Acid/EDTA Buffer (50x)	BioRad (München)
Triton X-100	Boehringer (Mannheim)
Water, Molecular Biology Grade	Eppendorf (Hamburg)

### **2.3 Reaktionssysteme**

Bioplex Protein Array	BioRad (München)
Cell Proliferation Kit XTT	Roche (Mannheim)
DC Protein Assay	BioRad (München)
First strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche (Mannheim)
MPCR for Human Inflammatory Cytokine	
Genes Set-I	Maxim-Biotech (California, USA)
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II	Macherey + Nagel (Düren)
Quantikine TGF- $\beta$ 1 ELISA	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

### **2.4 Zellkulturmedien und –seren**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Gibco (Eggenstein)
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco (Eggenstein)
Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS)	Sigma (Taufkirchen)
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco (Eggenstein)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma (Taufkirchen)
RPMI 1640 Medium	Gibco (Eggenstein)
Trypsin-EDTA Solution (1x)	Boehringer (Mannheim)

### **2.5 Material für molekularbiologische Arbeiten**

BIOPUR Combitips plus 5 mL, 10 mL	Eppendorf (Hamburg)
BIOPUR 1,5 mL-Cups	Eppendorf (Hamburg)
Einmalküvetten, halbmikro	Brand (Wertheim)
Einmalküvetten Uvette	Eppendorf (Hamburg)
Filtertips 0,1-10 $\mu$ L, 2-100 $\mu$ L, 50-1000 $\mu$ L	Eppendorf (Hamburg)
Mikrotiterplatten (96-Well)	Falcon (Heidelberg)
Nalgene-Filter Unit 250 mL	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Omnifix 50 mL Einmalspritzen	Braun (Melsungen)
PCR-Tubes, thin walled, 0,5 mL	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Spritzenfilter (0,22 $\mu$ m)	Roth (Karlsruhe)

## Materialien

---

6-Well-Platten	Falcon (Heidelberg)
96-Well-Platten	Falcon (Heidelberg)
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup>	Falcon (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Falcon (Heidelberg)

## 2.6 Puffer und Lösungen

Bradford-Puffer:	2,0 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x 2 H <sub>2</sub> O) 0,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,0 g NaCl 0,2 g NaN <sub>3</sub> ad 1000 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,4
MOPS-Puffer (10 x):	41,8 g MOPS 15,62 mL 3M Natriumacetat → mit Essigsäure pH 5,0 (49,2 g + DEPC-H <sub>2</sub> O ad 200 mL) 20 mL 0,5 M EDTA → mit NaOH pH 8,0 (37,2 g + DEPC-H <sub>2</sub> O ad 200 mL) DEPC-H <sub>2</sub> O ad 1000 mL pH 7,2 (NaOH)
1,2 N NaOH / 0,5 M Hepes:	4,8 g NaOH Pellets 11,9 g HEPES ad 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### **3. Methoden**

#### **3.1 Kultur der A549-Zelllinie**

A549-Zellen sind epitheliale Zellen, die einem humanen Lungenkarzinom entstammen und aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung große Ähnlichkeit mit Alveolarepithelzellen vom Typ II aufweisen (Giard et al. 1973; Lieber et al. 1976). Die Lungentumorzellen wurden stets unter sterilen Bedingungen in RPMI-Medium, welches zuvor mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) supplementiert wurde, angezüchtet. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % aufbewahrt und zweimal wöchentlich passagiert (Split ratio 1:5). Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit 2-3 mL angewärmter PBS-Lösung gespült, um das serumhaltige Medium wegzuwaschen. Danach wurde der Monolayer mit 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und bis zum Abkugeln der Zellen für etwa 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und die abgelösten Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels eines Hämocytometers.

#### **3.2 Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung**

##### **Testprinzip:**

Zellschädigungen resultieren in der fehlenden Fähigkeit einer Zelle, den für ihre Funktion und ihr Wachstum nötigen Energiehaushalt aufrechtzuerhalten. Die metabolische Aktivität einer Zelle gibt somit Aufschluss über ihre Vitalität und kann zum Nachweis zytotoxischer Effekte herangezogen werden. Dieses Prinzip macht man sich beim so genannten XTT-Proliferationstest zunutze: unter Oxidation von NAD(P)H + H<sup>+</sup> zu NAD(P)<sup>+</sup> wird das farblose Tetrazoliumsalz XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzolsulfonsäure-hydrat) vorwiegend durch mitochondriale Dehydrogenasen intakter Zellen zu einem wasserlöslichen, orangen Formazan umgewandelt (s. Abb. 4). Diese Farbstoffbildung wird kolorimetrisch am Photometer gemessen, wobei die entstehende Farbintensität zur Zahl lebender Zellen korreliert (Mosmann 1983). Als Referenz dienen Kontrollansätze, d.h. Zellen, die nur dem reinen Medium exponiert werden und deren Substratumsetzung als maximal eingestuft wird, bzw. solche, die unter Zugabe des Detergens Triton X-100 (20 mM) vollständig lysiert wurden und deshalb als 0 % vital gewertet werden.

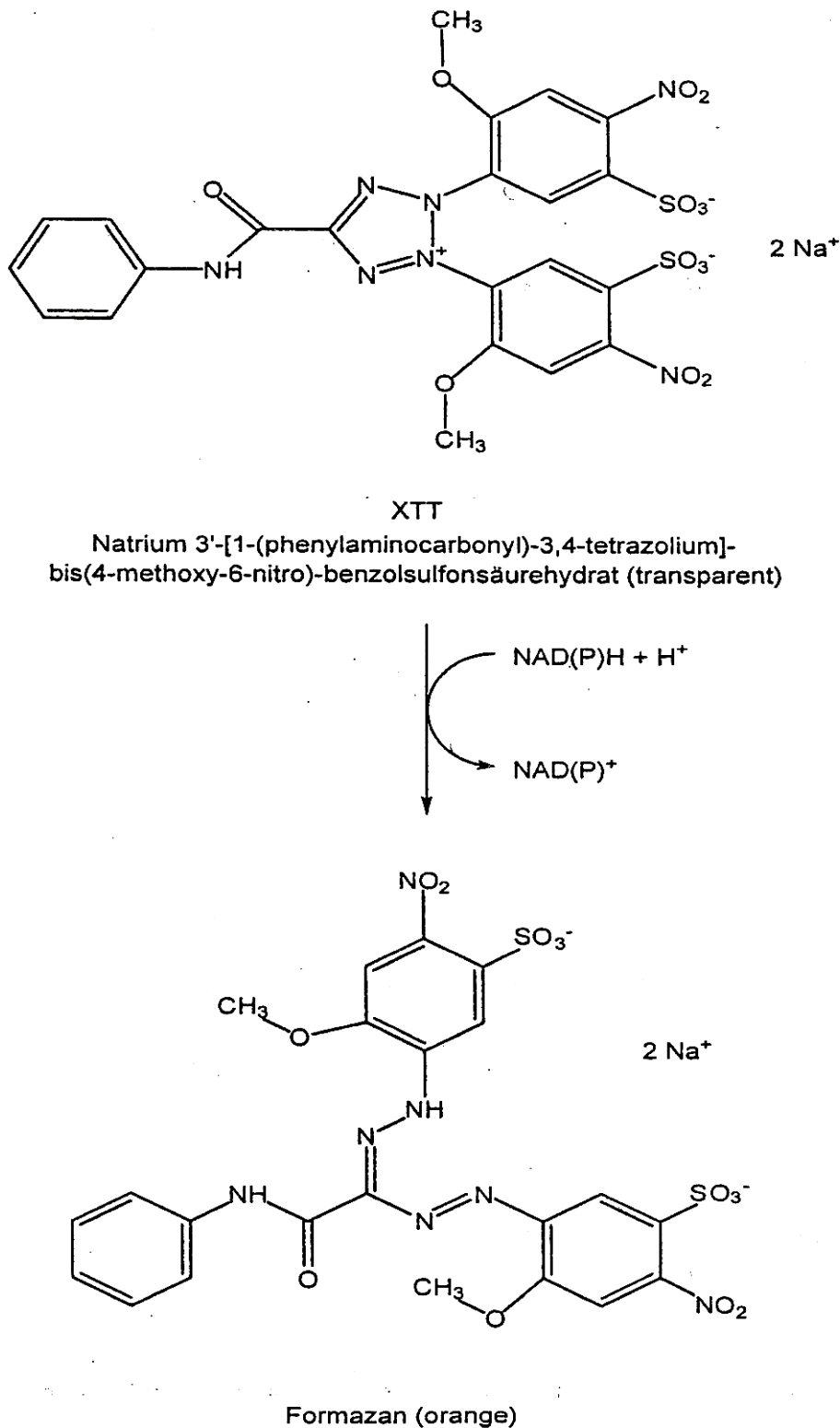


Abbildung 4: Schematische Darstellung der in den Zellmitochondrien ablaufenden Reaktionen beim XTT-Test: Reduktion des farblosen Tetrazoliumsalzes XTT zum löslichen, orangen Farbstoff Formazan durch mitochondriale Dehydrogenaseaktivität lebender Zellen.



### 3.2.1 Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA

5000 Zellen pro Well wurden auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Als Leerwert wurde eine Reihe mit reinem Medium belassen. Nach 24-stündiger Anzucht der Zellen im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Komonomers TEGDMA (30-10000  $\mu\text{M}$ ) bzw. HEMA (30-30000  $\mu\text{M}$ ), welche zuvor in dem Zellkulturmedium gelöst worden waren, inkubiert. Nach einer weiteren 4-, 20- beziehungsweise 44-stündigen Inkubationszeit wurde eine gemäß Herstellerangaben gefertigte Bestimmungslösung, bestehend aus einem so genannten Labeling- und einem Electron-coupling-Reagenz, aufgetragen. Die spektrophotometrische Formazanbestimmung erfolgte 4 h nach Reagenzzugabe an einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm. Der Versuch wurde insgesamt zweimal mit jeweils 12 Replikaten wiederholt.

### 3.2.2 Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten

Jeweils 10000 Zellen/Well wurden auf mehreren 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24 h Adhärenz den folgenden Substanzen in HBSS exponiert:

Substanz gelöst in HBSS	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]
TEGDMA	3 - 10000
HEMA	3 - 30000
Methacrylsäure	30 - 30000
Triethylenglykol + Methacrylsäure	30 - 10000
Paraformaldehyd	30 - 10000
Triethylenglykol	30 - 10000
2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure (Epoxid)	1 - 30000

Nach 20 h Inkubationszeit im Brutschrank wurde die gebrauchsfertige Bestimmungslösung des XTT-Kits aufgetragen. Weitere 4 h nach der Farbstoffzugabe erfolgte die spektrophotometrische Formazanbestimmung in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Testfilter = 450 nm; Referenzfilter = 670 nm).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure (Epoxid) bzw. die, bei der hydrolytischen Spaltung des Oxiranes entstehende, 2,3-Dihydroxy-2-methyl-propionsäure (Diol) in einer Konzentration von 0,001-10000  $\mu\text{M}$  in serumhaltigem D-MEM gelöst und derselbe Versuchsaufbau wiederholt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal mit jeweils 2 Replikaten durchgeführt.

### **3.2.3 Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA**

5000 Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen des Komonomers TEGDMA (30-10000  $\mu\text{M}$ ) bzw. HEMA (100-30000  $\mu\text{M}$ ), welche zuvor in RPMI-Medium gelöst worden waren, exponiert. Es wurden jeweils drei verschiedene Versuchsgruppen gebildet, in denen das jeweilige Komonomer entweder mit reinem Medium, mit Medium und 30  $\mu\text{M}$  Pifithrin- $\alpha$  (in DMSO gelöst) oder mit Medium und dem Lösemittel DMSO (30  $\mu\text{M}$ ) auf die Zellen aufgetragen wurde. Daraufhin wurden die so beschickten Mikrotiterplatten für 20 beziehungsweise 44 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit dem XTT-Reagenz versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h wurde die Substratumsetzung (wie oben beschrieben) am Mikrotiterplattenleser bei den oben genannten Wellenlängen ermittelt. Der Versuch wurde insgesamt zweimal mit jeweils 4 Replikaten wiederholt.

### **3.2.4 Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien**

Begleitend zu den Zytokinuntersuchungen wurde ein Vitalitätstest nach vierstündiger TEGDMA-Exposition der A549-Zellen durchgeführt:

5000 Zellen/Well wurden auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Anzucht der Zellen im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Komonomers TEGDMA (30–10000  $\mu\text{M}$  gelöst in RPMI-Medium) inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die gemäß Herstellerangaben gefertigte XTT-Bestimmungslösung aufgetragen und die gebildete Menge an Formazan 2 h nach Reagenzzugabe an einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Der Versuch wurde insgesamt zweimal mit jeweils 12 Replikaten wiederholt.

### **3.2.5 Auswertung und Statistik**

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 4.0 für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA): Durch nichtlineare Kurvenanpassung der Werte an eine sigmoidale Kurve mit variablem Hill-Koeffizienten wurde die EC<sub>50</sub> als halbmaximaler Effekt aus den errechneten Graphen bestimmt und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

Die so erhaltenen EC<sub>50</sub>-Werte wurden varianzanalytisch mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Abschätzung auf ihre Signifikanz überprüft (Forst 1985).

## **3.3 Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine**

### **3.3.1 Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay**

Je  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h im Brutschrank angezchtet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Komonomer TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu$ M (in RPMI) für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Im Falle der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid wurden die Zellen erst für 30 Minuten dem Alkylanz Schwefellost in den Konzentrationen 10-500  $\mu$ M (in MEM) exponiert und das Vergiftungsmedium daraufhin verworfen. Die Zellen wurden im Anschluss daran mit frischem RPMI-Medium versorgt und für weitere 3,5 h im Brutschrank belassen. Nach Ablauf des insgesamt vierstündigen Inkubationsintervalls wurde der Überstand abpipettiert und in Aliquoten von jeweils 1 mL bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen und danach mit 0,5 N NaOH vollständig lysiert. Das so gewonnene Zellhomogenat wurde bei -20 °C für die spätere Proteinbestimmung eingefroren.

#### **3.3.1.1 Proteinbestimmung**

Zur modifizierten Proteinbestimmung nach LOWRY (Lowry et al. 1951) wurde das DC Protein Assay der Firma Biorad angewandt. Zunächst wurde ein BSA-Standard (2 mg/mL) in Bradford-Puffer verdünnt und die Verdünnungsreihe am Eppendorf-Biophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen. Aus den gewonnenen Daten wurde eine Eichgerade erstellt. Das lysierte und eingefrorene Zellhomogenat wurde zur NaOH-Aktivierung für 12 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubiert und die Proben daraufhin im Verhältnis 1:1 mit

Bradford-Puffer verdünnt (pH-Einstellung). Anschließend wurden 10 µL Probe gemäß Herstellerangaben mit 50 µL alkalischer Kupfertartratlösung sowie 400 µL Folin-Reagenz vermischt. Die zu beobachtende Farbentwicklung beruht auf einer Interaktion zwischen Protein und Kupfer, wodurch das zugegebene Folin reduziert wird und so kolorimetrisch am Photometer bestimmt werden kann.

### **3.3.1.2 Bioplex-Immunoassay**

Zur Quantifizierung der beiden Zytokine IL-6 und IL-8 wurde das Bioplex Protein Array System der Firma Biorad angewandt, mit welchem in einem Ansatz simultan mehrere Proteine analysiert werden können. Das Prinzip dieses modifizierten Sandwich-Immunoassays beruht auf der Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Polystyrenkügelchen (so genannter Beads), an die ein spezifischer Antikörper kovalent gebunden ist. In einer Mikrotiterfilterplatte wurden die aufgetauten Zellkulturüberstände der TEGDMA- bzw. Schwefelost-exponierten Proben beziehungsweise ein bekannter Standard zusammen mit den Anti-IL-6- und Anti-IL-8-konjugierten Beads in die Plattenwells pipettiert und für 30 Minuten auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Hierbei wurden das im Überstand präsenzte IL-6 und IL-8 an den auf der Oberfläche der Polystyrenkügelchen haftenden Antikörper gebunden. Anschließend wurde die Platte durch Vakuumfiltration gewaschen und ein zweiter biotinylierter Detektionsantikörper, welcher spezifisch an ein anderes Epitop der gesuchten Zytokine IL-6 und IL-8 bindet, wurde hinzugegeben. Danach wurde die Wellplatte für weitere 30 Minuten unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung von überschüssigem Detektionsantikörper mittels einer erneuten Vakuumfiltration wurde mit rekombinantem Phycoerythrin markiertes Streptavidin zugegeben. Es folgten ein dritter 10-minütiger Inkubationsschritt sowie weitere Waschschrirte, um das ungebundene Streptavidin zu entfernen. Die Quantifikation der Zytokine erfolgte im so genannten Protein Array Reader, welcher nach folgendem Prinzip funktioniert: Mittels einer Kanüle wird jeweils ein kleines Volumen aus der Probe aufgenommen und zu einer Durchflusszelle geleitet, welche die Beads einzeln in einem gleichmäßigen Strom durchfließen. Hierbei werden die Polystyrenkügelchen an zwei verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Während der erste „rote“ Laser die einzelnen Kügelchen klassifiziert, dient der zweite „grüne“ Laser (mit einer Exzitations-Wellenlänge von 532 nm) zur Anregung der auf der Kügelchenoberfläche gebundenen Fluorochrome, wodurch die gebundene Menge an IL-6 und IL-8 aufgrund ihrer Emission bei einer Wellenlänge von 575 nm quantifiziert wird (Vignali 2000; Zhang et al. 2000; Zimmermann et al. 2001).

Die so gemessenen Zytokin-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden auf den Gesamtproteingehalt der Kulturflasche normiert und in pg Zytokin pro mg Protein umgerechnet.

### **3.3.1.3 TGF- $\beta$ 1-ELISA**

Die im Kulturüberstand vorhandene Menge an TGF- $\beta$ 1 wurde mithilfe des Enzyme-linked-Immunsorbent-Assays (ELISA) bestimmt. Hierzu wurde das Quantikine Kit für humanes TGF- $\beta$ 1 der Firma R&D Systems verwendet. Da der Transforming Growth Factor von Zellen als latenter Komplex sezerniert wird, wurden zur Aktivierung zunächst je 500  $\mu$ L frisch aufgetauter und raumtemperierter Zellkulturüberstand der TEGDMA- bzw. 2,2'-Dichlordiethylsulfid-exponierten Zellkulturen mit je 100  $\mu$ L 1 N HCl angesäuert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert. Die Proben wurden daraufhin mit 150  $\mu$ L einer 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES-Lösung neutralisiert und der Soll-pH-Wert von 7,2-7,6 mittels Indikatorpapier stichprobenartig kontrolliert. Nachdem das mit FKS supplementierte Zellkulturmedium einen TGF- $\beta$ 1-Eigengehalt von bis zu 1600 pg/mL aufweisen kann, wurde neben den zu ermittelnden Proben auch ein Mediumleerwert als Kontrolle mitgeführt. 200  $\mu$ L der aktivierten Probe bzw. einer parallel angelegten Standardverdünnungsreihe wurden in eine mit rekombinantem humanem TGF- $\beta$  sRII-beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte für 3 h bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen und für weitere 1,5 h mit 200  $\mu$ L TGF- $\beta$ 1-Konjugat, welches aus einem mit Meerrettichperoxidase konjugierten polyklonalen Anti-TGF- $\beta$ 1-Antikörper bestand, inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe sowie eine 20-minütige Inkubation mit Substratlösung, bestehend aus stabilisiertem Hydrogenperoxid und dem Chromogen Tetramethylbenzidin.

Für den letzten Reaktionsschritt wurden je 50  $\mu$ L Stopp-Solution in Form von 2 N Schwefelsäure pro Well aufgetragen. Die Farbumsetzung wurde innerhalb von 30 Minuten im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm spektrophotometrisch vermessen.

Die im ELISA ermittelte TGF- $\beta$ 1-Konzentration wurde anschließend auf die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Kulturflasche normiert. Die Ergebnisse konnten so in pg TGF- $\beta$ 1 pro mg Protein ausgedrückt und miteinander verglichen werden.

### **3.3.1.4 Auswertung und Statistik**

Sämtliche in den Immunoassays erhobenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.0 für Windows varianzanalytisch (ANOVA mit anschließender Bonferroni-Abschätzung) auf ihre Signifikanz überprüft (Forst 1985).

### **3.3.2 Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR**

#### **Testprinzip:**

Eine geeignete Technik zur Messung der Expressionsstärke bekannter Gene in verschiedenen Geweben stellt die so genannte Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dar. Dieser Methode liegt die Hypothese zugrunde, dass die Aktivität eines Gens mit der Menge an intrazellulär vorhandener spezifischer Messenger-RNA (mRNA) korreliert. Von besonderem Vorteil ist insbesondere ihre 1000- bis 10000-fach höhere Sensitivität im Vergleich zu traditionellen RNA-Blotting-Techniken, weshalb mit dieser Methode auch schon sehr geringe Mengen von teilweise degradiertem RNA detektiert werden können (Schröder 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine in A549-Zellen nach Exposition mit dem Komonomer TEGDMA bzw. der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid untersucht. Dazu wurden die exponierten Zellen zunächst lysiert und ihre Gesamt-RNA wurde isoliert. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase wurde die extrahierte RNA daraufhin in die einzelsträngige und stabilere Form der komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wurde diese cDNA unter Zugabe von spezifischen Oligonukleotiden (Primern) und dem hitzestabilen Enzym Taq-Polymerase in einer Multiplex-PCR vervielfältigt. Um genauere Aussagen über die ursprünglich in den Zellen vorhandene Menge der jeweiligen mRNA machen zu können, bediente man sich eines internen Kontrollstandards. Zu diesem Zweck wurden in demselben Versuchsansatz Primer für die zu ermittelnde Sequenz sowie für das ubiquitär exprimierte Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Dieses Enzym kommt konstitutiv in allen Säugetierzellen sowie in Bakterien und höheren Pflanzen vor (Suzuki et al. 2000). Nach Auftrennung in einem 2 %-igen Agarosegel wurden die entsprechenden Banden densitometrisch ausgewertet, was eine semiquantitative Aussage zur Expression der untersuchten Sequenzen ermöglicht.

Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in einer  $25 \text{ cm}^2$  Kulturflasche ausgesät und für 24 h im Brutschrank angezüchtet. Anschließend wurden sie mit TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu\text{M}$  für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Im Falle der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid wurden die Zellen zunächst mit Schwefellost in den Konzentrationen 10-500  $\mu\text{M}$  vergiftet und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Vergiftungsmedium (MEM) entfernt, frisches RPMI-Medium zugegeben und die Zellen für weitere 3,5 h im Brutschrank belassen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in Medium resuspendiert. Mittels Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer wurde ein Zelltitel von  $1 \times 10^6$  Zellen eingestellt und die Zellsuspension anschließend zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden daraufhin bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

### **3.3.2.1 RNA-Isolierung**

Um eine Kontamination der Proben mit ubiquitär vorhandenen RNasen zu vermeiden, wurden bei allen Arbeitsgängen mit RNA stets Handschuhe getragen. Ferner wurden sämtliche Arbeitsschritte mit RNA auf Eis ausgeführt. Für das Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde ausschließlich Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser (DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ ) verwendet. Außerdem wurden alle benötigten Materialien und Geräte vor Versuchsbeginn mit 80 %-igem Ethanol gereinigt und anschließend mit RNaseAWAY<sup>®</sup>-Lösung dekontaminiert. Zur Isolierung wurden ausschließlich RNase-freie Filter-Pipettenspitzen und Tubes benutzt.

Die RNA-Extraktion wurde gemäß dem Protokoll des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kits der Firma Macherey und Nagel durchgeführt. Gefrorene Zellpellets von je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit einem Gemisch aus 3,5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol und 350  $\mu\text{L}$  RA1-Lysispuffer versetzt, bei Raumtemperatur ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aufgetaut und durch mehrmaliges Vortexen lysiert. Das Lysat wurde auf einen Filter verbracht und 1 Minute bei  $11000 \times g$  zentrifugiert. Neben einem Aufreinigungseffekt konnten so eventuell vorhandene RNasen inaktiviert, die Viskosität der Lösung herabgesetzt und - durch die hohe Konzentration der im Puffer enthaltenen chaotropen Salze - die Bindungsfähigkeit der Nukleinsäuren an die Silicamembran erhöht werden. Dem Filtrat wurden daraufhin 350  $\mu\text{L}$  70 %-iger Ethanol zugegeben und die Lösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Eine RNA-Säule wurde mit dem Homogenat beladen, nach Zentrifugation ( $8000 \times g$ , 30 sec) der Durchfluss verworfen und die Säule mit 350  $\mu\text{L}$  Membranentsalzungspuffer für den anschließenden DNase-Verdau vorbereitet. An die Membran gebundene DNA wurde durch eine 15-minütige Inkubation mit 95  $\mu\text{L}$  DNase-Reaktionsmix eliminiert, der Verdau durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  eines DNase-

inaktivierenden RA2-Puffers gestoppt und die Säule danach sukzessive in mehreren Waschschrritten gewaschen. Nach dem letzten Beladungsschritt wurde die Säule schließlich in ein neues 1,5 mL Biopur-Tube der Firma Eppendorf verbracht und die gebundene RNA mit 60  $\mu$ L DEPC-Wasser eluiert.

Jeweils 6  $\mu$ L der so gewonnenen Probe wurden unmittelbar im Anschluß an die Extraktion mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und am Photometer quantifiziert. Die restliche RNA-Lösung wurde bei -20 °C eingefroren.

### **3.3.2.2 RNA-Formaldehydgel**

Um die Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen, wurde auf einem denaturierenden Formaldehydgel die Menge und Qualität der gewonnenen RNA nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht beurteilt.

Hierzu wurde zunächst ein 1 %-iges Agarose-Formaldehydgel nach folgendem Protokoll hergestellt: 1 g Agarose wurde in 36,6 mL DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und in der Mikrowelle unter Schwenken aufgekocht. Anschließend wurden 5 mL MOPS-Puffer (10x) und - nach Abkühlen der Lösung auf etwa 60 °C - zusätzlich 8,4 mL Formaldehyd (37 %) und 2,4  $\mu$ L Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gel wurde in einen Gießstand gefüllt und für ca. 30 Minuten ausgehärtet.

Zu 8  $\mu$ L der isolierten Gesamt-RNA (mind. 500 ng berechnet auf Basis der Messung der optischen Dichte) aus Frischzellen bzw. eingefrorenen Zellpellets wurden 2  $\mu$ L Nucleic Acid Sample Buffer gemischt und nach Befüllen der Geltaschen und Zugabe des 1:10 verdünnten MOPS-Laufpuffers eine einstündige Gelelektrophorese bei 80 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die spezifischen ribosomalen RNA-Banden (18 S und 28 S) unter einem UV-Transilluminator visualisiert und fotografiert.

### **3.3.2.3 Photometrische Quantifizierung und Reinheitsbestimmung**

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit der Proben wurden durch eine spektralphotometrische Messung ihrer optischen Dichte (OD) im UV-Bereich bestimmt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 6  $\mu$ L RNA-Lösung mit 54  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption jeder Probe bei 260 nm, 230 nm und 280 nm an einem Eppendorf Biophotometer gemessen. Die OD<sub>260nm</sub> ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden, während die Absorptionsmessung bei 230 nm über die Verunreinigung mit Polysacchariden und bei 280 nm über Kontamination mit Proteinen Aufschluss gibt. Die Verhältnisse von OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>230nm</sub> sowie von OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> sollten bei den RNA-Proben folgende



Grenzwerte nicht unterschreiten, da sonst keine lineare Abhängigkeit von der Absorption bei 260 nm zur Nukleinsäurekonzentration gegeben ist:

$$OD_{260\text{nm}}/OD_{230\text{nm}}: > 2,0$$

$$OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}: > 2,0$$

Alle Messungen wurden mit Einmal-UV-Küvetten der Firma Eppendorf vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im UV-Bereich aufweisen.

### 3.3.2.4 *RT (Reverse Transkriptase)-PCR*

Zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mußte die eukaryotische RNA zuerst in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das First-strand-cDNA-Synthese Kit für RT-PCR der Firma Roche benutzt. Bei dieser besonderen Art der PCR wird anstatt von DNA-Molekülen die aus Zellen isolierte Gesamt-RNA als Matrize für die Amplifikation eingesetzt. Die hierzu verwendete Avian Myoblastosis Virus DNA Polymerase (AMV Reverse Transkriptase) synthetisiert sowohl DNA- als auch RNA-abhängig und besitzt DNA Exonuklease Aktivität sowie RNase H Aktivität.

Pro Reaktion wurde zunächst ein Transkriptionsgemisch - wie folgt - auf Eis zusammenpipettiert:

- 2,0 µL 10x Reaktionspuffer
- 4,0 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,0 µL dNTP-Lösung
- 2,0 µL Primer
- 1,0 µL RNase Inhibitor
- 0,8 µL AMV Reverse Transkriptase

Je 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8,2 µL gebracht und zum Transkriptionsgemisch gegeben. Anschließend wurde das Gemisch mit folgendem Temperaturprofil im Mastercycler inkubiert:

- 5 min bei 65 °C      zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen
- 10 min bei 25 °C     zur Primeranlagerung
- 60 min bei 42 °C     zur Transkription
- 5 min bei 95 °C      zur abschließenden Denaturierung der Reversen  
Transkriptase

### 3.3.2.5 *Multiplex-PCR*

#### **Testprinzip:**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) führt zu einer exponentiellen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Saiki et al. 1985; Saiki et al. 1988). In einem initialen Denaturierungsschritt bei 96 °C werden zunächst die zusammengelagerten DNA-Stränge voneinander getrennt. Darauf folgt die so genannte Annealing-Phase (58 °C), während der sich die Primer an die Matrize anlagern. In der anschließenden Elongationsphase synthetisiert die hitzestabile Taq-Polymerase einen zur Matrize komplementären Strang mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1000 Basenpaaren (bp) pro Sekunde. Durch periodische Wiederholung dieses Temperaturprofils können die neusynthetisierten DNA-Sequenzen erneut vom Template abdissoziieren und ihrerseits als Matrize für weitere Zyklen dienen. Die abschließende 10-minütige Inkubation bei 70 °C dient zur finalen Extension partiell vervollständigter Produkte.

Zur Amplifikation der Zielsequenzen wurde das Multiplex-PCR Kit für humane inflammatorische Zytokine der Firma Maxim Biotech verwendet, in dem Primer für folgende Targets enthalten sind: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF sowie GAPDH als sogenanntes Haushaltsgen (housekeeping-gene).

Als Mastermix für eine Reaktion wurde angesetzt:

25,0 $\mu$ L	Reaktionspuffer
5,0 $\mu$ L	Primergemisch
14,5 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
0,5 $\mu$ L	Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L)

Diesem Ansatz wurden jeweils 5,0  $\mu$ L Proben- oder Kontroll-cDNA hinzugefügt und in einem 0,5 mL PCR-Reaktionsgefäß im Mastercycler wie folgt inkubiert:

1 min	96 °C	
4 min	58 °C	
		2 Zyklen
1 min	94 °C	
2 min	58 °C	
		35 Zyklen
10 min	70 °C	
5 min	4 °C	

### **3.3.2.6      *Gelelektrophorese***

Durch ihre negative Ladung wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld durch die Poren des Gels zum positiven Pol, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von ihrer Größe abhängt. So können bei einem 2 %-igen Agarosegel Längenunterschiede von nur 50 bp nachgewiesen werden.

Agarose-Gele wurden in (1x) TAE-Puffer präpariert: 2 % Agarose wurde in 50 mL Puffer eingewogen und in der Mikrowelle unter wiederholtem Schwenken aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 40-50 °C wurden 5,4 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) zugegeben und die Agaroselösung in Gelgießständen ausgegossen und für etwa 30 Minuten ausgehärtet. Anschließend wurden die so hergestellten Gele in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit (1x) TAE-Laufpuffer überdeckt. Die Geltaschen wurden mit einem Gemisch aus je 8 µL Probe und 2 µL Loading Buffer befüllt und eine Elektrophorese bei 80 Volt für 1 Stunde durchgeführt.

### **3.3.2.7      *Densitometrische Auswertung***

Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und es werden nach Bestrahlung mit UV-Licht orangefarben-leuchtende Nukleinsäurebanden detektierbar.

Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Fragmente wurden in einem Fluor-S-MultiImager der Firma Biorad abphotographiert und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One Version 4.2 densitometrisch vermessen und ausgewertet.

### **3.3.2.8      *Auswertung und Statistik***

Sämtliche in der RT-PCR erhobenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.0 für Windows varianzanalytisch (ANOVA mit anschließender Bonferroni-Abschätzung) auf ihre Signifikanz überprüft (Forst 1985).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kultur der A549-Zelllinie

Die permanente Zelllinie A549 wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen in Kultur gehalten. Alle Versuche wurden erst nach Vorliegen eines konfluenten und homogenen Zellrasens durchgeführt.

### 4.2 Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung

#### 4.2.1 Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA

Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, war in dem untersuchten Zeitintervall von 8 bis 48 h sowohl bei TEGDMA- als auch bei HEMA-exponierten A549-Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten ein dosisabhängiger Vitalitätsverlust feststellbar. Mit zunehmender Expositionsdauer konnte bei den behandelten Zellen außerdem für beide Komonomere ein stetiger Abfall der halbmaximalen Effektkonzentration ( $EC_{50}$ ), d.h. eine zeitabhängige Zunahme ihrer zytotoxischen Wirkung, beobachtet werden. Wie aus der Darstellung der relativen Toxizität - definiert als dem Verhältnis des  $EC_{50}$ -Wertes von TEGDMA im Vergleich zur  $EC_{50}$  von HEMA - hervorgeht, näherten sich die halbmaximalen Effektkonzentrationen beider Komonomere im untersuchten Zeitintervall von 48 h mit steigender Expositionszeit kontinuierlich aneinander an (Tabelle 1).

	<b><math>EC_{50}</math> [mmol/L]</b>		
	<b>(95 %-CI)</b>		
	<b>8 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>TEGDMA</b>	4,6 (4,2 – 5, 1)	3,5 (3,1 – 3,9)	2,8 (1,7 – 4,6)
<b>HEMA</b>	50,5 (34,1 – 74,9)	14,2 (13,4 – 15,0)	8,4 (7,8 – 9,1)
<b>Relative Toxizität</b>	<b>11,0 ***</b>	<b>4,1 ***</b>	<b>3,0 ***</b>

**Tabelle 1: Mittelwerte der  $EC_{50}$  [mmol/L] (95%-Konfidenzintervall) Komonomer-exponierter A549-Zellen und Berechnung der relativen Toxizität von TEGDMA bezogen auf HEMA. \*\*\* =  $EC_{50}$  TEGDMA im jeweiligen Zeitintervall signifikant unterschiedlich zur  $EC_{50}$  HEMA ( $p < 0,001$ ).**

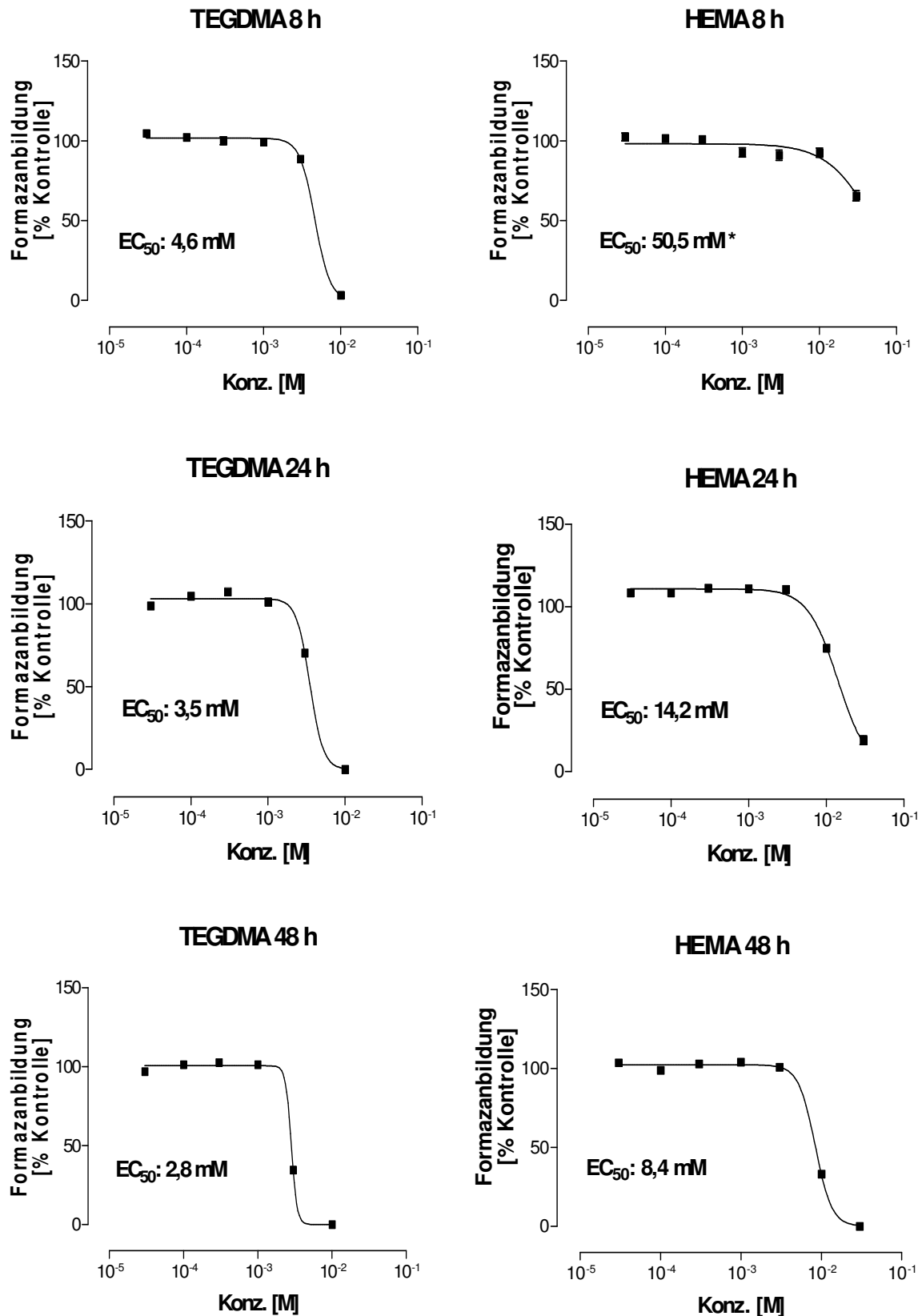
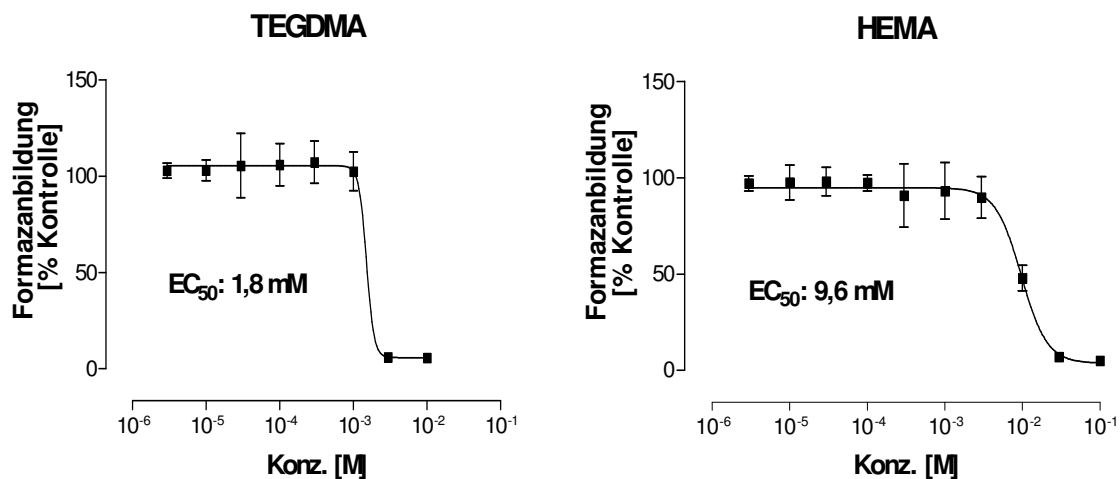


Abbildung 5: Formazanbildung jeweils 8, 24 und 48 h nach TEGDMA- bzw. HEMA-Exposition humaner A549-Zellen. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 12 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoidale Kurvenanpassung der Messdaten erhalten. \* = EC<sub>50</sub> extrapoliert.

#### 4.2.2 Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten

Auch nach 24-stündiger Exposition der Zellen mit Komonomeren in serumfreiem HBSS führten TEGDMA und HEMA zu einem dosisabhängigen Vitalitätsverlust. Dabei lag die für TEGDMA ermittelte  $EC_{50}$  um ein 5-faches niedriger im Vergleich zu HEMA (Abb. 6). Gemessen an den halbmaximalen Effektkonzentrationen aus den Versuchen mit serumhaltigem Medium war die Sensitivität der Zellen deutlich erhöht (s. 4.2.1).



**Abbildung 6: Formazanbildung humaner A549-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit TEGDMA bzw. HEMA in serumfreiem HBSS. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 3 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoidale Kurvenanpassung der Messdaten erhalten.**

Auch sämtliche getesteten Metabolite - mit Ausnahme von Triethylenglykol - induzierten bei den exponierten A549-Zellen innerhalb von 24 h einen dosisabhängigen Vitalitätsverlust. Wie aus der Abbildung 7 ersichtlich ist, ergab sich für die untersuchten Intermediate anhand ihrer halbmaximalen Effektkonzentration folgende Reihenfolge ihrer Toxizität: Epoxid > Methacrylsäure > Paraformaldehyd.

Der für TEGDMA errechnete mittlere  $EC_{50}$ -Wert von 1,8 mmol/L wurde lediglich durch die  $EC_{50}$  des getesteten Epoxids geringfügig unterschritten: Diese lag bei den mit 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure behandelten Zellen nach Ablauf des 24-stündigen Expositionsintervalles bei 1,7 mmol/L. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Methacrylsäure und Triethylenglykol in äquimolarem Verhältnis zu TEGDMA (2:1) entsprach die errechnete  $EC_{50}$  mit 4,7 mmol/L in etwa derjenigen nach alleiniger Methacrylsäure-Exposition der Zellen (4,9 mmol/L).

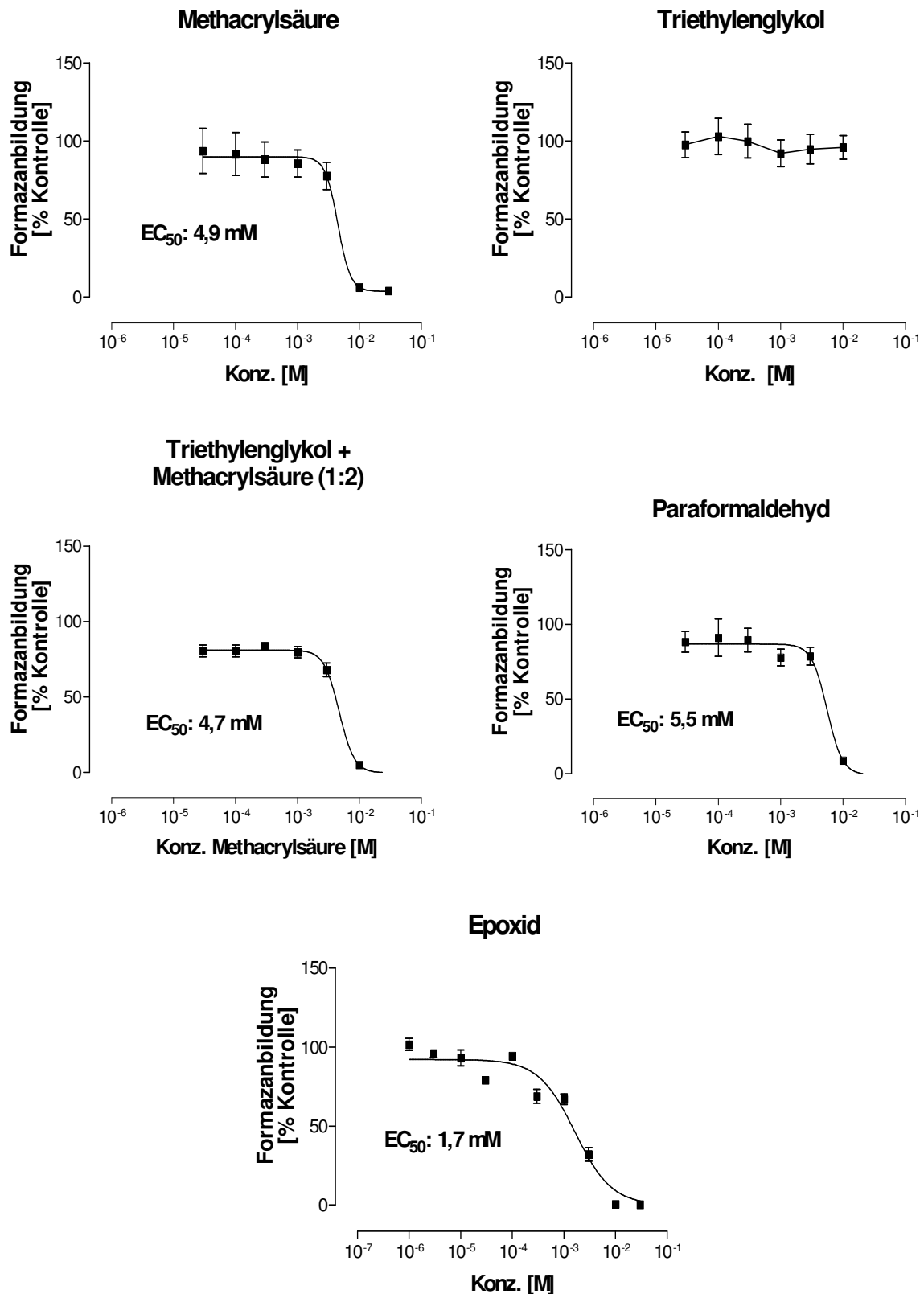
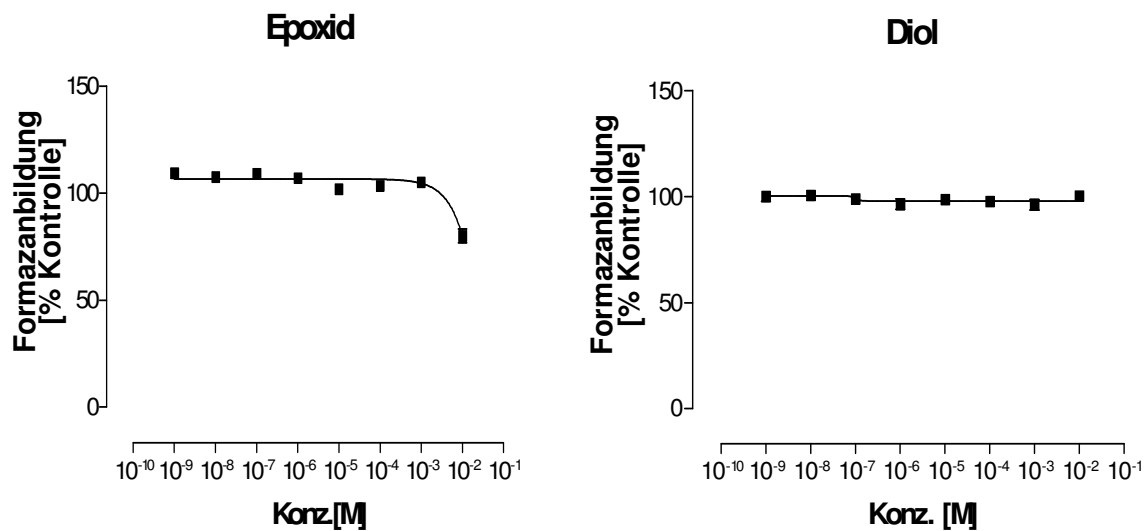


Abbildung 7: Formazanbildung humaner A549-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit verschiedenen Metaboliten von TEGDMA in serumfreiem HBSS. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 3 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoidale Kurvenanpassung der Messdaten erhalten.

Nach 24-stündiger Exposition von A549-Zellen mit dem Epoxid 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure bzw. seinem korrespondierenden Diol 2,3-Dihydroxy-2-methyl-propionsäure wurde bei den gleichzeitig durchgeführten Inkubationsversuchen mit serumhaltigem Medium die halbmaximale Effektkonzentration im untersuchten Konzentrationsbereich (1 nmol/L - 10 mmol/L) von keiner der beiden Substanzen erreicht (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Formazanbildung humaner A549-Zellen nach 24-stündiger Exposition mit dem Epoxid 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure bzw. dem Diol 2,3-Dihydroxy-2-methyl-propionsäure in serumhaltigem Medium. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 3 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoidale Kurvenanpassung der Messdaten erhalten.**



### 4.2.3 Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA

Auch im Rahmen der Koinkubationsversuche mit Pifithrin- $\alpha$  war eine Abnahme der metabolischen Dehydrogenaseaktivität bei TEGDMA- bzw. HEMA-exponierten Zellen feststellbar. Im gesamten Untersuchungszeitraum von 48 h konnte jedoch bei gleichzeitiger Exposition mit Pifithrin- $\alpha$  weder nach 24 noch nach 48 h ein signifikanter Einfluss des p53-Antagonisten auf die zytotoxische Wirkung der Komonomer-behandelten A549-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 9).

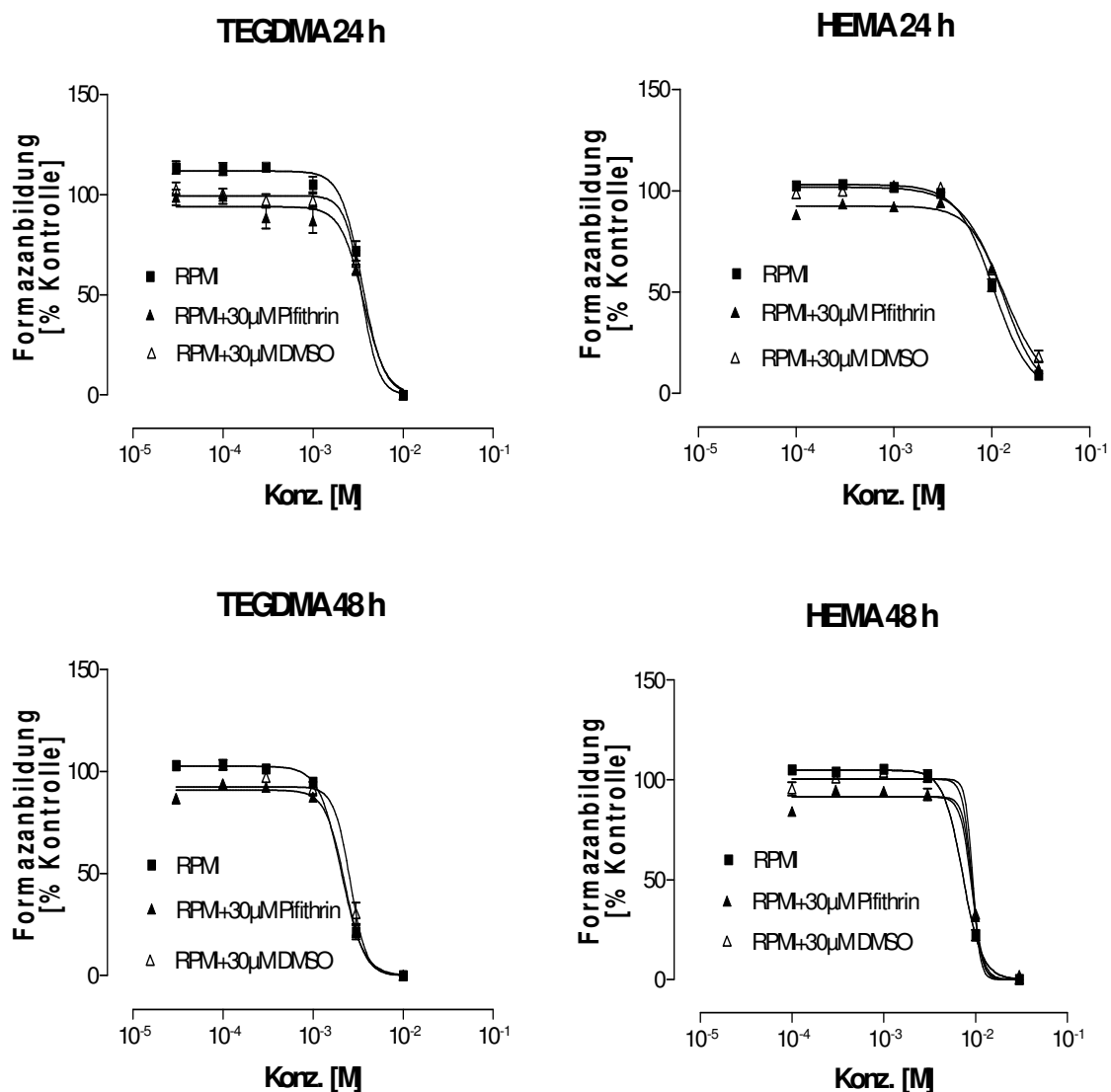


Abbildung 9: Formazanbildung humaner A549-Zellen nach 24- bzw. 48-stündiger Exposition mit TEGDMA bzw. HEMA unter Zugabe von Pifithrin- $\alpha$  oder DMSO (30  $\mu$ M). Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 4 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoide Kurvenanpassung der Messdaten erhalten.

Die mittels Kurvenanpassung errechneten  $EC_{50}$ -Werte sind in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt. Die varianzanalytische Auswertung der gemittelten Ergebnisse ergab, dass die im 24-Stunden-Intervall nach HEMA-Exposition auftretende signifikante Verminderung der  $EC_{50}$  bei Koinkubation mit Pifithrin- $\alpha$  ebenfalls nach Exposition der Zellen mit HEMA und dem Lösungsmittel DMSO beobachtet werden konnte.

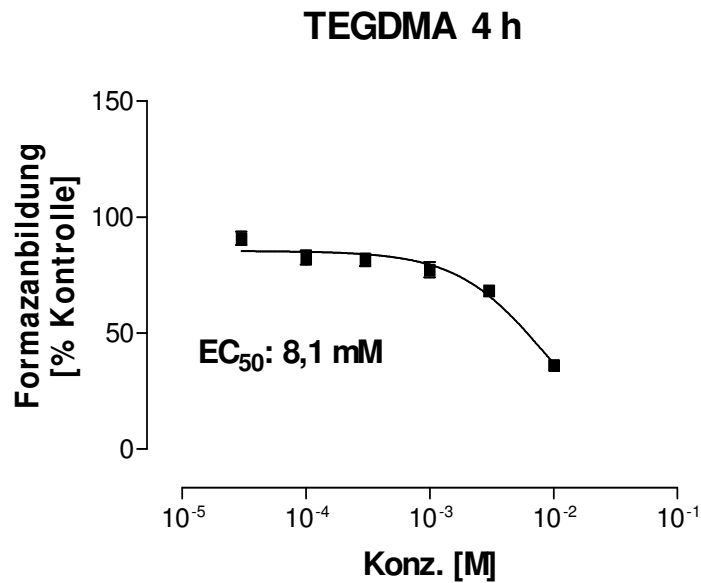
<b><math>EC_{50}</math> [mmol/L] (95 %-CI)</b>		
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>TEGDMA</b>	<b>3,5</b> (3,1 – 3,9)	<b>2,1</b> (1,9 – 2,3)
<b>TEGDMA+PFT</b>	<b>3,6</b> (3,1 – 4,3)	<b>2,3</b> (2,1 – 2,5)
<b>TEGDMA+DMSO</b>	<b>3,5</b> (2,8 – 4,4)	<b>2,6</b> (2,1 – 3,2)
<b>HEMA</b>	<b>10,4</b> (9,9 – 11,0)	<b>7,2</b> (7,2 – 7,3)
<b>HEMA+PFT</b>	<b>13,5 ***</b> (12,6 – 14,4)	<b>9,1</b> (4,4 – 18,8)
<b>HEMA+DMSO</b>	<b>12,9 **</b> (11,8 – 14,1)	<b>9,2</b> (1,9 – 43,3)

**Tabelle 2: Mittelwerte der  $EC_{50}$  [mmol/L] (95 %-Konfidenzintervall) nach 24- bzw. 48-stündiger Exposition von A549-Zellen mit dem Komonomer TEGDMA bzw. HEMA in Kombination mit Pifithrin- $\alpha$  (PFT) bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO). Signifikant unterschiedlich zu HEMA 24 h : \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .**

#### **4.2.4 Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien**

Der - begleitend zu den Zytokinuntersuchungen durchgeführte - Vitalitätstest brachte folgendes Ergebnis:

Nach vierstündiger Exposition mit TEGDMA wurde ein von der applizierten Dosis abhängiger Vitalitätsverlust bei den Komonomer-behandelten A549-Zellen beobachtet. Der mittels Kurvenanpassung errechnete  $EC_{50}$ -Wert lag bei einer TEGDMA-Konzentration von 8,1 mmol/L (s. Abb. 10).

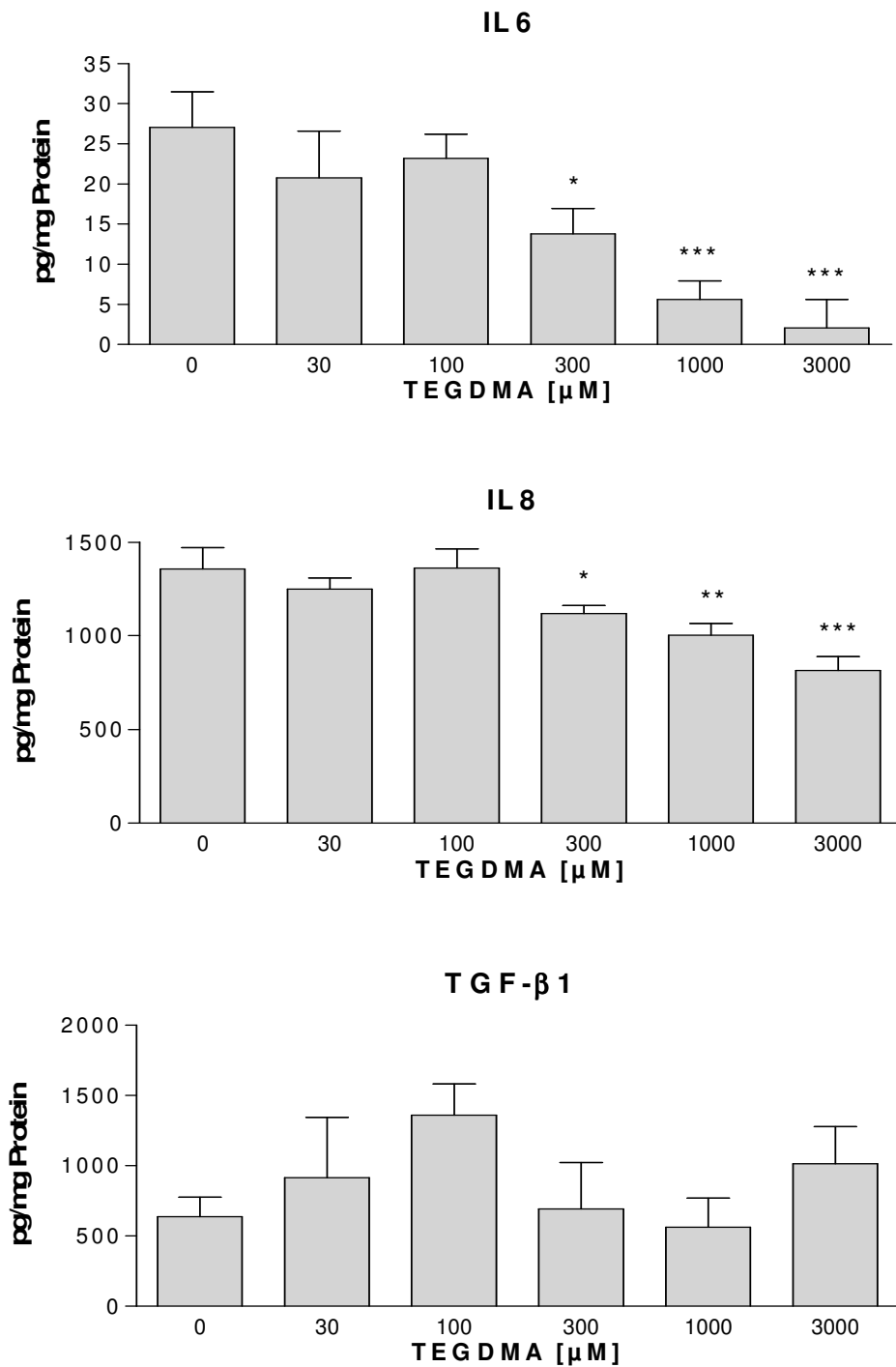


**Abbildung 10:** Formazanbildung humaner A549-Zellen nach 4-stündiger TEGDMA-Exposition. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=2; je 12 Replikate). Die Graphen wurden durch sigmoidale Kurvenanpassung der Messdaten erhalten.

### **4.3 Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine**

#### **4.3.1 Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay**

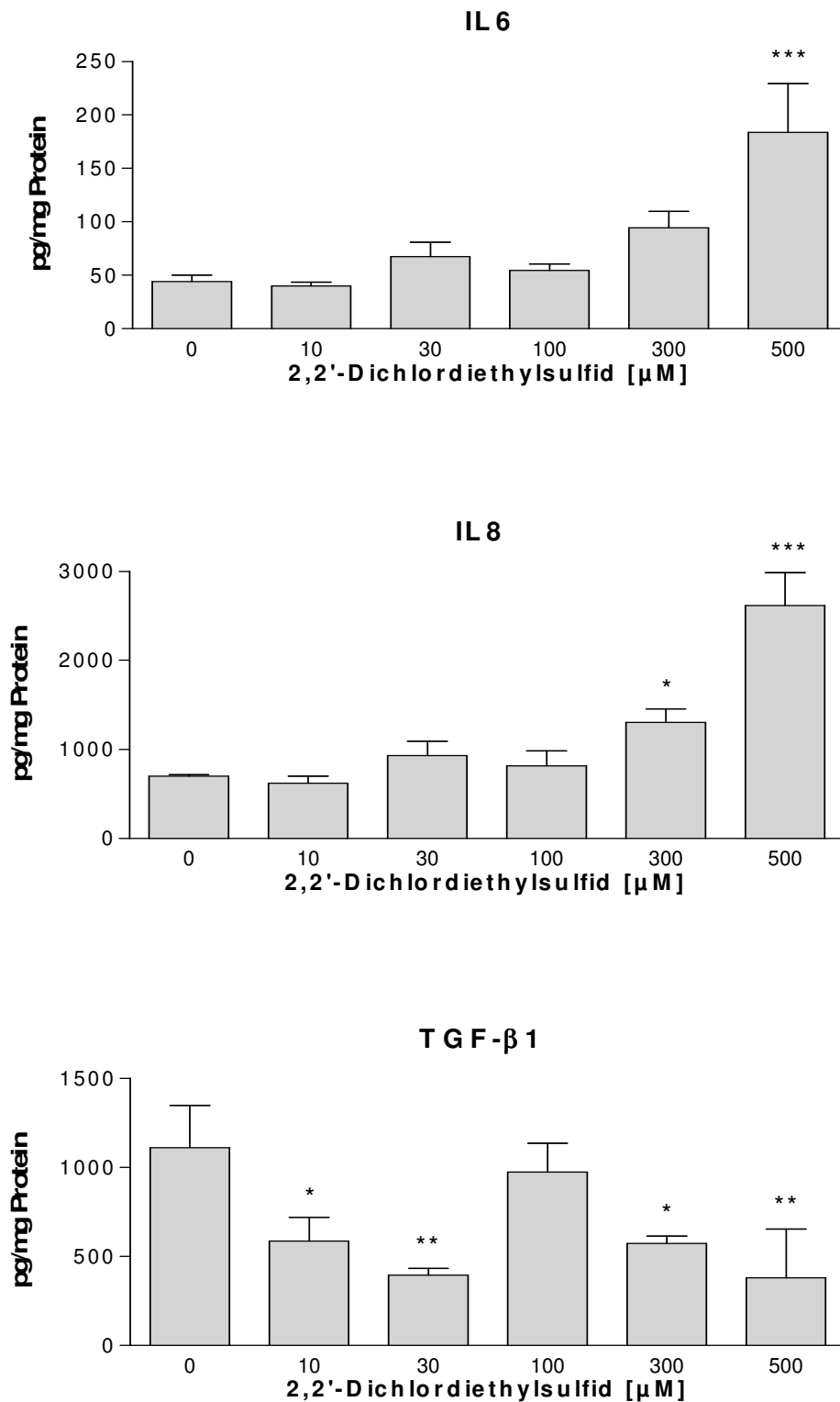
Untersucht wurde der Einfluss des Komonomers TEGDMA auf die Konzentration inflammatorischer Zytokine im Überstand von A549-Zellen. Bei Zellkulturen, die zuvor für 4 Stunden TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu$ M exponiert worden waren, wurden die Zytokinlevel von IL-6 und IL-8 simultan in einem Multiplex-Proteinassay ermittelt. Die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Im Anschluß an die jeweiligen Versuche wurden die gemessenen Zytokinkonzentrationen auf den pro Well ermittelten Proteingehalt umgerechnet und auf 1 mg Proteinmenge normiert (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zytokinkonzentration im Überstand von A549-Zellen, die für 4 h TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu$ M exponiert wurden. Aus dem Kulturüberstand wurden die sezernierte Menge der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 mittels Immunoassay bestimmt. Darstellung des Mittelwertes (n=3) der Zytokinkonzentration + SD in pg/mg Protein. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .**

Sowohl bei IL-6 als auch IL-8 konnte eine signifikante dosisabhängige Inhibition der Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand ab einer TEGDMA-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die im gesamten Expositionsintervall von 0 bis 3000  $\mu\text{M}$  gemessene IL-6-Konzentration sank dabei von 27,05 pg/mg Protein bei unbehandelten Zellen bis auf 2,04 pg/mg Protein ab und war somit um das 13-fache im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Ebenso war bei IL-8 ein stetiger Abfall der Zytokinausschüttung um das 1,6-fache von 1355,34 pg/mg Protein auf 814,68 pg/mg Protein bei höchster TEGDMA-Konzentration erkennbar. TGF- $\beta$ 1 wurde mit biphasischem Verlauf sezerniert: bis zu einer TEGDMA-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  stieg das im Überstand vorhandene TGF- $\beta$ 1 auf die zweifache Konzentration der Kontrolle an. Nach Abfall auf das Kontrollniveau im Bereich von 300 und 1000  $\mu\text{M}$  erreichte die Ausschüttung einen weiteren Peak mit um den Faktor 1,8 erhöhter Sekretion bei höchster TEGDMA-Konzentration. Die für TGF- $\beta$ 1 ermittelten Werte waren allerdings nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Vergleichend hierzu wurden A549-Zellen für 30 Minuten dem Alkylanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid in den Konzentrationen 10-500  $\mu\text{M}$  exponiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 3,5 h inkubiert. Mit Hilfe der oben genannten Verfahren wurden die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturüberstand der so behandelten Zellen bestimmt (Abbildung 12). Dabei konnte in Abhängigkeit zunehmender Schwefellostkonzentrationen eine signifikante Stimulation der Ausschüttung von IL-6 erst ab einer Dosis von 500  $\mu\text{M}$  und bei IL-8 ab 300  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Bei höchster Schwefellostkonzentration (500  $\mu\text{M}$ ) war die im Überstand der Kontrolle gemessene Konzentration an IL-6 von 43,97 pg/mg Protein um das 4-fache auf 183,44 pg/mg Protein erhöht. IL-8 stieg im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls um den Faktor 4 von 699,81 pg/mg sezerniertem Protein durch unbehandelte Zellen auf 2616,20 pg/mg Protein bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  S-Lost an. Die Ausschüttung von TGF- $\beta$ 1 zeigte einen biphasischen Verlauf, wobei im Intervall zwischen 0 und 30  $\mu\text{M}$  eine signifikante erste Hemmung der Zytokinproduktion von 1109,20 pg/mg Protein auf 394,68 pg/mg Protein zu beobachten war. Bei 100  $\mu\text{M}$  S-Lost war die TGF- $\beta$ 1-Sekretion in etwa vergleichbar mit der Ausschüttung durch unbehandelte Zellen. Eine weitere signifikante Reduktion wurde im anschließenden Intervall von 300 und 500  $\mu\text{M}$  bis um den Faktor 2,9 bei höchster Vergiftungsstufe ermittelt.



**Abbildung 12: Zytokinkonzentration im Überstand von A549-Zellen, welche für 30 min S-Lost in den Konzentrationen 10-500 μM exponiert wurden. Es wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach weiteren 3,5 h Inkubationszeit aus dem Kulturüberstand die sezernierte Menge der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF-β1 mittels Immunoassay bestimmt. Darstellung des Mittelwertes (n=3) der Zytokinkonzentration + SD in pg/mg Protein. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001.**

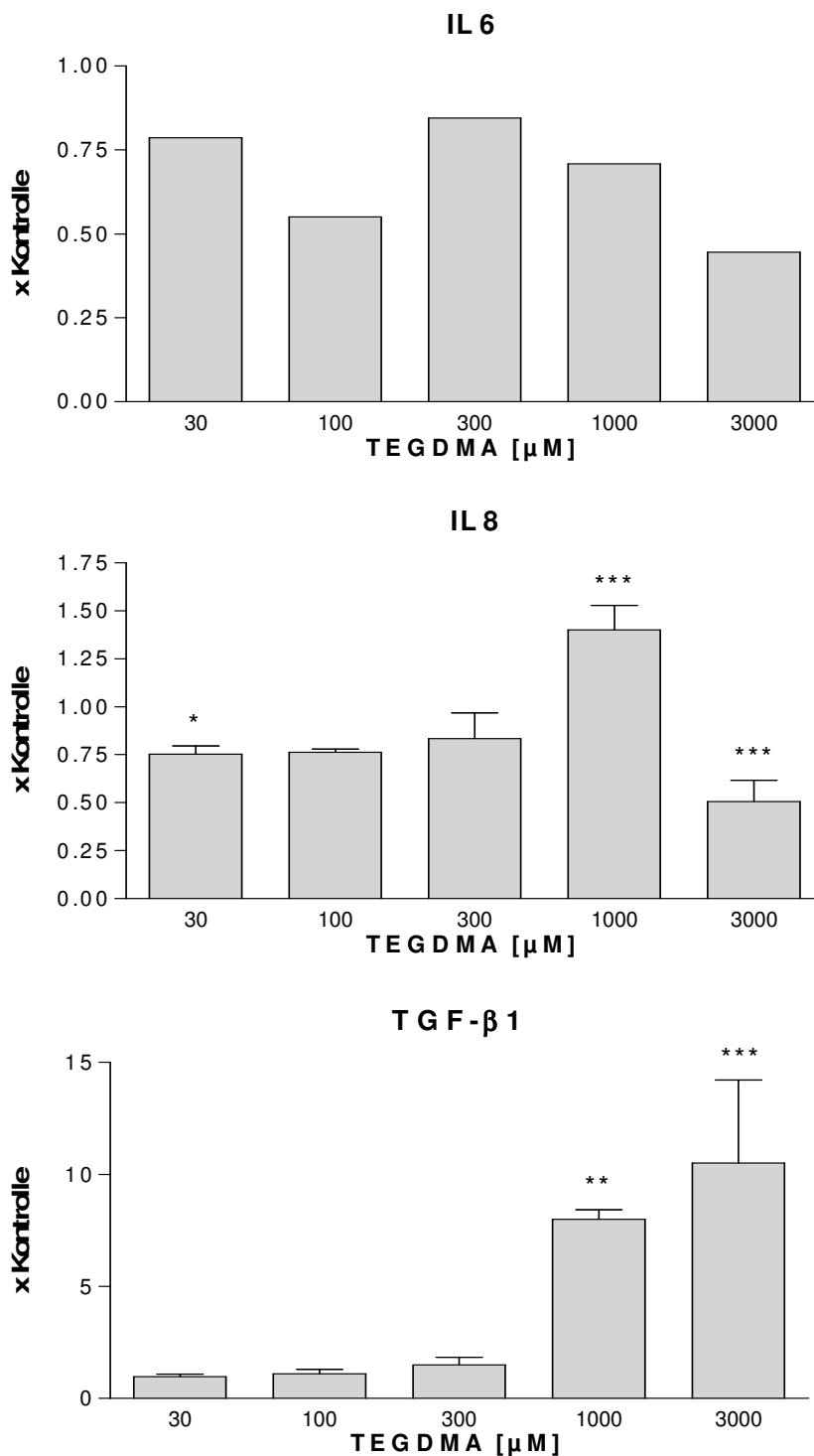
#### **4.3.2 Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR**

A549-Zellen wurden für 4 Stunden mit TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu$ M inkubiert und nach Entfernung des Kulturüberstandes wurde aus jeweils  $1 \times 10^6$  lysierter Zellen die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA und Amplifikation der Produkte in einer PCR-Reaktion wurde die mRNA der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 densitometrisch quantifiziert und auf einen internen Standard - das Haushaltsgen GAPDH - normiert. Die so gewonnenen Daten wurden anschließend in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Dabei ergaben sich, wie in Abbildung 13 gezeigt, folgende mRNA-Mengenverhältnisse zwischen behandelten und unbehandelten Zellen:

Aufgrund erheblicher Inkonstanz beim verwendeten Multiplex-Kit konnten für IL-6 keine gut reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Die dargestellten Daten stellen einen typischen Versuch dar. Die mRNA-Expression von IL-6 war nach TEGDMA-Exposition im untersuchten Konzentrationsintervall von 30 bis 3000  $\mu$ M durchgehend im Vergleich zur Kontrolle inhibiert. Bei den Konzentrationen 30 und 300  $\mu$ M betrug sie etwa 80 %, bei einer TEGDMA-Konzentration von 100  $\mu$ M nur 60 % der IL-6-Expression unbehandelter Zellen. Mit weiter ansteigender Komonomerkonzentration konnte eine stetig zunehmende Hemmung der Boten-RNA beobachtet werden. Die Zytokin-Expression bei höchster TEGDMA-Konzentration betrug gegenüber der Kontrolle etwa 40 %.

Die für IL-8 gemessene Menge an Boten-RNA war ebenfalls in dem Konzentrationsbereich von 30 bis 300  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle um etwa 20 % reduziert (nur bei 30  $\mu$ M TEGDMA signifikant unterschiedlich zur Kontrolle). Eine Stimulation der Expression wurde mit einem signifikanten 1,4-fachen Anstieg bei einer Konzentration von 1000  $\mu$ M TEGDMA beobachtet. Bei höchster Vergiftungsstufe war die mRNA-Expression mit 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant gehemmt.

Bei TGF- $\beta$ 1 wurde durch die ansteigende TEGDMA-Konzentration eine stetige Hochregulation der zugehörigen mRNA-Expression induziert. Die Boten-RNA-Menge war bei den Vergiftungsstufen 1000  $\mu$ M signifikant um das 8-fache und bei einer TEGDMA-Konzentration von 3000  $\mu$ M signifikant um das 11-fache im Vergleich zur Zytokinexpression unbehandelter Zellen erhöht.



**Abbildung 13: Zytokinexpression in A549-Zellen nach 4-stündiger Exposition mit TEGDMA in den Konzentrationen 30-3000  $\mu$ M. Aus  $1 \times 10^6$  Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die mRNA der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 wurde densitometrisch quantifiziert und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert. Gewonnene Daten wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Darstellung des Mittelwertes (n=3; IL-6: n=1) der mRNA-Expression + SD. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .**

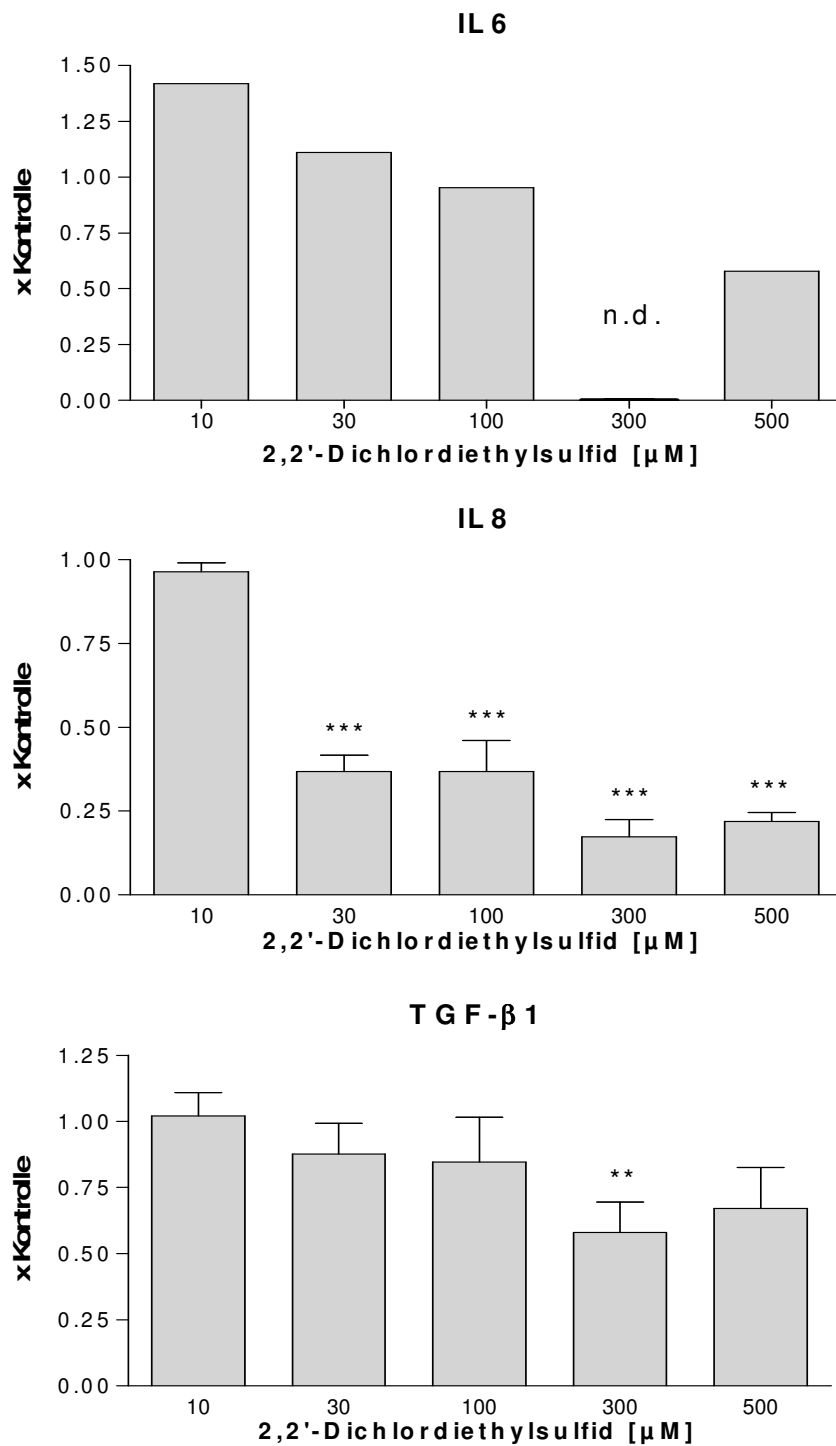


Zum Vergleich wurden die Zellen für 30 Minuten dem Alkylanz 2,2'-Dichloräthylsulfid in den Konzentrationen 10-500  $\mu\text{M}$  exponiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 3,5 h inkubiert. Nach Entfernen des Kulturüberstandes wurde aus Zellpellets von  $1 \times 10^6$  Zellen nach dem oben beschriebenen Schema die intrazelluläre mRNA extrahiert und mengenmäßig bestimmt. Die gewonnenen Daten sind in Abbildung 14 dargestellt.

Die für IL-6 ermittelten Daten stellen wiederum Einzelwerte dar. Für das Konzentrationsintervall von 10 bis 100  $\mu\text{M}$  wurde eine stetig abnehmende Tendenz in der mRNA-Expression verzeichnet: die Boten-RNA war bei Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  S-Lost im Vergleich zur Kontrolle 1,4-fach erhöht und sank mit zunehmender Giftkonzentration auf das Expressionslevel unbehandelter Zellen bei 100  $\mu\text{M}$  Schwefellost. Bei einer Schwefellostkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  konnte keine mRNA detektiert werden. Bei höchster Vergiftungsstufe war die IL-6-Expression mit 60 % verglichen mit der Kontrolle inhibiert.

Für IL-8 wurde mit steigender Schwefellostkonzentration ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion an exprimierter mRNA nachgewiesen. Die Menge an detektierter Boten-RNA betrug bei den Konzentrationen 30 und 100  $\mu\text{M}$  etwa 40 %, bei 300 und 500  $\mu\text{M}$  noch 20 % der unbehandelten Kontrolle.

Auch die mRNA von TGF- $\beta$ 1 wurde im untersuchten Konzentrationsintervall herunterreguliert: bei den 2,2'-Dichloräthylsulfid-Konzentrationen 300  $\mu\text{M}$  (signifikant) und 500  $\mu\text{M}$  war die Zytokin-Expression um etwa 40 bzw. 30 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert.



**Abbildung 14: Zytokinexpression in A549-Zellen nach 30-minütiger Exposition mit Schwefelost in den Konzentrationen 10-500  $\mu\text{M}$ . Nach einem Mediumwechsel und weiteren 3,5 h Inkubationszeit wurde aus  $1 \times 10^6$  Zellen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die mRNA der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 wurde densitometrisch quantifiziert und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert. Gewonnene Daten wurden in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Darstellung des Mittelwertes (n=3; IL-6: n=1) der mRNA-Expression + SD. Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n.d. = nicht determiniert.**

## **5. Diskussion**

### ***5.1 Auswahl von Testsubstanzen, eingesetzter Dosis, Versuchszelllinie und Referenzmaterial***

Zahnrestaurationsmaterialien aus Kunststoff sind im Laufe ihrer Tragedauer permanent degradativen Prozessen unterworfen. Einerseits tragen rein mechanisch bedingte Abbauvorgänge bei der Mastikation, z.B. „Erosion“ und „Abrasion“, zum fortwährenden Materialabrieb von Partikeln aus Kunststofffüllungen bei. Andererseits kann aber auch die Wasserabsorption der Polymermatrix neben einer deutlichen Massenzunahme zur Entstehung einer weichen und porösen „Korrosionsschicht“ und damit zu kontinuierlichem Abbau und progressiver Veränderung ihrer Oberflächenmikrostruktur führen (Sarkar 2000; Ortengren et al. 2001). Im Zuge solcher Umformungsprozesse an der Oberfläche von Dentalpolymeren wird die Elution von Matrixbestandteilen begünstigt und zugleich die Entstehung weiterer degradativer Vorgänge gefördert (Larsen et al. 1991).

Neben solchen mechanischen Prozessen können aber auch im Speichel vorhandene Enzyme zusätzliche chemische Abbauvorgänge an Restaurationsmaterialien in Gang setzen. Indem sie teilvernetzte Matrixbestandteile an ihren freiliegenden Enden enzymatisch angreifen und degradieren, tragen insbesondere unspezifische Esterasen (so genannte Hydrolasen) zum verstärkten Abbau dentaler Kunststoffpolymere bei (Munksgaard et al. 1990; Larsen et al. 1992). Diese Vorgänge enzymatischer Hydrolyse, die man auch unter dem Begriff der so genannten Biodegradation zusammenfasst (Göpferich 1996), unterstützen zusätzlich eine laufende Freisetzung von verschiedenen Matrixkomponenten und/oder ihren Derivaten.

Die - bei sämtlichen soeben genannten Vorgängen - entstehenden Abbauprodukte dentaler Restaurationsmaterialien können also kontinuierlich mit dem Speichel eluiert werden und anschließend mit weiteren Geweben und Strukturen des Organismus interagieren. Die hier untersuchten Komonomere TEGDMA und HEMA gehören dabei zu einer Gruppe von besonders häufig aus Kompositen freigesetzten Bestandteilen, die zugleich mit negativen lokalen und systemischen Effekten in Verbindung gebracht werden (Geurtsen 1998; Reichl et al. 1999; Geurtsen 2000; Geurtsen et al. 2001). Bei zahlreichen in-vitro-Studien konnten für diese beiden Kompositkomponenten bereits zytotoxische Wirkungen nachgewiesen werden (Kehe et al. 2001; Emmler et al. 2002; Walther et al. 2002). Dabei wurden für TEGDMA und HEMA an verschiedenen Zelllinien halbmaximale Effektkonzentrationen zur Induktion zytotoxischer Effekte bestimmt. In Anlehnung an diese Untersuchungen wurden auch für die

hier durchzuführenden Versuche entsprechende Konzentrationen von TEGDMA (3-10000  $\mu\text{M}$ ) bzw. HEMA (30-100000  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

Im Rahmen von tierexperimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass inhalierte Partikel (0,5-10  $\mu\text{m}$  Durchmesser), welche beim Schleifen und Polieren aus Kunststofffüllungen freigesetzt werden, im Lungengewebe von Kaninchen chronische Entzündungen hervorrufen (Goldberg et al. 1992; Nayebzadeh et al. 2000). Zudem haben Forschungsarbeiten bewiesen, dass Gesichtsmasken zahnärztliches Personal nur bedingt vor der Inhalation flüchtiger Monomere bei der Verarbeitung von Kompositen schützen (Lonnroth et al. 1998). Als Haupteintrittspforte inhalierbarer Substanzen spielt vor allem die Lunge eine wichtige Rolle, weil dort eine Aufnahme toxischer Agenzien bedingt durch die große Organoberfläche leicht möglich ist. Nachdem auch das gesamte Blutvolumen die Lunge durchfließt, müssen zusätzlich auch alle systemisch aufgenommenen chemischen Komponenten dieses Organ passieren und können bei der Lungenpassage metabolisiert werden. Aufgrund der genannten Tatsachen erscheint also insbesondere auch die Überprüfung der Komonomere auf ihre Lungenverträglichkeit von großer Bedeutung zu sein.

Im Zuge möglicher in der Lunge stattfindender Umformungsprozesse kann es neben einer erwünschten Herabsetzung der Toxizität auch erst zur „Giftung“ von metabolisierten Substanzen kommen. Aufgrund ihrer reichen enzymatischen Ausstattung (z.B. Cytochrom-P450, UDP-Glucuronosyltransferase, Epoxidhydrolasen, Glutathion-S-Transferase) besitzen insbesondere Pneumozyten vom Typ II eine hohe metabolische Kapazität (Cohen 1990) und spielen daher bei der Metabolisierung von Fremdstoffen eine wichtige Rolle (Castranova et al. 1988). Die permanente Lungentumorzelllinie A549 diente bei den durchgeführten Versuchen deshalb als in-vitro-Modell für Lungenschädigungen, da A549-Zellen große Ähnlichkeiten mit Alveolarepithelzellen vom Typ II aufweisen (Smith 1979) und ebenfalls dieselbe Enzymausstattung besitzen (Lieber et al. 1976).

Als Vergleichssubstanz für die Untersuchungen zur Expression und Sekretion inflammatorischer Zytokine wurde das Alkylanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid ausgewählt, da diese Substanz in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis ein bekanntes und ausgeprägtes zytotoxisches und proinflammatorisches Potential besitzt (Reid et al. 2000). Des Weiteren wurden schon mutagene, teratogene und kanzerogene Wirkungen von 2,2'-Dichlordiethylsulfid in der Literatur beschrieben (Dacre et al. 1996).

Nachdem auch für das Komonomer TEGDMA sowie einige seiner Abbauprodukte in der Vergangenheit bereits häufiger genotoxische Wirkungen postuliert worden waren (Moore et al. 1988; Schweikl et al. 1998; Schweikl et al. 1999), erschien ein Vergleich regulatorischer

Vorgänge nach einer Zellexposition mit diesen beiden Substanzen sinnvoll. Dies trifft vor allem auch wegen der möglichen Bildung hochreaktiver Epoxide bei der Verstoffwechselung von TEGDMA zu (Reichl 2003), nachdem die Oxirane zu DNA-Interaktionen fähig sind (Nuhn 1993), die mit der mutagenen Wirkung von Schwefellost vergleichbar sind.

## **5.2 Vitalitätstest und Zytotoxizitätsbestimmung**

Im Rahmen der Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden die Effekte der beiden Komonomere TEGDMA und HEMA auf das Proliferationsverhalten von A549-Zellen nach unterschiedlichen Expositionsintervallen getestet. Als Endpunkt zur Bestimmung der Zellvitalität diente der so genannte XTT-Vitalitätstest, welcher eine höhere Sensitivität als das <sup>51</sup>Cr-Standard-Assay aufweist und deshalb die geeignetere Methode zum Toxizitätsnachweis dentaler Materialien darstellt (Bean et al. 1995).

### **5.2.1 Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Komonomere TEGDMA und HEMA**

Die Komonomere TEGDMA und HEMA sind als Bestandteile dentaler Restaurationsmaterialien bereits binnen weniger Minuten bis Stunden nach Legen einer Kunststofffüllung in Mikrogramm-Konzentrationen in der Mundhöhle präsent (Hume et al. 1996). Darüber hinaus können beide Komonomere auch innerhalb von Stunden bis Tagen via Dentin in die Pulpahöhle diffundieren und von dort aus in den Körperkreislauf gelangen (Gerzina et al. 1996). Die unterschiedliche chemische Struktur der beiden Kompositkomponenten spielt dabei eine wichtige Rolle. So konnte in Studien nachgewiesen werden, dass das kleinere aber hydrophilere HEMA wegen seines niedrigeren Molekulargewichts wesentlich rascher durch das Dentin diffundiert als das vergleichsweise größere und lipophilere TEGDMA (Gerzina et al. 1995). Derartige Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die genannten unterschiedlichen Eigenschaften beider Komonomere eventuell auch bezüglich ihres zytotoxischen Potentials von Bedeutung sind.

Bei den mit TEGDMA bzw. HEMA behandelten A549-Zellen konnte im Laufe des 48-stündigen Expositionsintervalles eine stetige Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität festgestellt werden (s. Abb. 5). Dies wurde als Zeichen von fortschreitender Zellschädigung und Vitalitätsverlust bei den exponierten Zellen interpretiert. Als Indiz dafür, dass TEGDMA und HEMA jedoch zusätzlich auch unterschiedliche

zytotoxische Mechanismen entfalten, wurde die Beobachtung gewertet, dass die Minderung der Stoffwechselaktivität behandelter Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten (8, 24 und 48 h) verschieden stark ausgeprägt war. TEGDMA erwies sich innerhalb des gesamten Betrachtungszeitraums von 48 h zu jedem gemessenen Zeitpunkt als toxischer im Vergleich zu HEMA, wobei sich die errechneten  $EC_{50}$ -Werte beider Komonomere in Relation zueinander kontinuierlich angleichen (s. Tab. 1). Insgesamt spricht dies also für einen deutlich schnelleren Angriff des Komonomers TEGDMA an den exponierten A549-Zellen. Diese Entdeckungen stimmen auch mit Ergebnissen anderer metabolischer Studien überein, in denen anhand der LDH-Freisetzung komonomerexponierter Zellen ebenfalls eine Zeitabhängigkeit der Toxizität von TEGDMA und HEMA nachgewiesen werden konnte (Walther et al. 2002).

Bereits in früheren Untersuchungen wurde das höhere zytotoxische Potential von TEGDMA durch seine Fähigkeit zur Surfactant-ähnlichen Anlagerung an die Lipiddoppelschicht der Zellmembran mit anschließender Lipidperoxidation erklärt (Fujisawa et al. 1984; Terakado et al. 1984). In neueren Arbeiten werden solche Membraninteraktionen jedoch auch für das Komonomer HEMA diskutiert. Bei der Hydrolyse von HEMA wird demnach das Alkoholderivat Ethylenglykol gebildet, welches sich anschließend in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einlagert. Durch Wechselwirkungen mit wichtigen membranständigen Signalmolekülen kommt es dabei zur Änderung der Zelllipidzusammensetzung, aus der dann eine veränderte Signaltransduktion und die Veränderung des Zellwachsstums resultieren (Schuster et al. 1999; Schuster et al. 2000). Auch hydrophobe Wechselwirkungen von HEMA mit der Zellmembran sind in der Literatur beschrieben worden (Fujisawa et al. 2001).

Alternative Erklärungsmöglichkeiten bezüglich des unterschiedlichen zelltoxischen Potentials von TEGDMA und HEMA ergeben sich aus dem Nachweis ihrer Interaktion mit wichtigen zelleigenen Schutzmechanismen. Einen in zahlreichen Studien untersuchten Angriffspunkt stellt das intrazelluläre Antioxidanz Glutathion (GSH) dar. Bei diesem Molekül handelt es sich um ein intrazelluläres Tripeptid, welches bei der Detoxifizierung schädigender Agenzien eine zentrale Rolle spielt. Neben der Entgiftung von endogenen Stoffen, die als Nebenprodukte aerober Stoffwechselfvorgänge (z.B. Zellatmung) im Körper laufend entstehen, werden durch dieses vitale Redox-Schutzsystem vor allem auch diverse anthropogene Fremdstoffe, so genannte Xenobiotika, abgefangen und wirkungsvoll beseitigt. Diese Entgiftung findet einerseits durch die Reaktion von reaktiven Sauerstoffgruppen der Fremdstoffen mit der SH-Gruppe von Glutathion statt, wobei das oxidierte Dimer GSSG entsteht. Andererseits führt auch die zweite wichtige Funktion von GSH als intrazellulärer

Scavenger - d.h. die Konjugation und anschließende Ausscheidung über den Urin - zur Elimination derartiger Fremdstoffe. Im Rahmen der genannten Umwandlungsprozesse kann es jedoch statt zu einer Entgiftung auch erst zur Akkumulation von toxischen Konjugaten innerhalb der Zelle kommen (Zimniak et al. 1999). Im Falle der Komonomere wird angenommen, dass TEGDMA aufgrund seiner Lipophilie biologische Membranen vergleichsweise rascher passieren kann als HEMA (Reichl et al. 1999). Eine Ausbildung von Addukten mit intrazellulären Molekülen ist deshalb von besonders großem Interesse (Geurtsen et al. 2001). In früheren Studien wurde für Acrylsäureester, zu denen unter anderem auch das Komonomer TEGDMA gehört, die Bildung einer kovalenten S-C-Bindung (so genannte Michael-Addition) mit Glutathion vorgeschlagen (McCarthy et al. 1994).

Tatsächlich konnte eine mit Komonomeren assoziierte zeit- und dosisabhängige GSH-Depletion bereits in mehreren Zellkulturstudien nachgewiesen werden (Stanislawski et al. 2000; Walther et al. 2004). Bei Gingiva-Fibroblasten wird bereits innerhalb weniger Stunden nach TEGDMA-Exposition eine signifikante Depletion des intrazellulären Redox-Schutzmoleküls Glutathion beschrieben. Interessanterweise sind zu diesem Zeitpunkt bei den exponierten Zellen jedoch noch keine weiteren Anzeichen von Zelluntergang feststellbar. Außerdem werden die zellinternen GSH-Vorräte nach Exposition mit subtoxischen Komonomer-Konzentrationen wieder voll regeneriert, während bei der Applikation von höheren Dosen der Zelltod eintritt (Engelmann et al. 2002). Von Bedeutung sind diese Beobachtungen vor allem deshalb, da die GSH-Depletion immer auch als ein frühes Merkmal apoptotischer Prozesse angesehen wird (Coppola et al. 2000). Gemäß vergangener Studien reicht eine derartige Depletion von Glutathion zur alleinigen Induktion der Apoptose allerdings nicht aus (Slater et al. 1995). Trotzdem wird durch die Reduktion von intrazellulärem GSH die Puffer-Kapazität der Zelle für endogene Oxidanzien geschwächt. Obwohl üblicherweise sogar eine Verminderung bis auf 20 % des Normalgehalts toleriert wird, steigt so die Sensitivität der Zelle für zusätzlichen oxidativen Stress deutlich an (White et al. 1992). Synergistisch-toxische Effekte des Komonomers TEGDMA, welches in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verabreicht wurde, konnten bei in-vitro-Studien an Rattennierenzellen bereits nachgewiesen werden. Hingegen konnten vergleichbare Effekte durch die kombinierte Zellexposition mit HEMA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht erzielt werden (Reichl et al. 2003). Zu bedenken ist außerdem, dass A549-Zellen eine höhere Resistenz gegenüber einer GSH-Depletion im Vergleich zu anderen Zelllinien aufweisen (Walther et al. 2002). Dies wird auf den relativ hohen GSH-Gehalt dieser Zellen zurückgeführt (Walther et al. 2000). Zusammenfassend könnte TEGDMA, bedingt durch seinen lipophilen Charakter, vergleichsweise schneller zu

wichtigen Zellregulatoren vordringen, um dort zu interagieren. Für die tatsächliche Membranpermeation von TEGDMA sprechen auch Expositionsversuche an Lungentumorzellen, bei denen radioaktiv markiertes  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA durch dünnschichtchromatographische Auftrennung lysierter Zellen in allen Zellfraktionen nachgewiesen wurde (Durner 2000). Das Komonomer HEMA war in diesen Versuchen dagegen lediglich im Extrazellularraum nachweisbar. Ferner hat sich die intrazelluläre Präsenz des Komonomers TEGDMA auch schon bei der Detektion mittels Kernmagnetresonanzspektroskopie bestätigt (Engelmann et al. 2001).

### **5.2.2 Vergleich der Zytotoxizität der Komonomere TEGDMA und HEMA mit verschiedenen Metaboliten**

In der Mundhöhle existieren zahlreiche Prozesse, die einen Abbau von dentalen Restaurationsmaterialien begünstigen. Dabei handelt es sich um komplexe degradative Vorgänge, die sich einerseits aus der bloßen Disintegration von Komponenten bzw. deren Auflösung mit dem Speichel und andererseits aus verschiedenen chemischen (z.B. Thermolyse, Solvolyse, Oxidation) und physikalischen (Auflösung, Aufweichen, Mineralisation) Abbauvorgängen - bedingt durch Nahrung, Kauakt und bakterielle Aktivitäten - zusammensetzen (Santerre et al. 2001).

Wie zahlreiche Untersuchungen aus der Vergangenheit belegen, sind Kunststoffpolymere also nicht chemisch inert und es treten auch laufend Wechselwirkungen mit verschiedenen Enzymen auf (Stanley 1993; Santerre et al. 1999; Santerre et al. 2001). Die am Abbau beteiligten Enzyme stammen dabei von oralen Mikroorganismen, Speicheldrüsen, gingivaler Flüssigkeit, polymorphkernigen Leukozyten, Epithelzellen sowie Nahrungsbestandteilen (Chauncey 1961). Zusätzlich können bei entzündlichen Prozessen in der Mundhöhle (z.B. Periodontitis) auch noch weitere Enzymaktivitäten (z.B. durch Bakterienakkumulation) frei werden (Nakamura et al. 1983). Somit lässt sich erklären, dass schon degradative Prozesse an der Oberfläche von Restaurationsmaterialien auf Kunststoffbasis beobachtet wurden, obwohl mechanische Einwirkungen zuvor ausgeschlossen werden konnten (Stanley 1993). Beobachtungen dieser Art sprechen für ein Vorliegen von metabolischer Aktivität.

Die beiden Komonomere TEGDMA und HEMA gehören zu den Inhaltsstoffen aus dentalen Restaurationsmaterialien, die im Zuge der eben genannten Abbauvorgänge metabolisiert werden können. Für ihre Verstoffwechslung wurde der - in Abbildung 2 - dargestellte



Abbauweg postuliert. Aus diesem Grund erscheint vor allem die vergleichende Untersuchung möglicher entstehender Intermediate mit TEGDMA und HEMA interessant.

Nachdem es sich bei vielen der auf Methacrylsäure basierenden Monomere um Ester handelt, liegt insbesondere ihr Abbau durch die im Organismus ubiquitär vorhandenen Esterasen nahe (Yourtee et al. 2001). Schon in früheren Studien wurde nachgewiesen, dass durch den permanenten enzymatischen Angriff an der Oberfläche der Dentalpolymere laufend Mono- und Dimethacrylate zu Methacrylsäure und ihrem korrespondierenden Alkohol hydrolysiert werden (Larsen et al. 1992; de Gee et al. 1996). Dabei beginnen die meisten Abbauvorgänge an solchen Bestandteilen, die nur mit einem Ende in der Polymermatrix verankert sind (Munksgaard et al. 1990). Neuere Studien zum Abbau der Komonomere belegen, dass die Enzyme Cholesterinesterase (= inflammatorisches Enzym zellulären Ursprungs, CE) und Pseudocholinesterase (= dominierendes Speichelenzym, PCE), die im Speichel in ausreichenden Mengen für eine Degradation vorliegen, kommerzielle polymerisierte Dentalkomposite abbauen können (Finer et al. 2004). Ferner wurde nachgewiesen, dass die im menschlichen Speichel gemessenen Esteraseaktivitäten (= human saliva derived esterase activity, HSDEA) ausreichen um BisGMA-Monomere und TEGDMA-Komonomere innerhalb von 25 h vollständig zu verstoffwechseln (Jaffer et al. 2002). Durch Analyse der entstehenden Nebenprodukte via HPLC (high-performance liquid chromatography) und Massenspektroskopie konnte die Hydrolyse von TEGDMA an seinen Esterbindungen eindeutig belegt werden (Shajii et al. 1999). Zusätzlich wurde im Rahmen solcher Studien auch beobachtet, dass eine starke Abhängigkeit zwischen der Menge an entstehenden Abbauprodukten einerseits und der Enzymkonzentration und spezifischen Monomerformulierung andererseits besteht: Bei Enzyminkubationsversuchen an polymerisierten Kompositen stellte sich heraus, dass PCE eine höhere Spezifität für das Komonomer TEGDMA besitzt, wohingegen das Basismonomer BisGMA verstärkt durch die Aktivität der CE abgebaut wird (Finer et al. 2003). Aufgrund des Mengenverhältnisses der gebildeten Intermediate ist ferner auch eine Unterscheidung zwischen dem Abbau unreaktiver Restmonomere und der Hydrolyse von Methacrylaten an der Oberfläche der Polymere möglich: Während die Bildung von Methacrylsäure zum korrespondierenden Alkohol im Verhältnis 2:1 nämlich für eine hydrolytische Spaltung unvernetzter Monomere spricht, deutet ein Verhältnis von Methacrylsäure zum entsprechenden Alkohol von  $> 2$  auf die Freisetzung terminaler Methacrylsäuregruppen aus der Matrix hin (Shajii et al. 1999; Yourtee et al. 2001). In der Vergangenheit wurden für einige der Abbauprodukte von Komonomeren (z.B. Methacrylsäure) schon mehrfach zellschädigende Effekte postuliert

(Moore et al. 1988). Auch die Freisetzung anderer potentiell toxischer Substanzen, wie Formaldehyd, wurde bereits in verschiedenen Studien an Eluaten von dentalen Restaurationsmaterialien untersucht (Baker et al. 1988; Koda et al. 1990; Tsuchiya et al. 1994; Cimpan et al. 2000a). In Anlehnung an den eingangs beschriebenen Abbauweg der Komonomere TEGDMA und HEMA (s. Abb. 2) wurden daher folgende postulierte Metabolite auf ihre individuelle Zytotoxizität untersucht: Methacrylsäure, Triethylenglykol und Paraformaldehyd.

Für keinen dieser beim enzymatischen Abbau von TEGDMA entstehenden Metabolite konnte - gemessen an der halbmaximalen Effektkonzentration ( $EC_{50}$ ) - ein vergleichbares zytotoxisches Potential wie für das Komonomer TEGDMA selbst nachgewiesen werden (s. Abb. 6 und 7). Die für Methacrylsäure errechnete geringere Toxizität im Vergleich mit TEGDMA korreliert gut mit Daten aus der Literatur, in denen das zytotoxische Potential der untersuchten Komponenten in der Reihenfolge TEGDMA>HEMA>MA eingeordnet wurde (Ratanasathien et al. 1995; Fujisawa et al. 2001). Abweichend von diesen Studien wurde für Methacrylat jedoch eine höhere Toxizität im Vergleich zu HEMA ermittelt. Nachdem TEGDMA beim Abbau durch unspezifische Esterasen zu 2 Molekülen Methacrylsäure (MA) und 1 Molekül Triethylenglykol (TEG) gespalten wird, wurde ferner auch die Kombination beider Metabolite in äquimolarer Konzentration zu TEGDMA getestet, um möglicherweise auftretende synergistische/additive Effekte zu detektieren (s. Abb. 7). Bei kombinierter MA/TEG-Exposition der Zellen entsprach die halbmaximale Effektkonzentration in etwa derjenigen von Methacrylsäure-exponierten Zellen. Somit wurden die bei Koinkubation mit MA und TEG induzierten zytotoxischen Effekte allein auf das intermediär gebildete Methacrylat zurückgeführt. Diese Vermutung hat sich auch durch die fehlende toxische Wirkung bei alleiniger Exposition der Zellen mit Triethylenglykol bestätigt.

Neben diesen nachgewiesenen Stoffwechselprodukten wurde für den Abbau von TEGDMA und HEMA schon verschiedentlich die Entstehung toxischer Epoxide postuliert (Reichl 2003; Walther et al. 2004). Aufgrund der hohen metabolischen Kapazität der verwendeten Untersuchungszelllinie A549 wurde deshalb im Vergleich mit TEGDMA und HEMA auch das zytotoxische Potential von 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure untersucht.

Die zelluläre Detoxifikation von Xenobiotika erfolgt in zwei Phasen und beginnt mit einem Aktivierungsschritt, z.B. durch Oxidation oder Epoxidierung zur Addition polarer Gruppen. Durch die anschließende Konjugation an zelleigene Schutzmoleküle (GSH, Glucuronsäure) wird die Wasserlöslichkeit der Komponenten erhöht und sie können dadurch leichter ausgeschieden werden. Die dabei entstehenden Produkte werden in der Regel als untoxisch

angesehen. Mehrere Studien belegen jedoch, dass diese Vorgänge teilweise auch erst zur Aktivierung von Fremdstoffen führen (Zimniak et al. 1999). Außerdem können die dabei entstehenden Konjugate auch andere detoxifizierende Enzyme hemmen oder in der Zelle akkumulieren. Die Epoxidierung stellt also einen wichtigen metabolischen Schritt dar, der zur Entstehung toxischer Effekte führen kann (Yamamoto et al. 2002). Unter Beteiligung von Cytochrom-P450, welches erwiesenermaßen in Lungenepithelzellen vorliegt, kann es so zu einer „Giftung“ von Substanzen kommen.

Bei den Vitalitätstests in HBSS (s. Abb. 7) stellte sich heraus, dass 2,3-Epoxy-2-methylpropionsäure aufgrund seiner halbmaximalen Effektkonzentration ( $EC_{50}$ ) als einziger postulierter TEGDMA-Metabolit ein vergleichbares zytotoxisches Potential wie das Komonomer TEGDMA aufweist. Obwohl aus TEGDMA die doppelte molare Menge an MA gebildet werden kann, reicht dies nicht als alleinige Erklärung für die um mehr als das zweifache erhöhte Toxizität von TEGDMA aus. Unter Zugrundelegung der molaren Verhältnisse (1 Mol TEGDMA = 2 Mol Epoxid) scheint das Epoxid deshalb an der toxischen Wirkung von TEGDMA beteiligt zu sein. Im Gegensatz dazu läßt der direkte Vergleich mit dem Komonomer HEMA jedoch nicht auf eine Beteiligung des postulierten Intermediates an der zytotoxischen Wirkung von HEMA schließen: Das getestete Epoxid, welches beim Abbau von HEMA in äquimolarem Verhältnis gebildet werden würde (1 Mol HEMA = 1 Mol Epoxid), erwies sich bei den durchgeführten Untersuchungen als etwa sechs mal toxischer im Vergleich zu HEMA und scheint daher bei der Zytotoxizität dieses Komonomers auf A549-Zellen keine Rolle zu spielen.

Epoxide sind chemisch instabil und hochreaktiv und es ist bekannt, dass sie kovalent an Nucleinsäuren und Gewebeproteine binden können (Wistuba 1986). Nachdem die Membranpermeation von TEGDMA als gesichert anzusehen ist, könnte das intrazellulär gebildete Epoxid daher auch in hohem Maße an der häufiger beschriebenen GSH-Depletion bei TEGDMA-exponierten Zellen beteiligt sein (Walther et al. 2004). Die hohe Reaktivität von Epoxiden gegenüber freien Nucleophilen (z.B. Sulfhydrylgruppen von Proteinen) sowie ihre Konjugation an Glutathion wurde bereits früher in Studien nachgewiesen (Nuhn 1993). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Scavengerfunktion von Glutathion auch bei der Detoxifizierung von Epoxiden aus dem Abbau der Komonomere eine wichtige Rolle spielt. Auch die Beobachtung, dass die zytotoxische Wirkung von TEGDMA und HEMA bei verschiedenen Zelllinien durch gleichzeitige Gabe von Antioxidantien gemindert werden kann, spricht für die Entstehung solcher reaktiver Intermediate (Stanislawski et al. 2003; Walther et al. 2004).

Darüber hinaus wurden in der Vergangenheit schon mehrfach erbgutschädigende Effekte von dentalen Restaurationsmaterialien beschrieben. Diese Effekte wurden meist auf andere Inhaltsstoffe, wie z.B. Bisphenol-A und Formaldehyd, zurückgeführt (Ersev et al. 1999; Geurtsen 2001). Auch für TEGDMA wurden bereits häufiger genotoxische Eigenschaften postuliert (Reichl et al. 2003). Nachdem eine Entstehung von Epoxiden beim Abbau von TEGDMA wahrscheinlich ist, könnten also auch diese Effekte auf möglichen Wechselwirkungen des hochreaktiven Metaboliten mit der DNA beruhen (Schweikl et al. 2000; Schweikl et al. 2001). In Mutagenitätsstudien mittels Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Test (so genannter Comet-Assay) ist es bereits gelungen, für BisGMA und TEGDMA eine mutagene Wirkung bei humanen Lymphozyten nachzuweisen, wohingegen erbgutverändernde Effekte für das Komonomer HEMA nicht nachgewiesen werden konnten (Reichl 2003).

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit HBSS wurden auch Vitalitätsversuche mit 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure in serumhaltigem Medium durchgeführt (s. Abb. 8) und mit der Wirkung der - nach Ringöffnung möglicherweise entstehenden - 2,3-Dihydroxy-2-methyl-propionsäure verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass weder das Epoxid noch das getestete Dihydrodiol eine toxische Wirkung bei den A549-Zellen induzierten. Aus diesem Ergebnis wird gefolgert, dass das Epoxid in physiologischem Milieu möglicherweise sehr schnell zu seinem untoxischen Diol abreagiert und deshalb keine zytotoxische Wirkung entfaltet (s. Abb. 8).

Aus Literaturdaten geht hervor, dass zytotoxische und mutagene Oxirane im Rahmen ihrer Detoxifikation von löslichen und mikrosomalen Enzymen zu ihren korrespondierenden Dihydrodiolen umgewandelt werden (Moran et al. 1997). Findet eine Epoxidierung jedoch in Anwesenheit anderer Reaktionspartner, wie z.B. der Serumalbumine statt, kann auch die Protein-Bindung der entstehenden toxischen Intermediate Zellen vor zytotoxischen Effekten schützen (Schultz et al. 1998; Mitchell et al. 2002). Ferner ist anzunehmen, dass derart gekoppelte Metabolite nicht in der Lage sind, bis ins Innere der Zelle vorzudringen (Sorrentino et al. 1989). Somit lassen sich auch die mittels Zytotoxizitätstest erhobenen Daten mit FKS-haltigem Medium erklären, bei denen weder für das getestete Epoxid noch für das korrespondierende Diol zytotoxische Effekte nachgewiesen werden konnten.

Bei der Bewertung reaktiver Monomere ist neben ihrer Verweildauer vor allem auch ihre resultierende Struktur im Organismus entscheidend (Yoshii 1997). Allein aufgrund der beschriebenen molaren Verhältnisse würde bei der Verstoffwechslung von TEGDMA also bereits mehr Methacrylsäure (2:1) als Ausgangsmolekül einer nachfolgenden Epoxidierung

entstehen als dies beim Metabolismus von HEMA (1:1) der Fall ist. Ein wichtiger Punkt könnte in diesem Zusammenhang auch die unterschiedliche Enzymkinetik beider Komonomere sein. Bei Inkubationsversuchen verschiedener Monomere mit Enzymen zeigte das Komonomer HEMA die geringste Konversionsrate im Vergleich zu anderen Methacrylaten, wohingegen für TEGDMA eine besonders hohe Umwandlungsrate und -geschwindigkeit nachgewiesen werden konnte (Yourtee et al. 2001). Diese Unterschiede in ihrer Enzymaffinität wurden dabei auf die unterschiedlichen sterischen Eigenschaften der Monomere zurückgeführt, da sich Komonomere, welche an beiden Enden unpolare Gruppen enthalten, als gute Substrate für viele Esterasen erwiesen. Somit ließen sich die beobachteten unterschiedlichen Effekte möglicherweise auch durch die höhere Affinität von TEGDMA für enzymatische Umwandlung im Vergleich zum polareren HEMA erklären (Abb. 1). Denkbar ist weiterhin, dass reaktive Epoxide aufgrund mangelnder Membranpermeabilität des Komonomers HEMA gar nicht erst entstehen können, nachdem die Epoxidierung an das mikrosomale Cytochrom-P450 gebunden ist. Während die hier verwendete Versuchszelllinie A549 Cytochrom-P450 enthält (Cohen 1990), konnten jedoch auch schon mutagene Wirkungen des Komonomers TEGDMA bei Versuchen mit V79-Zellen nachgewiesen werden (Schweikl et al. 1999), in denen kein Cytochrom-P450 enthalten ist (Bieler et al. 2003).

Auch bei der dünn-schicht-chromatographischen Bestimmung der Verteilung radioaktiv markierter Komonomere sowie der entstehenden Metabolite auf die verschiedenen Zellkompartimente bei exponierten A549-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass der enzymatische Abbau beider Komonomere mit unterschiedlicher Intensität und Geschwindigkeit von statten geht. Während  $^{14}\text{C}$ -TEGDMA innerhalb von 30 Minuten nahezu vollständig (Restaktivität  $< 1\%$ ) verstoffwechselt wurde, war nicht metabolisiertes  $^{14}\text{C}$ -HEMA innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 6 h bis zuletzt in Konzentrationen zwischen 5 und 25 % der eingesetzten Dosis im Extrazellularraum präsent. Auch das aus dem TEGDMA-Abbau stammende Methacrylat wurde demnach schneller metabolisiert als das bei der Metabolisierung von HEMA entstandene. Als Zwischenprodukt des Abbauweges über toxische Epoxide konnte  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat nach TEGDMA-Exposition sowohl extrazellulär als auch - in geringerer Konzentration - intrazellulär nachgewiesen werden. Dies war bei HEMA-behandelten Zellen nicht der Fall (Durner 2000). Somit kommt also auch die lokal unterschiedliche Entstehung zelltoxischer Intermediate als Ursache für die abweichende Zytotoxizität beider Komonomere in Betracht.

### **5.2.3 Einfluss von Pifithrin- $\alpha$ auf die Zytotoxizität der Konomere TEGDMA und HEMA**

Über die Art des Zelltods, welcher durch toxische Inhaltsstoffe aus dentalen Restaurationsmaterialien induziert wird, ist bisher nur wenig bekannt. Zwar wurde bereits in einigen Studien untersucht, ob Eluate aus methacrylsäurebasierten Dentalpolymeren verschiedene Formen von Zelltod induzieren können. Dabei wurden jedoch meist Extrakte mit unbekannter Zusammensetzung verwendet, so dass Daten über das individuelle zytotoxische Potential der verschiedenen Matrixkomponenten fehlen. Genauere Kenntnisse über Art und Ausmaß der Induktion so genannter Todessignal-Wege (death-signaling pathways) können jedoch wertvolle Hinweise bezüglich der biologischen Aktivität dentaler Restaurationspolymere liefern (Cimpan et al. 1998; Cimpan et al. 2000a).

Grundsätzlich wird bei toxikologischen Studien zwischen zwei verschiedenen Formen des Zellunterganges - nämlich zwischen Nekrose und Apoptose - unterschieden (Majno et al. 1995; Cimpan 2000b): Als Nekrose bezeichnet man einen Vorgang, der durch das abrupte Versagen zellulärer Abwehrmechanismen gekennzeichnet ist. Nach Einwirkung stark schädigender Einflüsse bricht das osmotische Gleichgewicht der Zelle zusammen und ihre Vitalfunktionen kommen innerhalb von kurzer Zeit zum Erliegen. Charakteristischerweise gehen mit diesem Homeostaseverlust ein Anschwellen der Zelle mitsamt ihrer intrazellulären Organelle (Onkose) und der Verlust der Membranintegrität einher. Durch die - nach dem Platzen aus dem Zellinneren frei werdenden - Bestandteile, zu denen auch lysosomale Enzyme gehören, wird infolge der Schädigung des umliegenden Gewebes eine entzündliche Abräumreaktion provoziert. Insgesamt handelt es sich bei der Nekrose also um einen eher passiv ablaufenden Prozess, der vorwiegend durch gravierende pathologische Stimuli ausgelöst und immer von einer Entzündungsreaktion begleitet wird.

Als alternative Form des Zelltods basiert die Apoptose dagegen auf einer fein abgestimmten und streng regulierten Abfolge von Ereignissen, die zu einer kontrollierten Entsorgung unerwünschter Zellen innerhalb eines längeren Zeitraumes führen. Diese auch als „programmierter Zelltod“ bezeichneten Prozesse laufen unter Energieverbrauch aktiv ab und spielen schon bei der Entstehung und Entwicklung multizellulärer Organismen eine zentrale Rolle (Gao et al. 1998). Mit Hilfe solcher apoptotischer Mechanismen kann unter physiologischen Bedingungen stets die notwendige Balance zwischen Proliferation und dem Absterben von Zellen aufrechterhalten werden (Saini et al. 1998; Hall 1999b). Charakteristischerweise erfolgen die Abräumvorgänge bei der Apoptose entzündungsfrei (Hansen et al. 1997; Hodge et al. 2002), so dass die - zumeist durch mildere Einflüsse

entstandenen - Zellschäden mittels Phagozytose ohne eine Schädigung benachbarter Gewebe eliminiert werden können.

In diesem Zusammenhang deuten also die im Rahmen der Zytokinstudien gewonnenen Daten (s. 4.3.1) eher auf ein Ausbleiben proinflammatorischer Reaktionen und damit auf den Untergang der TEGDMA-exponierten Zellen via Apoptose hin. Außerdem treten die nach Komonomerexposition zu beobachtenden zytotoxischen Effekte - wie auch aus den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität hervorgeht - erst nach mehreren Stunden auf (s. Abb. 5), was ebenfalls für einen kontrollierten Untergang der Zellen spricht. Des Weiteren konnte erst kürzlich in einer Studie nachgewiesen werden, dass das Komonomer TEGDMA bei humanen Gingivafibroblasten dosisabhängig zur Induktion des programmierten Zelltods führt (Janke et al. 2003). Ferner wurde auch schon gezeigt, dass bei Pulpazellen in Kontakt mit Dentinadhesiven Apoptosen auftreten (Mantellini et al. 2003). Dabei wurde festgestellt, dass die Apoptoserate der Zellen vom Polymerisationsgrad der Materialien abhängt. Die Induktion des apoptotischen Untergangs bei komonomerexponierten A549-Zellen wurde auf die Aktivierung proapoptotischer Signalkaskaden unter Beteiligung des Enzyms Caspase 3 zurückgeführt (Bahnemann et al. 2002a).

Im Rahmen der Apoptose treten mehrere morphologische Veränderungen an den betroffenen Zellen auf. Zu den wichtigen Kennzeichen des programmierten Zelltods gehören die Kondensation des Chromatins und die Pyknose (Kernschrumpfung) bei gleichzeitig intakter Zellmembran. Weiterhin stellen die so genannte Phosphatidylserinexternalisation, d.h. die Translokation membranständiger Signalmoleküle zur Aktivierung benachbarter Phagozyten, und das so genannte „Membran-Blebbing“ mit der Abschnürung von kleinen „apoptotic bodies“ deutliche Merkmale der Apoptose dar (Darzynkiewicz et al. 1997; Trump et al. 1997; Fadok et al. 2001; Hoffmann et al. 2001). Zeitgleich mit solchen morphologischen Veränderungen finden beim programmierten Zelltod an den Zellen auch zahlreiche biochemische Wandlungsvorgänge statt. Zu diesen gehört die Fragmentierung der DNA in charakteristische Fragmente von 180-200 bp Länge sowie die Induktion einer Enzymkaskade. Diese besteht aus der stufenweisen Aktivierung so genannter Caspasen, welche Proteine definiert spalten (Dobrucki et al. 2001; Grabarek et al. 2002). All diese streng kontrollierten Vorgänge bei der Apoptose benötigen zu ihrem Ablauf mehrere Stunden und sind zum Teil reversibel. Der Zelltod durch Nekrose läuft hingegen innerhalb von Minuten und ohne Kontrollmöglichkeiten der Zelle irreversibel ab.

Aus den Untersuchungen zur proapoptotischen Wirkung der Dentinadhäsive bei Pulpazellen geht auch hervor, dass bei Zellen, an denen keine Anzeichen von Apoptose aufgetreten waren,

ein Zyklusarrest beobachtet wurde (Mantellini et al. 2003). Eine Induktion solcher Effekte wurde in der Literatur insbesondere unter der Beteiligung des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben: Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein am Ablauf der Apoptose wesentlich beteiligtes Element. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit liegt p53 in der Zelle physiologisch nur in geringer Konzentration vor. Nach einer Zellschädigung bewirkt die Hochregulation der p53-Gen-Expression, dass das kernständige und labile Proteinprodukt durch posttranskriptionale Prozesse stabilisiert wird (Lakin et al. 1999). Durch die damit verbundene Akkumulation des Tumorsuppressorproteins werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt, vor deren Induktion niedrige p53-Level die Zelle gezielt schützen (Lassus et al. 1996).

In Abhängigkeit vom Ausmaß des gesetzten Schadens werden durch den Konzentrationsanstieg von p53 zweierlei Zellantworten induziert: Zum einen kann p53 den Arrest der Zelle in der so genannten G<sub>1</sub>-Phase bewirken (Chen et al. 1996), indem die Produktion von p21 stimuliert wird. Dieses Protein interagiert anschließend mit dem Zellteilungsprotein cdk2 und der entstehende Komplex bewirkt einen Stillstand der Zelle in einem Zyklusstadium, das der mitotischen Teilung vorausgeht. Auf diese Weise können verschiedene Reparaturmechanismen greifen und die Weitergabe genetisch veränderter Information wird effektiv verhindert.

Übersteigt die Schädigung der Zelle einen gewissen Schwellenwert, so bewirkt p53 den programmierten Zelltod, um so den fehlerfreien Fortbestand des Genomes zu gewährleisten. Im Verlauf des Tumorsuppressor-vermittelten Zelluntergangs kommt es zunächst zur Transkription verschiedener Redox-kontrollierender Gene. Daraufhin wird die Bildung reaktiver Oxygenspezies gefördert und die sukzessive oxidative Degradation mitochondrialer Komponenten führt zum programmierten Zelltod (Polyak et al. 1997).

Wie bereits in vergangenen Studien nachgewiesen wurde, kann der Verlust des p53-Gens Zellen für apoptotische Prozesse desensibilisieren (Hickman et al. 2002). Bedeutsam erscheint auch die Tatsache, dass bei über der Hälfte aller Tumoren eine Mutation beziehungsweise Depletion des p53-Gens vorliegt, was die extrem wichtige Funktion des Tumorsuppressors bei der Aufrechterhaltung eines funktionierenden Organismus unterstreicht (Hall 1998).

Trotzdem ist das Vorliegen eines intakten Tumorsuppressorgens für den Ablauf apoptotischer Vorgänge keine Bedingung, was die Existenz anderer p53-unabhängiger Mechanismen beweist. Eine apoptotische Antwort ist daher immer vom jeweiligen Zelltyp abhängig und bei einigen Tumorzelllinien wurden auch schon verschiedentlich p53-unabhängige Apoptosewege



nachgewiesen. Ebenso wurden auch bei Zellen mit mutiertem oder deletiertem p53-Tumorsuppressorgen Apoptosen beobachtet (Fang et al. 1999; Wani et al. 2000).

1999 wurde von einer Forschergruppe eine synthetische Substanz identifiziert, die in der Lage ist, die Aktivität von p53 zu inhibieren (Komarov et al. 1999). Mit Hilfe dieser fortan als Pifithrin- $\alpha$  (**p fifty three inhibitor**) bezeichneten Substanz war erstmals die vorübergehende selektive Blockierung p53-vermittelter apoptotischer Prozesse möglich. Damit konnte unter gleichzeitiger Anwendung dieses Antagonisten einem ausgedehnten Zelluntergang in normalem p53-Wildtyp-Gewebe, als einem unerwünschten Nebeneffekt der Tumorthherapie, vorgebeugt werden (Komarova et al. 2000). Seit seiner Entdeckung fand dieser reversible Antagonist unter anderem auch Anwendung bei mehreren in-vitro-Studien. Beispielsweise konnten neuronale Zellen mittels Pifithrin- $\alpha$  erfolgreich am apoptotischen Zelltod gehindert werden (Culmsee et al. 2001; Zhu et al. 2002; Culmsee et al. 2003). Die zur Reduktion der Apoptosefrequenz eingesetzten Dosen wurden auch bei den hier durchgeführten Vitalitätstests angewendet. Ferner enthält die verwendete Untersuchungszelllinie A549 ein intaktes p53-Gen vom Wildtyp und ist somit für eine Inhibition des Tumorsuppressors mittels Pifithrin- $\alpha$  geeignet (Raynal et al. 1997).

Der Effekt von TEGDMA auf die Proliferation und Apoptoserate in primären humanen Gingivafibroblasten wurde auch schon mittels Lichtmikroskopie und Flow-cytometrie (FACS) untersucht. Dabei konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den hier durchgeführten Vitalitätstests (s. Abb. 9) eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition bei den exponierten Zellen festgestellt werden. Bei niedrigen Konzentrationen wurde auch nach 24 h kein Anstieg der Apoptose- oder Nekroserate beobachtet. Demgegenüber wurde bei höheren TEGDMA-Konzentrationen ein deutlicher Anstieg der Apoptosefrequenz verzeichnet. Daraus wurde geschlossen, dass das Komonomer TEGDMA zeit- und dosisabhängig zytotoxisch und apoptoseinduzierend wirkt (Janke et al. 2003).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten deuten jedoch darauf hin, dass die Übermittlung derartiger zytotoxischer Effekte von Komonomeren in A549-Zellen ohne Beteiligung des Tumorsuppressorgens p53 abläuft. Bei den durchgeführten Versuchen war lediglich nach 24-stündiger Koinkubation der Zellen mit HEMA und Pifithrin- $\alpha$  eine Verminderung der  $EC_{50}$  feststellbar (s. Tab. 2). Nachdem derselbe Effekt auch bei Ko-Exposition mit dem Lösungsmittel DMSO auftrat, wurde dies jedoch nicht auf eine Wirkung von Pifithrin- $\alpha$  zurückgeführt. Somit war bei den durchgeführten Koinkubationsversuchen kein Einfluss des p53-Antagonisten Pifithrin- $\alpha$  auf die zytotoxische Wirkung von TEGDMA

und HEMA erkennbar. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die apoptotische Wirkung der Komonomere über andere Signaltransduktionswege vermittelt wird (Emmler et al. 2003).

#### **5.2.4 Zellvitalität TEGDMA-exponierter Zellen als Begleitversuch zu Zytokinstudien**

Um im nachfolgenden die Expression und Sekretion ausgewählter inflammatorischer Zytokine nach TEGDMA-Exposition beurteilen zu können, wurde ein XTT-Test nach 4-stündigem Expositionsintervall durchgeführt. Eine zeit- und dosisabhängige Vitalitätsabnahme - wie sie aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von TEGDMA und HEMA hervorging (s. Abb. 5) - hat sich auch bei diesem Versuchsaufbau erneut bestätigt (s. Abb. 10).

### **5.3 Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression ausgewählter inflammatorischer Zytokine**

#### **5.3.1 Bestimmung der Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels Immunoassay**

Bei der Beurteilung der biologischen Aktivität von Dentalmaterialien kann die Induktion proinflammatorischer Mediatoren wertvolle Hinweise auf beginnende zelltoxische Vorgänge liefern. Vor allem im frühen Stadium und nach Anwendung sublethaler Konzentrationen sind Sekretion und Expression solcher Biomarker als Indikatoren möglicher Zellschäden von hoher Relevanz. Im Rahmen von Untersuchungen über entzündungsfördernde und zytotoxische Eigenschaften verschiedenener Inhaltsstoffe aus dentalen Restaurationmaterialien wurde deshalb schon früher explizit auf die Bedeutung der Zytokine IL-6 und IL-8 als geeignete Parameter zur Bestimmung der biologischen Aktivität zahnärztlicher Werkstoffe hingewiesen (Schmalz 1997; Schmalz et al. 1998; Schmalz et al. 2000). Nicht nur in-vitro werden IL-6 und IL-8 häufig als Parameter zur Detektion lokaler Entzündungsprozesse herangezogen. Auch nach invasiven zahnärztlichen Eingriffen (z.B. Implantationen) stellte sich heraus, dass die Spiegel dieser beiden Entzündungsboten am Folgetag aufgrund von Gewebeirritationen noch deutlich erhöht waren, wohingegen bei Nachuntersuchungen keine erhöhten Sekretionslevel von IL-6 und IL-8 mehr nachweisbar waren (Pietruski et al. 2001).

Um nähere Einblicke in den Pathomechanismus der Komonomere zu gewinnen, wurde daher als Endpunkt zur Bestimmung der möglicherweise schon sehr frühzeitig auftretenden toxischen Effekte die Regulation der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 nach einem Expositionsintervall von vier Stunden untersucht. Nach diesem Zeitraum konnten in dem zusätzlich durchgeführten Zytotoxizitätstest bei den TEGDMA-exponierten A549-Zellen noch keine deutlichen Anzeichen eines Vitalitätsverlusts in den eingesetzten Dosen (30-3000  $\mu$ M) beobachtet werden (s. Abb. 10). Nach Verlängerung des Expositionsintervalles auf 24 bis 48 h waren bei Applikation derselben TEGDMA-Konzentrationen jedoch bereits deutliche zytotoxische Effekte aufgetreten und die Vitalität der Zellen war auf etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert (s. Abb. 5). Weiterhin wurde bei anderen Studien beobachtet, dass bereits 15-30 Minuten nach einer TEGDMA-Exposition erste Anzeichen einer GSH-Depletion bei den exponierten Zellen auftreten, die sich nach 4-6 Stunden auf eine maximale Reduktion steigern (Stanislawski et al. 2003). Somit erschien die Untersuchung der Botenstoffe nach vierstündigem Expositionsintervall sinnvoll.

Um die Ergebnisse zur Induktion inflammatorischer Reaktionen nach TEGDMA-Gabe besser bewerten und einordnen zu können, wurde der gleiche Versuch außerdem mit 2,2'-Dichlordiethylsulfid bis zu einer Maximalkonzentration von 500  $\mu$ M durchgeführt. Dies entspricht einer Schwefelost-Dosis, bei welcher sich in Versuchen mit Endothelzellen nach drei bis fünf Stunden erste zytotoxische Effekte nachweisen lassen (Dabrowska et al. 1996). Für Schwefelost wurde lediglich ein 30-minütiges Expositionsintervall gewählt, da das lipophile Alkylanz innerhalb dieser Zeitspanne sicher in die Zellen permeiert und danach keine weitere Zytotoxizitätssteigerung mehr zu erwarten ist (Kehe et al. 2000). Bedingt durch die hohe Reagibilität von 2,2'-Dichlordiethylsulfid ist also zu diesem Zeitpunkt von der vollständigen Reaktion des Agens mit den Zellbestandteilen auszugehen. Um Effekte des Hydrolyseproduktes Thiodiglykol auszuschließen, wurde nach Beendigung der 30-minütigen Schwefelost-Exposition jeweils ein Mediumwechsel durchgeführt und für weitere dreieinhalb Stunden inkubiert, so dass dies der vierstündigen Gesamtexpositionszeit mit dem Komonomer TEGDMA entsprach.

Die Induktion der Botenstoffe IL-6 und IL-8 wurde bei der Untersuchungszelllinie A549 bereits häufig im Zusammenhang mit verschiedenen Entzündungsprozessen beschrieben: Zu den zahlreichen proinflammatorischen Stimuli gehörten dabei unter anderem bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und Exotoxine, Entzündungsmediatoren sowie amorphe Substanzen (Wang et al. 1999; Hetland et al. 2001; Krakauer 2002; Rose et al. 2002). Auch bei der Entstehung verschiedener entzündlicher Lungenerkrankungen, wie z.B. der

hypersensitiven Pneumonie und dem Status asthmaticus, wurde eine gesteigerte Produktion dieser beiden Entzündungsmediatoren diskutiert (Gudmundsson et al. 1999; Tillie-Leblond et al. 1999). Die basale Sekretion inflammatorischer Zytokine bei den unbehandelten Kontrollzellen stimmt außerdem mit Literaturdaten überein, in denen eine konstitutive Sekretion von IL-8 (Mizuno et al. 1994; Pechkovsky et al. 2000) und TGF- $\beta$ 1 (Koyama et al. 1997) bei der verwendeten Tumorzelllinie gezeigt werden konnte.

Im direkten Vergleich mit der proinflammatorischen Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid deutet die nach TEGDMA-Exposition feststellbare dosisabhängige Sekretionsminderung der Entzündungsboten IL-6 und IL-8 (s. Abb. 11) auf das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion und eher auf eine immunsuppressive Wirkung von TEGDMA hin. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Komonomer TEGDMA konzentrationsabhängig die Proliferation immunkompetenter Zellen beeinträchtigen kann. In diesem Zusammenhang wurde auch beobachtet, dass bei niedrigen TEGDMA-Konzentrationen eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Immunzellen auftrat, während bei steigenden Komonomerkonzentrationen eine immunsupprimierende Wirkung von TEGDMA zu beobachten war (Jontell et al. 1995). Diese immunhemmende Wirkung des Komonomers wurde dabei auf die konzentrationsabhängige Modifikation des Zytokinprofils exponierter Zellen zurückgeführt. Auch für das Komonomer HEMA konnte bereits eine dosisabhängige Suppression inflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden (Rakich et al. 1999). Eine derartige immunsuppressive Wirkung der Kompositkomponenten wäre vor allem im Hinblick auf das mittels verschiedener in-vitro-Methoden nachgewiesene mutagene Potential der Komonomere von großer Bedeutung. In Mutagenitätsstudien mittels Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Test (so genannter Comet-Assay) ist es schon gelungen, für das Komonomer TEGDMA eine mutagene Wirkung bei humanen Lymphozyten nachzuweisen (Reichl 2003). Auch aufgrund von Versuchen an Bakterienstämmen wurden in der Vergangenheit bereits häufiger erbgutverändernde Eigenschaften von TEGDMA postuliert (Schweikl et al. 1998; Schweikl et al. 1999; Geurtsen et al. 2001). Bei längerer Aufrechterhaltung des beobachteten immunsuppressiven Milieus nach einer Zell-Exposition mit TEGDMA bestünde demnach die Gefahr, dass DNA-geschädigte Zellen persistieren und in der Folgezeit entarten könnten.

Für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 wurde nach Komonomer-Exposition ein biphasischer Sekretionsverlauf festgestellt. Im Gegensatz zum Alkylanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid war hier jedoch tendenziell eher eine stimulierende Wirkung bei maximaler TEGDMA-Konzentration von 3000  $\mu$ M erkennbar (s. Abb. 11). Diese gesteigerte TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung korreliert gut

mit der gleichzeitig nachgewiesenen Sekretionsminderung von IL-6 und IL-8. Wie aus den durchgeführten Genexpressionsstudien ersichtlich wurde, war neben der Sekretion auch die Transkription des Wachstumsfaktors bei höchster Komonomerkonzentration auffällig erhöht (s. Abb. 11). Dies spricht also nicht nur für eine Freisetzung von latentem Wachstumsfaktor sondern auch für eine deutliche Stimulation seiner Neusynthese (Chen et al. 2001). Im Zusammenhang mit pathologischen Vorgängen an der Lunge wurde die gesteigerte Sekretion von TGF- $\beta$ 1 sowohl schon in Verbindung mit akutem Lungenversagen (Pittet et al. 2001) als auch bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Prozesse beobachtet. Des Weiteren konnte eine deutliche und konsistente Steigerung der TGF- $\beta$ 1-Produktion auch in Epithelzellen von Patienten mit fortgeschrittener idiopathischer Lungenfibrose beobachtet werden (Khalil et al. 1991). Wegen seiner induktiven Wirkung auf die Ablagerung extrazellulärer Matrixkomponenten sowie aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf Entzündungsmediatoren wird TGF- $\beta$ 1 daher oftmals auch als Wegbereiter chronisch-fibrotischer Prozesse gesehen.

Durch 2,2'-Dichlordiethylsulfid stimulierte Zellen wiesen im Vergleich zu den TEGDMA-exponierten Zellen einen deutlichen dosisabhängigen Sekretionsanstieg von IL-6 und IL-8 auf (s. Abb. 12). Diese Beobachtungen stimmen mit Daten aus der Literatur überein, in denen für S-Lox ein ausgeprägtes proinflammatorisches Potential beschrieben wird. Ebenso kommt es nach Exposition mit Schwefellox zu einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg der Zelltodfrequenz (Dabrowska et al. 1996; Kehe et al. 2000). Das verstärkte Auftreten entzündungsfördernder Botenstoffe erklärt sich dabei vorwiegend aus der Notwendigkeit, die zur Regeneration der entstandenen Gewebeschäden nötige Immunantwort zu initiieren.

Auch nach Exposition mit 2,2'-Dichlordiethylsulfid war für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 ein biphasischer Sekretionsverlauf feststellbar. Im Gegensatz zu TEGDMA wurde die TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung bei höchster Schwefellox-Konzentration von 500  $\mu$ M jedoch tendenziell eher gehemmt (s. Abb. 12). Bezüglich der beobachteten Sekretionsschwankungen ist zu bedenken, dass es sich bei den im ELISA detektierten TGF- $\beta$ 1-Mengen immer zum Teil um biologisch aktives (Halbwertszeit  $\sim$  2 Min) sowie auch um komplexiertes (latentes) TGF- $\beta$ 1 (Halbwertszeit  $\sim$  90 Min) handeln kann. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Fraktionen ist jedoch im Rahmen der angewandten Untersuchungsmethode wegen des Säuerungsschrittes nicht möglich. Ferner steht die Sekretions-Inhibition des antiinflammatorischen Wachstumsfaktors im Einklang mit seiner antagonistischen Wirkungsweise zu den proinflammatorischen Mediatoren IL-6 und IL-8, deren Sekretion bei der Dosis von 500  $\mu$ M deutlich erhöht war (Marie et al. 1997; Xiao et al. 2002).

In Versuchen an Endothelzellen konnte nach Exposition mit 500  $\mu\text{M}$  S-Lost bereits nach 3 h ein vermehrtes Auftreten von Nekrosen beobachtet. Weiterhin traten bei denselben Versuchen nach 5 bis 6 h auch vermehrt Apoptosen bei den behandelten Zellen auf (Dabrowska et al. 1996). Insgesamt wäre der im Untersuchungsintervall von vier Stunden beobachtete Sekretionsanstieg von IL-6 und IL-8 im Zusammenhang mit der Genexpressionsminderung (s. Abb. 14) somit eher auf die Freisetzung präformierter Entzündungsboten zurückzuführen. Ihre Ausschüttung könnte dabei entweder als ein Signal von geschädigten Zellen oder aber als Sekretion durch unmittelbar benachbarte Zellen aufgefasst werden. In Versuchen an Hautexplantaten wurde über die Stimulation von Entzündungsmediatoren nach Anwendung niedriger S-Lost-Dosen berichtet, wohingegen solche Botenstoffe nach Exposition mit höheren Konzentrationen fehlten. Dies wurde auf einen massiven Zelluntergang nach Applikation hoher Dosen zurückgeführt, der die betroffenen Zellen an einer aktiven Antwort hindert (Rikimaru et al. 1991).

Insgesamt deuten die erhobenen Daten zur Sekretion inflammatorischer Zytokine also eher auf eine immunsupprimierende Wirkung des Komonomers TEGDMA im Vergleich mit der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlor-diethylsulfid hin. Für Schwefellost konnte dagegen der zu erwartende Anstieg der Sekretion der beiden Entzündungsmarker IL-6 und IL-8 gezeigt werden.

### **5.3.2 Bestimmung der Genexpression der Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 bei TEGDMA-exponierten Zellen mittels RT-PCR**

Aufgrund ihrer bevorzugt lokalen Wirkung erscheinen Zytokine zumeist nur transient und in sehr geringen Konzentrationen im interzellulären Medium. Zum besseren Verständnis pathophysiologischer Mechanismen innerhalb dieses komplexen kreuzregulatorischen Netzwerks ist daher eine Quantifizierung am Ort der Expression sinnvoll. Hinzu kommt, dass die Proteinbestimmung wegen geringer Produktion, kurzer Halbwertszeiten sowie Mangel an Spezifität der zur Detektion verwendeten Antikörper oft fehlerbehaftet ist. Als ergänzende Methode zur Bestimmung unterschiedlicher Zytokinlevel kann die mRNA-Quantifizierung deshalb wertvolle Hinweise auf die Zuverlässigkeit der im Immunoassay ermittelten Daten geben (Platzer et al. 1995). Bezüglich der angewandten Methode ist anzumerken, dass trotz der Verwendung eines internen Standards (Haushaltsgen GAPDH) nur eine semiquantitative Aussage zur Expressionstärke der untersuchten Zytokine möglich ist (Souaze et al. 1996; Bustin 2000; Degan et al. 2000).

Die im Immunoassay nachgewiesene Inhibition der Entzündungsboten IL-6 und IL-8 nach TEGDMA-Exposition hat sich durch die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung weitgehend bestätigt. Im Vergleich zur Kontrolle war die Genexpression beider Mediatoren im untersuchten Konzentrationsbereich fast durchgehend vermindert. Obwohl ansonsten keine eindeutige Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, war die Genexpression von IL-6 und IL-8 bei höchster TEGDMA-Konzentration wie auch in den Immunoassay-Versuchen am deutlichsten inhibiert. Auffällig war außerdem der dosisabhängige signifikante Anstieg der Gen-Expression von TGF- $\beta$ 1. Im Hinblick auf die sehr verschiedenartigen Funktionen des Wachstumsfaktors und wegen seiner autoregulativen Wirkung bei der verwendeten Zelllinie A549 (Kim et al. 1989) erscheint dieses Ergebnis besonders interessant.

Eine erhöhte Expression und Sekretion von TGF- $\beta$ 1 wurde schon im Zusammenhang mit der Pathogenese von chronisch-obstruktiven pulmonalen Erkrankungen beobachtet (de Boer et al. 1998). Die gesteigerte Sekretion des Wachstumsfaktors führt im Verlauf derartiger Prozesse primär zu einer vermehrten Deposition extrazellulärer Matrixkomponenten und damit zur Fibrose. Auch sind immunsuppressive Effekte von TGF- $\beta$ 1 beschrieben, bei denen der Wachstumsfaktor die Proliferation von Immunzellen hemmen und gleichzeitig die aktivierende Wirkung anderer Zytokine aufheben kann (Derynck et al. 1998).

Des Weiteren wird die gesteigerte Produktion von TGF- $\beta$ 1 auch mit der Entstehung von chronisch-inflammatorischen Lungenkrankheiten in Verbindung gebracht, die mit einer Redox-Imbalanz einhergehen: In früheren Studien wurde dies auf die inhibierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression des Enzyms gamma-Glutamyl-Cystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS) zurückgeführt (Jardine et al. 2002). Somit besteht auch die Möglichkeit, dass TGF- $\beta$ 1 direkt in die Synthese von Glutathion als dem wichtigsten Scavenger für oxidative Noxen eingreifen kann. Die Synthese des Redox-Schutzmoleküls GSH erfolgt nämlich grundsätzlich in zwei Schritten, wobei  $\gamma$ -GCS für die de-novo-Biosynthese von Glutathion den limitierenden Schritt darstellt. Ansonsten kommt für die Produktion von GSH nur eine Regeneration von reagiertem GSSG durch membranständige Enzyme in Betracht. Auch in weiteren Studien an Endothelzellen aus bovinen Pulmonalarterien wurden für TGF- $\beta$ 1 prooxidative Effekte durch GSH-Depletion und verringerte GSH-Synthese nachgewiesen (White et al. 1992; Boustani et al. 1997). Zudem gilt die Aktivierung des latenten Wachstumsfaktors durch reaktive Oxygenspezies als gesichert (Vodovotz et al. 1999). Während einige Untersuchungen lediglich den zeit- und dosisabhängigen Anstieg von TGF- $\beta$ 1 nach oxidativem Stress beschreiben (Bellocq et al. 1999), wurde in anderen Arbeiten sogar eine induktive Wirkung des Wachstumsfaktors auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert (Arsalane et al.

1997; Pittet et al. 2001; Jardine et al. 2002). Insgesamt würde ein deutlicher TGF- $\beta$ 1-Konzentrationsanstieg, wie er aufgrund der gesteigerten Genexpression des Wachstumsfaktors zu erwarten ist (s. Abb. 13), gut mit der durch Komonomere verursachten GSH-Depletion übereinstimmen. Eine deutliche intrazelluläre Abnahme von Glutathion innerhalb weniger Stunden (4-12 h) nach TEGDMA-Exposition wurde bereits bei mehreren Zelllinien beschrieben (Engelmann et al. 2002; Walther et al. 2002; Stanislawski et al. 2003). Synergistisch mit anderen Substanzen, welche Redoximbalancen induzieren, kann TGF- $\beta$ 1 überdies als Auslöser für die Inangsetzung der apoptotischen Kaskade dienen (Hall 1999a). Eine Beteiligung der gesteigerten Produktion von TGF- $\beta$ 1 an der Vermittlung Fas-Ligand induzierter apoptotischer Prozesse ist erwiesen (Hagimoto et al. 2002). Fest steht auch, dass apoptotische Zellen signifikant mehr TGF- $\beta$ 1 produzieren und sezernieren als vitale Zellen und damit eine inflammatorische Antwort verhindern können (Chen et al. 2001; Hodge et al. 2002). Die Freisetzung des bioaktiven Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 trägt also bei der Apoptose entscheidend zur Entstehung des immunsuppressiven Milieus bei. Im untersuchten TEGDMA-Konzentrationsbereich von 30-3000  $\mu$ M tritt ein vermehrter Untergang von Zellen - gemäß den Ergebnissen des Zytotoxizitätstests - erst nach etwa 24 bis 48 h auf (s. Abb. 5). Damit könnte die Hochregulation des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 als Vorbote einer Induktion von apoptotischen Vorgängen angesehen werden. Die zeit- und dosisabhängige apoptoseinduzierende Wirkung des Komonomers TEGDMA wurde kürzlich auch bei humanen Gingivafibroblasten nachgewiesen (Janke et al. 2003). Dabei wurde - ebenso wie bei den hier durchgeführten Genexpressionsstudien - festgestellt, dass nach 4-stündiger Exposition ebenfalls noch keine Anzeichen von Vitalitätsverlust bei den TEGDMA-exponierten Zellen auftraten, wohingegen nach 24-stündiger Expositionszeit ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen war. Auch die beobachtete Inhibition der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 (s. Abb. 13) lässt in diesem Zusammenhang nicht auf eine massive Schädigung der Zellen durch TEGDMA und ihren sofortigen nekrotischen Untergang unter Beteiligung von entzündlichen Prozessen schließen.

Die Expression der beiden Entzündungsboten IL-6 und IL-8 nach Exposition mit der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid war im Vergleich zur Kontrolle nach vierstündiger Exposition in Abhängigkeit der Dosis leicht vermindert (s. Abb. 14). Dies spricht zunächst - unter Einbeziehung der im Immunoassay erhobenen Daten - nicht für einen konsistenten Produktionsanstieg beider Entzündungsmediatoren zum untersuchten Zeitpunkt nach vier Stunden. In vergleichbaren Studien an humanen Keratinozyten wurde jedoch bei



Schwefellost-exponierten Zellen nach 6-12 h ein drastischer Anstieg der m-RNA von IL-8 beschrieben (Lardot et al. 1999).

Hinsichtlich der mittels RT-PCR detektierten Menge an Boten-RNA für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 war nach Schwefellost-Gabe bei den A549-Zellen keine eindeutige Dosisabhängigkeit der Expressionsintensität erkennbar (s. Abb. 14). Die Abnahme bei höchster Schwefellostdosis korreliert jedoch mit Untersuchungen, wonach der Wachstumsfaktor antagonistisch zu den beiden proinflammatorischen Mediatoren IL-6 und IL-8 wirkt (Marie et al. 1997; Xiao et al. 2002).

Im direkten Vergleich mit dem proinflammatorischen Alkylanz ergeben sich aus den Zytokinstudien Anhaltspunkte für die Induktion eines immunsuppressiven Milieus nach 4-stündiger TEGDMA-Exposition der untersuchten A549-Lungenzellen. Dies könnte im Zusammenhang mit den bereits früher postulierten mutagenen Wirkungen des Komonomers TEGDMA die Entstehung DNA-schädigender Effekte sowie die nachfolgende Entartung der Zellen begünstigen. Generell muß bei der Betrachtung vergleichender Toxizitätsstudien berücksichtigt werden, dass die mittels Zytotoxizitätstests erhobenen Daten lediglich akute Effekte auf zellulärer Ebene detektieren können (Kehe et al. 2001). Anhand der gewonnenen Ergebnisse sind deshalb noch keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Gesundheitsgefährdung durch die untersuchten Substanzen möglich. Der Nachweis bestimmter Eigenschaften in in-vitro-Systemen kann daher lediglich Hinweise auf mögliche Gefahren geben, da sämtliche Reparatur- und Kompensationsmechanismen komplexer Organsysteme nicht erfasst werden. Ebenso wie bei anderen toxischen Stoffen besteht auch für kanzerogene Substanzen eine Beziehung zwischen verabreichter Dosis und den resultierenden Konzentrationen und Wirkungen im Zielorgan. Genotoxische Schäden können jedoch, wenn sie nicht rechtzeitig repariert werden, zu persistenten und irreversiblen Schäden führen, welche bei der Zellteilung dann an Tochterzellen weitergegeben werden könnten. Somit kann es zu einer Summierung induzierter Schäden über längere Zeiträume kommen. Für Kanzerogene mit initiiender, genotoxischer Wirkung, zu denen möglicherweise auch das beim Abbau der Komonomere entstehenden Epoxid gehört, existiert deshalb kein Schwellenwert, so dass auch niedrige Dosen ein zwar geringes, aber dennoch immer vorhandenes Risiko darstellen (Nuhn 1993).

## **5.4 Schlussbetrachtung**

Zusammenfassend ergeben sich für die unter Punkt 1.5 formulierten Fragestellungen folgende Antworten:

1. Für die beiden Komonomere TEGDMA und HEMA wurde bei den untersuchten A549-Lungentumorzellen eine zeit- und dosisabhängige zytotoxische Wirkung innerhalb des Expositionsintervalles von 8 bis 48 h nachgewiesen. Die relative Toxizität beider Komonomere - definiert als Verhältnis der Zytotoxizität von TEGDMA im Vergleich zu HEMA - sank von 11:1 nach 8-stündiger Komonomer-Exposition auf ein Verhältnis von 3:1 nach 48 h ab.
2. Die Komonomere TEGDMA und HEMA sowie die getesteten Metabolite Methacrylsäure, Paraformaldehyd und 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure (Epoxid) induzierten bei den untersuchten A549-Lungentumorzellen einen konzentrationsabhängigen Vitalitätsverlust nach 24 h. Die anhand der halbmaximalen Effektkonzentrationen ( $EC_{50}$ ) ermittelten Toxizitäten beider Komonomere deuten im Vergleich mit den getesteten Abbauprodukten darauf hin, dass das postulierte intermediäre Epoxid an der Zytotoxizität von TEGDMA beteiligt zu sein scheint.
3. Bei Koinkubationsversuchen von TEGDMA bzw. HEMA mit Pifithrin- $\alpha$  konnte weder nach Ablauf der 24- noch 48-stündigen Expositionszeit bei den untersuchten A549-Lungentumorzellen ein Einfluss des p53-Antagonisten auf die zytotoxische Wirkung der beiden Komonomere nachgewiesen werden. Das Tumorsuppressorgen p53 scheint somit bei der Übermittlung des komonomerinduzierten Vitalitätsverlusts keine bedeutende Rolle zu spielen.
4. Nach 4-stündiger Exposition von A549-Zellen mit TEGDMA ergaben sich aufgrund der nachgewiesenen Genexpressions- und Sekretionslevel der Entzündungsmediatoren IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 keine Anzeichen dafür, dass TEGDMA bei den exponierten Zellen eine proinflammatorische Wirkung erzeugt. Der Vergleich mit der Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid lieferte Hinweise darauf, dass das Komonomer bei den untersuchten Zellen dosisabhängig immunsuppressive Effekte induziert. Zudem wurde der signifikante Anstieg der Genexpression von TGF- $\beta$ 1 als Indiz einer möglichen chronisch-fibrosierenden Wirkung von TEGDMA angesehen.

### ***Schlussfolgerung:***

Beide Komonomere TEGDMA und HEMA induzierten bei der untersuchten Lungentumorzelllinie A549 eine zeit- und dosisabhängige zytotoxische Wirkung. Darüberhinaus zeigte sich, dass insbesondere auch das möglicherweise bei der Verstoffwechselung gebildete Epoxid für die Zytotoxizität des Komonomers TEGDMA verantwortlich zu sein scheint. Die Untersuchungen zur Sekretion und Genexpression inflammatorischer Zytokine deuteten auf eine potentielle immunsupprimierende und fibrosierende Wirkung des untersuchten Komonomers TEGDMA hin.

## 6. Zusammenfassung

Aufgrund der anhaltenden Kontroverse um das Zahnfüllungsmaterial Amalgam haben sich in der Zahnheilkunde in den vergangenen Jahren zunehmend zahnfarbene Restaurationsmaterialien etabliert. Für dentale Restaurationen werden heutzutage vorwiegend so genannte Komposite verwendet. In früheren Untersuchungen wurden für einige Inhaltsstoffe dieser neuartigen Füllungsmaterialien zellschädigende Effekte nachgewiesen. In der vorliegenden Studie wurden deshalb zwei Vertreter von Komponenten aus dentalen Kompositen - nämlich die beiden Komonomere Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) - näher bezüglich ihres zytotoxischen Potentials untersucht. Als in-vitro-Modell wurde aufgrund ihrer hohen metabolischen Kapazität die etablierte humane Lungentumorzelllinie A549 ausgewählt.

Mittels Vitalitätstest (XTT-Test) wurde zunächst die Zeitabhängigkeit zellschädigender Effekte von TEGDMA und HEMA in einem 8-, 24- und 48-stündigen Expositionsintervall bestimmt. Die zytotoxische Wirkung der beiden Komonomere nahm dabei im Verlauf des 48-stündigen Untersuchungszeitraumes stetig zu, wobei sich TEGDMA anhand seiner halbmaximalen Effektkonzentrationen ( $EC_{50}$ ) zu jedem gemessenen Zeitpunkt als toxischer im Vergleich zu HEMA erwies. Es konnte ferner eine zeitabhängige Angleichung der Toxizitäten beider Kompositkomponenten beobachtet werden. Während die relative Toxizität von TEGDMA im Vergleich zu HEMA nach 8 Stunden noch um das 11-fache erhöht war, betrug sie nach 48 Stunden nur mehr den 3-fachen Wert.

Für den Abbau von TEGDMA und HEMA wurde in der Vergangenheit die Entstehung toxischer Metabolite postuliert. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den beiden Komonomeren auch einige für ihre Verstoffwechslung postulierte Intermediate auf ihre Zytotoxizität untersucht. Dabei zeigten die getesteten Metabolite Methacrylsäure, Paraformaldehyd und 2,3-Epoxy-2-methyl-propionsäure (Epoxid) bei den exponierten Zellen nach 24 h dosisabhängige zytotoxische Effekte. Für den TEGDMA-Metaboliten Triethylenglykol konnte im Untersuchungsintervall von 24 h keine zellschädigende Wirkung nachgewiesen werden. Die mittels Vitalitätstest bestimmten  $EC_{50}$ -Werte betragen für TEGDMA 1,8 mmol/L, für HEMA 9,6 mmol/L, für Methacrylsäure 4,9 mmol/L, für Paraformaldehyd 5,5 mmol/L und für das postulierte Epoxid 1,7 mmol/L. Bei Koinkubation der Zellen mit Triethylenglykol und Methacrylsäure in äquimolarem Verhältnis zu TEGDMA (1:2) konnte gezeigt werden, dass die auftretenden zellschädigenden Effekte auf die intermediäre Methacrylsäure zurückzuführen sind, da die ermittelte  $EC_{50}$  von 4,7 mmol/L

annähernd mit der für Methacrylsäure bestimmten Toxizität (4,5 mmol/L) übereinstimmte. Aufgrund der 2,7-fach gesteigerten Toxizität von TEGDMA im Vergleich zu Methacrylsäure wurde die Beteiligung toxischer Epoxide an der Zytotoxizität von TEGDMA vermutet.

In früheren Studien wurde bereits bei verschiedenen Zelllinien eine Induktion apoptotischer Prozesse durch Komonomere nachgewiesen. Um Rückschlüsse über die Art der Komonomer-induzierten Zellschäden zu erhalten, wurden A549-Zellen für 24 und 48 h den Komonomeren TEGDMA und HEMA unter Koinkubation mit dem p53-Antagonisten Pifithrin- $\alpha$  exponiert. Wie die antagonistische Blockade des Apoptose-Signaltransduktors p53 ergab, laufen die zellschädigenden Effekte der Komonomere TEGDMA und HEMA auf A549-Zellen wahrscheinlich nicht unter Beteiligung des Tumorsuppressors p53 ab, da weder nach 24- noch nach 48-stündiger Zellexposition ein Einfluss von Pifithrin- $\alpha$  auf die zelltoxische Wirkung der Komonomere festgestellt werden konnte.

Zusätzlich zu den Zytotoxizitätsstudien wurde mittels Immunoassay- und RT-PCR-Technik auch die Ausschüttung und Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 nach 4-stündiger Zellexposition mit dem Komonomer TEGDMA untersucht. Dabei ergaben sich bei vergleichender Betrachtung mit der proinflammatorischen Referenzsubstanz 2,2'-Dichlordiethylsulfid anhand der Sekretionsminderung der Entzündungsmarker IL-6 um das 13-fache und IL-8 um das 1,6-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle Hinweise auf eine mögliche immunsuppressive Wirkung von TEGDMA. Der auf Ebene der Genexpression beobachtete deutliche Anstieg von TGF- $\beta$ 1 um das 11-fache unbehandelter Zellen stellt ferner ein Indiz für eine mögliche fibrosierende Wirkung des Komonomers TEGDMA dar.

## 7. Summary

### **In-vitro-toxicity of components of dental restorative materials**

Due to a persistent controversial discussion on the dental filling material amalgam, during the past years in dentistry an increasing number of tooth-coloured materials have been introduced. For dental restorations, nowadays, mainly so called composites are being used. However, prior investigations have revealed the induction of cytotoxic effects by components of this new kind of filling materials. In this study, the cytotoxic potentials of two components of dental composites - the comonomers triethyleneglycoldimethacrylate (TEGDMA) and 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) - were examined. For this purpose, the established human bronchoalveolar carcinoma derived cell-line A549 had been chosen as an in-vitro-model owing to its high metabolic capacity.

By means of the XTT-viability-assay the cytotoxicity of TEGDMA and HEMA after an incubation-period of 8, 24 and 48 h was determined. Within 48 h, both comonomers induced steadily augmenting cytotoxic effects in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, according to the half-maximum-effect concentrations ( $EC_{50}$ ) obtained, TEGDMA proved to be more toxic than HEMA at any interval tested. Moreover, a time-dependent adaptation of the toxicities of both composite components could be observed. The relative toxicity of TEGDMA in comparison to HEMA declined from an initial ratio of 11:1 after 8 h to a ratio of only 3:1 after 48 h.

In the past, the formation of toxic metabolites during degradation of TEGDMA and HEMA had been proposed. Therefore, in addition to the comonomers also certain postulated metabolites of TEGDMA and HEMA were investigated. After an incubation-period of 24 h the following intermediates, likewise, showed dose-dependent cytotoxic effects in exposed A549-cells: methacrylic acid (MA), paraformaldehyde and 2,3-epoxy-2-methyl-propionic acid (epoxide). For the degradation product triethyleneglycol (TEG) no cytotoxic effects could be detected.  $EC_{50}$ -values, as determined by viability assay, were: TEGDMA 1,8 mmol/L, HEMA 9,6 mmol/L, methacrylic acid 4,9 mmol/L, paraformaldehyde 5,5 mmol/L, epoxide 1,7 mmol/L. As could be seen by exposure of cells with triethyleneglycol and methacrylic acid in equal molar proportions to TEGDMA (1:2), the exertion of cytotoxic effects seems to be uniquely derived from methacrylic acid, since the obtained  $EC_{50}$ -value of 4,7 mmol/L in co-incubated cells was similar to the one found in methacrylate-treated cells (4,5 mmol/L). Furthermore, because of the 2.7-fold increased

toxicity of TEGDMA in comparison to methacrylic acid the formation of toxic epoxides during the metabolic degradation of TEGDMA was assumed.

In prior studies, the induction of apoptotic processes after cell-incubation with comonomers had been shown. In order to obtain further information on the nature of effects induced, A549-cells were exposed to either TEGDMA or HEMA in combination with the p53-antagonist pifithrin- $\alpha$ . The antagonistic blockade of the apoptosis-related tumorsuppressor p53 revealed, that comonomer-associated cytotoxic effects in A549-cells are not likely to be mediated by p53. After 24 and 48 h of cell-exposure with the two comonomers no influence of pifithrin- $\alpha$  on the cytotoxicity of TEGDMA and HEMA could be observed.

Following a 4-hour exposure of A549-cells with the comonomer TEGDMA, additionally, the secretion and gene-expression of the inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TGF- $\beta$ 1 was determined by means of Immunoassay- and RT-PCR-technique. Comparing the obtained results to the proinflammatory substance bis-2-chloroethyl sulfide, the observed 13-fold reduction of secreted IL-6 compared to untreated cells and the 1.6-fold decrease of IL-8 indicated a potential immunosuppressive property of TEGDMA. Moreover, the significant increase in TGF- $\beta$ 1-expression by a factor of 11 in comparison to untreated cells was interpreted as hint to a possible profibrotic function of TEGDMA.

## 8. Literatur

Andreasson H, Boman A, Johnsson S, Karlsson S, Barregard L. On permeability of methyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate and triethyleneglycol dimethacrylate through protective gloves in dentistry. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(6):529-535.

Arroyo CM, Broomfield CA, Hackley BE. The role of interleukin-6 (IL-6) in human sulfur mustard (HD) toxicology. *Int J Toxicol* 2001; 20(5):281-296.

Arroyo CM, Schafer RJ, Kurt EM, Broomfield CA, Carmichael AJ. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard (HD): cytokine release using a non-enzymatic detachment procedure. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18(1):1-11.

Arroyo CM, Schafer RJ, Kurt EM, Broomfield CA, Carmichael AJ. Response of normal human keratinocytes to sulfur mustard: cytokine release. *J Appl Toxicol* 2000; 20:63-72.

Arsalane K, Dubois CM, Muanza T, Begin R, Boudreau F, Asselin C, Cantin AM. Transforming growth factor-beta 1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(5):599-607.

Bahnemann I, Emmler J, Kehe K, Reichl FX, Folwaczny M, Hickel R. Aktivierung von Caspase 3/7 und lysosomaler Enzyme in A549 durch dentale Kompositwerkstoffe und Quecksilberverbindungen. Tagungsband zur "21. Arbeitstagung Mengen- und Spurenelemente", Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 18.-19.10.2002a:1135-1139.

Bahnemann I, Emmler J, Kehe K, Reichl FX, Folwaczny M, Hickel R. Dental composite components and mercury compounds induce apoptosis and necrosis in A549 cells. *Naun Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002b; 365, Suppl 1, R 137, Nr. 534.

Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 1988; 67(10):1295-1299.



Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and Cr-51 release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mat* 1995; 11(5-6):327-331.

Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Yourtee DM. Effect of esterase on methacrylates and methacrylate polymers in an enzyme simulator for biodurability and biocompatibility testing. *J Biomed Mater Res* 1994; 28(1):59-63.

Bellocq A, Azoulay E, Marullo S, Flahault A, Fouqueray B, Philippe C, Cadranet J, Baud L. Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor-beta 1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21(1):128-136.

Bieler CA, Arlt VM, Wiessler M, Schmeiser HH. DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzathrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes. *Cancer Lett* 2003; 200(1):9-18.

Bjorklund G. The history of dental amalgam. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1989; 109(34-36):3582-3585.

Boustani MR, Hertig IA, Maloney EK, Fanburg BL, White AC. Transforming growth factor-beta 1 decreases uptake of glutathione precursor amino acids in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Endothelium* 1997; 5(1):1-10.

Bowen RL. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bisphenol and glycidyl methacrylate. 1962; US Patent 3,066,112.

Bowen RL. Silica-resin direct filling material and method of preparation. 1965; US Patent 3,194,783 and 3,194,784.

Bundesministerium für Gesundheit, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bundeszahnärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung. *Restaurationsmaterialien in der Zahnheilkunde*. Konsenspapier, Eigenverlag 1997.

Buonocore MG. Adhesive sealing of pits and fissures for caries prevention with ultraviolet light. *J Am Dent Assoc* 1970; 80:324.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2):169-193.

Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93:472-483.

Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta 1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol* 2003; 162(2):533-546.

Chauncey HH. Salivary enzymes. *J Am Dent Assoc* 1961; 63:361-369.

Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001; 14(6):715-725.

Chen W, Wahl SM. Manipulation of Transforming growth factor-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Microbes Infect* 1999; 1:1367-1380.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10(19):2438-2451.

Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000a; 108(1):59-69.

Cimpan MR, Gjertsen BT, Skaug N, Gjerdet NR, Hansen B, Matre R. A comparative study of cytopathogenic effects of four denture base acrylic resins. *J Dent Res* 1998; 77:1480.

Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, Skaug N. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 2000b; 58(5):217-228.

Cohen GM. Pulmonary metabolism of foreign compounds: its role in metabolic activation. *Env Health Persp* 1990; 85:31-41.

Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor beta 1 and beta 3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* 2001; 56(7):549-556.

Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 2000; 28:56-61.

Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethylmethacrylate. *ASDC J Dent Child* 1999; 66(5):337-342.

Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Kriegstein J. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J Neurosci* 2003; 23(24):8586-8595.

Culmsee C, Zhu XX, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 2001; 77(1):220-228.

Dabrowska MI, Becks LL, Lelli JL, Levee MG, Hinshaw DB. Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 141(2):568-583.

Dacre JC, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacol Rev* 1996; 48(2):289-326.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27(1):1-20.

de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, van Krieken JH. Transforming growth factor-beta 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(6):1951-1957.

de Gee AJ, Wendt SL, Werner A, Davidson CL. Influence of enzymes and plaque acids on in vitro wear of dental composites. *Biomaterials* 1996; 17(13):1327-1332.

Debnath S, Wunder SL, McCool JI, Baran GR. Silane treatment effects on glass/resin interfacial shear strengths. *Dent Mater* 2003; 19(5):441-448.

Degan M, Mazzocco FT, Di Francia R, Rossi FM, Pinto A, Gattei V. Normalizing complementary DNA by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of beta(2)-microglobulin: molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9(2):98-109.

Derynck R, Choy L. Transforming growth factor-beta and its receptors. in: Thomson A (Hrsg.) *The Cytokine Handbook*, 3rd Edition. London: Academic Press; 1998: 593-636.

Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis - a confocal microscopy study. *Micron* 2001; 32(7):645-652.

Durner J. Untersuchungen zur Zytotoxizität in vitro und zur Toxikokinetik in vivo der Komposit-Komonomere TEGDMA und HEMA. Technische Universität München; 2000.

Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC, Glaros AG, Yourtee DM. In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dent Mater* 2002; 18:413-421.

Emmler J, Bahnemann I, Kehe K, Kreppel H, Folwaczny M, Reichl FX, Hickel R. Time-dependent cytotoxicity of dental composite components in A549 cells. Tagungsband zur "21. Arbeitstagung Mengen- und Spurenelemente", Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 18.-19.10.2002:1141-1145.

Emmler J, Bahnemann I, Kehe K, Kreppel H, Folwaczny M, Reichl FX, Hickel R. Pifithrin- $\alpha$  has no influence on cytotoxicity of dental composite components in A549 cells. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2003; 367, Suppl. 1, R 150, Nr. 585.

Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. J Biomed Mater Res 2002; 63(6):746-751.

Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. J Dent Res 2001; 80(3):869-875.

Ernst CP, Willershausen B. Eine aktuelle Standortbestimmung zahnärztlicher Füllungskomposite. Zahnärztl Mitt 2003; 93(7):790-800.

Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, Schweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. J Endod 1999; 25(5):359-363.

Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. J Biol Chem 2001; 276(2):1071-1077.

Fang L, Igarashi M, Leung J, Sugrue MM, Lee SW, Aaronson SA. p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. Oncogene 1999; 18:2789-2797.

Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. J Oral Rehabil 1994; 21(4):441-452.

Ferracane JL, Greener EH. Fourier transform infrared analysis of degree of polymerization in unfilled resins - methods comparison. *J Dent Res* 1984; 63(8):1093-1095.

Finer Y, Santerre JP. Biodegradation of a dental composite by esterases: dependence on enzyme concentration and specificity. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003; 14(8):837-849.

Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 2004; 83(1):22-26.

Forst HT. Problems of multiple tests and evaluations in drug research. *Arzneimittelforschung* 1985; 35(3):563-569.

Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y. Cytotoxicity and phospholipid-liposome phase-transition properties of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29(3):245-261.

Fujisawa S, Kadoma Y, Masuhara E. A calorimetric study of the interaction of synthetic phospholipid liposomes with vinyl monomers, acrylates and methacrylates. *J Biomed Mater Res* 1984; 18(9):1105-1114.

Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; 188(5):887-896.

Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* 1996; 24(1-2):125-128.

Gerzina TM, Hume WR. Effect of hydrostatic-pressure on the diffusion of monomers through dentin in-vitro. *J Dent Res* 1995; 74(1):369-373.

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

Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *Aust Endod J* 2001; 27(1):12-21.

Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(2):687-695.

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

Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-biological interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res* 2001; 80(12):2046-2050.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1417-1423.

Goldberg NB, Goldberg AF, Gergans GA, Loga S, Taschini P, Molnar ZV. A rabbit lung model for testing reaction to inhaled dental restorative particles. *Chest* 1992; 101(3):829-832.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996; 17: 103-114.

Grabarek J, Darzynkiewicz Z. In situ activation of caspases and serine proteases during apoptosis detected by affinity labeling their enzyme active centers with fluorochrome-tagged inhibitors. *Exp Hematol* 2002; 30(9):982-989.

Gudmundsson G, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells release interleukin-8 in response to a thermophilic bacteria that causes hypersensitivity pneumonitis. *Exp Lung Res* 1999; 25(3):217-228.

Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. Transforming growth factor-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168(12):6470-6478.

Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 1999a; 29(3):238-245.

Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocr Relat Cancer* 1999b; 6(1):3-8.

Hall PA. p53: The challenge of linking basic science and patient management. *Oncologist* 1998; 3(4):218-224.

Halvorson RH, Erickson RL, Davidson CL. The effect of filler and silane content on conversion of resin-based composite. *Dent Mater* 2003; 19(4):327-333.

Hansasuta C, Neiders ME, Aguirre A, Cohen RE. Cellular inflammatory responses to direct restorative composite resins. *J Prosthet Dent* 1993; 69(6):611-616.

Hansen R, Oren M. p53 - from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7(1):46-51.

Harhammer R. Zur Risikobewertung des zahnärztlichen Füllungswerkstoffes Amalgam. *Bundesgesundheitsbl* 2001; 44:149-154.

Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 1996; 368(3-4):181-194.

Heintzenberg KH. Vergleich der mechanischen Festigkeiten gelöteter und lasergeschweißter Prüfkörper aus einer Palladiumbasis-Legierung nach chemischer Belastung. Freie Universität Berlin; 2002.

Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M. Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20(1):46-55.

Hickel R, Dasch W, Janda R, Tyas M, Anusavice K. New direct restorative materials. *Int Dent J* 1998a; 48 (1):3-16.

Hickel R. Zur Einführung und Verwendung neuer Füllungswerkstoffe - Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK. *DZZ* 1998b; 53 (Stand 12/98).

Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(1):60-66.



Hirano T. Interleukin-6. in: Thomson A (Hrsg.) *The Cytokine Handbook*, 3rd Edition. London: Academic Press; 1998:197-228.

Hodge S, Hodge G, Flower R, Reynolds PN, Scicchiatano R, Holmes M. Up-regulation of production of TGF-beta and IL-4 and down-regulation of IL-6 by apoptotic human bronchial epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(6):537-543.

Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AJ, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001; 155(4):649-659.

Hume WR, Gerzia TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996; 7(2):172-179.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth F R* 2002;13 (4-5): 357-368.

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 2004; 20(1):12-20.

Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials* 2002; 23(7):1707-1719.

Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82(10):814-818.

Jardine H, MacNee W, Donaldson K, Rahman I. Molecular mechanism of transforming growth factor-beta (1)-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells - Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem* 2002; 277(24):21158-21166.

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

Kauppi MR, Combe EC. Polymerization of orthodontic adhesives using modern high-intensity visible curing lights. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 124(3):316-322.

Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, Hickel R, Forth W. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 2001; 22(4):317-322.

Kehe K, Reisinger H, Szinicz L. Sulfur mustard induces apoptosis and necrosis in SCL II cells in vitro. *J Appl Toxicol* 2000; 20:81-86.

Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1(15):1255-1263.

Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh HW. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14(2):131-138.

Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5(2):155-162.

Kim SJ, Jeang KT, Glick AB, Sporn MB, Roberts AB. Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem* 1989; 264(12):7041-7045.

Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater* 1990; 6(1):13-16.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999; 285(5434):1733-1737.

Komarova EA, Gudkov AV. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(6):657-667.

Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry-Moscow* 2000; 65(1):41-48.

Kondo M, Weissman IL. Function of cytokines in lymphocyte development. *Curr Top Microbiol* 2000; 251: 59-65.

Konig B, Steinbach F, Janocha B, Drynda A, Stumm M, Philipp C, Allhoff EP, Konig W. The differential expression of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF-alpha in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19(2C):1519-1524.

Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Nagai S, Izumi T. Type II pneumocytes release chemoattractant activity for monocytes constitutively. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 16(5):830-837.

Krakauer T. Stimulant-dependent modulation of cytokines and chemokines by airway epithelial cells: cross talk between pulmonary epithelial and peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(1):126-131.

Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18(53):7644-7655.

Lardot C, Dubois V, Lison D. Sulfur mustard upregulates the expression of interleukin-8 in cultured human keratinocytes. *Toxicol Lett* 1999; 110(2):29-33.

Larsen IB, Freund M, Munksgaard EC. Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res* 1992; 71(11):1851-1853.

Larsen IB, Munksgaard EC. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins. *Scand J Dent Res* 1991; 99(3):254-261.

Lassus P, Ferlin M, Piette J, Hibner U. Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *Embo J* 1996; 15(17):4566-4573.

Le Bell AM, Tanner J, Lassila LV, Kangasniemi I, Vallittu PK. Depth of light-initiated polymerization of glass fiber-reinforced composite in a simulated root canal. *Int J Prosthodont* 2003; 16(4):403-408.

Lee SY, Huang HM, Lin CY, Shih YH. Leached components from dental composites in oral simulating fluids and the resultant composite strengths. *J Oral Rehabil* 1998; 25(8):575-588.

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from human carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 1976; 17(1):62-70.

Lindsay CD, Hambrook JL. Protection of A549 cells against the toxic effects of sulphur mustard by hexamethylenetetramine. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16:106-114.

Lonroth EC, Shahnava H. Adverse health reactions in skin, eyes, and respiratory tract among dental personnel in Sweden. *Swed Dent J* 1998; 22(1-2):33-45.

Lonroth EC, Shahnava H. Use of polymer materials in dental clinics, case study. *Swed Dent J* 1997; 21(4):149-159.

Lösch U, Cihak J, Erhard MH, Kaspers B. Blut und Abwehr. in: v.Engelhardt W, Breves B (Hrsg.) *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Hippokrates Verlag; 2000:190-213.

Lovell LG, Newman SM, Donaldson MM, Bowman CN. The effect of light intensity on double bond conversion and flexural strength of a model, unfilled dental resin. *Dent Mater* 2003; 19(6):458-465.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1):3-15.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82(8):592-596.

Marie C, Cavaillon JM. Negative feedback in inflammation: the role of antiinflammatory cytokines. *Bull Inst Pasteur* 1997; 95(1):41-54.

Mathias CG, Caldwell TM, Maibach HI. Contact dermatitis and gastrointestinal symptoms from hydroxyethylmethacrylate. *Br J Dermatol* 1979; 100(4):447-449.

McCarthy TJ, Hayes EP, Schwartz CS, Witz G. The reactivity of selected acrylate esters toward glutathione and deoxyribonucleosides in-vitro - structure-activity-relationships. *Fundam Appl Toxicol* 1994; 22(4):543-548.

Mitchell LA, Moran JH, Grant DF. Linoleic acid, cis-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to Sf-21 cells in the absence of albumin. *Toxicol Lett* 2002; 126:187-196.

Mizuno K, Sone S, Orino E, Mukaida N, Matsushima K, Ogura T. Spontaneous production of interleukin-8 by human lung cancer cells and its augmentation by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 at protein and mRNA levels. *Oncology* 1994; 51(5):467-471.

Moore MM, Amtower A, Doerr CL, Brock KH, Dearfield KL. Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate, and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ Mol Mutagen* 1988; 11(1):49-63.

Moran JH, Weise R, Schnellmann RG, Freeman JP, Grant DF. Cytotoxicity of linoleic acid diols to renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146:53-59.

Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.

Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res* 1990; 98(3):261-267.

Nakamura M, Oshima H, Hashimoto Y. Monomer permeability of disposable dental gloves. *J Prosthet Dent* 2003; 90(1):81-85.

Nakamura M, Slots J. Salivary enzymes: origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res* 1983; 18:559-569.

Nayebzadeh A, Stangel I, Dufresne A. Risk of respiratory exposure of dental personnel to amalgam alternatives. *Sci Total Environ* 2000;247(1):33-39.

Nesnow S, Davis C, Nelson GB, Lambert G, Padgett W, Pirmentel M, Tennant AH, Kligerman AD, Ross JA. Comparison of the genotoxic activities of the K-region dihydrodiol of benzo[a]pyrene with benzo[a]pyrene in mammalian cells: morphological cell transformation, DNA damage and stable covalent DNA adducts. *Mutat Res* 2002; 521:91-102.

Nuhn P. Biochemische Grundlagen toxischer Wirkungen von Pharmaka und anderen Xenobiotika. *Pharm Unserer Zeit* 1993; 22(3): 119-133.

Ortengren U, Wellendorf H, Karlsson S, Ruyter IE. Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *J Oral Rehabil* 2001; 28(12):1106-1115.

Park YJ, Chae KH, Rawls HR. Development of a new photoinitiation system for dental light-cure composite resins. *Dent Mater* 1999; 15(2):120-127.

Pechkovsky DV, Zissel G, Ziegenhagen MW, Einhaus M, Taube C, Rabe KF, Magnussen H, Papadopoulos T, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Effect of proinflammatory cytokines on interleukin-8 mRNA expression and protein production by isolated human alveolar epithelial cells type II in primary culture. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(4):618-625.

Peutzfeld A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:97-116.

Pietruski JK, Pietruska MD, Stokowska W, Pattarelli GM. Serum levels of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in patients treated with dental implants. *Rocz Akad Med Bialymst* 2001; 46:28-37.

Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Matthay MA, Sheppard D. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001; 107(12):1537-1544.

Platzer C, Blankenstein T. Polymerase chain reaction to quantitate cytokine mRNA. in: Balkwill FR (Hrsg.) Cytokines - a practical approach, 2nd Edition. The practical Approach Series. London: Oxford University Press; 1995:57-68.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature 1997; 389(6648):300-305.

Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. J Endod 1999; 25(2):114-117.

Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 1995; 74(9):1602-1606.

Raynal S, Nocentini S, Croisy A, Lawrence DA, Jullien P. Transforming growth factor-beta 1 enhances the lethal effects of DNA-damaging agents in a human lung-cancer cell line. Int J Cancer 1997; 72(2):356-361.

Reichl FX. Toxikologie zahnärztlicher Restaurationsmaterialien. Zahnärztl Mitt 2003; 93(7):834-840.

Reichl FX, Durner J, Hickel R, Kunzelmann KH, Jewett A, Wang MY, Spahl W, Kreppel H, Moes GW, Kehe K, Walther U, Forth W, Hume WR. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. J Dent Res 2001a; 80(5):1412-1415.

Reichl FX, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U, Gempel K, Liebl B, Kunzelmann KH, Hume W. Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs. Dent Mater 2002a; 18(8):581-589.

Reichl FX, Durner J, Kehe K, Folwaczny M, Kleinsasser N, Schwarz M, Karim EM, Hickel R. Synergistic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with components of dental restorative materials on gluconeogenesis in rat kidney tubules. Biomaterials 2003; 24:1909-1916.

Reichl FX, Durner J, Kunzelmann KH, Hickel R, Spahl W, Hume WR, Moes GW, Kehe K, Walther U, Forth W. Biological clearance of TEGDMA in guinea pigs. Arch Toxicol 2001b; 75(1):22-27.

Reichl FX, Durner J, Manhart J, Spahl W, Gempel K, Kehe K, Liebl B, Walther UI, Hume WR, Hickel R. Biological clearance of HEMA in guinea pigs. *Biomaterials* 2002b; 23(10):2135-2141.

Reichl FX, Durner J, Mückter H, Elsenhans B, Forth W, Kunzelmann KH, Hickel R, Spahl W, Hume WR, Moes GW. Effect of dental materials on gluconeogenesis in rat kidney tubules. *Arch Toxicol* 1999; 73(7):381-386.

Reid FM, Graham J, Niemuth NA, Singer AW, Janny SJ, Johnson JB. Sulfur mustard-induced skin burns in weanling swine evaluated clinically and histopathologically. *J Appl Toxicol* 2000; 20(Suppl1):153-160.

Rikimaru T, Nakamura M, Yano T, Beck G, Habicht GS, Rennie LL, Widra M, Hirshman CA, Boulay MG, Spannhake EW et al. Mediators, initiating the inflammatory response, released in organ culture by full-thickness human skin explants exposed to the irritant, sulfur mustard. *J Invest Dermatol* 1991; 96(6):888-897.

Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hanze J, Duemmer N, Grandel U, Seeger W, Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S-aureus alpha-toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(2):207-214.

Roulet JF. Benefits and disadvantages of tooth-coloured alternatives to amalgam. *J Dent* 1997; 25(6):459-473.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.

Saini KS, Walker NI. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1998; 178(1-2):9-25.



Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(2):136-151.

Santerre JP, Shajii L, Tsang H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J Dent Res* 1999; 78(8):1459-1468.

Sarkar NK. Internal corrosion in dental composite wear: its significance and simulation. *J Biomed Mater Res* 2000; 53:371-380.

Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 1998; 14(6):429-440.

Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(2 Pt 2):696-706.

Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1997; 1(4):154-162.

Schmalz G, Schuster U, Schweikl H. Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials* 1998; 19(18):1689-1694.

Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Inflammatory mediators released from three-dimensional human oral epithelia cultures 2001; 80(4):1273-1273.

Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci* 2000; 108(5):442-448.

Schröder K. Neue Marker und ihr diagnostischer Einsatz bei pathomolekularen Veränderungen am Chromosom 22. Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2000.

Schultz RM, Shih C, Wood PG, Harrison SD, Ehlhardt WL. Binding of the epoxide cryptophycin analog, LY355703 to albumin and its effect on in vitro antiproliferative activity. *Oncol Rep* 1998; 5(5):1089-1094.

Schuster GS, Caughman GB, Rueggeberg FA. Changes in cell phospholipid metabolism in vitro in the presence of HEMA and its degradation products. *Dent Mater* 2000; 16(4):297-302.

Schuster GS, Caughman GB, Rueggeberg FA, Lefebvre CA, Cibirka R. Alterations in cell lipid metabolism by glycol methacrylate (HEMA). *J Biomater Sci-Polym Ed* 1999; 10(11):1121-1133.

Schweikl H, Schmalz G. Molecular analysis of TEGDMA-induced mutations in mammalian cells. *J Dent Res* 2000; 79:150.

Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 1999; 438(1):71-78.

Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 1998; 415(1-2):119-130.

Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001; 80(7):1615-1620.

Shajii L, Santerre JP. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials* 1999; 20(20):1897-1908.

Slater AFG, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 1995; 82(3):149-153.

Smith HS. In vitro properties of epithelial cell lines established from human carcinomas and nonmalignant tissue. *J Natl Cancer Inst* 1979; 62:225-230.

Sorrentino D, Robinson RB, Kiang CL, Berk PD. At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration: uptake kinetics are consistent with the conventional Theory. *J Clin Invest* 1989; 84:1325-1333.

Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 1996; 21(2):280-285.

Stahl W. Drugs and remedies in old China. *Zahnärztl Prax* 1966; 17(23):288.

Stanislowski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res* 2003; 66A(3):476-482.

Stanislowski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M. Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(3):469-474.

Stanley HR. Effects of dental restorative materials: local and systemic responses reviewed. *J Am Dent Assoc* 1993; 124(10):76-80.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000; 29 (2): 332.

Terakado M, Yamazaki M, Tsujimoto Y, Kawashima T, Nagashima K, Ogawa J, Fujita Y, Sugiya H, Sakai T, Furuyama S. Lipid-peroxidation as a possible cause of benzoyl peroxide toxicity in rabbit dental-pulp - a microsomal lipid-peroxidation in vitro. *J Dent Res* 1984; 63(6):901-905.

Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Bricchet A, Wallaert B, Tonnel AB, Gosset P. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(2):487-494.

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 1997; 25(1):82-88.

Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K et al. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71(6):618-624.

Vallittu PK, Vallittu ASJ, Lassila VP. Dental aesthetics - a survey of attitudes in different groups of patients. *J Dent Res* 1996; 24(5):335-338.

Vankerckhoven H, Lambrechts P, van Beylen M, Davidson CL, Vanherle G. Unreacted methacrylate groups on the surfaces of composite resins. *J Dent Res* 1982; 61(6):791-795

Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 2000; 243:243-255.

Vilcek J. The Cytokines: An Overview. in: Thomson A (Hrsg.), *The Cytokine Handbook*, 3rd Edition. London: Academic Press; 1998:1-20.

Vodovotz Y, Chesler L, Chong HY, Kim SJ, Simpson JT, DeGraff W, Cox GW, Roberts AB, Wink DA, Barcellos-Hoff MH. Regulation of transforming growth factor beta 1 by nitric oxide. *Cancer Res* 1999; 59(9):2142-2149.

Wahl SM. Introduction. *Microbes Infect* 1999; 1:1247-1249.

Walsh SV, Hopkins AM, Nusrat A. Modulation of tight junction structure and function by cytokines. *Adv Drug Deliver Rev* 2000; 41 (3): 303-313.

Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 2004; 49(2):125-131.

Walther UI, Walther SC, Liebl B, Reichl FX, Kehe K, Nilius M, Hickel R. Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in L2- and A549 cells. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(5):643-649.

Walther UI, Wilhelm B, Walther SC, Mückter H, Forth W. Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines. *In Vitro Mol Toxicol* 2000; 13(2):145-152.

Wang Z, Malmberg P, Ek A, Larsson K, Palmberg L. Swine dust induces cytokine secretion from human epithelial cells and alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1999; 115(1):6-12.

Wani MA, Zhu Q, El-Mahdy M, Venkatachalam S, Wani AA. Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells. *Cancer Res* 2000; 60:2273-2280.

Wataha J, Schmalz G, Lockwood PE, Bouillaguet S, Hoddaido MN. Konzepte zur Biokompatibilität. *Zahnärztl Mitt* 2001; 16:34.

White AC, Das SK, Fanburg BL. Reduction of glutathione is associated with growth restriction and enlargement of bovine pulmonary artery endothelial cells produced by transforming growth factor-beta 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(4):364-368.

Wistuba D. Enantioselektive Metabolisierung kleiner aliphatischer Olefine und Oxirane durch Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen, Epoxid-Hydrolasen und Glutathion S-Transferasen. Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 1986.

Wuyts A, Proost P, Van Damme J. Interleukin-8 and other CXC Chemokines. in: Thomson A (Hrsg.) *The Cytokine Handbook*, 3rd Edition. London: Academic Press; 1998: 271-311.

Xiao YQ, Malcolm K, Worthen GS, Gardai S, Schiemann WP, Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2002; 277(17):14884-14893.

Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M, Yokoi TI. Formation of a novel quinone epoxide metabolite of Troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(2):155-160.

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

Yourtee DM, Smith RE, Russo KA, Burmaster S, Cannon JM, Eick JD, Kostoryz EL. The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetic and systematic evaluations. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(4):522-531.

Zhang A, Aguilera A, Luu C, Huang D, Davis D, Etienne C, Song R, Thomas R, Simonyi K, Wong J, Nguyen Q. Simultaneous detection of 8 cytokines in mouse or human sera using the Bio-Plex protein array system. Poster presentation at American Society for Cell Biology 9-13.12.2000.

Zhu X, Yu QS, Cutler RG, Culmsee CW, Holloway HW, Lahiri DK, Mattson MP, Greig NH. Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzoxazole derivatives. *J Med Chem* 2002; 45(23):5090-5097.

Zimmermann C, Willis E. Suspension protein arrays for multiplex fluorescence analysis. *New Drugs* 2001; (3):28-32.

Zimniak P, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Awasthi YC. Mechanisms for xenobiotic transport in biological membranes. *Toxicol Lett* 1999; 106:107-118.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. vet. H. Ammer danke ich für das entgegengebrachte Interesse sowie die Bereitschaft, die Arbeit an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Dr. F.X. Reichl danke ich für die Überlassung des Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. P. Eyer möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie die freundliche Unterstützung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med L. Szinicz für die Möglichkeit, große Teile der vorliegenden Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. K. Kehe für die stets gewährte Unterstützung und wissenschaftliche Anleitung sowie die Durchsicht des Manuskripts und die ermutigenden Worte, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt sämtlichen Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts sowie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, die durch ihre freundliche und hilfsbereite Art zum Gelingen des Projektes beigetragen haben. Dies gilt insbesondere für Frau Domes, Herrn Schultz, Herrn Dr. Seiss, Frau Zarrabi und Herrn Prasad.

# Lebenslauf

**Name:** Judith Emmmler  
**Heimatanschrift:** Spitzwegstr. 2  
82402 Seeshaupt  
**Geburtsdatum:** 26. April 1973  
**Geburtsort:** Benediktbeuern  
**Nationalität:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

**1979 - 1983** Grundschule Seeshaupt  
**1983 - 1987** Gymnasium Penzberg  
**1987 - 1993** Gymnasium Weilheim, Abitur  
**1993 - 1995** Ausbildung zur Fachgehilfin in steuer- und wirtschaftsberatenden Berufen  
**1995 - 2001** Studium der Tiermedizin an der LMU München, Approbation zur Tierärztin  
**Seit Juni 2001** Doktorandin am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München  
**Seit Mai 2003** Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr in München

## Auslandsaufenthalte:

**1990 / 1991** Einjähriger Aufenthalt als Austauschschülerin an der Kerman High School, Kalifornien  
**1998 / 1999** Achtmonatiges Auslandssemester und –praktikum an der ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE