

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Heidrun Potschka

angefertigt im Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl)

Einfluss von Antioxidantien auf das DNA-Doppelstrangbruch-
induzierende Potential von dentalen Kompositbestandteilen und
quantitativer Formaldehyd-Nachweis in dentalen Kompositen

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

von
Susanne Lottner
aus
Saarbrücken

München 2012

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Potschka
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Gabius

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Dentale Kompositmaterialien	3
2.1.1	Aufbau	3
2.1.1.1	Matrix (organische Phase)	3
2.1.1.2	Anorganische Phase	6
2.1.1.3	Verbundphase	7
2.1.2	Polymerisation	8
2.1.3	Freisetzung von Inhaltsstoffen aus Kompositen	9
2.1.4	Toxikologie dentaler Komposite	9
2.1.4.1	Toxikokinetik	9
2.1.4.2	Biokompatibilität dentaler Komposite	11
2.2	Antioxidantien	13
2.3	Formaldehyd (FA)	16
2.3.1	Toxikokinetik von FA	17
2.3.2	Toxizität von FA	17
2.4	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	19
2.4.1	DNA-Aufbau	19
2.4.2	DNA-Schädigung	19
2.4.2.1	DNA-Schäden durch Inhaltsstoffe dentaler Kompositmaterialien	20
2.4.2.2	DNA-Schäden durch FA	21
2.4.3	Reparatur von DNA-Schäden	21
2.4.4	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	22
2.4.4.1	Homologe Rekombination (HR)	22
2.4.4.2	Nicht-homologe Endverknüpfung (Non-Homologous-End-Joining = NHEJ)	23
2.5	γ-H2AX-Test	23
2.5.1	H2AX und seine phosphorylierte Form	23
2.5.2	Darstellung und Quantifizierung von DNA-DSB	24
2.6	GC-MS-Analyse	24
2.6.1	Gaschromatographie	25
2.6.2	Massenspektrometer	26
2.6.3	Auswertung der Massenspektren	27
3	Zielsetzung	28
3.1	γ-H2AX-Test	28

3.2	FA-Nachweis mittels GC-MS	29
4	Materialien.....	30
4.1	Verwendete Substanzen.....	30
4.2	Verbrauchsmaterialien	31
4.3	Zellkulturlinie	32
4.4	Medium und Waschlösung	32
4.5	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	32
4.6	Dentale Komposite	33
4.7	Geräte	33
4.8	Verwendete Software.....	34
5	Methoden.....	35
5.1	γ -H2AX-Test.....	35
5.1.1	Zellkultur	35
5.1.1.1	Auftauen der Zellen.....	35
5.1.1.2	Bestimmung der Zellzahl.....	35
5.1.1.3	Kultivieren der HGF	36
5.1.1.4	Passagieren der Zellen.....	37
5.1.2	γ -H2AX-Test.....	38
5.1.2.1	Vorbereitung der 24-Well-Platten	38
5.1.2.2	Aussäen der Zellen auf die 24-Well-Platten	38
5.1.2.3	Herstellung der Lösungen der Testsubstanzen.....	38
5.1.2.4	Auftragen der Testsubstanzen auf die 24-Well-Platten.....	39
5.1.2.5	Fixieren der Zellen und Immunfluoreszenzfärbung.....	39
5.1.2.6	Mikroskopische Auswertung.....	41
5.1.2.7	Statistische Auswertung	41
5.2	Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS	42
5.2.1	GC-MS-Bedingungen	42
5.2.2	FA-Konzentration in den Verdünnungsreihen	42
5.2.3	Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH	43
5.2.4	Einfluss der Reaktionszeit und der DNPH-Applikationsform.....	44
5.2.4.1	Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung des FA-DNPH-Komplexes	45
5.2.4.2	Einfluss der Applikationsform von DNPH.....	45
5.2.4.3	Einfluss des Lösungsmittels von DNPH	46
5.2.5	Einfluss der FA-Applikationsform auf die Derivatisierungsreaktion.....	46
5.2.5.1	Verwendung von festem Paraformaldehyd	47
5.2.5.2	Verwendung von flüssigem Formaldehyd (Formalin)	49
5.2.5.3	Verwendung eines festen FA-DNPH-Komplexes	49

5.2.6	Auswahl eines internen Standards.....	49
5.2.6.1	13C-FA als interner Standard.....	50
5.2.6.2	d-FA als interner Standard	52
5.2.7	Analytik von Zahnkompositen mittels GC-MS	53
6	Ergebnisse.....	55
6.1	γ-H2AX-Test.....	55
6.1.1	γ -H2AX-Test mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere	55
6.1.1.1	H ₂ O ₂ (= Positivkontrolle).....	55
6.1.1.2	Negativkontrolle	56
6.1.1.3	Asc	57
6.1.1.4	ACC.....	59
6.1.1.5	Trolox.....	61
6.1.1.6	Retinylacetat.....	62
6.1.1.7	Katalase.....	64
6.1.1.8	Vergleich der Antioxidantien in Bezug auf ihr Foci-induzierendes-Potential	65
6.1.1.9	Festlegung der Antioxidantien-Konzentrationen für die Kombination mit (Ko)Monomeren	65
6.1.2	γ -H2AX-Test mit den (Ko)Monomeren allein und in Kombination mit Asc und ACC66	
6.1.2.1	H ₂ O ₂ (= Positivkontrolle).....	66
6.1.2.2	Medium (= Negativkontrolle).....	66
6.1.2.3	Asc	66
6.1.2.4	ACC.....	67
6.1.2.5	BisGMA	67
6.1.2.6	BisGMA in Kombination mit Asc	67
6.1.2.7	BisGMA in Kombination mit ACC.....	68
6.1.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse von BisGMA	70
6.1.2.9	UDMA	71
6.1.2.10	UDMA und Asc.....	72
6.1.2.11	UDMA in Kombination mit ACC	73
6.1.2.12	Zusammenfassung der Ergebnisse von UDMA	74
6.1.2.13	EGDMA.....	76
6.1.2.14	EGDMA in Kombination mit Asc.....	77
6.1.2.15	EGDMA und ACC.....	78
6.1.2.16	Zusammenfassung der Ergebnisse von EGDMA.....	78
6.1.2.17	GDMA.....	80
6.1.2.18	GDMA in Kombination mit Asc.....	80
6.1.2.19	GDMA in Kombination mit ACC.....	81
6.1.2.20	Zusammenfassung der Ergebnisse von GDMA.....	82
6.2	Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS	84

6.2.1	Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH	84
6.2.2	Einfluss der Reaktionszeit und der DNPH-Applikationsform.....	85
6.2.2.1	Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung des FA-DNPH-Komplexes	85
6.2.2.2	Einfluss der Applikationsform von DNPH.....	85
6.2.3	Einfluss der FA-Applikationsform auf die Derivatisierungsreaktion.....	86
6.2.3.1	Verwendung von festem Paraformaldehyd	86
6.2.3.2	Verwendung von flüssigem Formaldehyd (Formalin)	88
6.2.3.3	Verwendung eines festen FA-DNPH-Komplexes	91
6.2.4	Auswahl eines internen Standards.....	92
6.2.4.1	¹³ C-FA als interner Standard.....	92
6.2.4.2	d-FA als interner Standard	96
6.2.5	Analytik von Inhaltsstoffen (FA) aus Zahnkompositen mittels GC-MS.....	103
6.2.5.1	FA-Nachweis in unpolymerisierten Kompositen.....	103
6.2.5.2	FA-Nachweis im Eluat polymerisierter Komposite	104
7	Diskussion.....	109
7.1	γ-H2AX-Test.....	109
7.1.1	Auswahl der (Ko)Monomere und ihrer eingesetzten Konzentrationen	110
7.1.2	Auswahl der Antioxidantien.....	110
7.1.3	γ-H2AX-Test mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere	111
7.1.4	γ-H2AX-Test mit (Ko)Monomeren und Antioxidantien.....	114
7.1.5	Ausblick.....	117
7.2	Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS	119
7.2.1	Analysemethode für FA mittels GC-MS.....	120
7.2.1.1	Derivatisierung von FA mit DNPH.....	120
7.2.1.2	Lösungsverhalten von Paraformaldehyd	122
7.2.1.3	FA-Lösung (Formalin)	125
7.2.1.4	¹³ C-FA als interner Standard.....	125
7.2.1.5	d-FA als interner Standard	127
7.2.1.6	FA-DNPH-Komplex.....	128
7.2.1.7	Optimierung der Derivatisierungsreaktion.....	128
7.2.1.8	15,6 mM DNPH in d-EtOH und in Acetonitril	129
7.2.1.9	1,56 mM DNPH in Acetonitril und Erstellen einer Kalibrierkurve.....	129
7.2.2	FA-Nachweis in Zahnkompositen mittels GC-MS.....	130
7.2.3	Ausblick/Risikoabschätzung.....	131
8	Zusammenfassung.....	135
9	Summary.....	138
10	Literaturverzeichnis	140

11	Anhang.....	154
11.1	Messergebnisse des γ -H2AX-Tests mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere ...	154
11.2	Messergebnisse des γ -H2AX-Testes mit (Ko)Monomeren und Antioxidantien	160
11.3	GC-MS Messungen von FA-Verdünnungsreihen	174
12	Danksagung.....	178

Abkürzungsverzeichnis

13C-FA	13C-markierter Formaldehyd
ACC	N-Acetylcystein
Asc	Ascorbinsäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATR-Kinase	ATM and Rad3-related-Kinase
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BisGMA	Bisphenol-A-glycidylmethacrylat
BPO	Dibenzoylperoxid
CF	Coffein
CQ	Kampferchinon
d-EtOH	Deuteriertes Ethanol
d-FA	Deuteriertes Formaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
EGDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
EI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FA-DNPH	Formaldehyd-2,4-Dinitrophenylhydrazon
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer

GDMA	1,3-Glyceroldimethacrylat
Gew%	Gewichtsprozent
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HGF	Humane Gingivafibroblasten
HR	Homologe Rekombination
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MeOH	Methanol
MMR	Mismatch-Reparatur
MS	Massenspektrometrie
NER	Nucleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Non-Homologous-End-Joining (nicht homologe Endverknüpfung)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NTP	National Toxicology Programm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
RA	Retinsäure
RoC	Report on carcinogens
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Retentionszeit
SOD	Superoxiddismutase
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEGDMA	Triethylenglykoldimethacrylat
UDMA	Urethandimethacrylat
Vit A	Vitamin A
Vit E	Vitamin E

1 Einleitung

Kompositkunststoffe zählen in der Zahnmedizin zu den am häufigsten eingesetzten Füllungsmaterialien. Für diese große Verbreitung der Komposite spielen zum einen funktionelle Aspekte, beispielsweise die hohe mechanische Stabilität der Komposite, eine wichtige Rolle, zum anderen ästhetische Aspekte aufgrund ihres zahnfarbenen Aussehens. Dieser ästhetische Aspekt hat schon seit einigen Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen [1]. Begünstigend für den Einsatz von Kompositen wirkte sich auch der zunehmende Rückgang eingesetzter Amalgam-Füllungen aus. Amalgam-Füllungen sind wegen des Quecksilber-Gehaltes und der Toxizität des Quecksilbers als Füllungsmaterial umstritten. Viele Patienten lehnen mittlerweile Amalgam als Werkstoff für Zahnfüllungen ab [2, 3]. Der wirtschaftliche Aspekt ist ebenfalls nicht zu verachten, da Komposite als Alternative zu Amalgamfüllungen kostengünstiger sind als beispielsweise Gold- oder Keramikfüllungen.

In der Tiermedizin finden ebenfalls Kompositkunststoffe als Zahnfüllungsmaterialien Verwendung. Es können dabei dieselben Materialien wie in der humanen Zahnmedizin verwendet werden [4]. Insbesondere in der Kleintiermedizin und Pferdemedizin bieten viele Tierarztpraxen zahnmedizinische Tätigkeiten mit Verwendung von Kompositen an. Da der Tierbesitzer die Tierarzkosten vollständig zu tragen hat, sind Komposite als kostengünstige Alternative zu Gold- oder Keramikfüllungen gefragt, wenn Amalgam aufgrund gesundheitlicher Bedenken vom Besitzer abgelehnt wird. Zudem ist die Verarbeitung dentaler Komposite leicht und schnell durchführbar, was die Anwendung durch viele Tierärzte ohne tiefgründige zahntechnische Ausbildung erleichtert. Ein weiterer wesentlicher Vorteil dentaler Komposite ist, dass die Kompositfüllung wie alle plastischen Füllmaterialien (z. B. Amalgam) in einer Sitzung eingesetzt werden kann. Für die Anfertigung von Inlay-Füllungen wie Keramik- oder Goldinlays sind mindestens zwei Sitzungen nötig, in denen zuerst ein Abdruck erstellt wird, anhand dessen das einzusetzende Inlay geformt wird, in der zweiten Sitzung wird das Inlay eingesetzt. Dieser Mehraufwand für Inlay-Füllungen ist entscheidend in der Tiermedizin, da insbesondere im Kleintierbereich die meisten zahnärztlichen Eingriffe unter Narkose erfolgen müssen. Für Inlay-Füllungen wären folglich zwei Narkosen notwendig, bei Kompositfüllungen dagegen nur eine, wodurch bei Verwendung dentaler Komposite das zusätzliche Risiko durch eine weitere Narkose wegfällt.

Aufgrund der großen Verbreitung dentaler Komposite werden diese nicht nur in Hinblick auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften wie Stabilität und Abrasionsverhalten untersucht, sondern zunehmend auch auf ihre Verträglichkeit, die sog. Biokompatibilität. So

wurde beobachtet, dass Monomere, Komonomere und weitere Zusatzstoffe dentaler Komposite allergische Reaktionen verursachen können, unter anderem Kontaktdermatitis, Zahnfleischulzationen und Asthma [5, 6] [7-9]. Darüberhinaus konnten in *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass einige Monomere östrogene Wirkungen haben [10], wobei die klinische Relevanz dieser Wirkung umstritten ist [11]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Monomere zytotoxische [12, 13] und mutagene Reaktionen verursachen können [14-16].

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die Genotoxizität dentaler (Ko)Monomere durch Antioxidantien reduziert werden kann. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Monomere und Komonomere, die aus Kompositfüllungen freigesetzt werden, im γ -H2AX-Test DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) in humanen Gingiva-Fibroblasten (HGF) induzieren [17]. Der Einfluss von Antioxidantien auf die Zytotoxizität von (Ko)Monomeren wurde ebenfalls in Zellkulturversuchen untersucht [18]. Es sollte der Einfluss von Antioxidantien auf die Bildung von DNA-DSB in HGF nach der Exposition dentaler (Ko)Monomere mittels des γ -H2AX-Tests untersucht werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob Formaldehyd (FA) aus unpolymerisierten und polymerisierten dentalen Kompositen freigesetzt wird. Der qualitative und quantitative Nachweis von FA erfolgte dabei mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Da FA unter anderem ein kanzerogenes Potential besitzt [19] und Allergien [20] auslösen kann, trägt die Untersuchung dentaler Komposite auf FA wesentlich zur Abklärung der Biokompatibilität dentaler Komposite bei.

2 Literaturübersicht

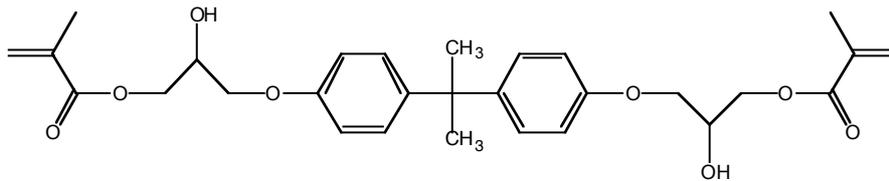
2.1 Dentale Kompositmaterialien

2.1.1 Aufbau

Dentale Komposite sind zahnfarbene plastische Füllungsmaterialien, die aus mindestens zwei verschiedenen Komponenten bestehen: die organische Komponente, auch Matrix genannt, sowie die anorganische Komponente, der sog. Füllkörper. Eine Verbundphase (aus Silanen, s.2.1.1.3) koppelt die organische Matrix und die anorganischen Füllkörper aneinander.

2.1.1.1 Matrix (organische Phase)

Die organische Phase dentaler Komposite besteht hauptsächlich aus Monomeren und Komonomere. Im dentalen Bereich werden häufig Methacrylsäure und ihre Derivate als Monomere und Komonomere verwendet. Sie sind aufgrund ihrer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung (C-C-Doppelbindung) zur Polymerisation fähig. Meist handelt es sich um Di- oder Trimethacrylate. Häufige eingesetzte Monomere sind die Dimethacrylate Bisphenol-A-glycidylmethacrylat (BisGMA, s. Abbildung 1) und Urethandimethacrylat (UDMA, s. Abbildung 2). Monomere zeichnen sich durch ein hohes Molekulargewicht und eine hohe Viskosität aus.



Systematischer Name: 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,1'-((1-methylethylidene)bis(4,1-phenyleneoxy (2-hydroxy-3,1-propanediyl))) ester

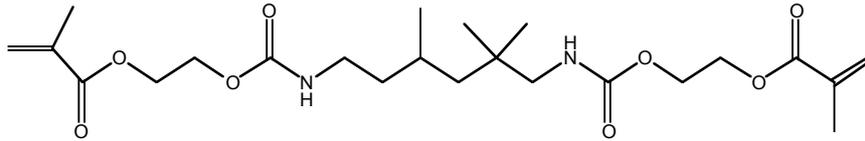
Andere Namen: Bisphenol-A-glycidyl methacrylat, BisGMA

Summenformel: $C_{29}H_{36}O_8$

Molekulargewicht: 512 g/mol

CAS-Nummer: 1565-94-2

Abbildung 1: Strukturformel von Bisphenol-A-glycidylmethacrylat (BisGMA)



Systematischer Name: 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 7,7,9(or 7,9,9)-trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diazahexadecane-1,16-diyl ester

Andere Namen: Urethan-dimethacrylat, UDMA

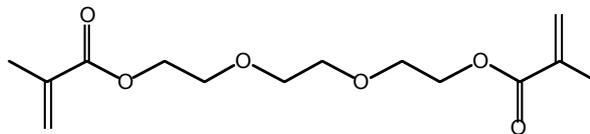
Summenformel: $C_{23}H_{38}N_2O_8$

Molekulargewicht: 471 g/mol

CAS-Nummer: 72869-86-4

Abbildung 2: Strukturformel von Urethandimethacrylat (UDMA)

Um das Arbeiten mit den viskosen Monomeren zu erleichtern, werden Komonomere als Verdünnungsmonomere hinzugegeben. Diese sind kurzkettiger als die Monomere (meist Monomethacrylate und kurzkettige Dimethacrylate) und dadurch weniger viskos, führen aber auch zu einer höheren Polymerisationsschrumpfung. Komonomere polymerisieren mit den Monomeren und werden so in die Kunststofffüllung eingebaut. Die beiden häufigsten verwendeten Komonomere sind Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA, s. Abbildung 3) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA, s. Abbildung 4) [21]. Weitere Komonomere, die als Alternativen verwendet werden, sind 1,3-Glyceroldimethacrylat (GDMA, Abbildung 5) und Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA, Abbildung 6).



Systematischer Name: 2-(2-(2-methylprop-2-enoyloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2methylprop-2-enoate

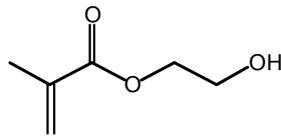
Andere Namen: Triethylenglykoldimethacrylat, TEGDMA

Summenformel: $C_{14}H_{22}O_6$

Molekulargewicht: 286 g/mol

CAS-Nummer: 109-16-0

Abbildung 3: Strukturformel von Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA)



Systematischer Name: 2-Hydroxyethyl-2-methylprop-2-enoat

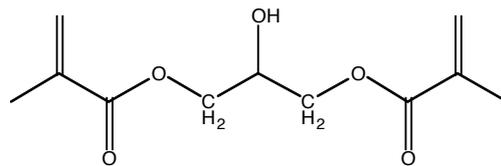
Andere Namen: 2-Hydroxyethylmethacrylat, HEMA

Summenformel: $C_6H_{10}O_3$

Molekulargewicht: 130 g/mol

CAS-Nummer: 868-77-9

Abbildung 4: Strukturformel von 2-Hydroxyethylmethacrylat



Systematischer Name: 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 2-hydroxy-1,3-propanediyl ester

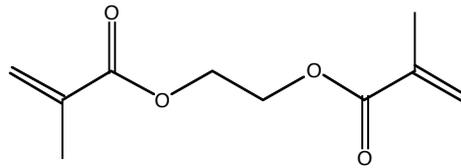
Andere Namen: 1,3-Glycerol-dimethacrylat, GDMA

Summenformel: $C_{11}H_{16}O_5$

Molekulargewicht: 228 g/mol

CAS-Nummer: 1830-78-0

Abbildung 5: Strukturformel von 1,3-Glyceroldimethacrylat (GDMA)



Systematischer Name: 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,1'-(1,2-ethanediyl) ester

andere Namen: Ethylenglykol-dimethacrylat, EGDMA

Summenformel: $C_{10}H_{14}O_4$

Molekulargewicht: 198 g/mol

CAS-Nummer: 97-90-5

Abbildung 6: Strukturformel von Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA)

Neben den Monomeren und Komonomeren sind noch weitere Bestandteile in der Matrix enthalten:

Initiatoren starten die radikalische Polymerisationsreaktion nach chemischer oder physikalischer Aktivierung. Typische Initiatoren sind Dibenzoylperoxid (BPO) und Campherquinon (CQ).

Akzeleratoren, meist tertiäre Amine wie Dihydroxyethyl-*p*-Toluidin, unterstützen die Polymerisationsreaktion.

Inhibitoren, z.B. Methoxyhydrochinon, dagegen verhindern durch Inaktivierung radikaler Substanzen, dass eine vorzeitige Polymerisierung z.B. durch Tageslicht starten kann und tragen so zur Lagerungsfähigkeit der Komposite bei [22].

Weitere Additive sind Farbstabilisatoren, die durch Absorption der UV-Wellen eine Verfärbung der Kompositfüllung verhindern, Pigmente, die die Herstellung verschiedener Farbnuancen der Komposite ermöglichen und Weichmacher [23].

2.1.1.2 Anorganische Phase

Die anorganische Phase, auch als disperse Phase bezeichnet, besteht aus anorganischen Füllstoffen, welche die mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Kunststoffmatrix verbessern. Heutzutage beträgt ihr Anteil in den Kompositen über 60 Gew%. Es handelt sich dabei vor allem um Quarzpulver (SiO_2), Silikate, Keramik- und Glaskeramikpartikel. Diese Füllkörper vermindern die Polymerisationsschrumpfung und die Wasseraufnahme und erhöhen die Abrieb-, Druck- und Zugfestigkeit der Komposite [24].

Nach Art und Größe der Füllstoffpartikel lassen sich die Komposite in verschiedene Gruppen klassifizieren [3, 22]:

- Makrofüllerkomposite

- Mikrofüllerkomposite, die sich nochmals in homogene und inhomogene Mikrofüllerkomposite unterscheiden lassen
- Hybridkomposite

Makrofüllerkomposite enthalten Füllkörper in einem Größenbereich von 0,1 bis 100 μm . Die durchschnittliche Füllkörpergröße liegt zwischen 5 und 10 μm , der Gehalt liegt bei ca. 75 Gew%. Sie bestehen aus Quarz, Glas oder Keramik [22]. Makrofüller verleihen dem Komposit Härte, sind aber nicht polierbar. Die raue Oberfläche führt zu Plaque-Ablagerungen und der Härteunterschied zwischen Matrix und Füllkörper durch Kaubelastung zu stärkerer Abrasion [25, 26], weshalb reine Makrofüllerkomposite nur noch selten verwendet werden.

Mikrofüllerkomposite enthalten Füllkörper mit einer Partikelgröße kleiner 0,1 μm und bestehen aus hochdispersen Kieselsäuren (Siliziumdioxid). Inhomogene Mikrofüllerkomposite enthalten Vorpolymerisate, so dass ein besserer Füllgehalt erreicht wird [22]. Vorteile der Mikrofüllerkomposite sind eine bessere Polierbarkeit und eine höhere Verschleißfestigkeit. Nachteile sind die höhere Wasseraufnahme und die Polymerisationsschrumpfung.

Hybridkomposite enthalten sowohl Makrofüller als auch Mikrofüller, um die positiven Eigenschaften beider Komposite zu verbinden und so die mechanischen und physikalischen Eigenschaften zu optimieren. Die Füllstoffe der Hybridkomposite setzen sich dabei zu 85 bis 90 Gew% aus Makrofüllern und zu 10 bis 15 Gew% aus Mikrofüllern zusammen.

2.1.1.3 Verbundphase

Da eine direkte Verbindung zwischen der organischen und der anorganischen Phase nicht möglich ist, wird ein sog. „Kopplungsagens“ benötigt. Dieses Kopplungsagens muss hydrophile und hydrophobe Eigenschaften haben, um als Haftvermittler wirken zu können. Meist werden dafür bipolare Silane (organische Siliziumverbindung) verwendet, wie beispielsweise 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan [27-29]. Die anorganischen Füllkörper werden mit Silan beschichtet, man spricht auch von Silanisieren. Dies führt zur Hydrophobierung der Füllkörper, so dass diese während der Polymerisation der organischen Kunststoffmatrix ebenfalls mit den (Ko)Monomeren polymerisieren können und so in die Matrix eingebettet werden. Durch diesen Verbund werden die mechanischen und physikalischen Eigenschaften des Komposites verbessert, da die Belastungen von der weicheren Matrix auf die härteren Füllkörper übertragen werden können [30, 31].

2.1.2 Polymerisation

Die Polymerisation ist eine chemische Reaktion, bei der die Monomere unter Auflösung ihrer Mehrfachbindungen, in den meisten Fällen ihrer C-C-Doppelbindungen, zu Polymeren reagieren. Bei der Polymerisation der meisten dentalen Komposite handelt es sich um eine radikalische Polymerisation, die chemisch oder photochemisch durch einen Initiator gestartet wird. Der Initiator (chemisch oder photochemisch aktiviert) bildet Radikale, die die C-C-Doppelbindungen der (Ko)Monomere aufbrechen. So entstehen Primärradikale, an die sich ständig Monomere, ebenfalls unter Aufbrechen ihrer C-C-Doppelbindungen, anlagern können. Die Radikalketten wachsen so lange bis zwei Radikale miteinander reagieren. Es kommt zum Kettenabbruch.

Bei der chemischen Härtung wird als Initiator meist Dibenzoylperoxid verwendet. Dieser wird durch Anmischen mit einem tertiären Amin aktiviert, indem dieser mit dem Amin als Redoxpartner einen energiereichen Komplex bildet, der in ein Radikal und eine inaktive Komponente zerfällt. Das Radikal startet die Polymerisationsreaktion. Bei den chemisch-härtenden Kompositen müssen zum Starten der Polymerisation zwei Pasten miteinander vermischt werden [22].

Bei der photochemischen Härtung bildet ein Initiator durch Beleuchtung mit Licht im blauen Bereich bzw. mit UV-A-Strahlung Radikale, wodurch die Polymerisationsreaktion gestartet wird. Für die Beleuchtung werden spezielle Polymerisationslampen verwendet, die meistens Licht der Wellenlänge zwischen 400 und 500 nm emittieren. Häufig verwendete Photoinitiatoren sind Benzoinalkylether und CQ, dessen Absorptionsmaximum bei 468 nm liegt [22]. Vorteile der lichthärtenden Komposite gegenüber den chemisch-härtenden Kompositen sind ein höherer Polymerisationsgrad, wodurch sie stabiler gegenüber Abrasion oder Verfärbung sind. Außerdem können sie verarbeitet und modelliert werden, bevor die Härtung durch Lichteinwirkung gestartet wird.

Inhibitoren verhindern die vorzeitige Polymerisation bei Tageslicht und verzögernd die Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerisation während des Verarbeitens des Werkstoffes. UV-Stabilisatoren sollen die Zersetzung und die Farbveränderung der Komposite verhindern. Dafür werden Verbindungen eingesetzt, die aufgrund mehrerer konjugierter C-C-Doppelbindungen und aromatischer Ringe UV-Strahlungen absorbieren [31, 32].

Während der Polymerisation findet eine Polymerisationsschrumpfung statt, da durch die Ausbildung eines 3D-Netzwerkes der Polymere die Moleküle aufgrund der Ausbildung von C-C-Einfachbindungen zusammenrücken und so weniger Raum beanspruchen [33, 34]. Die Schrumpfrate verkleinert sich bei Kompositen mit einem hohen Füllkörperanteil. Je nach

verwendetem Material treten Volumenreduktionen von 4 bis 9 % bei reinen Monomeren auf und von 1 bis 5 % bei Kompositen [35]. Durch die Schrumpfung entstehen Spannungen im Material, so dass es zur Bildung von Randspalten kommen kann, die wiederum Randverfärbungen, eine Hypersensibilität des Zahnes und Sekundärkaries durch Eindringen von Bakterien in den Spalt bewirken können [36-38]. Neben der Polymerisationsschrumpfung ist auch der Polymerisationsgrad, also die Anzahl an nicht umgesetzten C-C-Doppelbindungen in einem Polymer, für die Stabilität des Komposits, aber auch für seine Verträglichkeit von Bedeutung, da die nicht umgesetzten (Ko)Monomere aus der Füllung diffundieren können [39, 40].

2.1.3 Freisetzung von Inhaltsstoffen aus Kompositen

Die Polymerisation läuft nicht vollständig ab, so dass nicht umgesetzte (Ko)Monomere und weitere Inhaltsstoffe in dem gehärteten Komposit verbleiben. Die Monomer-Polymer-Konversion liegt zwischen 35 % und 77 % [41], weshalb von einem hohen Gehalt freier (Ko)Monomere im Komposit auszugehen ist [42]. Dies kann anhand der vorhandenen C-C-Doppelbindungen mittels Infrarotspektroskopie untersucht werden. Diese nicht umgesetzten (Ko)Monomere können aus den Füllungen durch Speichelzutritt oder durch Nahrung und Getränke eluiert werden und in die Mundhöhle gelangen oder über den Dentinliquor bis zur Pulpa diffundieren [43, 44]. Freie (Ko)Monomere und Inhaltsstoffe können direkt nach der Fertigstellung des Komposites eluiert werden, aber auch durch Abrasion und Verschleiß freigesetzt werden [45-47]. Die Freisetzung der (Ko)Monomere und weiterer Inhaltsstoffe durch Elution, Abrasion und Verschleiß trägt wesentlich zur Biokompatibilität der Komposite bei.

2.1.4 Toxikologie dentaler Komposite

2.1.4.1 Toxikokinetik

2.1.4.1.1 Resorption und Verteilung

Freie (Ko)Monomere können aus der Füllung in die Mundhöhle diffundieren. In der Mundhöhle können diese (Ko)Monomere in direkten Kontakt mit den Zellen der Mundschleimhaut z.B. Gingivafibroblasten treten oder abgeschluckt werden und im Darm fast vollständig resorbiert werden [48-52]. Über die Blutbahn werden sie dann im Organismus verteilt. Daneben können nicht umgesetzte (Ko)Monomere aus der Füllung oder Klebern (Adhäsiven) durch das Dentin bis zur Pulpahöhle diffundieren [53, 54]. In der Pulpahöhle

können (Ko)Monomere außerdem über Kapillaren in den systemischen Blutkreislauf gelangen [54].

Weiterhin können Kompositbestandteile durch Inhalation über die Lunge in den Blutkreislauf gelangen [54]. Für das zahnärztliche/tierärztliche Personal ist zusätzlich der Hautkontakt mit (Ko)Monomeren, v.a. durch die unpolymersierte Kompositpaste beim Verarbeiten von Bedeutung. Handschuhe schützen dabei nur gering vor dem Kontakt, da (Ko)Monomere in der Lage sind, relativ leicht die Handschuhe zu penetrieren [55, 56]. Ebenso verhält es sich beim Mundschutz [56].

2.1.4.1.2 *Metabolismus, Exkretion*

(Ko)Monomere, die durch Inhalation und/oder Resorption aus dem Darm oder über die Kapillaren der Pulpahöhle in den Blutkreislauf gelangen, können im Organismus weiter verstoffwechselt werden [51, 57]. *In vivo*-Versuche mit ^{14}C -markiertem HEMA, welches Mäusen oral bzw. subkutan appliziert wurde, ergab eine ^{14}C -Ausscheidung je nach Applikationsart mit dem Urin von 6,9 % bzw. 14 % und mit der Fäces von 22,6 % bzw. 12,4 % (ersterer Wert entspricht dem Wert nach oraler Applikation). Daneben konnte gezeigt werden, dass ^{14}C -HEMA zu $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut wird und zu 62,3 % nach oraler bzw. zu 66,7 % nach subkutaner Applikation per Exhalation ausgeschieden wird [31, 58]. Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem TEGDMA und BisGMA zeigten ähnliche Ergebnisse [50, 51, 59].

Es werden zwei unterschiedliche Stoffwechselwege postuliert, bei denen CO_2 als Endprodukt entsteht: ein Valin-ähnlicher Abbauweg und ein Abbauweg mit Epoxiden als Zwischenstufen. Beide Wege führen zunächst über eine Esterspaltung des (Ko)Monomers durch unspezifische Esterasen zur Bildung der Methacrylsäure [60, 61]. Die Methacrylsäure wird im ersten Abbauweg wie die proteinogene Aminosäure Valin über Malat und den Zitronensäurezyklus bis zu CO_2 verstoffwechselt. Beim zweiten Stoffwechselweg wird aufgrund einer oxidativen Spaltung der C-C-Doppelbindung der Methacrylsäure durch Oxygenasen ein intermediäres Epoxid gebildet, das weiter zu Pyruvat und FA abgebaut wird. Das Pyruvat kann dann unter CO_2 -Abspaltung in den Zitronensäurezyklus eintreten. Die Entstehung von Epoxiden wie 2,3-Epoxymethacrylsäure (2,3-EMA) beim Abbau von HEMA, BisGMA und TEGDMA durch Cytochrom P 450-Monooxygenasen konnte dabei nicht nur in Lebermikrosomen nachgewiesen werden, sondern auch in Zellen der Mundschleimhaut wie Gingivafibroblasten und Pulpafibroblasten [62]. Bei diesen Zelllinien konnte sowohl die Expression der Cytochrom P 450-Monooxygenase CYP450-2E1 als auch die Bildung von 2,3-EMA nachgewiesen werden [31, 63].

Die Bildung von Epoxiden ist im Metabolismus der Komposite/Adhäsive für die Toxikologie entscheidend, da Epoxide in der Regel chemisch äußerst instabil und damit sehr reaktiv sind, wodurch sie kovalent an Nukleinsäuren und Proteine binden können [64, 65]. Die Reaktionsfreudigkeit der Epoxide ist in einem Dreiring mit hoher Ringspannung begründet. Unter Öffnung des Ringes kann das Epoxid z.B. an das Stickstoffatom N7 der DNA-Base Guanin binden [66]. Die Strukturveränderung der DNA-Struktur kann zur Mutation der DNA führen.

2.1.4.2 Biokompatibilität dentaler Komposite

2.1.4.2.1 Allergenität

In den letzten Jahren wurde eine Zunahme allergischer Reaktionen, die vor allem das zahnärztliche Personal betreffen, beobachtet. Es handelt sich dabei um allergische Reaktionen wie Kontaktdermatiden, Ekzeme, Gingivitis, Ulzerationen, Erytheme bis hin zu allergischen Asthma [6, 8, 9, 67]. Für die allergischen Reaktionen werden in erster Linie Komposite, die Methacrylat-basierende (Ko)Monomere enthalten, verantwortlich gemacht [7, 67, 68].

2.1.4.2.2 Östrogene Wirkung dentaler Komposite

Einige Chemikalien wie Bisphenol A sind fähig an Östrogenrezeptoren zu binden und eine östrogene Wirkung hervorzurufen (z.B. verbesserte Durchblutung des Uterus, Einfluss auf das Wachstums der weiblichen Geschlechtsorgane, Zellproliferation im Uterus). Bisphenol A ist häufig in kunststoff-basierenden dentalen Werkstoffen und Fissurenversiegeler zu finden und kann zusätzlich im Metabolismus von BisGMA entstehen [46, 69]. BisGMA, welches aus Bisphenol A und Glycidylmethacrylat (s. Abbildung 1) besteht, kann beim Abbau Bisphenol A freisetzen. In einer *in vitro*-Studie konnte gezeigt werden, dass BisGMA eine östrogene Wirkung bei den östrogensensitiven MCV-7-Zellen zeigt [10]. Eine *in vivo*-Studie an ovariectomierten Mäusen dagegen ergab, dass BisGMA in einer Konzentration von 25 µg/kg Körpergewicht nicht signifikant das Normalgewicht des Uterus veränderte [69, 70]. Es bleibt umstritten, ob die östrogene Wirkung für den Organismus von klinischer Bedeutung ist [11, 71].

2.1.4.2.3 Zytotoxizität und Genotoxizität

Im Metabolismus von (Ko)Monomeren konnte die Entstehung von Methacrylsäure und Epoxidverbindungen nachgewiesen werden [60, 63, 72]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass (Ko)Monomere eine höhere Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies

(ROS) induzieren [73]. Epoxid-Verbindungen und ROS besitzen ein zytotoxisches und genotoxisches Potential [64, 65, 74]. Von (Ko)Monomeren und deren Metaboliten konnten in verschiedenen Zellkulturversuchen eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden, z.B. mittels des Laktat-Dehydrogenase-Tests in Gingivafibroblasten [75] und in alveolären Lungenepithel-Zellen [76], mittels des XTT-Test bei HGF [77]. Unter anderem wurden in diesen Studien die (Ko)Monomere BisGMA, TEGDMA, HEMA, EGDMA, UDMA und GDMA auf ihre Zytotoxizität untersucht, aber auch Additive dentaler Komposite wie beispielsweise der Initiator BPO. Es zeigten sich zytotoxische Effekte wie vermehrter Zelltod, Schädigung der Plasmamembran oder eine erhöhter Gehalt an freigesetzter Laktatdehydrogenase [46, 75, 77].

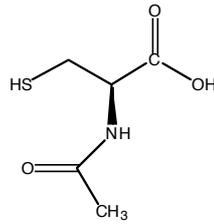
Für Acrylatverbindungen konnten in Zellkulturversuchen genotoxische Effekte nachgewiesen werden [78]. Ebenfalls können Epoxid-Verbindungen und ROS genotoxisch wirken [74, 79]. Methacrylatverbindungen, Epoxid-Verbindungen, ROS und inflammatorische Zytokine treten im Metabolismus der methacrylat-basierenden (Ko)Monomere dentaler Komposite auf. In einigen Zellkulturversuchen wurde mittlerweile das genotoxische Potential verschiedener (Ko)Monomere untersucht [80]. Mittels des Ames-Tests konnten in vier verschiedenen Salmonella-typhimurium-Stämmen für das Monomer GMA genetische Veränderungen gezeigt werden [16]. In Lungenfibroblasten des Hamsters, einer eukaryontischen Zelllinie, konnten für TEGDMA und Methacrylsäure mutagene Effekte nachgewiesen werden [14]. In anderen Studien führte TEGDMA durch Deletionen im HPRT-Gen zu genetischen Veränderungen [81] und zur vermehrten Entstehung von Mikrokernen [82]. Mittels Durchflusszytometrie konnte für TEGDMA in einer neueren Studie die Induktion oxidativer DNA-Schäden gezeigt werden [74]. Für BisGMA und UDMA wurden ebenfalls genotoxische Effekte in Zellkulturen nachgewiesen [83]. Durch Exposition verschiedener (Ko)Monomere wie BisGMA, UDMA und TEGDMA auf Lymphozyten und Speicheldrüsenzellen wurde mittels des COMET-Assay die Entstehung von DNA-Einzelstrangbrüchen nachgewiesen [79, 84]. Mit Hilfe des γ -H2AX-Testes wurde in HGF gezeigt, dass mehrere (Ko)Monomere und Additive dentaler Komposite (BisGMA, BPO, Dicyclohexylphthalat (DCHP), EGDMA, GDMA, HEMA, TEGDMA und UDMA) eine erhöhte Anzahl an DNA-DSB induzieren [17]. Es ist aber noch nicht geklärt, ob dentale Komposite und ihre (Ko)Monomere, die freigesetzt werden können, nicht nur *in vitro*, sondern auch im Organismus selbst genotoxisch wirken und somit ein kanzerogenes Potential haben. Denn die Übertragung von *in-vitro*-Daten auf die *in-vivo*-Situation ist, ähnlich der Übertragung von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen nicht einfach möglich. Auffällig ist, dass in den letzten Jahren vor allem bei jungen

Erwachsenen (<45 Jahre) vermehrt bestimmte Krebsformen der Mundschleimhaut wie Oral- oder Oropharyngealkarzinom diagnostiziert werden [85], die nicht mit Rauchen und Alkoholkonsum korrelieren [86, 87]. Somit werden andere Umweltfaktoren, wie andere Xenobiotika (z.B. Epoxide aus Zahnfüllungsmaterialien) sowie Viren (z.B. Papillomaviren oder Epstein-Barr-Virus), zur Tumorentstehung diskutiert [86, 88-90]. Neben den Xenobiotika wie Kunststofffüllungen und -Klebern und viralen Mikroorganismen wie Papillomaviren wird eine Tumorentstehung durch bakterielle Mikroorganismen (z.B. orale Streptokokken), die eine Periodontitis verursachen können postuliert [91, 92]. Diese Periodontitis ist mit einem Anstieg von inflammatorischen Markern verbunden, die unter anderem das Tumorrisiko erhöhen können [91, 93]. Ob Zahnmaterialien wie dentale Komposite das Risiko einer Tumorentstehung begründen können, ist noch nicht bewiesen [31]. Dazu sind noch weitere Studien wie epidemiologische Untersuchungen und Studien über die Toxizität von Zahnmaterialbestandteilen (z.B. Studien über das Alkylierungsverhalten dieser Substanzen) notwendig. Trotzdem ist zu beachten, dass insbesondere die Risikogruppe der jungen Erwachsenen (<45 Jahre), in denen die Zunahme der Krebsformen der Mundschleimhaut zu beobachten ist, insbesondere aus ästhetischen Aspekten [1] vermehrt zahnfarbene Zahnmaterialien, wozu auch Kompositkunststoffe zählen, wählen.

2.2 Antioxidantien

Antioxidantien sind chemische Verbindungen, die eine unerwünschte Oxidation anderer Substanzen gezielt verhindern und Radikale einfangen können. Durch diese Funktion sind Antioxidantien für den Organismus von großer Bedeutung, da sie ROS und Epoxide inaktivieren können und so den oxidativen Stress für den Organismus reduzieren. ROS entstehen bei vielen Stoffwechselfvorgängen im Organismus sowie im Metabolismus von Xenobiotika (auch im Metabolismus dentaler (Ko)Monomere). Sie sind chemisch reaktiv und führen zu oxidativen DNA-Schäden wie DNA-Strangbrüche, zur Lipidperoxidation sowie zur Inaktivierung von Enzymen. Wie bereits erwähnt, besitzen ROS ein zytotoxisches und genotoxisches Potential.

Zu den Antioxidantien zählen die endogenen, antioxidativen Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase und Katalase. Diese bauen Radikale rasch über Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab, wie in folgender Reaktionsgleichung dargestellt ist (Abbildung 7):



Systematischer Name: (2R)-2-acetamido-3-sulfanylpropanoic acid

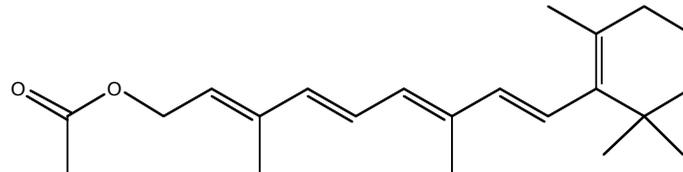
Andere Namen: N-Acetyl-L-cysteine, Acetylcystein, N-Acetylkystein, ACC, Broncholsin

Summenformel: C₃H₉NO₃S

Molekulargewicht: 163 g/mol

CAS-Nummer: 616-91-1

Abbildung 9: Strukturformel von N-Acetylcystein (ACC)



Systematischer Name: Retinylacetat

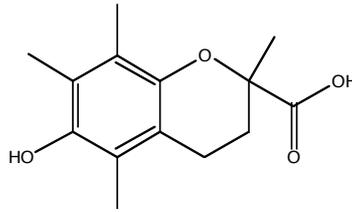
Andere Namen: Vitamin A acetat, all-trans-Retinylacetat, Retinylester

Summenformel: C₂₂H₃₂O₂

Molekulargewicht: 328 g/mol

CAS-Nummer: 127-47-9

Abbildung 10: Strukturformel von Retinylacetat, gehört in die Gruppe der Vitamin A-Derivate



Systematischer Name: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

Andere Namen: Trolox, Trolox C, Vitamin E

Summenformel: $C_{14}H_{18}O_4$

Molekulargewicht: 250 g/mol

CAS-Nummer: 53188-07-1

Abbildung 11: Strukturformel von Vitamin E (Trolox als wasserlösliche Form)

2.3 Formaldehyd (FA)

FA ist der Trivialname des einfachsten Aldehyd Methanal. Es ist ein farbloses, stechend riechendes Gas. FA ist sehr weit verbreitet. Natürlicherweise kommt FA in der Atmosphäre und in Organismen, von denen es auch gebildet werden kann, vor. Beim Stoffwechsel einer Zelle entsteht FA als Zwischenprodukt. So wird es auch von Mensch und Tier endogen gebildet, beispielsweise beim oxidativen Abbau von Methanol und anderen Xenobiotika. In der Leber wird FA jedoch rasch durch die FA-Dehydrogenase zu Methansäure (Ameisensäure) metabolisiert [94]. Natürlicherweise ist es ebenfalls in Früchten und Holz zu finden. Daneben entsteht FA bei allen unvollständigen Verbrennungsprozessen. So auch bei der Verbrennung von Holz, bei der Herstellung von Kunststoff, im Zigarettenrauch und in Verbrennungsmotoren von Kraftfahrzeugen. FA ist auch in der Industrie eine oft verwendete Chemikalie, die großtechnisch hergestellt wird. So wurden im Jahr 2007 weltweit ca. 21 Mio. Tonnen FA produziert [95]. FA wird zur Produktion von Harzen, Bindemitteln, pharmazeutischen und kosmetischen Produkten verwendet, sowie in der Textilindustrie und bei der Herstellung von Kunststoffen. Weitere Verwendung, bei denen Tiere und Menschen durch FA stark exponiert sind, findet FA in Desinfektionsmitteln, zur Konservierung von Geweben und bei der Herstellung von Düngemitteln und Fungiziden [96].

Auch in Wurzelkanalversiegeler und anderen Kompositen konnten in früheren Studien FA nachgewiesen werden [97-99]. Es stellt sich die Frage, ob FA auch in den modernen dentalen Kompositen enthalten ist bzw. im Metabolismus gebildet werden kann. So wird beim Abbau von dentalen Methacrylaten aus Zahnmaterialien die Entstehung von FA postuliert [58, 72].

In Kapitel 2.1.4.1.2 wurde bereits die Entstehung von FA beim Epoxystoffwechsel von dentalen Methacrylaten aufgeführt.

2.3.1 Toxikokinetik von FA

FA wird nahezu vollständig von Gastrointestinaltrakt und Respirationstrakt resorbiert, aber nur in geringem Maße von der intakten Haut resorbiert. FA wird rasch durch die FA-Dehydrogenase und S-Formylglutathion-Hydrolase zu Methansäure metabolisiert, dass nur geringe Mengen an FA in den Blutkreislauf gelangen. Im Blutkreislauf liegt FA hauptsächlich in der hydratisierten Form des Methylenglycols (auch FA-Monohydrat genannt) vor. Das Abbauprodukt Methansäure wird über die Nieren ausgeschieden oder weiter zu CO₂ abgebaut und exhaliert. Die Exkretion über die Nieren überwiegt bei der intestinalen Aufnahme von FA und die Exhalation bei inhalativer Aufnahme [96].

2.3.2 Toxizität von FA

Die akute Toxizität von FA äußert sich v.a. in Reizungen der Schleimhäute der oberen Atemwege. Abhängig von der Dosis treten dabei unterschiedliche Symptome auf, die in nachfolgender Tabelle 1 aufgeführt sind [100]:

Tabelle 1: Konzentrationsabhängige Wirkung von FA nach inhalativer Aufnahme (nach Dekant und Vamvakas [100])

FA-Konzentration (ml/m ³) ab	Reizerscheinungen
0,125	Olfaktorische Wahrnehmung
0,1	Reizungen der Augen
0,5	Reizungen des Kehlkopfs
2-3	Reizungen der Atemwege, leichtes Stechen im Nasen/Rachen
10-20	Akute Atemstörungen mit starkem Husten, Brennen in Nase und Rachen, Tränenfluss
30-50	Schleimhautnekrosen durch eiweißdenaturierende Wirkung, Kehlkopfschwellung, Stimmritzenkrampf und Lungenödem (Lebensgefahr)

FA wirkt auch nach chronischer Exposition toxisch. Neben Reizungen der Augen und der Schleimhäute der oberen Atemwege besitzt FA auch eine allergene Wirkung. Nach Kontakt mit FA kann es zu Kontaktdermatiden. z.B. Ekzemen und Erythemen kommen [20, 101]. FA

gilt als neurotoxisch und soll zu Müdigkeit, Konzentrationsschwäche und Kopfschmerzen führen [96]. In Zellkulturversuchen konnte ein neurotoxischer Effekt von FA an PC12-Zellen nachgewiesen werden [102]. FA wirkt auch zytotoxisch, als Folge kommt es zu einer vermehrten Proliferation epithelialer Zellen [103]. Bei chronischer Exposition wird postuliert, dass sich aus der Epithelhyperplasie eine Plattenepithelmetaplasie und letztlich ein Plattenepithelkarzinom entwickeln kann [104].

FA besitzt auch genotoxische Eigenschaften. Auf die durch FA verursachten DNA-Schäden, wie DNA-Strangbrüchen und Crosslinks-Schäden, wird im Kapitel 2.4.2.2 genauer eingegangen. Weitere genotoxische Wirkungen von FA sind die Erhöhung der Anzahl an Micronuclei, Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustausch [96, 105, 106]. Bis zur Neueinstufung durch die Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) im Jahr 2004 wurde FA als wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen eingestuft. Basierend auf mehreren Tierversuchen, bei denen nach FA-Exposition vermehrt Tumore des Nasen-Rachenraums bei Inhalation von FA [107, 108] sowie Magentumore und Hodentumore nach FA-Aufnahme über das Trinkwasser auftraten [19, 109, 110], wurde FA im Jahr 2004 von der IARC als krebserregend für den Menschen eingestuft. Basierend auf dieser neuen Einstufung der IARC hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine toxikologische Bewertung von FA durchgeführt, in der das BfR in einer Stellungnahme 2006 vorschlägt, FA im Hinblick auf die Inhalation als humankanzerogen einzustufen [104]. Das „National Toxicology Programm“ (NTP) des Department of Health and Human Services stuft FA in der zwölften Ausgabe des „Report on carcinogens“ (RoC) ebenfalls als karzinogen für den Menschen ein [19]. Grund der Neueinstufung sind epidemiologische Studien, die den Zusammenhang zwischen FA und vermehrter Krebsentstehung beim Menschen darlegen [111-113].

Die maximale Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) von Formaldehyd wurde von der internationalen MAK-Kommission auf $0,3 \text{ ml/m}^3$ bzw. $0,37 \text{ mg/m}^3$ festgesetzt. Dieser MAK-Wert beruht auf der 2012 veröffentlichten Liste der MAK-Werte durch die internationale MAK-Kommission [114]. Formaldehyd ist zudem in der Kategorie 4 der Gruppe der krebserregenden Stoffe eingeordnet. Zu der Kategorie 4 werden Stoffe eingeordnet mit krebserregender Wirkung, bei denen genotoxische Effekte keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Liegt ein MAK-Wert vor, ist bei dessen Einhaltung kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten [115]. Das BfR hat in einer toxikologischen Bewertung eine tolerierbare Luftkonzentration als sog. „safe“ level für FA von $0,124 \text{ mg/m}^3$ (= 0,1 ppm) für FA abgeleitet [104]. Der „save“ level (sichere Dosis) wird aus dem „No Observed Adverse Effect Level“ (NOAEL), der durch Sicherheitsfaktoren dividiert wird,

berechnet. Der NOAEL entspricht der höchsten Expositionskonzentration eines Stoffes in chronischen Studien, bei der keine erkennbare schädigende Wirkung auftritt. Ein NOAEL-Wert für FA kann für den Menschen direkt nicht abgeleitet werden, für Ratten liegt er bei $1,24 \text{ mg/m}^3 \text{ FA}$ (= 1 ppm) [104].

2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.4.1 DNA-Aufbau

Die DNA ist ein polymeres doppelsträngiges Makromolekül, das aus zwei helikal umeinander gewundenen Polynukleotidketten besteht. Die Grundeinheit, das Nukleotid, besteht aus dem C₅-Zucker Desoxyribose, einer Purin- oder Pyrimidinbase (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) und einem Phosphorsäurerest. Die Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick aufgeklärt. Als Träger der Erbinformation liegt die DNA in den eukaryontischen Zellkernen in einer hochkondensierten Form als sog. Chromosom vor.

Die kleinste Einheit des Chromosoms ist das Nukleosom. Das Nukleosom ist ein DNA-Histon-Komplex, bei dem die DNA 1,7-mal um ein Histon-Oktamer gewunden ist [116, 117]. Das Histon-Oktamer besteht aus je zwei Molekülen H2a, H2b, H3 und H4. Die Nukleosomen sind durch eine Verbindungs-DNA, der sog. Linker-DNA und einem Linker-Histon H1 zu einer perlschnurartigen Struktur angeordnet [118]. Weitere Kondensationsschritte führen zur Chromatinstruktur und in der höchst-kondensierten Form zum Chromosom.

Die Verpackung der DNA in Form des hochkondensierten Chromosoms ermöglicht zwar deren Unterbringung im sehr begrenzten Raum, verhindert jedoch auch wichtige Stoffwechselfvorgänge wie die DNA-Replikation und –Transkription. Dafür muss die Struktur des Chromatins moduliert werden, was unter anderem mit der Hilfe von Histonmodifikationen geschieht [119, 120]. Die Histonmodifikationen können aus Acetylierungen und Methylierungen der Aminosäuren Lysin und Arginin oder in Phosphorylierungen von Serin und Threonin bestehen [121].

2.4.2 DNA-Schädigung

Die DNA kann durch endogene Faktoren, z.B. Stoffwechselprodukte wie ROS und Epoxide oder während der DNA-Replikation, und durch exogene Faktoren, z.B. ionisierende Strahlung

und Xenobiotika, geschädigt werden. Werden die DNA-Schäden falsch oder nicht repariert, führt dies zu einer Veränderung der DNA-Sequenz und zu einer Strukturänderung. Es ist eine Mutation entstanden. Diese bleibt als stumme Mutation oft folgenlos, sie kann aber auch zur Funktionsveränderung führen, in diesem Fall spricht man auch von einer effektiven Mutation. Die veränderte Funktion kann beispielsweise zum Zelltod oder Entartung einer Zelle führen. In diesem Abschnitt werden DNA-Schäden durch dentale Kompositmaterialien und durch FA genauer erläutert.

2.4.2.1 DNA-Schäden durch Inhaltsstoffe dentaler Kompositmaterialien

Eine DNA-Schädigung durch Inhaltsstoffe dentaler Komposite ist über verschiedene Wege denkbar. Zum einen können Kompositbestandteile wie Methacrylat-basierende (Ko)Monomere die DNA direkt angreifen. Methacrylate sollen aufgrund der positiven Teilladung des C-Atoms der C-C-Doppelbindung über die Michael-Addition mit DNA und Proteinen reagieren [122]. Dadurch können DNA-Strangbrüche entstehen [123]. Daneben können Produkte, die beim Metabolismus von (Ko)Monomeren entstehen, die DNA schädigen. Wie bereits erwähnt, entstehen beim Metabolismus von (Ko)Monomeren Epoxidverbindungen [62, 63] und es kommt durch (Ko)Monomere zu einer vermehrten Bildung an ROS. Epoxide können, da sie sehr reaktiv sind, an die DNA binden. Diese DNA-Addukte können zur Strukturveränderung der DNA und zu Mutationen führen [65, 66]. Die ROS, die durch Kompositbestandteile induziert werden, können zu oxidativen DNA-Schäden führen. Insbesondere die Bildung von Hydroxylradikalen ($-OH\bullet$), welche als sehr reaktive Moleküle die Basen oxidieren können, spielt eine wichtige Rolle beim oxidativen DNA-Schaden. Beispielsweise wird Guanin zu 8-Hydroxyguanin oxidiert, das sich vermehrt mit Adenin statt Cytosin paart. Es entsteht eine Transversionsmutation [124]. Der oxidative Schaden durch ROS führt zudem zu DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen [125]. In verschiedenen Studien konnte der oxidative DNA-Schaden durch (Ko)Monomere dargestellt werden [15, 74]. In Zellkulturversuchen konnte nachgewiesen werden, dass einige (Ko)Monomere DNA-Einzelstrangbrüche verursachen [84], aber auch viele (Ko)Monomere DNA-DSB induzieren können [17]. Die Gefahr einer schädigenden Auswirkung des DNA-Schadens ist bei DNA-DSB wesentlich größer als bei DNA-Einzelstrangbrüchen [126], da die Kontinuität der DNA unterbrochen ist und die freien DNA-Enden ungeschützt von Nucleasen angegriffen werden können [127].

2.4.2.2 DNA-Schäden durch FA

FA kann in vielen Geweben die Bildung von ROS induzieren. Diese können mit der DNA interagieren und zur oxidativen Schädigung der DNA führen [128-130]. Die durch ROS bedingten Schäden wurden im oberen Abschnitt bereits beschrieben. In mehreren Studien konnte das genotoxische Potential von FA direkt nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass FA vor allem die Bildung von DNA-Addukten induziert, insbesondere mit Guanin zu N2-Hydroxymethyl-Guanin [131]. Die DNA-Addukte können zu DNA-Einzelstrangbrüchen („intrastrand crosslink“) [132], zu DNA-DSB („interstrand crosslink“) und zu DNA-Protein-crosslinks führen [128, 133-135]. Cross-link sind DNA-DNA-Quervernetzungen bzw. DNA-Protein-Quervernetzungen und stellen die vorherrschenden DNA-Schäden dar, die durch FA entstehen [128, 136].

2.4.3 Reparatur von DNA-Schäden

In Abhängigkeit des DNA-Schadens kommt es zu verschiedenen Reparaturmechanismen, die nachfolgend kurz aufgelistet werden (nach Gessler) [127]:

- Direkte Reparatur:
Sie findet Einsatz bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen und bei Dealkylierungen mittels DNA-Ligase.
- Basen-Exzisionsreparatur (BER):
Basenmodifikationen wie Methylierung, Desaminierung werden mittels DNA-Glycosylasen, die die Base von der Desoxyribose abspalten, korrigiert. Die entstehende Lücke kann durch DNA-Polymerase und –Ligase wieder geschlossen werden.
- Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER):
Größere Basenmodifikationen und Vernetzungen werden von einem Multienzymkomplex repariert, bei dem mehrere Nukleotide ersetzt werden und der Doppelstrang kurzfristig aufgetrennt wird.
- Mismatch-Reparatur (MMR):
Findet nur bei Replikationsfehlern statt. Dabei sind sog. Mutator-Proteine beteiligt, die den Tochterstrang identifizieren und ihn dem Mutterstrang angleichen.
- Toleranz-Reparatursysteme:
Diese können ebenfalls bei der Replikation auftreten, bei der eine massive DNA-Schädigung vorliegt, aber über die blockierende Läsion hinweg können bestimmte

Polymerasen die DNA-Synthese trotzdem weiterführen. Dabei können Mutationen entstehen.

- Rekombinationsreparatur:

Die Reparatur von DNA-DSB und massive DNA-Schäden finden über diesen Mechanismus statt. Dabei kommt es zuerst zu einem Exonuclease-Verdau, so dass 3'überstehende Einzelstränge entstehen. Je nach Größe des DNA-Schadens finden dann die homologe Rekombination oder die nicht-homologe Endverknüpfung statt. Diese beiden Mechanismen werden in Kapitel 2.4.4 ausführlich erklärt, da DNA-DSB die entscheidenden DNA-Schäden bei (Ko)Monomere und FA darstellen. DNA-Einzelstrangbrüche können ebenfalls durch homologe Rekombination repariert werden.

Wenn es zur Schädigung der DNA kommt, müssen Sensorproteine den Schaden detektieren und über ein Signal die Reparatur starten. Dies erfolgt über Phosphorylierungsreaktionen bis zum Effektorprotein. Über diese Signalübertragungsmechanismen kann der Zellzyklus angehalten werden und die Reparaturmechanismen gestartet werden. Wichtige Proteine bei der Signalübertragung sind das Protein p53 und die Serin-/Threonin-Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated protein), die ATR-Kinase (ATM and Rad3-related Kinase) und die DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase). ATM ist eine Kinase, die bei der Entstehung von DNA-DSB sehr rasch aktiviert wird, ATR dagegen wird zur Aufrechterhaltung des phosphorylierten Status später aktiviert [137, 138].

2.4.4 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-DSB werden wie bereits erwähnt durch Rekombinationsreparatur korrigiert. Dabei können abhängig von der Größe des Schadens die „homologe Rekombination“ oder die „nicht-homologe Endverknüpfung“ als Mechanismus Verwendung finden.

2.4.4.1 Homologe Rekombination (HR)

Die homologe Rekombination kann nur erfolgen, wenn eine identische unbeschädigte Kopie der DNA in einem Schwesterchromatid vorliegt, anhand dieser der geschädigte DNA-Strang repariert bzw. neu synthetisiert wird. Dies erlaubt eine fehlerfreie Reparatur. Da die HR nur stattfinden kann, wenn die Bruchenden ausreichende Homologien zu einem anderen Strang aufweisen zwecks der Ausbildung von „Holliday-Kreuzungen“ und diese in der Nähe des Bruchs vorliegen müssen, findet die HR nur in der S- und der G2-Phase des Zellzyklus statt

[139]. Mit Hilfe verschiedener Enzyme kommt es zur Stranginvasion in den DNA-Doppelstrang der unbeschädigten Schwesterchromatide und anhand des unbeschädigten Stranges findet mittels Polymerase und Ligase die Polymerisation und Verknüpfung des reparierten Stranges statt. Nach der Ligation der DNA-Enden kommt es zur Auflösung der Holliday-Kreuzungen [127].

2.4.4.2 Nicht-homologe Endverknüpfung (Non-Homologous-End-Joining = NHEJ)

Ist eine homologe Rekombination nicht möglich, beispielsweise aufgrund nicht ausreichend vorhandener Homologien oder aufgrund der Phase des Zellzyklus, findet die nicht-homologe Endverknüpfung statt. Dabei werden die freien DNA-Enden direkt verknüpft, wofür keine Sequenzübereinstimmung notwendig ist. Die freien Enden werden durch ein Dimer aus dem Ku70- und Ku80-Protein gebunden. Durch eine DNA-abhängige Protein-Kinase und der DNA-Ligase IV kommt es zur Verknüpfung der DNA. Da keine Matrize als Vorlage dient, ist die Reparatur durch NHEJ fehlerbelasteter. Dies ist vor allem der Fall, wenn die freien DNA-Enden durch Nucleasen bereits verdaut wurden, so dass schon Basen fehlen und es zu Deletionen kommt oder mehrere DNA-DSB vorliegen, die dann falsch ligiert werden. Trotzdem wird dieser Reparaturmechanismus oft verwendet, da er im Gegensatz zur HR in allen Zellzyklen stattfinden kann [139] und insbesondere in der G1-Phase als schnelle Reparaturmöglichkeit genutzt wird [127, 140].

2.5 γ -H2AX-Test

2.5.1 H2AX und seine phosphorylierte Form

Das Histon H2A, welches Bestandteil des Nucleosoms ist, kann in 3 Subfamilien eingeteilt werden: H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX. H2AX besitzt am C-terminalen Ende eine Aminosäuresequenz aus Serin, Glutamin und Glutaminsäure, die als SQW-Motiv bezeichnet wird [141]. Nach der Induktion von DNA-DSB wird das Histon H2AX in eine phosphorylierte Form modifiziert. Dabei sind die drei Kinasen ATM, ATR und DNA-PK beteiligt. Diese phosphorylierte Form von H2AX wird auch als γ -H2AX bezeichnet [141, 142]. Die Phosphorylierung von H2AX wird als eine der ersten Reaktionen in der Schadensantwort von Doppelstrangbrüchen angesehen [143]. Pro Doppelstrangbruch werden so viele H2AX-Moleküle phosphoryliert, dass es zu einer Akkumulation von γ -H2AX-Molekülen kommt, so dass mehrere Megabasenpaaren einer Chromatindomäne involviert sind

[144]. Die Akkumulation von γ -H2AX dient dabei der Fixierung und Rekonstruktion der Bruchenden und der korrekten Anordnung der beteiligten Komplexe zur Reparatur [145]. Die Phosphorylierung von H2AX erfolgt auch durch endogene Prozesse, wie z.B. bei Alterungsprozessen in der Zelle [146], während der mitotischen Rekombination [147] und während der Apoptose [142]. Daneben führen exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung, UV-Licht [148], Hitze [149] und Chemikalien [150] zur Bildung von γ -H2AX.

2.5.2 Darstellung und Quantifizierung von DNA-DSB

Da nach Induktion von DNA-DSB H2AX phosphoryliert wird, wurden Antikörper entwickelt, die sich nur an die phosphorylierte Form, also an γ -H2AX, binden. In Kombination mit einem sekundären fluoreszenz-markierten Antikörper können die an den Doppelstrangbrüchen akkumulierten γ -H2AX-Moleküle als Foci sichtbar gemacht werden und somit der Doppelstrangbruch dargestellt werden [144, 151]. Für die Quantifizierung der Foci werden mit einem Fluoreszenzmikroskop oder Laser-Scanning-Mikroskop Schnittbilder erstellt und anhand dieser Bilder die Foci pro Zellkern gezählt. Das Auszählen der Foci kann manuell oder automatisch mittels Bildanalyse-Systemen erfolgen. Sowohl automatisch als auch manuell muss definiert werden, wann ein Fluoreszenzsignal als Foci zählt. Manuell ist dies sehr subjektiv, da diese Beurteilung von dem Betrachter abhängig ist. Die Quantifizierung der γ -H2AX-Foci ist auch mittels Durchflusszytometrie möglich, bei der die Gesamtintensität der Fluoreszenzsignale gemessen wird. Neben dem γ -H2AX-Test können DNA-DSB auch mit anderen Methoden untersucht werden, beispielsweise mit dem Comet-Assay oder der Pulsfeldgelelektrophorese.

Zuerst wurden mit Hilfe des γ -H2AX-Testes nur strahleninduzierte DNA-DSB nachgewiesen [152, 153]. Mittlerweile wurde in mehreren Studien gezeigt, dass sich der Test auch zum Nachweis von DSB, die durch Xenobiotika induziert werden, eignet, so auch durch (Ko)Monomere dentaler Komposite [17] und Desinfektionsmitteln.

2.6 GC-MS-Analyse

Die GC-MS-Analyse ist ein Verfahren, bei dem ein Gaschromatograph mit einem Massenspektrometer kombiniert wird. Die Kopplung des Gaschromatograph mit dem Massenspektrometer wird auch mit GC-MS, GC/MS oder GCMS abgekürzt. Bei der GC-MS

Analyse dient die GC zur Auftrennung von Stoffgemischen mittels einer mobilen gasförmigen und einer stationären Phase. Die Moleküle werden dann im Massenspektrometer ionisiert und zerfallen in einzelne, für jede Substanz spezifische, Muster. Anhand der Retentionszeit im GC und des Fragmentmusters im MS können die Substanzen identifiziert werden und anhand der Intensität der detektierten Fragmente quantifiziert werden. Daneben können die Substanzen durch Vergleich mit den Reinsubstanzen oder mittels Spektrenbibliotheken (z.B. NIST) identifiziert werden.

2.6.1 Gaschromatographie

Mit Hilfe der GC werden die einzelnen Substanzen eines Stoffgemisches zwischen einer gasförmigen mobilen Phase und einer stationären Phase aufgetrennt. Als mobile Phase/Trägergas wird meist Helium, Wasserstoff oder Stickstoff verwendet. Als stationäre Phase dienen meistens Kapillarsäulen aus reinem Quarzglas, an deren Innenwand ein Flüssigkeitsfilm chemisch gebunden ist. Daneben gibt es auch gepackte Säulen, die heutzutage jedoch kaum noch verwendet werden.

Die Probeninjektion kann manuell oder mit Hilfe eines automatischen Injektionssystems (Autosampler) erfolgen. Flüssige Proben müssen im Einspritzblock (Injektor) durch Erhitzen in einen gasförmigen Zustand überführt werden, was durch bestimmte Temperaturprogramme gesteuert wird. Im gasförmigen Zustand kann die Probe dann mit dem Trägergas auf die Säule transportiert werden. Bei der Injektion kann man zwischen der splitlosen (splitless) Injektion und der Splitinjektion unterscheiden. Bei der splitlosen Injektion kommt es bei geschlossenem Ventil zum vollständigen Transfer der Probe auf die Säule. Bei der Splitinjektion wird ein großer Anteil des injizierten Probematerials durch ein Splitventil aus dem Injektor entlassen. Es werden daher nur sehr kleine Volumina auf die Kapillarsäule appliziert [154]. Der Splitanteil kann dabei programmiert werden.

Die Substanzen werden im Gasstrom (bei konstantem Gasfluss oder konstantem Gasdruck) während der Passage durch die Säule aufgetrennt. Die Säule wird im Säulenofen auf bis zu 300°C mittels spezieller Temperaturprogramme aufgeheizt. Aufgrund der chemisch-physikalischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen eines Stoffgemisches interagieren sie unterschiedlich mit der stationären Phase, so dass die Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten die GC-Säule verlassen, den sog. Retentionszeiten. Nach der Elution werden die Substanzen mit Hilfe eines Detektors nachgewiesen. Es finden dabei beispielsweise Flammenionisations-, Wärmeleitfähigkeits-, Elektroneneinfang- und Atomemissionsdetektoren sowie Massenspektrometer Verwendung. Die Kopplung der GC mit einem Massenspektrometer ist

wegen des geringen Trägergasflusses in der Kapillarsäule möglich, da der geringe Gasstrom das Hochvakuum des MS nicht beeinflusst [154]. Die Analyte werden über eine beheizte Transferkapillare im gasförmigen Zustand vom Säulenausgang in die Ionenquelle des MS transportiert.

2.6.2 Massenspektrometer

Im Massenspektrometer werden die Masse der Analyte und deren Fragmente gemessen. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Nach Verlassen der GC-Säule werden die aufgetrennten Substanzen über eine beheizte Transferkapillare ins Massenspektrometer überführt und in der Ionenquelle des Massenspektrometers ionisiert. Es gibt dabei verschiedene Ionisationsmethoden. Die am meisten verwendete Methode ist die Elektronenstoßionisation (EI). Dabei werden Elektronen von einem Filament mittels eines elektrischen Feldes auf eine Energie von meist 70 eV beschleunigt und durch die Gaswolke der Analyte geleitet. Wenn die Elektronen mit den Molekülen zusammenstoßen, wird ein Elektron aus den Molekülen herausgeschlagen. Es entstehen positiv geladene Radikalkationen, die meist instabil sind und in kleinere positiv geladene Fragmente zerfallen. Die Größe der Fragmente ist bei gegebener Beschleunigungsspannung für eine bestimmte Substanz charakteristisch. Das Fragmentmuster kann gemeinsam mit der Retentionszeit zur Identifizierung herangezogen werden. Andere Ionisationsmethoden sind die chemische Ionisation, die Feldionisation, die Matrix-unterstützte Laser-Ionisation oder die Photoionisation.

Im Analysator, auch Massenselektor genannt, werden die ionisierten Teilchen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Je nach Art der Analysatoren erfolgt die Massentrennung unterschiedlich. Es gibt Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer, Flugzeitmassenspektrometer, Tandem-Massenspektrometer und Quadrupol-Massenspektrometer [154]. Es wird hier nur näher auf die Trennung durch Quadrupol-Massenspektrometer eingegangen. Ein Quadrupol besteht aus vier parallelen Metallstäben, die als Elektroden dienen und zur Trennung genutzt werden. Eine geringe Gleichspannung zieht die Ionen aus der Ionisationsquelle in den Quadrupol. Die jeweils gegenüberliegenden Metallstäbe sind an eine um 180° phasenverschobene Hochfrequenzspannung angeschlossen. Zusätzlich liegt noch eine Gleichspannung an den Metallstäben an. Die ionisierten Teilchen werden durch die Spannungen innerhalb des Quadrupols auf spiralförmige Bahnen gedrängt. Aufgrund des Verhältnisses von Frequenz und Amplitude der Wechsel- und Gleichspannung können nur Teilchen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Quadrupol verlassen. Ionen

mit anderem m/z -Verhältnis gelangen dabei auf Bahnen, die ihren Radius vergrößern und an den Metallstäben des Quadrupols eliminiert werden [154]. Durch kontinuierliches Verändern der Spannungen können Ionen mit verschiedener Masse nacheinander den Quadrupol passieren und vom Detektor erfasst werden.

Der Detektor dient zur Erfassung der vorher separierten Ionen. Es sind dabei sehr empfindliche Detektoren und Verstärker notwendig, um die kleinen Signale durch ein Ion umzusetzen. Als Detektoren werden Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), Continuous Electron Multiplier (Channeltron), Delay-Detektoren oder Photomultiplier verwendet. Bei allen Detektoren werden aufgrund einer Kaskadenreaktion das Signal 10^5 bis 10^7 -fach verstärkt, indem die Ionen auf die erste Diode bzw. den Anfang des Channeltrons treffen und aus der Diode zwei Elektronen herauslösen. Diese Elektronen treffen dann auf die nächste Diode.

2.6.3 Auswertung der Massenspektren

Die Massenspektren stellen Histogramme dar. Die Masse des schwersten detektierten Ions ist meist die Molekülmasse des Analyten und wird auch Molekülpeak oder Molekülion genannt (M^+). Deshalb muss zunächst die Masse des Analyten bestimmt werden. Das Molekül kann aber durch die Elektronen-Ionisation gespalten sein, so dass kein Molekülpeak detektiert werden kann oder als Dimer oder Trimer vorliegen. Die weitere Auswertung beruht auf der Tatsache, dass jede Substanz einen unterschiedlichen Massendefekt hat und in unterschiedlich große Fragmente zerfällt. Aufgrund von typischen Bruchstellen, charakteristischen Isotopenverhältnissen und oft auftretenden Umlagerungsreaktionen, sowie weiteren Informationen, kann die Strukturformel bestimmt werden. Daneben helfen Massenspektren-Bibliotheken, in denen die Massenspektren von bereits analysierten Substanzen mit ihrem typischen Fragmentmuster aufgelistet sind. Die Retentionszeiten der verschiedenen Substanzen eines Stoffgemisches bei der GC-Messung tragen auch zur Identifizierung der Substanzen bei. Neben der Identifizierung von Substanzen können diese auch anhand der Signalintensität und unter Einbeziehung der Signalhöhe eines internen Standards mit definierter Konzentration quantifiziert werden. Für die Bestimmung der Signalintensität werden von einer speziellen Software die Flächenintegrale der verschiedenen Signale berechnet.

3 Zielsetzung

Dentale Komposite und ihre eluierbaren Bestandteile werden immer mehr in Hinsicht auf ihre Biokompatibilität und Toxizität untersucht. *In-vivo*-Studien verzeichnen die Zunahme allergischer Reaktionen (z.B. Gingivitis, Ekzeme und Ulzerationen) und Atemwegserkrankungen, insbesondere beim zahnärztlichen Personal, die täglich mit kunststoffbasierenden Zahnmaterialien in Kontakt kommen. In vielen *in-vitro*-Studien konnte den (Ko)Monomeren und Additiven dentaler Komposite cyto- und genotoxische Effekte zugeschrieben werden. Freigesetzte Kompositbestandteile können im Organismus weiter verstoffwechselt werden. Dabei können reaktive, toxische Epoxid-Verbindungen und ROS entstehen. Diese können zu Zell- und DNA-Schäden führen. In verschiedenen Zellkulturstudien konnten zytotoxische Effekte, aber auch DNA-Schäden wie DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen nachgewiesen werden. DNA-Doppelstrangbrüche gehören dabei zu den bedeutendsten DNA-Schäden.

Im ersten Abschnitt der Dissertation soll deshalb untersucht werden, ob Antioxidantien das DNA-DSB induzierende Potential der (Ko)Monomere dentaler Komposite bei HGF reduzieren können und so *in-vitro* zu einer Verbesserung der toxischen Eigenschaften von Kompositbestandteilen beitragen. Der zweite Teil der Dissertation befasst sich mit dem Nachweis von FA aus unpolymerisierten und polymerisierten dentalen Kompositen mittels GC-MS. Da FA unter anderem als allergen und kanzerogen eingestuft wird, trägt der FA-Nachweis zur weiteren Aufklärung der Biokompatibilität und Toxizität dentaler Komposite bei.

3.1 γ -H2AX-Test

Mit Hilfe des γ -H2AX-Testes konnte in einer früheren Zellkulturstudie bei HGF nachgewiesen werden, dass (Ko)Monomere dentaler Komposite (z.B. TEGDMA, BisGMA, HEMA, UDMA) nach sechsständiger Exposition DNA-DSB induzieren können und somit ein genotoxisches Potential besitzen. Basierend auf der Grundlage, dass im Metabolismus der Methacrylat-basierenden (Ko)Monomere ROS und Epoxide entstehen, die durch Antioxidantien abgefangen werden könnten, soll in dieser Dissertation untersucht werden, ob die Antioxidantien (Asc, ACC) im γ -H2AX-Test die Anzahl der durch Monomer-induzierten DNA-DSB reduzieren können. Mittels γ -H2AX-Test sollte deshalb folgendes untersucht werden:

1. Es soll die Konzentration der einzelnen Antioxidantien im γ -H2AX-Test ermittelt werden, die zur Zellkultur dazugeben werden kann, ohne dass die Antioxidantien Asc, ACC, Trolox, Retinylacetat und Katalase selbst die Anzahl an DNA-DSB im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhen oder zu anderen möglichen toxischen Effekten führen.
2. Es sollen die induzierten γ -H2AX-Foci nach Exposition verschiedener Konzentrationen an BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA quantifiziert werden.
3. Es sollen die induzierten γ -H2AX-Foci nach Exposition verschiedener Konzentrationen an BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA in Kombination mit Antioxidantien quantifiziert werden.
4. Es soll die Anzahl der induzierten Foci nach Exposition von BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA ohne Zugabe und mit Zugabe von Antioxidantien verglichen werden.

3.2 FA-Nachweis mittels GC-MS

Für den FA-Nachweis mittels GC-MS musste erst eine Methode entwickelt werden, mit der es ohne aufwändige Extraktionsschritte möglich ist, FA in dentalen Kompositen nachzuweisen. Folgende Versuchsbedingungen müssen erst etabliert und standardisiert werden:

1. Etablierung eines GC-MS-Steuerprogramms zum Nachweis von FA.
2. Auswahl einer GC-Säule zum Nachweis von FA.
3. Etablierung eines internen Standards, der in Struktur und chemischen Eigenschaften FA ähnlich ist.
4. Auswahl des Lösungsmittels für den FA-Nachweis mittels GC-MS.
5. Erstellen einer Standard-FA-Verdünnungsreihe.
6. Erstellen einer Kalibrierkurve anhand der Standardverdünnungsreihe unter Einbeziehung des internen Standards.
7. Nachweis von FA mittels GC-MS in nicht-polymerisierten dentalen Kompositen.
8. Nachweis von FA mittels GC-MS in den Eluaten polymerisierter Komposite.

4 Materialien

4.1 Verwendete Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
13C-markiertes Formaldehyd (13C-FA) (20 Gew%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH), in Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) gelöst	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ACC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Antikörperdiluent	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Asc	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BisGMA	Röhm GmbH, Darmstadt
Coffein wasserfrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (FLUKA), Taufkirchen
Deuteriertes Ethanol (d-EtOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Deuteriertes Formaldehyd (d-FA) (20 Gew%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNPH-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EGDMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol (EtOH) (>99,8 % p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FA-2,4-DNPH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formalin (37 Gew%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
GDMA	Röhm GmbH, Darmstadt
Immersionsöl	Merck, KGaA, Darmstadt
Katalase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

n-Hexan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid-Lösung (50%)	Merck, KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ProLong Antifade Gold mit DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinblockierungspuffer	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Retinylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salzsäure (HCl, 37%)	Merck, KGaA, Darmstadt
Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer (10× konzentriert)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, KGaA, Darmstadt
Trolox	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
UDMA	Evonik Industries AG, Essen
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

4.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

24-Well-Zellkultur-Platte
 Deckgläser rund, Ø 12 mm
 Entsorgungsbeutel
 GC-Gläschen braun (1,5 ml)
 Kryoröhrchen (1,8 ml)
 Objektträger
 Pasteurpipetten
 Pipettenspitzen (1000µl, 100µl, 10µl)

Bezugsquelle

BD Bioscience, Heidelberg
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Macherey-Nagel GmbH, Düren
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
 Eppendorf AG, Hamburg

Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (14 ml und 50 ml), „Falcon-Röhrchen“	BD Bioscience, Heidelberg
Schraubverschluss für GC-Gläschen	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Zellkulturflaschen 175 cm ²	BD Bioscience, Heidelberg

4.3 Zellkulturlinie

Zelllinie

HGF

Bezugsquelle

Provitro GmbH, Berlin

4.4 Medium und Waschlösung

Lösung

Fibroblastenmedium Quantum 333 mit L-Glutamin

Bezugsquelle

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Waschlösung Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

4.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz

Primärer Antikörper =
Anti-phospho-Histon H2AX, monoclonal

Bezugsquelle

Millipore GmbH, Schwalbach

Sekundärer Antikörper =
Fluorolink Cy3 Goat, Anti-Mouse,
polyclonal

GE Healthcare, München

Zellkernfarbstoff Cybr-Green I

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.6 Dentale Komposite

Komposite	Bezugsquelle
Filtek™ Silorane (LOT: 7AR9)	3M ESPE Deutschland GmbH, Neuss
Filtek™ Supreme XT (LOT: 9YC)	3M ESPE Deutschland GmbH, Neuss
N'Durance® Flow (LOT: E9800-2)	Septodont GmbH, Niederkassel
N'Durance® Norm (LOT: E9810-2)	Septodont GmbH, Niederkassel
Tetric EvoCeram® (LOT: N01397)	Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen
Tetric EvoFlow® (LOT: M61775)	Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen
Voco Grandio Flow® (LOT: 1022114)	VOCO GmbH, Cuxhave

4.7 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Brutschrank Hera cell 150	Hera Laborsysteme GmbH, Blaufelden
Erlenmeyerkolben	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Feinwaage CP 124 S	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, München
GC-MS	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Gefrierschrank	Siemens AG, München
Handstückzähler	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kühlschrank	Siemens AG, München
Lichtmikroskop IM 35	Carl Zeiss AG, München

Messzylinder	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (2 ml, 5ml, 10ml, 20 ml)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Probenmischer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Rühr-und Heizgerät MAG-K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sicherheitswerkbank Hera safe KS 9	Hera Laborsysteme GmbH, Blaufelden
Sterile Werkbank Hera safe KSP 189	Hera Laborsysteme GmbH, Blaufelden
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank Heraeus 150	Hera Laborsysteme GmbH, Blaufelden
Ultraschallbad	SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf
UV-Lampe	Carl Zeiss AG, München
Wasserbad	Messgerätewerk Lauda, Lauda-Königshofen

4.8 Verwendete Software

Software

LSM Image Browser,
Software Fluoreszenzmikroskop

Xcalibur
Software GC-MS

Bezugsquelle

Carl Zeiss AG, München

Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

5 Methoden

5.1 γ -H2AX-Test

5.1.1 Zellkultur

Für die Zellkulturversuche wurden ausschließlich HGF verwendet. Diese werden eingefroren in Stickstoffbehältern bei -196 °C gelagert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen mittels Sterilbank, Handschuhen, sterilen Einwegartikeln, Geräten und Substanzen.

5.1.1.1 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in 37 °C warmen destilliertem Wasser aufgetaut und, sobald die Zellen soweit aufgetaut sind, dass sie pipettiert werden können, in 10 ml steriles Medium pipettiert. Dies sollte deshalb so schnell erfolgen, da für aufgetaute Zellen das im Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch ist. Durch das Überführen der Zellen in das Medium wird DMSO verdünnt. Dabei wurden mit Hilfe der Pipette durch mehrmaliges Pipettieren die Zellen homogen verteilt. Die Zellen wurden in 175 cm^2 Kulturflaschen ausgesät und das Medium auf 30 ml aufgefüllt. Es wurden ca. 3000 Zellen/cm^2 ausgesät, dies entspricht bei 175 cm^2 Kulturflaschen 525000 Zellen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerzählkammer ermittelt (s. 5.1.1.2). Wenn sich die Zellen auf die Wachstumsfläche abgesetzt und angeheftet haben (nach zwei bis drei Stunden), wurde das Medium gewechselt, um das Einfriermedium inklusive DMSO zu entfernen.

5.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels der Neubauerzählkammer ermittelt. Ein Deckgläschen wurde auf die durch Anhauchen befeuchtete Zählkammer angedrückt, so dass sich bei korrekter Platzierung des Deckgläschens Newton'sche Ringe auf den Glasstegen der Zählkammer bildeten. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurde an den Rand des Deckgläschens pipettiert, die Suspension verteilte sich selbstständig unter dem Deckglas. Ausgezählt wurde mit einem Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung. Die Zählkammer wurde so unter dem Mikroskop platziert, dass das in der Zählkammer abgebildete Kreuz in der Mitte liegt. Die Zellen wurden dann in den vier Quadranten, die um das Kreuz herum direkt anliegen, gezählt. Um die Zellzahl pro Volumen (ml) zu bestimmen, wurde das Ergebnis der Auszählung in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \right) \times 10^4 \text{ in } \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)$$

Anhand dieser errechneten Konzentration c der Zellsuspension konnte das Volumen, das von dieser Zellsuspension in die Kulturflasche pipettiert werden muss, berechnet werden mit folgender Formel:

$$\text{Volumen } V \text{ (ml)} = \frac{\text{Ausgangszelldichte } N \text{ (Zellen)}}{\text{Konzentration } c \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)}$$

Beim Aussäen in Kulturflaschen nach Auftauen oder beim Passagieren der Zellen soll die Ausgangszelldichte $N = 525000$ Zellen betragen. Wenn z.B. die errechnete Konzentration der Zellsuspension 104000 Zellen/ml beträgt, lässt sich folgendes Volumen berechnen:

$$\text{Volumen } V \text{ (ml)} = \frac{525\,000 \text{ (Zellen)}}{104000 \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)} = 5,05 \text{ ml}$$

Dies bedeutet für die Praxis, dass von der 10 ml Zellsuspension, die beim Auftauen entstanden ist, 5 ml in eine 175 cm^2 Kulturflasche pipettiert und mit 25 ml Medium auf 30 ml aufgefüllt werden müsste. In diesem Fall könnte man mit der aufgetauten Zellsuspension zwei Kulturflaschen befüllen. Für den γ -H2AX-Test wurden 70000 Zellen in 1 ml Nährmedium ausgesät. Das Auszählen und die Berechnung wurden wie beschrieben ausgeführt.

5.1.1.3 Kultivieren der HGF

Die HGF wurden in 175 cm^2 Kulturflaschen mit 30 ml Medium kultiviert. Das Medium ist ein spezielles Fibroblastenmedium (Quantum 333), das L-Glutamin als Zusatzstoff enthält. Dem Medium wurde 1 % einer Antibiotika-Antimykotika-Lösung zugegeben, um eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen zu minimieren. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubiert, welches den optimalen Wachstumsbedingungen der HGF entspricht. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt, so dass die Zellen ständig mit Nährstoffen versorgt waren. Der Mediumwechsel erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Steriles Medium und die Waschlösung PBS wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde

abgesaugt, die Zellen mit 5-10 ml PBS-Lösung gewaschen, diese wurde wieder abgesaugt und 30 ml des neuen Mediums hinzugefügt.

Die HGF wachsen einschichtig unter Ausbildung einer Schichtlage (Monolayer). Ist der Boden der Zellkulturflasche konfluent bewachsen, ohne dass sich die Zellen berühren, sind genügend Zellen mit ausreichendem Proliferationspotential für die Versuche mit dem γ -H2AX-Test vorhanden. Für die Experimente ist eine ausreichende Stoffwechselrate notwendig, damit die HGF auf die Exposition der verschiedenen Substanzen gut reagieren können. In diesen Experimenten wurden ausschließlich HGF der Passage 10 verwendet. Es ist wichtig die Experimente mit Zellen möglichst gleicher Passagen durchzuführen, da sich Zellen in den verschiedenen Passagen in ihrem Proliferations- und Differenzierungsvermögen erheblich unterscheiden können.

5.1.1.4 Passagieren der Zellen

Die Zellen müssen passagiert werden, d. h. in mehrere neue Kulturflaschen überführt werden, wenn die Wachstumsfläche von den Zellen zu dicht besiedelt ist. Es kommt dann zu einer Unterversorgung an Nährstoffen und die Zellen hemmen sich bei Kontakt in ihrer Proliferation gegenseitig, die Zellen sterben ab. Für die Passage müssen die Zellen von der Wachstumsfläche gelöst werden. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Wachstumsfläche zweimal mit 10 ml sterilem PBS, welches vorgewärmt war, gespült. Die Waschlösung wurde ebenfalls abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurde daraufhin 5 ml einer sterilen vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTA pro Liter) in die Kulturflasche pipettiert und diese für 5 min im Brutschrank inkubiert, da das Temperaturoptimum des Trypsins bei 37 °C liegt. Nach 5 min wurde 10 ml Medium dazugegeben, um die Proteolyse durch Trypsin zu blockieren, da eine zu lange proteolytische Wirkung die Lebensfähigkeit der Zellen schädigen würde. Durch mehrmaliges Pipettieren dieser Zellsuspension wurden die Zellen voneinander getrennt. Die Kulturflasche wurde dann aufrecht hingestellt, damit die Zellen nicht mehr auf die Wachstumsfläche zu liegen kommen und sich wieder anheften. Die Konzentration der Zellen wurde dann wie oben beschrieben mittels Neubauerzählkammer und der oben aufgeführten Formeln berechnet. Es wurden ca. 3000 Zellen/cm² in 175 cm² Kulturflaschen überführt und alle Kulturflaschen wurden auf 30 ml mit Medium aufgefüllt. Die Kulturflaschen wurden mit der Wachstumsfläche nach unten im Brutschrank inkubiert, so dass sich die Zellen anheften konnten. Nach zwei bis drei Stunden, wenn die meisten Zellen sich angeheftet haben, wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt, um Trypsin vollständig zu entfernen.

5.1.2 γ -H2AX-Test

5.1.2.1 *Vorbereitung der 24-Well-Platten*

Die Zellen wurden auf runde Deckgläschen in den einzelnen Kavitäten der 24-Well-Platte ausgesät. Damit die Zellen besser an den Deckgläschen haften können, wurde die Oberfläche aufgeraut, indem die Deckgläschen in 1 M HCl-Lösung für eine Stunde eingelegt wurden. Anschließend wurden sie mit entionisiertem Wasser abgespült und in einer Petrischale sterilisiert. In jedes Well der 24 Well-Platte wurde unter sterilen Bedingungen ein Deckgläschen gelegt.

5.1.2.2 *Aussäen der Zellen auf die 24-Well-Platten*

Es wurden in jede Kavität ca. 70000 Zellen suspendiert in 1ml Medium ausgesät. Dafür wurden die Zellen von der Wachstumsfläche der Kulturflasche mit Hilfe der Protease Trypsin gelöst. Das Medium wurde, wie beim Passagieren der Zellen, abgesaugt, 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und 5 min im Brutschrank inkubiert. Ebenso wurde zur Blockierung des Trypsins 10 ml Medium in die Kulturflasche pipettiert und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Das Medium wurde dann so aufgefüllt, dass der Gehalt an Zellen der Zellsuspension bei ca. 70000 Zellen/ml lag. In jede Kavität wurden ca. 70000 Zellen in 1 ml Medium ausgesät. Die 24-Well-Platte wurde nach der Aussaat der Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

5.1.2.3 *Herstellung der Lösungen der Testsubstanzen*

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss der fünf Antioxidantien Asc, ACC, Trolox, Retinylacetat und das Enzym Katalase ohne Zugabe von (Ko)Monomere auf die Zellen getestet. Von jedem Antioxidans wurde eine Verdünnungsreihe in Medium hergestellt und vier verschiedene Konzentrationen auf die einzelnen Wells für den γ -H2AX-Test aufgetragen. Für die Versuche mit Asc, ACC, Retinylacetat und Trolox wurden 500 μ M, 200 μ M, 100 μ M und 50 μ M Lösungen hergestellt. Retinylacetat musste wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit in Medium mit DMSO gelöst werden, wobei der Anteil an DMSO im Medium kleiner 0,5 Gew% war. Katalase wurde in den Konzentrationen 10 μ g/ml (20 U/ml), 5 μ g/ml (10 U/ml), 1 μ g/ml (2 U/ml) und 0,5 μ g/ml (1 U/ml) eingesetzt. Daneben wurde Medium als Negativkontrolle und als Positivkontrolle eine 1 M H₂O₂-Lösung, die aus einer 30 % H₂O₂-Lösung und Medium hergestellt wurde, verwendet.

Für die weiteren Versuche wurde 100 μ M Asc und 500 μ M ACC in Kombination mit den (Ko)Monomeren eingesetzt. Medium wurde als Negativkontrolle verwendet und eine 1 M

H₂O₂-Lösung als Positivkontrolle. Die (Ko)Monomer-Lösungen wurden in folgenden Konzentrationen (µM) aus Stammlösungen hergestellt: BisGMA (180, 60, 18 µM), UDMA (200, 67, 20 µM), GDMA (5000, 1667, 500 µM) und EGDMA (5440, 1813, 544 mM). Von allen (Ko)Monomeren wurden die einzelnen Verdünnungsstufen einmal 1:1 mit Medium gemischt, einmal 1:1 mit 200 µM Asc-Lösung und 1:1 mit 1000 µM ACC-Lösung. Diese Lösungen wurden dann für den γ-H2AX-Test auf die 24-Well-Platten aufgetragen. Somit wurden die Experimente mit folgenden Konzentrationen der (Ko)Monomere durchgeführt: BisGMA (90 µM, 30 µM, 9 µM), UDMA (100 µM, 33,5 µM, 10 µM), GDMA (2500 µM, 833,3 µM, 250 µM) und EGDMA (2720 µM, 906,7 µM, 0,027 mM) und die gleichen Konzentrationen einmal mit 100 µM Asc und einmal mit 500 µM ACC. Diese Konzentrationen der (Ko)Monomere entsprechen den EC₅₀-, den 1/3 EC₅₀- und den 1/10 EC₅₀-Werten des XTT-Tests, die in einer vorhergehenden Studie [77] mittels des XTT-Tests ermittelt wurden.

5.1.2.4 Auftragen der Testsubstanzen auf die 24-Well-Platten

Nachdem die Zellen 24 Stunden in den 24-Well-Platten inkubiert wurden, konnten die oben genannten Testlösungen aufgetragen werden. Dies wurde unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt. Dazu wurde das in den Kavitäten befindliche Medium abgesaugt und jeweils 1 ml der Testlösung in die jeweilig dafür beschriftete Kavität gegeben. Für die Negativkontrolle wurde das alte Medium abgesaugt und 1 ml frisches Medium zugegeben. Die Platte mit den Testsubstanzen wurde danach für sechs Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, nach vier Stunden wurde sie kurz aus dem Brutschrank entnommen, um für 5 bis 10 min die 1 mM H₂O₂-Lösung auf die Zellen der beiden Kavitäten für die Positivkontrolle zu geben. Es werden zwei Positivkontrollen gemacht, da bei der einen Kontrolle später kein immunfluoreszierender Primär-Antikörper zugegeben wird, um die spezifische Bindung des Antikörpers zu kontrollieren. Nach 5 min wurde die H₂O₂-Lösung wieder abgesaugt und mit 1 ml Medium ersetzt, um eine vollständige Oxidation der Zellen durch H₂O₂ zu verhindern. Die 24-Well-Platte wurde bis zum Ablauf der sechs Stunden wieder bei 37 °C inkubiert.

5.1.2.5 Fixieren der Zellen und Immunfluoreszenzfärbung

Vor dem Fixieren wurden die Substanzen von der 24-Well-Platte abgesaugt und jede Kavität zweimal mit PBS gewaschen. Zum Fixieren wurden in jedes Well 300 bis 500 µl 4 % Paraformaldehyd (in PBS gelöst) pipettiert. Das Paraformaldehyd wurde bei 4 °C gelagert. Die Paraformaldehyd-PBS-Lösung wurde für 5 min bei 4 °C auf die Zellen einwirken

gelassen, durch die Paraformaldehyd-Lösung wurden die Zellen abgetötet und fixiert. Durch viermaliges Waschen jeder Kavität der Platte mit PBS wurde Paraformaldehyd entfernt. Nach dem Fixieren erfolgte dann die Permeabilisierung der Zellwände mit dem Triton-Komplex, einem Gemisch aus 0,1 % Natriumcitrat und 0,1 % Triton X 100. Dafür wurde in jede Kavität 500 µl Triton-Komplex gegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte darauf wieder ein Spülschritt mit viermaligem Waschen mittels PBS.

Bevor der spezifische Primärantikörper hinzugefügt wurde, wurden die unspezifischen Bindungsstellen mithilfe eines Protein-Blockierungspuffers blockiert. Dazu wurden vier bis sechs Tropfen des Proteinblocker in jede Kavität gegeben, sodass das Deckgläschen mit den Zellen komplett mit diesem Blockierungspuffers bedeckt war und für 20 min bei 25 °C inkubiert. Währenddessen wurde der spezifische monoklonale Primärantikörper (Anti-phospho-Histon H2AX, monoklonal) aufgetaut und in Anitbodydiluent im Verhältnis 1:1300 verdünnt. Das Blockierungspuffer wurde abgesaugt und in jede Kavität wurde 300 µl des verdünnten Primärantikörpers pipettiert, bis auf eine der beiden Positivkontrollen mit H₂O₂. Dort wurde Antibodydiluent ohne Antikörper dazugegeben. Dieser Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C auf der Platte gelassen. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch viermaliges Waschen mit PBS ausgewaschen.

Daraufhin wurde der unspezifische polyklonale Sekundärantikörper (Fluorolink Cy3 Goat, anti Mouse) appliziert. Dafür wurde dieser ebenfalls 1:1300 in Antibodydiluent verdünnt und 300 µl dieser Lösung in jedes Well gegeben, diesmal auch in beide Kavitäten der Positivkontrolle. Zur Bindung des zweiten Antikörpers wurde die 24-Well-Platte für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Der nichtgebundene zweite Antikörper wurde ebenfalls ausgewaschen, diesmal mit dreimaligen Waschen mit PBS und das vierte mal mit TAE.

Als letzte Färbung erfolgte die Kerngegenfärbung mit Cybr green 1. Cybr green 1 lag schon 1:100 in DMSO verdünnt vor und wurde weiter in TAE zu 1:50000 verdünnt. In jedes Well wurden wiederum 300 µl des verdünnten Cybr green 1 pipettiert und 15 min lichtgeschützt bei 25 °C inkubiert. Danach folgte ein letzter Waschschrift aus zweimaligem Waschen mit PBS, gefolgt durch zweimaliges Waschen mit destilliertem H₂O.

Die Deckgläschen wurden auf beschriftete Objektträger eingedeckt, jeweils drei Deckgläschen auf einen Objektträger. Dafür wurde für jedes Deckglas 20 µl Prolong Antifade Gold auf den Objektträger gegeben, das Deckgläschen mithilfe einer Pinzette aus dem Well genommen und mit der Wachstumsfläche der Zellen nach unten auf den Objektträger mit dem

Prolong Antifade Gold luftblasenfrei gelegt. Diese Objektträger wurden 24 Stunden lichtgeschützt bei 25 °C getrocknet.

5.1.2.6 Mikroskopische Auswertung

Die Mikroskopische Auswertung erfolgte innerhalb einer Woche, damit die Immunfluoreszenzfärbung nicht zu sehr ausbleichte. Zwischen der Auswertung wurden die Proben lichtgeschützt in einer Box bei -20 °C eingefroren, sodass die Intensität der Fluoreszenzfarbe noch besser erhalten blieb. Zur mikroskopischen Auswertung wurde das Fluoreszenzmikroskop CLSM der Firma Zeiss eingesetzt. Dabei wurde mit einem 100er Ölimmersionsobjektiv und zwei Filtern gearbeitet. Es wurden mindestens 80 Zellen von jedem Deckglas ausgewertet. Dabei wurde an verschiedenen Stellen des Deckgläschens ausgezählt. Jede Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt. Es wurden Zellen ohne Foci und Zellen mit 1 bis 40 Foci gezählt. Darüberhinaus wurden die Foci nicht weiter gezählt, Zellen mit mehr als 40 Foci galten als Zellen mit multiplen Schaden, sog. „multi damage“-Zellen.

5.1.2.7 Statistische Auswertung

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Microsoft Software Excel 2011 ausgeführt. Die statistische Analyse der Ergebnisse umfasste die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes sowie die Berechnung der Standardabweichung. Der student's *t*-Test wurde durchgeführt, um Aussagen über die statistische Signifikanz eines Ergebnisses zwischen 2 Testsubstanzen treffen zu können. Das Ergebnis war statistisch signifikant unterschiedlich wenn der p-Wert aus dem Student's *t*-Test $< 0,05$ war.

5.2 Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS

5.2.1 GC-MS-Bedingungen

Die analytische Messung von FA erfolgte mittels der GC-MS-Methodik. Die Einstellungen und das Messprogramm sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Tabelle 2: GC-MS-Bedingungen

Gaschromatograph	
Probenaufgabe	Autosampler Triplus AS Injektionsvolumen 1 μ l Split 1 zu 30 bzw. Split 1 zu 10
Trägergas	Helium
GC-Säule	Factor Four TM
Temperaturprogramm	50 °C, 2 min halten 25 °C/min auf 300°C, 10 min halten Transfer Line: 250°C
Massenspektrometer	
MS-Parameter	Ionisierungsart: EI (Elektronenstoß) Ionisierungsenergie 70 eV Mass range: 40-500 m/z Detektion: Fullscan-Mode bzw. Selected Ion Monitoring (SIM)-Mode

5.2.2 FA-Konzentration in den Verdünnungsreihen

Es wurden mit verschiedenen FA-Stammlösungen Verdünnungsreihen erstellt. In den erhältlichen Lösungen wurde die Menge des enthaltenden FA in Gewichtsprozent angegeben. Um das Arbeiten zu erleichtern, wurden die Verdünnungsreihen im prozentualen Anteil von FA in der Lösung angegeben. Nachfolgend ist die Umrechnung zur entsprechenden FA-Ausgangskonzentration angegeben:

12C-FA-Lösung: 37 Gew% FA, Dichte 1,07 g/ml
FA-Konzentration $c = 13,2$ mol/l

13C-FA-Lösung: 20 Gew% 13C-FA, Dichte 1,07 g/ml
13C-FA-Konzentration $c = 6,9$ mol/l

deuterierte FA-Lösung: 20 Gew% d-FA, Dichte 1,15 g/ml
d-FA-Konzentration $c = 7,2 \text{ mol/l}$

Die Konzentration der jeweiligen Verdünnungsreihe ist in Tabelle 3 angegeben:

Tabelle 3: Umrechnung der unterschiedlichen FA-Verdünnungsreihe (in %) in die entsprechende Konzentration (mol/l) von FA/deuteriertem FA/¹³C-FA

FA (%)	¹² C-FA (mol/l)	d-FA (mol/l)	¹³ C-FA (mol/l)
1	0,36	0,36	0,45
0,5	0,18	0,18	0,225
0,25	0,09	0,09	0,1125
0,1	0,036	0,036	0,045
0,05	0,018	0,018	0,0225
0,025	0,009	0,009	0,01125
0,01	0,0036	0,0036	0,0045
0,005	0,0018	0,0018	0,00225
0,0025	0,0009	0,0009	0,001125
0,001	0,00036	0,00036	0,00045

5.2.3 Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH

FA wurde mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert. Hierfür waren bezüglich des Nachweis von FA in Kompositen keine Daten verfügbar. Um eine GC-MS-Methode für FA ohne aufwändige Extraktionsschritte zu entwickeln, wurden mehrere Lösungsansätze versucht. Vorgehen:

- Bestimmung der Reaktionszeit für die Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH
- DNPH wurde deshalb in verschiedenen Verdünnungen angewendet sowie in verschiedenen Lösungsmitteln verdünnt. Zudem wurde DNPH-Pulver hinsichtlich seiner Reaktivität mit DNPH in gelöster Form in H_3PO_4 verglichen.
- Zur Herstellung einer FA-Standardlösung wurde zunächst mit Paraformaldehyd gearbeitet. Später wurde für die Standardlösung zur Verwendung von Formalin, eine 37 Gew% FA-Lösung, und zur Verwendung von FA-DNPH-Komplex, der in Pulverform erhältlich war, übergegangen.
- Zur Entwicklung eines internen Standards wurden ¹³C-FA-Lösungen und d-FA getestet. Dazu wurde teilweise der bisherige interne Standard Coffein kombiniert.

Für die Bestimmung von FA mittels GC-MS wurde FA mit DNPH derivatisiert, um ein größeres Molekulargewicht zu erhalten. FA liegt mit einer Molekülmasse von 30 g/mol an der unteren Nachweisgrenze der verwendeten GC-MS und im Hintergrundrauschen mit Substanzen aus der Luft. Kleinere Fragmente, die bei der EI entstehen, wären nicht mehr zu sehen, so dass auch kein Fragmentmuster aufgezeichnet werden könnte. Zudem wurde FA, welches sehr flüchtig ist, mittels des DNPHs als FA-DNPH stabilisiert. Die Molekülmasse des Komplexes liegt bei $M = 210$ g/mol. Nachfolgend ist die Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH dargestellt (s. Abbildung 12).

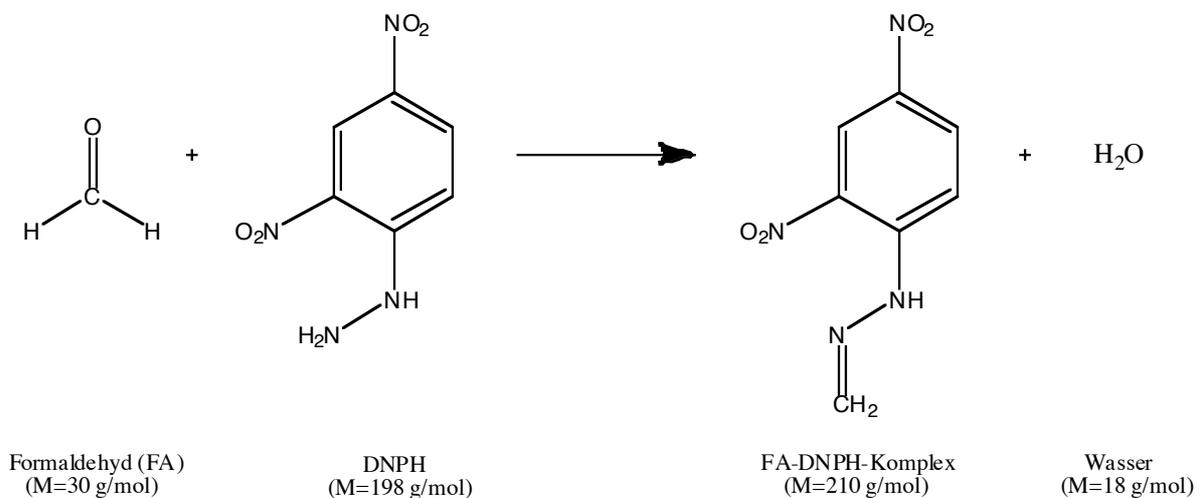


Abbildung 12: Derivatisierungsreaktion von Formaldehyd (FA) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu FA-DNPH unter Abspaltung von Wasser.

5.2.4 Einfluss der Reaktionszeit und der DNPH-Applikationsform

Tabelle 4 zeigt zusammenfassend die verschiedenen Ansätze zur Optimierung der Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH.

Tabelle 4: Ansätze zur Derivatisierung von FA mit DNPH

Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung des FA-DNPH-Komplexes	1 % ¹³ C-FA-Lösung in EtOH, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH derivatisiert (DNPH in 1 N HCl zu 15,6 mM verdünnt)	GC-MS-Messung nach einer Reaktionszeit von 5, 10, 15, 30, 40, 45, 60, 90 min, 2 h, 4 h, 8h, 24 h (s. 5.2.4.1)
Applikationsform von DNPH	Herstellerseitig gelöst in H ₃ PO ₄ (0,2 M DNPH)	15,6 mM DNPH in EtOH, damit FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA hergestellt und mittels GC-MS gemessen (s. 5.2.4.2)
	DNPH-Pulver	15,6 mM DNPH in EtOH, damit FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA hergestellt und mittels GC-MS gemessen (s. 5.2.4.2)
Lösungsmittel für DNPH	1 N HCl (15,6 mM DNPH)	zu 450 µl Probe 50 µl DNPH (wenn nicht anders erwähnt)
	EtOH (15,6 mM, 7,8 mM, 1,56 mM DNPH)	Mit den verschiedenen ethanolschen DNPH-Lösungen wurden jeweils FA-Verdünnungsreihen erstellt (s. 5.2.5.2.2)
	d-EtOH (15,6 mM DNPH)	FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001% FA mit dieser deuterierten ethanolschen DNPH-Lösung und 0,1 % d-FA als interner Standard (s. 5.2.6.2.2)
	Acetonitril (15,6 mM, 1,56 mM DNPH)	0,1 % d-FA als Standard zur DNPH-Lösung, mit dieser FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA erstellt (s. 5.2.6.2.3, 5.2.6.2.4 und 5.2.7)

¹³C-FA = ¹³C-markiertes Formaldehyd, d-FA = deuteriertes Formaldehyd, EtOH = Ethanol, d-EtOH = deuteriertes Ethanol, HCl = Salzsäure

5.2.4.1 Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung des FA-DNPH-Komplexes

Zur Ermittlung der Reaktionszeit wurde eine 1 % ¹³C-FA-Lösung in EtOH hergestellt. 450 µl jeder Probe der Verdünnungsreihe wurde mit 50 µl DNPH (15,6 mM) gemischt und 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 40 min, 45 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h inkubiert. Diese Proben wurden in der GC-MS gemessen und die Flächenintegrale des FA-DNPH-Komplexes verglichen.

5.2.4.2 Einfluss der Applikationsform von DNPH

Es wurde eine 15,6 mM ethanolsche DNPH-Lösung aus DNPH-Pulver und bereits herstellerseitig gelöstem DNPH hergestellt. Mit diesen beiden DNPH-Lösungen wurde jeweils eine FA-Verdünnungsreihe aufgestellt mit folgenden FA-Konzentrationen: 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,0025 und 0,001 %.

Die Proben wurden in der GC-MS gemessen und die Flächenintegrale der Massenpeaks von m/z 210 und m/z 79 verglichen.

5.2.4.3 Einfluss des Lösungsmittels von DNPH

In den verschiedenen Ansätzen zur Optimierung der Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH wurden unterschiedliche Lösungsmittel von DNPH eingesetzt. Zuerst wurde DNPH, welches herstellerseitig in H_3PO_4 gelöst vorlag, zu 15,6 mM in 1 N HCl verdünnt. In folgenden Ansätzen wurde DNPH direkt in EtOH oder Acetonitril gelöst. Einen Überblick gibt Tabelle 4 mit Verweis auf die Kapitel, in denen die verschiedenen Lösungsmittel von DNPH angewendet wurden.

5.2.5 Einfluss der FA-Applikationsform auf die Derivatisierungsreaktion

Tabelle 5 zeigt die verschiedenen Methodenschritte, die durchgeführt wurden, um eine Kalibrierungskurve mittels einer FA-Standardverdünnungsreihe zu erstellen.

Tabelle 5: Verwendete Applikationsformen von FA sowie verschiedene Lösungsmittel für FA

Paraformaldehyd	1 % Paraformaldehyd-Stammlösung in MeOH, Herstellung durch Erwärmen	FA-Verdünnungsreihe von 1 % - 10 ⁻⁶ % FA in MeOH erstellt, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) derivatisiert (s. 5.2.5.1.1)
		Gleicher Ansatz wie oben, nach Derivatisierung überführen mittels NaCl und schütteln in 450 µl Hexan (s. 5.2.5.1.1)
	1 % Paraformaldehyd-Stammlösung in MeOH, Herstellung mittels Ultraschallbad	FA-Verdünnungsreihe von 1 % - 0,0001 % FA in MeOH erstellt, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) derivatisiert (s. 5.2.5.1.1)
	1 % Paraformaldehyd-Lösung in EtOH	Wie oben nur mit EtOH (s. 5.2.5.1.2)
Formalin (37 Gew% in H₂O)	in EtOH verdünnt	FA-Verdünnungsreihe in EtOH von 1 % - 0,0001 % FA, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) derivatisiert (s. 5.2.5.2.1)
		Ethanolische DNPH-Lösung mit DNPH-Konzentrationen von 15,6 mM, 7,8 mM und 1,56 mM, mit diesen DNPH-Lösungen FA-Verdünnungsreihen von 0,5 % - 0,001 % FA erstellt (s. 5.2.5.2.2)
	In Acetonitril verdünnt	Mit 15,6 mM DNPH als Derivatisierungsreagenz und 0,1 % d-FA als interner Standard, Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA (s. 5.2.6.2.3)
Mit 1,56 mM DNPH und 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein, Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA, Aufstellen einer Kalibrierkurve (s. 5.2.6.2.4)		
FA-DNPH- Pulver	In EtOH gelöst	FA-DNPH-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA-DNPH erstellt (s. 5.2.5.3)

EtOH = Ethanol, d-EtOH = deuteriertes Ethanol, MeOH = Methanol

5.2.5.1 Verwendung von festem Paraformaldehyd

Paraformaldehyd wird mit Natronlauge (NaOH) und in Folgeschritten mit HCl gelöst. Hierbei entsteht NaCl, welches die Analytik im GC stark beeinflusst. Deshalb wurde ein neuer Versuch gemacht, Paraformaldehyd zu lösen.

5.2.5.1.1 *Paraformaldehyd in MeOH*

Zunächst wurde Paraformaldehyd-Pulver in MeOH gelöst. Dafür wurde eine 1 % Paraformaldehyd-Lösung unter leichtem Erwärmen und Rühren mittels Magnetrührer hergestellt. Die Probe war verschlossen, damit kein MeOH und FA verdampfte. (Anmerkung: Paraformaldehyd-Lösung müsste korrekterweise als FA-Lösung (Formalin) bezeichnet werden, da FA nicht mehr in der Paraformaldehyd-Form in der Lösung vorliegt. Zur Abgrenzung soll hier dennoch von Paraformaldehyd-Lösung gesprochen werden.) Ausgehend von der 1 % Paraformaldehyd-Stammlösung wurden Verdünnungsreihen hergestellt von 1 % bis 10^{-6} % Paraformaldehyd. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 450 μl in ein Reaktionsgefäß gegeben und 50 μl DNPH, das vorher in 1 N HCl zu einer Konzentration von 15,6 mM verdünnt wurde, zugefügt und mit Hilfe der Pipette vermischt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 25 °C inkubiert und mittels GC-MS gemessen.

In einem weiteren Ansatz wurde, wie oben beschrieben, eine Verdünnungsreihe erstellt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurde 450 μl Hexan gegeben und danach soviel NaCl-Pulver hinzugefügt, bis die Lösung gesättigt war und Salz ausfiel. Die Probe wurde 5 min geschüttelt. Die Hexan-Phase wurde in ein GC-Gläschen pipettiert. Daraufhin wurden die Proben mittels GC-MS gemessen.

Parallel zur Erwärmung wurde versucht, Paraformaldehyd in MeOH ohne Erhitzen nur im Ultraschallbad zu lösen, damit das leicht flüchtige FA nicht entweicht und falsch niedrige Konzentrationen gemessen würden. Dafür wurde wieder eine 1 % Paraformaldehyd-Lösung hergestellt und 20 min ins Ultraschallbad gestellt. Von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 1 % bis 10^{-4} % Paraformaldehyd erstellt. Jede FA-Verdünnungsstufe wurde mit DNPH derivatisiert und mittels GC-MS gemessen.

5.2.5.1.2 *Paraformaldehyd in EtOH*

Paraformaldehyd wurde in EtOH gelöst, indem eine 1 % Paraformaldehyd-Lösung erstellt wurde und diese 20 min im Ultraschallbad aufgelöst wurde, bis eine klare Lösung entstand. Von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 1 % bis 10^{-4} % erstellt. Es wurden jeweils 450 μl der jeweiligen Probe der Verdünnungsreihe mit 50 μl DNPH, verdünnt zu 15,6 mM in 1 N HCl, vermischt, 10 min bei 37 °C inkubiert und mittels GC-MS gemessen.

5.2.5.2 Verwendung von flüssigem Formaldehyd (Formalin)

5.2.5.2.1 FA-Verdünnungsreihe, 15,6 mM DNPH in 1 N HCl gelöst

Es wurde eine FA-Lösung verwendet, bei der 37 Gew% FA in Wasser gelöst ist. Diese wurde in EtOH, welches 0,1 mg/ml Coffein enthielt, zu einer 1 %-igen FA-Lösung verdünnt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 1 % bis 0,0001 % in EtOH hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) derivatisiert.

5.2.5.2.2 FA-Verdünnungsreihe, DNPH in EtOH gelöst

Es wurde eine 15,6 mM, eine 7,8 mM und eine 1,56 mM ethanolische DNPH-Lösung hergestellt. Zu diesen Lösungen wurde FA in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Die FA-Gehalte waren: 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,0025 und 0,001 %.

Die Proben wurden im Splitverfahren 1:30 und im Splitverfahren 1:10 mittels GC-MS gemessen.

5.2.5.3 Verwendung eines festen FA-DNPH-Komplexes

Es wurde der FA-DNPH-Komplex in EtOH gelöst und dabei folgende Verdünnungsreihe erstellt: 0,5 %, 0,25 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,0025 % und 0,001 % FA-DNPH. Die Proben wurden in GC-Gläschen pipettiert und im Splitverfahren 1: 30 und im Splitverfahren 1:10 mittels GC-MS gemessen.

5.2.6 Auswahl eines internen Standards

Es sollte ein interner Standard verwendet werden, der dem nachzuweisenden FA in chemischer Struktur und Reaktionsverhalten ähnlich ist. Zur Auswahl standen ¹³C-FA und d-FA. Damit es zu keinem Austausch von Protonen zwischen d-FA und dem Lösungsmittel kommt, wurden auch deuterierte Lösungsmittel verwendet (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Untersuchte interne Standards

13C-FA	in H ₂ O	1 % und 0,1 % 13C-FA-Lösung, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) (s. 5.2.6.1.1)
	in MeOH	13C-FA- und 12C-FA- Verdünnungsreihe im gleichen Verhältnis von 1 % - 0,001 %, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) (s. 5.2.6.1.2)
	In EtOH	0,1 % 13C-FA-Lösung sowie eine 0,1 % 13C-FA- und 12C-FA- Lösung im gleichen Verhältnis, 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) (s. 5.2.6.1.3)
Deuteriertes Formaldehyd	In d-EtOH	1 % und 0,1 % d-FA-Lösung sowie 1 % und 0,1 % d-FA- und 12C-FA- Lösung im gleichen Verhältnis 450 µl Probe mit 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) (s. 5.2.6.2.1)
		0,1% d-FA in ethanolische DNPH- Lösung (15,6 mM), damit 12C-FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % 12C-FA erstellt (s. 5.2.6.2.2)
	In Acetonitril	0,1 % d-FA in ethanolische DNPH-Lösung (15,6 mM) damit 12C-FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % 12C-FA erstellt (s. 5.2.6.2.3)
		0,1 % d-FA in ethanolische DNPH-Lösung (1,56 mM) mit 0,1 mg/ml Coffein damit 12C-FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % 12C-FA erstellt (s. 5.2.6.2.4)

5.2.6.1 13C-FA als interner Standard

13C-FA soll als interner Quantifizierungsstandard neben Coffein verwendet werden. Zuerst wurde eine 1 % 13-C-FA-Lösung hergestellt, mit DNPH (in 1 N HCl zu 15,6 mM verdünnt) derivatisiert und gemessen, um die Retentionszeit und das Fragmentmuster von 13C-markiertem FA zu analysieren. Dann wurde 13C-FA-Lösungen in Wasser, MeOH und EtOH hergestellt und mittels GC-MS gemessen:

5.2.6.1.1 *13C-FA in H₂O*

Es wurde eine 1 % und eine 0,1 % ¹³C-FA-Lösung in H₂O hergestellt und 450 µl jeder Proben mit 50 µl DNPH (in 1 N HCl zu 15,6 mM verdünnt) gemischt und gemessen.

5.2.6.1.2 *13C-FA in MeOH*

Es wurde eine Verdünnungsreihe von ¹³C-FA und ¹²C-FA im gleichen Verhältnis in MeOH hergestellt mit folgenden Verdünnungen: 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,001 %. Allen Proben wurde 50 µl DNPH, in 1 N HCl verdünnt, zugegeben und in der GC-MS gemessen.

5.2.6.1.3 *13C-FA in EtOH*

Es wurde ¹³C-FA gemeinsam mit ¹²C-FA in EtOH gelöst, so dass beide einen Endgehalt von 0,1 % in EtOH hatten. Diese Lösungen wurden zweimal angesetzt und mit DNPH (15,6 mM in 1 N HCl) derivatisiert. Beide Proben wurden mehrmals im Scan-Mode und im SIM-Mode in der GC-MS gemessen. Daneben wurde eine 0,1 % ¹³C- ¹²C-FA-Lösung in EtOH hergestellt, bei der DNPH bereits in EtOH gelöst war. Zudem wurde auch eine 0,1 % ¹²C-FA-Lösung in EtOH ohne ¹³C-FA hergestellt. Eine Probe der reinen ¹²C-FA-Lösung enthielt Coffein, die andere nicht. Bei diesen wurden DNPH am Ende wieder zugefügt. Auch diese Proben wurden im Scan-Mode und im SIM-Mode gemessen.

5.2.6.1.4 *Zugabe von 13C-FA zu Kompositen (Wiederfindung des internen Standards)*

Die Untersuchungen wurden mit dem unpolymersisierten Komposit Filtek™ Supreme XT durchgeführt. Dafür wurde 100 mg unpolymersisierte Filtek™ Supreme XT Paste in 1000 µl EtOH bzw. in 1000 µl MeOH gelöst. Als interner Standard wurde abwechselnd 0,1 % ¹³C-FA und 0,1 mg/ml Coffein verwendet. Die Proben wurden nach 12, 24 und 36 Stunden gemessen. Mit ¹³C-FA als interner Standard wurde zu dem entsprechenden Lösungsmittel 0,1 % ¹³C-FA gegeben. Mit Coffein als Standard wurde 0,1 mg/ml Coffein zu dem jeweiligen Lösungsmittel gegeben. 15,6 mM DNPH wurde ebenfalls zu beiden Lösungsmittel gegeben, bevor der unpolymersierte Komposit aufgelöst wurde. Das Mengenverhältnis von 1000 µl Lösungsmittel mit ¹³C-FA als Standard für 100 mg Komposit war dabei:

- 945 µl EtOH bzw. MeOH
- 5 µl 20 Gew% ¹³C-FA-Lösung
- 50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl verdünnt)

Mit Coffein als Standard war das Mengenverhältnis von 1000 µl Lösungsmittel:

-950 µl EtOH bzw. MeOH mit 0,1 mg/ml Coffein

-50 µl DNPH (15,6 mM in 1 N HCl verdünnt)

100 mg unpolymerisiertes Komposit wurde in Reaktionsgefäßen abgewogen und 1000 µl Lösungsmittel zugegeben. Das unpolymerisierte Komposit wurde unter Schütteln gelöst und 15 min inkubiert. Nach dem Lösen des unpolymersierten Komposits wurde die Suspension bei 1000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in GC-Gläschen pipettiert und in der GC-MS gemessen.

5.2.6.2 d-FA als interner Standard

5.2.6.2.1 d-FA als interner Standard, 15,6 mM DNPH in 1 N HCl verdünnt

d-FA mit einer Molekülmasse von 32 g/mol sollte für die Verwendung als interner Standard untersucht werden. Zuerst wurden d-FA-Proben derivatisiert und mittels GC-MS gemessen. Daraufhin wurden Lösungen mit FA und d-FA im gleichen Verhältnis untersucht. Zur Herstellung der Lösung wurden d-FA, welches in Wasser zu 20 Gew% gelöst erhältlich ist, verwendet und die wässrige 37 Gew% FA-Lösung.

Zuerst wurde eine 1 % d-FA-Lösung und eine 0,1 % d-FA-Lösung in deuteriertem EtOH (d-EtOH) hergestellt, sowie eine 1 % und 0,1 % ¹²C-FA-Lösung in EtOH. Für die Derivatisierung wurde wie bisher 450 µl jeder Probe mit 50 µl DNPH, das zu 15,6 mM in 1 N HCl verdünnt wurde, vermischt. Daneben wurden auch 2 % und 0,2 % FA-Lösungen (deuteriert und nicht deuteriert) hergestellt, um DNPH im gleichen Verhältnis zuzugeben: 250 µl Probe und 250 µl DNPH (zu 15,6 mM in 1 N HCl verdünnt) wurden vermischt, sodass ebenfalls 1 % und 0,1 % FA-Lösungen entstanden. Daneben wurde eine 1 % und 0,1 % FA-Lösung und eine 1 % und 0,1% d-FA-Lösung hergestellt, von denen 450 µl Probe mit nur 25 µl DNPH derivatisiert wurden.

Als letztes wurden FA und d-FA gemeinsam im Verhältnis 1:1 in d-EtOH gelöst. Es wurde eine 1 % FA- und d-FA-Lösung und eine 0,1 % FA- und d-FA-Lösung hergestellt. 450 µl dieser Proben wurden wieder mit 50 µl DNPH derivatisiert und mittels GC-MS gemessen.

5.2.6.2.2 15,6 mM DNPH in d-EtOH

Es wurde eine Verdünnungsreihe von FA in d-EtOH hergestellt, unter Zusatz von 0,1 % d-FA als interner Standard. Dafür wurde DNPH in einer Konzentration von 15,6 mM d-EtOH zugefügt und d-FA zu einer Konzentration von 0,1 % zugegeben. Mit dieser Lösung wurde

dann die Verdünnungsreihe von nicht deuteriertem FA erstellt mit folgenden Verdünnungen: 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,0025 und 0,001 % FA. Die Verdünnungsreihe wurde mittels GC-MS gemessen. Es wurden das Verhältnis zwischen der Größe der Flächenintegrale von m/z 210 und 212, der Mittelwert davon, sowie die Mittelwerte der Flächenintegrale von m/z 210, 212, 79 und 194 berechnet.

5.2.6.2.3 15,6 mM DNPH in Acetonitril

Es wurde die gleiche Verdünnungsreihe wie in d-EtOH erstellt, nur das DNPH zu 15,6 mM in Acetonitril gelöst wurde und mit dieser Acetonitril-Lösung die Verdünnungsreihe von FA aufgestellt wurde. Als interner Standard wurde d-FA mit 0,1 % verwendet. Die Verdünnungsreihe wurde wiederum dreimal angesetzt und in der GC-MS gemessen. Es wurden das Verhältnis der Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 212, der Mittelwert davon, sowie die Mittelwerte der Flächenintegrale von den Masseneinheiten 210, 212 und 79 berechnet.

5.2.6.2.4 1,56 mM DNPH in Acetonitril und Erstellen einer Kalibrierkurve

Es wurde die gleiche Verdünnungsreihe in dreifacher Ausführung von FA in Acetonitril wie oben hergestellt, mit d-FA als internen Standard und Coffein in einer Konzentration von 0,1 mg/ml als zweiter interner Standard. Die Konzentration von DNPH betrug 1,56 mM in Acetonitril.

Es wurden die Flächenintegrale der Massen 210, 212, 79 und 194 in jeder Konzentration mittels der Software Xcalibur berechnet. Von diesen wurde der Mittelwert berechnet sowie das Verhältnis zwischen dem Flächenintegral der Masse 210 und dem der Masse 212. Von dem Verhältnis 210/212 wurde aus den drei Messungen ebenfalls der Mittelwert gebildet. Anhand dieses Mittelwertes wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt.

Daneben wurden vier 0,1 % d-FA-Lösungen in Acetonitril hergestellt ohne 12C-FA. Die vier Proben wurden in der GC-MS gemessen und die Flächenintegrale der Massen 210, 212, 79 und 194 berechnet. Es wurde das Flächenintegral von m/z 210, welches der Molekülpeak von nicht deuteriertem FA-DNPH-Komplex darstellt, mit berechnet, um die natürliche Isotopenverteilung abschätzen zu können.

5.2.7 Analytik von Zahnkompositen mittels GC-MS

Für den Nachweis von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS wurden folgenden Komposite verwendet: Filtek™ Silorane, Filtek™ Supreme XT, N'Durance® Flow, N'Durance® Norm,

Tetric EvoCeram®, Tetric EvoFlow® und Voco Grandio Flow®. Für jeden Komposit wurde der FA-Nachweis im unpolymerisierten Komposit und im Eluat des polymerisierten Komposits (nach Härten durch UV-Licht) mittels GC-MS durchgeführt. Alle Proben wurden dreimal angesetzt und alle Messungen dreimal wiederholt. Als interner Standard waren sowohl 0,1 mg/ml Coffein als auch 0,1 % d-FA zugefügt.

Für alle Probenansätze wurden eine 0,1 mg/ml CF-Lösung in Acetonitril hergestellt. Dieser Lösung wurde zur Herstellung einer 0,1 % d-FA-Acetonitril-Lösung 19,9 ml mit 100 µl der d-FA-Lösung (20 Gew%) gemischt. Für die Derivatisierung von FA wurde zu dieser Lösung (20 ml) 156 µl DNPH-Lösung (0,2 M in H₃PO₄) zugegeben, entsprechend einer DNPH-Konzentration von 1,56 mM in der Lösung. In dieser Ausgangslösung wurden die unpolymersisierten Komposite gelöst und die polymerisierten Komposite eluiert.

5.2.7.1.1 FA-Nachweis in unpolymerisierten Kompositen

100 mg Paste wurden im Reaktionsgefäß abgewogen und mit 1000 µl Acetonitril-Lösung (mit 0,1 mg/ml Coffein, 0,1 % d-FA und 1,56 mM DNPH) unter Schütteln suspendiert. Sobald die Paste suspendiert war, wurden die Proben zentrifugiert. Der Überstand wurde in GC-Gläschen gefüllt. Anschließend wurden die Proben mittels GC-MS gemessen. Von jedem unpolymerisiertem Komposit wurden drei Proben angefertigt.

5.2.7.1.2 FA-Nachweis im Eluat polymerisierter Komposite

Von jedem Komposit wurden 100 mg Prüfkörper (0,79 cm² Oberfläche) entsprechend den Herstellerangaben angefertigt. Die polymerisierten Kunststoffe wurden in ein GC-Gläschen gegeben und mit 1000 µl Acetonitril-Lösung überschichtet. Die Acetonitril-Lösung war die gleiche Ausgangslösung wie bei den unpolymerisierten Kompositen und enthielt 0,1 mg/ml Coffein, 0,1 % d-FA und 1,56 mM DNPH. Von jedem polymerisierten Komposit wurden drei Proben angefertigt und direkt im Anschluß mittels GC-MS gemessen. Die Eluate wurden nach Herstellung, sowie sieben und neun Wochen nach Herstellung mittels GC-MS gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Xcalibur.

6 Ergebnisse

6.1 γ -H2AX-Test

Durch die Immunfluoreszenzfärbung wurden DNA-DSB im Zellkern als rote fluoreszierende Foci erkenntlich gemacht. Dies war durch die Verwendung des γ -H2AX-spezifischen Antikörpers bedingt. Der Zellkern wurde durch die Kernfärbung mit Cybrgreen grün fluoreszierend dargestellt. Die mikroskopische Auswertung ergab, dass die Größe der Foci und die Intensität der fluoreszierenden Foci stark variierten.

6.1.1 γ -H2AX-Test mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere

6.1.1.1 H_2O_2 (= Positivkontrolle)

H_2O_2 induzierte im γ -H2AX-Test eine durchschnittliche Foci-Anzahl mit 16,15 Foci/Zelle (+/- 3,6). Im Vergleich zur Negativkontrolle ist die durchschnittliche Anzahl an Foci/Zelle mit einem p-Wert von 0,002 signifikant ($p < 0,05$) erhöht. H_2O_2 induzierte eine rund 10-fach höhere Foci-Anzahl als Medium. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden betrug in der Positivkontrolle 8,86 %.

In der Auswertung der Positivkontrolle ohne 1. AK waren keine Foci zu sehen (s. Abbildung 13)

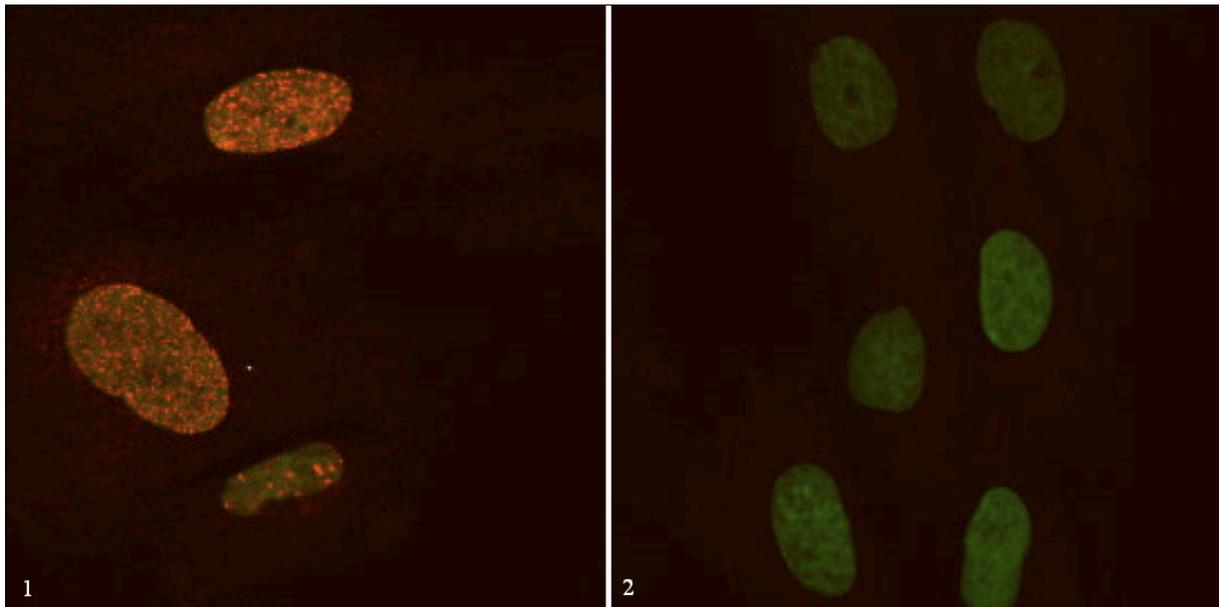


Abbildung 13: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Bild 1 zeigt die induzierten Foci im Zellkern der HGF nach 10 minütiger Exposition mit 1 mM H_2O_2 . Bild 2 zeigt ebenfalls die Zellkerne der HGF nach 10 minütiger Exposition mit 1 mM H_2O_2 , wobei während des γ -H2AX-Testes in diesem Fall der primäre Antikörper weggelassen wurde. Es sind keine Foci zu sehen. Dies zeigt dass der sekundäre fluoreszierende Antikörper spezifisch an den primären Antikörper bindet.

6.1.1.2 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle mit Medium konnte im γ -H2AX Test Foci bei den HGF induzieren (s. Abbildung 14). Durchschnittlich wurden 1,62 Foci/Zelle (\pm 0,67) bei der Auswertung der Negativkontrolle gezählt.

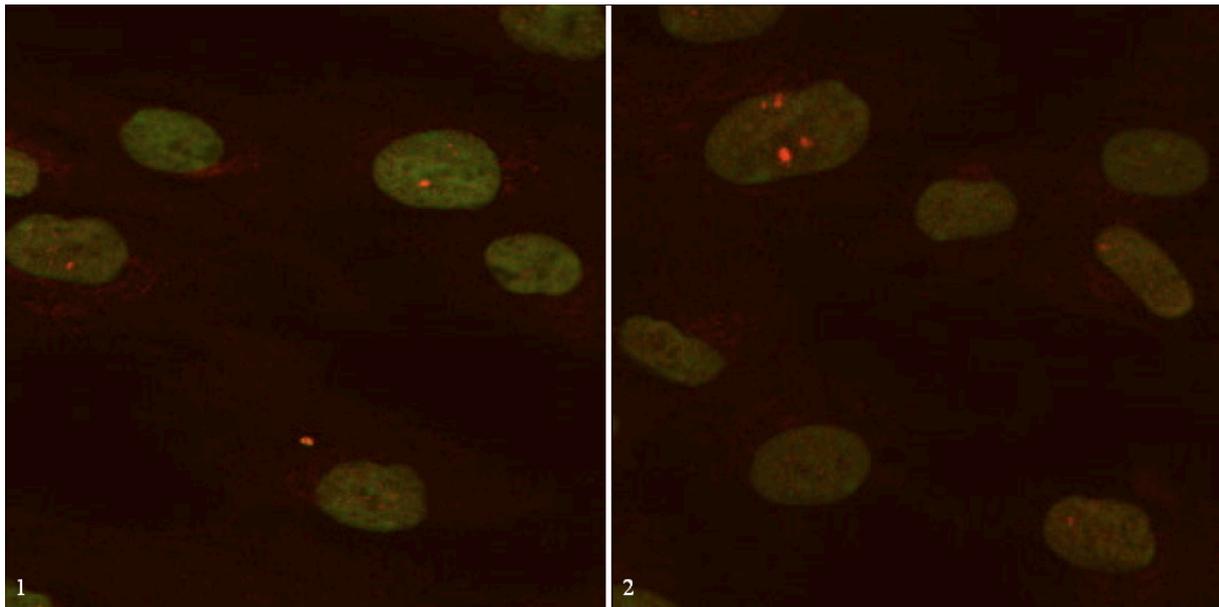


Abbildung 14: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Bild 1 und 2 zeigen die induzierten Foci im Zellkern der HGF nach 6 h Exposition mit Medium als Negativkontrolle.

6.1.1.3 Asc

Die Auswertung des γ -H2AX-Testes ergab, dass Asc in allen vier Konzentrationen (500 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M) Foci bei den Zellen induzierte. Die durchschnittliche Anzahl der induzierten Foci/Zelle ist in Tabelle 7 gezeigt:

Tabelle 7: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit Ascorbinsäure (Asc) bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

Asc (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
500	4,92 \pm 1,28	0,02	3,83
200	2,10 \pm 0,34	0,33	1,09
100	1,35 \pm 1,58	0,8	0,76
50	0,94 \pm 0,53	0,24	0
0	1,62 \pm 0,67	-	0
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	16,15 \pm 3,6	0,002	8,86

Asc in den Konzentrationen 200 μM , 100 μM und 50 μM induzierten keine signifikante unterschiedliche Anzahl an Foci/Zelle ($p < 0,05$), im Vergleich zur Negativkontrolle. Asc in der Konzentration von 500 μM bewirkte mit durchschnittlich 4,92 Foci/Zelle eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. 500 μM Asc induzierte damit eine ca. dreifach höhere Anzahl an Foci als die Negativkontrolle (s. Tabelle 7). Bei Asc in den Konzentrationen von 500 μM und 200 μM war auch der prozentuale Anteil an „multi-damage“-Zellen erhöht.

Abbildung 15 zeigt die induzierten Foci in HGF durch die vier verschiedenen Asc-Konzentrationen.

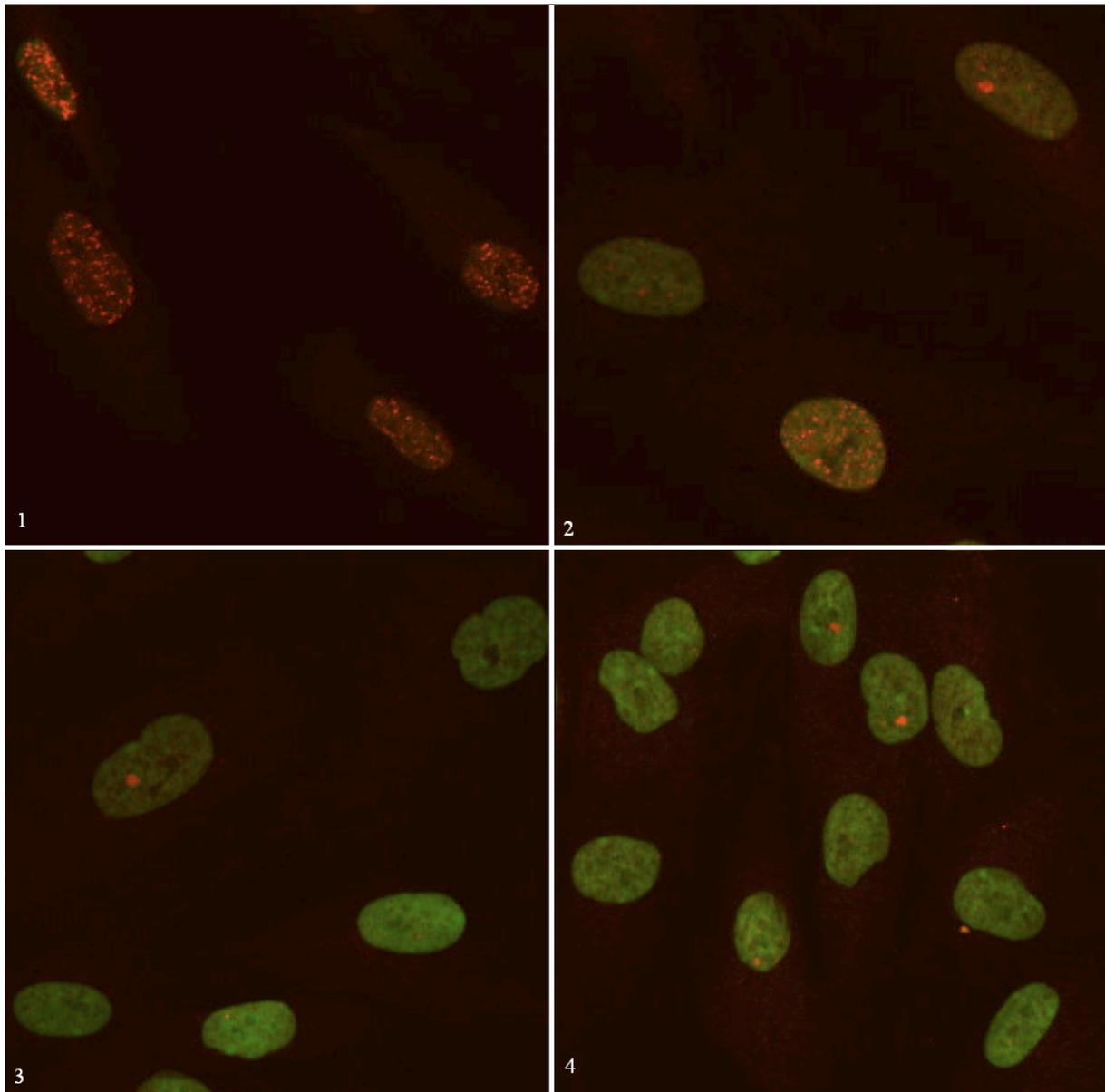


Abbildung 15: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Bild 1 zeigt die induzierten Foci im Zellkern der HGF nach 6 h Exposition mit 500 μ M Asc. Bild 2 zeigt die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 200 μ M Asc. Bild 3 zeigt die Foci nach 6 h Exposition mit 100 μ M Asc und Bild 4 mit 50 μ M Asc.

6.1.1.4 ACC

ACC zeigte bei allen Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in der Anzahl der induzierten Foci/Zelle (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit N-Acetylcystein (ACC) bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

ACC (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
500	2,17 \pm 1,14	0,51	0,75
200	1,3 \pm 1,16	0,70	0
100	1,52 \pm 0,9	0,89	0
50	1,47 \pm 0,88	0,82	0
0	1,62 \pm 0,67	-	0
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	16,15 \pm 3,6	0,002	8,86

In Abbildung 16 sind die Foci im Zellkern der HGF, die durch ACC in den Konzentrationen 500 μ M und 100 μ M induziert wurden, dargestellt.

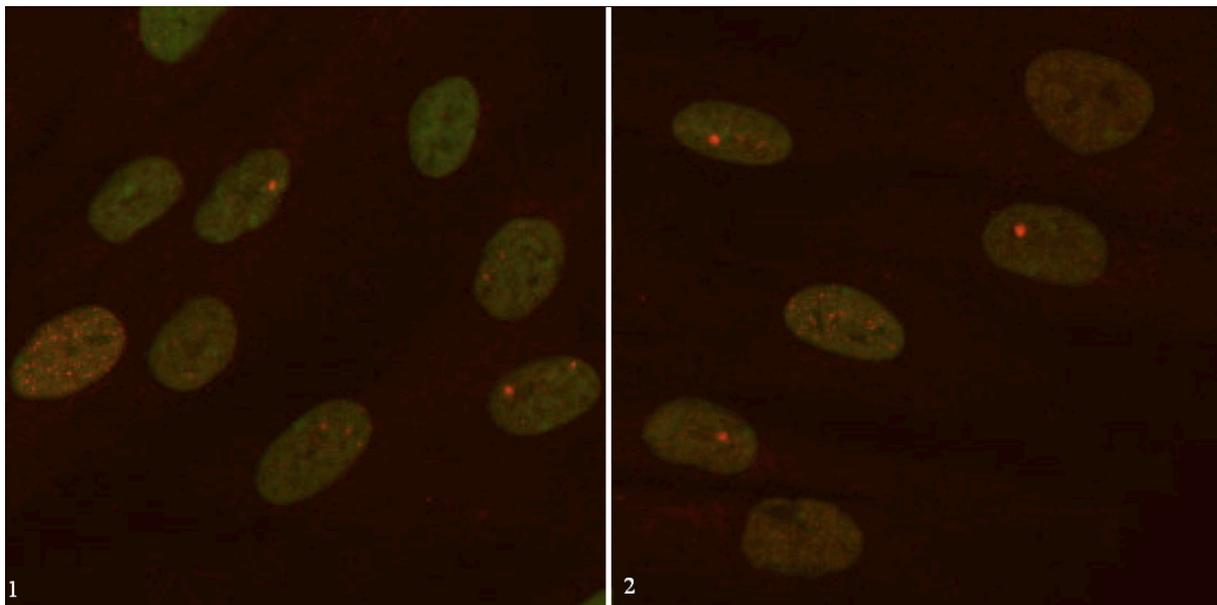


Abbildung 16: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit ACC. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Als Beispiel sind in Bild 1 die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 500 μ M ACC gezeigt und in Bild 2 mit 100 μ M ACC.

6.1.1.5 Trolox

Die Auswertung ergab, dass Trolox in allen vier Konzentrationen (500 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM) im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test keine signifikant ($p < 0,05$) höhere Anzahl an Foci/Zelle im Vergleich zur Negativkontrolle induzierte (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD ($n=3$) nach 6 h Exposition der HGF mit Trolox bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD ($n=3$) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

Trolox (μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
500	1,13 \pm 0,5	0,37	0
200	0,81 \pm 0,43	0,15	0
100	1,38 \pm 0,65	0,68	0
50	1,4 \pm 1,03	0,77	0,41
0	1,62 \pm 0,67	-	0
H ₂ O ₂ (1000 μM)	16,15 \pm 3,6	0,002	8,86

Abbildung 17 zeigt die durch Trolox bei 500 μM und 200 μM induzierten Foci im Zellkern von HGF.

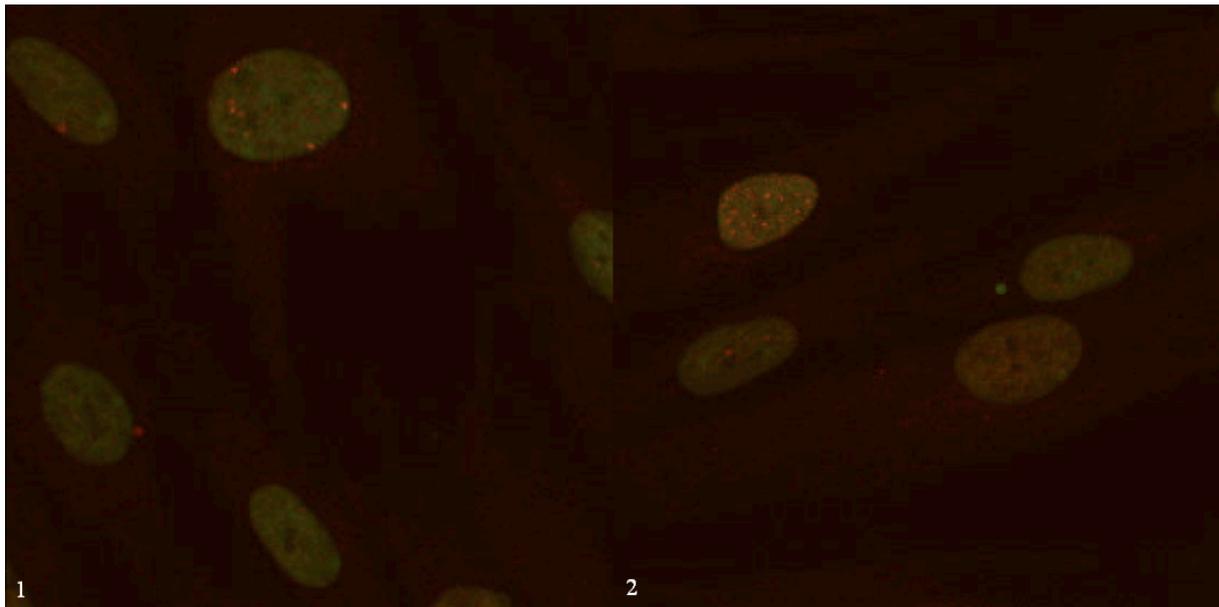


Abbildung 17: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit Trolox. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Als Beispiel sind in Bild 1 die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 500 μ M Trolox gezeigt und in Bild 2 mit 200 μ M Trolox.

6.1.1.6 Retinylacetat

Keine der vier Retinylacetat-Konzentrationen weist im Student's *t*-Test ($p < 0,05$) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in der Anzahl induzierter Foci zur Negativkontrolle auf (s. Tabelle 10).

In der mikroskopischen Auswertung zeigte sich, dass sich bei 500 μ M Retinylacetat über 99 % der Zellen und bei 200 μ M Retinylacetat über 90 % der Zellen während des γ -H2AX-Tets vom Deckglas ablöst hatten. In der ersten Versuchsreihe von 500 μ M Retinylacetat konnten aufgrund des hohen Zellverlustes nur acht Zellen ausgezählt werden. Deshalb wurde diese nicht in die Auswertung mit einbezogen. Hätte man diese ins Ergebnis einbezogen, wäre die durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle $6,01 \pm 8,07$ und der durchschnittliche prozentuale Anteil an Multi-Damage-Zellen läge bei 11,11%. Auch unter Einbeziehung des Ergebnisses induziert 500 μ M Retinylacetat keine signifikante ($p < 0,05$) unterschiedliche Anzahl an Foci/Zelle, im Vergleich zur Negativkontrolle.

Tabelle 10: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit Retinylacetat bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

Retinylacetat (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
500	1,36 \pm 0,38	0,66	0
200	1,98 \pm 1,65	0,74	0,81
100	1,24 \pm 0,19	0,39	0
50	0,61 \pm 0,16	0,06	0
0	1,62 \pm 0,67	-	0
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	16,15 \pm 3,6	0,002	8,86

In nachfolgender Abbildung 18 sind HGF nach Exposition mit Retinylacetat abgebildet. Zu sehen sind die rot-fluoreszierenden Foci im Zellkern, die durch 500 μ M und 200 μ M Retinylacetat induziert wurden.

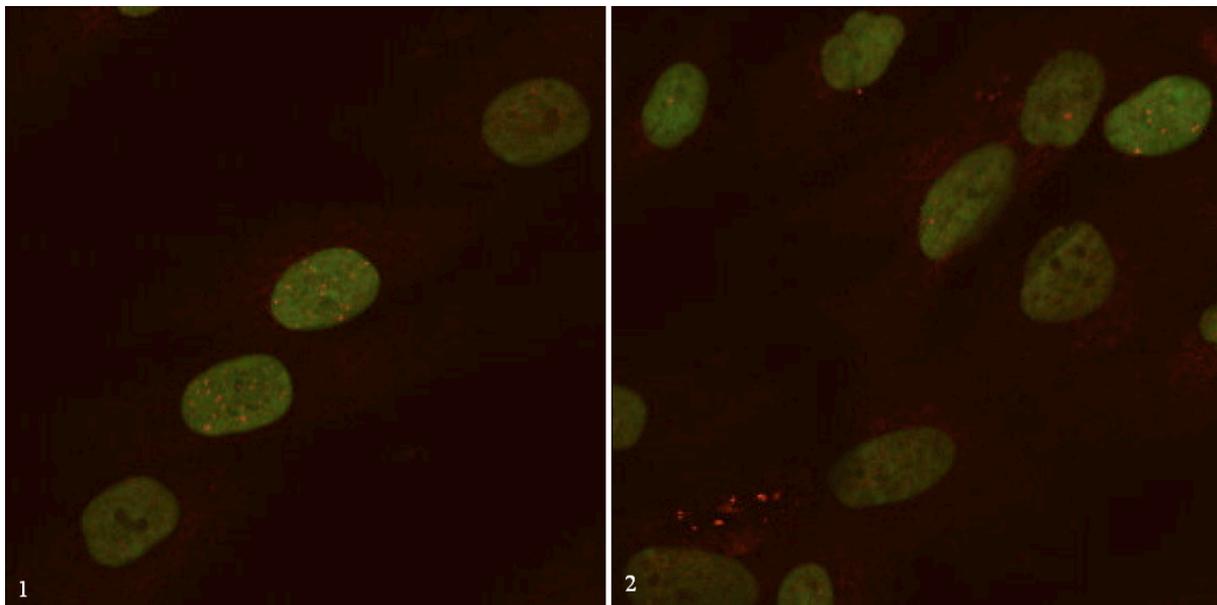


Abbildung 18: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit Retinylacetat. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Als Beispiel sind in Bild 1 die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 500 μ M Vit A gezeigt und in Bild 2 mit 200 μ M Vit A.

6.1.1.7 Katalase

Alle vier Katalase-Konzentrationen liegen unterhalb der durchschnittlich induzierten Anzahl an Foci/Zelle der Negativkontrolle mit 1,62 Foci/Zelle. Es besteht bei allen Konzentrationen der Katalase kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der durchschnittlich induzierten Foci-Zahl zur Negativkontrolle (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit Katalase bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

Katalase ($\mu\text{g/ml}$)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
10	1,59 \pm 0,97	0,97	0,74
5	0,91 \pm 0,87	0,32	0
1	0,77 \pm 0,19	0,1	0,31
0,5	0,89 \pm 0,82	0,3	0,39
0	1,62 \pm 0,67	-	0
H ₂ O ₂ (1000 μM)	16,15 \pm 3,6	0,002	8,86

Abbildung 19 zeigt die durch 10 $\mu\text{g/ml}$ Katalase bzw. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Katalase induzierten Foci in HGF. Es ist zu erkennen, dass beide Katalase-Konzentrationen nur sehr wenige Foci/Zelle induzieren.

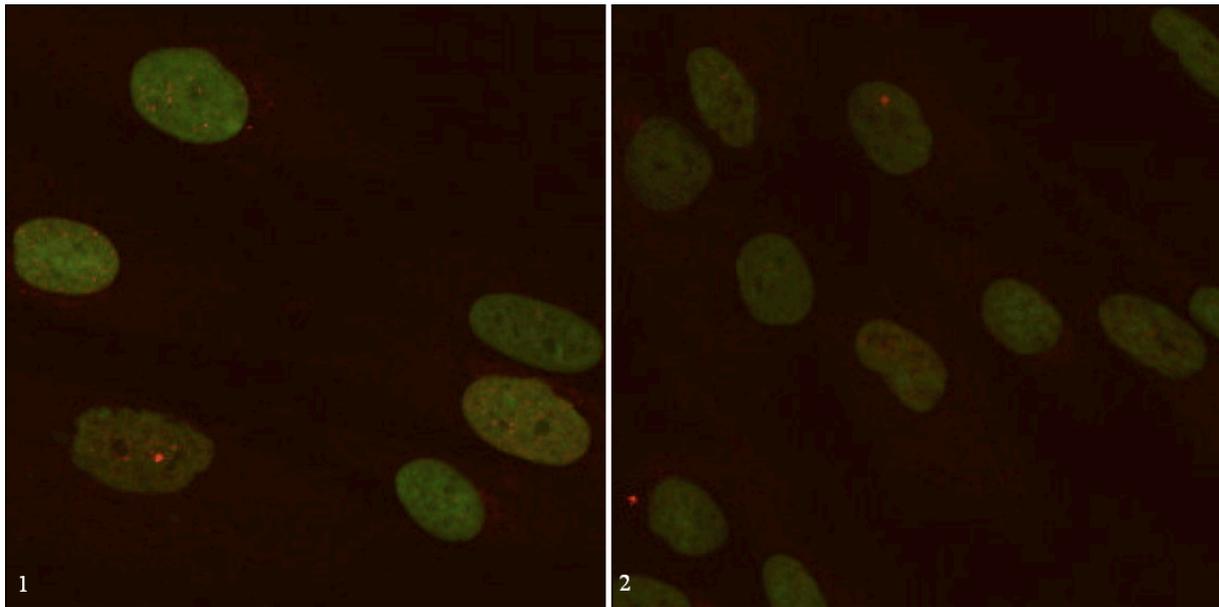


Abbildung 19: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit Katalase. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Als Beispiel sind in Bild 1 die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 10 μ g/ml Katalase gezeigt und in Bild 2 mit 0,5 μ g/ml Katalase.

6.1.1.8 Vergleich der Antioxidantien in Bezug auf ihr Foci-induzierendes-Potential

Die Auswertung ergab, dass die fünf untersuchten Antioxidantien (Asc, ACC, Retinylacetat, Trolox und Katalase) in allen verwendeten Konzentrationen nicht vermehrt Foci im γ -H2AX-Test bei HGF induzierten als die Negativkontrolle mit Ausnahme von 500 μ M Asc. Alle fünf Antioxidantien unterscheiden sich demnach in ihrem Foci-induzierendem-Potential nicht signifikant ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle. Einzige Ausnahme stellt 500 μ M Asc dar. Mit durchschnittlich 4,92 Foci/Zelle induzierte 500 μ M Asc signifikant ($p < 0,05$) eine ca. dreifach höhere Anzahl an Foci als das Medium.

6.1.1.9 Festlegung der Antioxidantien-Konzentrationen für die Kombination mit (Ko)Monomeren

Die durchschnittliche Anzahl an Foci, die durch die Antioxidantien induziert wurden, sollte nicht höher liegen als bei der Negativkontrolle. Anhand der oben aufgeführten Ergebnisse wurde durch Vergleich der durchschnittlich induzierten Anzahl an Foci, unter Berücksichtigung der Zellen mit multiplen Schäden und unter Berücksichtigung des

Zellverlustes folgende Konzentrationen der einzelnen Antioxidantien für die Zugabe zu (Ko)monomeren ausgewählt:

- Asc: 100 μM
- ACC: 500 μM
- Retinylacetat: 100 μM
- Trolox: 500 μM
- Katalase 10 $\mu\text{g/ml}$

6.1.2 γ -H2AX-Test mit den (Ko)Monomeren allein und in Kombination mit Asc und ACC

6.1.2.1 H_2O_2 (= Positivkontrolle)

H_2O_2 induzierte im γ -H2AX-Test eine durchschnittliche Anzahl von 23,25 (+/- 1,73) Foci/Zelle. Im Vergleich zur Negativkontrolle ist die durchschnittliche Anzahl an Foci/Zelle mit einem p-Wert von $3,8 \times 10^{-11}$ signifikant ($p < 0,05$) erhöht. H_2O_2 induzierte eine 17-fach höhere Anzahl an Foci/Zelle als Medium. Der durchschnittliche prozentuale Anteil an „multi-damage“ Zellen lag dabei bei 28,6 %.

In der Auswertung der Positivkontrolle ohne 1. AK waren keine Foci zu sehen.

6.1.2.2 Medium (= Negativkontrolle)

Die Auswertung ergab, dass bei alleiniger Inkubation mit Medium eine durchschnittliche Anzahl von 1,39 (+/- 0,4) Foci/Zelle vorlag. Der durchschnittliche prozentuale Anteil an „multi-damage“ Zellen lag dabei bei 0,35 %.

6.1.2.3 Asc

100 μM Asc induzierte im γ -H2AX-Test eine durchschnittliche Anzahl von 1,59 Foci (+/- 0,59) und führte damit zu keiner signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) an DNA-DSB, im Vergleich zur Negativkontrolle. Der durchschnittliche prozentuale Anteil an „multi-damage“ Zellen lag dabei bei 0,18 %.

6.1.2.4 ACC

ACC bei einer Konzentration von 500 μM induzierte eine durchschnittlich Anzahl von 1,12 Foci (+/- 0,24). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Foci-Zahl lag nicht zur Negativkontrolle vor.

6.1.2.5 BisGMA

Die mikroskopische Auswertung des $\gamma\text{-H2AX}$ -Testes ergab, dass 90 μM BisGMA eine signifikante ($p < 0,05$) höhere Anzahl an Foci/Zelle induzierte als die Negativkontrolle. Die durchschnittlich induzierte Anzahl an Foci/Zelle durch 90 μM BisGMA war 2,9-fach höher als die der Negativkontrolle. Die durchschnittliche Anzahl an Foci/Zelle, die durch 30 μM BisGMA und durch 9 μM BisGMA induziert wurde, war ca. zweifach erniedrigt zu der induzierten Foci-Zahl von 90 μM BisGMA und unterschied sich nicht signifikant ($p < 0,05$) von der Negativkontrolle (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit BisGMA bei verschiedenen Konzentrationen. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist, der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

BisGMA (μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
90	4,05 \pm 0,56	$7,2 \times 10^{-5}$	0
30	2,12 \pm 0,54	0,05	0
9	2,13 \pm 0,98	0,14	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	$3,8 \times 10^{-11}$	28,6

6.1.2.6 BisGMA in Kombination mit Asc

100 μM Asc reduzierte die durchschnittliche Anzahl an Foci von 90 μM BisGMA von 4,05 (+/- 0,56) auf 1,96 Foci (+/- 0,56), bei 30 μM BisGMA von 2,12 Foci (+/- 0,54) auf 1,77 Foci (+/- 0,86) und bei 9 μM BisGMA von 2,13 Foci (+/- 0,98) auf 1,32 Foci (+/- 0,68). In der statistischen Auswertung reduzierte Asc signifikant ($p < 0,05$) nur die durchschnittliche Anzahl an Foci, die von 90 μM BisGMA induziert wurden. Es bestand kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu 30 μM BisGMA und 9 μM BisGMA (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Durchschnittlich induzierte Anzahl (n=3) der Foci/Zelle \pm SD nach 6 h Exposition der HGF mit BisGMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 100 μ M Asc. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben

BisGMA (μ M) mit Asc (100 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
90	1,96 \pm 0,59	0,01	0
30	1,77 \pm 0,86	0,59	0
9	1,32 \pm 0,68	0,31	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.7 BisGMA in Kombination mit ACC

ACC reduzierte bei 90 μ M BisGMA die Foci-Zahl von 4,05 Foci auf 1,92 Foci (s. Tabelle 14 und Tabelle 15), bei 30 μ M BisGMA von 2,12 Foci (+/- 0,54) auf 1,24 Foci (+/- 0,51) und bei 9 μ M BisGMA von 2,13 Foci (+/- 0,98) auf 1,98 Foci (+/- 0,31). In der statistischen Auswertung reduzierte ACC signifikant ($p < 0,05$) die durchschnittliche Anzahl an Foci, die von 90 μ M BisGMA induziert wurden. Es bestand kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu 30 μ M BisGMA und 9 μ M BisGMA (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit BisGMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μ M ACC. Sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben

BisGMA (μ M) mit ACC (500 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
90	1,92 \pm 0,14	0,003	0
30	1,24 \pm 0,51	0,11	0
9	0,98 \pm 0,31	0,13	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

Abbildung 20 zeigt die induzierten Foci im Zellkern von HGF nach einer sechststündigen Exposition mit 90 μ M BisGMA 90 μ M ohne Zugabe eines Antioxidans (Abbildung 20, Bild 1

und 2) sowie mit Zugabe von 100 μM Asc (Abbildung 20, Bild 3) und mit Zugabe von 500 μM ACC (Abbildung 20, Bild 4).

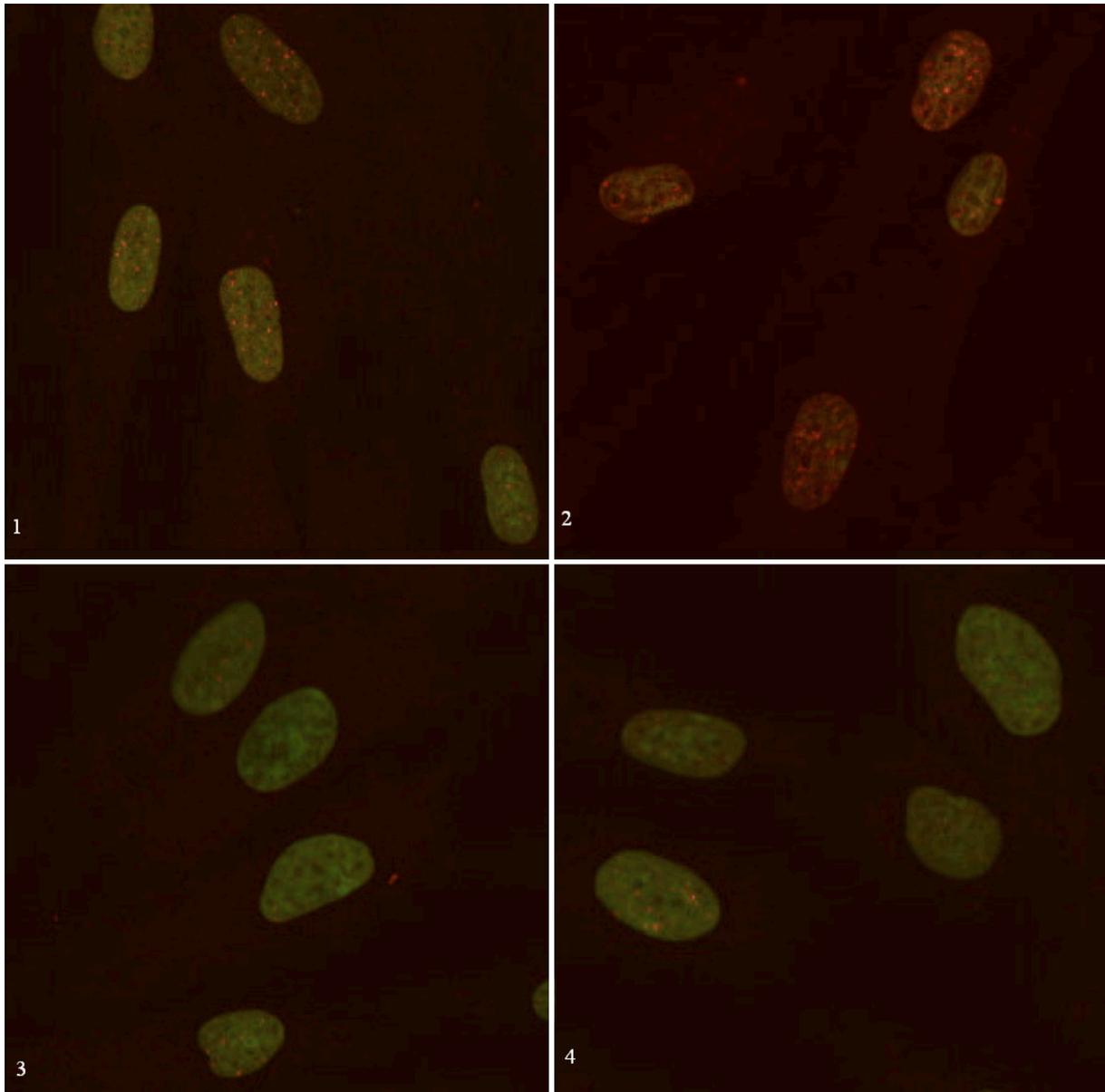


Abbildung 20: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit BisGMA alleine, mit Kombination BisGMA/Asc und BisGMA/ACC. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Bild 1 und 2 zeigen die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 90 μM BisGMA, Bild 3 zeigt die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 90 μM BisGMA und 100 μM Asc und Bild 4 mit 90 μM BisGMA und 500 μM ACC.

6.1.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse von BisGMA

Die höchste BisGMA-Konzentration von 90 μM führte im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der DNA-DSB im Vergleich zur Negativkontrolle. Asc und ACC konnten signifikant ($p < 0,05$) die Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch 90 μM BisGMA reduzieren. BisGMA in den Konzentrationen von 30 μM und 9 μM führte zu keiner deutlichen Erhöhung der Foci-Zahl und in diesem Fall konnten 100 μM Asc und 500 μM ACC die induzierten Foci nicht signifikant ($p < 0,05$) erniedrigen. In Tabelle 15 ist die durchschnittliche Foci-Zahl der drei verwendeten BisGMA-Konzentrationen (90, 30, 9 μM) ohne und mit Zugabe von 100 μM Asc bzw. 500 μM ACC tabellarisch aufgeführt und in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

Tabelle 15: Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD ($n=3$), die nach 6h Exposition durch BisGMA in drei Konzentrationen alleine und in Kombination mit 100 μM Asc bzw. mit 500 μM ACC induziert wurde, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD ($n=6$) der Negativ-und Positivkontrollen.

BisGMA (μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle		
	Ohne Antioxidans	Mit Asc (100 μM)	Mit ACC (500 μM)
90	4,05 \pm 0,56	1,96 \pm 0,59	1,92 \pm 0,14
30	2,12 \pm 0,54	1,77 \pm 0,86	1,24 \pm 0,51
9	2,13 \pm 0,98	1,32 \pm 0,68	0,98 \pm 0,31
0	1,39 \pm 0,4	1,59 \pm 0,59	1,12 \pm 0,24
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73

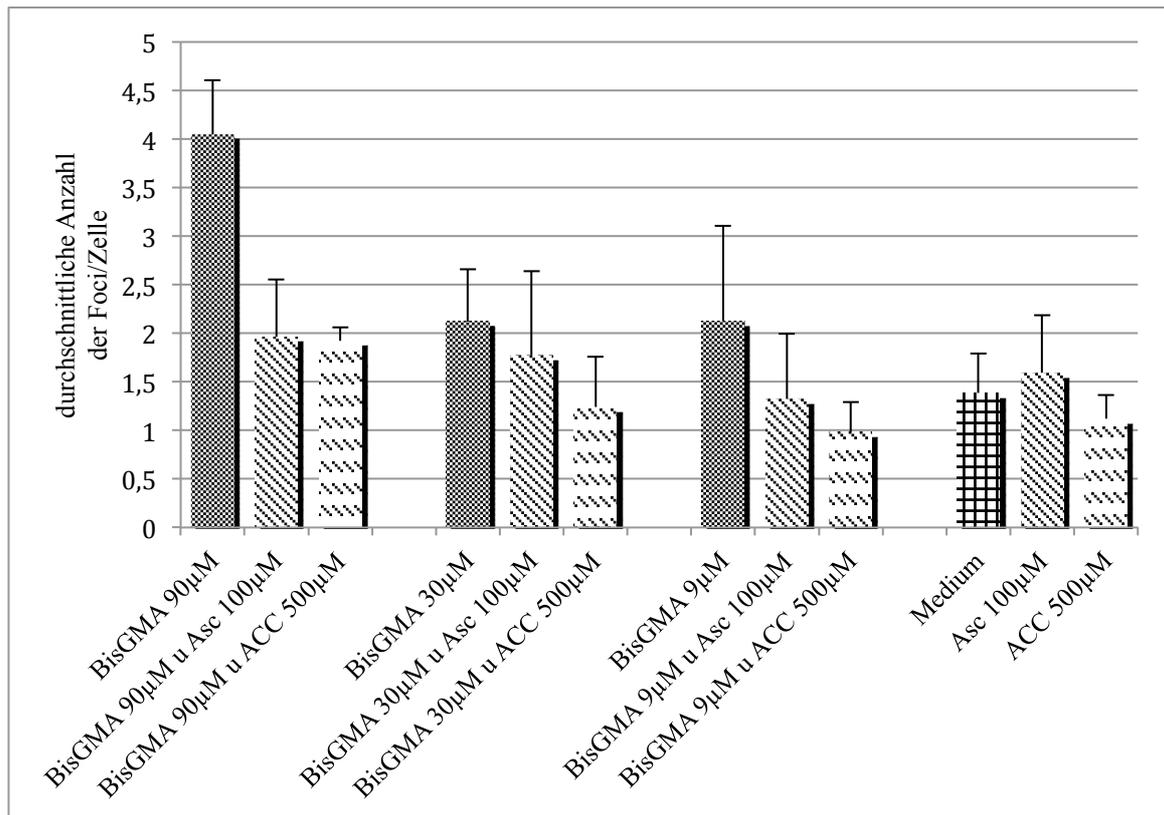


Abbildung 21: Durchschnittliche Anzahl induzierter Foci nach 6 h Exposition der HGF mit BisGMA, BisGMA mit 100 µM Asc und BisGMA mit 500 µM ACC, daneben auch die Anzahl induzierter Foci von Medium als Negativkontrolle, sowie von 100 µM Asc und 500 µM ACC in Medium gelöst.

6.1.2.9 UDMA

100 µM UDMA induzierte mit 2,50 Foci (+/- 0,37) die höchste Anzahl an Foci/Zelle (s. Tabelle 16). UDMA in den Konzentrationen von 100 µM und 33,5 µM induzierten eine signifikante ($p < 0,05$) höhere Anzahl an Foci/Zelle als die Negativkontrolle. 100 µM UDMA bewirkte eine 1,8-fache Erhöhung, 33,5 µM UDMA eine 1,6-fache Erhöhung der Anzahl an Foci gegenüber der Negativkontrolle. In der niedrigsten Konzentration von 100 µM führte UDMA zu keiner signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der DNA-DSB in HGF.

Tabelle 16: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit UDMA bei verschiedenen Konzentrationen, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

UDMA (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
100	2,5 \pm 0,37	0,005	0
33,5	2,21 \pm 0,38	0,02	0
0,01	1,56 \pm 0,7	0,64	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.10 UDMA und Asc

100 μ M Asc konnte bei allen drei UDMA-Konzentrationen die durchschnittliche Anzahl an Foci reduzieren (s. Tabelle 17 und Tabelle 18): bei 100 μ M UDMA von 2,5 Foci (+/- 0,37) auf 1,64 Foci (+/- 0,25), bei 33,5 μ M UDMA von 2,21 Foci (+/- 0,38) auf 1,39 Foci (+/- 0,58) und bei 10 μ M UDMA von 1,56 Foci (+/- 0,7) auf 1,34 Foci (+/- 0,66). Eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Foci-Anzahl war bei der Kombination von Asc mit 100 μ M UDMA gegeben. Die Kombination von Asc mit 33,5 μ M UDMA und mit 10 μ M UDMA führte zu keiner signifikanten ($p < 0,05$) unterschiedlichen Anzahl an Foci/Zelle im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit UDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 100 μ M Asc, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

UDMA (μ M) mit Asc (100 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
100	1,64 \pm 0,25	0,03	0
33,5	1,39 \pm 0,58	0,11	0
10	1,34 \pm 0,66	0,72	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.11 UDMA in Kombination mit ACC

500 μM ACC konnte bei allen drei UDMA-Konzentrationen die durchschnittliche Anzahl an Foci reduzieren: bei 100 μM UDMA von 2,5 Foci (+/- 0,37) auf 1,64 Foci (+/- 0,25), bei 33,5 μM UDMA von 2,21 Foci (+/- 0,38) auf 1,39 Foci (+/- 0,58) und bei 10 μM UDMA von 1,56 Foci (+/- 0,7) auf 1,34 Foci (+/- 0,66). Eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Foci-Anzahl war bei der Kombination von ACC mit 100 μM UDMA gegeben und bei der Kombination von ACC mit 33,5 μM UDMA. Die Anzahl an Foci, die durch 10 μM UDMA induziert wurde, wurden durch 500 μM ACC nicht signifikant ($p < 0,05$) reduziert (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit UDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μM ACC, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben

UDMA (μM) mit ACC (500 μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
100	1,31 \pm 0,4	0,02	0
33,5	1,16 \pm 0,11	0,01	0
10	0,69 \pm 0,11	0,1	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

In Abbildung 22 sind die Foci im Zellkern von HGF nach einer sechststündigen Exposition mit 100 μM UDMA ohne Zugabe eines Antioxidans (Abbildung 22, Bild 1 und 2) sowie mit Zugabe von 100 μM Asc (Abbildung 22, Bild 3) und mit Zugabe von 500 μM ACC (Abbildung 22, Bild 4) dargestellt.

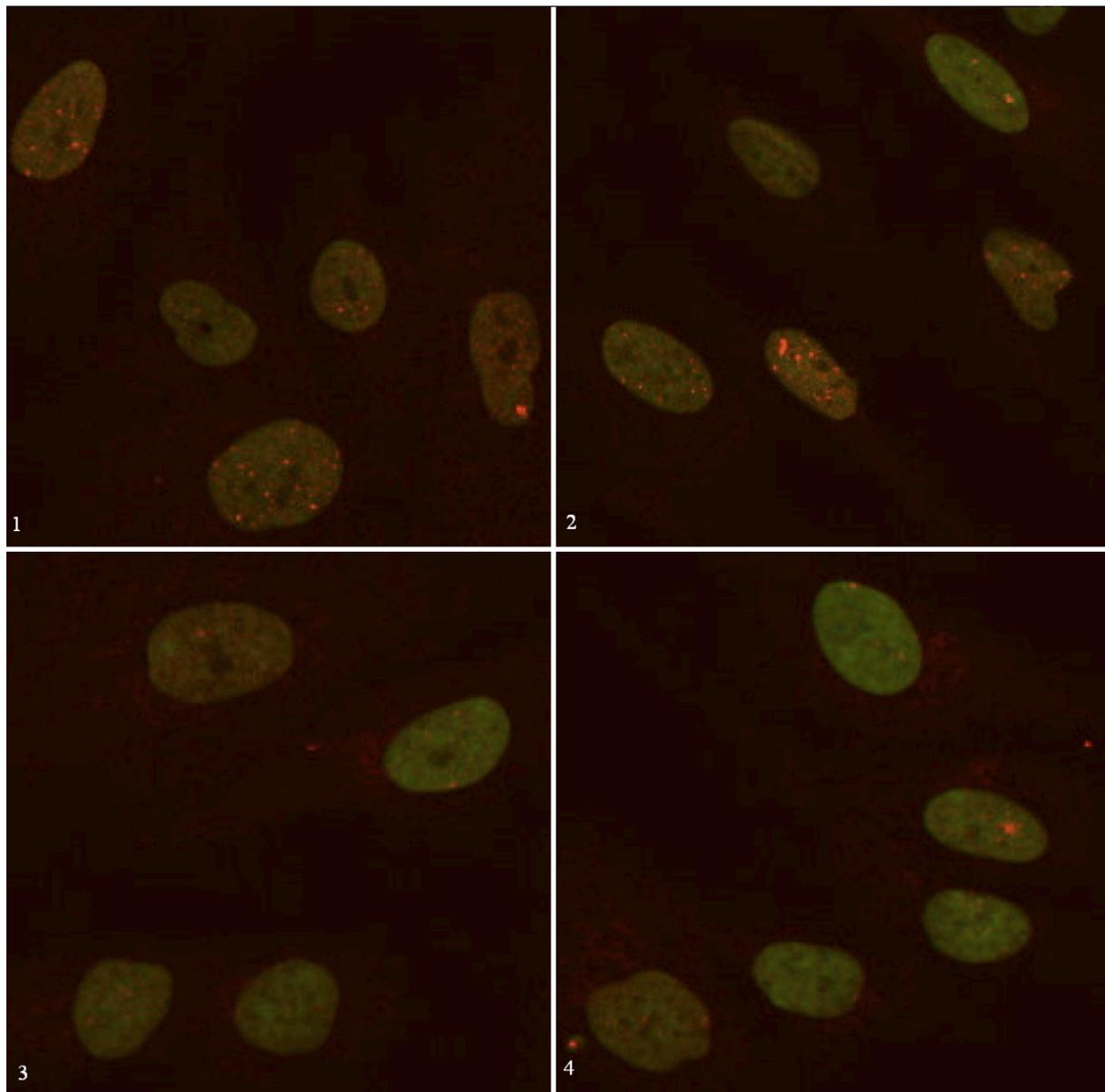


Abbildung 22: Darstellung der γ -H2AX-Foci im Zellkern von HGF nach 6 h Exposition mit UDMA alleine, mit UDMA/Asc in Kombination und mit UDMA/ACC. Die Zellkerne sind durch den Kernfarbstoff grün fluoreszierend dargestellt, die Foci sind aufgrund des sekundären Antikörpers rot fluoreszierend dargestellt. Bild 1 und 2 zeigen die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit UDMA bei 100 μ M, Bild 3 zeigt die induzierten Foci nach 6 h Exposition mit 100 μ M UDMA und 100 μ M Asc und Bild 4 mit 100 μ M UDMA und 500 μ M ACC.

6.1.2.12 Zusammenfassung der Ergebnisse von UDMA

Die beiden höchsten UDMA-Konzentrationen (100 μ M und 33,5 μ M) führten im γ -H2AX-Test zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der DNA-DSB, im Vergleich zur Negativkontrolle. ACC konnte signifikant ($p < 0,05$) die Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch die beiden höchsten UDMA-Konzentration (100 μ M und 33,5 μ M) reduzieren. Asc dagegen reduzierte signifikant ($p < 0,05$) nur die durch 100 μ M UDMA induzierten Foci (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3), die nach 6h Exposition durch UDMA in drei Konzentrationen alleine und in Kombination mit 100 μ M ACC bzw. mit 500 μ M ACC induziert wurde, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen.

UDMA (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle		
	Ohne Antioxidans	Mit Asc (100 μ M)	Mit ACC (500 μ M)
100	2,5 \pm 0,37	1,64 \pm 0,25	1,31 (0,4)
33,5	2,21 \pm 0,38	1,39 \pm 0,58	1,16 (0,11)
10	1,56 \pm 0,7	1,34 \pm 0,66	0,69 (0,11)
0	1,39 \pm 0,4	1,59 \pm 0,59	1,12 \pm 0,24
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73

In Abbildung 23 ist graphisch die durchschnittliche Anzahl der Foci nach Exposition der drei verwendeten UDMA-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von 100 μ M Asc und 500 μ M ACC dargestellt. Ebenfalls ist die durchschnittliche Anzahl an Foci der Negativkontrolle, von 100 μ M Asc und von 500 μ M ACC gezeigt.

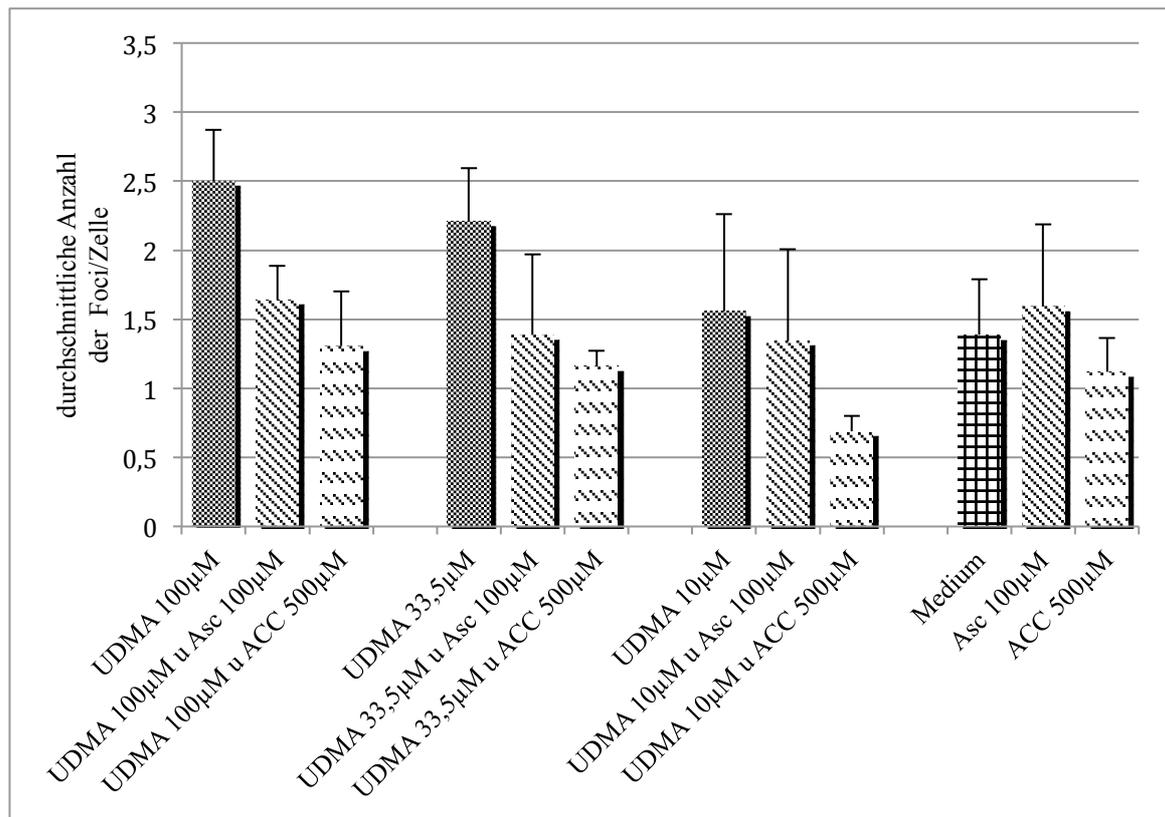


Abbildung 23: Durchschnittliche Anzahl induzierter Foci nach 6 h Exposition der HGF mit UDMA, UDMA mit 100 µM Asc und UDMA mit 500 µM ACC, daneben auch die Anzahl induzierter Foci von Medium als Negativkontrolle, sowie von 100 µM Asc und 500 µM ACC in Medium gelöst.

6.1.2.13 EGDMA

EGDMA in den beiden höchsten Konzentrationen von 2720 µM und 906,7 µM bewirkte eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der durchschnittlichen Anzahl an Foci im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Tabelle 20). So induzierte die höchste Konzentration von 2720 µM EGDMA mit durchschnittlich 5,36 Foci (+/- 1,59) eine 3,9-fache höhere Anzahl an Foci als die Negativkontrolle. EGDMA in der niedrigsten Konzentration (272 µM) induzierte mit durchschnittlich 1,95 Foci (+/- 0,37) nicht signifikant ($p < 0,05$) mehr Foci als die Negativkontrolle.

Anzumerken ist, dass in einigen Versuchsdurchgängen in den beiden höheren EGDMA-Konzentrationen eine Zellablösung verbunden mit einem Zellverlust von ca. 90 % der Zellen vorlag.

Tabelle 20: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit EGDMA bei verschiedenen Konzentrationen, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

EGDMA (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2720	5,36 \pm 1,59	0,0005	4,56
906,7	3,1 \pm 0,24	0,0003	0
272	1,95 \pm 0,37	0,08	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.14 EGDMA in Kombination mit Asc

100 μ M Asc konnte die durchschnittliche Anzahl an Foci, aller getesteter EGDMA-Konzentrationen (2720 μ M, 906,7 μ M, 272 μ M), signifikant ($p < 0,05$) reduzieren (s. Tabelle 21). Asc reduzierte die durch 2720 μ M EGDMA induzierten Foci von 5,36 (+/- 1,59) auf 2,6 Foci (+/- 0,57), was einer 2,1-fachen Erniedrigung entspricht. Die durchschnittliche Anzahl an Foci, die durch 906,7 μ M EGDMA induziert wurden, wurden durch Asc um ein 4,2-faches reduziert auf 0,74 Foci (+/- 0,42) und die durchschnittliche Foci-Zahl, die durch 272 μ M EGDMA induziert wurden, wurde durch Asc um ein 3,3-faches erniedrigt auf 0,58 Foci (+/- 0,06).

Tabelle 21: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit EGDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 100 μ M Asc, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

EGDMA (μ M) mit Asc (100 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2720	2,6 \pm 0,57	0,047	0,4
906,7	0,74 \pm 0,42	0,001	0
272	0,58 \pm 0,06	0,003	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.15 EGDMA und ACC

500 μM ACC konnte die durchschnittliche Anzahl an Foci, aller getesteter EGDMA-Konzentrationen (2720 μM , 906,7 μM , 272 μM), signifikant ($p < 0,05$) reduzieren (s. Tabelle 22, Tabelle 23). So reduzierte ACC die durch 2720 μM EGDMA induzierten Foci von 5,36 (+/- 1,59) auf 1,9 Foci (+/- 1,17), was einer 2,8-fachen Erniedrigung entspricht. Die durchschnittliche Anzahl an Foci, die durch 906,7 μM EGDMA induziert wurden, wurden durch ACC um ein 2,5-faches reduziert auf 1,26 Foci (+/- 0,69) und die durchschnittliche Foci-Zahl, die durch 272 μM EGDMA induziert wurden, wurde durch ACC um ein 2-faches erniedrigt auf 0,97 Foci (+/- 0,34).

Tabelle 22: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit EGDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μM ACC, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

EGDMA (μM) mit ACC (500 μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2720	1,9 \pm 1,17	0,039	0
906,7	1,26 \pm 0,69	0,012	0
272	0,97 \pm 0,34	0,026	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.16 Zusammenfassung der Ergebnisse von EGDMA

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Asc also auch ACC die Anzahl der γ -H2AX-Foci, die durch alle drei EGDMA-Konzentrationen induziert wurden, signifikant ($p < 0,05$) reduzieren konnten. Die durchschnittliche Anzahl der Foci der drei EGDMA-Konzentrationen (2720, 906,7 und 272 μM) mit und ohne Zugabe von Asc bzw. ACC sind in Tabelle 23 und nachfolgendem Diagramm (Abbildung 24) zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 23: Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3), die nach 6h Exposition durch EGDMA in drei Konzentrationen alleine und in Kombination mit 100 μ M Asc bzw. mit 500 μ M ACC induziert wurde, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen.

EGDMA (μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle		
	Ohne Antioxidans	Mit Asc (100 μ M)	Mit ACC (500 μ M)
2720	5,36 \pm 1,59	2,6 \pm 0,57	1,9 \pm 1,17
906,7	3,1 \pm 0,24	0,74 \pm 0,42	1,26 \pm 0,69
272	1,95 \pm 0,37	0,58 \pm 0,06	0,97 \pm 0,34
0	1,39 \pm 0,4	1,59 \pm 0,59	1,12 \pm 0,24
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73

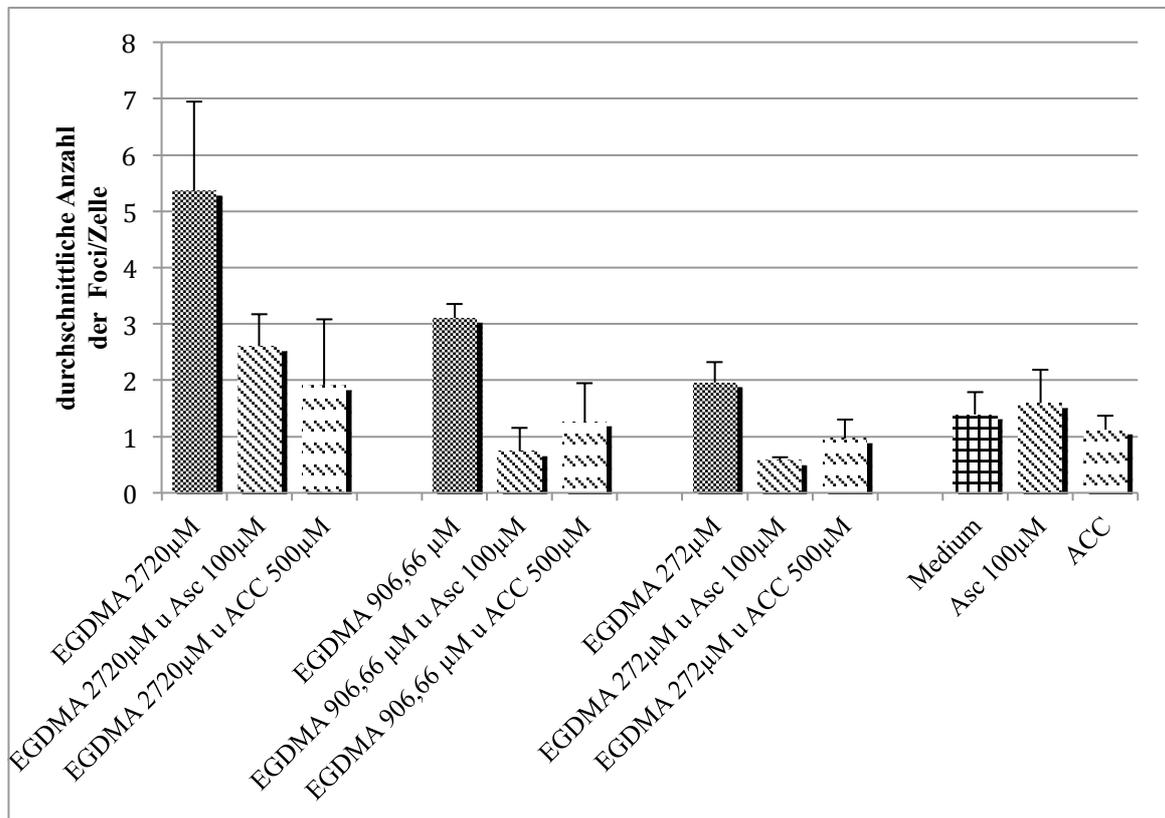


Abbildung 24: Durchschnittliche Anzahl induzierter Foci nach 6 h Exposition der HGF mit EGDMA, EGDMA mit 100 μ M Asc und EGDMA mit 500 μ M ACC, daneben auch die Anzahl induzierter Foci von Medium als Negativkontrolle, sowie 100 μ M Asc und 500 μ M ACC in Medium gelöst.

6.1.2.17 GDMA

Die durchschnittliche Anzahl an Foci war dosisabhängig von den verschiedenen GDMA-Konzentrationen (2500, 833,3 und 250 μM). Die höchste Anzahl induzierte mit 2,57 Foci (+/- 0,49) 2500 μM GDMA, 833,3 μM GDMA induzierte durchschnittlich 2,02 Foci (+/- 0,83) und 250 μM GDMA induzierte 1,93 Foci (+/- 0,38). Dabei erhöhte signifikant ($p < 0,05$) nur 2500 μM GDMA die durchschnittliche Anzahl an Foci im Vergleich zur Negativkontrolle. Die durchschnittliche Anzahl an Foci war gegenüber dem Medium 1,8-fach erhöht. Die durch 833,3 μM GDMA und durch 250 μM GDMA induzierte Anzahl an Foci unterschied sich nicht signifikant ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle. Die beiden niedrigeren Konzentrationen von GDMA führten demnach zu keiner höheren Induktion von Foci (s. Tabelle 24).

Tabelle 24: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit GDMA bei verschiedenen Konzentrationen, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ-und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

GDMA (μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2500	2,57 \pm 0,49	0,006	1,96
833,3	2,02 \pm 0,83	0,15	0,81
250	1,93 \pm 0,38	0,095	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.18 GDMA in Kombination mit Asc

100 μM Asc reduzierte signifikant ($p < 0,05$) die durchschnittliche Anzahl an Foci/Zelle, die durch 2500 μM GDMA und durch 250 μM GDMA induziert wurden (s. Tabelle 25). Asc reduzierte die durchschnittliche Foci-Zahl von 2500 μM GDMA von 2,57 Foci auf 1,24 Foci (+/- 0,5) und von 250 μM GDMA von 1,93 Foci auf 0,82 Foci (+/- 0,03) (s. Tabelle 27). Dies entspricht einer zweifachen Reduktion der, von 2500 μM GDMA induzierten, Foci und einer 2,4-fachen Reduktion der Foci von 250 μM GDMA durch 100 μM Asc. Die durch 833,3 μM GDMA induzierten Foci wurden durch Asc nicht signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt.

Tabelle 25: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit GDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 100 μ M Asc, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

GDMA (μ M) mit Asc (100 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2500	1,24 \pm 0,5	0,03	0
833,3	1,21 \pm 0,56	0,23	0
250	0,82 \pm 0,41	0,03	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.19 GDMA in Kombination mit ACC

500 μ M ACC reduzierte signifikant ($p < 0,05$) die durchschnittliche Anzahl an Foci/Zelle, die durch 2500 μ M GDMA induziert wurden, auf 0,96 Foci (\pm 0,74), was einer 2,7-fachen Reduktion der Foci entspricht (s. Tabelle 26, Tabelle 27). ACC konnte die Anzahl an Foci, die durch 833,3 μ M GDMA und durch 250 μ M GDMA induziert wurden, nicht signifikant ($p < 0,05$) reduzieren.

Tabelle 26: Durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3) nach 6 h Exposition der HGF mit GDMA bei verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μ M ACC, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen. Daneben ist der p-Wert aus dem Student's *t*-Test sowie der prozentuale Anteil der Zellen mit multiplen Schaden angegeben.

GDMA (μ M) mit ACC (500 μ M)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD	p-Wert	Durchschnittlicher Anteil der Zellen mit multiplen Schaden (%)
2500	0,96 \pm 0,74	0,04	0
833,3	1,32 \pm 0,31	0,24	0
250	1,06 \pm 0,55	0,09	0
0	1,39 \pm 0,4	-	0,35
H ₂ O ₂ (1000 μ M)	23,25 \pm 1,73	3,8 \times 10 ⁻¹¹	28,6

6.1.2.20 Zusammenfassung der Ergebnisse von GDMA

Nur die höchste GDMA-Konzentration von 2500 μM führte im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der DNA-DSB im Vergleich zur Negativkontrolle. Asc konnte signifikant ($p < 0,05$) die Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch die höchste und niedrigste GDMA-Konzentration (2500 μM und 250 μM) reduzieren. ACC reduzierte signifikant ($p < 0,05$) nur die durch 2500 μM GDMA induzierten Foci (s. Tabelle 27).

Tabelle 27: Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=3), die nach 6h Exposition durch GDMA in drei Konzentrationen alleine und in Kombination mit 100 μM Asc bzw. mit 500 μM ACC induziert wurde, sowie durchschnittlich induzierte Anzahl der Foci/Zelle \pm SD (n=6) der Negativ- und Positivkontrollen.

GDMA (μM)	Durchschnittliche Anzahl der Foci/Zelle		
	Ohne Antioxidans	Mit Asc (100 μM)	Mit ACC (500 μM)
2500	2,57 \pm 0,49	1,24 \pm 0,5	0,96 \pm 0,74
833,3	2,02 \pm 0,83	1,21 \pm 0,56	1,32 \pm 0,31
250	1,93 \pm 0,38	0,82 \pm 0,41	1,06 \pm 0,55
0	1,39 \pm 0,4	1,59 \pm 0,59	1,12 \pm 0,24
H ₂ O ₂ (1000 μM)	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73	23,25 \pm 1,73

In Abbildung 25 ist graphisch die durchschnittliche Anzahl der Foci nach Exposition der drei verwendeten GDMA-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von 100 μM Asc bzw. 500 μM ACC dargestellt. Ebenfalls ist die durchschnittliche Anzahl an Foci der Negativkontrolle, von 100 μM Asc und von 500 μM ACC zu sehen.

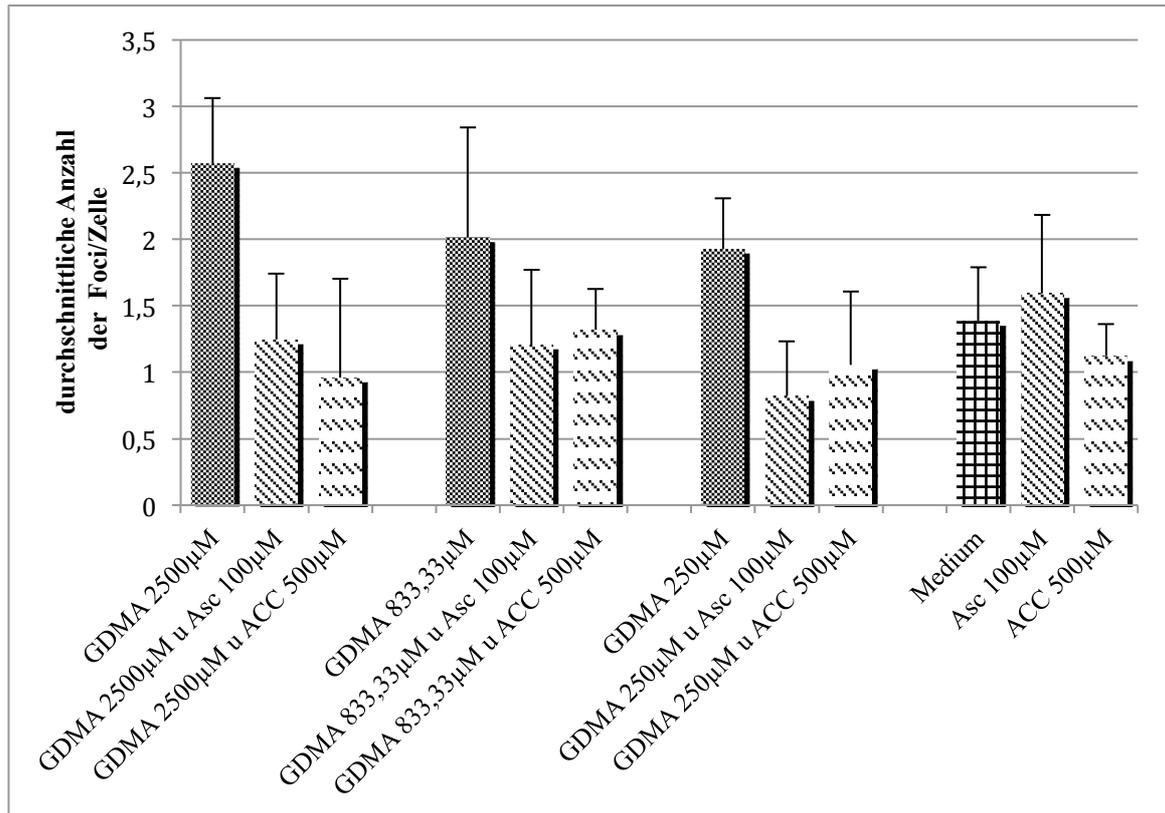


Abbildung 25: Durchschnittliche Anzahl induzierter Foci nach 6 h Exposition der HGF mit GDMA, GDMA mit 100 µM Asc und GDMA mit 500 µM ACC, daneben auch die Anzahl induzierter Foci von Medium als Negativkontrolle, sowie von 100 µM Asc und 500 µM ACC in Medium gelöst.

6.2 Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS

6.2.1 Derivatisierungsreaktion von FA mit DNPH

Die Retentionszeit des FA-DNPH-Komplexes beträgt 10,4 min. Mit DNPH derivatisiertes FA zerfällt im Massenspektrometer in folgende Fragmente mit einem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) von: 210, 180, 152, 122, 79, 63 und 51. Die Fragmente mit den höchsten Signalstärken hatten ein Masse zu Ladungsverhältnis von 210 und 79. Das Fragment m/z 210 stellt dabei das Masse/Ladungsverhältnis des Mutterions dar, also das nicht zerfallene FA-DNPH-Molekölion. Von diesen Hauptfragmenten wurde deshalb die Signalstärke über Berechnung der Flächenintegrale bestimmt. In Abbildung 26 ist beispielhaft das Gaschromatogramm und das Massenspektrum eines FA-DNPH-Komplexes nach Derivatisierung von 0,1 % FA in EtOH mit DNPH dargestellt.

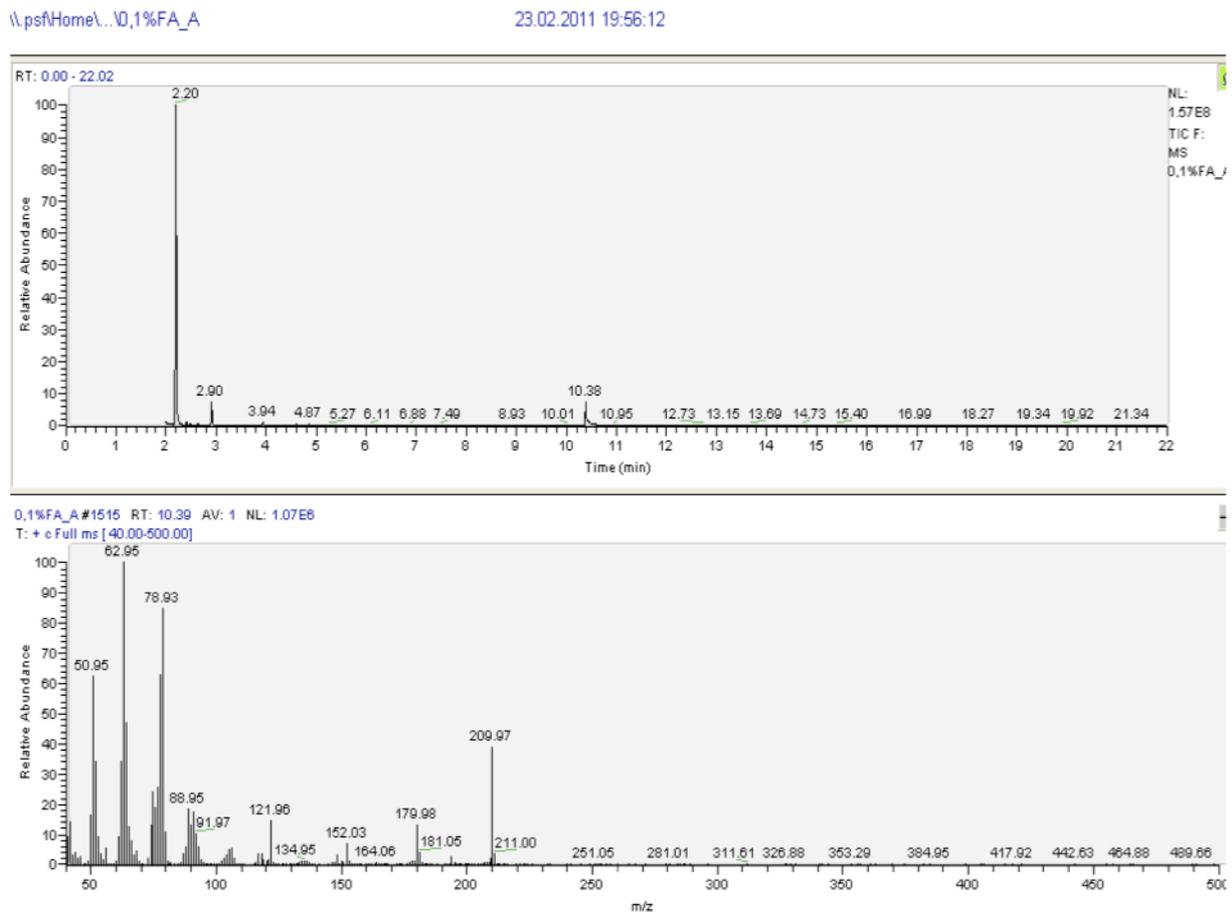


Abbildung 26: Gaschromatogramm und Massenspektrum einer 0,1 % FA-Lösung in EtOH, mit DNPH derivatisiert. Bei einer Retentionszeit (RT) von 10,39 min sind folgende Fragmente m/z zu sehen: 210, 180, 152, 122, 79, 63 und 51.

6.2.2 Einfluss der Reaktionszeit und der DNPH-Applikationsform

6.2.2.1 Einfluss der Reaktionszeit auf die Bildung des FA-DNPH-Komplexes

Optisch konnte die Reaktion von DNPH mit FA sofort nach Zugabe des DNPHs zur FA-Lösung beobachtet werden. Die dunkelgelbe DNPH-Lösung färbte sich bei Kontakt mit der FA-Lösung sofort in eine hellgelb gefärbte Lösung. Die Auswertung der GC-MS-Messergebnisse ergab, dass sich die Flächenintegrale von m/z 211 und m/z 79 zwischen den einzelnen Reaktionszeiten nicht deutlich unterschieden (s. Tabelle 28). Es waren nur die Geräte-bedingten Schwankungen zu erkennen. DNPH reagiert sofort mit FA (12C- und 13C-FA) zu dem FA-DNPH-Komplex. Dieser bleibt dann konstant, auch nach 24 Stunden ergab die Messung keinen wesentlichen Unterschied.

Tabelle 28: Flächenintegrale von m/z 211 und m/z 79 einer 1 % 13C-FA-Lösung in EtOH. Die Derivatisierung mit DNPH erfolgte mit unterschiedlichen Reaktionszeiten.

Reaktionszeit	Flächenintegral von m/z 211	Flächenintegral von m/z 79
5 min	410145	466993
10 min	222466	254640
15 min	330741	367211
30 min	246906	277394
40 min	252018	305222
45 min	191138	214591
60 min	340578	396338
90 min	364349	429571
2 h	316978	388141
4 h	217781	264558
8 h	479995	563013
24 h (Probe 1)	443717	545364
24 h (Probe 2)	387185	436290

6.2.2.2 Einfluss der Applikationsform von DNPH

DNPH in Pulverform und DNPH in H₃PO₄ gelöst wurden beide in EtOH zu einer Konzentration von 15,6 mM gelöst. Die Auswertung ergab, dass in den Proben, die mit DNPH-Pulver derivatisiert wurden, in der gesamten Verdünnungsreihe die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 höher waren als in den Proben, die mit DNPH gelöst in H₃PO₄ derivatisiert wurden. Bei beiden Ansätzen nahm die Größe der Flächenintegrale nicht proportional zur FA-Konzentration ab, z. B. war das Flächenintegral von m/z 210 in der 0,05

% FA-Lösung mit 4700530 Flächeneinheiten größer als das von m/z 210 in der 0,5 % FA-Lösung 3931909 Flächeneinheiten (s. Tabelle 29). Für die Erstellung einer Kalibrierkurve waren noch weitere Methodenschritte nötig. In den Proben, die mit DNPH, welches in gelöster Form vorlag, derivatisiert wurden, waren die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 kleiner im Vergleich zu denen, die mit DNPH-Pulver derivatisiert wurden. Es waren keine Unterschiede im Reaktionsvermögen von DNPH in Pulverform oder in bereits gelöster Form nachweisbar.

Tabelle 29: Vergleich der Flächenintegrale von m/z 210 und 79 von zwei FA-Verdünnungsreihen, die mit DNPH mit einer Konzentration von 15,6 mM derivatisiert wurden. Für die erste Verdünnungsreihe wurde die DNPH-Lösung von 15,6 mM in EtOH mit DNPH-Pulver hergestellt, für die zweite Verdünnungsreihe mit 0,2 mM DNPH in H₃PO₄ gelöst zu 15,6 mM verdünnt.

FA (%)	DNPH als Pulver		DNPH gelöst in H ₃ PO ₄	
	Flächenintegrale bei m/z		Flächenintegrale bei m/z	
	210	79	210	79
0,5	3931909	4942974	1223865	2816543
0,25	5890402	7304832	1754801	2703829
0,1	12300930	14298305	2714900	3755707
0,05	4700530	5753417	1009846	1454380
0,025	8744531	10082077	2653823	3812580
0,01	n.n.	n.n.	1122666	1639865
0,005	5608848	6657460	94204	152968
0,0025	n.n.	n.n.	547586	859756
0,001	154567	216931	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.3 Einfluss der FA-Applikationsform auf die Derivatisierungsreaktion

6.2.3.1 Verwendung von festem Paraformaldehyd

6.2.3.1.1 Paraformaldehyd in MeOH

In den verschiedenen FA-Konzentrationen konnte das Hauptfragment m/z 210 des FA-DNPH-Komplexes mittels GC-MS in der 0,01 %, der 0,001 % und der 0,0001 % FA-Lösung gemessen werden. Die Signalhöhe war sehr gering. In der 1 %, der 0,1 % und der 0,00001 % FA-Lösung war kein FA-DNPH-Komplex nachweisbar (s. Tabelle 30). Das Fragment m/z 79 war nicht nachweisbar.

Tabelle 30: Flächenintegrale und Reaktionszeit von m/z 210 und m/z 79 durch GC-MS-Messung einer Paraformaldehyd-Verdünnungsreihe in MeOH. Paraformaldehyd wurde mithilfe von Erhitzen in MeOH gelöst.

Paraformaldehyd in MeOH (%)	Flächenintegral bei Masse 210
1	n.n. (Niederschlag)
0,1	n.n.
0,01	2146
0,001	2260
0,0001	6951
0,00001	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Bei dem Versuch, Paraformaldehyd mittels gesättigter NaCl-Lösung von der MeOH-Phase in die Hexan-Phase zu überführen, konnte in Hexan kein FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden.

Bei der Paraformaldehyd-Lösung, die mittels Ultraschallbad in MeOH gelöst wurde, konnten in den Konzentrationen von 0,1 % bis 0,001 % Paraformaldehyd die Hauptfragmente m/z 210 und m/z 79 nachgewiesen werden (s. Tabelle 31). Die Flächenintegrale waren größer als bei der FA-Verdünnungsreihe, für die Paraformaldehyd durch Erwärmen in MeOH gelöst wurde.

Tabelle 31: Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 durch GC-MS-Messung einer Paraformaldehyd-Verdünnungsreihe in MeOH. Paraformaldehyd wurde im Ultraschallbad in MeOH gelöst.

Paraformaldehyd in MeOH (%)	Flächenintegral bei Masse 210	Flächenintegral bei Masse 79
1	n.n.	n.n.
0,1	422952	507088
0,01	253069	323982
0,001	42025	209652
0,0001	4377	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

In der 1 % Paraformaldehyd-Lösung in MeOH konnten keine Fragmente des FA-DNPH-Komplexes nachgewiesen werden, da bei Zugabe von DNPH das Löslichkeitsprodukt überschritten wurde. In der 0,0001 % Paraformaldehyd-Lösung konnte nur das Fragment m/z 210 nachgewiesen werden, nicht aber m/z 79.

6.2.3.1.2 Paraformaldehyd in EtOH

Paraformaldehyd ging im Ultraschallbad in EtOH besser zu lösen als in MeOH. In allen Verdünnungsstufen von 1 % FA bis 0,0001 % FA war das mit DNPH derivatisierte FA in der GC-MS nachweisbar. Der FA-DNPH-Komplex hatte eine Retentionszeit von 10,4 min, im Massenspektrum waren die charakteristischen Signale bei m/z 210 und 79 zu sehen (s. Tabelle 32). Die Flächenintegrale dieser Signale erwiesen sich als nicht linear bezogen auf die Konzentration.

Tabelle 32: Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 nach GC-MS-Messung einer Paraformaldehyd-Verdünnungsreihe in EtOH. Paraformaldehyd wurde im Ultraschallbad in EtOH gelöst.

Paraformaldehyd in EtOH (%)	Flächenintegral bei Masse 210	Flächenintegral bei Masse 79
1	10821	15875
0,1	12165	n.n.
0,01	7935	7280
0,001	40675	55229
0,0001	10326	28869

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.3.2 Verwendung von flüssigem Formaldehyd (Formalin)

6.2.3.2.1 FA-Verdünnungsreihe, 15,6 mM DNPH in 1 N HCl gelöst

In der GC-MS-Messung der FA-Verdünnungsreihe in EtOH (mit Formalin erstellt) konnte FA anhand des FA-DNPH-Komplexes in der 1 %, der 0,1 % und der 0,01 % FA-Lösung nachgewiesen werden. Dabei betrug die RT 10,4 min und es konnten die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 berechnet werden. In den anderen Verdünnungsstufen war FA-DNPH nicht nachweisbar (s. Tabelle 33).

Tabelle 33: Berechnete Flächenintegrale der GC-MS-Messung der Formaldehyd-Verdünnungsreihe gelöst in EtOH mit 0,1 mg/ml Coffein als interner Standard. Es sind die Flächenintegrale m/z 79 und m/z 210 für FA-DNPH und das Flächenintegral von m/z 194 für Coffein angegeben.

FA in EtOH (%)	Flächenintegral bei m/z 210	Flächenintegral bei m/z 79	Flächenintegral bei m/z 194
1	152208	179896	1528452
0,1	232902	267688	1589172
0,01	34773	44746	1322675
0,001	n.n.	n.n.	2746233
0,0001	n.n.	n.n.	2254723

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.3.2.2 FA-Verdünnungsreihe, DNPH in EtOH gelöst

Es wurden drei verschiedene ethanolische DNPH-Konzentrationen untersucht: 15,6 mM, 7,8 mM und 1,56 mM. Die Derivatisierungsreaktion lief mit allen drei Konzentrationen von DNPH in EtOH besser ab, als wenn DNPH zuvor in Salzsäure verdünnt wurde, weshalb die Nachweisgrenze im deutlich kleineren Konzentrationsbereich lag. So konnte der FA-DNPH-Komplex in 0,05 % FA-Lösungen nachgewiesen werden. Die Verdünnungsreihen, die mit 15,6 mM DNPH und mit 1,56 mM DNPH derivatisiert wurde, zeigten in der 0,001 % FA-Lösung noch Signale bei m/z 210 und m/z 79. Die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 der 0,5 % FA-Lösungen waren im Vergleich zu denen der 0,25 % und der 0,1 % FA-Lösungen dabei identisch oder geringer. Die Größe der Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 waren nicht proportional zur Verdünnungsstufe (s. Tabelle 34, Tabelle 35, Tabelle 36). Die Messungen mit der Methode, in der 1 zu 10 gesplittet wurde, brachten keine deutlichen Verbesserungen im Nachweis von FA-DNPH. Weder die Nachweisgrenze konnte verbessert werden, noch wurde die Größe der Flächenintegrale durchgängig verändert.

In Tabelle 34 sind die Messergebnisse der FA-Verdünnungsreihe, die mit der ethanolischen DNPH-Lösung von 15,6 mM hergestellt wurde, dargestellt. Im Splitverfahren 1 zu 30 sind mit Ausnahme von der 0,01 % FA- und der 0,0025 % FA-Lösung in jeder Verdünnungsstufe von 0,5 % - 0,001 % FA der FA-DNPH-Komplex nachweisbar. Die Ergebnisse des Splitverfahrens 1 zu 10 sind vergleichbar, zusätzlich ist in der 0,1 % FA-Lösung kein FA-DNPH-Komplex nachweisbar.

Tabelle 34: Flächenintegrale von m/z 210 und 79 einer FA-Verdünnungsreihe in EtOH, die Proben wurden mit 15,6 mM DNPH derivatisiert. DNPH wurde in EtOH direkt verdünnt. Bei der Probeaufgabe wurden zwei verschiedene Splitverfahren verwendet: 1 zu 30 und 1 zu 10.

FA (%) DNPH 15,6 mM	Split 1 zu 30, Flächenintegral bei m/z		Split 1 zu 10, Flächenintegral bei m/z	
	210	79	210	79
0,5	203975	391621	897464	1470320
0,25	1367602	2638435	1013883	2139183
0,1	1064793	2155947	n.n.	n.n.
0,05	807547	1771684	1436031	2751255
0,025	710990	1399114	820110	1597997
0,01	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
0,005	187768	342861	318484	541120
0,0025	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
0,001	63391	126159	151361	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 35 zeigt die Messergebnisse der FA-Verdünnungsreihe, die mit 7,8 mM DNPH derivatisiert wurde. Im Splitverfahren von 1 zu 30 ist in jeder Verdünnungsstufe ein Flächenintegral von m/z 210 nachweisbar, außer in der niedrigsten von 0,001 % FA. Im Splitverfahren 1 zu 10 ist ab 0,005 % FA kein FA-DNPH-Komplex nachweisbar. Die Derivatisierung von FA mit 7,8 mM DNPH ergibt in den meisten Fällen kleinere Flächenintegrale im Vergleich zu denen, bei denen FA mit 15,6 mM DNPH derivatisiert wurde.

Tabelle 35: Flächenintegrale von m/z 210 und 79 einer FA-Verdünnungsreihe in EtOH, die Proben wurden mit 7,8 mM DNPH derivatisiert. DNPH wurde in EtOH direkt verdünnt. Bei der Probeaufgabe wurden zwei verschiedene Splitverfahren verwendet: 1 zu 30 und 1 zu 10.

FA (%) DNPH 7,8 mM	Split 1 zu 30, Flächenintegral bei m/z		Split 1 zu 10, Flächenintegral bei m/z	
	210	79	210	79
0,5	573150	1141931	1140231	2101778
0,25	454517	893836	1543632	2638437
0,1	326222	n.n.	893227	1619906
0,05	317007	844725	n.n.	n.n.
0,025	227611	541474	303563	n.n.
0,01	30929	n.n.	231855	n.n.
0,005	35809	n.n.	n.n.	n.n.
0,0025	50870	n.n.	n.n.	n.n.
0,001	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 36 stellt die Messergebnisse der FA-Verdünnungsreihe, die mit 1,56 mM DNPH derivatisiert wurde, dar. Der FA-DNPH-Komplex ist in jeder Verdünnungsstufe nachweisbar, Ausnahme stellt die 0,001 % FA-Lösung dar, die mit dem Splitverfahren von 1 zu 10 gemessen wurde.

Tabelle 36: Flächenintegrale von m/z 210 und 79 einer FA-Verdünnungsreihe in EtOH, die Proben wurden mit 1,56 mM DNPH derivatisiert. DNPH wurde in EtOH direkt verdünnt. Bei der Probeaufgabe wurden zwei verschiedene Splitverfahren verwendet: 1 zu 30 und 1 zu 10

FA (%) DNPH 1,56 mM	Flächenintegral bei m/z		Split 1 zu 10, Flächenintegral bei m/z	
	210	79	210	79
0,5	548259	1217602	492300	1278804
0,25	366275	707340	645899	1123137
0,1	698582	1445079	707096	1706435
0,05	934280	1762695	452209	1013218
0,025	447750	967495	596115	1386918
0,01	276628	644735	985169	2064550
0,005	128889	290171	277096	634258
0,0025	250525	494912	106985	n.n.
0,001	125224	253036	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.3.3 Verwendung eines festen FA-DNPH-Komplexes

In dem Splitverfahren 1 zu 30 konnte der FA-DNPH-Komplex anhand der Massenpeaks m/z 210 und m/z 79 in der 0,5 %-, der 0,25 %-, der 0,1 %- und der 0,05 % Lösung nachgewiesen werden. Bei den Messungen, in denen 1 zu 10 gesplittet wurde, waren die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 in allen Konzentrationen höher im Vergleich zur 1 zu 30 Split-Messmethode. Auch mit dem Splitverfahren von 1 zu 10 konnte der FA-DNPH-Komplex nur bis zu einer Konzentration von 0,05 % FA-DNPH nachgewiesen werden. Mit beiden Splitverfahren war der FA-DNPH-Nachweis ab einer FA-DNPH-Konzentration von 0,025 % nicht mehr möglich (s. Tabelle 37).

Tabelle 37: Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 79 einer FA-DNPH-Verdünnungsreihe in EtOH. Für die GC-MS-Messung wurde bei der Probenaufgabe entweder 1 zu 30 oder 1 zu 10 gesplittet.

FA-DNPH (%)	Split	Flächenintegral m/z 210	Flächenintegral m/z 79
0,5	1 zu 30	1114279	1837212
0,5	1 zu 10	3274434	5121625
0,25	1 zu 30	455390	750465
0,25	1 zu 10	1242350	2000738
0,1	1 zu 30	70179	157158
0,1	1 zu 10	287331	429821
0,05	1 zu 30	26533	36301
0,05	1 zu 10	88999	130489

6.2.4 Auswahl eines internen Standards

6.2.4.1 *13C-FA als interner Standard*

Der ¹³C-FA-DNPH-Komplex erscheint wie der ¹²C-FA-DNPH-Komplex nach einer Retentionszeit von 10,4 min im Gaschromatogramm. Das Massenspektrum ergibt folgende Fragmente mit einem Masse zu Ladungsverhältnis m/z: 211, 180, 152, 122, 79, 63 und 51. Der ¹³C-FA-DNPH-Komplex weicht in seinem Massenspektrum nur in dem Fragment m/z 211 (Mutterion) von dem des ¹²C-FA-DNPH-Komplexes ab. Abbildung 27 zeigt das typische Massenspektrum eines ¹³C-FA-DNPH-Komplexes.

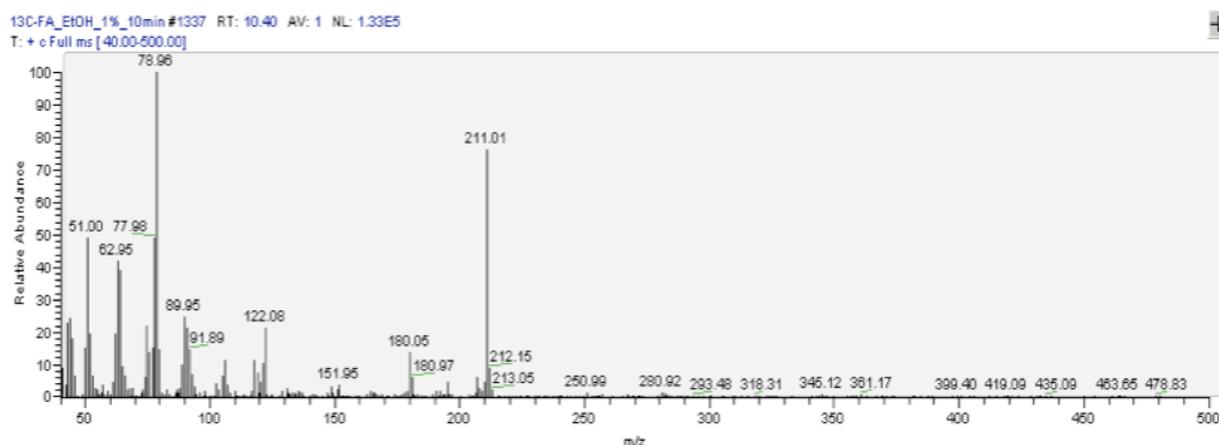


Abbildung 27: Massenspektrum einer FA-Lösung in EtOH mit ¹³C-FA und mit DNPH derivatisiert. Der Komplex ¹³C-FA-DNPH erscheint nach einer Retentionszeit (RT) von 10,4 min. Es sind folgende Fragmente zu sehen: m/z 211, 180, 152, 122, 79, 63 und 51.

6.2.4.1.1 ^{13}C -FA in H_2O

In der wässrigen FA-Lösung mit ^{13}C -FA konnte der ^{13}C -FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden. Die Intensität der Signale von m/z 211 und von m/z 79 war aber sehr niedrig. Bei der 1 % ^{13}C -FA-Lösung die Flächenintegrale von m/z 211 26648 Flächeneinheiten und von m/z 79 31660 Flächeneinheiten groß. Bei der wässrigen 0,1 % ^{13}C -FA-Lösung lag das Flächenintegral von m/z 211 mit 7196 Flächeneinheiten an der unteren Nachweisgrenze. Das Flächenintegral von m/z 79 war mit 13663 Flächeneinheiten kaum größer. Die Bildung des ^{13}C -FA-DNPH-Komplexes in wässriger Lösung war nicht zufriedenstellend.

6.2.4.1.2 ^{13}C -FA in MeOH

In der 1%, der 0,1 % und der 0,05 % Lösung konnte in der GC-MS sowohl ^{12}C -FA-DNPH anhand m/z 210 als auch ^{13}C -FA-DNPH anhand m/z 211 nachgewiesen werden. Das Flächenintegral von m/z 211 war wesentlich größer als das von m/z 210. Dabei sollten sie aufgrund des gleichen Verhältnisses annähernd gleich groß sein. In der 1 % und der 0,5 % Lösung wurde das Löslichkeitsprodukt überschritten. Es kam zur Bildung eines gelben Niederschlags. Die nachgewiesene Menge an ^{12}C - und ^{13}C -FA war in der 1 % Lösung wesentlich geringer als in der 0,1 % und 0,05 % Lösung, ersichtlich an den wesentlich geringeren Flächenintegralen von m/z 211 und 210 (s. Tabelle 38). In den niedrigeren FA-Konzentrationen (ab 0,025 % FA) konnte FA in Form des FA-DNPH-Komplexes nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 38: Flächenintegrale von m/z 211, m/z 210 und m/z 79 von einer ^{12}C -FA- ^{13}C -FA-Verdünnungsreihe in MeOH. FA und ^{13}C -FA sind im gleichen Verhältnis in MeOH gelöst sind und wurden mit DNPH derivatisiert.

^{12}C -und ^{13}C -FA (%), im gleichen Verhältnis	Flächenintegral bei m/z 211	Flächenintegral bei m/z 210	Flächenintegral bei m/z 79
1	53001 (Niederschlag)	31212 (Niederschlag)	113935 (Niederschlag)
0,5	n.n. (Niederschlag)	n.n. (Niederschlag)	n.n. (Niederschlag)
0,25	n.n.	n.n.	n.n.
0,1	521170	24157	592994
0,05	119047	50943	158282
0,025	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.4.1.3 ¹³C-FA in EtOH

Es wurden Versuche gemacht mit ¹³C-FA-Lösung alleine und gemeinsam mit ¹²C-FA im gleichen Verhältnis von jeweils 0,1 %. Das Flächenintegral von m/z 211 war immer größer, wenn ¹³C-FA und ¹²C-FA gemeinsam im gleichen Verhältnis in der Probe war. Beide Signale sollten die gleiche Intensität haben. Wenn ¹²C-FA alleine in der Lösung war, war das Flächenintegral größer als in Kombination mit ¹³C-FA (s. Tabelle 39).

Tabelle 39: 0,1 % FA- und 0,1 % ¹³C-FA-Lösung im gleichen Verhältnis in EtOH gelöst. In dieser Tabelle sind die Flächenintegrale, die mittels full-scan Modus gemessen wurden, aufgeführt. Neben m/z 211 und m/z 210, für den FA- und den ¹³C-FA-DNPH-Komplex sind auch deren Fragment m/z 79 und das Molekölion von Coffein mit m/z 194 erfasst worden.

0,1 % FA u. 0,1 % ¹³ C-FA in EtOH	Anmerkung	Flächenintegral bei m/z 211	Flächenintegral bei m/z 210	Flächenintegral bei m/z 79	Flächenintegral bei m/z 194
Probe 1	Messung 1	492021	70789	600875	1224704
Probe 1	Messung 2	384786	150665	790272	1411202
Probe 1	Nach vier Wochen	483313	66754	720924	1264477
Probe 2	Messung 1	632454	81081	857916	1276310
Probe 2	Messung 2	737953	91463	967396	1618855
Probe 2	Nach vier Wochen	551512	62221	850832	1753771
Probe 3	DNPH vorher in EtOH gelöst, ohne CF	182702	334254	744605	-
ohne ¹³ C-FA	mit CF	45883	265800	327423	1535920
ohne ¹³ C-FA	ohne CF	66899	695697	752578	-

Die Proben wurden auch im SIM-Mode gemessen (s. Tabelle 40), bei dem nur die Masseneinheiten 210 und 211 erfasst werden. Die Auswertung der Messungen im SIM-Mode brachten keine Verbesserungen bezüglich der Sensitivität als das üblicherweise verwendete Messprogramm. Das Flächenintegral von m/z 211 lag immer über der von m/z 210. Wenn man die Messung im SIM-Mode doppelt durchführte und beim ersten Durchgang nur m/z 211 erfasste und bei zweitem Durchgang m/z 210, war das Flächenintegral von m/z 210 noch bedeutend kleiner als das der Masseneinheit 211.

Tabelle 40: SIM-Methode zur Messung der 0,1 % FA- und 0,1 % ¹³C-FA-Lösung in EtOH. Es wurden nur m/z 211 und m/z 210 erfasst. ES sind die berechneten Flächenintegrale der Masseneinheiten 211 und 210 zu sehen.

0,1 % FA u. 0,1 % ¹³ C-FA in EtOH	Methode	211	210
Probe 1	SIM 210 u. 211	685502	82829
Probe 1	SIM 210 u. 211	465452	54942
Probe 1	SIM 210 u. 211	365899	54476
Probe 2	SIM 210 u. 211	721771	89099
Probe 2	SIM 210 u. 211	890048	100105
Probe 2	SIM 210 u. 211	881123	93262
Probe 2	Nur SIM 210	-	207544
Probe 2	Nur SIM 211	899399	-
Probe 3 (DNPH bereits in EtOH)	SIM 210 u. 211	182702	334254
ohne ¹³ C-FA	SIM 210 u. 211	72327	623034

6.2.4.1.4 Zugabe von ¹³C-FA zu Kompositen (Wiederfindung des internen Standards)

In den Proben, bei denen als interner Standard ¹³C-FA zugefügt war, konnte bei beiden Lösungsmitteln MeOH und EtOH in der GC-MS das Mutterion m/z 211 von ¹³C-FA-DNPH nachgewiesen werden. In der einen ethanolischen Probe war kein Massenfragment bei m/z 210 zu finden, in der methanolischen und der anderen ethanolischen Probe lag das Massenfragment von m/z 210 an der unteren Nachweisgrenze. In den Proben, in denen Coffein als Standard zugefügt war, konnten weder das Massenfragment 211 noch das Massenfragment 210 nachgewiesen werden. Selbst nach einer Inkubation von 36 Stunden einer Probe in EtOH mit Coffein als Standard und nochmaliger Messung, konnte kein Formaldehyd-DNPH-Komplex anhand m/z 210 und m/z 79 nachgewiesen werden (s. Tabelle 41). Es konnte in der gelösten Komposit-Paste Filtek™ Supreme XT kein FA in Form des FA-DNPH-Komplexes nachgewiesen werden.

Tabelle 41: FA-Nachweis in dem unpolymersierten Komposit Filtek™ Supreme XT, gelöst in MeOH oder EtOH. In den ersten drei Messungen ist 13C-FA als interner Standard (Flächenintegral bei m/z 211), in den restlichen Messungen ist Coffein als interner Standard (Flächenintegral bei m/z 194) zugefügt.

Filtek™ Supreme XT in	Standard	Flächenintegral bei m/z 211	Flächenintegral bei m/z 210	Flächenintegral bei m/z 79	Flächenintegral bei m/z 194
EtOH	0,1 % 13C-FA	55550	-	66014	-
EtOH	0,1 % 13C-FA	301787	18055	326136	-
MeOH	0,1 % 13C-FA	298261	9758	303954	
EtOH	Coffein	-	-	-	1578990
EtOH	Coffein	-	-	-	1357613
EtOH (36h ink.)	Coffein	-	-	-	2020515
MeOH	Coffein	-	-	-	1213466

6.2.4.2 d-FA als interner Standard

6.2.4.2.1 d-FA als interner Standard, 15,6 mM DNPH in 1 N HCl verdünnt

Der d-FA-DNPH-Komplex erscheint wie der 12C-FA-DNPH-Komplex und der 13C-FA-DNPH-Komplex nach einer Retentionszeit von 10,4 min. Im Massenspektrum d-FA, das mit DNPH derivatisiert wurde, sind folgende Fragmente zu finden: m/z 212, 180, 152, 122, 79, 63 und 51. Es unterscheidet sich in seinem Massenspektrum zu dem von 12C-FA-DNPH nur im Fragment m/z 212.

Bei der Herstellung der 1 % FA-Lösungen mit 12C-FA und mit d-FA war zu beobachten, dass die Lösung bei Zugabe von DNPH, unabhängig von der zugegebenen Menge, ausfiel.

In der 1 % d-FA-Lösung, von der 450 µl mit 50 µl DNPH derivatisiert wurde, konnte mittels GC-MS d-FA-DNPH anhand des Fragmentes mit der Masseneinheit m/z 212 mit 373228 Flächeneinheiten nachgewiesen werden. Ebenso konnte in der 0,1 % d-FA-Lösung der d-FA-DNPH-Komplex anhand des Fragmentes von m/z 212 mit 818896 Flächeneinheiten nachgewiesen werden (s. Tabelle 42). Bei Abweichung der 50 µl Zugabemenge von DNPH, mit einmal nur 25 µl DNPH-Lösung zu 450 µl Probe und das zweite Mal 250 µl DNPH-Lösung zu 250 µl Probe, konnte in beiden Fällen kein d-FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden, weder in der 1 % d-FA-Lösung noch in der 0,1 % d-FA-Lösung. Zusammenfassend lässt sich nach der Auswertung sagen, dass sowohl in der 1 % als auch in der 0,1 % d-FA-Lösung d-FA-DNPH bedingt nachweisbar war. Beim Vergleich der Signalstärke von m/z 212 der 1 % mit der Signalstärke der 0,1 % d-FA-Lösung ist zu erkennen, dass das Flächenintegral von m/z 212 der 0,1 % Lösung mit 818896 Flächeneinheiten wesentlich höher ist als das

Flächenintegral von m/z 212 der 1 % Lösung mit 373228 Flächeneinheiten. Die in der GC-MS nachgewiesene d-FA-Menge war in der 0,1 % d-FA-Lösung deutlich höher als in der 1 % d-FA Lösung.

Tabelle 42: Flächenintegrale von m/z 212, m/z 210 und m/z 79 von FA-d-FA-Lösungen in EtOH im gleichen Verhältnis. Die Lösungen wurden mit 25 µl, 50 µl oder 250 µl 15,6 mM DNPH (in 1 N HCl) derivatisiert

d-FA (%)	DNPH (µl)	Flächenintegral m/z 212	Flächenintegral m/z 210	Flächenintegral m/z 79
1	50	373228	n.n.	1408533
1	250	n.n.	n.n.	n.n.
0,1	50	818896	35541	18873830
0,1	250	n.n.	n.n.	n.n.
0,1	25	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Bei den nicht deuterierten FA-Lösungen verhielt es sich ähnlich. Es war sowohl in der 1 % als auch in der 0,1 % FA-Lösung, bei denen je 450 µl Probe mit 50 µl DNPH derivatisiert wurde, FA in Form des FA-DNPH-Komplexes nachweisbar. Bei Zugabe von 250 µl DNPH zu 250 µl Probe konnte in der 1 % FA-Lösung kein FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden, aber in der 0,1 % FA-Lösung konnte FA anhand des FA-DNPH-Komplexes mit dem Fragment von m/z 210 nachgewiesen werden. Bei der 1 % und 0,1 % FA-Lösung, bei denen 450 ml Probe mit 25 µl DNPH derivatisiert wurde, konnte keine FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden. Auch hier zeigt der Vergleich der beiden Konzentrationen, dass in der 0,1 % FA-Lösung fast die gleiche Menge an FA nachgewiesen wurde wie in der 1 % FA-Lösung. Dies ist an den relativ gleich großen Flächenintegralen von m/z 210 mit rund 643000 Flächeneinheiten der 1 % FA-Lösung und mit rund 500000 Flächeneinheiten der 0,1 % FA-Lösung zu erkennen (s. Tabelle 43).

Tabelle 43: Flächenintegrale von m/z 212, 210 und 79 von FA-Lösungen in EtOH mit einer Konzentration von 1 % FA und von 0,1 % FA, FA wurde mit 25 µl, 50 µl oder 250 µl 15,6 mM DNPH (in 1 N HCl) derivatisiert.

FA (%)	DNPH (µl)	Flächenintegral m/z 212	Flächenintegral m/z 210	Flächenintegral m/z 79
1	50	n.n.	642966	936537
1	250	n.n.	n.n.	n.n.
1	25	n.n.	n.n.	n.n.
0,1	50	7071	500753	780938
0,1	250	n.n.	128906	225096
0,1	25	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Im Massenspektrum der Proben, in denen FA und d-FA im gleichen Verhältnis gelöst waren, konnten sowohl die Masse 210 für den FA-DNPH-Komplex als auch die Masse 212 für den deuterierten Komplex detektiert werden (s. Tabelle 44). So wurde in der 1 % FA-d-FA-Lösung die Masseneinheit m/z 212 in einer Intensität von 224374 nachgewiesen und m/z 210 in einer Intensität von 277728. In der 0,1 % FA-Lösung wurden das Flächenintegral des Massenpeaks 212 mit 198835 und das Flächenintegral des Massenpeaks 210 mit 244803 gemessen. In beiden Konzentrationen konnten demnach FA und d-FA nachgewiesen werden. Die Flächenintegrale von m/z 212 und von m/z 210 waren dabei ungefähr gleich groß. Beim Vergleich der Flächenintegrale von m/z 212 und m/z 210 zwischen der 1 % und 0,1 % FA-Lösung unterscheiden sich diese wiederum kaum in ihrer Größe. Dies bedeutet, dass in der 0,1 % FA-Lösung annähernd die gleiche Menge an FA und d-FA in Form von FA-DNPH und d-FA-DNPH nachgewiesen wurde wie in der 1 % Lösung.

Tabelle 44: Flächenintegrale von m/z 212, 210 und 79 von FA-d-FA-Lösungen im gleichen Verhältnis in den beiden Konzentrationen 1 % und 0,1%, es wurde mit 50 µl DNPH derivatisiert.

d-FA und FA 1:1 (%)	DNPH (µl)	Flächenintegral m/z 212	Flächenintegral m/z 210	Flächenintegral m/z 79
1	50	224374	277728	1108806
0,1	50	198835	244803	786225

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.4.2.2 15,6 mM DNPH in d-EtOH

Anhand der obigen Ergebnisse aus Kapitel 6.2.3.2.2 wurde eine Verdünnungsreihe von FA in d-EtOH aufgestellt. DNPH wurde direkt zu 15,6 mM in d-EtOH verdünnt. Als interner

Standard wurde 0,1 % d-FA zugefügt. Beim Herstellen der Verdünnungsreihe fiel bei der 0,5 % FA-Lösung ein Niederschlag aus. Dieser konnte aufgrund der Tatsache, dass nur FA, d-FA und DNPH in der Lösung war und aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 6.2.4.2.3 konnte dieser weiter bestimmt werden als ausgefallener FA-/d-FA-DNPH-Komplex.

Der FA-DNPH-Komplex (anhand m/z 210) und der d-FA-DNPH-Komplex (anhand m/z 212) konnten in der Verdünnungsreihe bis zur Konzentration von 0,005 % FA nachgewiesen werden. In den beiden niedrigsten FA-Verdünnungsstufen von 0,0025 % und 0,001 % FA konnten keine Fragmente bei m/z 210 und 212 nachgewiesen werden. In den Konzentrationen von 0,025, 0,01 und 0,005 % FA konnte das Messsignal nicht vom Basisrauschen abgegrenzt werden. Das Verhältnis von m/z 210 zu m/z 212 verringerte sich mit abnehmender FA-Konzentration bei gleichbleibender d-FA-Konzentration (s. Tabelle 45).

Tabelle 45: Flächenintegrale von m/z 79, 210, und 212 einer FA-Verdünnungsreihe in EtOH mit 0,1 % d-FA als interner Standard und mit 15,6 mM DNPH als Derivatisierungsreagenz.

FA (%), 0,1 % d-FA	Flächenintegral bei m/z			Verhältnis 210/212
	79	210	212	
0,5	2194801	688021	171287	4,02
0,25	160013	343550	140678	2,44
0,1	1419527	227168	133334	1,70
0,05	954527	105030	123715	0,85
0,025	31355	4051	7056	0,57
0,01	28345	4404	7465	0,59
0,005	44157	3446	10989	0,31
0,0025	n.n.	n.n.	n.n.	-
0,001	n.n.	n.n.	n.n.	-

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.4.2.3 15,6 mM DNPH in Acetonitril

In jeder Konzentration der FA-Verdünnungsreihe konnte anhand des Massenpeaks m/z 210 FA-DNPH nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze von FA in Acetonitril ist niedriger als in EtOH. Der interne Standard d-FA war ebenfalls in jeder Probe anhand des Fragments m/z 212 für den d-FA-DNPH-Komplex nachweisbar. Das Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212 wurde mit abnehmender FA-Konzentration kleiner (s. Tabelle 46).

Tabelle 46: Durchschnittliche Größe der Flächenintegrale von m/z 79, 210 und 212 von FA-Verdünnungsreihe in Acetonitril mit 0,1 % d-FA als interner Standard und mit DNPH in einer Konzentration mit 15,6 mM als Derivatisierungsreagenz.

FA (%),	Durchschnittliche Größe des Flächenintegrals von m/z			Durchschnittliches Verhältnis 210/212
	79	210	212	
0,5	1512003	583984	152943	4,33
0,25	988695	320968	111660	2,96
0,1	789256	259741	155410	2,02
0,05	1484552	401807	353059	1,17
0,025	1029963	158365	341735	0,46
0,01	1468006	155287	560840	0,28
0,005	704233	38843	241929	0,18
0,0025	941446	47037	367243	0,16
0,001	1043937	39765	424005	0,13

n.n. = nicht nachweisbar

6.2.4.2.4 1,56 mM DNPH in Acetonitril und Erstellen einer Kalibrierkurve

FA konnte in Acetonitril mit 1,56 mM DNPH in Form des FA-DNPH mittels GC-MS nachgewiesen werden. Abbildung 28 stellt ein Massenspektrum einer 0,1 % FA in Acetonitril mit 1,56 mM DNPH und beiden internen Standards, 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein, dar:

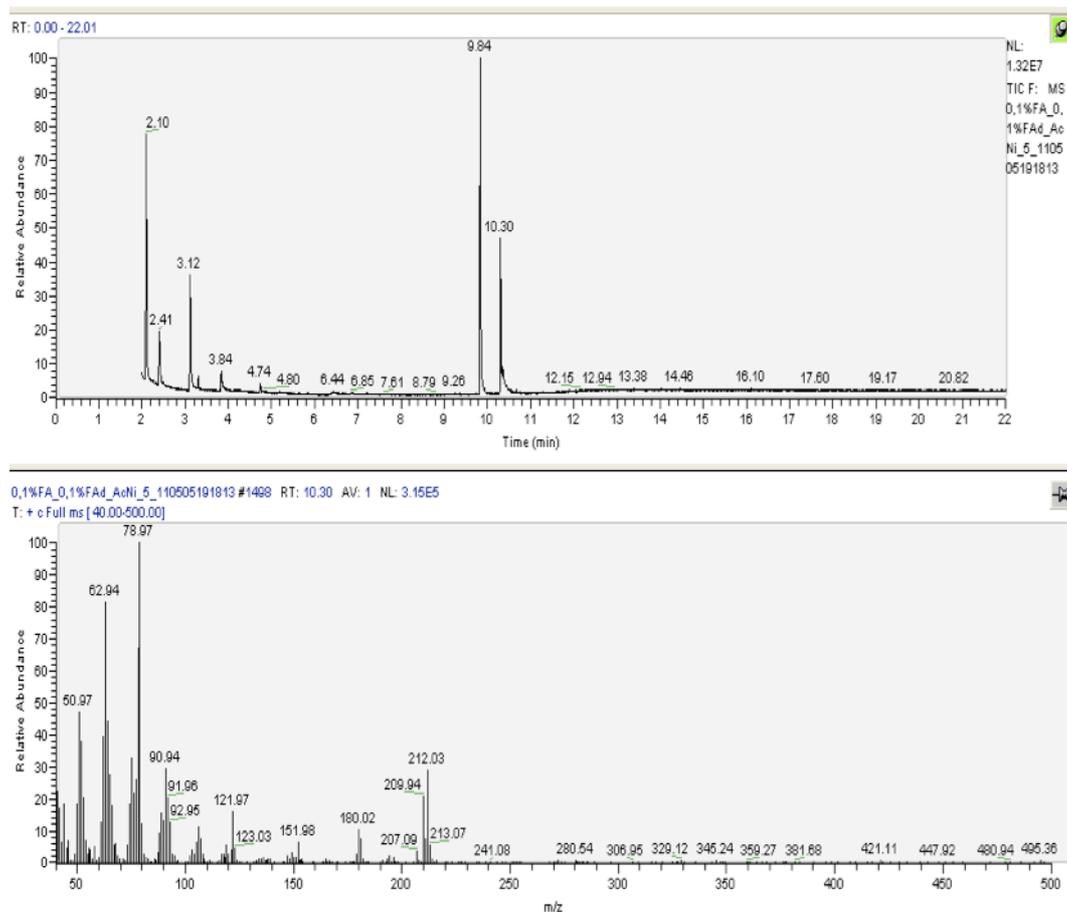


Abbildung 28: Massenspektrum einer 0,1%FA-0,1%d-FA-Lösung mit 1,56 mM DNPH derivatisiert. Die Retentionszeit (RT) von 9,84 min im oberen Bild ist die RT von Coffein. Die RT von 10,3 min im oberen Abschnitt ist die RT des FA-DNPHs und des d-FA-DNPHs. Im unteren Abschnitt des Bildes sind die Fragmente der beiden FA-DNPH-Komplexe zu sehen. Die Signalhöhe von m/z 212 und m/z 210 ist fast gleich hoch.

In jeder Probe waren beide internen Standards Coffein und d-FA nachweisbar. In der gesamten FA-Verdünnungsreihe von 0,5 % - 0,001 % FA konnte FA in Form des FA-DNPH-Komplexes mit m/z 210 nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Größe des Flächenintegrals von m/z 210 nahm mit abnehmender Konzentration der FA-Lösung ab. Ausnahme bildet die durchschnittliche Größe des Flächenintegrals von m/z 210 der 0,01 % FA-Lösung. Dies ist mit einer durchschnittlichen Größe von 138977 Flächeneinheiten größer als die durchschnittliche Größe der Flächenintegrale der beiden höheren FA-Verdünnungsstufen mit 0,025 % und 0,05 % FA, deren Größe bei rund 90000 Flächeneinheiten liegt (s. Tabelle 47).

Das durchschnittliche Verhältnis des Flächenintegrals der Masseneinheit 210 zu dem der Masseneinheit 212 nahm mit abnehmender FA-Konzentration kontinuierlich ab. Insgesamt haben sich alle Retentionszeiten etwas verkürzt, da die Säule gekürzt wurde. Die Fragmente

von FA-DNPH und d-FA-DNPH erscheinen jetzt nach einer Retentionszeit von 10,30 min und das Molekulation von Coffein mit m/z 194 nach 9,84 min.

Tabelle 47: Durchschnittliche Größe der Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194 von FA-Verdünnungsreihen in Acetonitril mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als Standard und mit 1,56 mM DNPH als Derivatisierungsreagenz. Das Verhältnis der Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 212 ist ebenfalls angegeben.

FA (%)	Durchschnittliche (n = 3) Größe des Flächenintegrals von m/z				Durchschnittliches Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
0,5	1031968	283197	105401	1288377	2,71
0,25	978709	249540	93402	1035958	2,46
0,1	731381	144018	104734	1605678	1,51
0,05	747511	98574	145644	1659317	0,72
0,025	932737	94517	255038	1158472	0,39
0,01	1814921	128977	519132	854718	0,28
0,005	1174577	72384	398730	2093185	0,18
0,0025	908131	44463	442026	1188284	0,08
0,001	837610	23391	478645	2101857	0,06

Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Kalibrierkurve einer FA-Standardverdünnungsreihe erstellt werden, die in Abbildung 29 dargestellt ist.

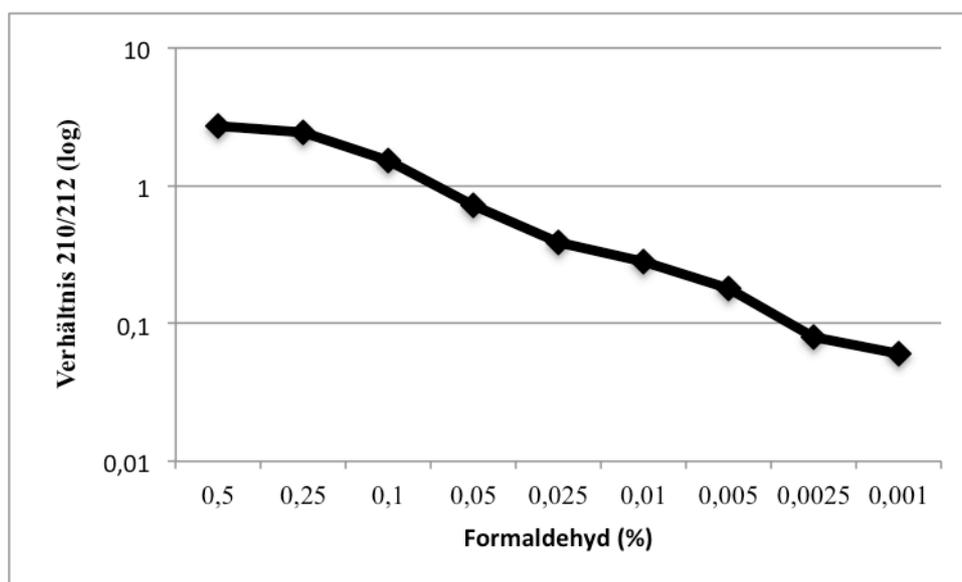


Abbildung 29: Kalibrierkurve einer FA-Verdünnungsreihe mit 0,1 % d-FA als interner Standard. Das Verhältnis der Flächenintegrale von m/z 210 zu m/z 212 ist im Bezug zur FA-Konzentration in einer logarithmischen Darstellung abgebildet.

Daneben wurden vier Proben einer 0,1 % d-FA-Lösung in Acetonitril mit 0,1 mg/ml Coffein ohne 12C-FA hergestellt und in der GC-MS gemessen, um zu sehen, ob in einer d-FA-Lösung ebenfalls der nicht deuterierte FA-Komplex mit der Masse 210 zu messen ist aufgrund des natürlichen Isotopenverhältnisses. Die Messungen ergaben bei m/z 210 einen kleinen Massenpeak. Auch hier liegt die Signalhöhe von m/z 210 wie bei der 0,001 % FA-Lösung der Verdünnungsreihe innerhalb des Basisrauschens. Das Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212 lag dabei immer unter 0,03. Der Mittelwert dieses Verhältnisses lag bei 0,015 (s. Tabelle 48).

Tabelle 48: Flächenintegrale sowie deren Mittelwerte von m/z 79, 210, 212 und 194 von vier 0,1 % d-FA-Lösungen mit 0,1 mg/ml Coffein als Standard und 1,56 mM DNPH zur Derivatisierung. Daneben ist noch das Verhältnis von m/z 210 zu m/z 212 angegeben.

d-FA (%)	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
0,1	786845	2855	208616	1457986	0,014
0,1	568209	5173	190347	1160193	0,027
0,1	812203	3902	219605	1486132	0,02
0,1	617088	0	288957	886299	0
MW 0,1	696086,25	2982,5	226881,25	1247652,5	0,015

6.2.5 Analytik von Inhaltsstoffen (FA) aus Zahnkompositen mittels GC-MS

6.2.5.1 FA-Nachweis in unpolymerisierten Kompositen

Nach Auflösen der unpolymerisierten Komposite in Acetonitril und sofortigen Messen konnte in keiner Paste der sieben Komposite ein deutlicher Massenpeak bei der Masseneinheit 210 nachgewiesen werden bzw. war die Signalhöhe von m/z 210 so gering, dass sie innerhalb des Basisrauschens lag. Der Massenpeak von 212, verursacht durch den deuterierten FA-DNPH-Komplex war in jeder Probe nachweisbar, die Derivatisierungsreaktion mit DNPH war demnach erfolgreich. Ebenso war der zweite interne Standard Coffein anhand des Massenpeaks 194 in jeder Probe nachweisbar. Das Verhältnis der Fläche von m/z 210 zu der von m/z 212, war im größten Fall 0,03 (s. Tabelle 49) und war damit nicht deutlich höher als bei einer reinen d-FA-Lösung. Bei dieser wurde mit 0,027 ein ähnlich großes Verhältnis gemessen. Demnach konnte der FA-DNPH-Komplex entsprechend dem natürlichen Isotopenauftreten von d-FA gemessen werden. Mittels GC-MS war folglich nach Auflösen der verschiedenen Kompositpasten in Acetonitril kein FA nachweisbar.

Tabelle 49: Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194 in unpolymerisierten dentalen Kompositen, die in Acetonitril mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interne Standards und mit 1,56 mM DNPH gelöst wurden. Daneben das berechnete Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212.

Komposit	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
Filtek™ Silorane	2375087	15786	1173911	3097713	0,013
Filtek™ Silorane	3125184	21782	1411145	4146339	0,015
Filtek™ Silorane	957769	0	472657	1640224	0
Filtek™ Supreme XT	1762735	13749	880102	2151623	0,016
Filtek™ Supreme XT	4929160	36813	2124003	4623498	0,017
Filtek™ Supreme XT	1169219	14490	542766	1386756	0,027
N'Durance® Flow	993349	6547	558732	1774439	0,012
N'Durance® Flow	1091032	8163	590585	1770510	0,014
N'Durance® Flow	822726	9397	387293	1280089	0,024
N'Durance® Norm	1086199	17392	572463	1294231	0,03
N'Durance® Norm	4857498	39528	2276092	4643145	0,017
N'Durance® Norm	2723501	18185	1286373	2704585	0,014
Tetric EvoCeram®	3114838	37518	1374193	3348517	0,027
Tetric EvoCeram®	4797345	41634	1903755	4409165	0,022
Tetric EvoCeram®	3468702	42239	1514670	3289429	0,028
Tetric EvoFlow®	1958375	0	475385	1163087	0
Tetric EvoFlow®	2326140	0	1010745	2303002	0
Tetric EvoFlow®	2780207	0	1026938	2486123	0
Voco Grandio Flow®	2609202	37516	1624118	3230478	0,023
Voco Grandio Flow®	1829159	23894	1029768	2786680	0,023
Voco Grandio Flow®	3067553	62345	4119294	6072686	0,015

6.2.5.2 FA-Nachweis im Eluat polymerisierter Komposite

Die Messung der Eluate der Komposite sofort nach Härtung ergab, dass kein bzw. nur ein Signal der Masse 210 innerhalb des Basisrauschens nachgewiesen werden konnte. Es liegt damit unter der Nachweisgrenze einer 0,001 % FA-Standardlösung. Das Verhältnis des Flächenintegrals der Masseneinheit 210 zu dem der Masseneinheit 212 ist so gering, dass es im Bereich des Verhältnisses 210/212 des d-FA alleine liegt und dem natürlichen Isotopenverhältnis von d-FA entspricht (s. Tabelle 48). Am höchsten war mit 0,034 das

Verhältnis 210/212 in einer Messung des Eluates von Tetric EvoFlow® (s. Tabelle 50), welches ebenfalls unterhalb des Verhältnisses 210/212 der FA-Nachweisgrenze von 0,06 (s. Tabelle 47) liegt und dem natürlichn Isotopenverhältnis einer 0,1 % d-FA-Standardösung ohne ¹²C-FA entspricht. In den Eluaten der Komposite ist demnach nach sofortigem Messen kein FA nachweisbar.

Tabelle 50: Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194 in den Eluaten von polymerisierten dentalen Kompositen direkt nach Härtung der Komposite. Sie wurden in Acetonitril mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interne Standards und mit 1,56 mM DNPH eluiert. Daneben das berechnete Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212.

Komposit	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
Filtek™ Silorane	593388	0	287097	1612246	0
Filtek™ Silorane	1424466	7882	675957	3236913	0,012
Filtek™ Silorane	1588734	9350	483048	908975	0,019
Filtek™ Supreme XT	1246104	8871	512477	4414061	0,017
Filtek™ Supreme XT	348367	0	120060	1155616	0
Filtek™ Supreme XT	727950	0	217236	1091228	0
Filtek™ Supreme XT	414173	0	200814	1297134	0
Filtek™ Supreme XT	584119	3837	296919	2695593	0,013
Filtek™ Supreme XT	467636	0	133421	1249433	0
N'Durance® Flow	637203	5645	300968	1731986	0,019
N'Durance® Flow	490850	0	249604	1178113	0
N'Durance® Flow	371641	0	169249	1326950	0
N'Durance® Norm	417145	4001	217152	1642260	0,018
N'Durance® Norm	2215962	13388	997207	1872354	0,013
N'Durance® Norm	1477889	10272	621002	1317970	0,017
Tetric EvoCeram®	474217	0	219269	1543217	0
Tetric EvoCeram®	359174	0	162826	1359074	0
Tetric EvoCeram®	538236	0	277722	3142422	0
Tetric EvoFlow®	723752	7160	341210	3104135	0,021
Tetric EvoFlow®	919751	10774	318945	1484438	0,034
Tetric EvoFlow®	1888655	0	546488	1030288	0
Voco Grandio Flow®	435380	0	217366	1049572	0
Voco Grandio Flow®	256183	0	115982	699960	0
Voco Grandio Flow®	800261	6460	404317	1362816	0,016

Es wurden eine zweite Messung der Eluate nach 50 Tagen (s. Tabelle 51) und eine dritte Messung nach 70 Tagen (s. Tabelle 52) durchgeführt, um zu sehen, ob in diesem Zeitraum FA eluiert wurde oder als Degradationsprodukt entsteht. In beiden Messreihen konnte ebenso wie in der ersten Messreihe kein Signal bei der Masseneinheit 210 bzw. eine nur geringe Signalthöhe gemessen werden. Das Verhältnis 210/212 entsprach damit dem natürlichen Isotopenverhältnis einer deuterierten FA-Lösung ohne FA. Es war demnach auch nach längerer Elution in Acetonitril kein FA in Form eines FA-DNPH-Komplexes mittels GC-MS nachweisbar.

Tabelle 51: Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194 in den Eluaten von polymerisierten dentalen Kompositen nach 50 Tagen. Elutionslösung war Acetonitril mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interne Standards und mit 1,56 mM DNPH zur Derivatisierung. Daneben das berechnete Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212.

Komposit	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
Filtek™ Silorane	414467	0	126704	863156	0
Filtek™ Silorane	323182	0	80876	765709	0
Filtek™ Silorane	308967	0	84889	1009768	0
Filtek™ Supreme XT	247652	0	64896	831413	0
Filtek™ Supreme XT	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Filtek™ Supreme XT	155081	0	44772	904607	0
Filtek™ Supreme XT	263262	0	68467	748448	0
Filtek™ Supreme XT	164187	0	34163	522951	0
Filtek™ Supreme XT	150769	0	37361	658045	0
N'Durance® Flow	263555	1874	64472	1592192	0,029
N'Durance® Flow	198532	0	53219	1470397	0
N'Durance® Flow	72198	0	24814	1404149	0
N'Durance® Norm	297051	0	78466	1264023	0
N'Durance® Norm	1182542	0	373159	n.n.	0
N'Durance® Norm	2105178	0	641612	n.n.	0
Tetric EvoCeram®	589443	0	157267	1636303	0
Tetric EvoCeram®	277950	2192	87388	1400370	0,025
Tetric EvoCeram®	180335	0	61919	757673	0
Tetric EvoFlow®	425270	0	124194	1382513	0
Tetric EvoFlow®	421378	2003	126880	1647700	0,016
Tetric EvoFlow®	1888655	0	546488	1030288	0
Voco Grandio Flow®	562340	0	171907	1434326	0
Voco Grandio Flow®	352238	1741	75656	1012694	0,023
Voco Grandio Flow®	320323	0	107328	1422745	0

n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 52: Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194 in den Eluaten von polymerisierten dentalen Kompositen nach 70 Tagen. Elutionslösung war Acetonitril mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interne Standards und mit 1,56 mM DNPH zur Derivatisierung. Daneben das berechnete Verhältnis des Flächenintegrals von m/z 210 zu dem von m/z 212.

Komposit	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
Filtek™ Silorane	456871	0	118480	890530	0
Filtek™ Silorane	511223	0	144558	851944	0
Filtek™ Silorane	477796	0	153983	896295	0
Filtek™ Supreme XT	812092	0	252415	1265515	0
Filtek™ Supreme XT	452490	0	102133	1214452	0
Filtek™ Supreme XT	557758	0	166651	790807	0
Filtek™ Supreme XT	518067	0	142068	802327	0
Filtek™ Supreme XT	367668	2432	93342	628159	0,026
Filtek™ Supreme XT	668131	0	194093	1289692	0
N'Durance® Flow	548884	0	135545	1537865	0
N'Durance® Flow	483331	0	128750	1287108	0
N'Durance® Flow	382762	0	111378	1367782	0
N'Durance® Norm	494303	1591	134276	945686	0,012
N'Durance® Norm	613122	0	158418	1113793	0
N'Durance® Norm	408393	2352	109293	818997	0,022
Tetric EvoCeram®	958110	0	254913	1376080	0
Tetric EvoCeram®	682885	0	204254	1116665	0
Tetric EvoCeram®	886158	3805	269270	1376625	0,014
Tetric EvoFlow®	791591	0	2325865	1072495	0
Tetric EvoFlow®	1711501	3868	443595	1880864	0,009
Tetric EvoFlow®	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Voco Grandio Flow®	653737	4214	139603	1006316	0,03
Voco Grandio Flow®	798264	0	238806	1251702	0
Voco Grandio Flow®	658798	3375	211928	961502	0,016

n.n. = nicht nachweisbar

7 Diskussion

7.1 γ -H2AX-Test

Nicht polymerisierte Inhaltsstoffe aus Kompositen wie (Ko)Monomere und Photoinitiatoren können aus der Kompositfüllung in die Umgebung diffundieren [40, 155]. Durch Abrasion beim Kauvorgang oder Zähneknirschen und durch Elution aufgrund von Speichel, Nahrungszufuhr und Getränke (insbesondere Alkohol) werden (Ko)Monomere aus der Füllung freigesetzt. Eluierte (Ko)Monomere können verschluckt werden und im Darm resorbiert werden [49-52], durch das Dentin bis zum Zahnnerv diffundieren und dabei in Kontakt mit Zellen des Zahnmarkes treten [43, 44] oder unmittelbar mit Zellen in der Mundhöhle wie z.B. die Gingivafibroblasten reagieren. Ein Abbauweg der (Ko)Monomere führt über die Intermediate Methacrylsäure und 2,3-Epoxymethacrylsäure [63]. In anderen Studien bewirkten (Ko)Monomere die Induktion von ROS [73, 74]. Epoxid-Verbindungen und ROS haben ein zytotoxisches und genotoxisches Potential [74, 79].

Aufgrund des oxidativen Metabolismus der (Ko)Monomere, bei dem Epoxide und ROS mit zytotoxischer und genotoxischer Wirkung entstehen, stellte sich die Frage, ob Antioxidantien die Toxizität von (Ko)Monomeren reduzieren können, indem sie die entstehenden reaktiven Spezies abfangen. In einer früheren Studie wurde anhand von verschiedenen Zellkulturlinien getestet, ob Antioxidantien die Zytotoxizität der (Ko)Monomere reduzieren können [156]. Es wurde dabei nachgewiesen, dass die Antioxidantien Asc, Vitamin E, bedingt auch Vitamin A und Harnsäure die Zytotoxizität von HEMA und TEGDMA in Zellkulturlinien reduzieren können. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Antioxidantien auf das DNA-DSB induzierende Potential von (Ko)Monomeren dentaler Komposite im γ -H2AX-Test bei HGF untersucht werden. Es wurde der γ -H2AX-Test zur Untersuchung der DNA-DSB gewählt, da dieser als qualitativer und quantitativer Nachweis von DNA-DSB in Zellen geeignet ist und mit diesem Test bereits in einer vorherigen Studie das DNA-DSB induzierende Potential verschiedener (Ko)Monomere dentaler Kompositen bei HGF nachgewiesen werden konnte [17]. Es wurden HGF als Zellkulturlinie gewählt, da sie als Bestandteil des Bindegewebes der Mundhöhle zu den am stärksten durch eluierte Kompositbestandteile exponierten Zellen zählen und da anhand dieser Zellkulturlinie bereits (Ko)Monomere erfolgreich im γ -H2AX-Test auf ihr genotoxisches Potential getestet wurden [17].

7.1.1 Auswahl der (Ko)Monomere und ihrer eingesetzten Konzentrationen

Es wurden die Monomere BisGMA und UDMA sowie die Komonomere EGDMA und GDMA untersucht, da sie häufig in dentalen Kompositen enthalten sind und oft aus diesen eluiert werden können und da für diese (Ko)Monomere in einer früheren Studie ein DNA-DSB-induzierendes Potential mittels γ -H2AX-Tests nachgewiesen werden konnte [17, 157]. Es werden dabei die gleichen Konzentrationen der Testsubstanzen verwendet wie in der vorherigen Studie: EC_{50} , $1/3 EC_{50}$ und $1/10 EC_{50}$. Der EC_{50} -Wert der einzelnen Substanzen wurde mittels XTT-Test ermittelt [77, 157]. Ein Drittel und ein Zehntel des EC_{50} -Wertes wurden berechnet. Es wurden für den γ -H2AX-Test mit diesen Werten Konzentrationen bis im millimolaren Bereich eingesetzt, da frühere Studien belegen, dass aus dentalen Kompositen freigesetzte (Ko)Monomere in Pulpazellen millimolare Konzentrationen erreichen können [53, 158].

7.1.2 Auswahl der Antioxidantien

Asc, Trolox als wasserlösliches Derivat von Vitamin E und Retinylacetat als wasserlösliches Derivat von Vitamin A wurden für diese Studie als Antioxidantien ausgewählt, da mit diesen der Einfluss auf die Zytotoxizität der (Ko)Monomere in einer früheren Studie getestet wurde [18]. Zusätzlich wurde als Antioxidantien Katalase, welches ein wichtiges antioxidativ-wirkendes körpereigenes Enzym darstellt und ACC gewählt. ACC besitzt aufgrund der Thiolgruppe ebenfalls eine antioxidative Wirkung und stellt eine Vorstufe von Glutathion dar, welches einer der wichtigsten körpereigenen antioxidativen Stoffe ist. ACC findet als Medikament weite Verbreitung, wo es v.a. als mukolytisches Medikament und als Antidot bei Paracetamol-Überdosierungen angewendet wird. Die verwendeten Konzentrationen der Antioxidantien (500 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M) wurden mit Ausnahme der Konzentrationen (bzw. der Enzymaktivität) von Katalase orientierend an bereits vorhandenen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe über den Einfluss von Antioxidantien auf die Zytotoxizität der (Ko)Monomere ausgewählt [156]. Die Konzentrationen von Katalase wurden anhand einer anderen Studie gewählt, in der Katalase in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml zu einem Medium für Neuroblasten dazugegeben wurde [159]. Für die Exposition von HGF mit Katalase wurden Katalase-Konzentrationen mit 10 μ g/ml (20 U/ml), 5 μ g/ml (10 U/ml), 1 μ g/ml (2 U/ml) und 0,5 μ g/ml (1 U/ml) untersucht.

Für die Kombination mit (Ko)Monomeren wurden die Antioxidantien Asc (100 μ M) und ACC (500 μ M) ausgewählt. Asc ist ein sehr häufig verwendetes Vitamin und ACC ein

gebräuchliches Arzneimittel. Die Auswahl der Konzentrationen von Asc (100 μM) und von ACC (500 μM) beruhen auf den Ergebnissen des $\gamma\text{-H2AX}$ -Tests dieser Antioxidantien ohne Zugabe von (Ko)Monomeren. Es wurde von den untersuchten Konzentrationen (50 μM , 100 μM , 200 μM und 500 μM) die höchste Konzentration gewählt, bei der keine vermehrten Schäden bei den Zellkulturzellen im Vergleich zu den Negativkontrollen entstanden.

7.1.3 $\gamma\text{-H2AX}$ -Test mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere

Ziel dieser Voruntersuchung war, die Konzentration der einzelnen Antioxidantien (Asc, ACC, Retinylacetat, Trolox und Katalase) zu ermitteln, mit der die HGF exponiert werden können, ohne dass vermehrt Zellschäden oder genotoxische Schäden im Vergleich zum Medium auftreten, insbesondere im Hinblick auf die Induktion von DNA-DSB. Die jeweils höchsten Konzentrationen von Katalase mit 10 $\mu\text{g/ml}$ und von Trolox und ACC mit jeweils 500 μM verursachten im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test keine zusätzlichen Foci bei HGF im Vergleich zu den Kontrollen. Sie zeigten also in keiner Konzentration toxische Effekte im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test und könnten deshalb in der höchsten angewendeten Konzentration eingesetzt werden.

Anders verhielt es sich bei Retinylacetat. Dort führten die beiden höchsten Konzentrationen von 500 μM und 200 μM zu toxischen Auswirkungen. Über 90 % der Zellen gingen während der Inkubation verloren. Zwar ist die Anzahl der induzierten Foci der Zellen, die noch vorhanden waren, nicht signifikant ($p < 0,05$) erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle, aber der Großteil der Zellen durch die hohe Verlustrate von $>90\%$ war hinsichtlich seines Foci-induzierenden Potentials nicht mehr zu beurteilen. Der Grund für die schädigende Wirkung von Retinylacetat kann in seiner hohen lipophilen Eigenschaft liegen. Als lipophiler Stoff passiert es wesentlich leichter die Zellmembran und auch den Zellkern [160, 161], so dass Retinylacetat in höherer Konzentration in der Zelle vorliegt als eine vergleichsweise hydrophilere Substanz oder ein Enzym wie Katalase, welches durch Diffusion nicht die Zellmembran durchdringen kann [162]. Trolox ist ebenfalls lipophil, aber in diesem Versuch konnte es in der höchsten Konzentration von 500 μM ohne Erhöhung der Anzahl an Foci im Vergleich zur Negativkontrolle angewendet werden und ohne vermehrten Zellverlust. Auch in anderen Zellkulturstudien konnten toxische Effekte von Vitamin A-Derivaten nachgewiesen werden [163-165]. So konnten in einer Zellkulturstudie anhand porcinen Thyreoidea-Zellen gezeigt werden, dass hohe Retinoid-Konzentrationen cytotoxisch wirken, indem Vitamin A in erster Linie den Zelltod durch Apoptose induziert, aber auch lysosmale Membranen zerstört [163]. Auch im Blastocysten-Stadium von Mäuse-Embryonen konnten durch Retinsäure (RA)

in einer Konzentration von 10 μM [164] cytotoxische Effekte durch Apoptose und Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden [165]. Andere Studien demonstrierten, dass es zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses und oxidativen Schadens durch hohe Vitamin A-Supplementation bei Ratten in verschiedenen Geweben, beispielsweise im Lungengewebe [166], in den Nieren von Muttertieren und Feten und im Hippocampus [167, 168] kommt. ROS werden gebildet und können den oxidativen Stress verursachen. Sie besitzen ein zytotoxisches und genotoxisches Potential [74, 125]. Die Genotoxizität von Vitamin A in Form von RA konnte unter anderem an einer Zellkulturstudie mit humanen Lymphozyten und einer murinen Zelllinie gezeigt werden. Dort induzierte RA durch Chromosomenstrangbruch und -austausch vermehrt die Bildung von Mikronuclei und zerstörte das Mikrotubulus-Netzwerk zur Zellreplikation und somit die Chromosomen-Orientierung und die Centrosom-Separation im Mitose-Stadium [169]. Der hohe Verlust an HGF durch Retinylacetat bei 500 μM und 200 μM in dieser Studie wäre so unter Berücksichtigung des oben beschriebenen toxischen Potentials von Vitamin A erklärbar.

Asc (500 μM) induzierte eine höhere Anzahl an DNA-DSB als Medium und verursachte ebenso wie 200 μM Asc einen höheren prozentualen Anteil an Zellen mit multiplen Schäden. Es wurde deshalb für die weiteren Versuche Asc in einer Konzentration von 100 μM verwendet. Das DNA-DSB induzierende Potential von 500 μM Asc könnte auf ein toxisches Potential von Asc für Zellkulturen schließen. Allerdings gilt Asc für den Organismus als toxisch unbedenklich [170]. Als wasserlösliches Vitamin ist eine Hypervitaminose nicht beschrieben, da überschüssige Asc schnell ausgeschieden wird. Zellkulturzellen können sich nicht durch Ausscheidung einer Asc-Überdosierung entziehen, weswegen es denkbar ist, dass bei Anwendung hoher Asc-Konzentrationen Asc zumindest für die Zellkultur toxisch ist. Asc ist ein Antioxidans und soll als starkes Reduktionsmittel die Oxidation anderer Substanzen verhindern und als Radikalfänger wirken, wichtig ist diese Eigenschaft zur Elimination von ROS. Aber Redoxreaktionen sind in jeder Zelle bei den meisten Stoffwechselfvorgängen, so auch zur DNA-Replikation und der Proteinbiosynthese wichtig. Es wäre denkbar, dass bei einer zu hohen Konzentration an Asc diese auch in die physiologisch notwendigen Redoxreaktionen eingreift und so zu Zell- und DNA-Schäden führt. So wurden v.a. in *in vitro*-Studien toxische Effekte durch Asc nachgewiesen [171-173]. In einem Zellkulturversuch mit humanen Lymphozyten konnten genotoxische Effekte von Asc anhand der Identifizierung verschiedener Chromosomen-Abnormalitäten gezeigt werden und bei höheren Asc-Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ konnte der Mitoseindex verändert werden [171]. Das Zellwachstum einer Leukämie-Zellkulturlinie wurde durch Zugabe von Asc (nicht

aber durch Zugabe der oxidierten Form Dehydroascorbat) gehemmt, wobei in dieser Studie postuliert wird, dass dieser Effekt von der Höhe der extrazellulären Asc-Konzentration abhängig ist [172]. Die Zugabe von Asc zu Zellkulturen soll nicht so effizient sein wie die von Dehydroascorbat und zu vermehrtem oxidativen Stress führen [173]. Oxidativer Stress durch ROS kann zu oxidativen DNA-Schäden, darunter auch Strangbrüchen führen [125]. Damit wären die höhere Anzahl an Foci, die durch Asc bei 500 μM induziert wurde, sowie der erhöhte Anteil an Zellen mit multiplen Schäden bei Asc mit 500 μM und 200 μM in dieser Arbeit erklärbar. Dass Asc cytotoxisch und genotoxisch auf Zellkulturen wirken kann, bestärkt eine Studie, in der bei der Leukämie-Zelllinie HL-60 DNA-Schäden, darunter auch Strangbrüche mittels COMET-Test und cytotoxische Effekte mittels Benzaminblau-Färbung nachgewiesen wurden [174]. Die erhöhte Anzahl an $\gamma\text{-H2AX}$ -Foci bei HGF nach einer sechsstündigen Exposition mit Asc bei 500 μM und der erhöhte Anteil an „multi damage“ Zellen bei 500 μM Asc und 200 μM Asc könnte auf ein genotoxisches Potential von Asc in Zellkulturen hindeuten.

Es gibt dagegen auch Studien, die einen oxidativen DNA-Schaden durch Asc widerlegen [175]. Um sicher eine Aussage treffen zu können, ob Asc bei HGF genotoxisch durch eine erhöhte Induktion von DNA-DSB wirkt, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, beispielsweise durch Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden, die unabhängig vom Nachweis des phosphorylierten H2AX sind. Denn H2AX kann auch bei endogenen Prozessen wie Alterungsprozessen und während der DNA-Replikation auftreten [146, 147, 176], sodass diese Prozesse ebenfalls zu der Bildung von $\gamma\text{-H2AX}$ -Foci führen. In einer anderen Studie konnte eine diffuse $\gamma\text{-H2AX}$ -Verteilung bei Zellen gefunden werden, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden und durch Nukleotid-Excisions-Reparaturfaktoren begründet worden ist [177]. Es sollte deshalb weiter abgeklärt werden, ob Asc vermehrt DNA-DSB induziert oder andere Prozesse in Gang setzt, die zur Foci-Bildung führen können.

Keines der fünf getesteten Antioxidantien (Asc, ACC, Retinylacetat, Trolox und Katalase) vermag die Foci-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant zu reduzieren. Dies bedeutet, dass keines der getesteten Antioxidantien einen positiven Einfluss auf unbehandelte HGF hinsichtlich der Zahl der DNA-DSB ausübt. Die generelle Supplementation durch Vitamine, wie sie gerne propagiert wird, ist aufgrund dieses Ergebnisses als kritisch zu bewerten.

7.1.4 γ -H2AX-Test mit (Ko)Monomeren und Antioxidantien

In dieser Arbeit konnte nur die höchste angewendete Konzentration der (Ko)Monomere, die dem EC_{50} -Wert im XTT-Test entspricht, signifikant ($p < 0,05$) mehr DNA-DSB als die Negativkontrolle induzieren. EGDMA stellt hiervon eine Ausnahme dar, da dort die beiden höchsten Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der induzierten Foci/Zelle führten, wobei anzumerken ist, dass auch ein höherer Zellverlust vorlag, was möglicherweise auf der Kombination aus einer zytotoxischen und/oder genotoxischen Schädigung beruhen kann.

Bei Einsatz von EC_{50} -Werte verursachte EGDMA mit durchschnittlich 5,36 Foci/Zelle die höchste Foci-Anzahl, gefolgt von BisGMA mit 4,05 Foci/Zelle, GDMA mit 2,57 Foci und UDMA mit 2,5 Foci. Es wurde in früheren Studien festgestellt, dass die Genotoxizität mit der lipophilen Eigenschaft positiv korreliert [178]. Dies ist dadurch zu erklären, dass lipophile Stoffe leichter und vermehrt in die Zelle eindringen können und so zu einer größeren Schädigung führen können. In einer Studie von Durner et al. [179] wurde der Nernstsche Verteilungskoeffizient von 64 eluierbaren Substanzen aus dentalen Kompositen bestimmt, unter anderem auch für die hier verwendeten (Ko)Monomere. Der Nernstsche Verteilungskoeffizient gibt das Verhältnis der Konzentration einer Substanz in Octanol zu dem der Konzentration dieser Substanz in Wasser (in diesem Fall 0,9 % Kochsalzlösung) an. Je höher dieser Koeffizient ist, desto lipophiler ist eine Substanz. Die in dieser Arbeit verwendeten (Ko)Monomere sind nach absteigenden Nernstschen Verteilungskoeffizienten aufgeführt [179]: EGDMA (3,3) > BisGMA (1,3) > UDMA (1,1) > GDMA (0,9). Der Verteilungskoeffizient in dieser publizierten Studie korreliert positiv mit der Höhe des DNA-DSB-induzierenden Potentials in der vorliegenden Studie. Ausnahme stellt UDMA und GDMA dar, wobei die Koeffizienten und ihre durchschnittlichen Anzahl induzierter Foci mit 2,57 bei GDMA und 2,5 bei UDMA nahezu gleich hoch sind. Trotzdem hängt das DNA-DSB-induzierende Potential und somit die genotoxische Eigenschaft nicht nur von der Lipophilie und dem damit verbundenen Nernstschen Verteilungskoeffizienten zusammen. Denn BisGMA mit 90 μ M und UDMA mit 100 μ M sind entsprechend ihrer EC_{50} -Werte in wesentlich geringeren Dosen eingesetzt worden als EGDMA mit 2720 μ M und GDMA mit 2500 μ M. Damit ist EGDMA z.B. in einer 30fach höheren Dosis eingesetzt worden als BisGMA. Dies bedeutet das BisGMA in einer 30 fach geringerer Konzentration als EGDMA ein vergleichbares DNA-DSB induzierendes Potential besitzt. Neben der lipophilen Eigenschaft müssen somit noch andere Faktoren zur genotoxischen und auch zytotoxischen Wirkung der (Ko)Monomere beitragen, beispielsweise unterschiedliche Metabolisierungswege, das Molekulargewicht [180], die chemische Struktur (z.B. handelt es

sich um Mono-, Di-, oder Trimethacrylatverbindungen oder sind andere/weitere chemische Gruppen enthalten, die zur Toxizität beitragen können). Die Molekulargewichte der vier verwendeten (Ko)Monomere betragen: BisGMA (512 g/mol) > UDMA (470 g/mol) > GDMA (228 g/mol) > EGDMA (198 g/mol). Das Molekulargewicht könnte deshalb erklären, warum BisGMA und UDMA in wesentlich geringeren Konzentrationen toxisch wirkt als GDMA und EGDMA.

Sowohl Asc in einer Konzentration von 100 μ M als auch ACC in einer Konzentration von 500 μ M führten zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der DNA-DSB, die durch (Ko)Monomere induziert wurden, welche im Vergleich zum Medium zu signifikanten Erhöhungen ($p < 0,05$) der Foci-Zahl führten. Wenn das (Ko)Monomer in einer bestimmten Konzentration ohne Antioxidans zu keiner deutlichen Erhöhung der Foci im Vergleich zum Medium führte, waren bis auf wenige Ausnahmen weder Asc noch ACC fähig, diese induzierte Foci-Zahl signifikant zu vermindern. Dies ist stimmig, da in diesem Fall keine Erhöhung der DNA-DSB im Vergleich zur Negativkontrolle vorlag und somit die Antioxidantien diese dann auch nicht reduzieren können, ebenso wie Asc und ACC auch nicht die Zahl der DNA-DSB der Negativkontrollen signifikant ($p < 0,05$) verringerte.

Die Fähigkeit der Antioxidantien, die DNA-DSB, die durch die (Ko)Monomere induziert wurden, zu reduzieren, deutet darauf hin, dass ROS und Epoxide auch an der Entstehung der DNA-DSB beteiligt sind. Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass (Ko)Monomere zu erhöhten ROS- und Epoxid-Gehalten führen, die sowohl zytotoxisch als auch genotoxisch wirken [15, 74]. Zudem wurde gezeigt, dass der oxidative Schaden durch ROS zu DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen führen kann [125]. Die im Metabolismus von (Ko)Monomere entstehenden ROS und Epoxide könnten durch Antioxidantien mit ihrer Wirkung als Radikalfänger und Reduktionsmitteln reduziert werden. Dies wurde auch in einer Studie postuliert, in der der Einfluss der Antioxidantien auf die Zytotoxizität von TEGDMA und HEMA untersucht wurde [18]. Die mögliche Reduktion der ROS und Epoxide durch die Antioxidantien würde die Fähigkeiten von Asc und ACC, das DNA-DSB induzierende Potential von (Ko)Monomeren zu reduzieren, erklären. Die Bildung von ROS und deren oxidativer Schaden ist schematisch in Abbildung 30 dargestellt. Der mögliche Abbau von ROS durch Antioxidantien wird am Beispiel von Asc und Hydroxylradikalen in Abbildung 31 gezeigt:

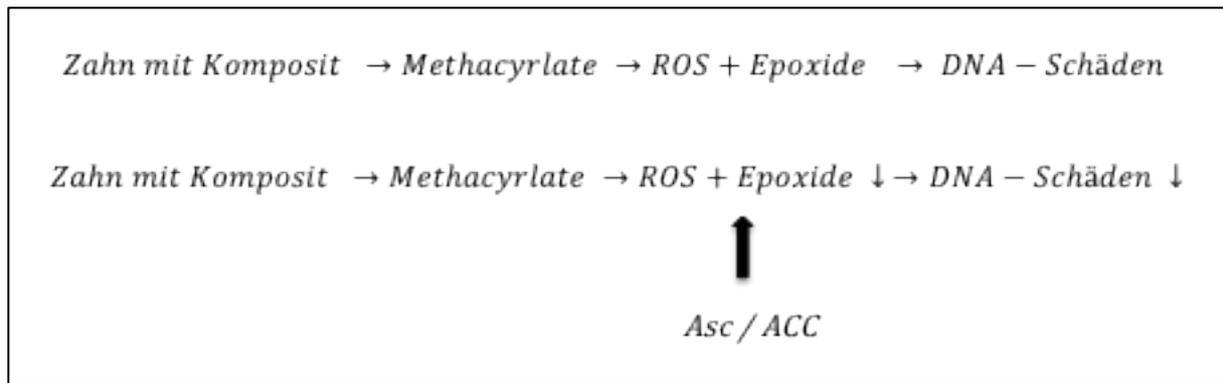


Abbildung 30: Schematische Darstellung von Methacrylat-Freisetzung aus einem eingesetzten Komposit. Im Metabolismus von Methacrylate entstehen ROS und Epoxide. Die entstehenden ROS und Epoxide werden durch Asc bzw. ACC reduziert, die dann weniger DNA-Schäden verursachen.

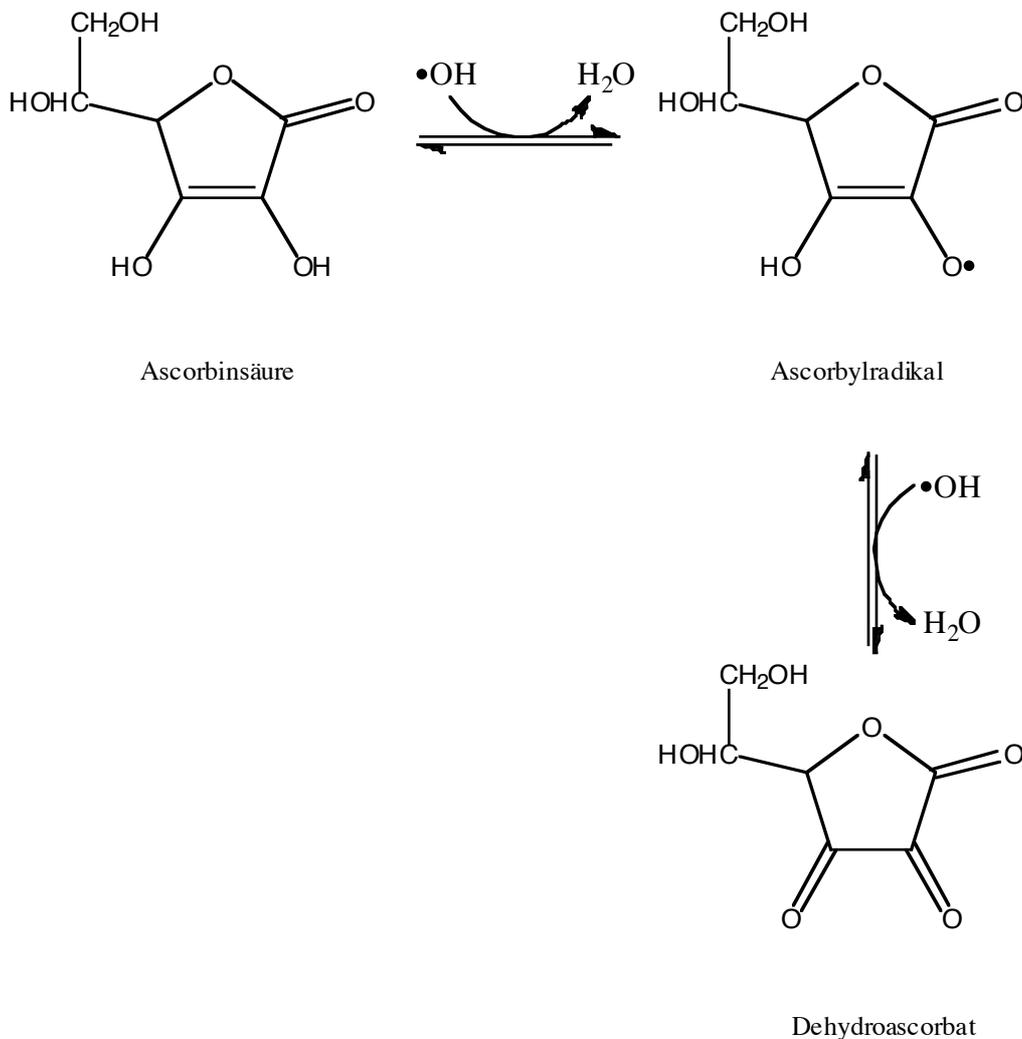


Abbildung 31: Reaktion von Ascorbinsäure (Asc) mit dem Hydroxylradikal $\text{OH}\bullet$ als Beispiel einer ROS: Asc reagiert unter Deprotonierung zum Ascorbylradikal, das mit einem weiteren Hydroxylradikal unter erneuter Deprotonierung zu Dehydroascorbat reagiert.

7.1.5 Ausblick

Alle vier (Ko)Monomere BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA konnten deutlich die Anzahl induzierter Foci/Zelle erhöhen. Sowohl Asc also auch ACC konnten die DNA-DSB, die durch die (Ko)Monomere verursacht wurden, reduzieren. Die Fähigkeit, die Zahl der Foci zu verringern, war bei Asc und ACC annähernd gleich, so dass beide Antioxidantien die gleiche Protektivität aufweisen. Es ist die Frage, wie man die Fähigkeit der Antioxidantien, die induzierten DNA-DSB von (Ko)Monomeren zu verringern und somit die toxischen Eigenschaften dentaler Komposite zu reduzieren, nutzen kann. Die Möglichkeit, Antioxidantien zu den unpolymerisierten dentalen Kompositen zu geben, um eine lokale protektive Wirkung direkt am Ort der Komposite zu entfalten, ist praktisch nicht möglich, da die Antioxidantien die Polymerisationsvorgänge als Radikalfänger stören und dadurch vermehrt unpolymerisierte (Ko)Monomere zurück bleiben würden. Dadurch könnten sich die Antioxidantien negativ auf die mechanischen und chemischen Eigenschaften dentaler Komposite auswirken. Als Radikalfänger könnten sie die Härtung der Komposite, die durch radikalische Polymerisation erfolgt, behindern, da sie durch Abbau der Radikale den Kettenabbruch bedingen könnten.

Zudem reicht eine rein lokale Wirkung der Antioxidantien zum Schutz vor möglichen schädlichen Kompositbestandteile nicht aus, da Kompositbestandteile resorbiert und über die Blutbahn im gesamten Organismus verteilt werden können [51, 57]. Dort werden die Kompositbestandteile metabolisiert, wobei ROS und Epoxide entstehen [62, 63, 73]. Deshalb sollten die Antioxidantien systemisch verabreicht werden. Die einfachste und praktisch gut durchführbare Variante ist die Einnahme von Asc oder ACC vor einem Eingriff. Das Antioxidans kann so im Darm resorbiert werden, von dort verteilt es sich systemisch im Organismus, wo es bei Bedarf seine protektive Wirkung als Antioxidans entfalten kann.

Urcan et al. [17] hat in einer Studie eine worst-case Risikoabschätzung für BisGMA gemacht: Wenn im ungünstigsten Falle alle 32 Zähne mit einem BisGMA-enthaltenden dentalen Komposit wie Filtek™ Supreme XT gefüllt werden, könnten ungefähr 2 µM BisGMA am Tag eluiert und resorbiert werden. Wenn man beim Menschen eine tägliche Speichelproduktion von 1,2 l/Tag annimmt, wird die eluierte BisGMA-Menge von 2 µM durch den Speichel auf 1,7 µM BisGMA reduziert. In der vorliegenden Studie wurden mit 90 µM BisGMA signifikant ($p < 0,05$) die Zahl der induzierten DNA-DSB in HGF erhöht. Diese Konzentration ist 53 mal höher als die eluierte und durch Speichel verdünnte BisGMA-Menge mit 1,7 µM. Praktisch sind vermutlich nicht alle Zähne mit dentalen Kompositen gefüllt (das gilt insbesondere in der Tiermedizin), sodass dadurch das Risiko einer schädigenden Wirkung

durch dentale Komposite weiter gesenkt wird. Ohne Verdünnung des Speichels ist die eluierte BisGMA-Menge von 2 μM noch 45 fach niedriger als die Konzentration von 90 μM BisGMA, die in dieser Studie zur vermehrten DNA-DSB führte. Alkohol hingegen kann die Elution unpolymerisierter (Ko)Monomere erhöhen. In einer Studie konnte in dem polymerisierten Komposit Tetric Ceram® (0,085 g) in einem 75 % Ethanol-Wasser-Gemisch kurzfristig 310 μM BisGMA eluiert werden [181]. Es ist hinzuzufügen, dass bei Alkoholkonsum der Alkoholgehalt in der Regel niedriger als 75 % ist und die Kontaktzeit zum Komposit kürzer ist als in der Studie [181].

Neben Patienten ist auch das zahnärztliche Personal gefährdet, da dieses täglich mit dentalen Kompositen und deren Bestandteilen, insbesondere auch in unpolymerisierter Form, in Kontakt kommt und Schutzmaßnahmen wie Handschuhe und Mundschutz nur begrenzt davor schützen [55]. Aber auch hier stellt sich die Frage, auf welchem Weg die Antioxidantien ein mögliches Risiko beim Personal reduzieren könnten. Wenn Kompositbestandteile resorbiert werden, werden sie im Organismus verteilt. Es würde dann nur eine ausreichende systemische Versorgung mit Antioxidantien zur Reduktion der DNA-DSB in Frage kommen. Dies wäre in Form einer oralen Asc- und/oder ACC-Supplementation möglich.

Aufgrund des vermehrten Anstiegs von Krebsformen der Mundschleimhaut bei jungen Erwachsenen (s.2.1.4.2.3), die nicht im Zusammenhang mit Tabak- oder Alkoholkonsum stehen, werden unter anderem Xenobiotika wie kunststoffbasierende Zahnmaterialien als Risikofaktoren der Tumorentstehung diskutiert. Das Risiko einer Tumorentstehung durch Zahnmaterialien ist fraglich und sollte noch weiter untersucht werden. Das DNA-DSB induzierende Potential dentaler Kompositmaterialien gibt Hinweise auf mögliche Gefahren, da DNA-DSB zu irreversiblen Schäden führen können [15, 83].

Da der qualitative und quantitative DNA-Schaden nach Exposition mit unpolymersisierten (Ko)Monomeren für den Organismus nicht bekannt ist, ist eine Supplementation mit Asc oder ACC bei Bedarf, beispielsweise vor einem Eingriff, prophylaktisch zu erwägen, da beide Antioxidantien die Entstehung von DNA-DSB verhindern können. Wenn man wieder die worst-case Situation betrachtet, bei der alle 32 Zähne mit BisGMA-haltigen Kompositen gefüllt sind, würde der Organismus unter Berücksichtigung der Speichelproduktion einer eluierten BisGMA-Menge von 1,7 μM ausgesetzt, die 53 fach geringer ist als 90 μM BisGMA, welches in der Studie vermehrt DNA-DSB induzierte. Asc hat in dieser Arbeit die durch 90 μM BisGMA induzierten DNA-DSB um das ca. 2-fache reduziert. Dies bedeutet, dass Asc das Risiko halbiert. Allerdings ist zu sagen, dass die *in-vitro*-Ergebnisse nicht einfach *in-vivo* auf den Organismus übertragen werden können. Der normale Tagesbedarf an Asc

beträgt 100 mg beim Menschen. Tiere können bis auf Primaten und Meerschweinchen Asc selbst synthetisieren. Der Tagesbedarf kann durch Belastungen, z. B. körperliche Anstrengungen, Tumore und Röntgenstrahlungen bis zu maximal 300 mg ansteigen. Eine Supplementation von mehr als 300 mg ist deshalb nicht nötig, insbesondere da die Resorptionsquote von Asc mit steigender Dosis abnimmt und überschüssige Asc über den Urin ausgeschieden wird [182]. Vor einem zahnärztlichen Eingriff, bei dem Kompositmaterialien verwendet werden, ist eine orale Asc-Supplementation bis zu 300 mg zur sicheren Tagesbedarfdeckung zu erwägen. Eine Erhöhung der DNA-DSB, wie in der Zellkulturstudie dieser Arbeit durch 500 μM Asc verursacht wurde, wäre mit dieser Asc-Supplementation nicht zu befürchten, da überschüssiges Asc anders als in der Zellkultur ausgeschieden wird. Zu bedenken ist allerdings, dass als Nebenwirkung einer überschüssigen Asc-Einnahme über längere Zeit bei Prädisposition Nierensteine aufgrund des Asc-Metaboliten Oxalsäure auftreten können [182]. Eine übermäßige Supplementation aller Antioxidantien ist für diesen alleinigen Zweck äußerst kritisch anzusehen, gerade im Hinblick auf die Ergebnisse im Vorversuch mit Retinylacetat. Die zellschädigende Wirkung von Retinylacetat im Versuch bestätigt, dass lipophile Vitamine wie Vitamin A und E überdosiert toxisch wirken. Zudem hat Vitamin E in neueren Studien seine schützende Wirkung vor Krebsentstehung teilweise aberkannt bekommen [183, 184].

7.2 Analytik von FA in Zahnkompositen mittels GC-MS

Obwohl FA seit Beginn der achtziger Jahre als gesundheitsgefährdender Schadstoff gilt und FA bereits im Jahr 2004 von der Internationalen Agentur für Krebsforschung der Weltgesundheitsorganisation als „für den Menschen krebserregende“ Substanz eingestuft wurde, ist FA weit verbreitet als natürlich vorkommender Stoff in Atmosphäre und Organismen als auch als industriell verwendeter Stoff. Aufgrund dieser weiten Verbreitung von FA, stellt sich die Frage, ob FA aus dentalen Kompositen freisetzbar ist oder ob FA beim Härten von dentalen Kompositen entsteht und dann freigesetzt wird. Die Untersuchung dentaler Komposite in Hinblick auf eine mögliche FA-Freisetzung ist nicht nur wegen der kanzerogenen Eigenschaft von FA von Bedeutung, sondern auch wegen der Eigenschaft von FA, Allergien, unter anderem Kontaktdermatiden, Haut-, Atemwegs- oder Augenreizungen verursachen zu können [20, 185] und würde damit zur weiteren Aufklärung der Biokompatibilität dentaler Komposite beitragen, insbesondere, da über zunehmende Unverträglichkeiten gegenüber Kompositen, die methacrylat-basierende Monomere enthalten,

berichtet wird. Diese äußern sich in Haut-/Schleimhautreizungen wie Kontaktdermatiden, Ekzeme, Gingivitis bis hin zum allergischen Asthma [7, 9, 31, 186]. Der quantitative Nachweis von FA aus Eluaten polymerisierter Kunststoffüllungen würde weitere wichtige Hinweise auf die Verträglichkeit dentaler Komposite geben. In einer älteren Studie aus dem Jahre 1988 konnte in den damaligen Kompositen mittels High-Performance Liquid Chromatographie (HPLC) und photometrischer Bestimmung FA nachgewiesen werden [97], ebenso wurden in anderen Studien die Freisetzung von FA aus Wurzelkanalversiegeler und in Polymeren für Zahnprothesen untersucht [98, 99, 187]. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob aus modernen dentalen unpolymersierten und polymerisierten Kompositen FA freigesetzt werden kann. Es wurde dafür der quantitative Nachweis von FA mittels GC-MS gewählt, da die Untersuchung eluierbarer Substanzen aus Kompositkunststoffen in dieser Arbeitsgruppe mit der Methodik der GC-MS erfolgt. Bei einem FA-Nachweis aus dentalen Kompositkunststoffen mittels GC-MS könnte man beide Untersuchungen kombinieren. Dafür musste erst eine Methode entwickelt werden, in der FA im nasschemischen Verfahren in unpolymersierten Kompositen und in den Eluaten polymerisierter Komposite mittels GC-MS quantitativ nachweisbar ist.

7.2.1 Analysemethode für FA mittels GC-MS

7.2.1.1 Derivatisierung von FA mit DNPH

FA sollte für den quantitativen Nachweis mit DNPH derivatisiert werden und der entstehende FA-DNPH-Komplex mittels GC-MS gemessen werden. Die Methode der Derivatisierung mit DNPH wurde in mehreren Studien als Nachweismethode für FA herangezogen [97, 188-190], meist erfolgt die Messung mittels HPLC. In zwei dieser Studien wurde FA mit DNPH derivatisiert und mittels GC-MS gemessen [188, 189]. Allerdings wurde in diesen Studien der FA-DNPH-Komplex in einem aufwändigeren Extraktionsverfahren von der wässrigen Phase in Pentan überführt, eingetrocknet unter Stickstoff und in Chloroform wieder aufgenommen. Dann erst erfolgte die Messung in der GC-MS. Ziel war die Entwicklung einer Nachweismethode ohne aufwändige Extraktionsschritte, deshalb wurde FA durch Zugabe von DNPH derivatisiert und diese Lösung direkt in der GC-MS gemessen. Es wurde mit einer DNPH-Konzentration von 15,6 mM in einer 1 N HCl-Lösung eine wesentlich höhere Konzentration an DNPH zur Derivatisierung verwendet als in der Literatur beschrieben. Dort wurde DNPH in 1 N HCl in einer Konzentration von 1,56 μ M gelöst. Es wurde in dieser Arbeit bewusst eine höhere Konzentration gewählt, da nur 50 μ l DNPH-Reagenz statt 100 μ l zu den 1000 μ l Proben gegeben wurde und sicher gestellt werden sollte, dass genug DNPH-

Moleküle zur Derivatisierung von FA zur Verfügung standen. Es konnte ohne die Extraktionsschritte ebenfalls der FA-DNPH-Komplex anhand des Signals der Masseneinheit 210, welches dem Molekülion von FA-DNPH entspricht, mittels GC-MS nachgewiesen werden.

FA kann mittels GC-MS nur durch Derivatisierung nachgewiesen werden, da es mit einem Molekulargewicht von 30 g/mol an der unteren Nachweisgrenze des MS und im Hintergrundrauschen mit Substanzen aus der Luft liegt. Die Derivatisierung von FA mittels DNPH hat den Vorteil, dass relativ geringe Mengen an FA nachgewiesen werden können [185] und der entstehende FA-DNPH-Komplex stabil ist im Vergleich zum flüchtigen FA.

Die Änderung des Lösungsmittels von DNPH von HCl zu EtOH ist dadurch begründet, dass in den ersten Messungen kein FA-DNPH nachweisbar war oder das gemessene Flächenintegral des FA-DNPH-Komplexes sich nicht mit der Konzentration änderte. Es stellte sich die Frage, ob die Derivatisierungsreaktion vollständig ablief. Dafür wurde ein erhältlicher FA-DNPH-Komplex in EtOH gelöst und mittels GC-MS gemessen. Da dabei höhere Werte des Signals bei der Masse 210 erreicht werden konnten, was einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit entspricht, wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen DNPH direkt in EtOH verdünnt wurde statt in 1 N HCl. Der FA-DNPH-Komplex konnte in diesen Versuchen aufgrund der besseren Empfindlichkeit in niedrigeren FA-Lösungen nachgewiesen werden. Von Vorteil war bei der Verdünnung von DNPH in EtOH, dass DNPH bereits im Lösungsmittel enthalten war, bevor die FA-Verdünnungsreihe in EtOH erstellt wurde und bevor EtOH zu den Kompositen gegeben wurde. So konnte freigesetztes FA direkt derivatisiert werden. Die Umstellung des Lösungsmittels von EtOH zu Acetonitril bewirkte eine weitere Steigerung der Nachweisempfindlichkeit (auf 10,8 µg/ml) und eine bessere Löslichkeit von FA und DNPH.

Der FA-DNPH-Komplex zerfällt im Massenspektrometer durch EI in folgende Fragmente m/z: 210, 180, 152, 122, 79, 63 und 51. In Anlehnung an die Fragmentation von DNPH-Derivaten mit Carbonylkomponenten [191] ist in Abbildung 32 die Fragmentationssequenz von FA-DNPH und die Struktur der identifizierten Fragmente dargestellt.

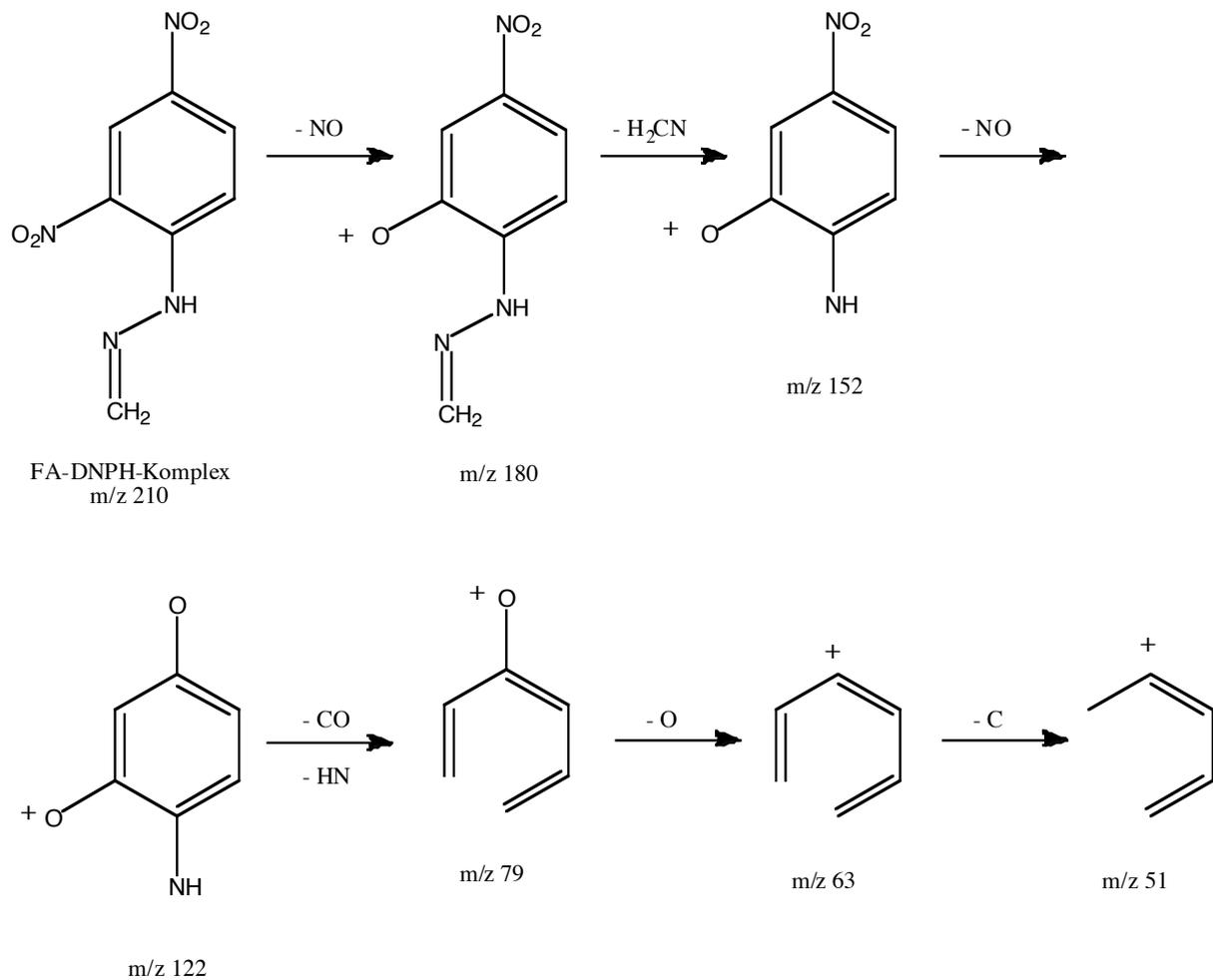
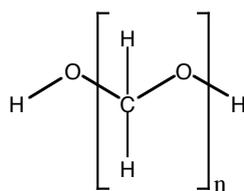


Abbildung 32: Fragmentationssequenz und identifizierte Fragmentationen des FA-DNPH-Komplexes im Massenspektrometer nach Elektronenstoßionisation (EI)

7.2.1.2 Lösungsverhalten von Paraformaldehyd

Es wurde erst mit Paraformaldehyd-Pulver versucht, eine FA-Lösung herzustellen und damit eine Standard-Verdünnungsreihe zu erstellen. Paraformaldehyd ist ein Polymer von FA (s. Abbildung 33) und liegt in Form eines weißen Pulvers vor.



Paraformaldehyd

Abbildung 33: Strukturformel von Paraformaldehyd, in der Regel ist der Polymerisationsgrad von Paraformaldehyd $n = 8-100$

Paraformaldehyd hat gegenüber FA den Vorteil, dass es nicht flüchtig ist und als Pulver gut gelagert werden kann. Paraformaldehyd ist in Wasser schlecht löslich [192, 193] und wird nur in leicht saurem Milieu (z.B. durch HCl) oder unter Erhitzen in Wasser gelöst. Die Lösung von Paraformaldehyd in leicht saurem Milieu kommt für die direkte GC-MS-Messung ohne Extraktion nicht in Frage, da durch Zugabe von HCl und späterem Neutralisieren mit NaOH Salze (NaCl) in der Lösung enthalten sind und diese eine GC-MS Messung stören. Deshalb wurde zunächst versucht, Paraformaldehyd durch Erhitzen in MeOH zu lösen. Das Erhitzen der Lösung war nicht unproblematisch, da FA, welches flüchtig ist, entweichen kann und damit der FA-Gehalt in der Lösung falsch niedrig ist. Außerdem liegt der Siedepunkt von MeOH bei 65 °C, so dass MeOH nicht stark zu erhitzen war.

Aus diesem Grund wurde versucht, Paraformaldehyd parallel zur Erwärmung im Ultraschallbad ohne Erhitzen in MeOH zu lösen. Paraformaldehyd ging in MeOH besser mithilfe des Ultraschallbades in Lösung als durch Erhitzen. Dies ist auch an den höheren Flächenintegralen der Masseneinheiten 210 und 79 des FA-DNPH-Komplexes in den GC-MS Messungen beider Lösungen zu erkennen (s. Tabelle 30 und Tabelle 31).

Da Paraformaldehyd in MeOH mittels des Ultraschallbads nur sehr langsam zu lösen war und der FA-DNPH-Komplex mittels GC-MS nicht in jeder Verdünnungsstufe nachgewiesen werden konnte, wurde Paraformaldehyd in EtOH gelöst. Das Lösen von Paraformaldehyd in EtOH erfolgte mit Hilfe des Ultraschallbads ohne Zufuhr von Wärme, beruhend auf den Ergebnissen der Lösungsversuche von Paraformaldehyd in MeOH. Paraformaldehyd ging im Ultraschallbad in EtOH wesentlich schneller zu lösen als in MeOH. Zudem war in jeder Paraformaldehyd-Verdünnungsstufe der FA-DNPH-Komplex nachweisbar.

Der Versuch, den FA-DNPH-Komplex in Hexan zu überführen wurde deshalb durchgeführt, da man, falls dies erfolgreich wäre, FA auf den üblichen Weg mit Natronlauge und Salzsäure lösen könnte. Die Salze würden nicht in die organische Hexan-Phase übergehen, die Hexan-Phase mit dem FA-DNPH-Komplex könnte dann ohne störende Salze mittels GC-MS

gemessen werden. In diesem Versuch war es nicht möglich, den FA-DNPH-Komplex in die organische Hexan-Phase zu überführen. Dies war schon optisch sichtbar, da sich die organische Hexan-Phase durch den gelben Komplex nicht gelblich färbte und wurde durch die GC-MS-Messung bestätigt, bei der keine Signale bei m/z 210 und m/z 79 zu finden waren.

Es war in keiner Messreihe möglich, eine FA-Verdünnungsreihe aufzustellen, bei deren Messung der FA-DNPH-Komplex proportional zur Konzentration von FA abnahm. Zudem lag die Nachweisgrenze auch sehr hoch. Vor allem aufgrund der durchweg sehr niedrigen Flächenintegrale von m/z 210 mit meist 100000 Flächeneinheiten oder niedriger, lag die Vermutung nahe, dass Paraformaldehyd zwar optisch, aber auf molekularer Ebene nicht vollständig gelöst war, so dass zum Teil noch Di- bzw. Oligomere vorlagen (s. Abbildung 34 und Abbildung 35), wodurch die Zahl der FA-Moleküle reduziert wurde und damit die tatsächliche FA-Konzentration niedriger war.

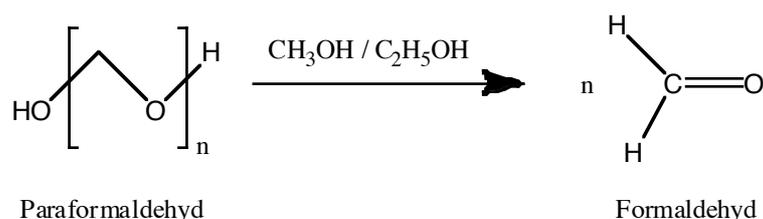


Abbildung 34: Paraformaldehyd wird in MeOH bzw. EtOH in FA gelöst. Die Lösung läuft im optimalen Fall vollständig ab.

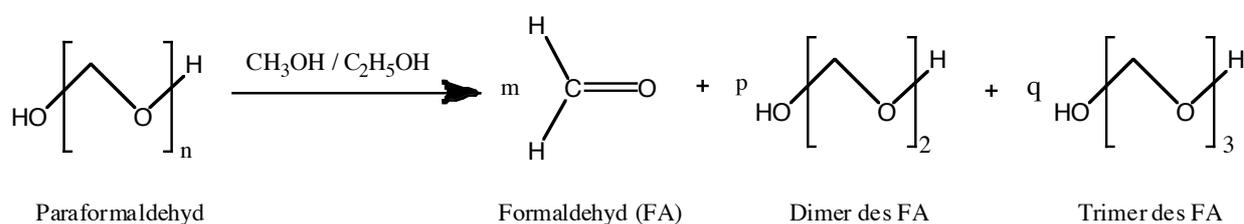


Abbildung 35: Paraformaldehyd wird in MeOH bzw. EtOH nicht vollständig in molekulares Formaldehyd gelöst (m , p und q gibt die Anzahl der verschiedenen Moleküle an). Es entstehen auch Di- und andere Oligomere. In dieser Reaktion sind beispielsweise neben m Molekülen FA auch p Dimere und q Trimere des FA entstanden.

Aufgrund der Vermutung, dass Paraformaldehyd nicht vollständig in EtOH oder MeOH gelöst wird, wurde mit einer kommerziell erhältlichen FA-Lösung (= Formalin) weitergearbeitet.

7.2.1.3 FA-Lösung (Formalin)

Bei der Erstellung einer FA-Verdünnungsreihe mit Formalin konnte FA in Form des FA-DNPH-Komplexes in den FA-Konzentrationen von 1 % bis 0,01 % FA nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Flächenintegrale des Fragmentes von m/z 210 für den FA-DNPH-Komplex bei der FA-Verdünnungsreihe mit Formalin wesentlich höher war als bei der FA-Verdünnungsreihe mit Paraformaldehyd, erhärtet den in 7.2.1.2 genannten Verdacht, dass Paraformaldehyd nicht vollständig in molekulares FA gelöst wurde. Deshalb wurde für alle weiteren Versuchen Formalin verwendet. Neben der Herstellung einer FA-Standardverdünnungsreihe sollte ein interner Standard etabliert werden.

7.2.1.4 ^{13}C -FA als interner Standard

Die Versuche mit ^{13}C -markierten FA wurden durchgeführt, um ^{13}C -FA als internen Standard zu verwenden. Mit DNPH derivatisiertes ^{13}C -FA zeigt mit 10,4 min die gleiche Retentionszeit wie der ^{12}C -FA-DNPH-Komplex. Der Molekülpeak des Mutterions liegt hier jedoch nicht bei m/z 210, sondern bei der Masseneinheit 211, m/z 79 ist bei dem ^{13}C -FA-DNPH-Komplex genauso zu finden wie beim ^{12}C -FA. Als interner Standard ist ^{13}C -FA gut geeignet, da sich ^{13}C -FA nur aufgrund des schwereren Kohlenstoffatoms von FA unterscheidet. Aufgrund der gleichen Struktur reagiert es genauso mit DNPH (s. Abbildung 36). Der kinetische Isotopeneffekt kann bezüglich der Reaktionszeit der Derivatisierung von ^{13}C -FA und DNPH vernachlässigt werden. Aus diesem Grund kann man die Konzentration von FA unter Einbeziehung des Messergebnisses des internen Standards ^{13}C -FA, von dem die Konzentration bekannt ist, berechnen, da die Bildung des ^{12}C -FA-DNPH-Komplexes gegenüber der Bildung des ^{13}C -FA-DNPH-Komplexes kinetisch nicht bevorzugt wird und der Gehalt an ^{13}C -FA-DNPH-Komplex dem Gehalt an ^{13}C -FA entspricht.

Daneben dient der interne Standard zur Beurteilung, ob die GC-MS-Messung richtig abgelaufen ist (technische Validation des Messvorgangs), wenn das Flächenintegral des Standards im üblichen Messbereich liegt. Mit ^{13}C -FA als interner Standard hat man neben der Geräte- und Messkontrolle auch den Vorteil, eine Aussage darüber zu treffen können, ob die Derivatisierung (chemische Validation) erfolgreich abgelaufen ist, da ^{13}C -FA ebenso mit DNPH reagiert wie ^{12}C -FA. Ist kein Signal der Masse 210 messbar, aber ein Signal der Masse 211, war die Derivatisierung erfolgreich und es ist kein FA in einer messbaren Konzentration in der Probe vorhanden. CF dient lediglich der Überprüfung der ordnungsgemäßen Funktion des Meßvorganges und ist damit ein weiterer Standard der

technischen Validation. CF wurde als weiterer interner Standard eingesetzt, da dieser bei den bisherigen Untersuchungen dentaler Komposite auf eluierbare Substanzen mittels GC-MS zur Identifizierung und Quantifizierung in dieser Arbeitsgruppe als interner Standard angewendet wird.

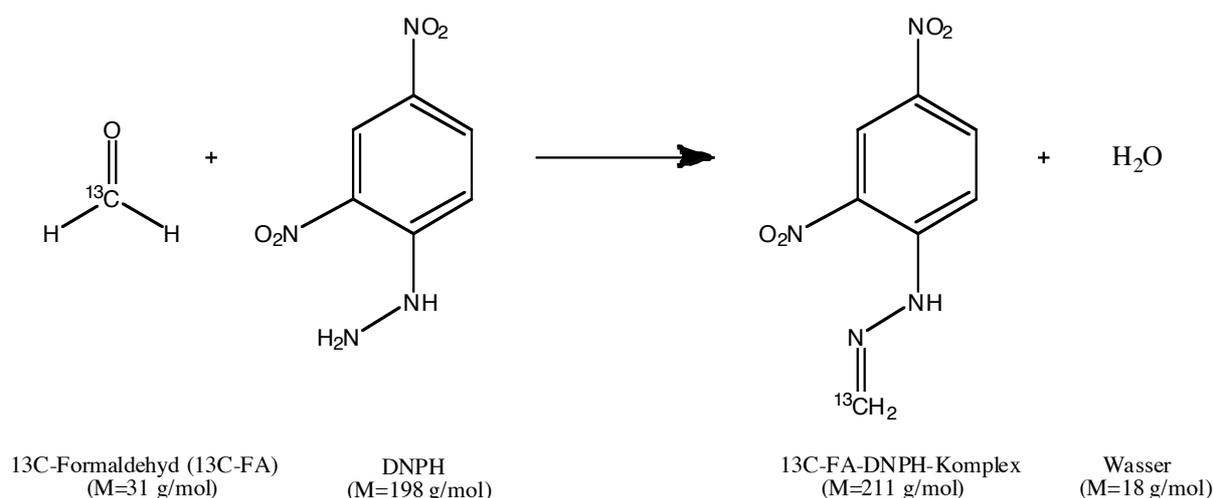


Abbildung 36: Derivatisierung von ^{13}C -markiertem Formaldehyd (^{13}C -FA) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Unter Abspaltung von Wasser entsteht ^{13}C -FA-DNPH, welches eine Molekülmasse von 211 besitzt.

Die Messergebnisse der Proben, in denen FA und ^{13}C -FA im gleichen Verhältnis gelöst waren, ergaben, dass die Intensität des Signals von m/z 211, also von dem ^{13}C -FA-DNPH-Komplex, wesentlich höher als der von m/z 210 war. Aufgrund der gleichen Konzentration von FA und ^{13}C -FA sollte die Intensität der beiden Signale annähernd gleich hoch sein. Im SIM-Modus, welcher nur die Masse 210 und Masse 211 zusammen erfasste, wurde das gleiche Problem beobachtet. Das Flächenintegral der Masseneinheit 211 war immer größer als das der Masseneinheit 210. In den SIM-Modi, in denen zuerst nur die Masse 211 und im zweiten Durchgang die Masse 210 erfasst wurde, war das Flächenintegral von m/z 211 immer noch größer als das von m/z 210, aber das Flächenintegral von m/z 210 näherte sich dem Flächenintegral von m/z 211 an. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass das verwendete Massenspektrometer nicht in der Lage ist, zwei Moleküle, die sich in nur einer Molekülmasse von 1 g/mol unterscheiden, nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis korrekt aufzutrennen. Dadurch wird die Signalhöhe von m/z 211 nicht nur durch Masseteilchen mit m/z 211, sondern auch durch die Moleküle der Masseneinheit 210 verursacht. Dafür wären also höher auflösende Massenspektrometer nötig.

7.2.1.5 d-FA als interner Standard

Aufgrund der Vermutung, dass das Massenspektrometer ^{13}C -FA als interner Standard und ^{12}C -FA der Masse nach nicht auftrennen kann, wurde d-FA als interner Standard verwendet. D-FA hat eine Molekülmasse von 32 g/mol und ist damit zwei Masseinheiten schwerer als FA ($M=30$ g/mol). Das Derivat von d-FA mit DNPH hat dann eine Molekülmasse von 212 g/mol (s. Abbildung 37).

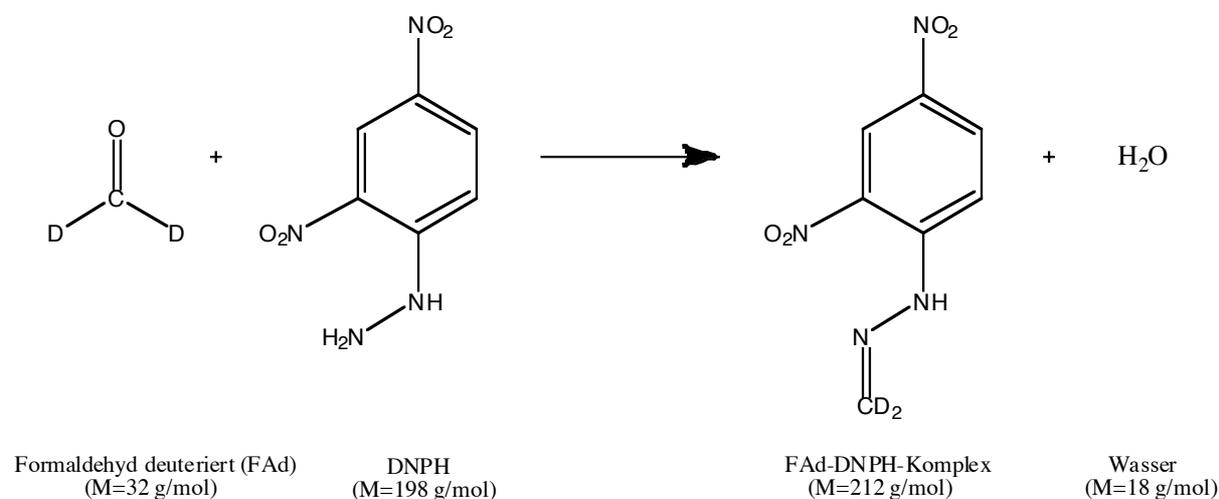


Abbildung 37: Derivatisierung von deuteriertem Formaldehyd (d-FA) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Es entsteht d-FA-DNPH mit einer Molekülmasse von 212 g/mol

Der d-FA-DNPH-Komplex mit der Molekülmasse von 212 g/mol konnte mittels GC-MS nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ^{13}C -FA konnte bei der Verwendung von d-FA der entstehende d-FA-DNPH-Komplex gegenüber dem ^{12}C -FA-DNPH-Komplex durch das MS aufgetrennt werden. Dies war daran zu erkennen, dass bei den Proben, die ^{12}C -FA und d-FA im gleichen Verhältnis enthielten, die Flächenintegrale von m/z 210 für den ^{12}C -FA-Komplex und m/z 212 für den d-FA-DNPH-Komplex annähernd gleich groß waren. Deshalb eignet sich d-FA als interner Standard und konnte als solcher für den FA-Nachweis in dentalen Kompositen mittels GC-MS verwendet werden. Ebenso wie ^{13}C -FA dient d-FA der technischen und chemischen Validation.

Auffällig war, dass der detektierte FA-DNPH-Gehalt und der d-FA-DNPH-Gehalt nicht mit der eingesetzten FA- und/oder d-FA-Konzentration korrelierten. Die Flächenintegrale von m/z 212 und m/z 210 der 1 % Lösungen waren nur geringfügig größer als die Flächenintegrale der 0,1 % Lösungen. Die nachgewiesene Menge des FA-DNPH-Komplexes

und des d-FA-DNPH-Komplexes war demnach nicht proportional zur FA- bzw. d-FA-Konzentration der Probe. Die Änderung des Gehalts an dem Derivatisierungsreagenz ergab keinen nennenswerten Einfluss auf das Analyseergebnis. Die fehlende Korrelation der detektierten FA- und d-FA-DNPH-Komplexe zur FA-/d-FA-Konzentration gibt Hinweise, dass die Derivatisierung von FA und d-FA mit DNPH nicht optimal abläuft. Es sollte deshalb in den weiteren Schritten versucht werden, die Derivatisierungsbedingungen zu optimieren (s. 7.2.1.6 und 7.2.1.7). Bisher wurde DNPH zu 15,6 mM in 1 N HCl gelöst.

7.2.1.6 FA-DNPH-Komplex

Um zu klären, ob der eingeschränkte Nachweis des FA-DNPH- und des deuterierten FA-DNPH-Komplexes aufgrund eines Gerätefehlers oder wegen fehlender Derivatisierung erfolgt, wurde eine Verdünnungsreihe von FA-DNPH in EtOH mit einem erhältlichen FA-DNPH-Komplex in Pulverform aufgestellt. Von der 0,5 % bis zur 0,05 % FA-DNPH-Lösung konnte in jeder Messung der FA-DNPH-Komplex anhand des Signals bei m/z 210 nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass bei fehlendem FA-DNPH-Nachweis oder einer zu geringen Nachweismenge in den vorherigen Messungen die Derivatisierung von FA mit DNPH nur unvollständig oder überhaupt nicht ablief. Mit dem erhältlichen FA-DNPH-Komplex konnte auch eine Verdünnungsreihe aufgestellt werden, bei der die Größe des Flächenintegrals von m/z 210 proportional zur Konzentration abnahm. Dennoch war diese als Standard-Verdünnungsreihe nicht optimal geeignet, da kein interner Standard mit zugefügt ist. D-FA sollte als interner Standard verwendet werden. Bei der Verdünnungsreihe von FA-DNPH ist kein zusätzliches DNPH vorhanden, um d-FA zu derivatisieren. DNPH müsste dafür zusätzlich zu den jeweiligen Verdünnungsstufen der FA-DNPH-Proben gegeben werden. Da die Derivatisierung mit DNPH, welches zu 15,6 mM in 1 N HCl verdünnt war, nicht zuverlässig war, musste versucht werden, die Derivatisierungsmethode zu optimieren.

7.2.1.7 Optimierung der Derivatisierungsreaktion

Da der kommerziell erhältliche FA-DNPH-Komplex gut in EtOH zu lösen war, wurde für den Versuch die Derivatisierungsreaktion zu verbessern, DNPH (herstellereitig in H₃PO₄ gelöst) in EtOH direkt verdünnt. DNPH (in H₃PO₄ gelöst) wurde zuerst in 1 N HCl verdünnt an Anlehnung der FA-Derivatisierungsverfahren mit DNPH, die in der Literatur beschrieben sind [188-190]. Die Derivatisierungsreaktion von FA mit in EtOH gelöstem DNPH reagierte besser, da in den meisten Proben der FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden konnte. Mit

allen drei verschiedenen DNPH-Konzentrationen (15,6 mM, 7,8 mM und 1,56 mM) in EtOH lief die Derivatisierung besser ab als wenn DNPH in 1 N HCl verdünnt wurde.

Der Vergleich der Derivatisierungsreaktion zwischen DNPH als Pulver und in H₃PO₄ gelöstes DNPH (beide in EtOH zu 15,6 mM verdünnt) brachte keine wesentlichen Unterschiede im Bezug der Nachweisempfindlichkeit des FA-DNPH-Komplexes. Deshalb wurde aufgrund der besseren Handhabung mit DNPH, welches in H₃PO₄ gelöst war, weitergearbeitet.

7.2.1.8 15,6 mM DNPH in d-EtOH und in Acetonitril

Es wurde eine Verdünnungsreihe von FA in d-EtOH hergestellt und gemessen. Als interner Standard war 0,1 % d-FA zugefügt. Es war eine Verdünnungsreihe von FA aufstellbar und d-FA konnte nachgewiesen werden. Allerdings ließ nach diesem Messdurchgang die Sensitivität aufgrund der Matrixbelastung des GC-MS deutlich nach. Eine Verunreinigung des Gerätes während der Messung war unvermeidbar. Da die 0,5 % FA-Lösung mit DNPH nicht in EtOH löslich war, sollte ein anderes Lösungsmittel mit besserer Löslichkeit für den FA-DNPH-Komplex verwendet werden. Es wurde mit Acetonitril als Lösungsmittel weitergearbeitet. Bei Herstellung der FA-Verdünnungsreihe in Acetonitril mit 15,6 mM DNPH fiel bei der 0,5 % FA-Lösung kein FA-DNPH-Komplex aus. Mit Acetonitril als Lösungsmittel konnten drei Messreihen durchgeführt werden. Dabei konnte eine Verdünnungsreihe aufgestellt werden, bei der der nachgewiesene FA-DNPH-Komplex proportional mit der FA-Konzentration abnahm und FA bis 0,001 % nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht einer FA-Konzentration von 10,8 µg/ml. D-FA, welches mit 0,1 % als interner Standard zugefügt war, konnte ebenfalls in jeder Probe nachgewiesen werden. Auch nach dieser Versuchsreihe zeigte eine Überprüfung des Gerätes, dass wieder Säule und Liner der GC matrixbelastet waren. Aufgrund dieser weiteren hohen Belastung des Messgerätes wurde die DNPH-Konzentration von 15,6 mM auf 1,56 mM reduziert.

7.2.1.9 1,56 mM DNPH in Acetonitril und Erstellen einer Kalibrierkurve

Es war eine FA-Standardverdünnungsreihe in Acetonitril mit 1,56 mM DNPH aufstellbar, bei der in jeder Konzentration der FA-DNPH-Komplex nachgewiesen werden konnte. Die beiden zugefügten internen Standards CF und d-FA wurden auch nachgewiesen. Es wurde das Verhältnis des Flächenintegrals der Masseneinheit 210 zum Flächenintegral der Masseneinheit 212 berechnet. Mit diesem Verhältnis für die verschiedenen Verdünnungsstufen von FA wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Da die Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 212 von FA-Lösungen bei der gleichen Konzentration stark variieren

können, werden diese durch Bildung des Verhältnisses wieder ausgeglichen, da beide Flächenintegrale von m/z 210 und m/z 212 innerhalb der Messreihen gleichermaßen schwanken.

Anhand des berechneten Verhältnisses m/z 210 zu m/z 212 (s. Tabelle 47) kann man mittels der Kalibrierkurve (Abbildung 29) die FA-Konzentration in der Komposit-Probe bestimmen.

7.2.2 FA-Nachweis in Zahnkompositen mittels GC-MS

Sowohl in dem unpolymerisierten Komposit als auch im Eluat des polymerisierten Komposits konnte kein FA mittels GC-MS nachgewiesen werden. Wenn ein FA-DNPH-Komplex mit der Masse 210 gemessen wurde, war der Gehalt des Komplexes so gering, dass das Signal im Bereich des Basisrauschens lag. Das berechnete Verhältnis 210/212 lag dabei unter dem Verhältnis der 0,001 % FA-Konzentration und befand sich im Bereich des Verhältnisses einer alleinigen d-FA-Lösung, in der aufgrund des natürlichen Isotopenverhältnisses auch in geringer Menge FA enthalten sein kann. Auch nach 50 und 70 Tagen konnte in den Eluaten der gehärteten Kunststoffe kein FA nachgewiesen werden. Die Eluate wurden nach 50 und 70 Tagen wieder gemessen, da in einer Studie von Oysaed [97] eine FA-Freisetzung bei gehärteten Kompositen bis zum 150. Tag festgestellt wurde, wobei die Konzentration des eluierten FA geringer wurde. Dass im Gegensatz zu der älteren Studie kein FA nachweisbar war, könnte in einer verbesserten Herstellung und Zusammensetzung der neueren Komposite begründet sein. So wurde auch in einer Studie, in denen ältere und neuere Wurzelkanalversiegeler auf eine FA-Freisetzung mittels Spektrometrie untersucht wurden, wesentlich geringere Mengen FA in den neueren Wurzelkanalversiegeler gefunden [187]. Es muss jedoch beachtet werden, dass in der Standardverdünnungsreihe bis zu 0,001 % FA dieses sicher nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht einer FA-Konzentration von 0,36 mM bzw. 10,8 $\mu\text{g/ml}$. Es ist nicht auszuschließen, dass in einer geringeren Konzentration als 0,36 mM, FA von Kompositen freigesetzt wird.

In den bisherigen Studien, in denen die FA-Freisetzung aus Zahnmaterialien wie Wurzelkanalversiegeler und dentalen Kompositen untersucht wurde, wurden andere Messmethoden als die GC-MS für den FA-Nachweis verwendet [97, 98, 187, 194]. In allen genannten Studien erfolgte der FA-Nachweis mit photometrischer Bestimmung alleine oder mit vorangehender HPLC und anschließender photometrischer Bestimmung. In zwei Studien wurde zur Untersuchung der Wurzelkanalversiegeler auf FA die Methode der Spektrometrie gewählt [98, 187]. Dabei wurde in der Studie von Koch [98] die Schlussfolgerung gezogen, dass es schwierig ist, anhand der Ergebnisse einen standardisierten *in-vitro* Test zu definieren,

der allgemein zur definitiven Bestimmung der FA-Freisetzung aus Wurzelkanalversiegler angewendet werden kann. In der Studie von Oysaed et al. [97] erfolgte der FA-Nachweis aus dentalen Kompositen mittels HPLC und anschließender photometrischer Bestimmung. Es wurde dabei eine FA-Freisetzung aus dentalen Kompositen zwischen $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nachgewiesen. Dieser Test ist hinsichtlich der Sensitivität mit der GC-MS Methode dieser Arbeit nicht zu vergleichen. Grund hierfür ist, dass in der publizierten Studie keine Angaben zur nachgewiesenen FA-Konzentration gemacht werden (sondern nur die FA-Menge/ cm^2), die Nachweisgrenze dieser Methode nicht genannt wird, das Gewicht der gemessenen Komposite nicht genannt ist und die untersuchten Prüfkörper mit $4,71 \text{ cm}^2$ eine wesentlich größere Fläche hatten als die untersuchten Komposite mit $0,79 \text{ cm}^2$ Fläche dieser Studie.

Es wurde für den FA-Nachweis aus dentalen Kompositen dieser Studie die Methodik der GC-MS aus folgenden Gründen gewählt: Die Untersuchung zur Identifizierung und Quantifizierung eluierbarer Substanzen aus Kompositkunststoffen erfolgt in dieser Arbeitsgruppe mittels GC-MS. Die Entwicklung einer FA-Nachweismethode aus dentalen Kompositen mittels GC-MS würde die Möglichkeit ergeben, diese beiden Untersuchungen zu verbinden und damit einen möglichen Zusammenhang zwischen der Menge an eluierbaren Substanzen und der Menge an eluierbaren FA zu untersuchen.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten GC-MS Methode konnten in keinem der sieben verwendeten Komposite FA-Gehalte oberhalb der Detektionsgrenze von $10,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ nachgewiesen werden. Die Fläche der in dieser Studie hergestellten Komposite war mit $0,79 \text{ cm}^2$ wesentlich kleiner als bei Oysaed et al. [97]. Mit einem Gewicht von $0,1 \text{ g}$ entspricht die Menge der hier untersuchten Komposite ca. der Menge, die im Zahn eingesetzt wird. Mit einer Nachweisgrenze von $10,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ FA aus $0,1 \text{ g}$ Komposit dieser GC-MS Methode kann nicht ausgeschlossen werden, dass $\text{FA} < 10,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. $< 10,8 \mu\text{g}$ pro $0,1 \text{ g}$ Komposit austreten kann. Die Nachweisgrenze ($10,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ aus $0,1 \text{ g}$ Komposit) stellt eine niedrige Nachweisgrenze dar, mit der eine Risikoabschätzung für Komposit-Träger bezüglich einer möglichen FA-Freisetzung aus Kunststofffüllungen erfolgen kann.

7.2.3 Ausblick/Risikoabschätzung

Dentale Komposite, Versiegler und Zahnprothesen finden sowohl in der Humanmedizin als auch hier in der Tiermedizin (wenn auch in geringerer Verbreitung als der Humanmedizin) Verwendung. Die Abklärung einer möglichen FA-Freisetzung aus diesen Materialien ist aufgrund der kanzerogenen und allergischen Eigenschaften von FA sowohl für den Patienten

als auch für das zahnmedizinische/tiermedizinische Fachpersonal, die täglich damit in Kontakt kommen, von größerer Bedeutung. In den sieben untersuchten Kompositen konnte mittels GC-MS in dieser Studie kein FA (bis zu 10,8 µg/ml) nachgewiesen werden. Es kann anhand der Nachweismethode nicht ausgeschlossen werden, dass eine FA-Menge < 10,8 µg pro 0,1 g Komposit freigesetzt wird. Wenn im worst-case Fall alle 32 Zähne mit einem Komposit von 0,1 g aus dieser Studie (z.B. Filtek™ Supreme XT) gefüllt sind, der im ungünstigsten Fall 10,7 µg FA pro Komposit freisetzt, werden aus 32 Kompositen (à 0,1 g) 342,4 µg FA freigesetzt. Bei einer Speichelproduktion von 1,2 l entspricht dies einer FA-Konzentration von 285 µg/l, die der Organismus in diesem Extremfall am Tag aufnehmen kann.

Um das Risiko einer krebserregenden Wirkung durch FA aus dentalen Kompositen abschätzen zu können, wird zunächst der MAK-Wert herangezogen. Der MAK-Wert gibt die maximale zulässige Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz an, bei der kein Gesundheitsschaden zu erwarten ist, auch wenn man der Konzentration in der Regel acht Stunden täglich ausgesetzt ist. Der MAK-Wert ist mittlerweile durch den Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) ersetzt, kann aber noch zur Beurteilung einer Gefährdung herangezogen werden. Der MAK-Wert von FA beträgt 0,37 mg/m³. Das Atemzugvolumen pro Atemzug beträgt zwischen 0,5 l in Ruhe und 2,5 l unter Belastung [195]. Bei 0,5 l Atemzugvolumen in Ruhe und 16 Atemzüge pro Minute, beträgt das Atemminutenvolumen 8 l/min. In 8 Stunden beträgt das eingeatmete Volumen schon ohne Belastung 3840 l. Dies bedeutet, dass bei einem FA-Gehalt von 0,37 mg/m³ in der Luft, der entsprechend des MAK-Wertes zu keiner Gefährdung führt, in Ruhe 1,42 mg FA eingeatmet werden können. Im Vergleich dazu ist die mögliche FA-Freisetzung von FA aus Kompositen, selbst die propagierten 342,4 µg bei allen 32 gefüllten Zähnen im worst-case Szenario gering (3,6 fach niedriger). In der Realität sind in der Regel nicht alle Zähne gefüllt, so dass von einer geringeren möglichen FA-Freisetzung von FA auszugehen ist. Formaldehyd ist zudem in der Kategorie 4 der Gruppe der krebserregenden Stoffe eingeordnet. Dies bedeutet, dass bei Einhaltung des MAK-Wertes kein Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten ist [115]. Allerdings bezieht sich der MAK-Wert auf die eingeatmete FA-Konzentration in der Atemluft. Der von dem BfR festgesetzte „safe“ Level bezieht sich ebenfalls auf die FA-Konzentration in der Luft und liegt bei 0,124 mg/m³ [104]. Diese 0,124 mg/m³ ist die tolerierbare FA-Konzentration, die in der Luft dauerhaft enthalten sein kann, ohne ein gesundheitliches Risiko zu verursachen [104]. An einem Tag (24 h) entspricht dies bei einem Atemminutenvolumen von 8 l/min in Ruhe einer FA-Menge von 1,43 mg, die der Mensch

täglich ausgesetzt ist. Auch hier ist die mögliche FA-Menge von 342,4 µg, die im worst case Fall freigesetzt werden könnten noch 4,1 fach niedriger. Aber da der „safe“ Level sich auf die inhalierte FA-Menge bezieht, ist dieser nicht einfach auf eine mögliche orale FA-Freisetzung aus Kompositkunststoffen zu übertragen. Ein „safe“ Level für die orale Aufnahme von FA wurde vom BfR noch nicht festgelegt [104].

In Tierversuchen konnte in Langzeitstudien über 2 Jahren bei Ratten bei oraler FA-Gabe über das Trinkwasser ein NOAEL (Dosis ohne erkennbare Wirkung) von 15 mg/kg Körpergewicht pro Tag ermittelt werden [196]. Ab 82 mg/kg Körpergewicht wurden Veränderungen der Magenschleimhaut festgestellt, aber keine Tumore [196]. Für Trinkwasser liegt der FA-Richtwert bei 0,9 mg/l [197]. Selbst dieser Wert liegt deutlich über den 0,29 mg/l FA, die maximal aus 32 Komposite im worst-case Fall austreten können. Die normalerweise im Trinkwasser gefundene FA-Menge ist kleiner 0,1 mg/ml, die daraus folgende Exposition von < 0,2 mg/Person/Tag ist vernachlässigbar gering [197, 198]. Die mögliche FA-Menge aus 32 Zähnen liegt mit 0,29 mg/l in einem ähnlichen Bereich wie durch die Aufnahme von FA aus dem Trinkwasser und ist deshalb ebenfalls vernachlässigbar gering. Die mittlere Aufnahme des Menschen von Formaldehyd, insbesondere mit der Nahrung, liegt bei bis zu 14 mg FA pro Tag [199, 200]. Die Nachweisgrenze von 10,8 µg pro Komposit liegt mit 0,011 mg FA um ein ca. 1300 faches niedriger als die mittlere FA-Menge, die von dem Menschen täglich aufgenommen wird. Selbst die maximal möglichen 0,34 mg FA aus 32 Kompositen in der worst-case Situation ist noch ca. 41 fach niedriger. Demnach vermögen die hier untersuchten Komposite, bei einer möglichen FA-Freisetzung unterhalb der Nachweisgrenze, die FA-Menge von 14 mg, die der Mensch im Schnitt aufnimmt, nicht ausschlaggebend zu erhöhen. Hinzu kommen andere unvermeidbare FA-Quellen, wie beispielsweise die FA-Exposition aus Luft, Desinfektionsmitteln und die endogene FA-Produktion. Diese erhöhen nochmals die FA-Menge, die der Organismus täglich ausgesetzt ist. In dieser Studie wurde mittels GC-MS in den untersuchten dentalen Kompositen bis zu 10,8 µg/ml pro Komposit kein FA nachgewiesen. Eine mögliche FA-Freisetzung unterhalb dieser Nachweisgrenze trägt, selbst im worst-case Fall mit einer möglichen FA-Freisetzung von 0,29 mg/ml, nicht wesentlich zur natürlichen FA-Menge, die der Organismus täglich unvermeidbar ausgesetzt ist, bei. Aufgrund dieses vernachlässigbaren möglichen FA-Beitrags ist bei diesen untersuchten dentalen Kompositen hinsichtlich der FA-Freisetzung nach dem jetzigen Forschungsstand von keiner toxischen Gefahr, auch im Hinblick eines krebserregenden Risikos, auszugehen.

Der FA-Nachweis mittels GC-MS in Zahnkompositen lief als Pilotstudie. Die Nachweisgrenze von 10,8 µg/ml ist ausreichend, um sicher sagen zu können, dass die FA-

Menge aus dentalen Kompositen, sollte es zu einer Freisetzung von FA unterhalb dieser Nachweisgrenze aus den Zahnmaterialien kommen, vernachlässigbar ist zu der FA-Menge, die der Organismus durch das ubiquitäre FA-Vorkommen ausgesetzt ist. Um die Nachweisgrenze zu verbessern, könnte in einem ersten Schritt einfach größere Mengen der Komposite bei geringerem Elutionsvolumen mit der gleichen GC-MS Methode verwendet werden und darüber hinaus die Methode weiter entwickelt werden. Als effiziente, vollautomatisierte FA-Nachweismethode, bei der keine aufwendigen Extraktionsverfahren nötig sind, wäre bei Weiterentwicklung dieser Methode die Etablierung in anderen Bereichen der Medizin und Tiermedizin durchaus denkbar.

8 Zusammenfassung

Kompositkunststoffe zählen in der Zahnmedizin zu den am häufigsten eingesetzten Füllungsmaterialien. In der Tiermedizin finden Kompositkunststoffe ebenfalls Anwendung. Aufgrund der weiten Verbreitung dentaler Komposite werden sie zunehmend auf ihre Biokompatibilität und Toxizität untersucht. Nicht polymerisierte Kompositbestandteile können in die Mundhöhle oder die Pulpa diffundieren oder werden durch Abrasion, Verschleiß und Elution aufgrund von Speichel, Getränke- und Nahrungszufuhr freigesetzt. Diese Freisetzung der Kompositbestandteile trägt wesentlich zur Biokompatibilität und Toxizität der Kompositkunststoffe bei. In verschiedenen Untersuchungen wurden vielen Kompositbestandteilen wie (Ko)Monomeren und Additiven unter anderem allergene, zytotoxische und genotoxische Effekte zugeordnet. Im Rahmen dieser Studien konnte nachgewiesen werden, dass (Ko)Monomere dentaler Komposite in Zellkulturen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) induzieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss von Antioxidantien auf die Induktion der DNA-DSB durch die (Ko)Monomere BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA bei humanen Gingivafibroblasten (HGF) mithilfe des γ -H2AX-Tests untersucht werden. In einem ersten Schritt wurden im γ -H2AX-Test ohne Zugabe von (Ko)Monomeren die fünf Antioxidantien (Ascorbinsäure (Asc), N-Acetylcystein (ACC), Retinylacetat, Trolox und Katalase) in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es wurde dabei die Konzentration des jeweiligen Antioxidans ermittelt, die zur Zellkultur gegeben werden kann, ohne dass diese selbst Schäden verursacht. Von den fünf untersuchten Antioxidantien führten Retinylacetat-Konzentrationen von 500 μ M und 200 μ M zu einem hohen Zellverlust und Asc in der höchsten angewendeten Konzentration von 500 μ M zu einer deutlichen Erhöhung der DNA-DSB. In einem weiteren Test wurden die vier (Ko)Monomere BisGMA, UDMA, EGDMA und GDMA ohne Antioxidantien und in Kombination mit 100 μ M Asc oder 500 μ M ACC im γ -H2AX-Test untersucht. Mithilfe des γ -H2AX-Testes konnte gezeigt werden, dass alle (Ko)Monomere in der höchsten angewendeten Konzentration bei HGF zu einer signifikanten ($p < 0,05$) höheren Anzahl an DNA-DSB führten. EGDMA und UDMA induzierten auch in niedriger angewendeten Konzentrationen eine signifikant höhere Anzahl an DNA-DSB. Asc (100 μ M) und ACC (500 μ M) konnten die durch alle vier (Ko)Monomere induzierten DNA-DSB/Zelle signifikant ($p < 0,05$) reduzieren. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die im Metabolismus von Kompositbestandteilen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Epoxide an den toxischen Eigenschaften dentaler Komposite beteiligt sind. ROS und Epoxide können zu zytotoxischen und genotoxischen Schäden, darunter auch zu DNA-

Schäden in Form von DNA-DSB führen. Antioxidantien wie Asc und ACC können in ihrer Funktion als Radikalfänger und Reduktionsmittel diese reaktiven Spezies abbauen und somit die Entstehung von DNA-DSB in Zellen reduzieren. Inwieweit das DNA-DSB induzierende Potential von Kompositbestandteilen und die Reduktion durch Antioxidantien in Zellkulturversuchen für die Entstehung möglicher toxischer Schäden durch dentale Komposite im Organismus von Bedeutung ist, ist nicht geklärt. Die Ergebnisse aus *in-vitro* Studien können nicht einfach *in-vivo* übertragen werden. Zur Prophylaxe kann die Supplementation von Asc oder ACC vor zahnärztlichen Eingriffen erwogen werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollten dentale Komposite auf eine mögliche Formaldehyd (FA)-Freisetzung untersucht werden. Da FA nicht nur wegen seiner kanzerogenen Eigenschaft von Bedeutung ist, sondern auch wegen der Eigenschaft, Allergien unter anderem Kontaktdermatiden, Haut- oder Augenreizungen verursachen zu können, trägt die Untersuchung dentaler Komposite in Hinblick auf eine mögliche FA-Freisetzung zur weiteren Abklärung der Toxizität und Biokompatibilität bei. Die quantitative Analyse von FA in dentalen Kompositen erfolgte mit der Methodik der GC-MS. Dafür musste eine Methode entwickelt werden. Für den FA-Nachweis mittels GC-MS war eine Derivatisierung von FA mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) nötig. Zur Entwicklung der FA-Nachweismethode wurden unter anderem die Reaktionszeit der Derivatisierung bestimmt, verschiedene Applikationsformen von FA und DNPH getestet, sowie verschiedene Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril) und die Eignung von ¹³C-markiertem Formaldehyd (¹³C-FA) und deuteriertem Formaldehyd (d-FA) als interner Standard untersucht. Als geeignete Methode des FA-Nachweises in dentalen Kompositen etablierte sich der Nachweis in Acetonitril, dem 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interne Standards und 1,56 mM DNPH als Derivatisierungsreagenz zugefügt wurden. Mit dieser Acetonitril-Lösung wurde für die Kalibrierung eine FA-Standardverdünnungsreihe hergestellt. Der FA-Nachweis in den unpolymerisierten Kompositen sowie in den Eluaten der polymerisierten Komposite erfolgte ebenfalls in dieser Acetonitril-Lösung mit 0,1 % d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interner Standard und 1,56 mM DNPH als Derivatisierungsreagenz. Es wurden die sieben dentale Komposite Filtek™ Silorane, Filtek™ Supreme XT, N'Durance® Flow, N'Durance® Norm, Tetric EvoCeram®, Tetric EvoFlow® und Voco Grandio Flow® auf eine FA-Freisetzung mittels GC-MS untersucht. Es konnte in keinem der sieben untersuchten Komposite, weder in dem unpolymerisierten Komposit noch in dem Eluat polymerisierter Prüfkörper, FA in Form des FA-DNPH-Komplexes nachgewiesen werden. Auch sieben und neun Wochen nach Polymerisation der Komposit-Prüfkörper konnte im Eluat kein FA nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der FA-Nachweisgrenze der angewandten Methode von 10,8 µg/ml, ist der Beitrag einer möglichen FA-Freisetzung der untersuchten dentalen Kompositen unterhalb dieser Nachweisgrenze, im Bezug zu der täglichen unvermeidbaren Exposition von FA für den Organismus durch die Nahrung, Luft und die endogene FA-Produktion vernachlässigbar.

9 Summary

Composite resins rank among the most frequently applied filling materials in dentistry. Likewise composite resins are used in veterinary medicine. Based on the wide prevalence of dental composite resins they are increasingly tested for their biocompatibility and toxicity. Unpolymerised composite components can diffuse into the oral cavity and the pulp, or be released by abrasion, attrition and by elution through saliva, intake of beverages and food. This release of composite components contributes essentially to the biocompatibility and toxicity of composite resins. In different studies composite components as (co)monomers and additives were classified among others with allergenic, cytotoxic and genotoxic effects. In the context of these previous studies it could be proven that (co)monomers of dental composites induce DNA double-strand breaks (DNA-DSB).

In the first part of this study the effect of antioxidants on the induction of DNA-DSB by the (co)monomers BisGMA, UDMA, EGDMA and GDMA in human gingival fibroblasts (HGF) should be investigated by use of γ -H2AX assay. In a first step, the five antioxidants (ascorbic acid (Asc), N-acetylcysteine (ACC), retinylacetate, trolox and catalase) were tested in different concentrations without (co)monomers using the γ -H2AX-assay. The concentration of the respective antioxidant, that can be added to the cell culture without this itself leading to damage was determined. Of the five investigated antioxidants, retinylacetate in the concentration of 500 μ M and 200 μ M caused a high loss of cells and Asc in the highest used concentration of 500 μ M, provoked a significant increase of DNA-DSB. In a further assay the four (co)monomers BisGMA, UDMA, EGDMA and GDMA were investigated without antioxidants and in combination with 100 μ M Asc or 500 μ M ACC in the γ -H2AX-assay. By means of γ -H2AX-assay it could be demonstrated that all (co)monomers in the highest used concentration caused a statistically higher number of DNA-DSB in HGF. EGDMA and UDMA induced even in lower used concentrations a significantly higher number of DNA-DSB. Asc (100 μ M) and ACC (500 μ M) could significantly reduce the number of DNA-DSB/cells that were induced by all four (co)monomers. This result supports the assumption that reactive oxygen species (ROS) and epoxides that emerge in the metabolism of composite components are involved in toxic properties of dental composites. ROS and epoxides can lead to cytotoxic and genotoxic damage including DNA damage in the form of DNA-DSB. As radical quencher and reducer antioxidants like Asc or ACC are able to degrade these reactive species therefore reducing the emergence of DNA-DSB in cells. It is not confirmed, how far the DNA-DSB induced potential of composite components and the reduction by antioxidants in cell culture studies are relevant to the emergence of potential toxic damage by dental

composites in the organism. It is impossible to simply transfer the results of *in-vitro* studies *in-vivo*. As prophylaxis the Asc or ACC supplementation can be considered ahead of dental surgery.

In the second part of this study dental composites should be tested for a potential release of formaldehyde (FA). Since FA isn't only relevant regarding its cancerogen property but also regarding the effect of causing allergies among others: contact dermatitis, skin irritations and eye irritations, the investigation of dental composites in view of the potential release of FA contributes to additional clarification of biocompatibility and toxicity. The quantitative analysis of FA in dental composites was conducted with the methodology of GC-MS. Therefore a method had to be developed. The derivatisation of FA with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was necessary for the detection of FA by use of GC-MS. For the development of reference method of FA the reaction time of derivatisation, tested different routes of administrations of FA and DNPH, investigated different solvents (methanol, ethanol, acetonitrile) and probing the aptitude of ¹³C-marked formaldehyde (¹³C-FA) and of deuterated formaldehyde (d-FA) for internal standard were among other things appointed. As an appropriate proving method of FA in dental composites, it emerged the proof of FA in acetonitrile to which 0,1 % d-FA and 0,1 mg/ml caffeine as internal standards and 1,56 mM DNPH as reagent of derivatisation were added. For calibration a standard serial dilution was made by this acetonitrile solution. The detection of FA in unpolymerised composites and in the eluate of polymerised composites was effected likewise by means of this acetonitril solution with 0,1 % d-FA, 0,1 mg/ml caffeine as internal standards and 1,56 mM DNPH as reagent of derivatisation. The seven dental composites, Filtek™ Silorane, Filtek™ Supreme XT, N'Durance® Flow, N'Durance® Norm, Tetric EvoCeram®, Tetric EvoFlow® und Voco Grandio Flow®, were tested for release of FA by means of GC-MS. FA in terms of FA-DNPH couldn't be proven in one of the seven composites, neither in the dissolved unpolymerised composite nor in the eluate of polymerised specimen. Moreover seven and nine weeks after polymerisation of composite specimen FA couldn't be proven in the eluate. Allowing for a FA detection limit of this used method by 10,8 µg/ml, the contribution of a potential release of FA from investigated dental composites below this detection limit is negligible in relation to daily inevitable exposition of FA for the organism through food, air and the endogenous FA production.

10 Literaturverzeichnis

- [1] Vallittu PK, Vallittu AS, Lassila VP. Dental aesthetics-a survey of attitudes in different groups of patients. *J Dent.* 1996;24:335-8.
- [2] Geurtsen W. Amalgam in der Diskussion. *Philip J.* 1990;7:121-8.
- [3] Hickel R. Moderne Füllungswerkstoffe. *Dtsch Zahnarztl Zeitung.* 1997;52:572-85.
- [4] Dupont GA. Modern Restorative Materialf for Veterinary Dentistry. *International Veterinary Information Servis (IVIS).* 2000.
- [5] Schnuch A, Uter W, Geier J, Frosch PJ, Rustemeyer T. Contact allergies in healthcare workers. Results from the IVDK. *Acta Derm Venereol.* 1998;78:358-63.
- [6] Oshima H, Kawahara D, Kosugi H, Nakamura M, Sugai T, Tamaki T. Epidemiologic study on occupational allergy in the dental clinic. *Contact Dermatitis.* 1991;24:138-9.
- [7] Henriks-Eckerman ML, Suuronen K, Jolanki R, Alanko K. Methacrylates in dental restorative materials. *Contact Dermatitis.* 2004;50:233-7.
- [8] Piirila P, Hodgson U, Estlander T, Keskinen H, Saalo A, Voutilainen R, et al. Occupational respiratory hypersensitivity in dental personnel. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002;75:209-16.
- [9] Biocina-Lukenda D, Gregurek-Novak T, Cekic-Arambasin A. Denture stomatitis associated with allergic reaction to teeth prostheses. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18:227-9.
- [10] Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* 1996;104:298-305.
- [11] Wada H, Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Ebisu S. In vitro estrogenicity of resin composites. *J Dent Res.* 2004;83:222-6.
- [12] Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998;41:474-80.
- [13] Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol.* 2006;80:370-7.
- [14] Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, et al. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials.* 2005;26:4111-8.
- [15] Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85:870-7.

- [16] Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res.* 1998;415:119-30.
- [17] Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials.* 2010;31:2010-4.
- [18] 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;49:125-31.
- [19] NTP. Report on Carcinogens, Twelfth Edition: Formaldehyde. Research Triangle Park, NC: US Department of Health and Human services, Public Health services, National Toxicology Programm. 2011:499 pp.
- [20] Latorre N, Silvestre JF, Monteagudo AF. [Allergic contact dermatitis caused by formaldehyde and formaldehyde releasers]. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102:86-97.
- [21] Ruyter IE. Composites-characterization of composite filling materials: reactor response. *Adv Dent Res.* 1988;2:122-9.
- [22] Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Kompositrestaurationen. München: Deutscher Ärzte-Verlag; 2009. p. 181-240.
- [23] Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials.* 2007;28:3757-85.
- [24] Lim BS, Ferracane JL, Condon JR, Adey JD. Effect of filler fraction and filler surface treatment on wear of microfilled composites. *Dent Mater.* 2002;18:1-11.
- [25] Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6:302-18.
- [26] Ferracane JL, Condon JR. In vitro evaluation of the marginal degradation of dental composites under simulated occlusal loading. *Dent Mater.* 1999;15:262-7.
- [27] Janda R. Der Stand der Entwicklung auf dem Gebiet der Zahnfüllungskunststoffe (I). *Quintessenz.* 1988:1067-73.
- [28] Janda R. Der Stand der Entwicklung auf dem Gebiet der Zahnfüllungskunststoffe (II). *Quintessenz.* 1988;7:1243-53.
- [29] Janda R. Der Stand der Entwicklung auf dem Gebiet der Zahnfüllungskunststoffe (III). *Quintessenz.* 1988:1393-8.
- [30] McCabe JF, Wassell RW. Hardness of model dental composites - the effect of filler volume fraction and silanation. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10:291-4.
- [31] Durner J. Klinisch-chemische Analytik dentaler Materialien, kumulative Habilitationsschrift der Ludwig-Maximilians-Universität München. 2010.

- [32] Bowen RL. Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues. XVIII: synthesis of a polyfunctional surface-active comonomer. *J Dent Res.* 1979;58:1101-7.
- [33] Roulet J. Degradation of dental polymers. München: Karger Verlag; 1987.
- [34] Chiang YC, Rosch P, Dabanoglu A, Lin CP, Hickel R, Kunzelmann KH. Polymerization composite shrinkage evaluation with 3D deformation analysis from microCT images. *Dent Mater.* 2010;26:223-31.
- [35] Alomari Q, Ajlouni R, Omar R. Managing the polymerization shrinkage of resin composite restorations: a review. *SADJ.* 2007;62:12-6.
- [36] Eick JD, Welch FH. Polymerization shrinkage of posterior composite resins and its possible influence on postoperative sensitivity. *Quintessence Int.* 1986;17:103-11.
- [37] Sidhu SK, Henderson LJ. Dentin adhesives and microleakage in cervical resin composites. *Am J Dent.* 1992;5:240-4.
- [38] Hickel R, Kaaden C, Paschos E, Buerkle V, Garcia-Godoy F, Manhart J. Longevity of occlusally-stressed restorations in posterior primary teeth. *Am J Dent.* 2005;18:198-211.
- [39] Vasudeva G. Monomer systems for dental composites and their future: a review. *J Calif Dent Assoc.* 2009;37:389-98.
- [40] De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005;84:118-32.
- [41] Ruyter IE. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odontol Scand.* 1981;39:27-32.
- [42] Chung KH, Greener EH. Correlation between degree of conversion, filler concentration and mechanical properties of posterior composite resins. *J Oral Rehabil.* 1990;17:487-94.
- [43] Gerzina TM, Hume WR. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994;21:463-8.
- [44] Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent.* 1998;26:137-45.
- [45] Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:687-95.
- [46] Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:333-55.
- [47] Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994;21:441-52.

- [48] Reichl FX, Durner J, Kehe K, Manhart J, Folwaczny M, Kleinsasser N, et al. Toxicokinetic of HEMA in guinea pigs. *J Dent*. 2002;30:353-8.
- [49] Reichl FX, Durner J, Kunzelmann KH, Hickel R, Spahl W, Hume WR, et al. Biological clearance of TEGDMA in guinea pigs. *Arch Toxicol*. 2001;75:22-7.
- [50] Reichl FX, Durner J, Manhart J, Spahl W, Gempel K, Kehe K, et al. Biological clearance of HEMA in guinea pigs. *Biomaterials*. 2002;23:2135-41.
- [51] Reichl FX, Durner J, Hickel R, Spahl W, Kehe K, Walther U, et al. Uptake, clearance and metabolism of TEGDMA in guinea pigs. *Dent Mater*. 2002;18:581-9.
- [52] Reichl FX, Durner J, Hickel R, Kunzelmann KH, Jewett A, Wang MY, et al. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. *J Dent Res*. 2001;80:1412-5.
- [53] Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res*. 2002;81:265-9.
- [54] Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7:172-9.
- [55] 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;111:529-35.
- [56] Lonroth EC, Shahnava H. Adverse health reactions in skin, eyes, and respiratory tract among dental personnel in Sweden. *Swed Dent J*. 1998;22:33-45.
- [57] Reichl FX, Durner J, Kehe K, Thomas P, Hickel R. Uptake and distribution of the dental composite component BisGMA in guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010;381:62.
- [58] Durner J, Kreppel H, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX. The toxicokinetics and distribution of 2-hydroxyethyl methacrylate in mice. *Biomaterials*. 2009;30:2066-71.
- [59] Reichl FX, Seiss M, Kleinsasser N, Kehe K, Kunzelmann KH, Thomas P, et al. Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs. *J Dent Res*. 2008;87:378-80.
- [60] Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res*. 1990;98:261-7.
- [61] Oilo G. Biodegradation of dental composites/glass-ionomer cements. *Adv Dent Res*. 1992;6:50-4.
- [62] Seiss M, Nitz S, Kleinsasser N, Buters JT, Behrendt H, Hickel R, et al. Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes. *Dent Mater*. 2007;23:9-16.

- [63] Reichl FX, Seiss M, Buters J, Behrendt H, Hickel R, Durner J. Expression of CYP450-2E1 and formation of 2,3-epoxymethacrylic acid (2,3-EMA) in human oral cells exposed to dental materials. *Dent Mater.* 2010;26:1151-6.
- [64] Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M, et al. Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:155-60.
- [65] Koskinen M, Plná K. Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact.* 2000;129:209-29.
- [66] Koivisto P, Kilpelainen I, Rasanen I, Adler ID, Pacchierotti F, Peltonen K. Butadiene diolepoxide- and diepoxybutane-derived DNA adducts at N7-guanine: a high occurrence of diolepoxide-derived adducts in mouse lung after 1,3-butadiene exposure. *Carcinogenesis.* 1999;20:1253-9.
- [67] Lindstrom M, Alanko K, Keskinen H, Kanerva L. Dentist's occupational asthma, rhinoconjunctivitis, and allergic contact dermatitis from methacrylates. *Allergy.* 2002;57:543-5.
- [68] Geukens S, Goossens A. Occupational contact allergy to (meth)acrylates. *Contact Dermatitis.* 2001;44:153-9.
- [69] Schmalz G. *Biocompatibility of dental Materials: Resin-based Composites*, p.108 + 109, Springer Verlag. Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2009. 2010.
- [70] Mariotti A, Soderholm KJ, Johnson S. The in vivo effects of bisGMA on murine uterine weight, nucleic acids and collagen. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:1022-7.
- [71] Hashimoto Y, Nakamura M. Estrogenic activity of dental materials and bisphenol-A related chemicals in vitro. *Dent Mater J.* 2000;19:245-62.
- [72] Durner J, Walther UI, Zaspel J, Hickel R, Reichl FX. Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. *Biomaterials.* 2010;31:818-23.
- [73] Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007;23:688-95.
- [74] Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, et al. TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials.* 2009;30:2006-14.
- [75] Reichl FX, Simon S, Esters M, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N, et al. Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg(2+) in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol.* 2006;80:465-72.
- [76] Walther UI, Walther SC, Liebl B, Reichl FX, Kehe K, Nilius M, et al. Cytotoxicity of ingredients of various dental materials and related compounds in L2- and A549 cells. *J Biomed Mater Res.* 2002;63:643-9.

- [77] Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2010;26:51-8.
- [78] 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;11:49-63.
- [79] Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent.* 2004;32:229-34.
- [80] Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res.* 2001;80:2046-50.
- [81] Schweikl H, Schmalz G. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res.* 1999;438:71-8.
- [82] Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80:1615-20.
- [83] Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res.* 1996;368:181-94.
- [84] Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials.* 2006;27:1762-70.
- [85] Annertz K, Anderson H, Björklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer.* 2002;101:95-9.
- [86] Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol.* 2004;40:304-13.
- [87] Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck.* 2008;30:75-84.
- [88] Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck.* 2009;31:1228-39.
- [89] Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN, Couch ME, Rosenman JG. Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. *Head Neck.* 2010;32:499-503.
- [90] Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *Journal of oral microbiology.* 2010;2.

- [91] Divaris K, Olshan AF, Smith J, Bell ME, Weissler MC, Funkhouser WK, et al. Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer Causes Control*. 2010;21:567-75.
- [92] Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*. 2007;43:181-6.
- [93] Michaud DS, Liu Y, Meyer M, Giovannucci E, Joshipura K. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *The lancet oncology*. 2008;9:550-8.
- [94] Koivusalo M, Baumann M, Uotila L. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett*. 1989;257:105-9.
- [95] Thieme-Chemistry. Eintrag zu Formaldehyd in Römpp online (Version 3.18.) <http://www.roempp.com>. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.
- [96] Final Report on Carcinogens Background Document for Formaldehyde. Report on carcinogens background document for [substance name]. 2010:512.
- [97] Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvik Kleven IJ. Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res*. 1988;67:1289-94.
- [98] Koch MJ. Formaldehyde release from root-canal sealers: influence of method. *Int Endod J*. 1999;32:10-6.
- [99] Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand*. 1980;38:17-27.
- [100] Dekant W, Vamvakas S. Wichtige Gifte und Verbindungen: Gasförmige Stoffe aus "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie" München: Urban & Fischer-Verlag, 10. Auflage; 2009. p. 1026-34.
- [101] Hauksson I, Ponten A, Gruvberger B, Isaksson M, Bruze M. Clinically relevant contact allergy to formaldehyde may be missed by testing with formaldehyde 1.0%. *Br J Dermatol*. 2011;164:568-72.
- [102] Tang XQ, Ren YK, Chen RQ, Zhuang YY, Fang HR, Xu JH, et al. Formaldehyde induces neurotoxicity to PC12 cells involving inhibition of paraoxonase-1 expression and activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38:208-14.
- [103] Casanova M, Morgan KT, Gross EA, Moss OR, Heck HA. DNA-protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundam Appl Toxicol*. 1994;23:525-36.
- [104] BfR. Toxikologische Bewertung von Formaldehyd, Stellungnahme des BfR Nr. 023/2006. http://www.bfr.bund.de/cm/343/toxikologische_bewertung_von_formaldehyd.pdf. 2006.

- [105] Schmid E, Goggelmann W, Bauchinger M. Formaldehyde-induced cytotoxic, genotoxic and mutagenic response in human lymphocytes and *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*. 1986;1:427-31.
- [106] Ying CJ, Yan WS, Zhao MY, Ye XL, Xie H, Yin SY, et al. Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomed Environ Sci*. 1997;10:451-5.
- [107] Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res*. 1983;43:4382-92.
- [108] Kamata E, Nakadate M, Uchida O, Ogawa Y, Suzuki S, Kaneko T, et al. Results of a 28-month chronic inhalation toxicity study of formaldehyde in male Fisher-344 rats. *J Toxicol Sci*. 1997;22:239-54.
- [109] Soffritti M, Belpoggi F, Lambertin L, Lauriola M, Padovani M, Maltoni C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;982:87-105.
- [110] Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, Hayashi Y. Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Jpn J Cancer Res*. 1986;77:118-24.
- [111] Hauptmann M, Stewart PA, Lubin JH, Beane Freeman LE, Hornung RW, Herrick RF, et al. Mortality from lymphohematopoietic malignancies and brain cancer among embalmers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1696-708.
- [112] Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orłowski E, et al. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2002;13:147-57.
- [113] Marsh GM, Youk AO. Reevaluation of mortality risks from nasopharyngeal cancer in the formaldehyde cohort study of the National Cancer Institute. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;42:275-83.
- [114] MAK-Collection: Substance Overview for Formaldehyde. Wiley Online Library. 2012.
- [115] IFA. Stoffdatenblatt zu Formaldehyd. Gestis-Stoffdatenbank. <http://www.dguv.de/ifa/de/gestis/stoffdb/index.jsp>. 2011.
- [116] Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974;184:868-71.
- [117] Noll M. Internal structure of the chromatin subunit. *Nucleic Acids Res*. 1974;1:1573-8.
- [118] Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002;31:361-92.

- [119] Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:142-8.
- [120] Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2006;7:437-47.
- [121] Peterson CL, Cote J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* 2004;18:602-16.
- [122] Solomon JJ. DNA adducts of lactones, sultones, acylating agents and acrylic compounds. *IARC Sci Publ.* 1994:179-98.
- [123] Besaratinia A, Pfeifer GP. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat Res.* 2005;580:31-40.
- [124] Candeias LP, Steenken S. Reaction of HO* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)*. *Chemistry.* 2000;6:475-84.
- [125] Hildenbrand K, Schulte-Frohlinde D. ESR spectra of radicals of single-stranded and double-stranded DNA in aqueous solution. Implications for .OH-induced strand breakage. *Free Radic Res Commun.* 1990;11:195-206.
- [126] van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews Genetics.* 2001;2:196-206.
- [127] Gessler M. Veränderungen der genetischen Information: DNA-Reparaturmechanismen (aus Lehrbuch der Vorklinik (Schmidt, Unsicker)) Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1. Auflage; 2003. p. 501-15.
- [128] Bono R, Romanazzi V, Munnia A, Piro S, Allione A, Ricceri F, et al. Malondialdehyde-deoxyguanosine adduct formation in workers of pathology wards: the role of air formaldehyde exposure. *Chem Res Toxicol.* 2010;23:1342-8.
- [129] Kum C, Kiral F, Sekkin S, Seyrek K, Boyacioglu M. Effects of xylene and formaldehyde inhalations on oxidative stress in adult and developing rats livers. *Exp Anim.* 2007;56:35-42.
- [130] Saito Y, Nishio K, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology.* 2005;210:235-45.
- [131] Lu K, Collins LB, Ru H, Bermudez E, Swenberg JA. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia. *Toxicol Sci.* 2010;116:441-51.
- [132] Marinari UM, Ferro M, Sciaba L, Finollo R, Bassi AM, Brambilla G. DNA-damaging activity of biotic and xenobiotic aldehydes in Chinese hamster ovary cells. *Cell Biochem Funct.* 1984;2:243-8.

- [133] Speit G, Schmid O, Neuss S, Schutz P. Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* 2008;49:300-7.
- [134] Ohba Y, Morimitsu Y, Watarai A. Reaction of formaldehyde with calf-thymus nucleohistone. *Eur J Biochem.* 1979;100:285-93.
- [135] Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occup Environ Med.* 2003;60:403-9.
- [136] Li F, Liu P, Wang T, Bian P, Wu Y, Wu L, et al. Genotoxicity/mutagenicity of formaldehyde revealed by the *Arabidopsis thaliana* plants transgenic for homologous recombination substrates. *Mutat Res.* 2010;699:35-43.
- [137] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer.* 2003;3:155-68.
- [138] Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 2003;22:5612-21.
- [139] Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst).* 2006;5:1042-8.
- [140] Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 1998;17:5497-508.
- [141] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273:5858-68.
- [142] Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem.* 2000;275:9390-5.
- [143] Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004;64:2390-6.
- [144] Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999;146:905-16.
- [145] Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst).* 2004;3:959-67.
- [146] Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2004;6:168-70.

- [147] Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, et al. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet.* 2001;27:271-6.
- [148] Halicka HD, Huang X, Traganos F, King MA, Dai W, Darzynkiewicz Z. Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle.* 2005;4:339-45.
- [149] Kaneko H, Igarashi K, Kataoka K, Miura M. Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:1101-6.
- [150] Banath JP, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 2003;63:4347-50.
- [151] Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5706-15.
- [152] Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 2002;158:486-92.
- [153] Olive PL, Banath JP. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58:331-5.
- [154] Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen.* Springer Verlag, 2. Auflage; 2008. p. 151-310.
- [155] Schedle A, Ortengren U, Eidler N, Gabauer M, Hensten A. Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated? *Clin Oral Implants Res.* 2007;18 Suppl 3:232-56.
- [156] 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;49:125-31.
- [157] Urcan E. *DNA-Doppelstrangbrüche in humanen Gingiva-Fibroblasten nach Exposition mit dentalen Kompositmaterialien.* Dissertation an der Ludwig-Maximillan-Universität München. 2010.
- [158] Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod.* 1996;22:244-8.
- [159] Roth S, Zhang S, Chiu J, Wirth EK, Schweizer U. Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival. *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24:130-7.
- [160] Luley C. *Struktur der Lipide (aus Lehrbuch der Vorklinik Teil A (Schmidt, Unsicker)).* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1. Auflage; 2003. p. 220-4.
- [161] Koepsell H. *Die Zellmembran: Aufbau und Funktion (aus Lehrbuch der Vorklinik (Schmidt, Unsicker)).* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1. Auflage; 2003. p. 231-6.

- [162] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Weinheim: WILEY-VHC-Verlag, 1. Auflage; 1999. p. 369-434.
- [163] Frohlich E, Wahl R. Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture. *J Mol Med (Berl)*. 1999;77:189-92.
- [164] Xiong Y, Zhang D. Effect of retinoic acid on apoptosis and expression of Fas proteins in mouse blastocysts cultured in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2008;28:239-42.
- [165] Huang FJ, Shen CC, Chang SY, Wu TC, Hsuw YD. Retinoic acid decreases the viability of mouse blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2003;18:130-6.
- [166] Pasquali MA, Gelain DP, Oliveira MR, Behr GA, Motta LL, Rocha RF, et al. Vitamin A supplementation induces oxidative stress and decreases the immunocontent of catalase and superoxide dismutase in rat lungs. *Exp Lung Res*. 2009;35:427-38.
- [167] Schnorr CE, da Silva Morrone M, Simoes-Pires A, da Rocha RF, Behr GA, Moreira JC. Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Res*. 2011;1369:60-73.
- [168] Schnorr CE, Morrone Mda S, Weber MH, Lorenzi R, Behr GA, Moreira JC. The effects of vitamin A supplementation to rats during gestation and lactation upon redox parameters: increased oxidative stress and redox modulation in mothers and their offspring. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:2645-54.
- [169] Alakhras RS, Stephanou G, Demopoulos NA, Nikolaropoulos SS. Genotoxicity of all-trans retinoic acid (ATRA) and its steroidal analogue EA-4 in human lymphocytes and mouse cells in vitro. *Cancer Lett*. 2011;306:15-26.
- [170] Elmore AR. Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2005;24 Suppl 2:51-111.
- [171] Nefic H. The genotoxicity of vitamin C in vitro. *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih mediciniskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences*. 2008;8:141-6.
- [172] Koh WS, Lee SJ, Lee H, Park C, Park MH, Kim WS, et al. Differential effects and transport kinetics of ascorbate derivatives in leukemic cell lines. *Anticancer Res*. 1998;18:2487-93.
- [173] Reynolds M, Stoddard L, Bepalov I, Zhitkovich A. Ascorbate acts as a highly potent inducer of chromate mutagenesis and clastogenesis: linkage to DNA breaks in G2 phase by mismatch repair. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:465-76.
- [174] Bergstrom T, Bergman J, Moller L. Vitamin A and C compounds permitted in supplements differ in their abilities to affect cell viability, DNA and the DNA nucleoside deoxyguanosine. *Mutagenesis*. 2011;26:735-44.

- [175] Cadenas S, Barja G, Poulsen HE, Loft S. Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Carcinogenesis*. 1997;18:2373-7.
- [176] Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, et al. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*. 2003;278:20303-12.
- [177] Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9891-6.
- [178] Dorn SB, Degen GH, Bolt HM, van der Louw J, van Acker FA, van den Dobbelsteen DJ, et al. Some molecular descriptors for non-specific chromosomal genotoxicity based on hydrophobic interactions. *Arch Toxicol*. 2008;82:333-8.
- [179] Durner J, Spahl W, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX. Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater*. 2010;26:91-9.
- [180] 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;20:12-20.
- [181] Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kummerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater*. 2007;23:1535-41.
- [182] Mutschler E, Geisslinger G, Krömer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 8. Auflage; 2001. p. 751-3.
- [183] Klein EA, Thompson IM, Jr., Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011;306:1549-56.
- [184] Long-term study finds vitamin E supplements raise the risk of prostate cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2011;25:1236-7.
- [185] Giehring S. Aufbau und Einsatz eines Formaldehyd-Meßsystems zur kontinuierlichen Bestimmung von Immisiionskonzentrationen. Dissertation an der Universität Hamburg. 1999.
- [186] Hamann CP, Rodgers PA, Sullivan KM. Occupational allergens in dentistry. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:403-9.
- [187] Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88:221-5.
- [188] Maboudou P, Mathieu D, Bachelet H, Wiart JF, Lhermitte M. Detection of oxidative stress. Interest of GC-MS for malondialdehyde and formaldehyde monitoring. *Biomed Chromatogr*. 2002;16:199-202.

- [189] Cordis GA, Bagchi D, Maulik N, Das DK. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart. *J Chromatogr A*. 1994;661:181-91.
- [190] Sollenberg J, Linnerborg M, Bodin A, Karlberg AT. Primary oxidation products affect the quantification of formaldehyde in autoxidized fatty alcohol ethoxylates when using DNPH derivatization. *Contact Dermatitis*. 2003;48:12-6.
- [191] Kolliker S, Oehme M, Dye C. Structure Elucidation of 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives of Carbonyl Compounds in Ambient Air by HPLC/MS and Multiple MS/MS Using Atmospheric Chemical Ionization in the Negative Ion Mode. *Anal Chem*. 1998;70:1979-85.
- [192] Merck. Sicherheitsdatenblatt Paraformaldehyd. http://www.merck-chemicals.com/germany/paraformaldehyd/MDA_CHEM-104005/p_uE6b.s1L154AAAEWIuEfVhTl.
- [193] IFA. Stoffdatenblatt zu Paraformaldehyd. Gestis-Stoffdatenbank. <http://www.dguv.de/ifa/de/gestis/stoffdb/index.jsp>. 2011.
- [194] Koch MJ, Wunstel E, Stein G. Formaldehyde release from ground root canal sealer in vitro. *J Endod*. 2001;27:396-7.
- [195] Gros G. Atmung aus Lehrbuch der Vorklinik Teil C (Schmidt, Unsicker). Köln: Deutscher-Ärzte-Verlag, 1.Auflage; 2003. p. 254-69.
- [196] Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VH, Falke HE, Clary JJ. Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. *Food Chem Toxicol*. 1989;27:77-87.
- [197] WHO. World Health Organisation 2005 Formaldehyde in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water. http://www.who.int/water_sanitation-health/dwq/chemicals/formaldehyde130605.
- [198] Owen BA, Dudney CS, Tan EL, Easterly CE. Formaldehyde in drinking water: comparative hazard evaluation and an approach to regulation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1990;11:220-36.
- [199] Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res*. 1991;259:363-85.
- [200] Hauptmann M, Straif K, Pesch B. Organische Verbindungen/Formaldehyd aus Handbuch Umweltmedizin. *ecomed Medizin*; 2006. p. VI-4,1-27.

11 Anhang

11.1 Messergebnisse des γ -H2AX-Tests mit Antioxidantien ohne (Ko)Monomere

Tabelle 53: Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch Asc in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	Asc 500 μ M			Asc 200 μ M			Asc 100 μ M			Asc 50 μ M		
	Versuch			Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10	20	12	12	13	15	11	12	14	7	8	12
2	9	3	6	3	4	12	4	2	7	9	2	1
3	2	2	5	7	4	4	3		2	3	6	1
4	2	1	4	2	5	3			2	3	1	
5	2	2	2	1	3	6	1	1	4	5	1	1
6		3	5	2	2			1	4	1	1	
7		1	6	4	2	2		1	6	1	2	
8		2	3	2	1		1		6		2	1
9		4	4	1	1	2			1	1	1	
10		1	2	1							2	
11	1	1									1	
12			4		1	1			1			
13	2	1	2									
14		1		1								
15												
16	4				1							
17	2		1			1						
18												
19	1											
20	2	1										
21												
22												
23		1										
24	2	1										
25												
26												
27												
28												
29												
30	1											
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38	1											
39	1											
40												
41	4	1	6	2		1			2			
Summe positiver Zellen	46	46	62	38	37	47	20	17	49	30	27	16
Zellen gesamt	106	80	93	93	80	90	80	91	88	80	87	88

Tabelle 54: Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch ACC in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	ACC 500 μ M			ACC 200 μ M			ACC 100 μ M			ACC 50 μ M		
	Versuch			Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	9	15	12	9	15	11	6	13	15	8	9	12
2	7	5	9	9	3	8	4	10	5	9	3	4
3	3	3	3	1		8	3	3	5	2	3	4
4	3	1	2	2		4	3	5	3	3	1	
5	2	3	1	2	1	8	1	2	6	5		2
6	3			2		2		2	1	3		6
7			1			4	1		3	2	1	5
8	2		2	2		3	1	1	3			1
9	4		1			3		2	3	2	1	1
10	2					1	1		2	1		2
11	3		2	1		3	1		2			3
12			2						2			
13												1
14	3								1			
15									1			
16	2									1		
17												
18												
19												
20		1										
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31		1										
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41	1		1									
Summe positiver Zellen	44	29	36	28	19	55	21	38	52	36	18	41
Zellen gesamt	85	86	92	83	89	94	84	99	100	85	89	89

Tabelle 55: Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch Retinylacetat in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	Retinylacetat 500 μM			Retinylacetat 200 μM			Retinylacetat 100 μM			Retinylacetat 50 μM		
	Versuch			Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1		11	18	10	19	12	15	9	16	7	6	15
2		4	7	8	5	5	7	7	3	3	5	5
3		4	1	2	1	2	3	1	1	3	3	
4			1	4	3	1	1	1			3	2
5	1	1	1	3	4		4	1	4		1	
6		1			3	2		2			1	
7		1		2			1	1		2	1	1
8			1	2								
9			1				1					2
10	1		1	2				2	3			2
11						1	1		2			1
12			1	2				1				
13		1	2			1						
14			2	1	1							
15		1		1		1						
16								1				
17				2		1						
18				1								
19				1								
20		1										
21												
22												
23									1			
24												
25									1			
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41	3			2								
Summe positiver Zellen	5	25	36	43	36	26	33	26	31	15	20	28
Zellen gesamt	9	89	84	82	90	99	80	89	100	81	88	115

Tabelle 56: Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch Trolox in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	Trolox 500 μM			Trolox 200 μM			Trolox 100 μM			Trolox 50 μM		
	Versuch			Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10	12	17	16	14	13	14	12	8	10	14	8
2	6	6	6	6	4	4	6	5	6	3	7	4
3		9			2	1	4	4	2	1	3	1
4	2	2	2	2	1	2	2	2	1			3
5		2	3	1	1	2	2	3	4	2	1	3
6	1	5					1		2	1	2	
7	1	2	1			1	2		4			1
8	1	1		2			3	1	1	3		1
9	1	2	1				2		2			1
10			1			1			1	1	1	2
11						1	1		2			
12				1			1		1		1	2
13		1							1			
14						1			1			1
15												1
16						1						
17						1						
18												
19												
20			1				1					
21												
22												
23												
24												
25												
26												1
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41												1
Summe positiver Zellen	22	42	32	28	22	28	39	27	36	21	29	30
Zellen gesamt	83	90	101	85	97	95	113	92	93	80	102	81

Tabelle 57: Anzahl der induzierten Foci/Zelle durch Katalase in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	Katalase (10 µg/ml)			Katalase (5 µg/ml)			Katalase (1 µg/ml)			Katalase(0,5 µg/ml)		
	Versuch			Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	7	11	11	15	9	17	11	11	11	11	13	10
2	5	4	11	3	2	3	3	9	2	7	2	4
3	2	4	1	1	2	10	2	6		1	3	1
4		1	3	2		2			2	2		1
5	3	1	5	1		4			1			2
6	1	1	2	2		1	1	1		1		3
7	2		3	1		2		1	2	1		1
8	1		4			3		1				3
9	1		3			3	1					1
10			3			2	1					1
11			1			1		1				
12			1			1						1
13			1									
14												
15	1											
16									1			
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
41	2								1			1
Summe positiver Zellen	25	22	49	25	13	49	19	30	20	23	18	29
Zellen gesamt	90	92	98	85	98	104	85	94	108	83	99	86

Tabelle 58: Anzahl (N) der gemessenen Foci, die durch Medium (Negativkontrolle) und H₂O₂ (Positivkontrolle) induziert wurden

Anzahl der Foci/Zelle	Medium			H ₂ O ₂		
	Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3
1	14	16	14		1	
2	5	9	10		1	
3	7	8	1		3	
4	3	4	4	1	3	
5	3	3	2	4	4	1
6	2	3		2		1
7	1	1		5	6	
8	1			2	5	3
9	1	1	1	3	7	5
10			1	13	7	
11			1	7	5	1
12	2			8	6	2
13	1			3	4	5
14				6	6	9
15	1			5	2	7
16			1	3	2	2
17	1			1	2	5
18	2			1	1	6
19				1	1	3
20				4	2	5
21				1		2
22					2	5
23				1	1	1
24						1
25				1		2
26				1		1
27				1		1
28				1		1
29						
30						
31				1		1
32				1		1
33						
34						
35				1		
36						
37						
38					1	
39						
40					1	
41				9	3	10
Summe positiver Zellen	44	45	35	87	76	81
Zellen gesamt	90	88	100	87	77	81

11.2 Messergebnisse des γ -H2AX-Testes mit (Ko)Monomeren und Antioxidantien

Tabelle 59: Anzahl der Foci/Zelle, durch BisGMA in verschiedenen Konzentrationen induziert

Anzahl der Foci/Zelle	BisGMA (90 μ M)			BisGMA(30 μ M)			BisGMA (9 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	5	7	11	17	16	9	15	13	11
2	9	6	7	6	2	11	8	3	8
3	7	3	5	2	1		3	3	2
4	7	4	5	1	5	2	2	1	3
5	13	7	6	6	4	1	2	1	
6	5	3	4	2	2		2		
7	2	2	1	1	4		1		1
8	4	1	3	1	1		2		1
9	3	3	1		1	1	1	3	1
10	7	3		1	2	2	2	1	3
11		5	1		3	1	1	1	
12	1	1	2	2	1	1		1	1
13		1	2	1		2		2	
14		1	1		2	1			2
15		1	1			2			2
16		1			1				2
17		1	2						1
18		1							1
19		1							
20									2
21									
22									
23									1
24									
25									
26			1						
27									
28									
29									
30		1							
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	63	53	53	40	45	33	39	29	42
Zellen gesamt	86	82	82	85	84	85	80	84	92

Tabelle 60: Anzahl der Foci/Zelle, durch BisGMA in verschiedenen Konzentrationen mit 100 μM Asc induziert

Anzahl der Foci/Zelle	BisGMA (90 μM) u. Asc (100 μM)			BisGMA (30 μM) u. Asc (100 μM)			BisGMA (9 μM) u. Asc (100 μM)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10	3	2	11	8	11	9	9	16
2	5	8	9	2	3	4	5	4	6
3	4	3	6	1	4	3	1	3	
4	4	5	7	3	2	2	3	3	
5	8	5	6	4	1	2		6	2
6	1	5	3		1		1	1	
7	1	2	1		2		2	2	
8	2	3	1	1	1	1		2	1
9	1	4	1		1		1		
10		1		1	3	2	1	2	
11					3	2			1
12		1			2	1		2	
13						1			
14								1	
15					1	1			
16								1	1
17		1			1	1			
18						1			1
19									
20									
21					1				
22		1							
23			1						
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	36	42	37	23	34	32	23	36	28
Zellen gesamt	89	92	85	81	85	88	87	85	88

Tabelle 61: Anzahl der Foci/Zelle, durch BisGMA in verschiedenen Konzentrationen mit 500 μM ACC induziert

Anzahl der Foci/Zelle	BisGMA (90 μM) u. ACC (500 μM)			BisGMA (30 μM) u. ACC (500 μM)			BisGMA(9 μM) u. ACC (500 μM)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	12	12	4	13	16	15	18	13	9
2	3	6	6	2	6	4	6	4	6
3	5	5	2	5	2	1	3	2	2
4	5	7	3	4	2		2	5	2
5	6	4	4	2	2		3	3	
6	2	3	3	2	3	1		3	
7	4		7	2	4	1	1	2	
8	2		2		2			1	
9		2	2	1	1	1		2	1
10			1		1	1		1	1
11	1	1	1		1				1
12	1				1				
13									1
14	1	1				1			
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23	1								
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	43	41	35	31	41	25	33	36	23
Zellen gesamt	99	84	88	85	86	88	89	97	93

Tabelle 62: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch UDMA in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	UDMA (100 μ M)			UDMA (33,5 μ M)			UDMA (10 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	12	10	4	13	20	10	24	23	11
2	9	13	6	8	5	7	4	4	1
3	6	4	6	2	6	2	4	3	4
4	7	5	2	4	2	2	2	3	1
5	3	5	7	3	5	2	1	2	
6	5	8	1	1	7			1	2
7	2	2	6	3	4	1		3	2
8	2	3	5	3	3	2	3	4	2
9	2	3	1	1	3	3		1	2
10		2	1		1	1		2	1
11	1		1	2	1	1			3
12						2			1
13	1		2			3			2
14		1	1		1				1
15						1			
16								1	
17									1
18						2			
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	50	56	43	40	58	39	38	47	34
Zellen gesamt	93	87	88	83	94	100	88	115	87

Tabelle 63: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch UDMA in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	UDMA(100 μ M) u. Asc (100 μ M)			UDMA (33,5 μ M) u. Asc (100 μ M)			UDMA(10 μ M) u. Asc (100 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	12	8	8	14	11	12	12	11	15
2	6	12	5	6	2	5	10	5	5
3	2	3	4	1	2	2	4		2
4	4	5	1	3	2	1	3		2
5	2	2	3		3	1	4	1	1
6	3	2	1		5	2	1	1	3
7	2	3	1	1	1	1			1
8	3	1	1	1	2		1	1	1
9	1	2		1					2
10	1						1		2
11			1		1	2		1	
12		1	2				1		
13		1				2			1
14					1				
15									
16			1						
17		1				1			
18								1	2
19									
20									1
21			1						
22									
23									
24									
25									
26									
27						1			
28						1			
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	36	41	29	27	30	31	37	21	38
Zellen gesamt	95	92	85	82	86	90	89	95	90

Tabelle 64: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch UDMA in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μ M ACC

Anzahl der Foci/Zelle	UDMA(100 μ M) u. ACC (500 μ M)			UDMA(33,5 μ M) u. ACC (500 μ M)			UDMA (10 μ M) u. ACC (500 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	8	8	10	17	10	8	13	8	9
2	6	5	6	1	3	5	6	3	5
3	3	3	5	2		4	3	1	2
4	3	4	2	1	2	1	2	1	2
5	2	1	1	1	2	1		1	
6	2	1	1	2	1	2	2		1
7	3	1		5	2	1			2
8	3	3	1	2		1		2	
9	1	1	1		1	1			
10	2	1			2		1		
11					3	1			
12		1						1	
13									
14									1
15									
16	1		1						
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	34	29	28	31	26	25	27	17	22
Zellen gesamt	89	91	96	82	92	83	85	97	89

Tabelle 65: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch EGDMA in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	EGDMA (2720 μM)			EGDMA(906,7 μM)			EGDMA (272 μM)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	3	16	11	14	10	9	14	11	18
2	2	7	4	7	5	2	6	3	5
3	5	5	5	3	2	1	1		1
4	9	2		7				1	1
5	10	1	1	1	1	1		4	2
6	5	4	1	3	1	1		1	2
7	4	4	1		1	1		1	1
8	2	3		2	1	2	1		2
9	1	2		1			2	1	2
10	1	1	1		4	3		1	1
11	1			1	1	5			2
12	2		1	3	1	2	1	1	1
13	1		1	1		1	1	1	
14		1	1		1		1	2	1
15			3	1	2	2	2		
16			2	1	1	1			
17			1	1	1	1	1	1	1
18			2	1	1	1	1		1
19									
20			1		1	1	1		
21			2	1	1				
22			1			1			
23									
24			2		1				
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31			1						
32									
33	1								
34									
35		1							
36	1								
37									
38									
39									
40									
Multi damage	6	5							
Summe positiver Zellen	54	52	42	48	36	35	32	28	41
Zellen gesamt	80	81	101	84	96	88	85	93	86

Tabelle 66: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch EGDMA in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	EGDMA (2720 μM) u. Asc (100 μM)			EGDMA(906,7 μM) u. Asc (100 μM)			EGDMA (272 μM) u. Asc (100 μM)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	7	6	4	5	5	7	5	6	17
2	1	8	5	4	6	4	1		4
3	3	5	5	2	2	1		1	3
4	2	4	4	1	4	2	1	1	1
5	4	1	1		2	1	1		
6	2	5	1		1	1	1		
7	8	1				2	1	1	
8	1	1	1		1		1	1	
9	3							1	
10	2		1		1	1			1
11	2	1	1		1		1		
12			2						
13	1								
14								1	
15	1								
16		2				1			
17			1						
18		1							
19									
20	1	2							
21			1						
22									
23									
24			1						
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage		1							
Summe positiver Zellen	38	38	28	12	23	20	12	12	26
Zellen gesamt	82	83	88	89	81	84	85	80	91

Tabelle 67: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch EGDMA in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μ M ACC

Anzahl der Foci/Zelle	EGDMA (2720 μ M) u. ACC (500 μ M)			EGDMA(906,7 μ M) u. ACC (500 μ M)			EGDMA (272 μ M) u. ACC (500 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	10	13	8	12	10	12	9	10	10
2	6	8	6	6	3	2	6	5	5
3	3	5	2	1	3	2		3	
4	5	1	5	1	2	1	1	1	
5	3	1	4					4	1
6	7	2	1	2	2				1
7	5		1	1	1		1	2	2
8	3	2	1		1		1	1	1
9					2			1	
10	2	2		1	1	1			
11	2			2		1	1		
12	1						2	1	
13						1	1		
14		1		1	1		1		
15	1						1		
16	1			1					
17									
18									
19									
20	1	1		1					
21									
22									
23									
24				1					
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33				1					
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	50	36	28	31	26	20	24	28	20
Zellen gesamt	84	92	85	94	92	91	93	92	89

Tabelle 68: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch GDMA in verschiedenen Konzentrationen

Anzahl der Foci/Zelle	GDMA (2500 μM)			GDMA (833,3 μM)			GDMA (250 μM)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	9	11	12	11	7	8	16	9	11
2	1	5	12	5	3	3	3	6	6
3	4	7	3	5	1	1	2	1	3
4		7	3	2	3	2	2	2	3
5	3	5	2	5	1	2	1	2	1
6	2	2	2	1	1	1	1	3	3
7	1	2	2	3	1	3	2	2	
8			3	1	1	3		2	2
9			1		3		2	2	
10	2	1	3		2	1	4	1	
11	1				2		2	1	1
12			1		2			1	
13			1		3				1
14									
15		1	1		2		2		1
16			1				1	1	
17									
18					1			2	
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage	2	2		2					
Summe positiver Zellen	25	43	47	35	33	24	38	35	32
Zellen gesamt	56	87	103	82	87	88	88	89	82

Tabelle 69: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch GDMA in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 100 μ M Asc

Anzahl der Foci/Zelle	GDMA (2500 μ M) u. Asc (100 μ M)			GDMA (833,3 μ M) u. Asc (100 μ M)			GDMA (250 μ M) u. Asc (100 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	5	8	8		13	10	5	10	8
2	5	7	5	3	3	1	5	2	6
3	3	6	2	3		2	4	1	2
4	2	1	1				3	3	
5	2	1	1	1			2		2
6	3	2	1	2	2	1	1		3
7	1	3			1	2			3
8		2	1	1				1	4
9					1	1			2
10	2	1		2		2			
11		1						1	
12				1		3			
13						1			
14									
15				1	1				
16									
17		1							
18									
19									
20									
21			1						
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	23	33	20	14	21	23	20	18	30
Zellen gesamt	50	109	91	49	96	97	84	91	97

Tabelle 70: Anzahl der Foci/Zelle, induziert durch GDMA in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit 500 μ M ACC

Anzahl der Foci/Zelle	GDMA (2500 μ M) u. ACC (500 μ M)			GDMA (833,3 μ M) u. ACC (500 μ M)			GDMA (250 μ M) u. Asc (500 μ M)		
	Versuch			Versuch			Versuch		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	9	10	12	18	10	7	7	14	11
2	5	5	1	6	6	2	2	3	3
3	2	3		4			1	3	1
4	2	2	1	3	3	1	1		3
5	5	3	1	7	1	1	2	1	3
6	3	2			2	2	2	1	
7		3		4	2	1	1		
8	1			1		3	1		3
9	3						2	1	1
10	2					1	2		1
11					2		3		
12				1					
13					1	1	1		
14	1								
15									
16									
17									
18					1				
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
Multi damage									
Summe positiver Zellen	33	28	15	44	28	19	25	23	26
Zellen gesamt	84	93	96	84	90	85	86	95	87

Tabelle 71: Anzahl der gemessenen Foci, die durch Medium (Negativkontrolle) und H₂O₂ (Positivkontrolle) induziert wurden

Anzahl der Foci/Zelle	H ₂ O ₂ (1 mM)						Medium					
	Versuch						Versuch					
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
1							8	11	12	11	8	23
2							9	4	8	8	7	5
3							3	1	3	2	4	2
4	2		1				3	2	2	1		
5	3	1			1		1	1	4	1	1	1
6	2			1	2		2	1	2		3	1
7	1				3	2		1	3		4	
8		3	1	1	2						1	
9	3	2		2	5	1		1				
10	2	4	2	2	3	2	1	1				
11	2	5	1	2	3	1		2	2	1		
12	5	3	5	4	5	2		2	1	1		
13	5	6	3	6	2	3	1	1		1	1	1
14	3	5	6	6	3	2		1	1		1	
15	3	8	2	2	5	5	1	1				
16	3	4	9	5	2	2	1					
17	6	3	7	5	6	8	1			1		
18	5	3	5	6	2	1						
19		2	3	3	3	3						
20	2	6	5	6	1	3						
21	2	3	3	2	1	5						
22	1	3	3	4		1						
23		1		1	2	3						
24					2	5						
25	1		1	2		2						
26	1		1		1	2						
27	1	1		1	1	1						
28			1	1	1							
29	1	1	1			1						
30	1	1				1						
31			1									
32												
33					1							
34												
35			1	1								
36						1						
37		1		1								
38		1										
39												
40												
Multi damage	22	20	28	26	28	24				1	1	
Summe positiver Zellen	77	87	90	90	85	81	31	30	38	28	31	33
Zellen gesamt	83	87	91	90	85	81	104	94	91	104	90	95

Tabelle 72: Anzahl der gemessenen Foci, die durch 100 μM Asc und durch 500 μM ACC induziert wurden

Anzahl der Foci/Zelle	Asc (100 μM)						ACC (500 μM)					
	Versuch						Versuch					
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	1a	1b	2a	2b	3a	3b
1	20	14	10	15	9	9	19	16	14	14	12	19
2	7	10	5	3	2	3	5		6	5	7	5
3	1	1	2	1	1	3	5	1	2	3	2	1
4					1	3			1			
5		1	3	2	1	1	1	1		1	3	
6	3	1	2	1	4		2	3	1			
7		1			2		3		2	1	1	
8		1	2		3	2		1		2		
9	1	1		1	3	1	1		1		1	2
10		1	2		3	3			1	1	2	
11			1	1	1			1				
12		1		2	2	1		1	1		1	2
13		1	1			2		1				
14		1										1
15			1						1			
16				2						1		
17										1		
18				1		1						
19			1									
20						1		1				
21						1						
22								1				
23				1								
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												
40												
Multi damage					1							
Summe positiver Zellen	32	34	30	30	33	31	36	27	30	29	29	30
Zellen gesamt	96	102	87	93	94	97	93	81	90	92	93	100

11.3 GC-MS Messungen von FA-Verdünnungsreihen

Tabelle 73: GC-Messung von drei FA-Verdünnungsreihen in Acetonitril mit 15,6 mM DNPH und 0,1 % d-FA als interner Standard. Es sind die Flächenintegrale von m/z 79, 210 und 212, das Verhältnis von m/z 210/212 sowie die Mittelwerte (MW) angegeben

FA (%)	Flächenintegral von m/z			Verhältnis 210/212
	79	210	212	
0,5	2871708	1068043	294321	3,63
0,5	990771	398190	116365	3,42
0,5	673530	285718	48142	5,93
MW 0,5	1512003	583984	152943	4,33
0,25	885451	154171	68679	2,24
0,25	1391667	530587	195377	2,72
0,25	688966	278147	70924	3,92
MW 0,25	988695	320968	111660	2,96
0,1	1556629	483135	339656	1,42
0,1	501087	182642	73927	2,47
0,1	310051	113446	52648	2,15
MW 0,1	789256	259741	155410	2,02
0,05	1178341	292502	293452	0,1
0,05	2835875	825928	700261	1,18
0,05	439440	86990	65463	1,33
MW 0,05	1484552	401807	353059	1,17
0,025	1389846	187430	498897	0,38
0,025	1033538	177319	325158	0,55
0,025	666504	110347	201149	0,55
MW 0,025	1029963	158365	341735	0,46
0,01	1705423	175511	702578	0,25
0,01	1914991	217241	721306	0,30
0,01	783604	73110	258637	0,28
Mittelwert 0,01	1468006	155287	560840	0,28
0,005	952604	62250	380861	0,16
0,005	714385	35670	273526	0,13
0,005	445709	18610	71399	0,26
MW 0,005	704233	38843	241929	0,18
0,0025	1397165	50746	633812	0,08
0,0025	974524	71455	374103	0,19
0,0025	452649	18911	93814	0,2
MW 0,0025	941446	47037	367243	0,16

FA (%)	Flächenintegral von m/z			Verhältnis 210/212
	79	210	212	
0,001	2037708	63625	920470	0,07
0,001	679908	35302	181914	0,19
0,001	414194	20370	169632	0,15
MW 0,001	1043937	39766	424005	0,13

Tabelle 74: GC-Messung von drei FA-Verdünnungsreihen in Acetonitril mit 1,56 mM DNPH, 0,1 %d-FA und 0,1 mg/ml Coffein als interner Standard. Es sind die Flächenintegrale von m/z 79, 210, 212 und 194, das Verhältnis von m/z 210/212 sowie die Mittelwerte angegeben

FA (%)	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
0,5	1205445	311362	112164	1425089	2,78
0,5	1436647	408309	156955	1219831	2,6
0,5	453811	129919	47084	1220212	2,76
MW 0,5	1031968	283197	105401	1288377,33	2,71
0,25	570402	131642	55485	1189881	2,37
0,25	1818261	493087	160888	869287	3,06
0,25	547463	123892	63833	1048707	1,94
MW 0,25	978709	249540	93402	1035958,33	2,46
0,1	698104	156875	69947	1573344	2,24
0,1	934843	176704	162363	2204775	1,09
0,1	561195	98475	81893	1038914	1,20
MW 0,1	731381	144018	104734,33	1605677,67	1,51
0,05	611992	100823	118926	1554220	0,85
0,05	894766	75993	184662	1762400	0,41
0,05	735774	118905	133343	1661330	0,89
MW 0,05	747511	98573,67	145643,67	1659316,67	0,72
0,025	545311	73179	216516	1032807	0,34
0,025	683571	74022	155971	1535301	0,47
0,025	1569328	136351	392627	907309	0,35
MW 0,025	932737	94517,33	255038	1158472,33	0,39
0,01	729838	63795	171300	937899	0,37
0,01	2763071	207916	780264	1511065	0,27
0,01	1951855	115220	605833	115190	0,19
MW 0,01	1814921	128977	519132,33	854718	0,28
0,005	770853	75191	347829	1592470	0,22
0,005	2160097	118226	682057	3257040	0,17
0,005	592781	23735	166303	1430046	0,14
MW 0,005	1174577	72384	398729,67	2093185,33	0,18
0,0025	455964	14356	255428	1199226	0,06
0,0025	587189	11382	183864	1306712	0,06
0,0025	1681239	107650	886786	1058915	0,12
MW 0,0025	908130,67	44462,67	442026	1188284,33	0,08

FA (%)	Flächenintegral von m/z				Verhältnis 210/212
	79	210	212	194	
0,001	386310	14279	207103	1335452	0,07
0,001	590827	26898	304079	2507365	0,09
0,001	1535693	28996	924753	2462754	0,03
MW 0,001	837610	23391	478645	2101857	0,06

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Ermöglichung der Promotion an der Veterinärmedizinischen Fakultät der LMU, für die Korrektur und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung, seine Anregungen, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, die Korrektur der Arbeit, die stets vorhandene Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Jürgen Durner möchte ich herzlich danken für die stete Betreuung, die technische Unterstützung, die Anregungen, seine Geduld und für das Korrekturlesen. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und motivierte mich mit seiner Zuversicht, seinen Ideen und dem entgegengebrachten Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. R. Hickel möchte ich für die zur Verfügung gestellten Zahnwerkstoffe und für die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie danken.

Ferner möchte ich Herrn Stefan Schulz für seine technische Hilfestellung danken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und an mich geglaubt haben. Mein herzlicher Dank gilt insbesondere meinen Eltern Dr. Klaus Lottner und Sylvia Lottner, die mir meine gesamte Ausbildung und die Disserationsarbeit ermöglichten, meinen Geschwistern Stefanie Lottner-Nau und Matthias Lottner sowie Thomas Sommer.